# Molekulare und physiologische Charakterisierung der Ribonuklease LER aus *Solanum lycopersicum*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

# NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I BIOWISSENSCHAFTEN

# DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von

Sabine Köthke geb. am: 01.09.1970 in: Bismark/Altmark

Gutachterin bzw. Gutachter:

- 1. PD Dr. Margret Köck
- 2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
- 3. Prof. Dr. Thomas Roitsch

Halle (Saale), 29.07. 2011

# Zusammenfassung

RNasen sind an der Regulation verschiedener zellulärer Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse beteiligt. So sind z. B. RNaseLE und RNaseLX, zwei S-*like* RNasen aus *Solanum lycopersicum* während Wundheilungsprozessen bzw. unter Phosphat (Pi)-Mangelbedingungen induziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere S-*like* RNase, RNaseLER, aus *S. lycopersicum* isoliert und charakterisiert. Die genomische Sequenz von *RNaseLER* umfasst 5591 bp einschließlich des 908 bp langen Promotorbereiches. Ein Alignment der kodierenden und der gesamten genomischen Sequenz ergab, dass *RNaseLER* 6 Exons und 5 Introns aufweist, wobei sich die Introns an denselben Positionen wie in den Exon/Intron-Strukturen anderer bekannter T2-Typ-RNasen befinden. Anhand der Exon/Intron-Struktur und einer Homologie von bis zu 83 % auf Proteinebene ließ sich RNaseLER in die Klasse 2 der T2-Typ-RNasen einordnen. Southern-Analysen zeigten, dass *RNaseLER* im Tomatengenom als *single copy*-Gen vorliegt.

*RNaseLER* kodiert für ein Protein mit 260 Aminosäuren (AS). Im N-Terminus konnte ein Signalpeptid von 23 AS Länge identifiziert werden, das einen kotranslationalen Import des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (ER) vermitteln sollte. Ein ER-Retentionssignal (KDEL bzw. HDEL) ist in RNaseLER nicht vorhanden. Jedoch zeigte eine transiente Expression von RNaseLER als YFP-Fusion (RNaseLER::YFP) in *N. benthamiana,* dass diese RNase im ER lokalisiert ist.

Des Weiteren zeigten Promotor-GUS-Studien eine Aktivität des Promotors in Schließzellen und Trichomen transgener *N. benthamiana*-Linien. In Übereinstimmung damit konnten potentielle *cis*-Elemente für eine Schließzellen-spezifische Expression ((T/A)AAAG-Element) im Promotor von *RNaseLER* identifiziert werden. Diese Aktivität ist bisher für eine T2-Typ-RNase einzigartig.

Eine Funktion von RNaseLER in der Entwicklung sowie Differenzierung von Stomata und Trichome ist somit denkbar. Allerdings konnte auch eine GUS-Aktivität im Parenchymgewebe der Stängel, in Antheren sowie in seltenen Fällen auch in der Reifungsund Streckungszone der Wurzeln nachgewiesen werden.

Im Promotor von *RNaseLER* konnten zudem konservierte Boxen ermittelt werden, die unter anderem abscisinsäure- (ABA), trockenstress- und seneszenzabhängige sowie eine circadiane Genregulation vermitteln können. Darüber hinaus enthält der Promotorbereich W-Boxen, die in Pathogen- und Elicitorresponsivität von Genen involviert sind. *Real-time* RT-PCR-Analysen zeigten jedoch, dass ABA, osmotischer Stress oder Trockenheit keinen Effekt auf das Expressionsmuster von *RNaseLER* hat. Hingegen waren nach Behandlung der Blätter mit dem Ethylen-Analogon Ethephon und/oder der Ethylen-Vorstufe 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylsäure Unterschiede im Expressionsverhalten zu beobachten. Die Behandlung führte hier, anders als bei anderen T2-Typ-RNasen, die während der Seneszenz induziert werden, zu einer Verringerung der Transkriptmenge.

Ein leichter der Anstieg der Transkriptmenge konnte indes unter Phosphatmangel und nach *Phytophthora infestans*-Infektion beobachtet werden. Ein tatsächlicher Effekt dieser Faktoren bleibt genauer zu untersuchen.

# **Summary**

RNases are involved in the regulation of several cellular differentiation and development processes. For example, two S-like RNases from *S. lycopersicum*, RNaseLE and RNaseLX, are induced during wound healing processes or under phosphate (Pi)-deficient conditions. Within this thesis, a further S-like RNase from *S. lycopersicum*, RNaseLER, was isolated and characterized. Its genomic sequence comprises 5591 bp including the 908 bp promoter region. An alignment of the coding and the entire genomic sequence revealed that *RNaseLER* contains 6 exons and 5 introns. The introns are similarly located as it has been shown for exon/intron structures of other known T2-type RNases. Based on this exon/intron structure as well as a homology of up to 83 %, RNaseLER could be assigned to the class 2 of T2-type-RNases. Southern blot analysis characterized *RNaseLER* as a single copy gene in the tomato genome.

*RNaseLER* encodes for a protein consisting of 260 amino acids (AA). A signal peptide of 23 AA in length that should convey a co-translational import of the protein into the endoplasmic reticulum (ER) was identified at the N-terminus. An ER-retention signal corresponding peptide, such as KDEL or HDEL does not exist in the RNaseLER AA sequence. However, transient expression of RNaseLER as YFP-fusion (RNaseLER::YFP) in *N. benthamiana* confirmed its localization in the ER.

Furthermore, promoter-GUS studies revealed activity of the promoter in guard cells and trichomes of transgenic *N. benthamiana* lines. In accordance with this observation, potential cis-elements for guard cell-specific expression ((T/A)AAAG-element) could be identified in the promoter of *RNaseLER*. This activity is so far unique for T2-type RNases. A function of the RNaseLER in the development and differentiation of stomata and trichomes is thus conceivable. However, GUS activity was also detected in the parenchymal tissue of stems, anthers, and in rare cases in the maturation and elongation zone of roots. In the promoter of *RNaseLER* conserved boxes could also be determined, which can facilitate among others by abscisic acid- (ABA), drought stress-, and senescence-dependent and circadian gene regulation processes. Also W boxes, which are found in pathogen responsive genes, are present in the promoter. Real-time RT-PCR analysis showed that ABA, osmotic stress or drought has no effect on the expression pattern of *RNaseLER*. On the other hand, differences are observed in the expression pattern of leaves after treatment with the ethylene analogue ethephon and / or the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Unlike for

other T2-type RNases that are induced during senescence the treatment here led to a reduction of the transcript level. A slight increase of transcripts was observed under phosphate deficiency and after infection with *Phytophthora infestans*. Effects of these factors remain to be further analyzed.

# Inhaltsverzeichnis

ZusammenfassungI		
SummaryII		
InhaltsverzeichnisIII		
Abbi	ldungsverzeichnis	.IV
Tabe	llenverzeichnis	V
Abki	irzungsverzeichnis	.VI
1 Ei	nleitung	1
1.1	Familie der T2-Typ-RNasen	2
1.2	Biologische Funktion der T2-RNasen in Pflanzen	8
1.3	Zielstellung der Arbeit	. 10
2 M	aterial und Methoden	. 11
2.1	Material	. 11
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und sonstige Verbrauchsmaterialien	. 11
2.1.2	Medien und Puffer	. 12
2.1.5	Oligonukleotide	. 17
2.1.5	Mikroorganismen und Vektoren	. 20
2.1.6	Pflanzenmaterialien, Anzuchtbedingungen und Behandlungen	. 22
2.2	Molekularbiologische Methoden	. 27
2.2.1	Allgemeine Grundtechniken der Nukleinsäureanalytik	. 27
222	Isolation von Nukleinsäurem	. 29
2.2.2		
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	. 31
2.2.2 2.2.3 2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten	. 31 . 39
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte	. 31 . 39 . 39 . 39 . 40
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung	. 31 . 39 . 39 . 40 . 42
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b>	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung Proteinanalytik	. 31 . 39 . 39 . 40 . 42 . 42
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i>	. 31 . 39 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42
2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> <i>2.3.1</i> 2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen	. 31 . 39 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung Proteinanalytik Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese	. 31 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43 . 43
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich	. 31 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43 . 43 . 45 . 45
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich Proteinfärbung Western-Blot	. 31 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43 . 45 . 45 . 45
2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 <b>2.4</b>	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich Proteinfärbung Western-Blot.	. 31 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43 . 45 . 45 . 45
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 <b>2.4</b> 2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)         Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten         DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot)         Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte         Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung         Proteinanalytik         Proteinextraktion aus N. benthamiana         Reinigung von Fusionsproteinen         Polyacrylamid-Gelelektrophorese         Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich         Proteinfärbung         Western-Blot         Histochemie und Mikroskopie         Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität	.31 .39 .39 .40 .42 .42 .42 .42 .43 .43 .45 .45 .45 .45 .45
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 <b>2.4</b> 2.4.1 2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)         Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten         DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot)         Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte         Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung         Proteinanalytik         Proteinextraktion aus N. benthamiana         Reinigung von Fusionsproteinen         Polyacrylamid-Gelelektrophorese         Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich         Proteinfärbung         Western-Blot         Histochemie und Mikroskopie         Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität	.31 .39 .40 .42 .42 .42 .43 .43 .45 .45 .45 .45 .45 .46 .46
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 <b>2.4</b> 2.4.1 2.4.2 2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich Proteinfärbung Western-Blot <b>Histochemie und Mikroskopie</b> Histochemischer Nachweis der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität Fixierung und Einbettung in Paraffin GUS-Aktivitätsbestimmung	.31 .39 .40 .42 .42 .42 .43 .45 .45 .45 .45 .45 .45 .46 .47 .48
2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 <b>2.3</b> 2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4 2.3.5 2.3.6 <b>2.4</b> 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot) Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung <b>Proteinanalytik</b> Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i> Reinigung von Fusionsproteinen Polyacrylamid-Gelelektrophorese Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich Proteinfärbung Western-Blot <b>Histochemie und Mikroskopie</b> Histochemischer Nachweis der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität Fixierung und Einbettung in Paraffin GUS-Aktivitätsbestimmung <i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin markierten cRNA-Einzelstrangsonden	. 31 . 39 . 40 . 42 . 42 . 42 . 42 . 43 . 43 . 43 . 45 . 45 . 45 . 45 . 45 . 46 . 47 . 48 . 49

3 Er	gebnisse	54
3.1	Charakterisierung des RNaseLER-Gens von S. lycopersicum	54
3.1.1	Ermittlung des RNaseLER-Primärtranskripts mittels 5'- und 3'-RACE	54
3.1.2	RNaseLER aus S. lycopersicum ist ein Mitglied der T2-Typ-RNase Familie	56
3.1.3	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung	59
3.1.4	Genomische Analyse der RNaseLER	61
3.1.5	Bestimmung der Kopienzahl der RNaseLER im Tomatengenom	
3.1.6	Charakterisierung der stromaufwärts liegenden Region von RNaseLER	65
3.1.7	Analyse der Promotoraktivität	
3.2	Expressionsanalysen des RNaseLER-Transkripts	77
3.2.1	Analyse der organspezifischen Expression	
3.2.2	Untersuchung zur zellspezifischen Expression des <i>RNaseLER</i> mittels <i>in situ</i> - Hybridisierung	
3.2.3	Untersuchung der RNaseLER-Genexpression während abiotischer und	0.4
	biotischer Stresssituationen.	
3.3	Rekombinante Expression der RNaseLER	
4 Di	skussion	
4.1	RNaseLER ist ein Mitglied der Klasse 2 der T2-Typ-RNase Familie	
4.2	Die Promotorregion des RNaseLER-Gens	102
4.3	Expression des RNaseLER-Gens	106
4.3.1	Gewebe- und Stimulus-spezifische Expressionsanalysen	107
4.3.2	Subzelluläre Lokalisation der RNaseLER	114
5 Li	teraturverzeichnis	117
ANH	ANG	127

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Sequenzhomologie ausgewählter T2-Typ-RNasen.	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von RNase Rh	
Abbildung 3:	Mechanismus der RNA-Spaltung bei T2-Typ RNasen am Beispiel von	
	RNase Rh.	7
Abbildung 4:	Bonitur des verwendeten Pflanzenmaterials.	. 22
Abbildung 5:	Dot-Blot zur Überprüfung der Effizienz der DIG-Markierung	. 52
Abbildung 6:	Relative Position der 5'- und 3'-RACE Oligonukleotide auf dem	
	RNaseLER homologen cDNA-Klon pCLER2.10.	. 55
Abbildung 7:	Gelelektrophoretische Auftrennung der RACE-Produkte	. 55
Abbildung 8:	Identifizierung der vollständigen, kodierenden Sequenz der RNaseLER	. 56
Abbildung 9:	Alignment der T2-Typ-RNase Aminosäuresequenzen verschiedener	
	Spezies	. 57
Abbildung 10:	Aminosäuresequenz der Ribonuklease RNaseLER.	. 58
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des RNaseLER::eYFP-Fusionskonstrukts	. 59
Abbildung 12:	Analyse der RNaseLER::eYFP transformierten Epidermiszellen von	
	N. benthamiana am CLSM.	. 60
Abbildung 13:	Exon/Intron-Struktur des RNaseLER-Gens.	. 62
Abbildung 14:	Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von RNaseLER	
	im Tomatengenom	. 64
Abbildung 15:	Regulatorische Elemente im 5'-Bereich des Gens RNaseLER.	. 66
Abbildung 16:	GUS-Reportergenkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität	
	der RNaseLER.	. 69
Abbildung 17:	Histochemischer Nachweis der GUS-Expression unter Kontrolle	
	des RNaseLER-Promotors (P367) und des Derivats P134	. 71
Abbildung 18:	Analyse der Intergrationanzahl der Promotor-GUS-Fusionen im Genom	
	von N. benthamiana.	. 73
Abbildung 19:	Fluorimetrisch ermittelte  ß-Glucuronidase Aktivität in Blättern trans-	
	gener Tabakpflanzen.	. 76
Abbildung 20:	RNaseLER-Expression in verschiedenen Organen von S. lycopersicum	. 79
Abbildung 21:	Vergleich der Transkriptmengen des RNaseLER-und des PIN2-Gens	
	infolge von osmotischen Stress in S. lycopersicum cv. Moneymaker	. 82
Abbildung 22:	Vergleich der Transkriptmengen des RNaseLER- und RNaseLX-Gens	
	in Tomatenzellkulturen in Abhängigkeit von der Phosphatversorgung	. 83
Abbildung 23:	Vergleich der Transkriptmenge des RNaseLER-Gens und des	
	PIN2-Kontrollgens nach ABA-Applikation.	. 84
Abbildung 24:	Vergleich der Transkriptmenge des RNaseLER-Gens und des	
	ACO-Kontrollgens nach Ethephon-Applikation.	. 86
Abbildung 25:	Vergleich der Transkriptmenge des RNaseLER-Gens und des ACO-	
	Kontrollgens nach ACC-Applikation mittels qRT-PCR-Analyse.	. 87

Abbildung 26:	Einfluss der Pseudomonas syringae pv tomato (Pto)-Inokulation auf	
	die Expression von RNaseLER im Vergleich zu PR1.	89
Abbildung 27:	Einfluss der Phytophthora infestans-Infektion auf die Expression	
	von RNaseLER im Vergleich zu PR1.	90
Abbildung 28:	Vergleich der Transkriptmengen des RNaseLER- und des PIN2-Gens	
	nach Verletzung in S. lycopersicum durch qRT-PCR-Analyse	92
Abbildung 29:	Schematische Darstellung des RNaseLER::His-Konstrukts	
	(Vektor pCPLERHis).	93
Abbildung 30:	PCR zum Nachweis der Integration des RNaseLER::His-Konstruktes	94
Abbildung 31:	Transiente Expression der RNaseLER::His in N. benthamiana.	96
Abbildung 32:	Phylogenetische Eingruppierung der RNaseLER in den Stamm-	
	baum ausgewählter pflanzlicher T2-Typ-RNasen	99
Abbildung 33:	Konservierte Intronpositionen der pflanzlichen T2-Typ-RNasen 1	00
Abbildung 34:	Sequenz des putativen Promotorbereiches von RNaseLER 1	02
Abbildung 35:	Die Aminosäuresequenz des sekretorischen Signalpeptids der RNaseLER	
	aus S. lycopersicum. 1	15

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.	. 12
Tabelle 2:	Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.	. 14
Tabelle 3:	Verwendete Antibiotika und Phytohormone	. 17
Tabelle 4:	Verwendete Oligonukleotide.	.17
Tabelle 5:	Verwendete Mikroorganismen	. 20
Tabelle 6:	Verwendete Vektoren.	. 20
Tabelle 7:	Eigenschaften der verwendeten Pseudomonas syringae-Stämme	. 25
Tabelle 8:	PCR-Effizienz der Oligonukleotide, die in qRT-PCR-Analysen	
	eingesetzt wurden	. 36
Tabelle 9:	Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung von Promotor-GUS-Fusion	. 40
Tabelle 10:	Ethanolreihe zur Dehydratisierung der Pflanzengewebe	. 47
Tabelle 11:	Deparaffinieren und Hydratisierung der Dünnschnitte bei RT	. 48
Tabelle 12:	Filtersätze mit Wellenlängenbereichen zur Anregung und Detektion von	
	CFP und YFP.	. 53
Tabelle 13:	Oligonukleotidkombination und deren Produkte auf gDNA und cDNA	. 61
Tabelle 14:	Exon/Intron Struktur des RNaseLER-Gens	. 63
Tabelle 15:	Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren	. 67
Tabelle 16:	Anzahl der Promotor-GUS-Fusionsintegration in T2-N. benthamiana Linien	. 75

# **Abkürzungsverzeichnis**

In dieser Arbeit wurden soweit möglich Einheiten gemäß dem internationalen Einheitensystem (*Système international d'unités*; SI) verwendet. Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. *Taq*), Länder (u.a. USA, Deutschland) bzw. Staaten (u.a. MO, CA), Maßeinheiten (z.B. min, °C, bar) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert sind, werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Bei zusammengesetzten Abkürzungen, z.B. Gen- und Enzymbezeichnungen, sind die jeweiligen Teile getrennt angegeben. Gene sowie aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

#### Nicht-SI-Einheiten

Da	Dalton; 1 Da=1,6601 * 10-27kg
OD	Optische Dichte
U	unit, Einheit für Enzymaktivität

#### Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
A. thaliana, At	Arabidopsis thaliana
ATP	Adenosintriphosphat
AWF	apoplastische Waschflüssigkeiten
BAP	6-Benzylaminopurin
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
C-	Carboxy-
ca.	circa
CaMV	Cauliflower mosaic virus, Blumenkohl-Mosaikvirus
CAS	<u>c</u> onserved <u>a</u> ctive-site <u>s</u> egment
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CDS	coding sequence, kodierende Sequenz
CFP	cyano fluorescence protein, blau fluoreszierendes Protein
CLSM	Confocal laser scanning microcope (Konfokales Laserscanning-Mikroskop)
CV.	<i>cultivar</i> , Kultursorte
C <sub>T</sub>	<i>"threshold cycle"=</i> Schwellenwert-Zyklus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOF	DNA binding with one finger, Ein-Zink-Finger DNA-Bindeproteinen
$\Delta$	Delta, Deletion
E.coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EST	expressed sequence tag
et al.	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
ER	endoplasmatisches Retikulum
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GBF	Gesamthlattextrakt
GUS	B Glucuronidase
UU5 Lie	Histidin
1115 Izh	Vilahasan
kU IrDa	Kilodaltan
KDa LD	Kiloualioli
	Luria Bertani / Luria oroin
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsaure
MS	Murashige&SKOOG
MSS	MS-Selektionsmedium
MST	MS-Transformationsmedium
MSW	MS-Wurzelinduktionsmedium
MSZ	MS-Zwischenmedium
N-	Amino-
NAA	Naphthylessigsäure
NCBI	National Center of Biotechnology Information
N. benthamiana	Nicotiana benthamiana
N. glutinosa, Ng	Nicotiana glutinosa
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Pi	anorganisches Phosphat
$[\alpha^{32}]-P$	radioaktives Phosphat
ΡΔΔ	Polyaerylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektronhorese
PRS	Phosphat genufferte Salzlösung (nhosphate huffer saling)
	Polymerase chain reaction Polymerase Kattenreaktion
Dfa	Dymeruse chuin reaction, i oryinerase-Kettenii caktion
DD Drotoin	ngthogenesic velated protein Dethogen induziertes Protein
	Dath over
pv.	ramoval
RACE	rapia amplification of cDNA enas
RNA	ribonucleic acia, Ribonukleinsaure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	reverse transcribed PCR
S. lycopersicum, Sl	Solanum lycopersicum
S. tuberosum, St	Solanum tuberosum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T <sub>0</sub>	transgene Eltergeneration
$T_1$	erste transgene Filialgeneration
$T_2$	zweite transgene Filialgeneration
uidA	kodierende Sequenz des β-Glucuronidase-Gens
Upm	Umdrehung pro Minute
ŪV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen, Volumenprozent
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen, Gewichtsprozent
YFP	vellow fluorescence protein gelh fluoreszierendes Protein
355	CaMV 35S Promotor

#### **EINLEITUNG**

# 1 Einleitung

Die Geschichte der Aufklärung von Funktion, Faltung und Aktivität von Proteinen, ebenso wie die Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Manipulation und Produktion von Enzymen sind eng verknüpft mit der Untersuchung von Ribonukleasen (RNasen). RNasen, zur Gruppe der Hydrolasen gehörende Enzyme mit relativ kleiner Molekülmasse und großer Hitzestabilität, spalten Ribonukleinsäure (RNA) hydrolytisch. Die erste Ribonuklease wurde bereits 1920 von Jones beschrieben, der zeigte, dass im Rinderpankreas ein relativ hitzestabiles Enzym vorkommt, welches Hefe-Nukleinsäure hydrolysieren konnte (Jones, 1920). Dubos und Thormpson gelang etwa 18 Jahre später eine partielle Reinigung der erste Ribonuklease aus Rinderpankreas, der RNase A (Dubos und Thompson, 1938). In den nächsten dreißig Jahren wurde die RNase A durch Kunitz kristallisiert, in dem Labor von Moore und Stein vollständig sequenziert und letztendlich im Labor von Merrifield synthetisiert (Kunitz, 1940; Smyth *et al.*, 1963; Gutte und Merrifield, 1969).

Seither wurde eine Reihe von Ribonukleasen charakterisiert. Obwohl die meisten RNasen Proteine sind, gibt es auch RNasen, wie z.B. RNaseP und MRP deren katalytische Einheit RNA-Moleküle sind (Aravind und Koonin, 2001; Piccinelli *et al.*, 2005).

Ribonukleolytische Enzyme sind ubiquitäre Komponenten aller lebender Zellen und spielen eine Schlüsselrolle bei vielen zellulären Funktionen. Sie sind am generellen RNA-Abbau zur Rückgewinnung von Kohlenstoff, Phosphat und Stickstoff, aber auch an der DNA-Replikation, Transkription, dem spezifischem RNA-Abbau individueller RNA-Spezies, wie, tRNA's, snRNA's und rRNA's, dem Splicing, dem RNA-Editing sowie an der Translationskontrolle beteiligt. Es wurde jedoch auch die Beteiligung von RNasen an der Pathogenabwehr und der Unterdrückung der Metastasierung von Tumorzellen nachgewiesen (Galiana *et al.*, 1997; Riordan, 1997; Hugot *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Monti *et al.*, 2008; Kim und Lee, 2009).

Allgemein teilt man RNasen in Exo- und Endoribonukleasen ein: Exoribonukleasen prozessieren das RNA-Substrat ausgehend von den Termini des Moleküls. Je nach Beginn der Prozessierung werden 3'- 5' bzw. 5'- 3' Exoribonukleasen unterschieden. Exoribonukleasen spalten zumeist Mononukleotide vom RNA-Molekül ab. Endoribonukleasen hingegen greifen das Substrat an internen Phosphodiesterbindungen an. Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand des Substrates: je nachdem, ob das Substrat einzelsträngig oder doppelsträngig ist, wird zwischen einzelstrangspezifischen bzw. doppelstrangspezifischen Ribonukleasen unterschieden. Bisher sind eine Vielzahl von Endonukleasen und Exonukleasen bekannt, von

denen die meisten anhand gemeinsamer Charakteristika, wie Sequenz, Struktur und Funktion in Familien eingeteilt werden können. Häufig sind die Familien nach ihrem Prototyp, z.B. RNaseA-, RNase T1- und RNase T2-Familie, benannt (D'Alessio und Riordan, 1997; Raines, 1998; Yoshida, 2001; Deshpande und Shankar, 2002).

RNasen erkennen RNA-Moleküle anhand der Primärstruktur, also der Nukleinsäuresequenz, wobei eine mehr oder weniger ausgeprägte Sequenzspezifität bestehen kann. Mitglieder der RNase A-Familie sind pyrimidinspezifische Enzyme, die in Vertebraten gefunden werden, während Enzyme der RNase T1-Familie mikrobieller Herkunft und vorrangig guanosinspezifisch sind. Eine relativ heterogene Gruppe bildet die ubiquitär verbreitete RNase T2-Familie, deren Mitglieder meist basenunspezifisch sind.

Im Allgemeinen katalysieren diese Ribonukleasen die hydrolytische Spaltung von RNA zu Mono- oder Oligonukleotiden mit einem 3'-Phosphat über ein 2',3'-zyklisches Intermediat.

Jedoch können, anhand des Spaltmechanismus, die Endo- und Exoribonukleasen auch in Phosphodiesterasen und Phosphotransferasen eingeteilt werden. Beispielsweise können RNasen der T2-Familie als Phosphotransferasen bezeichnet werden, da die Phosphatgruppe der gespaltenen Phosphodiesterbindung auf das 3'-Ende des 5'-Spaltproduktes übertragen wird.

# 1.1 Familie der T2-Typ-RNasen

Die Familie der T2-Typ RNasen umfasst RNasen von Pilzen, wie z. B. die namensgebende RNase T2 von *Aspergillus oryzae* (Kawata *et al.*, 1990), die RNase Rh von *Rhizopus niveus* (Kurihara *et al.*, 1996) und *Saccharomyces cerevisiae* (RNY 1, MacIntosh *et al.*, 2001). Diverse Mitglieder konnten auch im Tierreich z. B. in Austern (Watanabe *et al.*, 1993) und Hühnern (Hayano *et al.*, 1993) sowie in Säugetieren (Trubia *et al.*, 1997) gefunden werden. Das Vorkommen von RNasen der T2-Familie in Viren (RNase E<sup>RNS</sup>, Schneider *et al.*, 1993), Protozoen wie in *Physarum polycephalum* (Inokuchi *et al.*, 1993) und Bakterien wie z. B. RNase 1 in *Escherichia coli* (Meador III und Kennell, 1990) unterstreicht die ubiquitäre Verbreitung.

Die weitaus größte Vielfalt an T2-Typ-RNasen wurde bisher in verschiedenen Pflanzen gefunden. Anhand der Primärstruktur und der Funktion wurden die T2-Typ RNasen in zwei Subklassen, den S-RNasen und den S-*like* RNasen unterteilt (Taylor *et al.*, 1993; Green, 1994). Zu den S-RNasen zählen die Genprodukte der S-Locus-Allele (S-Glykoproteine), die ebenfalls als RNasen identifiziert werden konnten (McClure *et al.*, 1989). Dieser S-Genlocus

ist verantwortlich für die Kontrolle der gametophytischen Selbst-Inkompatibilität. Diese im Pollenschlauch erfolgende Strategie tritt ausschließlich in Pflanzen auf, die zu den Familien der *Solanaceae, Scrophulariaceae* und *Rosaceae* gehören. Zu diesen Selbst-Inkompatibilitäts-RNasen (S-RNasen) gehören die RNasen S2 und S6 von *Nicotiana alata* (McClure *et al.*, 1989; Matton *et al.*, 1994), S2, S3 und S5 von *Antirrhinum hispanicum* (Xue *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 2002) und S2 aus *Solanum tuberosum* (Kaufmann *et al.*, 1991).

Weitere Mitglieder der T2-Typ-RNasen sind die S-*like* RNasen. Sie sind multifunktionell und an vielen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen, jedoch nicht an der Unterdrückung der Selbstbefruchtung beteiligt. Beispiele für S-*like* RNasen sind: die RNaseLE und LX aus *Solanum lycopersicum* (Jost *et al.*, 1991; Loffler *et al.*, 1993), RNS 1, 2 und 3 aus *Arabidopsis thaliana* (Taylor und Green, 1991; Taylor *et al.*, 1993; Bariola *et al.*, 1994) und NGR 1, 2 und 3 aus *Nicotiana glutinosa* (Kariu *et al.*, 1998; Kurata *et al.*, 2002).

Igic und Kohn (2001) nahmen aufgrund von Sequenzhomologien in den kodierenden Bereichen und der Exon/Intron-Struktur der RNase-Gene eine weitere Unterteilung in drei Klassen vor. Die Klasse 1 zeichnet sich durch das Auftreten von zwei bis drei Introns mit hochkonservierten Positionen und die Klasse 2 durch mehr als drei mit konservierten Intronpositionen aus. Die S-RNasen bilden die dritte Klasse und besitzen nur ein in Bezug auf die Position stark konserviertes Intron.

Mitglieder der T2-Typ RNasen sind relativ unspezifische Endoribonukleasen mit einem Molekulargewicht von 22-26 kDa und einem pH Optimum im sauren Bereich (*Irie*, 1997 und 2001). Allen T2-Typ-RNasen, vom Virus bis zum Tier sind zwei konservierte Sequenzbereiche, CAS I und CAS II (*conserved active-site segments*; Abbildung 1), von acht bzw. zwölf Aminosäuren einschließlich der katalytisch aktiven Aminosäuren, gemein (Deshpande und Shankar, 2001).

		<u>CAS I</u>	<u>CAS II</u>
	RNase T2	WTI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWE <b>HEW</b> N <b>KHG</b> T <b>C</b>
Pilz	RNase Rh	FTL <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWS <b>HEW</b> S <b>KHG</b> T <b>C</b>
	RNY 1	FTI <b>hg</b> l <b>w</b> P	LWI <b>HE</b> FN <b>KHG</b> TC
	RNaseLE	FGI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWS <b>HEW</b> E <b>KHG</b> T <b>C</b>
	RNaseLX	FTI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWS <b>hew</b> l <b>khg</b> t <b>C</b>
	RNS 1	FGI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWE <b>HEW</b> E <b>KHG</b> T <b>C</b>
D.C	RNS 2	FTI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWG <b>HEW</b> E <b>KHG</b> T <b>C</b>
Phanze	RNS 3	FGI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWT <b>HEW</b> E <b>KHG</b> T <b>C</b>
	NGR 1	FGI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWS <b>hew</b> e <b>khg</b> t <b>C</b>
	NGR 2	FTI <b>hg</b> l <b>w</b> T	FWA <b>HEW</b> E <b>KHG</b> T <b>C</b>
	NGR 3	FSI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWS <b>hew</b> l <b>khg</b> t <b>C</b>
Mensch	RNASET2	WTI <b>hg</b> l <b>w</b> P	FWK <b>hew</b> e <b>khg</b> t <b>C</b>
Bakterien	RNase 1	LTV <b>hg</b> l <b>w</b> P	LERY <b>E</b> YA <b>KHG</b> A <b>C</b>
Virus	ERNS	RSL <b>hg</b> I <b>w</b> P	LQR <b>hew</b> n <b>khg</b> w <b>C</b>

Abbildung 1: Sequenzhomologie ausgewählter T2-Typ-RNasen.

Sequenzhomologien sind insbesondere in zwei Sequenzbereichen, CAS I und CAS II, vorhanden. Die fett dargestellten Aminosäuren sind durchgehend konserviert. RNase T2 aus Aspergillus oryzae; RNase Rh aus Rhizopus niveus; RNY 1 RNase aus Saccharomyces cerevisiae; RNaseLE und RNaseLX aus S. lycopersicum, RNS 1, RNS 2 und RNS 3 RNase aus A. thaliana; NGR 1, NGR 2 und NGR 3 RNase aus N. glutinosa; RNASET2 RNase aus Homo sapiens; RNase 1 aus E. coli; E<sup>RNS</sup> von Schweinepestvirus KSPV isoliert.

Die dreidimensionale Struktur der RNase Rh von *Rhizopus niveus* wurde im Jahr 1996 veröffentlicht, welche die erste dreidimensionale Struktur in der RNase T2-Familie war (Kurihara *et al.*, 1996). Es folgten die Kristallstrukturen weiterer Vertretern der T2-Typ-RNase Familie, wie RNaseLE von *S. lycopersicum* (Tanaka *et al.*, 2000), RNase MC1 von *Momordica charantia* (Suzuki *et al.*, 2000), RNase S3 von *Pyrus pyrifolia* (Matsuura *et al.*, 2001), die SF11-RNase von *Nicotiana alata* (Ida *et al.*, 2002), NGR 1 (früher NW) von *N. glutinosa* (Kawano *et al.*, 2002) und das Trichomaglin von *Trichosanthes lepiniate* (Gan *et al.*, 2004).

Aufgrund der bekannten Tertiärstrukturen von RNaseLE und RNase Rh bzw. der Anzahl der Disulfidbrücken wird eine Einteilung in zwei Subgruppen vorgeschlagen, den pilzlichen und den tierischen/pflanzlichen T2-RNasen. Während RNasen, die aus Pilzen isoliert worden sind, fünf Disulfidbrücken aufweisen, besitzen alle tierischen/pflanzlichen T2-Typ RNasen eine unterschiedliche Anzahl an Disulfidbrücken (*Irie*, 2001). Jedoch sind zwei Halb-Cysteinpaare allen T2-Typ-RNasen gemein, deren Position innerhalb der T2-Typ-RNasen konserviert sind und die zum Erhalt der aktiven Konformation beitragen (Tanaka *et al.*, 2000).

Disulfidbindungen sind typisch für sekretorische Proteine, da sie sich im Zytosol nicht ausbilden können. Dementsprechend sind auch alle bisher untersuchten T2-Typ-RNasen sekretorische Proteine.

Beide Kristallstrukturen, die des pilzlichen und die des tierisch/pflanzlichen Typs, gehören zu den " $\alpha+\beta$  *type structures*", da eine verschieden hohe Anzahl von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern vorhanden ist. Innerhalb beider Strukturen sind das zentral gelegene antiparallele  $\beta$ -Faltblätt, die lange  $\alpha$ -Helix, welche die N-terminale Hälfte mit der C-terminalen Hälfte verbindet, und die Lage der katalytisch aktiven Aminosäuren konserviert (Abbildung 2).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von RNase Rh. Die Abbildung wurde mit der PyMOL-Software Version 1.2.8 (http://www.pymol.org) und den Daten aus der "*protein data bank*" mit der Bezeichnung "1BOL"erstellt. Farbkodierung: grün:  $\alpha$ -Helix; gelb: antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt; an der RNA-Hydrolyse beteiligte AS rot: Histidine (His46, His109 und His104); blau: Glutaminsäure (Glu105) und pink: Lysin (Lys108), N<sub>2</sub>H: N-Terminus; COOH: C-Terminus.

Die Kristallstruktur, Daten aus Mutations- und Kinetikanalysen und chemische Modifikationen der RNase Rh (Ohgi *et al.*, 1992, 1993 und 1995) führten zu der Aufklärung des Katalysemechanismus (Abbildung 3). Da der Aufbau des aktiven Zentrums bei den bisher ermittelten Strukturen nahezu identisch ist, postulierte Tanaka, dass der Mechanismus zur

Hydrolyse der Nukleotidbindung auch für alle anderen Vertreter der T2-Typ-RNasen zutrifft (Tanaka *et al.*, 2000).

Irie postulierte, dass die enzymatische Reaktion und Basenspezifität durch die  $B_1$ - und  $B_2$ -Stelle festgelegt werden. Die  $B_1$ -Stelle befindet sich am 5'-Ende der zu spaltenden Phosphodiesterbindung und die  $B_2$ -Stelle am 3'-Ende (Irie, 1997).

Die Aminosäuren der B-Stellen bilden wahrscheinlich hydrophobe Taschen, in denen die abzubauende RNA gebunden wird. Eine sich am Boden der Tasche befindende hydrophile Aminosäure interagiert über polare Wechselwirkungen, wahrscheinlich Wasserstoffbrücken, mit der Base des Nukleotids vor der Spaltstelle. In RNase Rh handelt es sich dabei um die hydrophobe B<sub>1</sub>-Stelle, die aus den AS Trp49, Asp51 und Tyr57 besteht. Wobei Asp51 die hydrophile Aminosäure am Boden der B<sub>1</sub>-Stelle ist. Das führt zu der Basen-Präferenz (A>G>C, U). Die B2-Stelle wird aus den Aminosäuren Gln32, Pro92, Ser93, Asn94, Gln95 und Phe101 gebildet (Ohgi *et al.*, 1993; 1996; Irie, 1997; 2001).

Nach Ohgi führen die Aminosäuren His46 und His109 der RNase Rh die Grundreaktion der RNA-Spaltung durch (Abbildung 3; Ohgi *et al.*, 1993, 1996). His109 nimmt ein Proton der 2' OH-Ribosegruppe des Nukleotids der ersten Base (Abbildung 3A) auf. Durch den nukleophilen Angriff des entstandenen negativ geladenen Sauerstoffions an der Phosphatgruppe (Abbildung 3B) entsteht ein Zwischenprodukt (*pentakoordiniertes Intermediat*), welches durch Glu105 und Lys108 stabilisiert wird (Abbildung 3C). His104 bindet an der Phosphatgruppe, so dass die Hydrolyse der RNA erfolgen kann. Im letzten Schritt fungiert His 46 als Protonendonor, wobei das 5'-Sauerstoffatom der Ribose des Nukleotids der zweiten Base ein Wasserstoffion aufnimmt (Abbildung 3D). Als Zwischenprodukt wird ein 2'3'-zyklisches Nukleotid-Monophosphat gebildet, bevor als Endprodukt ein Mononukleotid mit einem 3'-Phosphat entsteht (Ohgi *et al.*, 1992, Irie, 1999).



Abbildung 3: Mechanismus der RNA-Spaltung bei T2-Typ RNasen am Beispiel von RNase Rh. Abgeleitet von Irie, 1999; nähere Angaben befinden sich im Text;

A) Aufnahme eines Protons durch His109, B) nukleophiler Angriff des negativ geladenen Sauerstoffions an der Phosphatgruppe, C) Stabilisierung des *pentakoordinierten Intermediats* durch Glu105 und Lys108, D) Hydrolyse der RNA durch Bindung von His104 wobei His 46 als Protonendonor dient.

## **1.2 Biologische Funktion der T2-RNasen in Pflanzen**

Die Funktion der S-RNasen, einer Klasse der pflanzlichen T2-Typ-RNasen, wurde bereits eingehend beschrieben (McCubbin und Kao, 2000). Sie haben eine essentielle Rolle in der Selbst-Inkompatibilität der Familien der *Solanaceae, Scrophulariaceae* und *Rosaceae.* S-RNasen (S-Gene) sind die Genprodukte des polymorphen S-Locus und die Determinanten der gametophytischen Selbst-Inkompatibilität des Solanaceen-Typs (Anderson *et al.*, 1986, McCubbin und Kao, 2000). Aus den verschiedenen S-Locus-Allelen entstehen Proteine mit meist kleinen, aber wichtigen Unterschieden, die zur (Selbst-) Erkennung der Pollen notwendig sind. Diese S-RNasen, die ausschließlich im Griffel exprimiert werden, verhindern nach einer Bestäubung die Befruchtung durch eigenen Pollen (Autogamie) oder genetisch ähnlichen Pollen. Die Bestäubung durch den eigenen Pollen führt zur Unterdrückung des Pollenschlauchauswachsens, indem die vom Griffel exprimierten extrazellulären S-RNasen in den Pollenschlauch einwandern und Pollenschlauch-eigene rRNA degradieren (McClure *et al.*, 1990; Parry *et al.*, 1997).

S-like RNasen sind ribonukleolytische Enzyme, die den S-RNasen molekular sehr verwandt sind, sich jedoch, hinsichtlich ihrer Struktur, Expression und biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Sie sind nicht in der Selbst-Inkompatibilität involviert, haben jedoch wichtige Funktionen in allen Pflanzen. Im Gegensatz zu den S-RNase Genen, deren Expression in der Regel auf den Griffel beschränkt ist, zeigen die S-like RNase Gene auch in anderen Organen unter bestimmten Umweltbedingungen eine Expression. Eine Beteiligung an Entwicklungsund Differenzierungsprozessen von Pflanzen wie der Fruchtreifung, Samenkeimung, Samenreifung, Wurzelwachstum, Seneszenz sowie der Xylogenese, konnte bereits für einige S-like RNasen nachgewiesen werden (Green, 1994). So deuten in Pflanzen durchgeführte Genexpressionsanalysen an, dass S-like RNasen am Phosphat-Recycling während der Seneszenz beteiligt sind und bei anorganischem Phosphat (Pi)-Mangel hochreguliert werden. RNasen wie beispielsweise RNS1 und RNS2 aus A. thaliana (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994) und RNaseLX aus S. lycopersicum (Lers et al., 1998) sind während der Seneszenz induziert. Die Expression der RNaseLE aus S. lycopersicum und RNaseLX wird in Tomaten-Suspensionskulturen und/oder in Keimlingen induziert, wenn diese in Pi-defizienten Medien angezogen wurden (Kock et al., 1998). Weiterhin wird für die beiden RNase-Gene von Arabidopsis, RNS1 und RNS2, RNaseNE aus Nicotiana alata, AhSL28 aus Antirrhinum und VRN1 aus Volvox carteri eine gesteigerte Expressionsrate infolge von Pi-Mangel postuliert (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994; Kock et al., 1995; Dodds et al., 1996, Shimizu et al., 2001, Liang et al., 2002). Für die RNaseLX sowie der ZRNaseI aus Zinnia elegans konnte eine Beteiligung an der Xylem-Differenzierung nachgewiesen werden, ein Hinweis darauf, dass die entsprechenden Proteine an der Pi-Rückgewinnung während der Prozesse, die während des Zelltodes ablaufen, beteiligt sein könnten (Ye und Droste 1996; Lehmann *et al.*, 2001). RNaseLX *antisense*-Expressionen führten in Tomate zu einer verzögerten Seneszenz und Blattabscission, somit könnte RNaseLX nicht nur während der Seneszenz und Abscission an der Pi-Rückgewinnung beteiligt sein, sondern auch an der Steuerung dieser Prozesse (Lers *et al.*, 2006).

Eine Pathogeninfektion führte bei einigen S-*like* RNasen zu einer gesteigerten RNase-Aktivität. So zeigten die *RNasenNE* aus *N. alata* und *Nk1* aus *N. tabacum* nach Infektion mit Viren und *Phytophthora parasitica* eine gesteigerte Expression (Galiana *et al.*, 1997; Hugot *et al.*, 2002; Ohon und Ehara, 2005). Hugot und Kollegen (2002) zeigten, dass die gereinigte RNase NE das Hyphenwachstum des Erregers hemmt. Für die RNase NGR3 aus *N. glutinosa* wurde eine Induktion durch eine TMV-Infektion beschrieben (Kurata *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003).

Mechanische Verwundung induziert die Expression verschiedener S-*like* RNasen, einschließlich der RNS1, NGR1 (früher NW) aus *N. glutinosa*, RNaseLE aus *S. lycopersicum* und ZRNaseII aus *Z. elegans* (Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998; Ye und Droste 1996; LeBrasseur *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2004). Die Rolle der S-*like* RNasen während der Verwundung ist nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass sie als antimikrobielle Enzyme fungieren oder an der Phosphat-Remobilisierung während des Heilungsprozesses beteiligt sind (LeBrasseur *et al.*, 2002; Ohno und Ehara 2005).

Über die physiologische Funktion nicht-pflanzlicher T2-Typ-RNasen ist wenig bekannt. Ihnen wird, wie beispielsweise bei den sekretierten Enzymen aus Pilzen und der periplasmatischen RNase I aus *Escherichia coli* eine Metabolisierung externer RNA-Quellen zugeschrieben (Nicholson, 1997; Deshpande und Shankar, 2002).

Für die sekretierte RNY1, die einzige bekannte T2-Typ RNase aus *S. cerevisiae*, wird eine Beteiligung an der Regulation der Membranpermeabilität oder -stabilität vermutet (MacIntosh *et al.*, 2001, Thompson und Parker, 2009).

Die humane RNASET2, ist ein sekretiertes Glykoprotein mit T2-Typ-RNase-Aktivität und Tumor- und Metastasen-unterdrückender Wirkung (Acquati *et al.*, 2005, Monti *et al.*, 2008).

9

## **1.3 Zielstellung der Arbeit**

Die Funktion der beiden T2-Typ Ribonukleasen RNaseLE und RNaseLX wurde bereits biochemisch und physiologisch eingehend untersucht (Kock *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 2001; Kock *et al.*, 2004; Kock *et al.*, 2006; Lers *et al.*, 2006). Neben diesen beiden RNase-Sequenzen konnte in *S. lycopersicum* ein weiterer EST-Datenbankeintrag (*expressed sequence tags*, NCBI-GenBank Est281775) identifiziert werden, der eine Sequenzhomologie zu bekannten T2-Typ-RNase zeigt.

Mittelpunkt dieser Arbeit ist die molekulare und physiologische Analyse dieser dritten putativen Ribonuklease RNaseLER. Zur molekularen Charakterisierung zählen sowohl die Entschlüsselung der Gensequenz und Struktur, die gewebespezifische Analyse und die subzelluläre Lokalisierung der RNase.

Des Weiteren soll in dieser Arbeit die Regulation der RNaseLER untersucht werden. Insbesondere sollte dabei geprüft werden, ob die Expression und die Aktivität dieser RNase durch abiotische und biotische Stressbedingungen, wie osmotischem Stress, Phosphatmangel, Pathogenbefall, Phytohormonapplikation und Verwundung induzierbar oder hemmbar ist.

Nach entsprechenden Stimulationen soll hierzu die *RNaseLER*-Expression und die Expression bestimmter Induktionskontrollgene auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) analysiert und die RNaseLER-Aktivität mittels eines RNase-Aktivitätstests bestimmt werden. Von den Ergebnissen zur Expression sind erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der RNaseLER zu erwarten.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und sonstige Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht weiter spezifiziert, in analytischer Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Chemikalien:	
Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	
DifcoLaboratories GmbH, Augsburg	
Duchefa (Haarlem, Niederlande)	
Eppendorf AG, Hamburg	
Greiner Labortechnik GmbH, Solingen	
Merck KGaA, Darmstadt	
Serva Feinchemika & Co., Heidelberg	
Sigma-Aldrich-Fluka, Steinheim	
Whatman (Maidstone, England)	
Reaktionskits:	Firma:
TA-Cloning Kit	Promega Corporation, Madison(U.S.A.)
GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
First-strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
wandow nyim ad Daval abol <sup>TM</sup> DNIA I aboling Kit	MDI Formantas CmbII St. Loon Dat

random primed DecaLabel <sup>m</sup> DNA Labeling Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
iQ <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München
Probe-Quant <sup>™</sup> G-50 Micro Columns	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
DYEnamic <sup>™</sup> ET Terminator Cycle SequencingKit	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
RNeasy® Plant Mini Kit	QiagenGmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	QiagenGmbH, Hilden
SMART <sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Palo Alto, USA

### Geräte:

Tischautoklav: Certoclav	Certoclav Sterilizer GmbH, Traun
Zentrifugen: 5415 R, 5403	Eppendorf AG, Hamburg
GS-15 R	Beckmann, München
Tischzentrifuge: Micro-Centrifuge II	The Griffin Group, Inc.
Spektrophotometer: Ultraspec 3300 pro	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Novaspec II	
Image Master VDS	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
iCycler iQ Real Time PCR Detektions System	BioRad Laboratories GmbH, München
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
UV StratalinkerTM1800	Stratagene GmbH (Heidelberg)

## Geräte (Fortsetzung):

Easyject Plus
<b>BIO-IMAGING ANALYZER BAS1500</b>
Hybridizer HB-1000
Microm Rotationsmikrotom
"Axioplan" Lichtmikroskop
CCD3 Video Kamera

Peqlab Biotechnologia GmbH, Erlangen Raytest Peqlab Biotechnologia GmbH, Erlangen Micram Laborgeräte GmbH Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

# 2.1.2 Medien und Puffer

Zur Herstellung der Medien und Puffer wurde deionisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet. Die verwendeten Medien bzw. ihre Bestandteile und Puffer wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121°C, 1,3 bar). Lösungen und Medienzusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch einen Filter mit 0,2  $\mu$ m Porengröße (Sartorius, Göttingen) steril filtriert. Alle verwendeten Medien bzw. Puffer sind mit ihren Bestandteilen, Konzentrationen und Verwendungszwecken in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zusammengefasst.

Bezeichnung	Zusammensetzung		Verwendungszweck
LB (Luria broth)-	1 % (w/v)	Bactotrypton	Anzucht von E. coli
Medium	1 % (w/v)	NaCl	
(Miller, 1972)	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt	
	рН 7,0		
Zur Herstellung von L	B-Platten wurden	dem Medium15g/l Aga	aragar zugesetzt.
YEB-Medium	0,5 %(w/v	Bacto-beef-Extrakt	Anzucht von Agro-
	0,1 % (w/v)	Hefe-Extrakt	bacterium tumefaciens
	0,5 % (w/v)	Bacto-Pepton	
	0,5 % (w/v)	Saccharose	
	0,2% (v/v)	1M MgSO <sub>4</sub>	
	pH 7,2	-	
Zur Herstellung von Y	EB-Platten wurde	en dem Medium15 g/l A	Agaragar zugesetzt
Murashige&SKOOG	0,44 %(w/v)	MS-OH	S. lycopersicum
mit Vitaminen	рН 6,0	ohne CoCl <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub>	Zellkultur-Medium
(Duchefa)	3,0 % (w/v)	Saccharose	
	100 mg/l	Myo-Inosit	
	0,5 mg/l	Thiamin	
	0,5 mg/l	Pyridoxin	
	1,0 mg/l	Nicotinsäureamid	
	0,1 mg/l	2,4-D	
	0,02 mg/l	6-Furfurylaminopurin	
MST-Medium	0.44 %(w/v)	MS-OH	stabile Agrobacterium-
	3,0 %(w/v)	Saccharose	vermittelte Transforma-
	pH 6,1		tion von <i>N. benthamiana</i>

Tabelle 1: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetz	zung	Verwendungszweck
MSZ-Medium	0,44 % (w/v)	MS-OH	Zwischenmedium
	3,0 % (w/v)	Saccharose	transgener
	1,15 µg/ml	BAP	N. benthamiana
	0,1 µg/ml	NAA	
	pH 6,1		
MSS-Medium	0,44 % (w/v)	MS-OH	Selektionsmedium
	3,0 % (w/v)	Saccharose	transgener
	1,15 µg/ml	BAP	N. benthamiana
	0,1 μg/ml	NAA	
	160 µg/ml	Betabactyl	
	100 µg/ml	Kanamycin	
	pH 6,1	2	
MSW-Medium	0,44 % (w/v)	MS-OH	Wurzelinduktions-
	3,0 % (w/v)	Saccharose	medium transgener
	160 µg/ml	Betabactyl	N. benthamiana
	$100 \mu \text{g/ml}$	Kanamycin	
	pH 6,1	2	
Zur Herstellung von	MS-Platten wurde	en dem Medium 8 g/l Pl	lant-Agar zugesetzt.
I-Medium	1,05 %(w/v)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Induktionsmedium
	0,45 %(w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Agrobacterium-
	0,1 %(w/v)	$(NH4)_2SO_4$	vermittelte transiente
	0,05 %(w/v)	Na-Citrat 2H <sub>2</sub> O	Transformation von
	0,1 % (w/v)	Glukose	N. benthamiana
	0,1 % (w/v)	Fruktose	
	0,4 %	Glycerol	
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>	
	10 mM	MES	
	pH 5,6		
	$50 \mu\text{g/ml}$	Acetosyringon	
	10	Zugabe nach dem	
		Autoklavieren	
AI-Medium	5 mM	MES	Inokulationsmedium
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	Agrobacterium-
	0,15 mM	Acetosyringon	vermittelte transiente
	pH 5,3		Transformation
	<u> </u>		N. benthamiana

Tabelle 1 Fortsetzung: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung		Verwendungszweck
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl	Lösen von DNA,
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA	in situ-Hybridisierung
	рН 7,5		
1 x TAE	40 mM	Tris	
	40 mM	Eisessig	
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA	
	pH 8,0		
DNA-Ladepuffer	50 % (v/v)	Glycerin	
(6x)	0,25 % (v/v)	Bromphenolblau	
	0,25 % (v/v)	Xylencyanol	
	10 mM	Tris/HCl	
	pH 8,0	N. OH	7 111
Alkalische Lyse-	200 mM	NaOH	Zelllyse
Losung	<u> </u>	SDS T · HOI	T 1 /
DNA-	100 mM	I ris-HCI	Isolation
Extractionsputter	50 mM	$Na_2$ -EDTA	hochmolekularer
	500 mM	NaCI	genomischer Pilanzen-
	1,3%	5D5	DINA
	рп 8,0 10 mM	B Margantaathanal	
		<i>p</i> -wereaptoethanor (frigeh zugetzen)	
	200 mM	Tria HCl	Isolation conomischor
DNA- Extractionspuffer	200  mW	$\frac{115-\Pi CI}{N_{0}}$	Pflanzon DNA aug
Extractionsputter	25  mW	Na <sub>2</sub> -LDTA NaCl	r Hallzell-DNA aus
	230 milvi	SDS	geringen Diattmengen
	0,5 70 nH 7 5	505	
GTE-Puffer	$\frac{\text{pn} \gamma, 5}{50 \text{ mM}}$	Glucose	Isolation Plasmid-DNA
	25 mM	Tris-HCl	mit geringer Konienzahl
	10 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA	init geringer itopienzum
	4  mg/ml	Lysozym	
	pH 8 0	Lybollym	
	10  µl/ml	RNase A	
		(10  mg/ml)	
SSC	150 mM	NaCl	Southern-Blot,
	pH 7,0	Na-Citrat	in situ-Hybridisierung
50x Denhardts	1 % Ficoll	Ficoll	Southern-Blot
	1 % PVP	PVP	
	1 % BSA	BSA	
Hybridisierungs-	5x	SSC	Southern-Blot
lösung	5x	Denhardts	
	0,5 %	SDS	
	100 µg/ml	Heringssperma-	
	_	DNA	
Extraktionspuffer	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Proteinextraktion aus
	300 mM	NaCl	Blattmaterial

Tabelle 2: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammenset	zung	Verwendungszweck
Äquilibrierungspuffer	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Proteinreinigung,
	300 mM	NaCl	Cobaltsäule
	10 mM	Imidazol	
	рН 7,4		
Elutionspuffer	50 mM	$Na_2HPO_4$	Proteinreinigung,
	300 mM	NaCl	Cobaltsäule
	150 mM	Imidazol	
	pH 7,4		
Protein-Probenpuffer	400 mM	Tris-HCl	
	4 %	SDS	
	40 %	Glycin	
	0,01 %	Bromphenolblau	
	pH 6,8		
	10 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol	
<b>D</b> ( <b>D</b> 1 1 )	25. 16	(frisch zusetzen)	
Protein-Elektro-	25 mM	Tris-HCl, pH 8,3	Acrylamidgel
phoreseputter	192 mM	Glycin	
Transferputter	50 mM	l ris	Western-Blot
	40 mM	Glycin	
	0,04 %	SDS	
	20 %	Methanol	
$1_{20}BS$	20 mM	I ris/HCl	Western-Blot
	150 mM	NaCI	
трст	pH /,5		Western Dist
1 <sub>20</sub> BS-1	20  mM	I fis/fici NaCl	western-Blot
	130 IIIIvi 0.1.0/	Tueson 20	
	0,1 70 nH 7 5	I WEELI 20	
Rlocking_Puffer	$\frac{p_{11}}{20}$ mM	Tris/HC1	Western_Blot
Diocking-1 unci	150  mM Na	NaCl	Western-Diot
	0.1%	Tween 20	
	3 %	fettfreie Trocken-	
	pH 7 5	milch	
PonceauS-Lösung	0.2%(w/v)	PonceauS	
Toneeddo Losung	3%(w/v)	TCA	
	3%(w/v)	Sulfosalicylsäure	
T100BS	100  mM	Tris/HCl	
110020	150 mM	NaCl	
	pH 7,5		
GUS-Fixierer	0,3 %	Formaldehyd	histochemischer
	50 mM	Na-Phosphatpuffer	GUS-Assay
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA	-
	рН 7,0		
GUS-Waschlösung	50 mM	Na-Phosphatpuffer	histochemischer
č	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA	GUS-Assay
	рН 7,0		-

Tabelle 2 Fortsetzung: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetz	ung	Verwendungszweck
Stängelfärbelösung	0, 5 mM 100 mM 1 mM 0,5 mM 0,5 mM	X-Gluc Na-Phosphatpuffer Na <sub>2</sub> -EDTA K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	histochemischer GUS-Assay
Blattfärbelösung	pH 7,0         0, 5 mM         100 mM         1 mM         0,5 %         0,2 %         0,5 mM         0,5 mM         pH 7,0	X-Gluc Na-Phosphatpuffer Na <sub>2</sub> -EDTA Triton X-100 Sarcosyl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	histochemischer GUS-Assay
Keimling/Blüte/ Wurzel-Färbelösung	0,5 mM 100 1 mM 50 mM 0,5 % 0,1 mM 0,1 mM pH 7,0	X-Gluc Na-Phosphatpuffer Na <sub>2</sub> -EDTA NaCl Triton X-100 K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] pH 7,0	histochemischer GUS-Assay
GUS-Extraktions- puffer	50 mM 10 mM 10 mM 0,1 % (v/v) 0,1 % (v/v) pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> -EDTA β-Mercaptoethanol Na-laurylsarcosyl TritonX-100	fluorimetrischer GUS-Aktivitätstest
Fixativ	8 mM 1,5 mM 135 mM 3 mM 3 % 0,01 % pH7,2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl KCl Paraformaldehyd Triton X-100	<i>in situ</i> -Hybridisierung / Einbettung in Paraplast
Hybridisierungs- puffer	50 % 4 x 150 μg (7 ml) 0, 5 % 40 U / ml	Formamid SSC tRNA (Merck) Blocking reagent RNase Inhibitor	in situ-Hybridisierung
Detektionspuffer	100 mM 100 mM 50 mM pH9,5	Tris/HCl NaCl MgCl <sub>2</sub>	in situ-Hybridisierung
Pronase-Puffer	50 mM 5 mM pH7,5	Tris/HCl EDTA	in situ-Hybridisierung

Tabelle 2 Fortsetzung: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

#### Antibiotika und Phytohormone 2.1.3

Den Medien für Flüssigkulturen oder Agarplatten wurden Antibiotika in den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben (Tabelle 3), um ausschließlich eine Vermehrung derjenigen Bakterien zu erreichen, die das betreffende Antibiotika-Resistenzgen exprimierten. Phytohormone wurden den Agarplatten, die für die stabile Transformation von Pflanzen verwendet wurden, in den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben (Tabelle 3).

abelle 3: verwendete Antibiotika und Phytonormone.				
Antibiotika/Phytohormone	Stammlösung	Endkonzentration		
Ampicillin	50 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	100 µg/ml		
Chloramphenicol	100 mg/ml (in EtOH)	7 μg/ml		
Gentamycin	50 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	50 μg/ml		
Kanamycin	50 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	50 μg/ml		
Rifampicin (Rif)	100 mg/ml (in DMF)	100 µg/ml		
Acetosyringon	0,15 mM/ml (in H <sub>2</sub> O)	50 μg/ml		
Betabactyl	160 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	160 μg/ml		
6-Benzylaminopurin (BAP)	1,15 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	1,15 µg/ml		
Naphthylessigsäure (NAA)	0,93 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	0,1 μg/ml		

<b>Tabelle 3: Verwendet</b>	e Antibiotika und	Phytohormone.
-----------------------------	-------------------	---------------

#### Oligonukleotide 2.1.4

Oligonukleotide (Primer), die für die reverse Transkription, die verschiedenen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und für die Sequenzierungen verwendet wurden, wurden über die Firma Metabion international AG (Martinsried) bezogen. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sie an ihrem 5'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle (RE) für die Klonierung in die verschiedenen Vektoren aufweisen.

Tabe Fettge	<b>Fabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.</b> Fettgedruckte Buchstaben in den Sequenzen deuten die Restriktionsschnittstellen (RE) an.				
Bez	zeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'–3')	RE		
Pro	motorkonstrukte:				
1	PstI_P1	AACTGCAGAAATAACTTTTCACTGAATGATAAC	PstI		
2	PstI_P2	AACTGCAGCACCTTTGCTAATTTTCTCAAGTTG	PstI		
3	PstI_P3	AACTGCAGCGACGGCTCGGGCTGATGACAAATC	PstI		
4	P1-2 SalI	GTCGACGGTGGCTTTTCTCTTCAAATTTTCA	SalI		

Bez	eichnung	Oligonukleotidsequenz (5'–3')	RE
5	M13f	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	-
6	M13r	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTA	-
8	GUSII	CTGCCTGGCACAGCAATTGCCCGGCTTTC	-
9	LER_Prom	CCAGCTCTTAATTAATCCATCGTC	-
10	5'UTR_f	CATTTCTGGTCTAACACAATTACAG	-
11	5'UTR_r	GAGTAGAGGCATAAAATGCAACTTG	-
12	LER-F1	GCTTTTCTCTTCAAATTTTCATTC	-
13	LER_E1r	GATACCGGCTGCAACAAGCGTTGG	-
Seq	uenzierung, Kolonie	- und analytische PCR	
14	LER_E2r	AATACAGATGGCGAGTTTGAG	-
15	LER_E3f	AACTTGGCCTTCCTGTTGTTCTGG	-
16	LER_E3f2	GGATAGTAGTGGCGTCAGCCGTCAG	-
17	LER_E3r	CAGAACAACAGGAAGGCCAAGTTCC	-
18	LER_E4f	TAAGTTGTAGTTCCCCCAGATCTTG	-
19	LER-E4f2	CATCACAAAAAAGGACCATTCTGGG	-
20	LER_E4r	GGGGGAACTACAACTTAAGGAAGG	-
21	LER_E4r2	ATCTCACATCCTAGTCTATGTTGCC	-
22	LER_E5f	GGGACATGTGCTTATCCAGTTGTCC	-
23	LER_E5f2	AGTTGCATCTTGAATAATTATATGC	-
24	LER_E5r	GAACAACTGGATAAGCACATGTCCC	-
25	LER_E6r	ATGGATGAAATGCCTCTTAATGG	-
26	LER_E6r2	GGCATAAAATCGTGAGGTGATTAGT	-
27	LER_R1	GCCAAGGTCATTCGGCACCTTTGTC	
28	Int3_f	AGAACTATCTGCATTGCTACTC	-
29	Int3_f2	TCATTGAGAAGCTTAGATTTCC	-
30	Int4_f	AATGTTGGCTTCTGTAATAATATTG	-
31	Int4_r	GGGATTAATGCTCCTGATAACCCC	-
32	Int4_r2	TATGTTGGCACATTATTGTCATACC	-
33	NotI_LER	GCGGCCGCATGTCTTCTCCTGCAATTGTGAATC	NotI
34	LER_TAT_XhoI	CTCGAGATAAGAAGCTGCTGTTGTATTGC	XhoI
35	BamHI_LER	GGATCCATGTCTTCTCCTGCAATTGTG	BamHI
36	His_TAG_SacI	GAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG	SacI
37	XhoI_eYFP	ATATCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	XhoI
38	eYFP_SacI	TATAGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	SacI
39	HindIIICaMV	AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCCCAG	HindIII
40	CaMVXbal	TCTAGAGTCCCCCGTGTTCTCTCC	Xbal
RT-	PCR und <i>real time</i> -F	RT-PCR:	
41	rt-LER_E5f	GGGACATGTGCTTATCCAGTTGTCC	-
42	rt-LER_E6r	ATGGATGAAATGATGCCTCCTAATGG	-
43	rt-E6_f	CCTCAGTACGTCAGCTTGCCAGCCC	-
44	rt_3`UTR_r	CCTGTAGATTTGCACGTGAGAAAGG	-
45	ACO-f	GAAGTGATGCAGTAATATATCCAGC	-
46	ACO-r	GCACTTGCAATTGGATCACTTTCC	-

### Tabelle 4 Fortsetzung: Verwendete Oligonukleotide

Bez	eichnung	Oligonukleotidsequenz (5'–3')	RE
RT-	PCR und <i>real time-</i> R	T-PCR:	
47	PR-1-f	AGGCCAGACTATAACTACGCTACC	-
48	PR-1-r	AAGGACGTTCTCCAACCCAGTTGCC	-
49	PIN2-f	GGATGTACCACGTGTTGCAG	-
50	PIN2-r	ACAGGGTACATATTTGCCTTGG	-
51	R-Ubi1-f	GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCAG	-
52	R-Ubi1-r	AAACGTAGGTGAGCCCACAC	-
54	RNLX-f	ATGGCACTTGTTCAGCTCTTAACC	-
55	RNLX-r	TGCACTCTATAAATGGTGTGTGTGTCC	-
gen	ome walker-PCR:		
56	GWAklein	PO <sub>4</sub> -ACCAGCCC-NH <sub>2</sub>	-
57	GWAgross	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGA CGGCCCGGGCTGGT	-
58	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
59	AP2 nested	ACTATAGGGCACGCGTGGT	-
60	GSP1	TGTCTCTGTTTCCTCCTCTTCTAAG	-
61	GSP2 nested	TCCTCTTCTAAGTATCCAACTTC	-
62	GSP3	AAGAGGGTCATGTCCTCAGTACGTC	-
63	GSP4 nested	CCTCAGTACGTCAGCTTGCCAGCCC	-
5'- ı	and 3'-RACE-PCR:		
64	BD SMART II™ A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	-
65	3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN (N = A, C, G, oder T; V = A, G oder C)	-
66	5'-CDS	$(T)_{25}V N (N = A, C, G, oder T; V = A, G, oder C)$	-
67	NPU	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	-
68	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAT CAACGCAGAGT	-

Tabelle 4 Fortsetzung: Verwendete Oligonukleotide

# 2.1.5 Mikroorganismen und Vektoren

Für allgemeine Klonierungsverfahren und Pflanzentransformation wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Bakterienstämme eingesetzt.

*Escherichia coli*-Stämme wurden in LB-Medium bei 37°C und *Agrobacterium*-Stämme in YEB-Medium bei 28°C inkubiert.

$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Mikroorganismen	Beschreibung	Quelle
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	Escherichia coli		
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	DH10b	F mcrA $\Delta$ (mrr-hrdRMS-mcsBc) $\Phi$ 80d	Bethesda Research
$\begin{array}{c c} araD139 \ \Delta(ara, leu) 7697 \ galU \ galK \ \lambda^{-} \\ rpsL \ nupG \end{array} \qquad (MD, U.S.A) \\ \hline rpsL \ nupG \\ \hline DH5\alpha \qquad supE44, lac, U169 \ \lambda (\Phi 80 lacZ \Delta M15), \\ hsdR17, recA1, endA1,gyrA96, thi-1, \\ relA1 \qquad (MD, U.S.A) \\ \hline Bl21(DE3) \qquad F, \ ompT, \ hsdS \ (r_B \ m_B \ ), \ gal, \ dcm \ \lambda(DE3) \\ \hline F, \ ompT, \ hsdS \ (r_B \ m_B \ ), \ gal, \ dcm \ \lambda(DE3) \\ \hline Stratagene \ Corporation \\ (La \ Jolla, \ California, \\ U.S.A) \\ \hline Agrobacterium \ tumefaciens \\ \hline GV3101 \qquad C58; \ Ti-Plasmid: \ pMP90 \qquad VanLarebeke \ et \ al., \\ \hline \end{array}$		$lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1$	Laboratories
$\begin{tabular}{ c c c c c } \hline rpsL nupG \\ \hline DH5\alpha & supE44, lac, U169 \lambda (\Phi 80 lacZ\Delta M15), \\ hsdR17, recA1, endA1,gyrA96, thi-1, \\ relA1 & (MD, U.S.A) \\ \hline Bl21(DE3) & F, ompT, hsdS (r_B m_B), gal, dcm\lambda(DE3) & Stratagene Corporation \\ (La Jolla, California, U.S.A) \\ \hline Agrobacterium tumefaciens \\ \hline GV3101 & C58; Ti-Plasmid: pMP90 & VanLarebeke et al., \\ \hline \end{array}$		araD139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda^{-}$	(MD, U.S.A)
DH5αsupE44, lac, U169 λ (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1,gyrA96, thi-1, relA1Bethesda Research Laboratories (MD, U.S.A)Bl21(DE3)F, ompT, hsdS ( $r_B m_B$ ), gal, dcmλ(DE3)Stratagene Corporation (La Jolla, California, U.S.A)Agrobacterium tumefaciensGV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,		rpsL nupG	
hsdR17, recA1, endA1,gyrA96, thi-1, relA1Laboratories (MD, U.S.A)Bl21(DE3)F , ompT, hsdS (rB mB), gal, dcmλ(DE3)Stratagene Corporation (La Jolla, California, U.S.A)Agrobacterium tumefaciensGV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,	DH5a	supE44, lac, U169 λ (Φ80lacZΔM15),	Bethesda Research
relA1(MD, U.S.A)Bl21(DE3)F , ompT, hsdS (rB mB), gal, dcmλ(DE3)Stratagene Corporation (La Jolla, California, U.S.A)Agrobacterium tumefaciensU.S.A)GV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,		hsdR17, recA1, endA1,gyrA96, thi-1,	Laboratories
Bl21(DE3)F, ompT, hsdS (rB mB), gal, dcmλ(DE3)Stratagene Corporation (La Jolla, California, U.S.A)Agrobacterium tumefaciensVanLarebeke et al.,		relA1	(MD, U.S.A)
Agrobacterium tumefaciens(La Jolla, California, U.S.A)GV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,	Bl21(DE3) F, $ompT$ , $hsdS$ ( $r_B m_B$ ), $gal$ , $dcm\lambda$ (DE3)		Stratagene Corporation
Agrobacterium tumefaciensU.S.A)GV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,			(La Jolla, California,
Agrobacterium tumefaciensGV3101C58; Ti-Plasmid: pMP90VanLarebeke et al.,			U.S.A)
GV3101 C58; Ti-Plasmid: pMP90 VanLarebeke <i>et al.</i> ,	Agrobacterium tumefaciens		
	GV3101	C58; Ti-Plasmid: pMP90	VanLarebeke et al.,
(pTiC58ΔT-DNA) 1974		(pTiC58∆T-DNA)	1974

Tabelle 5: Verwendete Mikroorganismen.

Die in dieser Arbeit erstellten Vektoren und Vektoren, die für allgemeine Klonierungsverfahren und Pflanzentransformation eingesetzt wurden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Verwendung / Resistenz	Quelle
pCR 2.1	Vektor zum direkten Klonieren von PCR-Produkten über A/T-Überhänge; Amp <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup>	Invitrogen
pGEM-Teasy	Vektor zum direkten Klonieren von, PCR-Produkten über A/T-Überhänge; Amp <sup>R</sup>	Promega
pBI101	binärer Vektor zur stabilen Pflanzen- transformation durch <i>Agrobacterium</i> - vermittelten Gentransfer; enthält promotorloses <i>uidA</i> -Gen und Nos- Polyadenylierungssignal; Kan <sup>R</sup>	Clontech

Bezeichnung	Verwendung / Resistenz	Quelle
pRT100mod-MCS-eYFP	enthält <i>eYFP</i> -Gen unter Kontrolle des <i>CaMV-35S</i> -Promotors und <i>CaMV</i> -Polyadenylierungssignals; Amp <sup>R</sup>	AG Klösken
pSPT18	Transkriptionsvektor; pUC-Derivat; Amp <sup>R</sup>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
pBI121	binärer Vektor zur stabilen Pflanzen- transformation durch Agrobacterium- vermittelten Gentransfer; enthält <i>uidA</i> -Gen unter Kontrolle des <i>CaMV-35S</i> -Promotors und Nos- Polyadenylierungssignals; Kan <sup>R</sup>	Clontech
pCP60	binärer Vektor zur stabilen Pflanzen- transformation durch <i>Agrobacterium</i> - vermittelten Gentransfer; enthält <i>CaMV-35S</i> -Promotor und Nos- Polyadenylierungssignal; Kan <sup>R</sup>	Corronado, C/ Raket, P. (1992, unveröffentlicht)
pBIP134-1	pBI101, enthält 750 bp Promotor- fragment ( <i>PstI / Sal</i> I) des <i>RNaseLER</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pBIP221-2	pBI101, enthält 250 bp Promotor- fragment der <i>RNaseLER</i> ; ( <i>PstI / Sal</i> I) Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pBIP367-3	pBI101, enthält 900 bp Promotor- fragment des <i>RNaseLER</i> ; ( <i>PstI / Sal</i> I) Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCPLER-His	pCP60, enthält kodierendes <i>RNaseLER</i> -cDNA-Fragment mit C- terminalem 6-fach His- <i>tag</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCPeYFP	pCP60, enthält kodierendes <i>eYFP</i> - cDNA-Fragment aus pRT100mod- MCS-eYFP ( <i>XhoI / SacI</i> ), Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCPLER-eYFP	pCP60, enthält kodierendes <i>RNaseLER</i> -cDNA-Fragment mit C- terminaler eYFP-Fusion ( <i>NotI / SacI</i> ), Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pETNotLERTATXho	pET22b, enthält kodierende <i>RNaseLER</i> -cDNA ohne Stoppkodon ( <i>Not</i> I / <i>Xho</i> I); Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pPS23	pBluescript II SK, enthält die vollständige cDNA des <i>Ubiquitin</i> -Gens <i>Ubi</i> 1 ( <i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I) aus <i>S. lycopersicum</i> , Amp <sup>R</sup>	Kock et al., 1995
pSPTLER	pSPT18; enthält kodierende <i>RNaseLER</i> cDNA ( <i>XbaI / Bam</i> HI); Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSPTUbi1	pSPT18; enthält die vollständige cDNA des <i>Ubiquitin</i> -Gens ( <i>Ubi1</i> ) ( <i>PstI / Kpn</i> I); Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

Tabelle 6 Fortsetzung: Verwendete Vektoren.

#### 2.1.6 Pflanzenmaterialien, Anzuchtbedingungen und Behandlungen

*Nicotiana-* und *Solanum*-Pflanzen wurden im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bei 23°C, einer relativen Luftfeuchte von 65 % und einer 16-stündigen Lichtperiode angezogen. Für Versuche mit Keimlingen und stabilen Pflanzentransformationen wurden die Samen von *Nicotiana benthamiana* sowie die Samen von *S. lycopersicum* in 4 % Natriumhypochloridlösung (10 min in Natriumhypochloridlösung unter leichtem Schütteln, gefolgt von 5 x 10 min in sterilem dH<sub>2</sub>O und anschließendem Trocknen auf sterilem Filterpapier) sterilisiert. Die Samen wurden auf MSS-Medium (Tabelle 1) ausgesät und die Keimlinge für weitere Analysen 4 Wochen bei 22°C, 16/8 h Licht/Dunkelheit kultiviert.

#### 2.1.6.1 Verwendetes Pflanzenmaterial für die Expressionsstudien

Für die Studien des Expressionsmusters mittels semiquantitativer RT-PCR (*reverse Trans-kriptase*-PCR) wurde aus den in Abbildung 4 dargestellten Pflanzenorganen Gesamt-RNA, wie unter Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, isoliert.



#### Abbildung 4: Verwendetes Pflanzenmaterial für die Expressionsstudien.

Dargestellt ist die Beschaffenheit der in den RNA-Analysen verwendeten Pflanzenmaterialien mit den Zeitangaben über das Alter der Pflanzen nach der Aussaat.

#### 2.1.6.2 In planta-Transformation von N. benthamiana

#### **Stabile Pflanzentransformation**

Die stabile Transformation von *N. benthamiana* wurde abgewandelt nach Horsch *et al.*, 1985 durchgeführt. Zur Durchführung einer *in planta*-Transformation von *N. benthamiana* wurden 25 ml selektiven YEB-Mediums mit dem gewünschten Agrobakterienstamm angeimpft und für 48 h bei 28°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Nach Sedimentation (10 min, 3000 U/min, RT) wurde das Zellpellet in 5 ml MS-Transformationsmedium (Tabelle 1) resuspendiert und anschließend in 50 ml MST-Medium eine  $OD_{600nm}$  0,7 eingestellt. Diese Agrobakteriensuspension konnte anschließend für die Transformation eingesetzt werden.

Zur Blattscheibentransformation wurden Blätter steril angezogener Tabakpflanzen *N. benthamiana* mit einem Skalpell abgetrennt und in 5 x 5 mm Quadrate geschnitten, wobei die Blattrippen entfernt wurden. Die Blattstücken wurden dann für 15 bis 20 min in der *Agrobacterium*-Suspension geschwenkt. Die gut abgetropften Blattstücken wurden anschließend mit der Blattoberseite nach unten für drei Tage auf Agarplatten mit MS-Zwischenmedium (Tabelle 1) aufgelegt. Nach dieser Regenerationszeit wurden die Blattstücken bzw. Kalli auf frisches MSS-Medium umgesetzt. Sich an den Kalli bildende Sprosse wurden mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und zur Wurzelbildung auf Agarplatten mit MS-Wurzelinduktionsmedium (Tabelle 1) umgesetzt. Die einzelnen Kultivierungsschritte erfolgten bei 23°C mit 16 h Licht(50  $\mu$ E\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>)/8 h Dunkelheits-Rhythmus.

Vollständig ausgebildete Tabakpflanzen wurden zur Samengewinnung in Erdkultur ins Gewächshaus überführt.

#### Transiente Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation

Zur Überexpression der *RNaseLER*, der Promotor:GUS-Fusionen oder zur Expression der RNaseLER::eYFP und RNaseLER::His Fusionsproteine wurden junge, vollständig entwickelte *N. benthamiana* Blätter mit den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen transformiert. Die Bakterien wurden 2 Tage in selektiven YEB-Medium angezogen (28°C; 200 U/min). Zur Vorbereitung auf die Infiltration wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 3000 U/min, RT) pelletiert und in 0,5 ml Induktionsmedium (Tabelle 1) mit den entsprechenden Antibiotika resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 4 ml Induktionsmedium

wurden die Bakterienzellen 3 bis 4 h bei RT inkubiert (Induktionsschritt). Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3000 U/min, 5 min) und in Infiltrationsmedium (AI-Medium, Tabelle 1) aufgenommen.

Hierbei wurde eine  $OD_{600nm}$  von 0,4 (entspricht in etwa 4 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) eingestellt. Diese wurden dann über das stumpfe Ende einer Einwegspritze in die Interzellularräume junger vollausgebildeter Blätter injiziert. Die Infiltrationen erfolgten stets von der Blattunterseite her. Die Pflanzen verblieben auch nach der Infiltration im Gewächshaus (26-28°C, 60-70 % relative Luftfeuchte, Lichtperiode 16 h).

### 2.1.6.3 Anzucht und Infiltration von Pseudomonas syringae

Es wurden Versuche mit Pseudomonas syringae pv. tomato (Pto DC3000), für den S. lycopersicum cv. Moneymaker anfällig ist (Petnicki-Ocwieja et al., 2005) und Pseudomonas syringae pv. tomato (Pto TLR 1), einer nicht-pathogenen hrcC-Mutante, die kein intaktes Proteinsekretionssystem besitzt und nicht in der Lage ist, Krankheitssymptome auf Wirtspflanzen bzw. eine HR auf Nicht-Wirtspflanzen auszulösen (Boch et al., 2002), durchgeführt. Die Charakteristika der verwendeten Bakterien sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Pseudomonas-Stämme, die freundlicherweise von Herrn Dr. habil. J. Boch (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik) zur Verfügung gestellt wurden, wurden auf einer selektiven King's B-Platte (Tabelle 1) für 2 Tage bei 28°C kultiviert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie zur Anzucht einer Übernachtkultur in King's B-Medium verwendet, die nach 20 h durch Zentrifugation bei 3000 Upm geerntet wurde. Die Bakterienpellets wurden in 10 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und in einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung so resuspendiert, dass sich eine OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,1 ergab. Das entspricht einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml. Die Infiltration erfolgte über das stumpfe Ende einer Einwegspritze in die Interzellularräume junger, vollausgebildeter Blätter von S. lycopersicum cv. Moneymaker. Die Infiltrationen erfolgten stets von der Blattunterseite her. Kontrollpflanzen wurden mit einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltriert (mock-Behandlung). Die Pflanzen verblieben auch nach der Infiltration in Klimaschränken (Klimaschrank AR-22L; 22°C, 60-70 % relative Luftfeuchte, Lichtperiode 16 h; Lichtintensität von 80  $\mu$ E\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>). Über einen Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurden zu bestimmten Zeitpunkten die Pseudomonas-infiltrierten und mock-infiltrierten Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.
Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>P. syringae</i> pv. tomato (DC3000)	Wildtyp-Stamm, virulent auf Tomate und Arabidopsis, verursacht bakterielle Flecken- krankheit	Cuppels, D. A. 1986.
<i>P. syrinae</i> pv. tomato (TLR1)	nicht pathogen auf Tomate hrcC::ΩSpec <sup>R,</sup> Kan <sup>R</sup>	Boch <i>et al.</i> , 2002

Tabelle 7: Eigenschaften der verwendeten Pseudomonas syringae-Stämme.

## 2.1.6.4 Inokulation von Tomatenpflanzen mit Sporen von Phytophthora infestans

Die Kultivierung und Ernte der Sporen des Oomyzeten *Phytophthora infestans* wurde durch von Frau Dr. S. Rosahl (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr) realisiert.

Zur Inokulation wurden die Blätter von Tomatenpflanzen *S. lycopersicum* cv. Moneymaker mit einer Rasierklinge am Blattgrund abgetrennt und auf Gazestreifen, die sich in Glaspetrischalen mit sterilem Wasser befanden mit der Blattunterseite nach oben aufgelegt. Etwa zwanzig 10  $\mu$ l-Tropfen einer Sporensuspension mit einer Dichte von 5 x 10<sup>5</sup>/ml in Wasser wurden auf die Blattunterseite aufgetropft. Die Petrischalen wurden verschlossen, um die für die Infektion durch Pilzsporen nötige hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen und in einem Klimaschrank bei 18°C inkubiert. Auf Blätter von Kontrollpflanzen wurde Wasser auf getropft.

Innerhalb von 5 Tagen wurden täglich Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

# 2.1.6.5 Verwundung von Tomatenpflanzen

Zur Untersuchung der Verwundungsinduzierbarkeit der *RNaseLER*-Genexpression wurden Fiederblätter 5 Wochen alter Tomatenpflanzen *S. lycopersicum* cv. Lukullus mit einer Rasierklinge am Blattgrund abgetrennt. Die Verwundung erfolgte durch mehrfaches perforieren der Blattspreiten und -rippen mit einem Markierrädchen. Die verwundeten Blätter wurden in Petrischalen auf 30 ml sterilisiertem Wasser aufschwimmend inkubiert. Zur Kontrolle (*mock*-Behandlung) wurden unbehandelte Blätter auf Wasser aufschwimmend inkubiert. Die Versuche wurden unter Dauerlicht von 50  $\mu$ E\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> bei 22°C durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.1.6.6 Applikation von Phytohormonen und Stress auslösenden Substanzen

Für die Applikationsversuche mit Abscisinsäure (ABA; 100  $\mu$ M), 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC; 50  $\mu$ M) und Sorbit (300 mM) wurden Fiederblätter 5 Wochen alter Tomatenpflanzen *S. lycopersicum* cv. Lukullus mit einer Rasierklinge am Blattgrund abgetrennt und in Glaspetrischalen auf den entsprechenden Lösungen schwimmend inkubiert. Kontrollblätter wurden auf Leitungswasser inkubiert (*mock*-Behandlung). Die Versuche wurden unter Dauerlicht 50  $\mu$ E\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> bei 22°C durchgeführt. Über einen Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurden zu bestimmten Zeitpunkten die behandelten und *mock*-behandelten Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Ethephon (Chlorethylphosphonsäure, Ethylen-Analogon) wurde durch Sprühen einer 20 mM wässrigen Lösung auf 5 Wochen alten Gewächshauspflanzen im Abstand von 30 cm appliziert, bis sie gleichmäßig von feinen Tropfen bedeckt waren. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser besprüht (*mock*-Behandlung). Die behandelten Pflanzen verblieben bis zum Ende der Probennahme im Gewächshaus. Über einen Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurden zu bestimmten Zeitpunkten die behandelten und *mock*-behandelten Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

### 2.1.6.7 Zellsuspensionskultur

In der vorliegenden Arbeit wurden heterotroph wachsende Zellsuspensionskulturen der Tomate *(S. lycopersicum* cv. Lukullus) für die Untersuchung des Expressionsmusters von *RNaseLER* während eines Phosphatmangels verwendet. Die Kultivierung der Zellkultur erfolgte nach TEWES *et al.* (1984) bei 28 °C im Dunkeln in modifiziertem Murashige&Skoog-Nährmedium (MS-Medium ohne Vitamine) im Rotationsschüttler (160 U/min). Durch den Transfer von ca. 2 x 10<sup>7</sup> Zellen einer 3 Tage alten Zellkultur erfolgte dann unter sukzessivem Verbrauch des in der Nährlösung vorhandenen Phosphates (Normalkultur). Ausgehend von dieser Normalkultur wurden die für die Untersuchung verwendeten +Pi- und Pi-Kulturen weitergeführt. In der +Pi-Kultur wurde die Pi-Ausgangskonzentration (2,5 mM) nahezu konstant gehalten, indem das von den Zellen aufgenommene Phosphat täglich durch steril filtriertes KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0 ersetzt wurde. Die Kultivierung unter Pi-Mangelbedingungen (Pi-Kultur) erfolgte in Abwesenheit von jeglichen organischen oder anorganischen Pi-

Quellen. Dazu wurden die Zellen einer 3 d alten Normalkultur abzentrifugiert (3 min; 1000 U/min; 25 °C), zweimal mit Pi-freiem Nährmedium gewaschen und dann in 100 ml Pi-freier Nährlösung resuspendiert. In einem Zeitintervall von 0; 12 und 24 Stunden wurden die +Pi<sup>+</sup>- und Pi-Kulturen durch absaugen des Kulturmediums mit einer Wasserstrahlpumpe geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

# 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Grundtechniken der Nukleinsäureanalytik

### 2.2.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei einem Restriktionsendonuklease-Verdauung wurde DNA mit der entsprechenden Enzymmenge (pro µg DNA 1 Unit Restriktionsenzym) in dem dafür geeigneten Reaktionspuffer inkubiert. Meist erfolgte die Hydrolyse während 3-4 h bei 37°C. Für einige Enzyme wurden die Inkubationszeit und -temperatur entsprechend kommerziell erhältlicher Tabellen variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumenanteil 6 x DNA-Probenpuffer beendet. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

### 2.2.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor-DNA und PCR- bzw. Restriktionsfragmenten erfolgte in einem Volumen von 10  $\mu$ l. Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde so eingestellt, dass das Insert mindestens im dreifachen Überschuss vorlag. Die Ligationsreaktion erfolgte für 16 h mit 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (1 U) bei 4°C wenn es sich um *"sticky end"-* und 12°C wenn es sich um *"blunt end"-*Fragmente handelte.

### 2.2.1.3 Transformation von Bakterien

Die verwendeten *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Stämme wurden mittels Elektroporation transformiert (Taketo, 1988). Diese Methode beruht auf kurzen Hochspannungspulsen, die "Löcher" in der Zellhülle verursachen, durch welche exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Die zu transformierende DNA muss sich zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlags in einer weitgehend Ionen-befreiten Lösung befinden.

### Präparation elektrokompetenter Zellen

250 ml Medium wurden mit einer Bakterienvorkultur angeimpft (1:250) und wuchsen in einem Inkubationsschüttler (37°C, 200 U/min) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6. Die Zellsuspension wurde dann durch 15 minütiges Schwenken in Eiswasser abgekühlt und durch Zentrifugation (ST-H750, 20 min, 4000 U/min, 4°C) sedimentiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 1/4 des Ausgangsvolumens eiskaltem, sterilem Wasser und sukzessive mit 1/8 und 1/10 des Ausgangsvolumen 10 %igem Glycerin gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschritten zentrifugiert wurde (10 min, 4000 U/min, 4°C), um einen Wechsel der Waschlösungen vornehmen zu können.

Im Anschluss wurde das Pellet in 2,5 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 50 µl und in Flüssigstickstoff eingefroren. Eine Lagerung erfolgte bei -80°C statt.

## **Elektroporation kompetenter Zellen**

Ein Aliquot der eingefrorenen elektrokompetenten Zellen wurde im Eis aufgetaut und mit DNA-Lösung versetzt. Bei nativen Plasmiden wurden in Abhängigkeit von der Größe zwischen 1 und 10 ng gereinigte DNA eingesetzt. Ligationsansätze wurden ungereinigt eingesetzt (maximal 2  $\mu$ l). Der Ansatz wurde dann in eine auf Eiswasser gekühlten Küvette überführt und die Elektroporation in einem Elektroporator der Firma BIORAD GmbH nach Vorschrift (Elektroporationsparameter: 2,5 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 5 msec) durchgeführt.

Mit 0,5 ml LB-Medium wurden die Zellen anschließend aus der Küvette gespült und zur Ausbildung der spezifischen Antibiotika-Resistenz 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf einer selektiven Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht (ca. 12 h bis 16 h) bei 37°C inkubiert.

### 2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. In der Regel wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1 %-2 % genutzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwandt. Zur Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten wurden den Gelen (100 ml) 4  $\mu$ l einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Zur Größenbestimmung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten wurden als Längenstandard der 100 bp- oder 1 kb-Marker der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) eingesetzt.

## 2.2.2 Isolation von Nukleinsäuren

## 2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden in Abhängigkeit der verwendeten Organismen und weiteren Verwendung verschiedene Methoden verwendet:

## Isolierung von Plasmiden hoher Kopienzahl

Die Extraktion von Plasmid-DNA mit hoher Kopienzahl erfolgte nach dem Protokoll der Alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Bakterien wurden zunächst in selektiven 5 ml-Übernachtkulturen angezogen. Je 2 ml Kultur wurden bei 13000 U/min (Eppendorf Zentrifuge 5415D) für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Präparation von Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse wurde immer dann verwendet, wenn die Plasmid-DNA durch PCR oder Restriktionsspaltung zu analysieren war bzw. für Klonierungen verwendet werden sollte und nur geringe Ansprüche an die DNA-Qualität bestanden. Für Sequenzierreaktionen wurden allerdings Plasmid-DNA-Präparationen mittels GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellerprotokoll bevorzugt.

## Isolation von Plasmiden mit geringer Kopienzahl oder aus Agrobacterium tumefaciens

Für die Extraktion von Plasmiden mit geringer Kopienzahl oder aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde der relative Anteil an Plasmid-DNA in den Bakterienzellen erhöht.

Die Bakterien wurden in einer selektiven 5 ml Übernachtkultur angezogen. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde der Übernachtkultur Chloramphenicol (8,5  $\mu$ l einer 100 mg/ml Chloramphenicollösung), das ausschließlich die Zellteilung jedoch nicht die Plasmidvermehrung hemmt, zugesetzt. Nach weiteren 3-6 h Inkubation bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) wurden die Zellen mittels Zentrifugation (2 min, 13000 U/min) geerntet. Die Extraktion erfolgte nach der Alkalischen Lyse-Methode von Doyle und Doyle (1979). Nach Resuspendierung der Zellen in GTE-Puffer (Tabelle 2) wurden zum Zellaufschluss 0,2 ml Lyse-Puffer zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Proteine und Zellbruchstücke wurden durch Zugabe von 300  $\mu$ l 3 M Natriumacetatlösung, (pH 5,0, Inkubation 20 min auf Eis) ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (3 min; 13000 U/min). Der Überstand wurde mit 1 Vol. PCIA gereinigt, die enthaltende DNA durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-40  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst.

## 2.2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolierung genomischer Pflanzen-DNA erfolgte aus Blattmaterial der zu untersuchenden Pflanzen. In Abhängigkeit von der weiteren Verwendung wurden hierzu verschiedene Methoden verwendet.

## Isolierung hochmolekularer genomischer Pflanzen-DNA

Unter Flüssigstickstoff im Mörser geriebenes Pflanzenmaterial (4 g Frischmasse) wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit 10 ml auf 65°C vorgewärmten Extraktionspuffer (Tabelle 2) versetzt und kräftig durchmischt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 65°C in einem Wasserbad und regelmäßigem Invertieren wurde die Suspension auf RT abgekühlt. Nach Zugabe von 3 ml 5 M Kalziumacetat erfolgte eine dreißigminütige Inkubation in einem Eisbad. Die ausfallenden Polysaccharide und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min bei 10000 U/min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Reinigung der sich in Lösung befindenden DNA erfolgte durch Zugabe von 10 ml PCIA (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (v/v/v) 25:24:1), vorsichtigem Mischen und Zentrifugation (15 min bei 5000 U/min). Der wässrige Überstand noch dreimal mit PCIA extrahiert. Zur DNA-Fällung wurde der wässrige Überstand mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt. Die als trübe, fädige Masse ausgefallene, hochmolekulare DNA wurde mit einem Glashaken aus der Lösung gefischt und in einem 15 ml Röhrchen mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig abgenommen, die DNA 15 min bei RT getrocknet und in 1 ml TE-Puffer gelöst.

Nach Zugabe von DNase-freier RNase (10  $\mu$ g/ml), einstündiger Inkubation bei 37°C wurde mit dH<sub>2</sub>O ein Gesamtvolumen von 5 ml eingestellt. Es folgte eine PCIA-Extraktion und die sich in Lösung befindende DNA wurde mit 2,5 Vol. Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100- 300  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst. Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (1 OD<sub>260 nm</sub> =50  $\mu$ g DNA / ml). Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

# Isolierung genomischer Pflanzen-DNA aus geringen Blattmengen

Die Extraktion von genomischer DNA aus den transgenen Tabakpflanzen erfolgte über einen wässrigen Puffer, der Detergenzien zum Zellaufschluss enthält. Ein 2 ml-*Safe-lock* Gefäß (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurde mit einer geringen Menge Blattmaterial befühlt und in Flüssigstickstoff Schock gefroren, mit einem Pistill gemörsert, mit 1 ml auf 65°C vorgewärmten DNA-Extraktionspuffer versetzt und bis zur Homogenität gemischt.

Nach 30 min Inkubation bei 65°C und regelmäßigem Invertieren wurde der Suspension 500  $\mu$ l Chloroform (bei -20°C vorgekühlt) zugegeben. Anschließend wurde die Suspension bis zur milchigen Konsistenz gemischt und zur Phasentrennung 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Zur DNA-Fällung wurde der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt und 1 ml Isopropanol zugegeben. Danach wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 13000 U/min) pelletiert, das DNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurde das in flüssigem Stickstoff eingefrorene bzw. bei -80°C gelagerte pflanzliche Material unter flüssigem Stickstoff gemörsert und 100 mg des Pulvers zur Gesamt-RNA Isolation eingesetzt. Gesamt-RNA der einzelnen Pflanzengeweben von *S. lycopersicum* wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini-Kits der Firma Qiagen gewonnen, wobei den Herstellerangaben gefolgt wurde.

Die isolierte Gesamt-RNA wurde zwecks Qualitäts- und Quantitätsprüfung jeweils gelelektrophoretisch in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und im Photometer (Wellenlänge 260/280nm) gemessen (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte spektrophotometrisch am Ultraspec 3300 (Pharmacia) über die Messung der Absorption von UV-Licht durch die Nukleinsäurelösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm. Dabei entspricht ein Extinktionswert von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration (doppelsträngige DNA) von 50  $\mu$ g/ml und einer Konzentration von 40  $\mu$ g/ml bei RNA oder einzelsträngiger DNA. Jeweils 1-2  $\mu$ l Nukleinsäurelösung wurde für die Messungen 100-fach verdünnt verwendet. Die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen wurden in ng/ $\mu$ l ausgegeben.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; Saiki et al., 1988) ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von Nukleinsäurebereichen. Ausgehend von

chemisch hergestellten Oligonukleotiden synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase einen neuen DNA-Doppelstrang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Die wesentlichen Schritte der PCR sind: Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelsträngige Matrize (*Annealing*) und Synthese des neuen DNA-Doppelstrangs (Elongation). Im Allgemeinen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Hatte bei der Amplifikation durch PCR die Vermeidung von Mutationen Priorität, so wurde die Reaktion mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt, da diese Polymerase eine *proof reading*-Funktion besitzt. Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit beheizbarem Deckel (iCycler iQ RealTime Detection System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

### Standardbedingungen der PCR

## Standardansatz (20 µl):

DNA-Matrize	100-250 ng	genomische DNA;		
10x PCR-Puffer	5-10 ng 1:10	Plasmid-DNA		
dNTPs	100 nM			
Oligonukleotide	je 3 mM			
Taq-Polymerase	3 U			
<i>ad</i> 20 μl dH <sub>2</sub> O				
Standard-PCR-Pro	ogramm:			
Denaturierung der D	DNA	94°C	2-5 min	
Denaturierung der D	DNA	94°C	30 sec	
Anlagerung der Olig	gonukleotide	50 - 70°C	30 sec	25-40x
DNA-Synthese (Elo	ngation)	72°C	30 sec-3 min	
DNA-Synthese (End	d-Elongation)	72°C	10 min	

Die Annealingtemperaturen wurden über die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide und die Elongationszeiten über die Länge der zu amplifizierenden Fragmente (1 min für ein Fragment mit 1 kb Länge) bestimmt. Die Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) eines Oligonukleotides

berechnete sich nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren Guanin/Cytosin-Gehalt (% GC), als auch die Länge der Oligonukleotide (n=Anzahl der Nukleotide) berücksichtigt (Bolton und McCarthy, 1962):  $T_M$  (°C)=69,3+0,41 (% GC)-(650/n).

### Erst-Strang-cDNA-Synthese

Zur weiteren Analyse wurde die aus den unterschiedlichen Pflanzengeweben isolierte RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zur Erst-Strang-cDNA-Synthese wurde das "First Strand cDNA Synthesis Kit" (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). In einem 12  $\mu$ l umfassenden Versuchsansatz wurden 1  $\mu$ g Gesamt-RNA mit 10 mM Oligo-(dT)<sub>18</sub> für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von Reaktionspuffer, Ribonuklease-Inhibitor (20 Units) und 10 mM dNTP Gemisch (1 mM), 2  $\mu$ l der M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ $\mu$ l) auf Eis, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt, anschließend auf Eis abgekühlt und die cDNA bei -20°C gelagert.

Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde mittels PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 4, 41/42) getestet. Es wurden Intronüberspannende Oligonukleotide eingesetzt, um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können.

## real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Die Kombination von reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht es, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen (Newton und Graham, 1994). Dabei können auch mRNA-Moleküle nachgewiesen werden, die nur in geringer Konzentration in der Zelle vorkommen. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde in einer PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 4, 43/44) aus dem 3'-Ende amplifiziert. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden Oligonukleotide verwendet, die ein spezifisches, 160 bp großes Fragment des *Ubiquitin* 1 (*Ubi1*)-Gens von *S. lycopersicum* amplifizieren, welches in den Zellen konstitutive Expression zeigt. Die entsprechenden Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 4 angegeben.

Für den *real-time* RT-PCR-Ansatz wurde der iQ<sup>™</sup> SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde wie bei der Standard-PCR der 50 µl Ansatz auf 20 µl Gesamtvolumen reduziert. Die einzelnen Proben wurden in Duplikaten analysiert. Alle Reaktionskomponenten wurden in einem

Mastermix zusammengeführt und je 19  $\mu$ l Aliquots in die PCR-Gefäße gegeben, bevor mit 1  $\mu$ l cDNA auf 20  $\mu$ l ergänzt worden war. Um die Reinheit des sterilen Wassers und der Primer zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Negativ-Kontrolle (NTC-No Template Control) ohne Matrize untersucht.

Für die qRT-PCR wurde ein optimiertes Programm verwendet. Die Fluoreszenzdatennahme erfolgte bei 72°C während der Elongation, da in dieser Phase die Taq-Polymerase doppelsträngige DNA synthetisiert und proportional dazu die Fluoreszenz durch gebundenen SYBR<sup>®</sup> Green I-Farbstoff ansteigt.

## real-time RT-PCR-Bedingungen

## real-time RT-PCR-Ansatzes (20 µl)

2 x iQ <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	10 µl
Oligonukleotid	je 100 nM
ddH <sub>2</sub> O	<u>ad 19 µl</u>
	+1 µl cDNA

## real-time RT-PCR-Programm

Hot Start Aktivierung/Denaturierung der cDNA	95°C	7 min	
Denaturierung der cDNA	95°C	15 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	60°C	15 sec	40x
DNA-Synthese (Elongation)	72°C	20 sec	

# Berechnung

Mit der quantitativen *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes kontinuierlich die Menge an Produkt, während der PCR in vielen PCR-Ansätzen gleichzeitig zu messen. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate. Dadurch erreicht man, dass nur das Produkt doppelsträngig vorliegt und ein Fluoreszenzsignal aussendet. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als C<sub>T</sub>-Wert ("threshold cycle"=Schwellenwert-Zyklus) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Da die PCR einer bestimmten Kinetik folgt, ist es durch Berechnung möglich, aus der entstandenen DNA-Menge auf die eingesetzte DNA-Menge zurückzuschließen. Die in dieser Arbeit gewählte Detektionsmethode beruht auf der Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist (Livak und Schmittgen, 2001). Aufgrund einer Proportionalität der Fluoreszenz und der entstehenden Amplifikate ist zudem eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA möglich. In der relativen Quantifizierung wird anhand der C<sub>T</sub>-Werte die Genexpression eines Zielgens (Z) auf ein weiteres nicht reguliertes housekeeping-Gen bezogen. In dieser Arbeit wurde als interne Kontrolle oder Referenzgen (Ref) das Gen-Transkript des Ubiquitin 1 (Ubi1) verwendet. Das heißt, die relative Expression des RNaseLER-Gens (Z) wurde auf die relative Expression des Referenzgens der entsprechenden Probe bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) wurde nach Pfaffl (2001) ermittelt. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der C<sub>T</sub>-Wert des Referenzgens vom C<sub>T</sub>-Wert des zu untersuchenden Zielgens subtrahiert ( $\Delta C_T = C_{TZielgen} - C_{TReferenzgen}$ ). Nach dieser Normierung wurde der  $\Delta C_T$ -Wert des Zielgens vom  $\Delta C_{T}$ -Wert eines Kalibrators abgezogen; man kommt zum so genannten "*delta-delta CT*" Berechnungsmodell ( $\Delta\Delta C_T = C_{TZielgen} - C_{TKalibrator}$ ). Als Kalibrator wurde der  $\Delta C_T$ -Wert gewählt, der in der unbehandelten (*mock*-) Probe ermittelt wurde. Der relative Expressionsunterschied (R) einer Probe zwischen dem Zielgen und dem Kalibrator, normalisiert zum Referenzgen, ergibt sich aus der arithmetischen Formel  $E^{\Delta\Delta CT}$ . Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus, wobei die PCR-Effizienz (E) hier gleich 2 gesetzt werden kann. Genauer ist es jedoch für jede verwendete Oligonukleotidkombination den Faktor der PCR-Effizienz anhand einer Standardkurve zu ermitteln.

$$R = \frac{(E_Z)^{\Delta C_T(mock-Behandlung - Behandlung)}}{(E_{Ref})^{\Delta C_T(mock-Behandlung - Behandlung)}}$$

Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen und ihre PCR-Effizienz sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

### Tabelle 8: PCR-Effizienz der Oligonukleotide, die in qRT-PCR-Analysen eingesetzt wurden.

Die Echtzeit-PCR-Oligonukleotide in dieser Arbeit wurden in einer Länge von 130 bis 160 bp synthetisiert, um eine größtmögliche Spezifität zu gewährleisten. Die Schmelztemperatur aller Oligonukleotide liegt bei ca. 62 °C  $\pm 2$  °C. Dadurch konnten alle Gene auch parallel in einem Ansatz untersucht werden. Die Spezifität der Oligonukleotidpaare wurde über konventionelle PCR und anschließende Agarose-Gelelektrophorese getestet.

Oligonukleotidkombination	PCR-Effizienz (E)
R-Ubi1-f/R-Ubi1-r	1,75
rt-LERE6f/rt-3`UTR-r	1,90
PR-1-f/PR-1-r	1,99
ACO-f/ACO-r	1,96
PIN2-f/PIN2-r	1,72
LX/LX	1,80

### 5'-RACE- und 3'-RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends)

Die unbekannten 5'- und 3'- cDNA-Sequenzabschnitte der *RNaseLER*-cDNA wurden in einer 5'- RACE- bzw. 3'-RACE-PCR unter Verwendung des *"SMART™ RACE cDNA Amplification Kit*"(Clontech, Palo Alto, USA) isoliert. Es wurden spezifische Oligonukleotide des Zielgens (Tabelle 4), die Oligonukleotide des *"SMART™* RACE cDNA Amplification Kit", sowie Gesamt-RNA aus dem Blattgewebe von *S. lycopersicum* verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei nach dem Protokoll des Herstellers. Mit Hilfe des *"High Fidelity PCR Enzym Mix"* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und einer *touch down*-PCR wurden die genspezifischen Sequenzen nach dem folgenden Programm amplifiziert.

## touch-down-PCR-Bedingungen

Denaturierung der DNA	96°C	3 min	
Denaturierung der DNA	94°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	62°C	30 sec	15x; -0,5°C pro
DNA-Synthese (Elongation)	68°C	2 min	Zyklus
Denaturierung der DNA	94°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	57°C	30 sec	35x
DNA-Synthese (Elongation)	68°C	2 min	
DNA-Synthese (End-Elongation)	72°C	10 min	

Die erhaltenen 5' und 3' PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des "pGEM<sup>®</sup>-TEasy Vector System" (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-TEasy kloniert

und die erhaltenen Plasmide sequenziert.

### Genome Walking

Zur Vervollständigung von Gensequenzen auf chromosomaler Ebene wurde die *Genome Walking*-Technik eingesetzt. Mit dieser Methode ist es möglich ausgehend von einem bekannten Teil einer DNA-Sequenz in unbekannte Bereiche vorzudringen und so die vollständige DNA-Sequenz zu ermitteln (Siebert *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde auf diesem Weg die 5`-stromaufwärts Sequenz des *RNaseLER*-Gens identifiziert und isoliert.

Ein Mikrogramm genomischer Tomaten-DNA wurde durch jeweils eines der Restriktionsenzyme *Dra*I, *Eco*RV, *Hinc*II, *Pvu*II oder *Stu*I verdaut. In die so generierten fünf genomischen Restriktionsbibliotheken wurde ein Adapter ligiert. Zur Adapterligation wurden10  $\mu$ M Oligonukleotid GWAklein (56, Tabelle 4) und 10  $\mu$ M Oligonukleotid GWAgross (57, Tabelle 4) 2 min bei 95°C denaturiert und zur Aneinanderlagerung langsam auf RT abgekühlt.

## Der Ligationsansatz lautet wie folgt

10 μl genomische DNA-Bibliothek
2 μl 10x T4-Ligase-Puffer
0,4 μl ATP (10 mM)
2 μl 10x BSA
5 μl Adapter (10 μM)
1 μl T4-Ligase (30 weiss unit)

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Im darauf folgenden Schritt wurde die DNA-Bibliothek 1:9 verdünnt und je 1  $\mu$ l in einer 1. Genome Walker PCR eingesetzt. Als genspezifische Oligonukleotide wurden die antisense Oligonukleotide GSP1/GSP2 und LERE2r (Tabelle 4; 60/61 und 14) von der Exon 1- bzw. Exon 2-Sequenz abgeleitet. Die erste PCR wird mit dem Adapteroligonukleotid AP1 (58, Tabelle 4) und einem genspezifischen Oligonukleotid durchgeführt. Die dabei entstandenen Fragmente werden in einer zweiten PCR, bei der ein zweites *nested* Adapteroligonukleotid AP2 und ein *nested* genspezifisches Oligonukleotid eingesetzt werden, noch einmal amplifiziert.

Es wurden Zweischritt-PCRs durchgeführt, bestehend aus 15 Zyklen mit dreiminütiger Anlagerung/Elongation bei 72°C und 40 Zyklen mit dreiminütiger Anlagerung/Elongation bei 67°C. Zwischen den Einzelschritten fand jeweils eine Denaturierung für 2 s bei 94°C statt.

Die anschließende zweite PCR mit eingebetteten Oligonukleotiden bestand aus 10 Zyklen bei 72°C und 30 Zyklen bei 68°C Elongation.

Die amplifizierten Fragmente wurden nach Reinigung in den A-Überhangsvektor, pCR<sup>®</sup>2.1, subkloniert (Tabelle 6, pC5'ÚTR-H) und wie im Folgenden beschrieben, sequenziert.

# Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde eine Sequenzierungs-PCR nach der Didesoxymethode nach Sanger wie folgt angesetzt.

# Sequenzieransatz (10 µl)

DNA-Matrize	100 ng
DYEnamic <sup>™</sup> ET Terminator Cycle Sequencing Kits	3 µl
Oligonukleotid	3 mM

# Sequenzier-PCR-Bedingung:

Denaturierung der DNA	95°C 20 sec.	
Denaturierung der DNA	94°C 10 sec.	
Anlagerung des Oligonukleotids	50°C 20 sec.	x 35
DNA-Synthese (Elongation)	60°C 4 min	

Um das PCR-Produkt anschließend zu fällen, wurden dem Sequenzierreaktionsansatz, 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol 100 % Ethanol hinzugegeben, die Proben gut gemischt und 30 min. bei 13.000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben nochmals eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, gemischt und 15 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nochmals eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Pellet dann 10 min bei RT getrocknet. Die Sequenzauswertung erfolgte freundlicherweise durch die AG von Prof. Bonas (MLU Halle-Wittenberg Institut für Genetik) mit einem ABI Prism 310 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

## 2.2.4 Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten

Zur Detektion von DNA in Hybridisierungsexperimenten PCR-Fragmente unter Verwendung des *random primed* DecaLabel<sup>TM</sup>DNA Labeling Kit (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuantTM G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) wurden nicht eingebaute Nukleotide entfernt.

### 2.2.5 DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Blot)

Die Isolierung genomischer DNA wurde wie unter Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Für die Isolation wurden junge, vollausgebildete Blätter 5 Wochen alter Tomatenpflanzen verwendet.

Die Restriktion von 20 µg genomische DNA erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Hind*III bzw. *EcoRV* unter Verwendung von 2 U pro µg DNA in 200 µL Gesamtvolumen für 20 h bei 37°C. Die DNA wurde mit 0,7 V Isopropanol gefällt und in dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Anschließend wurde die restringierte DNA in einem 0,8 %igem 1 x TAE-Agarosegel bei 5V für 20 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Mobilisierung großer DNA-Fragmente wurde das Agarosegel 20 min in 0,4 M NaOH; 1,5 M NaCl (Denaturierung) inkubiert und anschließend für 20 min in 0,5 M Tris/HCl (pH 7,0), 1,5 M NaCl neutralisiert. In einem alkalischen, aufwärts gerichteten Kapillartransfer wurde die DNA mit 0,4 M NaOH mindestens 10 Stunden auf eine "Biodyne B/Plus"-Membran (Pall Gelman Laboratory GmbH, Dreieich) übertragen. Nach dem DNA-Transfer wurde die Membran 2 min in 2 x SSC geschwenkt und im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, California, U.S.A) durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gekoppelt.

Nach einer 3 stündigen Prähybridisierung der Membranen mit Hybridisierungslösung (Tabelle 2) im Rotationsinkubator bei 65°C erfolgte die Hybridisierung mit geeigneten  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP markierten DNA-Sonden (Kapitel 2.2.4) über Nacht bei 65°C. Der Hybridisierung schlossen sich mehrere Waschschritte (Waschschritt 1: 2x 10 min, 65°C mit 2x SSC, 0,1 % SDS, Waschschritt 2: 20 min 60°C mit 1x SSC, 0,1 % SDS) an. Die Membran wurde in Saran<sup>TM</sup>-Folie (Dow Deutschland, Inc., Schwalbach) verpackt und die Transkript-spezifischen Signale durch Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (BIO-IMAGING ANALYZER BAS1500, Fuji Photo Film Co Ltd, Japan) detektiert.

### 2.2.6 Klonierung der RNaseLER-Fusionskonstrukte

### 2.2.6.1 <u>RNaseLER Promotor-GUS-Konstrukte</u>

Zur Herstellung der *RNaseLER Promotor: GUS*-Konstrukte wurde ein 908 bp- großer Bereich vor dem Startkodon des *RNaseLER*-Gens ausgewählt, der anschließend auf ein 755 bp- und 207 bp- großen Bereich gekürzt wurde. Diese drei Bereiche der putativen Promotorsequenz des untersuchten *RNaseLER*-Gens wurden mit dem Reportergen N-terminal fusioniert. Die ausgewählten Promotorbereiche wurden mit den in Tabelle 9 aufgeführten Oligonukleotiden unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Sal*I aus dem Vektor pC5'-UTR-H (Kapitel 3.1.6) amplifiziert. Die gereinigten und geschnittenen Fragmente [P364 (908 bp), P134 (755 bp); P221 (207 bp)] wurden anschließend in den, durch die gleichen Enzyme geschnittenen, binären Pflanzentransformationsvektor pBI101 vor das Reportergen integriert. Nach Überprüfung der richtigen Orientierung durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung wurden die erhaltenen Plasmide, pBI1P364, pBI1P134; pBI1P221 (Tabelle 6) in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 übertragen. Die erhaltenen Transformatien wurden anschließend erneut mittels Restriktionsanalysen und *Promotor:GUS* spezifischer PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden Promotor-GUS-Konstrukte überprüft.

befinden sich in der Tabelle 4.				
Konstrukt	Oligonukleotidkombination sense/antisense	amplifizierter Bereich	Vektor	
P364	PstI_P3/P1-2_SalI (1/4)	-852 bis +56	pBI1P364	
P134	PstI_P1/P1-2_SalI (2/4)	-699 bis +56	pBI1P134	
P221	PstI_P2/P1-2_SalI (3/4)	-151 bis +56	pBI1P221	

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung von Promotor-GUS-Fusion. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart. Nähere Angaben zu den Oligonukleotiden

### 2.2.6.2 RNaseLER::eYFP

Zur Herstellung der RNaseLER::eYFP-Fusionskonstrukte wurde, ausgehend von Plasmid pCLER2.10 (Tabelle 6) die kodierende Sequenz (CDS, *coding sequence*) der *RNaseLER* (*RNaseLER*-CDS) mittels PCR amplifiziert. Entsprechend der Klonierungsstrategie wurden dazu Oligonukleotide verwendet, die am 5'- und 3'-Ende zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen der Restriktionsenzymen *Not*I und *Xho*I enthielten. Während der Amplifikation des Fragmentes mit dem sense Oligonukleotid 33 (NotI\_LER; Tabelle 4) und dem antisense

Oligonukleotid 34 (LER\_TAT\_XhoI, Tabelle 4) wurde das Stoppkodon am 3'-Ende des Gens durch eine Punktmutation zerstört, um die zu untersuchende RNaseLER mit dem gelb fluoreszierenden Protein (eYFP) zu koppeln. Die Integration der kodierenden Sequenz des *eYFP* (*eYFP*-CDS) erfolgte ebenfalls unter der Verwendung des sense Oligonukleotids 37 (XhoI\_eYFP, Tabelle 4) und des antisense Oligonukleotids 38 (eYFP\_SacI, Tabelle 4), mittels PCR unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Sac*I aus dem Vektor pRT100-MCS-eYFP (Tabelle 6). Der Vektor wurde von der Arbeitsgruppe Klösgen, Institut für Pflanzenphysiologie der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt). Beide Amplikons wurden in den A-Überhangsvektor pGEM-Teasy subkloniert. Nach erfolgtem Restriktionsverdau der Zwischenvektoren wurden nacheinander die *RNaseLER*-CDS C-terminal vor die *eYFP*-CDS in den binären Pflanzentransformationsvektor pCP60 eingebracht und aufgrund des fehlenden Stoppkodons miteinander translational fusioniert. Die richtige Orientierung wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft. Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm DNAStar (DNAstar Inc. Madison, USA) genutzt.

# 2.2.6.3 RNaseLER::His

Zur Herstellung des RNaseLER::His-Konstrukts wurde, ausgehend vom Plasmid pCLER2.10 (Tabelle 6) die Sequenz der RNaseLER-CDS mittels PCR amplifiziert. Die Klonierung der RNaseLER-CDS entspricht der unter Kapitel 2.2.6.2 beschriebenen Strategie. Das Amplifikat wurde einem Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und XhoI unterzogen und in den bakteriellen Expressionsvektor pET22b subkloniert, um das zu untersuchende Gen RNaseLER mit dem His-tag C-terminal zu koppeln (pETLERHis, Tabelle 6). Anschließend wurde mittels PCR das RNaseLER::His-Konstrukt, unter der Verwendung des sense Oligonukleotids 35 (BamHI LER, Tabelle 4) und des antisense Oligonukleotids 35 (His TAG SacI, Tabelle 4), unter Einbau eines Stoppkodons TAG hinter der 6 x His-Sequenz und der Restriktionsschnittstelle SacI aus dem Vektor pETLERHis (Tabelle 6) amplifiziert. Das Amplikon wurde in den A-Überhangsvektor pGEM-Teasy subkloniert und sequenziert. Nach erfolgtem Restriktionsverdau des pGEM-Teasy Zwischenvektors wurde das RNaseLER::His-Fusionskonstrukt in den binären Pflanzentransformationsvektor pBI121 zwischen CaMV-35S Promotor und Anos-Terminator, ligiert. Die richtige Orientierung wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft. Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm DNAStar genutzt. Das erhaltene Plasmid, pBILERHis (Tabelle 6), wurde mittels Elektroporation in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 übertragen (Kapitel 2.2.1.3). Die erhaltenen Transformanten (GV3101pBILERHis) wurden anschließend mittels Restriktionsanalysen und *RNaseLER::His* spezifischer PCR auf das Vorhandensein des LER::His-Konstrukts überprüft.

# 2.2.7 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Computergestützte Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden unter Verwendung des DNAstar-Progammpaketes (DNAstar Inc. Madison, USA), MEGA4 (<u>http://www.megasoftware.net/</u>) und mit dem Vector NTI-Programm (Invitrogen) durchgeführt.

Datenbankrecherchen erfolgten am Medline- und BLASTN-Server das NCBI (National Center for Biotechnology Information, <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>), ClustalW (<u>www.ebi.ac.uk</u>), sol genomic network (<u>www.sgn.cornell.edu</u>), Place (<u>www.dna.affrc.go.jp</u>), SignalP (<u>www.cbs.dtu.dk</u>), PlantCare (<u>http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/</u>), PlantPAN (<u>http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw</u>).

# 2.3 Proteinanalytik

# 2.3.1 Proteinextraktion aus N. benthamiana

Frisch geerntetes Blattmaterial transformierter *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit Extraktionspuffer A (Hon *et al.*, 1994; Tabelle 2) versetzt und im Vakuumexsikator 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Blattmaterial gut abgetropft und in eine kolbenlose 5 ml Einwegspritze überführt. Die gefüllte Einwegspritze wurde in ein Zentrifugenröhrchen gestellt und 30 min mit 800 U/min bei 4°C zentrifugiert. Die so aus dem Apoplasten isolierte Proteinlösung wurde einer TCA-Fällung unterzogen. Das Pellet wurde in 20 µl Extraktionspuffer pro 1g Frischgewicht aufgenommen und bei -20°C gelagert. Das verbliebende Blattmaterial wurde in Flüssigstickstoff gefroren, gemörsert und mit 1 ml Extraktionspuffer (Tabelle 2) versetzt, bis zur Homogenität gevortext und 30 min mit 5000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und direkt für Western-Blot-Experimente oder RNase-Aktivitätsanalysen verwendet oder bei -20°C gelagert.

## 2.3.2 Reinigung von Fusionsproteinen

Das in dieser Arbeit verwendeten Fusionsprotein RNaseLER::His besitzt einen N-terminalen Fusionspartner mit 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten (6xHis-*tag*). Die hohe Affinität der Imidazol-Seitenkette von Histidin zu Metallionen wie Ni<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> ermöglicht die Reinigung der Fusionsproteine über an einer Sepharose-Matrix immobilisierte Co<sup>2+</sup>-Ionen (Thermo Scientific Inc. Pierce Protein Research Products, Rockford, U.S.A). Durch die lokal hohe Konzentration der Histidinreste werden die Proteine an das Säulenmaterial gebunden. Zelluläre Proteine werden nicht oder nur schwach gebunden und können mit niedrigen Konzentrationen des Kompetitors Imidazol von der Cobaltsäule verdrängt werden. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte nach Herstellerangaben. Da enzymatisch aktive Proteine isoliert und gereinigt werden sollten, wurden Puffer für native Präparationsbedingungen verwendet.

Es wurden folgende Puffer verwendet:

*Äquilibrierungs-/Waschpuffer*: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazole; pH 7.4

*Elutionpuffer*: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 150 mM Imidazole; pH 7.4

*MES-Puffer (Säulenregenerationspuffer)*: 20 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure, 0.1 M Natriumchlorid; pH 5.0

# 2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

# Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Pflanzliche Proteinextrakte wurden unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE mit PAGE-Puffer nach der Methode von Laemmli (1970) in 15 %igen SDS-Polyacrylamid-(PAA)-Gelen aufgetrennt. Die Proben wurden zuvor mit SDS-Probenpuffer (10 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5 % (w/v) SDS, 0,3 % (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris-HCl pH 6,8) versetzt, bei 95°C 5 min im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die unlöslichen Abstandteile abzentrifugiert und mit dem Überstand das Polyacrylamidgel beladen. Als Längenstandard diente der "*Prestained Protein Ladder*" 10-180 kDa (Fermentas).

Das Sammeln der Proben erfolgte bei 15 mA, der Probenlauf ab Erreichen des Trenngels bei 20 mA.

## Trenngel 15 %

4 ml 30 % PAA-Lösung (37,5:1), 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 8,8), 3,4 ml dH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin), 100  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS).

## Sammelgel 5 %

0,75 ml 30 % PAA-Lösung (37,5:1), 0,5 ml Sammelgelpuffer (0,625 M Tris, 20 mM EDTA, 1 % SDS, pH 6,8), 3,75 ml ddH<sub>2</sub>O, 5 μl TEMED, 50 μl 10 % APS.

An die SDS-PAGE schloss sich entweder eine Coomassie-Färbung oder der Transfer der nach Molekulargewicht getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot) an.

### Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Eine native-PAGE wurde zum visuellen Nachweis der RNaseLER-Aktivität angewandt. Dieser *In-Gel-Assay* beruht auf die Toluidinfärbung von RNA und wurde nach Abel und Kock (2001) durchgeführt. Die PAA-Gel-Zusammensetzung entspricht der Zusammensetzung einer denaturierenden SDS-PAGE jedoch wird auf denaturierende Agenzien wie SDS verzichtet. Nachdem die Proteinproben wie unter Kapitel 2.3.2 (SDS-PAGE) beschrieben, getrennt wurden, wurde das Gel für 15 min in Natriumacetat-Puffer pH 5,6 äquilibriert. Anschließend wurde dem Gel das RNA-Substrat (0,4 % Hefe-RNA, 2,5 mM EDTA, 150 mM Natriumacetat, pH 5,6) durch Inkubation für 30 min bei 37 °C zugefügt. Es folgte ein 20 minütiges Waschen in Äquilibrierungspuffer, dem sich eine 10 minütige Toluidin-Substratfärbung (0,2 % (w/v) Toluidinblau in 0,5 % (v/v) Essigsäure) anschloss. Zum Nachweis der transparenten RNase-Aktivitätsbanden (negative Substratfärbung) wurde das Gel mit 0,5 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Als Marker für die elektrophoretische Mobilität wurde ein Zellextrakt einer *S. lycopersicum*-Zellenkultur (Kapitel 2.1.6.7) verwendet. Dieser enthält die Aktivitäten der RNasen RNaseLE und RNaseLX von denen sich die RNaseLER hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterscheidet.

## 2.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen / Proteinabgleich

Zur quantitativen Proteinbestimmung von Zelllysaten erfolgte nach Bradford (1976) wurden die Lösungen des Roti<sup>®</sup>-Quant Kit (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Extinktion wurde bei 595 nm mit einem Spektralphotometer (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) gemessen. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen wurden aus den gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentrationen berechnet.

### 2.3.5 Proteinfärbung

### Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

Sofern SDS-PAA-Gele nicht für Western-Blot-Analysen eingesetzt werden sollten, erfolgt ein Nachweis der aufgetrennten Proteine über Coomassie-Blau Färbung.

Die SDS-PAA-Gele wurden 1h unter leichten Schütteln in Färbelösung inkubiert (0,25% (w/v) Coomassie<sup>®</sup> Brillantblau R-250. 45,5 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure).

Anschließend wurden die SDS-PAA-Gele bis zur gewünschten Bandenintensität leicht in Entfärberlösung geschüttelt (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure). Zum Stoppen der Entfärbung wurden die Gele mehrfach in H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele entweder fotografiert oder eingescannt.

### **Ponceau-Färbung**

Vor der Western-Analyse kann die Transfereffizienz, mittels der Ponceau-Färbemethode überprüft werden. Dazu wurde die Membran kurz in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Proteinbanden werden dadurch reversibel rot angefärbt. Die Membran wurde durch spülen in Wasser und einmal waschen in  $1x T_{20}BS-T$  vollständig entfärbt und in Western-Blotanalysen eingesetzt.

### 2.3.6 Western-Blot

Nach SDS-PAGE wurden Proteine durch "Semi-Dry"-Transfer mit einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen) auf Nitrocellulosemembranen (Bio Trace <sup>TM</sup> NT, Pall Gelman Laboratory GmbH, Dreieich) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (Tabelle 2) bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran über 2 h. Um

unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran 2 h bei RT in 50 ml *Blocking*-Puffer (Tabelle 2) geschüttelt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Anti-His Antibody; Rockland) in einer Verdünnung von 1:2000 in *Blocking*-Puffer erfolgte über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C. Daraufhin wurde die Membran 5 x 5 min in 25 ml T<sub>20</sub>BS-T (Tabelle 2) gewaschen und 2 h mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Boehringer, Mannheim) (8000-fach verdünnt in *Blocking*-Puffer) inkubiert. Nach dem waschen der Membran (3 x 10 min mit 1 x T<sub>20</sub>BS-T und einmal mit 1 x T<sub>20</sub>BS erfolgte die Detektion des Peroxidase-Antikörpers durch Chemilumineszenz mit dem ECL<sup>+</sup>-System (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) entsprechend den Herstellerangaben, wobei die Expositionszeit auf Filmen in Abhängigkeit von den Signalstärken zwischen 20 min und 2 h lagen.

# 2.4 Histochemie und Mikroskopie

## 2.4.1 Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität

Der histochemischen Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (GUS) erfolgte nach Blume und Grierson (1997) anhand einer Farbreaktion, bei der das Substrat X-Gluc (Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure) zu dem schwer löslichen Indigo-Farbstoff 5,5-Dibrom-4,4-dichlor-indigo umgesetzt wurde. Die zu untersuchenden Pflanzenteile bzw. Keimlinge wurden in passenden Reaktionsgefäßen mit GUS-Fixierer (Tabelle 2) inkubiert. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in einem Exsikator 5 min unter Vakuum gesetzt. Nach der Fixierung wurden die Proben dreimal mit GUS-Waschlösung (Tabelle 2) gewaschen, mit GUS-Färbelösung (Tabelle 2) versetzt und wiederum 5min Vakuum infiltriert. Die Gefäße wurden verschlossen und für 20 h bei 37°C und Dunkelheit inkubiert. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Pflanzenorgane wurden die in Tabelle 2 angegebenen GUS-Färbelösungen eingesetzt.

Das Pflanzenmaterial wurde anschließend in 70 % Ethanol entfärbt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Pflanzenteile in 70 % Ethanol bei 4°C gelagert.

Die Präparate wurden unter einem Stereomikroskop Stemi 2000-C (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) analysiert und mit Hilfe einer FUJIFILM Digital Kamera dokumentiert.

## 2.4.2 Fixierung und Einbettung in Paraffin

Die detaillierte Analyse der histochemischen  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in den unterschiedlichen Geweben erfolgte mikroskopisch mittels Gewebedünnschnitten von Blättern, Stängeln und Wurzeln 3 Wochen alter *N. benthamiana*-Pflanzen. Für die Gewebedünnschnitte wurde das Pflanzenmaterial in Paraffin eingebettet. Für die Paraffineinbettung wurde das frische Pflanzenmaterial in Fixativ (Tabelle 2) in 0,5 cm Stücken geschnitten, anschließend in frisches Fixativ überführt, 10 min Vakuum-infiltriert und 3 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen (2 x 15 min) in 1x PBS-Puffer erfolgte die Dehydratisierung des Gewebes mit einer in Tabelle 10 angegebenen aufsteigenden Ethanolreihe.

Ethanolkonzentration (v/v)	Inkubationsdauer
10 %	30 min
30 %	30 min
50 %	30 min
70 %	16 h
90 %	30 min
100 %	30 min

 Tabelle 10: Ethanolreihe zur Dehydratisierung der Pflanzengewebe.

Danach wurde das Gewebe 3x 45 min in Ethanol:Roti-Histol im Verhältnis (v/v) 3:1, 1:1 und 1:3 gewaschen und anschließend 2x 45 min in reinem Roti-Histol inkubiert. Anschließend wurde 2 ml reines Roti-Histol in jedes Probenröhrchen gegeben und durch sukzessives zutropfen von N+1 Tropfen Paraplast in einem 15 minütigen Rhythmus bei 62 °C die Lösung verdoppelt. Diese Prozedur wurde durch halbieren der Lösung und erneutem zu tropfen (halbiert letzte Tropfenzahl + 1) dreimal wiederholt. Danach wurde das Pflanzengewebe 2x 8 h in reinem Paraffin inkubiert. Die Pflanzengewebe wurden mit Paraffin in geeignete Formen ausgegossen. Die Paraffinblöcke härteten über Nacht bei RT aus, bevor mit einem Rotationsmikrotom (Micram Laborgeräte GmbH, Walldorf) die Dünnschnitte (10 µm) angefertigt wurden. Die Schnittbänder wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern, die zuvor mit Wasser (DEPC-dH<sub>2</sub>O) abgedeckt wurden, aufgelegt und durch Inkubation bei 45°C für 16 h fixiert. Anschließend erfolgte die schrittweise Deparaffinisierung der Dünnschnitte gefolgt von einer Hydratisierung des Gewebes mittels absteigender Ethanolreihe (Tabelle 11).

	Inkubationsdauer
Roticlear	5 min
Roticlear	5 min
Roticlear : Propanol 1 : 1	5 min
Propanol	5 min
Propanol : Ethanol 1 : 1	5 min
96 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
50 % Ethanol	5 min
30 % Ethanol	5 min
$H_2O$	5 min (2x)

Tabelle 11: Deparaffinieren und Hydratisierung der Dünnschnitte bei RT.

### 2.4.3 GUS-Aktivitätsbestimmung

Bei der Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität nach Jefferson *et al.* (1987) wird Methylumbelliferylglucuronid (MUG) als Substrat eingesetzt, welches in die Produkte Methylumbelliferon (MU, 7-hydroxy-4-methylcoumarin) und Glucuronsäure gespalten wird. Unter alkalischen Bedingungen und bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm emittiert MU Fluoreszenzstrahlung der Wellenlänge 455 nm, deren Intensität in einem Fluorometer bestimmt werden kann.

Zwei Wochen alten Keimlinge wurden durch aufsprühen einer Kanamycin-haltigen Lösung vorselektiert. Pflanzen, die eine Kanamycinresistenz aufwiesen, indem sie nicht durch vergilben der Blätter auf die Behandlung mit Kanamycin reagierten, wurden vereinzelt und weitere 3 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Anschließend wurden 100 mg Blattmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemörsert, mit 1 ml GUS-Extraktionspuffer (Tabelle 2) versetzt und für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 20 µl davon herangezogen (Kapitel 2.3.4) und 30 µl des Überstandes wurden zu 1,47 ml eines auf 37°C vorgewärmten GUS-Reaktionspuffers (GUS-Extraktionspuffer+2 mM Methylumbelliferyl-D-Glucuronid) gegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. In einem Zeitintervall von 15 min wurden 200 µl entnommen, in 800 µl GUS-Stopplösung (0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) gegeben und die Produktmenge [pmol] im Messansatz fluorimetrisch in einer 1 cm Quarzglasküvette mit dem Lumineszenz-Spektrophotometer (LS 50, Perkin Elmer, Rodgau) (Einstrahlung bei 365 nm, Messung bei 455 nm) ermittelt.

Als Nullwert dienten 200 µl eines Reaktionsansatzes der 0 min bei 37°C inkubiert wurde und

mit 800 µl GUS-Stopplösung inaktiviert wurde. Die Mu-Konzentration wurde über eine Eichgerade definierter Mu-Konzentrationen ermittelt. Folgende Formel wurde zur Ermittlung der Enzym (GUS)-Aktivität (A) verwendet:

$$A (pro mg Protein) = \frac{pmol_{Mu}*1,5ml_{Ra}*1ml}{min*ml*0,2ml_{P}*0,03ml_{Re}} * \frac{ml}{mg_{Protein}}$$

Dabei ist  $M_{mu}$  die vom Gerät ermittelte fluoreszierende Produktmenge 4-Methyl-Umbeliferon, *Ra* der Reaktionsansatz, *Re* der im Reaktionsansatz eingesetzte Rohextrakt und *P* die eingesetzte Probenmenge im Messansatz.

## 2.4.4 In situ-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten cRNA-Einzelstrangsonden

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung ist die Inkubation von Gewebedünnschnitten mit einer Digoxigenin-markierten RNA-*antisense*-Sonde, um RNA im Gewebe nachzuweisen.

In dieser Arbeite sollte die *RNaseLER* mRNA "*in situ*", also direkt im formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe nachgewiesen werden. Für die Paraffineinbettung der Probe wurde das frische Pflanzenmaterial wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben behandelt.

Die *in situ*-Hybridisierung wurde nach Leitch *et al.* (1999) modifiziert durch Weglassen des Dextransulfates im Hybridisierungspuffer und durch Änderungen der Stringenz beim Waschen durchgeführt. Zur Inaktivierung der in den in Gewebeschnitten vorhandenen Nukleasen, wurde eine ProteinaseK-Behandlung (0,12 U/ml ProteinaseK; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) über 30 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in DEPC-dH<sub>2</sub>O gewaschen, dann 10 min in 10 mM Tris-Puffer gefolgt von 30 min in Tris-Puffer mit 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), um unspezifische Bindestelle für den Anti-Digoxigenin Antikörper zu besetzen und eine mögliche Hintergrundfärbung zu verhindern, inkubiert und wiederum 2x 5 min in DEPCdH<sub>2</sub>O gewaschen.

Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes der Hybridisierung wurden die freien Aminogruppen durch Prä-Inkubation der Schnitte für 3 min in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) und 10 min in Triethanolamin (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) mit 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid (Merck KGaA, Darmstadt) acetyliert. Die Schnitte wurden danach 5 min in DEPC-dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit aufsteigender Ethanolreihe (Tabelle 10) dehydratisiert. Anschließend wurden die luftgetrockneten Schnitte in Hybridisierungspuffer für 1 h bei 45°C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 5, 10 und 20 ng denaturierter RNaseLERantisense-RNA-Einzelstrangsonde im Hybridisierungspuffer 16 h bei 45 °C in einer Feuchtkammer. Die gewählte Sondenkonzentration erwies sich als optimal für eine spezifische Signalgebung (Abbildung 5). Die Kontrollhybridisierung wurde mit der RNaseLER-sense-RNA-Einzelstrangsonde durchgeführt. Anschließend wurde 3x 10 min bei 45 °C mit abnehmender Stringenz gewaschen (Waschschritt 1: 50 % (v/v) Formamid in 4x SSC, Waschschritt 2 4x SSC und 0,1x SSC). Der Anteil der ungebundenen Sonden wurde durch einen einzelstrangspezifischen RNaseA-Verdau (20 µg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 37 °C für 30 min in NTE-Puffer. Die RNA-Detektion erfolgte mittels "DIG Nucleic Acid Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Immunoassay nach Herstellerangaben. Die Schnitte wurden 5 min in 1x TBS inkubiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Schnitte 1 h in Blockierungslösung (0,5 % Blocking reagent in 1x TBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 90 min mit dem Anti-DIG-Konjugat (1: 2500 (v/v); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) behandelt. Danach wurden die Schnitte  $3x 5 min in 1x T_{100}BS$  gewaschen. Nach Zugabe der Farbsubstratlösung (NBT/BCIP, Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) in Detektionspuffer setzt die Alkalische-Phosphatase das Substrat in ein violett gefärbtes Produkt um. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 4 h und wurde durch Zugabe von TE-Puffer gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend in Glycerol/PBS (1:4) konserviert und mit einem "Axioplan" Lichtmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen), welches mit einer CCD3 Video Kamera gekoppelt wurde, ausgewertet.

### 2.4.4.1 Digoxigenin Markierung der cRNA

Die Herstellung der *RNaseLER*-cRNA-Einzelstrangsonden erfolgte mittels *in vitro* Transkription mit Hilfe der SP6 RNA-Polymerase (Amplifikation der *sense*-Sonde, Negativkontrolle) bzw. der T7 RNA-Polymerase (Amplifikation der *antisense*-Sonde).

Das Plasmid pSPTLER (Tabelle 6) welches die *RNaseLER*-cDNA enthält, wurde mit den Restriktionsenzymen (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) *Bam*HI (*sense*) und *Xba*I (*antisense*) linearisiert. Die linearisierte DNA wurde mit *"High Pure PCR Product Purification Kit"* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt und mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits SP6/T7 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Vorschrift mit

Digoxigenin (DIG) markiert.

Pro Reaktionsansatz befand sich neben 1  $\mu$ g aufgereinigtem *template*, 1 x Labeling Mix (ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung), 1x Transkriptionspuffer (ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung), RNase-Inhibitor (20 U) und 40 U Sp6bzw. T7-RNA-Polymerase. Die Reaktion inkubierte 2 h bei 37°C. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 U RNase-freier DNaseI die DNA innerhalb von 15 min bei 37°C fragmentiert. Durch Zugabe von 0,8  $\mu$ l 0,5 M EDTA pH 8 wurde die DNaseI Reaktion abgestoppt.

## **Alkalische Hydrolyse**

Durch alkalische Hydrolyse wurden die cRNA-Sonden auf eine Größe von 200 bp fragmentiert, um eine optimale Gewebepenetration für die Fragmente zu erreichen.

Die Berechnung der Hydrolysezeit erfolgte nach folgender Formel:

$$t = \frac{L_{Anfang} - L_{Ende}}{L_{Anfang} * L_{Ende} * k}$$

 $L_{Anfang}$ =Anfangslänge der Sonde in kb  $L_{Ende}$ =gewünschte Endlänge der Sonde in kb k=Hydrolysekonstante (k = 0,11 kb/min)

Die Hydrolyse der Sonde erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l Hydrolyse-Puffer [30  $\mu$ l 2M NaHCO<sub>3</sub>, 20  $\mu$ l 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1  $\mu$ l tRNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)] und Inkubation bei 60°C für die errechnete Hydrolysezeit (RNaseLER cRNA-Sonde: 30 min, Ubi1 cRNA-Sonde: 25 min). Durch Zugabe von 3 $\mu$ l 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 5  $\mu$ l 10 %iger Essigsäure wurde die Hydrolyse beendet. Abschließend folgten eine Präzipitation der cRNA mit 2,5 Vol 100 % Ethanol und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und eine Resuspension der cRNA-Sonden in 50  $\mu$ l 50 % Formamid.

Die Proben wurden bezüglich ihrer Markierungseffiziens mittels Dot-Blot überprüft und bei 80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### Dot-Blot zur Quantifizierung von DIG-markierten cRNA-Sonden

Die Überprüfung der Effizienz der cRNA-Markierung und die semiguantitative Beurteilung der Konzentration der eingesetzten Sonden erfolgten für jede Sonde durch getrennte Dot-Blots wie in den Herstellerangaben (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) beschrieben. Hierfür wurden die Reaktionsprodukte der in vitro-Transkriptionen und einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zum Vergleich nebeneinander auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetropft. Die RNA wurde durch 3x 30 Sekunden Inkubation unter UV-Licht und anschließender einstündiger Inkubation bei 80°C an der Membran fixiert und die freien Bindungsstellen mit Blockierungslösung geblockt. Der Nachweis der markierten RNA erfolgte über die Behandlung mit einem an eine Alkalische Phosphatase-gekoppelten DIG-Antikörper und der nachfolgenden Farbreaktion mit NBT/BCIP. Die semiguantitative Auswertung der Farbreaktion erfolgte anhand eines Standards; hierfür wurde eine Verdünnungsreihe des DIG-RNA-Standards (100 ng/µl) aus dem DIG-RNA-Labeling Mix in den Konzentrationen 10ng; 1ng, 100pg; 10pg; 3,3pg und 1pg pro µl hergestellt. Parallel wurden die DIG-markierten cRNA-Sonden mit der gleichen Verdünnungsreihe in 50 % Formamidlösung verdünnt. Die Farbreaktion wurde nach dreistündiger Inkubation bei 37°C durch die Behandlung mit TE-Puffer beendet. Die Farbintensität der Punkte wurde mit der Farbintensität der Kontroll-RNA-Punkte verglichen und somit auf die Konzentration der RNA-Sonde geschlossen (Abbildung 5). Für die weiteren Versuche wurde eine DIG-cRNA-Konzentration zwischen 5 bis 20 ng/µl verwendet.



#### Abbildung 5: Dot-Blot zur Überprüfung der Effizienz der DIG-Markierung.

Mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper gegen Dioxigenin und dem NBT/BCIP-Substrat wurde die DIG-Markierung der RNA nachgewiesen werden. Auf die Nitrozellulose wurden die DIG-markierten sense- (sense LER-Sonde) und antisense-RNAs (antisense LER-Sonde) der *RNaseLER*-cDNA, der *Ubi1*-cDNA und einer gebrauchsfertigen Kontrolle (DIG-markierte antisense Neo-RNA) aufgetragen. Die Menge der RNA betrug jeweils 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 3,3pg und 1pg. Mit dem Anti-Digoxigenin-AP Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte die Nachweisreaktion.

## 2.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für Lokalisationsstudien (Kapitel 3.1.3) wurde transformiertes Blattmaterial am *Confocal Laser Scanning*-Mikroskop (CLSM 510, Carl Zeiss, Jena) untersucht. Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe von geeigneten Filtersätzen in den aufgeführten Wellenlängenbereichen (Tabelle 12).

 Tabelle 12: Filtersätze mit Wellenlängenbereichen zur Anregung und Detektion von CFP und YFP.

 Anregungs- bzw. Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (http://www.zeiss.de/).

	Anregung	Emission	Filter
CFP	434 nm	474 nm	BP 475-525
eYFP	514 nm	526nm	BP 530-600

<u>Ergebnisse</u>

# 3 Ergebnisse

Die Charakterisierung der Ribonuklease LER (RNaseLER) aus *S. lycopersicum* war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Es sollte die genomische Sequenz inklusive der Promotorsequenz, der Exon/Intron-Struktur und die Kopienzahl des *RNaseLER*-Gens bestimmt werden. Weiterhin sollte eine Analyse der Expression auf RNA-und Proteinebene erfolgen.

# 3.1 Charakterisierung des RNaseLER-Gens von S. lycopersicum

## 3.1.1 Ermittlung des RNaseLER-Primärtranskripts mittels 5'- und 3'-RACE

Zur Identifizierung homologer RNasen wurden mit den bereits charakterisierten RNasen RNaseLE und RNaseLX (Kock *et al.*, 1995) aus Tomate EST-Datenbankrecherchen (*expressed sequence tags*) durchgeführt. Dabei wurde eine EST-Sequenz (NCBI-GenBank, Est281775) ermittelt. Mit Hilfe dieser konnten in einer weiteren Datenbank (*"solanaceae genomics network"*) ein Contig aus EST-Sequenzen identifiziert werden, von dem eine Nukleotidsequenz (SGN-U46343; RNaseLER) abgeleitet wurde.

Für die Charakterisierung der RNaseLER aus *S. lycopersicum* cv. Lukullus wurden Oligonukleotide (12/27, Tabelle 4) von SGN-U46343 abgeleitet und die entsprechende Sequenz aus cDNA von *S. lycopersicum* cv. Lukullus amplifiziert. Das 849 bp große cDNA-Fragment wurde kloniert (pCLER2.10, Tabelle 6) und sequenziert. Die Sequenzanalyse mit der pCLER2.10-Sequenz ergab, dass es pCLER2.10 die putative kodierende Sequenz der *RNaseLER* enthält. Jedoch führte die Analyse auch zu der Annahme, dass es sich nicht um die vollständige Primärtranskriptsequenz der *RNaseLER* handelt, da in dieser Sequenz keine 5'-bzw. 3'-untranslatierte Region nachgewiesen werden konnte.

Für die Ermittlung des Transkriptionsstarts sowie der untranslatierten Bereiche wurden RACE-Analysen (Kapitel 2.2.3) durchgeführt. Hierfür wurden ausgehend von der 849 bp langen cDNA-Sequenz des Klons pCLER2.10 spezifische Oligonukleotide (Tabelle 4) abgeleitet. Eine schematische Darstellung der Lage der Oligonukleotide zur *RNaseLER*-cDNA ist in Abbildung 6 gezeigt.



Abbildung 6: Relative Position der 5'- und 3'-RACE Oligonukleotide auf dem *RNaseLER* homologen cDNA-Klon pCLER2.10.

Dargestellt sind die Anlagerungspositionen der verwendeten 5'- und 3'-RACE Oligonukleotide (Tabelle 4) innerhalb der *LER2.10*-cDNA. Pfeile geben die Syntheserichtung der Oligonukleotide an.

Mit Hilfe der genspezifischen Oligonukleotide des 5'-Bereiches (GSP2 und LER\_E2r) wurden Fragmente mit einer Länge von 161 bp und 286 bp bzw. in den 3'-RACE-Analysen Fragmente von 404 bp und 763 bp Länge amplifiziert (Abbildung 7).



Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der RACE-Produkte. Zur Amplifikation der 5'- und 3'-Bereiche von *RNaseLER* wurden die Oligonukleotidkombinationen (A) 5'-RACE: A1: PCR-Produkt NPU/GSP2

A2: PCR-Produkt NPU/LER\_E2r bzw.

(B) 3'-RACE: B3: PCR-Produkt GSP4/NPU

 $B4: PCR-Produkt \ LER\_E4f/NPU \ verwendet. \ Die \ RACE-PCR-Produkte \ (je \ 20 \ \mu l) \ wurden \ in einem 1 \ \% igem \ Agarosegel \ aufgetrennt \ und \ mit \ Ethidiumbromid \ angefärbt.$ 

M: 1 kb Gene Ruler DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), K: H<sub>2</sub>0-Kontrolle.

Die amplifizierten Fragmente wurden sequenziert. Ein Alignment der Sequenzen mit der bereits vorhandenen EST-Sequenz (EST281775) zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem kodierenden Bereich der *RNaseLER*. Eine schematische Darstellung des Alignments ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Identifizierung der vollständigen, kodierenden Sequenz der *RNaseLER*. Das Alignment der RACE-Produkte mit der *RNaseLER*-cDNA führte zur Identifizierung der 5'- und 3'-UTR (blass grüne Boxen), des Transkriptionsstartpunktes (+1) 56 bp stromaufwärts des Startkodons (ATG) sowie das Polyadenylierungssignals (pA-Signal) 280 bp stromabwärts des Stoppkodons (TAG). 161 bp-Fragment: 5'-RACE-Produkt NPU/GSP2, 283 bp-Fragment: 5'-RACE-Produkt NPU/LER\_E2r, 734 bp-Fragment: 3'-RACE-Produkt LER\_E4f/NPU, 404 bp-Fragment: 3'-RACE-Produkt GSP4/NPU

Das *RNaseLER*-Primärtranskript wurde so auf 1145 bp um weitere 50 bp in 5'-Richtung und 246 bp in 3'-Richtung erweitert. Sequenzanalysen der 5'-Amplifikate ergaben einen putativen Transkriptionsstart 56 bp stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle ATG. Die Analysen der 3'-Amplifikate ergaben eine Polyadenylierungssequenz 280 bp nach dem Stoppkodon TAG. Ein Überblick der Primär- und der abgeleiteten Aminosäuresequenz befindet sich im Anhang A.

## 3.1.2 RNaseLER aus S. lycopersicum ist ein Mitglied der T2-Typ-RNase Familie.

Die kodierende Sequenz der RNaseLER umfasst 783 bp, kodiert für ein Protein mit 260 AS und einer theoretischen Molekülmasse von 29,4 kDa. Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz der RNaseLER mit dem BLASTP-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) in der *nonredundant* (nr)-Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ergaben Homologie (34 % bis 83 %) zu Mitglieder der T2-Typ-RNase Familie, wie es zu erwarten war, da die paralogen RNasen RNaseLE und RNaseLX ebenfalls in diese Familie gehören. Eine Gruppierung ausgewählter homologer RNasen ist in Abbildung 9 dargestellt.

<i>Sl</i> RNaseLER	MSSPAIVNLWMLLVCCILIAVKGGWDEEVGLLRRGGKQRQFD	42
NgRNaseNGR2	MTFLPVHAIVNLRMLFLLIGACCILVGVNGGWDGEVGLLRRGRGGAGGGYQREFD	55
AtRNS2	DVIELNRSQREFD	33
AhSL28	MALLTARPLNPAAIQCACFVILWIGLLCVNVGINGSGDLG-EKLGANQRDFD	51
<i>Cs</i> ClasepRRP1	MASSLPALQIILPLLLLLGTCSANLIRGGHKEFD	34
T/Trichomaglin	DEREFD	6
SLRNaseLE	MASNSAFSLFLILLIITQCLSVLNAAKDFD	30
NGRNaseNGRI	MASDSATSLFLTLFLITQCLSVLTAAQDFD	30
ATRNSI	MKILLASLCLISLLVILPSVFSASSSSEDFD	31
SIRNASELA NGDNagaNCD2		29
NYRNASENGRS		20
ALMISS	$\text{$	25
<i>Sl</i> RNaseLER	YFKLALQWPGTYCRKTRHCCSSNACCSRSNSPSVFTIHGLWTEYNDGTWPSCCS-GRPFD	101
NgRNaseNGR2	YFKLSLQWPGTYCRRTRRCCSSNACCSRSNSPPVFTI <b>H</b> GLWTEYNDGTWPACCS-GKAFD	114
Atrns2	YFALSLQWPGTYCRGTRHCCSKNACCRGSDAPTQFTI <b>H</b> GLWPDYNDGSWPSCCY-RSDFK	92
AhSL28	YFQLALQWPGTFCRRTRHCCPNNGCCRGSNAPAEFTI <b>H</b> GLWPDYNDGSWPSCCT-GKTFE	110
CsClasepRRP1	YFTLALTWSGTECLSVKDSCPTNACSR-SEVETGFTIKGLWPDYDDGTWPSCCE-GAKYD	92
TlTrichomaglin	YFILALQWAGTSCRSGGACCPYNGCCK-ADSPTQFTI <b>H</b> GLRPEYSGGERPSCCT-GGSFD	64
<i>SL</i> RNaseLE	FFYFVQQWPGSYCDTKQSCCYPTTGKPAADFGI <b>H</b> GLWPNNNDGTYPSNCDPNSPYD	86
NgRNaseNGR1	FFYFVQQWPGSYCDTKQSCCYPKTGKPASDFGI <b>H</b> GLWPNNNDGSYPSNCDSNSPYD	86
AtRNS1	FFYFVQQWPGSYCDTQKKCCYPNSGKPAADFGI <b>H</b> GLWPNYKDGTYPSNCDASKPFD	87
<i>Sl</i> RNaseLX	FFYFVQQWPASYCDTRRSCCYPTTGKPDEDFSI <b>H</b> GLWPNYKDGKWPQNCDRESSLD	85
<i>Ng</i> RNaseNGR3	FFYFVQQWPASYCDTRRSCCYPTTGKPDEDFSI <b>H</b> GLWPNYENGKWPQNCDRESSLD	84
AtRNS3	FFYFVLQWPGAYCDSRHSCCYPQTGKPAADFGIHGLWPNYKTGGWPQNCNPDSRFD	79
CIPNOCOLED		1 6 1
Naphasener?	EREISTILEPI.RKYWPSI.SCGSPRSCHHRKGPFWAHEWEKHGTCAYPVVHDEYEFFI.TTI.	174
A+DNG2	EKETSTIMDGLEKYWPSI.SCGSPSSCNGGKGSFWGHEWEKHGTCSSPVFHDEYNYFI.TTI.	152
Abgi 28	EKEISTILGDINKYWPSI.SCGSPSNCHGGKGLEWEHEWEKHGTCSSSVTGAEYNYFVTAL	170
CcClaconPRD1	ENEISTI SUDSKYWPSYSCMSSSACGSFDASDLAYEWAKHGTCSSPVLGNOYEYFSTAL	1.52
<i>Tl</i> Trichomaglin	PDEIMPFFGKLVEYWPTYRCALEOSCNNRKEILWGOOYEKHGTCASPVIKGEWNYFKKTL	124
SLRNageL.F	OSOISDIJSSMOONWPTLACPSGSGSTFWSHEWEKHGTCAESVLTNOHAYFKKAL	141
NoRNaseNGR1	OSOVSDLISSMOONWPTLACPSGTGSAFWSHEWEKHGTCAENVFD-OHGYFKKAL	140
A+RNS1	SSTISDLLTSMKKSWPTLACPSGSGEAFWEHEWEKHGTCSESVID-OHEYFOTAL	141
SIRNaseLX	ESEFSDLISTMEKNWPSLACPSSDGLKFWSHEWLKHGTCSALN-OHAYFOTAL	137
NgRNaseNGR3	ESEISDLISTMEKNWPSLACPSSDGVRFWSHEWLKHGTCSALG-ERAYFQAAL	136
Atrns3	DLRVSDLMSDLQREWPTLSCPSNDGMKFWTHEWEKHGTCAESELD-QHDYFEAGL	133
SIRNaseLER	NVYFKYNVTEVLFEAGYVPSDSEKYPLGGTISSTONAFHTTPELVCSGDALEELR	216
NoRNaseNGR2	NTYFKYNVTEVLFEAGYVPSDSEKYPLGGTISSIENAFHATPELTCSGDALEELR	229
A+RNS2	NLYLKHNVTDVLYOAGYVASNSEKYPLGGTVTATONAFHTTPEVVCKRDATDETR	207
AbSL28	KVYFKYNVTEVLREAGYVASNSEKYPLGGTVTATONAFHATPELKCSGDAVEELY	225
CsClasepRRP1	MLYFKYNISEILSESGYLPSNTAEYKLEGIMSAIOSALRVTPVVKCKSDAVEOVO	207
<i>Tl</i> Trichomaglin	KLFMKYNVDKALEDAGIVASNSKMYDLKDIVVAVESAVGARPKLRCDEEGLVOKLS	180
SLRNaseLE	DLKNOIDLLSILOGADIHP-DGESYDLVNIRNAIKSAIGYTPWIOCNVDOSGNSOLYOVY	200
NgRNaseNGR1	DLKNQINLLEILQGAGINP-DGGFYSLNSIKNAIRSAIGYAPGIECNVDESGNSQLYQIY	199
Atrns1	NLKQKTNLLGALTKAGINP-DGKSYSLESIRDSIKESIGFTPWVECNRDGSGNSQLYQVY	200
<i>Sl</i> RNaseLX	DFKTKSNLLONLNNAGIKPRNGDYYGVESIKKAIEKGVGHTPFIECNVDSOGNHOLYOVY	197
NgRNaseNGR3	DFRKKSNLLENLKNAEITPRNGEHYTLESIKKAIEEGVGHSPYIECNVDTQGNHQIYQVY	196
Atrns3	KLKQKANLLHALTNAGIKP-DDKFYEMKDIENTIKQVVGFAPGIECNKDSSHNSQLYQIY	192
<i>Sl</i> RNaseLER	ICFYKNFE-PRDCAHD TSSRGSCPQYVSLPAHGSWGFRSNTTAAS	261
NgRNaseNGR2	ICFYKNFE-PRDCARD TSALSRGSCPQYVSLPAHGSWDEIRISNTTAAS	277
Atrns2	ICFYKDFK-PRDCVGS QDLTSRKSCPKYVSLPEYTPLDGEAMVLKMPTEREAL	259
AhSL28	LCFYKNFE-PRDCATK SNKKSCPRYVSLPEYSSLKMANDGNEVSESALDSDI	276
<i>Cs</i> ClasepRRP1	ICFDKTLQ-LQECPST ASTCPSLVSLPIKN TIKPLETNNLSFRGMRA	253
<i>Tl</i> Trichomaglin	LCFDKDFK-PRDCVQV GSCPRYVSLPEIPD	209
<i>SL</i> RNaseLE	ICVDGSGSSLIECPIF PGGKCGTSIEFPTF	230
NgRNaseNGR1	ICVDGSGSNLIECPIF PRGKCGSSIEFPTF	229
AtRNS1	LCVDRSGSGLIECPVF PHGKCGAEIEFPSF	230
S1RNaseLX	LCVDSSASKFIDCPIF PHGGKCGSKIEFPSFSTNDDHDEF	237
NgRNaseNGR3	LCVDKTATDFIDCPIF PHGRGCGSKIEFPPFSSESDHDEF	236
AtRNS3	LCVDTSASKFINCPVM PHGRCDSRVQFPKF	222

### Abbildung 9: Alignment der T2-Typ-RNase Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies.

Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt. Die innerhalb der T2-Typ-RNasen konservierten Domänen (CAS I und CAS II) sind grau unterlegt. Fett gedruckt sind die an der RNA-Hyrolyse beteiligten essentiellen AS, - : eingefügte Lücken (Gaps), um die Sequenzähnlichkeiten zu maximieren. Sternchen kennzeichnen die konservierten Cysteinpaare.

Die Homologievergleiche der RNaseLER mit bekannten Vertretern der T2-Typ-RNase-Familie verschiedener Spezies zeigten, dass RNaseLER ein Mitglied dieser Familie ist. Es wurden die konservierten Bereiche, CAS I und CAS II (*conserved active-site segment*), die das aktive Zentrum bilden sowie die für T2-Typ-RNasen typischen Halb-Cysteinpaare identifiziert (Abbildung 9). Die beiden Halb-Cysteinrestpaare befinden sich in der RNaseLER an den Positionen Cys95 und Cys145 bzw. Cys207 und Cys238.

Obwohl die hier untersuchte RNaseLER ein Paralog der RNaseLE (Acc.-Nr. CAA55896.1) und RNaseLX (Acc.-Nr. CAA55895.1) ist, zeigte sie nur eine geringe Homologie von 36 % bzw. 35 %. Die größte strukturelle Ähnlichkeit (83% Homologie) zeigte sie zu der orthologen RNaseNGR2 aus *N. glutinosa* (Acc.-Nr. BAA84468.1). Die RNasen RNS2 aus *A. thaliana* (Acc.-Nr. NP 001118478.1) und AhSL28 aus *Antirrhinum hispanicum* (Acc.-Nr. CAD33235) wiesen mit 64 % die zweithöchste Homologie auf. Geringere Homologien wurden auch zu den RNasen CalsepRRP aus *Calystegia sepium* (47 %, Acc.-Nr. 1JY5\_A), Trichomaglin aus *Trichosanthes lepiniata* (46 %, Acc.-Nr. 1SGL\_A), RNS1 (42 %, Acc.-Nr. AAM63798.1) und RNS3 (36 %, Acc.-Nr. AAM67130.1) beide aus *A. thaliana*, NGR1 (37 %, Acc.-Nr. BAC77613.1) und NGR3 (36 %, Acc.-Nr. BAA84469.1) beide aus *N. glutinosa* gefunden.

Mit Hilfe der Computerprogramme TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000; 2007) und SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) wurde in der abgeleiteten RNaseLER-Aminosäuresequenz ein spaltbares N-terminales Signalpeptid (23 AS lang) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,952 vorhergesagt, welches das Enzym vermutlich in den sekretorischen Weg einschleust. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abbildung 10 dargestellt.

MSSPAIVNLW	MLLVCCILIA	VKGGWDEEVG	LLRRGGKQRQ	FDYFKLALQW	PGTYCRKTRH	60
CCSSNACCSR	SNSPSVFTI	GLWTEYNDGT	WPSCCSGRPF	DQKEISTLLE	PMRKYWPSLS	120
CSSPRSCHHK	KGP <b>FWGH</b> WE	HGTCAYPVV	LDEYEFFLTT	LNVYFKYNVT	<b>EVLFEAGYVP</b>	180
SDSEKYPLGG	IISSIQNAFH	TTPELVCSGD	ALEELRICFY	KNFEPRDCAH	DTSSRGSCPQ	240
YVSLPAHGSW	GFRSNTTAAS					260

#### Abbildung 10: Aminosäuresequenz der Ribonuklease RNaseLER.

Die Signalsequenz des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist blau, die konservierten Aminosäuren (AS) im Bereich der CAS I und CAS II Domäne (grau hinterlegt) sind fett gedruckt. Aminosäuren, die an der Hydrolyse beteiligt sind, sind farblich dargestellt. Schwarze Dreiecke symbolisieren die Intronpositionen im *RNaseLER*-Gen, deren Ermittlung unter Kapitel 3.1.4.1 beschrieben ist.

### 3.1.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung

Zur Klärung, ob die *in silico* identifizierte N-terminale Extension eine funktionelle Targetingsequenz für das endoplasmatische Retikulum (ER) ist, wurde ein Fusionskonstrukt der kodierenden Sequenz der *RNaseLER* (*RNaseLER*-CDS, <u>coding sequence</u>) mit der CDS des gelb fluoreszierenden Proteins (eYFP, <u>enhanced yellow fluorescence protein</u>) erstellt.

### 3.1.3.1 Klonierung des eYFP-markierten RNaseLER-Fusionsproteins

Für die Erstellung des RNaseLER::eYFP-Fusionskonstruktes (Kapitel 2.2.6) erfolgte die Amplifikation der *RNaseLER*-CDS ohne Stoppkodon mit zusätzlichen Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen *Not*I und *Xho*I am 5'- bzw. 3'-Ende. Die CDS von eYFP wurde flankiert von den *Xho*I/*Sac*I-Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor pRT100-MCS-eYFP (Tabelle 6) amplifiziert. Nach Zwischenklonierung und Sequenzierung der Produkte erfolgte die Klonierung der *RNaseLER*-CDS und eYFP-CDS in den Binärvektor pCP60 (Kapitel 2.2.6; Tabelle 6). Das erhaltene Plasmid, pCPLEReYFP, wurden anschließend mittels Restriktionsanalysen und PCR auf das Vorhandensein des LER::eYFP-Konstrukts überprüft und abschließend in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert. Eine schematische Darstellung des Fusionskonstruktes mit vorgelagertem *CaMV35S*-Promotor ist in Abbildung 11 abgebildet.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des *RNaseLER::eYFP*-Fusionskonstrukts.

Das *RNaseLER::eYFP*-Konstrukt wurde in den Vektor pCP60 eingebracht (pCPLEReYFP). *CaMV-35S*: Promotor des *Cauliflower-Mosaikvirus*; *RNaseLER*: kodierte Sequenz der *RNaseLER* ohne Stoppkodon; *eYFP*: *eYFP*-Strukturgen; pAnos: Nopalin-Synthase-Polyadenylierungssignal, türkise Box: spaltbares, N-terminales ER-Signalpeptid von RNaseLER.

### 3.1.3.2 Lokalisation von RNaseLER::eYFP

Zur subzellulären Lokalisation der RNaseLER wurde das eYFP-Fusionsprotein Agrobacterium-vermittelt (Kapitel 2.1.6.2) unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in N. benthamiana-Blättern transient exprimiert. Zur Visualisierung der Strukturen des endoplasmatischen Retikulums wurde das Konstrukt ER-ck CD3-953 eingesetzt (Nelson et al., 2007). Bei dem freundlicherweise von Frau Dr. Hause (Institut für Pflanzenbiochemie) zur Verfügung gestelltem ER-Konstrukt handelt es sich um eine Fusion einer N-terminalen ER-Signalsequenz der Wand-assoziierten Kinase 2 (AtWAK2, wall-associated kinase 2 aus dem C-terminalen ER-Retentionssignal HDEL A. thaliana) und mit dem blau fluoreszierenden Protein (CFP; cyan fluorescence protein). Die Lokalisationskontrolle ERckCD3-953 wurde zusammen mit pCPLEReYFP kotransformiert (Kapitel 2.1.6.2). In einem Zeitraum von 20-72 h nach Inokulation der Agrobakterien in N. benthamiana wurden Blattproben am konfokalen CLSM analysiert. Abbildung 12 zeigt eine Auswahl der CLSM-Aufnahmen. Weiter Aufnahmen befinden sich im Anhang B.



Abbildung 12: Analyse der RNaseLER::eYFP transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana* am CLSM.

Derivate des *Agrobacterium*-Stamms GV3101 mit pCPLEReYFP, ER-ckCD3-953 und pCPeYFP wurden in *N. benthamiana*-Blätter (je 1x10<sup>9</sup> cfu/ml) inokuliert. (A) pCPeYFP zytoplasmatische eYFP-Fluoreszenz (Kontrolle); (B) CFP-Fluoreszenz des ER-ckCD3-953 (ER-Kontrolle); (C) eYFP-Fluoreszenz des RNaseLER::eYFP; (D) bis (F) Fluoreszenzaufnahme 2 Tag nach Koinfiltration von GV3101pCPLEReYFP und GV3101ER-ckCD3-953; (D) eYFP-Fluoreszenz des RNaseLER::eYFP; (E) CFP-Fluoreszenz des ER-ckCD3-953 (F) kombiniertes Bild; rot=Autofluoreszenz der Chloroplasten. Dargestellt ist eine CLSM-Aufnahme aus vier unabhängigen Lokalisationsexperimenten. Weiter Aufnahmen befinden sich im Anhang B.
Die Analyse der CLSM-Aufnahmen zeigten, dass RNaseLER::eYFP und ER ckCD3-953 im ER lokalisieren (Abbildung 12D bis F). Die Akkumulation der RNaseLER::eYFP-Proteine in den transformierten Tabakepidermiszellen weisen eine netzförmige Struktur auf (Abbildung 12 C, D und F), die eindeutige Ähnlichkeiten mit der blaufluoreszierenden, netzförmigen Struktur der ER-Marker-Kontrolle ER-ckCD3-953 aufweisen (Abbildung 12B, E und F). Die überlagerten gelben und blauen Fluoreszenzen der Fusionsproteine (Abbildung 12F) weisen deutlich auf einen kotranslationalen Transport der RNaseLER in das ER hin.

#### 3.1.4 Genomische Analyse der RNaseLER

Zur Charakterisierung der Ribonuklease RNaseLER wurde neben der Analyse der kodierenden Sequenz auch die genomische Organisation aufgeklärt. Neben der Bestimmung der Kopienzahl der *RNaseLER* im Genom von *S. lycopersicum* durch einen genomischen Southern-Blot, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Exon/Intron-Struktur untersucht.

### 3.1.4.1 Genomische Sequenzierung von RNaseLER und Analyse der Exon/Intron-Struktur

Zur Aufklärung der genomischen Struktur der *RNaseLER* wurden Oligonukleotide (Tabelle 4) abgeleitet, die den gesamten kodierenden Sequenzbereich abdecken. Mit den verschiedensten Oligonukleotidkombinationen wurden PCR-Reaktionen durchgeführt, um die korrespondierenden genomischen Fragmente von *RNaseLER* zu amplifizieren, klonieren und sequenzieren zu können. Als Matrize diente genomische DNA (gDNA) von cv. Lukullus. In Tabelle 13 sind die Oligonukleotidkombinationen und deren Produkte zusammengefasst.

Oligonukleotidkombination (Oligonukleotidnummer Tabelle 4)	Fragmentgröße auf gDNA	Fragmentgröße auf cDNA	Größenunter- schied
LER_F1 / LER_E3r (12 / 17)	588 bp	318 bp	270 bp
LER_F1 / LER_E4r (12 / 20)	1493 bp	400 bp	1093 bp
LER_E3f / LER_E4r (15 / 20)	930 bp	106 bp	824 bp
LER-E4f/LER_E5r (18/24)	1637 bp	96 bp	1531 bp
LER-E4f / LER_E6r (18 / 25)	2730 bp	229 bp	2501 bp
LER_E5f / LER_E6r (22 / 25)	1125 bp	158 bp	967 bp
LER_F1 / LER_E6r (12 / 25)	4206 bp	612 bp	3887 bp

Tabelle 13: Oligonukleotidkombination und deren Produkte auf gDNA und cDNA.

Ein Alignment der cDNA- und genomischen Sequenzen zum Contig ermöglichte die Bestimmung der Exon/Intron-Struktur von *RNaseLER* (Abbildung 13A). Der so erstellte Contig umfasste eine Sequenz mit einer Länge von 4739 bp. Das *RNaseLER*-Gen weist sechs Exons und fünf Introns auf (Abbildung 13B). Die gesamte genomische Sequenz wurde in der EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*)-Datenbank veröffentlicht (Accession Nummer #AM408589, siehe auch Anhang C).



Abbildung 13: Exon/Intron-Struktur des RNaseLER-Gens.

A) Schematische Darstellung des Alignments der amplifizierten genomischen Fragmente von *RNaseLER*. Die Zahlen entsprechen den in Tabelle 4 angegebenen Oligonukleotidnummern.

**B)** Schematische Darstellung der *RNaseLER* Exon/Intron-Struktur. Die putativ kodierenden Regionen sind als gefüllte Rechtecke, die 5'- und 3'-untranslatierte Region sind als weiße Rechtecke und die Intronregionen als Zirkumflexe hellgrau dargestellt. Exons (E) sind über und Introns (I) sind unter den Zeichnungen nummeriert und das putative Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG) sind abgebildet. Dunkelgraue Rechtecke deuten die Positionen der CAS-Domämen in den Exons 2, 3, 4 und 5 an. Die Exon- und Intron-Größen sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Das aus 265 Nukleotiden bestehende Exon 1 beinhaltet die 5'-untranslatierte Region (5'UTR) und die für die ersten 70 Aminosäuren kodierenden Region inklusive der putativen Signalpeptidsequenz für die endoplasmatische Lokalisation des Enzyms. Ein Teil des 29 bp langen Exon 2 und des 74 bp langen Exon 3 kodieren die CAS I-Domäne. Die CAS II-Domäne wird von Exons 4 und 5 kodiert, die 104 bp bzw. 93 bp lang sind. Das

Translationsstoppkodon TAG liegt im Exon 6, mit einer Länge von 579 bp, welches auch die 3`-untranslatierte Region (3`UTR) enthält. Die Introns variieren von 96 bp bis 1534 bp Länge. In Tabelle 14 sind die Exon/Intronübergänge und Größen zusammengefasst.

Exon	Größe [bp]	Donor-Spleißstelle 5`-3`	Intron	Größe [bp]	Akzeptor-Spleißstelle 5`-3`
1	265	GTATCTA	1	175	GTATTTTTCCAG
2	29	GTAAGTC	2	96	CTTGTCTTCTAG
3	74	GTAAGTT	3	823	TTTTTTTGTCAG
4	105	TTTCACT	4	1534	TATTGATTGCAG
5	93	GTAAGTG	5	967	ACACAATGCCAG
6	579				
Konsensus		GTRAGT			YYYYYYYYNYAG

Tabelle 14: Exon/Intron Struktur des RNaseLER-Gens.

Die Übergänge zwischen einzelnen Exon - und Intronbereichen innerhalb eines einzigen Gens und auch zwischen verschiedenen eukaryotischen Genen sind stark konserviert (Sharp, 1987). Introns beginnen immer mit GT und enden mit AG (GT-AG Regel). Bei höheren Eukaryoten ist innerhalb dieser Sequenz die bevorzugte Verwendung von Purinen (Pu) oder Pyrimidinen (Py) konserviert, der Konsensus lautet hier PyNPyPyPuAPy. Eine entsprechende Sequenz befindet sich in allen Introns von *RNaseLER* an der erwarteten Position. Die Sequenzen der 5'-Spleiß- und der pyrimidinreichen 3'-Spleißstellen des *RNaseLER*-Gens entsprechen mit der Ausnahme der 5'-Spleißstelle des Intron 4 den Konsensussequenzen. Es wurden jedoch keine abweichenden Spleißprodukte beobachtet. In wenigen Fällen wurde gezeigt, dass zum korrekten Spleißen pflanzlicher Prä-mRNA von der GT-AG-Regel abweichende Sequenzen verwendet werden (GC-AG oder AT-AC, Lal *et al.*, 1999).

#### 3.1.5 Bestimmung der Kopienzahl der RNaseLER im Tomatengenom

Durch Southern-Analysen sollte überprüft werden, wie viele *RNaseLER*-Gene im Tomatengenom vorhanden sind. Dafür wurde hochmolekulare, genomische DNA aus Tomatenblättern des cv. Lukullus isoliert, mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RV hydrolytisch gespalten (Kapitel 2.2.1.1) und nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte (Kapitel 2.2.1.4) auf eine Nylonmembran übertragen (Kapitel 2.2.5). Für die Hybridisierung wurden radioaktiv markierte *RNaseLER*-Sonden verwendet (Abbildung 14).

Die erste Sonde hybridisiert zu dem Bereich von Exon 1 bis Exon 3 (E1/E3-Sonde), die zweite Sonde (E5/E6) zum Bereich von Exon 5 bis Exon 6.



Abbildung 14: Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von RNaseLER im Tomatengenom.

Genomische Tomaten-DNA (10  $\mu$ g) wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RV gespalten und in einem 0,8 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung der Restriktionsfragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit den Sonden: A) E1/E3-Sonde und B) E5/E6-Sonde unter stringenten Bedingungen. DNA-Größenstandards sind links angegeben. Die Southern-Blot-Analyse wurde drei Mal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Wie die Abbildung 14 zeigt, trat je eine Hybridisierungsbande auf der gDNA, die mit *Hind*III geschnitten wurde, auf (Abbildung 14, *Hind*III-Spuren). Das *Hind*III-Restriktionsenzym schneidet nicht im E1/E3- bzw. E5/E6-Sondenbereich. Die *Eco*RV-Restriktion, hybridisiert mit der E1/E3-Sonde, ergab ebenfalls nur eine Hybridisierungsbande (Abbildung 14A). Durch die Hybridisierung mit der E5/E6-Sonde wurden drei Banden detektiert (Abbildung 14B, *Eco*RV-Spur). Auf der Basis der ermittelten Sequenz lässt sich dieses Spaltmuster erklären. Es befinden sich drei aufeinanderfolgende *Eco*RV-Schnittstellen innerhalb des hybridisierenden Bereichs der E5/E6-Sonde im Intron 5 des *RNaseLER*-Gens, die die zwei zusätzlichen Banden auf dem Southern-Blot mit der E5/E6-Sonde und diesem Enzym

erklären. Theoretisch sollten nach der Restriktion der DNA im Southern-Blot vier Banden auftreten, jedoch sind zwei Fragmente (ca. 250 bp) in ihrer Größe beinahe identisch, sodass sie im Gel, aufgrund der beinahe gleichen Position, visuell nicht voneinander zu unterscheiden sind. Zusammenfassend weisen die Analysen darauf hin, dass das *RNaseLER*-Gen als Einzelkopie im Tomatengenom vorliegt.

## 3.1.6 Charakterisierung der stromaufwärts liegenden Region von RNaseLER

Um die Promotorregion des *RNaseLER*-Gens zu bestimmen, wurde der genomischen 5'-Bereich des *RNaseLER*-Gens mit Hilfe der *Genome Walking*-Methode (Kapitel 2.2.3) analysiert. Als DNA-Matrize dienten fünf unterschiedliche genomische Restriktionsbanken von *S. lycopersicum* cv. Lukullus (Kapitel 2.2.3). Aus der gDNA-Restriktionsbibliothek *Hinc*II konnte mit den Oligonukleotiden AP2/GSP2 ein 1032 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Das Fragment wurde subkloniert (Tabelle 6, pC5'UTR-H) und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine Verlängerung der *RNaseLER*-Sequenz um 908 bp stromaufwärts vom ATG. Aus den erhaltenen Sequenzdaten des putativen Promotor-Amplifikationsproduktes und des genomischen Contigs (Abbildung 13) konnte eine 5,591 kb umfassende Sequenz des *RNaseLER*-Gens zusammengestellt werden. Die komplette Sequenz wurde in der EMBL-Gendatenbank veröffentlicht (#AM408589, siehe Anhang C).

#### 3.1.6.1 In silico-Analyse der genomischen 5'-Region

Mit Hilfe der Datenbanken PLACE-Datenbank (Higo *et al.*, 1999), PlantCare (Lescot *et al.*, 2002) und PlantPAN (Chang *et al.*, 2008) wurden *in silico*-Analysen des genomischen 5'-Bereiches durchgeführt, um potentielle regulatorische *cis*-Elemente zu identifizieren. Da es sich bei diesen Elementen um kurze, konservierte Sequenzen von etwa 5-20 Nukleotiden handelt, kann ihr Auftreten zufällig innerhalb von einigen hundert Basenpaaren statistisch erwartet werden. Die über einen Basenvergleich ermittelten Bindungsstellen müssen daher nicht zwingend korrekt sein. Zunächst wurde die 5`-Sequenz des *RNaseLER* auf das Vorhandensein der TATA-Box, einer der wichtigsten Kernpromotorelemente für regulierte Gene, hin untersucht. Diese liegt bei Eukaryoten zumeist 25-30 bp vom Transkriptionsstart entfernt und besitzt eine Konsensussequenz von TATA(A/T)AA(G/A) (Smale und Kadonaga, 2003). Eine der Konsensussequenz "TTATTT" ähnliche TATA-Box liegt 33 Nukleotide

#### **ERGEBNISSE**

stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und könnte somit als potentielles TATA-Element fungieren. Als zweites regulatorisches Promotorelement wurden neun potentielle CAAT-Boxen vorhergesagt. Die dem Transkriptionsstart am nächsten gelegene CAAT-Box befindet sich an Position -16 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Bucher und Trifonov (1986) geben eine für Eukaryoten übliche Distanz von -129 bis -50 bp relativ zum Transkriptionsstart an. Auch die anderen vorhergesagten CAAT-Boxen liegen außerhalb dieser Region. Neben diesen Standardelementen wurden im Promotorbereich von *RNaseLER* weitere, in Pflanzen beschriebene konservierte Boxen sowie Enhancer- und Suppressorelemente gefunden, die die Expressionsstärke eines Gens kontrollieren können. Alle Ergebnisse der computergestützten Sequenzanalysen sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Positionen der identifizierten Elemente sind in Abbildung 15 relativ zu der Sequenz des putativen Promotorbereiches dargestellt. Dabei wurden mit wenigen Ausnahmen nur Bindungsstellen mit ausgewiesener Funktion berücksichtigt. Es sollen nur einige interessante oder häufig auftretende Elemente genannt werden.



#### Abbildung 15: Regulatorische Elemente im 5'-Bereich des Gens RNaseLER.

Mit Hilfe der Datenbanken PLACE, PlantCare und PlantPAN wurde der 5'-untranslatierte Bereich des Gens *RNaseLER* auf mögliche regulatorische Promotorelemente untersucht. Dargestellt sind die wichtigsten Elemente, die im Bereich von -908 bp bis zum Startkodon ATG gefunden wurden. Eine Beschreibung der Elemente befindet sich in Tabelle 15.

#### Tabelle 15: Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren.

Auflistung potentiell regulatorischer *cis*-aktiver Elemente in der 908 bp Region vor dem ATG des *RNaseLER*-Gens (Akz. #AM408589). Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf den Transkriptionsstart (+1). Grau geschriebene Positionen markieren komplementäre Sequenzen. Angegeben sind die Signalsequenzen (N=A/C/G/T; R=A/G; W=A/T; Y=C/T), die Position der Elemente auf dem (+)- bzw. (-)-Strang sowie die Funktion und die allgemeine Klassifizierung, die den jeweiligen Elementen zugeordnet werden können. Daten wurden der PLACE-, PlantCare- bzw. PlantPAN-Datenbank entnommen.

<i>cis</i> -aktives- Element	Konsensus/Sequenz <i>RNaseLER</i> Promotor $5' \rightarrow 3$ `	Position (+/-Strang)	Name/Funktion/Spezifität
TATA-Box	TTATTT	-33, -99, -159,	Kernpromotorelement,
	TAATA	-81-169, -649,	-30 Transkriptionsstart
		-784	
CAAT-Box		-16, -476, -781,	cis-aktives Element in Promo-
		-2, -7, -519,	tor- und Enhancerregion
		-552,-584, -814	(Kehoe et al. 1994)
TAAAG-	TAAAG	-518, -568	Schließzellen-spezifische
Box	TAAAG		Expression, Bindestelle für
			Dof-Transkriptionsfaktoren
			(Plesch <i>et al.</i> , 2001)
GATA-Box	GATA	-609, -613,	Licht-regulierte und Gewebe-
		-668,-680,	spezifische Expression (Gidoni
	TATC	-739, -773	et al., 1989; Gilmartin et al.,
			1990; Lam und Chua, 1989)
GT-1	GRWAAW	+33, -263,	Licht- und Salizylsäure (SA)-
	GAAAAT,GGAAAA,	-379,- 380,	regulierte Expression,
	GATAAT, GAAAAA	-526, 609,	TATA-Komplexstabilisierung,
	CCTTTA, CTTTTA,	-89, -102,	(Lam und Chua, 1990)
	CTTTTT. CCAATT	-134, -324,	
		- 624, -658	
ERE	AWTTCAAA	-512	Ethylen-induzierte und Senes-
	ATTTCAAA		zenz-regulierte Expression
			(Montgomery et al., 1993,
			Itzhaki et al., 1994)
E-Box	CANNTG	-416, -789	Abscisinsäure (ABA)-
	CATTTG, CATATG,	,-801, -810,	regulierte Expression, Wasser-
	CAGATG,		stress (Stalberg et al., 1996)
	CAAATG, CATATG,	-411, -784,	
	CATCTG	-796,-805	
MYB-	CNGTTR		ABA- und Trockenstress-
Kernelement	CTGTTG, CTGTTA	-293, -707,	regulierte Expression
		-787	(Urao et al., 1993)

<i>cis</i> -aktives- Element	Konsensus/Sequenz <i>RNaseLER</i> Promotor 5'→ 3`	Position (+/-Strang)	Name/Funktion/Spezifität
W-Box	TTGAC, TGACY	-20, -155,	Pathogen- und pathogene
	TTGAC, TGACC	-785,	Elicitor-induzierte Expression,
	TTGAC	-175	WRKY-Transkriptionsfaktoren
			(Eulgem et al., 2000;
			Rushton et al., 1996)
TC-rich	RTTYTCTNMM	-139, -97	Stress- und Pathogen-
repeats	ATTTTCTCAA,		induzierte Expression
	ATTTTTTTCA		(Diaz-De-Leon et al., 1993)
circadian	CAANNNATC		circadiane Rhythmik
core	CAAAGGTGTC	-153	(Piechulla et al., 1998)

Tabelle 15 Fortsetzung: Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren.

#### 3.1.7 Analyse der Promotoraktivität

Die Analyse der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression eines Gens kann einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Rolle des korrespondierenden Proteins in der Pflanze liefern. In diesem Zusammenhang sollte überprüfen werden, ob der mittels Genome Walking isolierte putative Promotor (Kapitel 3.1.6) des RNaseLER-Gens eine spezifische Aktivität zeigt und der für die Expression von RNaseLER nötigte Minimalpromotor bestimmt werden. Dafür wurden verschiedene Reportergenkonstrukte erstellt. 908 bp, 755 bp und 207 bp der RNaseLER 5'-stromaufwärts Region (P367; P134 und P221, Konstrukte siehe Abbildung 16) wurden amplifiziert und transkriptionell an das uidA-Gen fusioniert (Kapitel 2.2.6.1). Das *uidA*-Gen aus *E. coli* kodiert für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS, EC 3.2.1.31), die die hydrolytische Spaltung eines großen Spektrums von  $\beta$ -Glucuroniden katalysiert. Die enzymatische Aktivität lässt sich im Gewebe der Pflanze histochemisch einer (Blaufärbung) bzw. fluorimetrisch mittels Farbreaktion nachweisen. Die Promotorfragmente wurden in Binärvektor pBI101 kloniert (Kapitel 2.2.6.1; Tabelle 6) und anschließend Agrobacterium-vermittelt stabil in *N. benthamiana* transformiert (Kapitel 2.1.6.2). Die Lokalisation und die Promotoraktivität der RNaseLER bzw. der Promotor:GUS-Fusionskonstrukte werden in den nachfolgenden Abschnitten mittels histochemischer und fluorimetrischer Bestimmung der GUS-Aktivität untersucht.



Abbildung 16: GUS-Reportergenkonstrukte zur Analyse der Promotoraktivität der *RNaseLER*. A): Schematische Darstellung der erstellten Konstrukte. Je ein 908 bp (P367)-, ein 755 bp (P134)- und ein 207 bp (P221)-Fragment aus dem Promotor des *RNaseLER* wurde vor das *uidA*-Gen ( $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Reportergen) in den Binärvektor pBI101 kloniert.

nosA: Nopalin-Synthase-Terminator

B): Histochemische Analyse der GUS-Fusionen in N. benthamiana

+: GUS-Aktivität

-: keine GUS-Aktivität

# 3.1.7.1 Lokalisation der Promotoraktivität in transgenen N. benthamiana

Über die *Agrobacterium*-vermittelte stabile Transformation wurden die Promotor:GUS-Fusionen *P367:uidA*, *P134:uidA* und *P221:uidA* in Wildtyp *N. benthamiana*-Pflanzen eingebracht (Kapitel 2.1.6.2, Stabile Pflanzentransformation). Die T-DNA enthielt zur Selektion transformierter Kalli/Pflanzen das Gen der Neomycin-Phosphotransferase (*NPTII*-Gen). Für jedes Promotor:GUS-Konstrukt wurden 100 bis 150 sich aus den Kalli bildende Sprosse ( $T_0$ ) abgeschnitten und auf Wurzelinduktionsmedium (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1) überführt. Pro Konstrukt bildeten etwa 50 der umgesetzten Sprosse innerhalb von zwei bis vier Wochen Wurzeln. Die bewurzelten  $T_0$ -Pflanzen wurden im Gewächshaus weiter kultiviert. Mittels PCR-Analysen wurde getestet, ob die selektierten Pflanzen tatsächlich das jeweilige Reportergenkonstrukt enthielten. Die PCR-Reaktionen wurden mit *RNaseLER*promotorspezifischen Oligonukleotiden (Kapitel 2.2.6.1, Tabelle 4) jeweils in Kombination mit einem *uidA*-Gen-spezifischen Oligonukleotid (GUSII; Kapitel 2.1.4, Tabelle 4) durchgeführt. Insgesamt konnten für *P367:GUS* 41 transgene *N. benthamiana*-Linien, für *P134:GUS* 30 und für *P221:GUS* 23 Linien regeneriert werden (Daten nicht gezeigt). Je zehn Linien wurden geselbstet und 15 Tage alte ganze Pflanzen der nächsten Generation ( $T_1$ ) zunächst histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht.

Dabei konnte für keine der zehn analysierten P221:uidA-Linien eine GUS-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 16). Anhand der *in silico*-Analysen (Kapitel 3.1.6.1) konnte eine TATA-Box, die sich in diesem Promotorfragment befindet, ermittelt werden, die jedoch nicht für die Expression des *P221:uidA*-Konstruktes ausreichend ist. Die je zehn *P367:uidA*- bzw. *P134:uidA*-Linien hingegen zeigten eine deutliche GUS-Färbung mit identischem Expressionsmuster. Die Abbildung 17 zeigt, repräsentativ für alle getestete Linien, die Ergebnisse der histochemischen GUS-Färbung in den verschiedenen Tabakgeweben. Alle Linien zeigten eine GUS-Aktivität in den Stomata, Trichomen und Stängeln (Abbildung 17). Durch Längsschnitte der Stängel konnte die GUS-Aktivität auf das Parenchymgewebe eingegrenzt werden (Abbildung 17H).

In den Epidermiszellen und Mesophyllzellen der Blätter ist keine Aktivität nachweisbar,

jedoch treten stark markierte Stomata in den Blättern hervor (Abbildung 17D, F).

Aktivität in den Wurzeln war nur in 20 % der untersuchten Pflanzen detektierbar. In diesen Fällen war die Blaufärbung auf den Bereich der Reifungs- und Streckungszone direkt hinter der Wurzelspitzen begrenzt (Abbildung 17E). In den verschiedenen Blütenteilen konnte eine Aktivität in den Sepalen, wobei sich die Aktivität auch hier auf die Stomata und die Blattnerven beschränkte, sowie in den Antheren nachgewiesen werden (Abbildung 17A). In den Petalen und dem Pistill konnte keine GUS-Aktivität detektiert werden.



# Abbildung 17: Histochemischer Nachweis der GUS-Expression unter Kontrolle des *RNaseLER*-Promotors (P367) und des Derivats P134.

15 Tage alte Promotor:GUS-Pflanzen wurden histochemisch analysiert.

Die Proben wurden über Nacht in GUS-Färbelösungen inkubiert und anschließend mit Ethanol gebleicht.

(A) Blüte (Linie P367-57), (B) Trichom eines Stängels, (C) 15 Tage alte Pflanze (Linie P134-9), (D) Primärblatt mit gefärbten Schließzellen, (E) Wurzel (Linie P134-9), (F) Detailaufnahme von (D) untere Blattepidermis mit gefärbten Schließzellen, (G) Stängel, (H) Detailaufnahme von (G) Stängellängsschnitt nach Paraffineinbettung; Aufnahmen A, C, E, G Stereomikroskop Stemi 2000 (Carl Zeiss Jena GmbH; Jena), B, F, H an Mikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss Jena GmbH; Jena).

#### **ERGEBNISSE**

### 3.1.7.2 Fluorimetrische Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität

Da es möglich ist, dass der histochemische Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität nicht sensitiv genug ist, um schwache Expressionen nachzuweisen, wurde zur weiteren Charakterisierung der transgenen Tabakpflanzen die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität in den Blättern transgener T<sub>2</sub>-Linien eingesetzt. Die quantitative Bestimmung beruht auf der Umsetzung von 4-Methyl-umbelliferyl-D-Glucuronid (MUG) zu Methylumbelliferon (MU) durch die  $\beta$ -Glucuronidase. Das Produkt MU kann durch Fluoreszensmessung quantifiziert werden (Kapitel 2.4.3; Jefferson *et al.*, 1987).

Mit Hilfe der fluorimetrischen Analyse sollte im Folgenden untersucht werden, ob die verwendeten Promotorfragmente hinsichtlich ihrer Aktivität Unterschiede aufweisen.

Um auszuschließen, dass die Kopienzahl der Promotor:GUS-Insertionen eine Auswirkung auf die Intensität der Expression und damit auf die GUS-Aktivität hat, wurden alle Pflanzen der verwendeten T<sub>2</sub>-Linien mittels Southern-Blot analysiert. Für die Analyse wurden T<sub>2</sub>-Nachkommen der Linien P367:uidA-5, P134:uidA-11, deren histochemische Analyse eine positive GUS-Färbung zeigte und T<sub>2</sub>-Nachkommen der P221:uidA-2 Linie verwendet und in Erde ausgesät. Drei Wochen alte Pflanzen wurden mit Kanamycin vorselektiert, vereinzelt und weitere 3 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Für die Southern-Analysen wurde gDNA der transgenen Linien mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer 500 bp großen *uidA*-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (<sup>32</sup>P-GUS) hybridisiert. Das Audioradiogramm ist in Abbildung 18 dargestellt. Linien, in denen eine Hybridisierungsbande detektiert wurde, wurden als Linien mit einer Kopie des klassifiziert, wohingegen mit zwei und mehr Promotor:GUS-Konstrukts Linien Hybridisierungsbanden als Linien mit mehreren Promotor:GUS-Insertionen eingestuft wurden. In Abbildung 18 A ist das Audioradiogramm der zehn getesteten T<sub>2</sub>-Generationen der P221:uidA-2 Linie dargestellt, Abbildung 18B und Abbildung 18C stellen die Audioradiogramme der zehn T2-Generationen der P134:uidA-11 bzw. P367:uidA-5 Linien wieder. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

	P221:uidA-9									P134:uidA-11										P367:uidA-5														
kb	Μ	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Μ	M	13	4	5	68	3 10	) 11	121	3	14 1	5 M	Μ	2	3	7	8	9	12	1314	15	17	18 28
10,0	-		-	-				Martin																1	-	-	-	-		-			-	-
0,0																				141				The second										
6,0	-	100	9		6	99. 1						-		34						164 4	4	12.1	-											
5,0			100				100		100																									
3'5																								- Sestary Nonces										
3.0	-											-											-	-										
2,5	-											and the second											10. 115	-										
2.0	_											-												-Campo										
1.5												-																						
1,5												640																						
10.	_											1999																						
0.75	_																																	Car Mary
0,5	_										()	A)											(B)	-										(C)

Abbildung 18: Analyse der Integrationsanzahl der Promotor-GUS-Fusionen im Genom von N. benthamiana.

Aus Tabakblättern isolierte genomische DNA wurde mit *Hind*III-Restriktionsenzymen geschnitten. Die Fragmente wurden in einem 0,8 % igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der <sup>32</sup>P-GUS-Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. (A): *P221:uidA-9* T<sub>2</sub> -Linien 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; (B): *P134:uidA-11* T<sub>2</sub>-Linien 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15; (C): *P367:uidA-5* T<sub>2</sub>-Linien 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 28; M: 1kb Gene Ruler (Fermentas). Die Radioaktivität wurde mittels des Phosphoimagers (BIO-IMAGING ANALYZER BAS1500) detektiert. Dargestellt ist eines von drei konsistenten Experimenten. Links der Abbildung sind die Laufhöhen des Größenmarkers (1kb Ladder Fermentas) in kb angegeben. Pro Spur wurden ca. 20 µg DNA aufgetragen.

Für die fluorimetrische Analyse wurden aus den analysierten T<sub>2</sub>-Pflanzen Proteinextrakte gewonnen und die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase fluorimetrisch durch Zugabe von MUG ermittelt (Kapitel 2.4.3). Als (i) positiv bzw. (ii) negativ Kontrolle wurden transgene T<sub>2</sub>-Tabaklinien, die (i) ein 35S:uidA-Konstrukt (GUS-Gen unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors) bzw. ein promotorloses  $\Delta$ 35S:uidA-Konstrukt (GUS-Gen ohne Promotor) enthielten (Konstrukte siehe Tabelle 6), mitgeführt.

Die ermittelte  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität der getesteten Linien sind zusammen mit ihrer ermittelten Integrationsanzahl in Tabelle 16 zusammengefasst. Blätter mit dem 35S:GUS-Konstrukt zeigten, wie anzunehmen, da 35S ein starker konstitutiver Promotor ist (Odell *et al.*; 1985), hohe Aktivitäten von 13035 bis 29270 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> lösliches Gesamtprotein (Tabelle 16). Doch auch die beiden Promotorkonstrukte *P134:uidA* und *P367:uidA* zeigten deutliche GUS-Aktivität. Bei der Bestimmung der GUS-Aktivität der *P134:uidA*-Linien zeigte sich, dass zehn der zwölf getesteten Linien ein breites Aktivitätsspektrum von 279 bis 2626 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> aufwiesen (Tabelle 16). Zwei Linien, *P134:uidA*-11/11 und *P134:uidA*-11/15, wiesen keine Expression der  $\beta$ -Glucuronidase auf. Das Fehlen der GUS-Aktivität in den Linien *P134:uidA*-11/11 und *P134:uidA*-11/15 bestätigt die Southern-Analysen, da in diesen Linien keine dem *uidA*-Gen entsprechende Bande detektiert werden konnte. Pflanzen, die in den Southern-Blot-Analysen negativ waren und keine GUS-Aktivität aufwiesen wurden als nicht transgen eingestuft und verworfen. Die GUS-Aktivität der *P367:uidA*-Linien betrug 80 bis 611 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> lösliches Gesamtprotein (Tabelle 16). Auch hier zeigten zwei der zwölf getesteten Linien, *P367:uidA*-5/9 und *P367:uidA*-5/18, Werte von 7,68 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>und 1,84 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> (Tabelle 16). Im Vergleich zu den Transgenen mit dem promotorlosen Konstrukt weisen diese beiden Pflanzen keine GUS-Aktivität auf. Es konnten für diese beiden Linien in den Southern-Analysen keine der <sup>32</sup>P-GUS-Sonde homologe Bande nachgewiesen werden, womit diese Pflanzen nicht transgen waren. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle Δ35S:GUS Werte von 2,86 bis 22, 48 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> (Tabelle 16), die als Hintergrundwerte eingestuft wurden. Bei den 10 untersuchten *P221:uidA*-2 Linien reichten die GUS-Aktivitäten in den Blättern von 3,57 bis 12,37 pmol \* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup>, womit diese im Bereich des Hintergrundsignals lagen (Tabelle 16). Die Ergebnisse des histochemischen GUS-Nachweises konnten so bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Promotorfragmente P134 und P367 in den histochemischen und fluorimetrischen Analysen eine Promotoraktivität in den transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen aufweisen. Das kleinste Fragment, P221, zeigt keine Promotoraktivität.

#### Tabelle 16: Anzahl der Promotor-GUS-Fusionsintegration in T<sub>2</sub>-*N. benthamiana* Linien.

Zusammengefasst dargestellt sind die Kopienzahl der Promotor-GUS-Insertionen mit der nach Jefferson *et al.* (1987) ermittelten GUS-Aktivität der transgenen T<sub>2</sub>-Linien: *P221:uidA*-2-2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; *P134:uidA*-11-1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15; *P367:uidA*-5-2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 28. Grau hinterlegt sind die Linien, die im Vergleich der GUS-Aktivitäten (Abbildung 19) einbezogen wurden, n. b.: nicht bestimmt.

Grad minterlegt sind die I	Linnen, ale i	in vergieten				undezogen w		ment bestim							
	P221:uidA-2														
T <sub>2</sub> -Linie	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
Kopienzahl	1	3	2	2	3	2	3	3	0	3					
GUS-Aktivität (pmol*min <sup>-</sup> 1*mg <sup>-1</sup> )	5,62	8,28	14,15	3,57	9,02	4,32	11,48	12,37	5,85	9,30					
P134:uidA-11															
T2-Linie 1 3 4 5 6 8 10 11 12 13 14 15															
Kopienzahl	2	2	2	2	1	1	1	0	2	2	1	0			
GUS-Aktivität (pmol*min <sup>-</sup> 1*mg <sup>-1</sup> )	2074	3314	2442	2154	899	279	369	3,6	2626	2156	423	4,6			
P367:uidA-5															
T <sub>2</sub> -Linie	2	3	7	8	9	12	13	14	15	17	18	28			
Kopienzahl	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1			
GUS-Aktivität (pmol*min <sup>-</sup> 1*mg <sup>-1</sup> )	611	338	80	401	7,68	345	576	259	233	230	1,84	361			
		·	·	·	35S:	uidA-5			·	·					
T <sub>2</sub> -Linie	1	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Kopienzahl	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.			
GUS-Aktivität (pmol*min <sup>-</sup> 1*mg <sup>-1</sup> )	29270	21073	21212	21454	17586	15181	24040	22193	10457	20382	13035	2,4			
	Δ35S:uidA-9														
T <sub>2</sub> -Linie	1	2	3	4	5	7	9	10	11	12	13	14			
Kopienzahl	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.			
GUS-Aktivität (pmol*min <sup>-</sup> 1*mg <sup>-1</sup> )	10,91	14,13	13,32	14,03	22,48	13,70	5,69	6,59	5,02	6,93	3,94	2,86			

#### 3.1.7.3 Vergleich der GUS-Aktivität der T<sub>2</sub>-Linien

Eine Gegenüberstellung der bestimmten GUS-Aktivitäten und der ermittelten Kopienzahl der Promotor-GUS-Konstrukte macht deutlich, dass die GUS-Aktivität von der Kopienzahl abhängig ist. Linien mit zwei oder mehr Integrationen weisen eine deutlich höhere Aktivität auf als Linien mit einer Integration (Tabelle 16).

Für einen genaueren Vergleich der Promotorkonstrukte bzw. deren Aktivitäten wurden Linien mit einer Kopie ausgewählt, da hier ein Gendosiseffekt auszuschließen ist. Die GUS-Aktivitäten dieser Pflanzen wurden verglichen und sind im Diagramm (Abbildung 19) graphisch dargestellt.



 $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (pmol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>)

Abbildung 19: Fluorimetrisch ermittelte  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität in Blättern transgener Tabakpflanzen. Dargestellt sind die fluorimetrischen GUS-Aktivitätswerte der T<sub>2</sub>-Linien, die eine Einzelkopie der Promotor:GUS-Konstrukte *P221:uidA*, *P134:uidA* bzw. *P367:uidA* aufwiesen. Als Positivkontrolle für die GUS-Aktivität wurden T<sub>2</sub>-Linien, die das *uidA*-Gen unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors (*35S:uidA*) exprimieren, eingesetzt und als Hintergrund- bzw. Negativkontrolle wurden T<sub>2</sub>-Linien eingesetzt, die ein promotorloses *uidA*-Gen (*Δ35S:uidA*) enthalten. Von den willkürlich ausgewählten Kontrollen wurde keine Kopienzahl ermittelt. Die GUS-Aktivitäten wurden von zwei biologischen Proben zu je zwei technischen Replikaten ermittelt. Es zeigte sich, dass die GUS-Aktivitäten der *P134:uidA*-Linien von 369,4 bis 899,9 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> leicht schwankten. Die GUS-Aktivitätswerte der *P367:uidA*-Linien lagen in einem Bereich von 79,5 bis 611,2 pmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>. Im Vergleich zur Negativkontrolle waren die Werte beider Konstrukte jedoch um mehr als das 300-fache erhöht. Ein Vergleich mit der Positivkontrolle zeigte etwa 100-fach geringere Aktivitätswerte. Für die Kontrollen wurde jedoch die Kopienzahl nicht bestimmt, so dass die Werte nur als Richtwerte betrachtet wurden. Die Ermittlungen der Kopienzahl geben jedoch keinen Aufschluss über den Ort der Integration, der ebenfalls einen Einfluss auf die Stärke der Expression durch die Integration in die Nähe von heterochromatischen bzw. in euchromatischen Bereich haben kann.

Vergleiche der Aktivitätswerte der *P367:uidA*-Linien mit denen der *P134:uidA*-Linien weisen geringe Unterschiede hinsichtlich der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitäten auf. Das lässt darauf schließen, dass diese beiden Promotorbereiche sich hinsichtlich ihrer Aktivität unter normalen Bedingungen nicht oder nur geringfügig unterscheiden.

# 3.2 Expressionsanalysen des RNaseLER-Transkripts

Um mehr über die Funktionen von RNaseLER zu erfahren, wurde im Folgenden analysiert, wann, wo und unter welchen Bedingungen die *RNaseLER* Expression zeigt. In den nachfolgenden Kapiteln wurden die organspezifische Expression und das Expressionsprofil der *RNaseLER* analysiert. Die Analysen erfolgten mit semiquantitativen und quantitativen RT-PCR-Methoden (*reverse transcription* PCR).

#### 3.2.1 Analyse der organspezifischen Expression

Die GUS-Analysen haben gezeigt, dass der *RNaseLER*-Promotor in unterschiedlichen pflanzlichen Organen aktiv ist (Kapitel 3.1.7.1). Um die Ergebnisse dieser GUS-Färbungen zu vertiefen, weitere Hinweise auf die Funktion der RNaseLER zu erhalten und eine Gewebespezifität und entwicklungsabhängige Expression im natürlichen System zu untersuchen, wurden semiquantitative RT-PCR Studien mit cDNA als Matratzen aus verschiedenen Geweben unbehandelter Tomatenpflanzen, *S. lycopersicum* cv. Lukullus, durchgeführt. Aus den in Abbildung 4 (Kapitel 2.1.6.1) dargestellten Pflanzenorganen wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Analyse wurden *RNaseLER* spezifische Oligonukleotide eingesetzt, die (i) Intron überspannend (Oligonukleotid 40/41;

Tabelle 4) gewählt wurden, so dass eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte und (ii) Oligonukleotide, mit denen der Bereich des 3'-Endes des Exon 6 und der 3'-nicht-translatierten Region (Oligonukleotid 42/43, Tabelle 4) amplifiziert wurde. Der 3'-Bereich ist häufig charakteristisch für ein bestimmtes Gen, da diese Sequenzen sogar innerhalb von Genfamilie weniger konserviert sind als mittlere Exons. Um Aussagen zur Expressionsstärke eines Gens zu machen, müssen bei der RT-PCR vergleichbare *template*-Mengen eingesetzt werden. Zur Kontrolle der *template*-Menge wurde die Amplifikation des Transkripts des konstitutiv exprimierten *Ubiquitin* 1-Gens (*Ubi 1*) verwendet (Kapitel 2.2.3). Dazu wurden die Transkriptmengen des *Ubi 1*-Gens im Gel zum Vergleich mit den *RNaseLER*-Transkriptmengen herangezogen.

Abbildung 20 gibt einen Überblick über die *RNaseLER*-Expression in den verschiedenen Organen. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Organen unabhängig vom Entwicklungsstadium eine Expression der *RNaseLER* detektiert werden konnte (Abbildung 20). Obwohl ein direkter quantitativer Vergleich der Expression aufgrund der unterschiedlichen Pflanzenorgane vermutlich nicht möglich ist, können dennoch qualitative bzw. semiquantitative Expressionsunterschiede in den verwendeten Proben beschrieben werden. Daher wurden verschiedene PCR-Reaktionen mit ansteigender Zyklenzahl durchgeführt, um eine semiquantitative Aussage über die eingesetzte Transkriptmenge treffen zu können.



Abbildung 20: RNaseLER-Expression in verschiedenen Organen von S. lycopersicum.

Expressionsanalysen des *RNaseLER*-Gens mit Gesamt-RNA aus diversen Organen der Tomate *S. lycopersicum* cv. Lukullus. Die RNA der verschiedenen Organe wurde *reverse* transkribiert und in einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse hinsichtlich *RNaseLER*-Expression untersucht. RT-PCR-Analysen auf das *Ubiquitin* 1-Gen (*Ubi1*) dienten zur Kalibrierung. Die Benennung der Organe ist rechts in der Abbildung dargestellt. Im Kopf der Abbildung ist die Anzahl der PCR-Zyklen (27, 32, 37) angegeben. Die Analysen wurden mit drei unabhängigen RNA-Proben durchgeführt, dargestellt ist repräsentativ ein Ergebnis. Gezeigt sind die spezifischen PCR-Amplifikate der *RNaseLER* (235 bp) mit den Oligonukleotidkombination (Oligonukleotid 42/43, Tabelle 4) und *Ubiquitin* 1 (*Ubi1*, 160 bp).

Aus der Abbildung 20 ist auch ersichtlich, dass ausgehend von der gleichen Menge an eingesetzter cDNA die Amplikonmenge in einigen Geweben höher ist als in anderen. Es ist sichtbar, dass im reifen Perikarp, jungen Blättern, Hypokotyl, der Wurzel sowie in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Blüte und in den Petalen, Fruchtknoten und Antheren geöffneter aber noch nicht befruchteter Blüten die *RNaseLER*-Expression höher ist als in den anderen untersuchten Pflanzenorganen. In den Stängeln, seneszenten Blättern, Kotyledonen und Sepalen geöffneter aber noch nicht befruchteter Blüten konnten die *RNaseLER*-Amplikons erst nach mehr als 27 Zyklen nachgewiesen werden konnte.

# 3.2.2 Untersuchung zur zellspezifischen Expression des *RNaseLER* mittels *in situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierungstechnik wurde im Folgenden analysiert, ob das *RNaseLER*-Gen in Tomatenpflanzen zellspezifisch exprimiert wird. Als genspezifische Sonde zur Detektion der *RNaseLER*-mRNA wurde die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) von *RNaseLER* verwendet. Ein Sequenzvergleich der *RNaseLER* mit *RNaseLE* und RNaseLX zeigte, dass keine Homologie zwischen den 3'UTRs auftreten, somit ist diese Sonde spezifisch für die *RNaseLER*-mRNA. Zur Herstellung der Sonde wurde die 3'-*RNaseLER*-cDNA, deren Enden jeweils mit einer *XbaI* bzw. *Bam*HI Schnittstelle flankiert sind, in den Vektor pSPT18 (pSPTLER1, Tabelle 6) kloniert. Die DIG-markierte, einzelsträngige RNA-Sonde wurde anschließend durch *in vitro*-Transkription hergestellt (Kapitel 2.4.4.1). Als Positiv-Probe wurde die *antisense*-RNA, als Negativ-Probe die *sense*-RNA der cDNA des *RNaseLER*-Gens verwendet. Als Kontrolle wurde das Haushaltsgen *Ubiquitin 1* verwendet und ebenfalls in den Vektor pSPT18 (pSPTLB8 (pSPTLB8), Tabelle 6) kloniert. Auch hier wurden als Positivkontrolle die antisense-RNA bzw. als Negativkontrolle die sense-RNA der cDNA von *Ubi1* verwendet.

Längs- und Querschnitte junger Blätter, Stängel und Wurzeln 14 Tage alter *S. lycopersicum*-Pflanzen wurden auf Objektträgern fixiert (Kapitel 2.4.2) und *in situ* hybridisiert (Kapitel 2.4.4). Nach 16 Stunden Hybridisierung mit 5 ng/µl Sonde bei 45 °C wurden die Proben für vier Stunden mit dem Farbsubstrat NBT/BCIP (Kapitel 2.4.4) inkubiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet.

Die Auswertung der Positivkontrolle (*antisense* Ubi1-Probe) zeigte deutlich die erwartete violette Färbung in allen Zellen. Es konnte jedoch kein spezifisches RNaseLER-Signal in den Proben detektiert werden. Eventuell war die ermittelte Sondenmenge (Kapitel 2.4.4.1, Abbildung 5) oder Farbreaktionszeit für die *RNaseLER*-mRNA zu niedrig. Daher wurden die Experimente mit 10 ng/µl und 20 ng/µl RNaseLER-Sonden wiederholt und die Reaktionszeit auf 12 h ausgeweitet. Allerdings führte eine Erhöhung der Sondenmenge und Verlängerung der Reaktionszeit nicht zur Detektion der *RNaseLER*-mRNA. Möglicherweise liegt die *RNaseLER*-mRNA Menge unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

# 3.2.3 Untersuchung der *RNaseLER*-Genexpression während abiotischer und biotischer Stresssituationen.

Die semiquantitativen RT-PCR-Analysen haben eine ubiquitäre, konstitutive Expression der *RNaseLER* gezeigt. (Kapitel 3.2.1). Die computergestützten Analysen der Promotorregion des *RNaseLER*-Gens zeigten jedoch die Anwesenheit potentieller *cis*-aktiver regulatorischer Elemente (Kapitel 3.1.6.1), die in der induzierbaren Expression der *RNaseLER* involviert sein könnten. Um die physiologische Bedeutung der RNaseLER zu analysieren, wurde zunächst die stressinduzierte Genexpression geprüft. Dazu wurde der Einfluss von Stresssituationen, wie osmotischem Stress, Phosphatmangel, Pathogenbefall, Phytohormonapplikation und Verwundung mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) analysiert.

Verwendet wurden Blätter fünf Wochen alter Tomatenpflanzen, die im Gewächshaus unter Normalbedingungen angezogen wurden. Die Verwendung von Blättern erschien zweckmäßig, da in den vorangegangenen Studien, bei denen die Expressionsmuster des *RNaseLER* in verschiedenen Pflanzenorganen untersucht wurden, eine *RNaseLER*-Expression auf signifikantem Niveau detektiert werden konnte (Kapitel 3.2.1). Das Protokoll der Durchführung und die Berechnungsgrundlage zur Auswertung der erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte sind unter Kapitel 2.2.3 aufgeführt.

#### 3.2.3.1 <u>RNaseLER-Genexpression nach Sorbitolapplikation.</u>

Die GUS-Analysen zeigten eine spezifische Promotoraktivität in Schließzellen und Trichomen (Kapitel 3.1.7.1, Abbildung 17). Aus diesem Grund wurde untersucht, wie sich das *RNaseLER*-Transkript bei osmotischem Stress verhält und somit die RNaseLER an Stress-reaktionen beteiligt sein könnte. Sorbitol erzeugt ohne direkten Einfluss auf metabolische Prozesse osmotischen Stress und wurde daher als Osmolytikum eingesetzt. Junge Fiederblätter von *S. lycopersicum* cv. Lukullus wurden auf Sorbitollösung oder sterilem Leitungswasser (*mock*-Behandlung) inkubiert (Kapitel 2.1.6.6) und in einem Zeitraum von 0 bis 24 h nach der Behandlung geerntet. Mittels qRT-PCR-Analysen wurde die Wirkung auf das Expressionsverhalten des *RNaseLER*-Gens untersucht. Roitsch (1999) zeigte, dass das Transkriptlevel des Proteinase Inhibitor II, *PIN2*, infolge einer Zuckerapplikation ansteigt, daher wurde die *PIN2*-Transkriptmenge als Induktionskontrolle gleichzeitig ermittelt.

Infolge der Sorbitolbehandlung zeigten die Tomatenblätter nach 24 Stunden erste Anzeichen von Welkeerscheinungen (eingerollte Blätter, Blätter nicht mehr voll turgeszent). Die zeitliche Transkriptakkumulation der *RNaseLER* im Vergleich zur Expression des *PIN2* ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt.



Abbildung 21: Vergleich der Transkriptmengen des *RNaseLER*-und des *PIN2*-Gens infolge von osmotischen Stress in *S. lycopersicum cv.* Moneymaker.

Eine gesteigerte Expression des *RNaseLER*-Gens durch die Sorbitolapplikation konnte innerhalb von 24 Stunden nicht nachgewiesen werden. Die Induktionskontrolle *PIN*2 zeigte, bezogen auf die Ausgangsexpression (Zeitpunkt 0 h) bereits nach sechs Stunden ein erhöhtes Expressionsniveau (36,9-fach). Diese Expressionsrate stieg innerhalb der nächsten sechs Stunden (12 Stunden nach Applikation) um das 70,8-fache an und sank nach 24 Stunden auf eine 2,88-fache Expression.

#### 3.2.3.2 Einfluss von Phosphatlimitierung auf das RNaseLER-Expressionsmuster.

Taylor *et al.* (1993) postulierten für die homologe RNase RNS2 aus *A. thaliana*, ebenfalls eine S-*like* RNase der Klasse 2, eine gesteigerte Expression infolge von Phosphatmangel. Auch für die paralogen RNasen RNaseLE und RNaseLX konnten gesteigerte Expressionen

Es wurden Fiederblätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen verwendet, die 24 h auf einer Sorbitollösung (300 mM) in geschlossenen Petrischalen inkubiert wurden. Kontrollblätter (*mock*) wurden auf sterilem Leitungswasser inkubiert. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten (0; 6; 12 und 24h) wurden jeweils 3 Blätter zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

und Aktivitäten infolge von Phosphatmangel gezeigt werden (Nurnberger *et al.*, 1990; Kock *et al.*, 1995 und Loffler *et al.*, 1992, 1993). Ausgehend von dieser Information war es von Interesse herauszufinden, ob das Expressionsmuster der *RNaseLER* durch Pi-Mangel beeinflusst werden kann. Die Expressionsanalysen wurden mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Kultivierung der Tomatenzellen erfolgte, wie unter Kapitel 2.1.6.7 beschrieben, ausgehend von einer Normalkultur (unter Verbrauch des in der Nährlösung vorhandenen Phosphates) bei konstantem extrazellulären Phosphatgehalt (+Pi-Kultur, Zugabe von 2,5 mM Phosphat im 12 h Rhythmus) bzw. in Abwesenheit jeglicher organischer oder anorganischer Phosphatquellen im Medium ( Pi-Kultur). Das Expressionsmuster der *RNaseLER* verglichen. In Abbildung 22 ist die zeitliche Transkriptakkumulation der *RNaseLER* im Vergleich zur Expression der *RNaseLX* in Tomatenzellkulturen dargestellt.



Abbildung 22: Vergleich der Transkriptmengen des *RNaseLER*- und *RNaseLX*-Gens in Tomatenzellkulturen in Abhängigkeit von der Phosphatversorgung.

Zeitlicher Verlauf der Trankskriptakkumulation der RNase-Gene in Tomatenzellkulturen in Abhängigkeit der extrazellulären Phosphat(Pi)-Versorgung. Drei Tage alte Zellkulturen wurden für 24 h in Phosphat-freien (¬Pi) und Phosphat-haltigem (+Pi, Zugabe von 2,5 mM Phosphat im 12 Stunden Rhythmus) Medium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0; 12 und 24h) wurden Proben entnommen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier biologischer Replikate, von denen je zwei technische Replikate ermittelt wurden.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass unter Pi-Mangelstress der Transkriptspiegel der *RNaseLER* transient nach 12 Stunden 3,4-fach anstieg. Dieses Expressionsniveau reduzierte sich jedoch nach weiteren 12 Stunden auf eine 1,8-fach erhöhte Expression. Die Induktionskontrolle *RNaseLX* hingegen zeigte nach 12 Stunden Phosphatmangelstress eine deutlich gesteigerte Transkriptakkumulation (70-fach), die nach weiteren 12 Stunden 402-fach verstärkt wurde.

## 3.2.3.3 Einfluss der Phytohormonapplikation auf die Expression des RNaseLER.

Phytohormone spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der verschiedensten Prozesse in Pflanzen. Um herauszufinden, ob Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA) und Ethylen einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von *RNaseLER* haben, wurden Tomatenblätter diesen Substanzen ausgesetzt und das folgende Expressionsprofil untersucht.

# Abscisinsäure (ABA)

Die in Kapitel 3.1.7.1 beschriebene spezifische Promotoraktivität des *RNaseLER*-Gens in den Stomata führte zu Überlegungen, ob die RNase an der Reaktion auf osmotischen Stress beteiligt ist und möglicherweise die *RNaseLER*-Expression durch ABA beeinflusst wird.

Daher wurden abgeschnittene Fiederblätter von *S. lycopersicum cv.* Lukullus auf einer ABA-Lösung, Kontrollblätter auf sterilem Leitungswasser (*mock*-Behandlung) inkubiert und nach 0 bis 24 h Inkubationszeit geerntet (Kapitel 2.1.6.6). In qRT-PCR-Experimenten wurde der Einfluss von ABA auf die *RNaseLER*-Regulation untersucht. Zur Induktionskontrolle wurde das Wund-induzierbare *PIN*2-Gen verwendet, für den eine ABA-Responsivität beschrieben ist (Pena-Cortes *et al.*, 1995). In Abbildung 23 sind die Transkriptlevel infolge der ABA-Applikation schematisch dargestellt.



# Abbildung 23: Vergleich der Transkriptmenge des *RNaseLER*-Gens und des *PIN2*-Kontrollgens nach ABA-Applikation.

Es wurden Blätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen verwendet, die in geschlossenen Petrischalen für 24 h auf einer ABA-Lösung (100 $\mu$ M) inkubiert wurden. Als Kontrolle (*mock*) wurden Blätter auf sterilem Leitungswasser inkubiert. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 3 Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6; 12; 24 h) zu einer Probe vereint, RNA isoliert und in der qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Für das *RNaseLER*-Gen konnte während des untersuchten Zeitraums keine differenzielle Genexpression nachgewiesen werden. Die Induktionskontrolle *PIN*2 zeigte sechs Stunden nach der Behandlung eine deutlich erhöhte Expressionsrate (4,1-fach), die innerhalb der nächsten 18 Stunden weiter auf das 6,9-fache anstieg.

#### **Ethephon (2-Chlorethylphosphonsäure)**

In den Blättern und Petalen von *A. thaliana* führt Seneszenz zu einer gesteigerten Expression des vermutlichen Orthologs *RNS2* (Taylor *et al.*, 1993), was die Frage auf warf, ob die RNaseLER ebenfalls in Seneszenzprozesse involviert sein könnte.

Die Seneszenz in Tomatenpflanzen wurde durch Ethephon, einem Analogon, das nach Hydrolyse Ethylen freisetzt, ausgelöst. Tomatenpflanzen cv. Lukullus wurden mit Ethephon besprüht (Kapitel 2.1.6.6) und der Einfluss auf die *RNaseLER*-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Kontrollpflanzen wurden zur Scheinbehandlung (*mock*-Behandlung) mit Leitungswasser besprüht.

Bereits drei Stunden nach Ethephongabe zeigten die Pflanzen Anzeichen für Epinastie (einrollen bzw. Krümmung von Blättern nach unten).

Das Enzym ACC-Oxidase (ACO) katalysiert den letzten Schritt in der Ethylen-Biosynthese und ist in den meisten vegetativen Geweben konstitutiv vorhanden. In einigen Fällen wird allerdings auch die ACO unter dem Einfluss von Ethylen verstärkt gebildet (positive *feeback* Regulation). Dieser Effekt wurde in diesem Experiment genutzt und das *ACO*-Gen als Induktionskontrolle verwendet. Die Expressionsprofile der *RNaseLER* und *ACO* sind in Abbildung 24 dargestellt.



Abbildung 24: Vergleich der Transkriptmenge des *RNaseLER*-Gens und des *ACO*-Kontrollgens nach Ethephon-Applikation.

Fünf Wochen alte, auf Erde angezogene Tomatenpflanzen wurden mit einer Ethephon-Lösung (20mM) flächendeckend besprüht und für 24 h im Gewächshaus inkubiert. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit Leitungswasser besprüht. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 3 Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6; 12; 24 h) zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Bereits sechs Stunden nach der Applikation von Ethephon war eine deutliche Induktion der Kontrolltranskriptexpression zu erkennen, während *RNaseLER* eine schwache Änderung seines Expressionsniveaus erfahren hat, die zur 3,5-fachen Verringerung der Transkriptmenge führte (Abbildung 24). Die Reduktion der *RNaseLER*-Transkriptmenge blieb im untersuchten Zeitraum erhalten. Aufgrund der ansteigenden Standardabweichung zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden wurde die Reduktion als nicht eindeutig eingestuft.

#### 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC)

Die 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) ist ein wichtiges Zwischenprodukt in der Ethylenbiosynthese. Ihre Applikation führt zur Bildung des Phytohormons Ethylen und zur Transkriptakkumulation Ethylen-responsiver Gene in der Pflanze (Pieterse *et al.*, 1998).

Junge Tomatenblätter wurden auf einer ACC-Lösung und auf sterilem Leitungswasser (*mock*-Behandlung) inkubiert (Kapitel 2.1.6.6). Als Kontrolle für die Induktion wurde in der qRT-PCR das Transkript der *ACO*, einem typischen Ethylen-induzierbaren Gen, zusätzlich zum *RNaseLER*-Transkript analysiert.

Die Transkriptmengen des *RNaseLER* und des *ACO* wurden parallel in den qRT-PCR-Experimenten ermittelt und sind in Abbildung 25 dargestellt.



Abbildung 25: Vergleich der Transkriptmenge des *RNaseLER*-Gens und des *ACO*-Kontrollgens nach ACC-Applikation mittels qRT-PCR-Analyse.

Es wurden Blätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen verwendet, die in geschlossenen Petrischalen für 24 h auf einer ACC-Lösung (50 $\mu$ M) inkubiert wurden, als Kontrolle wurden Blätter auf sterilem Wasser inkubiert. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 3 Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3; 6; 24 h) zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Die Induktionskontrolle ACO weist, wie vermutet, einen Transkriptanstieg nach drei bis sechs Stunden auf (110-facher Anstieg nach 6 h). Nach 24 h sank das Expressionslevel und zeigt, bezogen auf die Ausgangsexpression (Zeitpunkt 0 h), noch eine 6,2-fach gesteigerte Expression. Für *RNaseLER* konnte nach **ACC-Inkubation** bezogen auf die Ausgangsexpression (Zeitpunkt 0 h) wie in den Ethephon-Experimenten, eine transiente Reduktion der Expressionsstärke beobachtet werden. Die Kinetik dieser transkriptionellen Regulation zeigt nach drei Stunden eine Reduktion der Expression um den Faktor 5,7, die mehrere Stunden lang anhielt. In den nächsten drei Stunden nahm die Expressionsrate weiter ab (Reduktion um den Faktor 12.8). Nach 24 h war das Transkriptlevel wieder auf dem Stand wie vor dem Stressstimulus (Zeitpunkt 0). Aufgrund der hohen Standardabweichung wurde die Reduktion drei Stunden nach der Applikation als nicht eindeutig betrachtet.

## 3.2.3.4 Expressionsanalysen des RNaseLER-Gens nach Pathogenbefall.

Pflanzen besitzen die Fähigkeit über spezifische Geninduktion aktiv Maßnahmen gegen Pathogenbefall einzuleiten. Diese induzierten Abwehrreaktionen gegenüber dem Pathogen setzt eine Aktivierung der entsprechenden Gene auf Transkriptionsebene voraus und korreliert mit stark erhöhten Genexpressionsmustern sogenannter PR-Proteine (pathogenesis related proteins) in der Wirtspflanze (Lawton und Lamb, 1987; Staskawicz et al., 1995). Diese akkumulieren nach Pathogeninfektion zum Teil in großen Mengen, wie zum Beispiel das PR1a-Protein in Tomatenpflanzen (Hauck et al., 2003). Daher wurde das PR1-Transkript als Kontrolle für die Induktion eingesetzt. Literaturdaten belegen einen Anstieg der RNase-Aktivitäten in Pflanzen nach Pathogenbefall (Galiana et al., 1997, Hayashi et al., 2003 NGR3; Hugot et al., 2002 RNaseNE). Ob RNaseLER eine Funktion in der Pathogenabwehr besitzt, wurde untersucht, indem ihr Expressionsmuster infolge einer Pathogeninfektion analysiert wurde. Für die Analyse der Expression des RNaseLER-Gens nach eine Pathogeninfektion wurden Wildtyppflanzen mit pathogenen und nicht-pathogenen Pseudomonas-Bakterien (Kapitel 2.1.6.3) sowie in einem zweiten Ansatz mit Phytophthora infestans Sporen (Kapitel 2.1.6.4) inokuliert. Zur Kontrolle wurden nichtinokulierte Blätter der Pseudomonasbehandelten Pflanzen entsprechend mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (mock-Behandlung) inokuliert und Kontrollblätter der Phytophthora-Behandlung mit sterilem Leitungswasser (mock-Behandlung) betropft.

# Einfluss der Inokulation nicht-pathogener und pathogener *Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pto*) auf die Expression des *RNaseLER*-Gens.

Das gram-negative Bakterium *Pseudomons syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pto*DC3000) ist der Verursacher der "bakteriellen Fleckenkrankheit", eine weltweite, wirtschaftlich bedeutende Krankheit (Cuppels, D. A. 1986). Bei einer kompatiblen Interaktion, d.h. die Wirtspflanze ist anfällig für das Pathogen, kann sich das Pathogen in den Interzellularräumen des pflanzlichen Gewebes vermehren, wobei es zur Ausbildung von Krankheitssymptomen kommt. Während einer inkompatiblen Interaktion wird das Bakterium durch die Wirtspflanze erkannt und das bakterielle Wachstum oft durch eine hypersensitive Reaktion (HR), dem programmierten Zelltod am Ort der Infektion, inhibiert. An dieser Interaktion sind die bakteriellen *hrp / hrc*-Gene, die für das Proteinsekretionssystem kodieren, sowie bakterielle Elicitoren, die vom Pathogen in die Wirtszellen über dieses Proteinsekretionssystem übertragen werden, beteiligt.

Obwohl *Hrp*-Mutanten keine Elicitoren in die Wirtszelle übertragen können, kann es zu einer basalen Abwehrreaktion durch die Pflanzen kommen. Bei dieser Basalresistenz kommt es zur Erkennung mikrobieller Strukturen, sogenannte Mikroben-/Pathogen-assoziierter molekularer Muster (*microbe-/pathogen-associated molecular patterns*, MAMPs/PAMPs; Jones und Dangl, 2006). Seitens der Wirtspflanzen führt das zur Einlagerung von Kallose, Lignin und phenolischen Verbindungen in die pflanzliche Zellwand, zur Neubildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Sekundärmetaboliten wie Phytoalexine aber auch von PR-Proteinen, die in diese basale Abwehrreaktion involviert sind (Fritig *et al.*, 1998; Nurnberger und Lipka, 2005; He *et al.*, 2007).

Im Folgenden sollte mittels qRT-PCR das Verhalten des *RNaseLER*-Transkripts nach Infektion von *S. lycopersicum* cv. Moneymaker Wildtypblätter mit zwei verschiedenen *Pto*-Stämmen untersucht werden. Die verwendeten Stämme waren der pathogene Wildtypstamm *Pto* DC3000 sowie die nicht-pathogene *hrcC*-Mutante, *Pto* TLR 1 (Kapitel 2.1.6.3).



Abbildung 26: Einfluss der *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pto)-Inokulation auf die Expression von *RNaseLER* im Vergleich zu *PR1*.

Es wurden Blätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) mit einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml inokuliert. Kontrollpflanzen wurden mit einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltriert (*mock* - Behandlung). In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 3 Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3; 6; 24 h) zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Wie vermutet führte die Infektion der Tomatenblätter mit dem pathogenen *Pto* DC3000-Stamm bereits sechs Stunden nach der Applikation zu einer deutlichen Induktion der *PR1*-Kontrolltranskriptexpression. Wie aus der Abbildung 26 ersichtlich, ist auch eine verspätete Induktion der *PR1*-Expression 24 Stunden nach der Infektion mit dem nicht-pathogenen *Pto* TLR1 Stamm zu erkennen. Jedoch führte Infiltration mit dem pathogenen Stamm *Pto* DC3000 im untersuchten Zeitraum zu keinem differenziellen *RNaseLER*-Expressionsmuster (Abbildung 26). Die Infektion von Tomatenblättern mit dem nicht-pathogenen *Pseudomonas*-Stamm TLR1 führt zu einer schwachen transienten Reduktion der *RNaseLER* Transkriptmenge, die nach sechs Stunden (2-fach) ihr Maximum erreicht. Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist diese Reduktion allerdings nicht eindeutig, woraus sich schließen lässt, dass die RNaseLER nicht an basalen Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt ist.

#### Einfluss der Infektion mit Phytophthora infestans auf die Expression des RNaseLER.

Da der Oomyzet *Phytophthora infestans* der Erreger der Kraut- und Braunfäule an Tomaten ist, wurde neben dem *Brassica*-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* auch eine Sporensuspension dieses Oomyzeten verwendet, um eine mögliche differenzielle Expression der *RNaseLER* durch Pathogene zu untersuchen. Dazu wurde auf die Unterseite von Tomatenblättern eine Sporensuspension von *P. infestans* (Sporendichte von 5 x  $10^5$ /ml) bzw. H<sub>2</sub>O (*mock*-Behandlung) aufgetropft (Kapitel 2.1.6.4) und die Transkriptmengen des *RNaseLER*- und des *PR1*-Gens in qRT-PCR-Experimenten parallel ermittelt (Abbildung 27).



Abbildung 27: Einfluss der *Phytophthora infestans*-Infektion auf die Expression von *RNaseLER* im Vergleich zu *PR1*.

Es wurden Blätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) mit einer Sporendichte von 5 x  $10^5$  Sporen pro ml inokuliert. Kontrollpflanzen wurden mit H<sub>2</sub>O betropft (*mock*-Behandlung). In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 3 Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1; 2; 4, 5 Tage) zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

#### **ERGEBNISSE**

Die qRT-PCR-Analysen (Abbildung 27) zeigten, dass die *PR1*-Expression bereits 24 h nach der *P. infestans*-Behandlung deutlich induziert wurde. Für das *RNaseLER*-Transkript kann nach *P. infestans*-Behandlung bezogen auf die Ausgangsexpression (Zeitpunkt 0 h) eine transienten Reduktion der Expressionsstärke beobachtet werden. Die Kinetik dieser transkriptionellen Regulation zeigt nach 24 h eine 1,3-fache und nach 48 h eine 2,8-fache Reduktion der Expression im Vergleich zur Expression zum Zeitpunkt 0. Am vierten Tag führt die *P. infestans*-Infektion bezogen auf die Ausgangsexpression (Zeitpunkt 0 h) zu einer 2-fachen Induktion der *RNaseLER*-Expression, die am Tag fünf weiter auf das 2,2-fache ansteigt. Daraus resultiert also eine, durch die *P. infestans*-Infektion ausgelöste Negativ-Regulation der *RNaseLER*-Expression. Auch hier ist die Reduktion aufgrund der hohen Standardabweichung nicht eindeutig.

#### 3.2.3.5 Effekte von Verwundungen auf die Transkriptmenge von RNaseLER.

Verwundung führt in vielzelligen Eukaryoten zu deutlichen Veränderungen der Expression von Genen, die zur pflanzlichen Abwehrreaktion und Reparatur beitragen. So wurde berichtet, dass T2-Typ-RNasen, wie NGR1, RNaseLE und RNS1 durch eine mechanische Verwundung in Pflanzen induziert wurden (Kariu et al., 1998; Lers et al., 1998; LeBrasseur et al., 2002, Gross et al., 2004). Beide Gene weisen Homologie zu der hier untersuchten RNaseLER auf. Um zu untersuchen, ob eine solche Behandlung auch eine differenzielle Expression des RNaseLER-Gens bewirkt, wurden Blätter verwundet (Kapitel 2.1.6.5) die und Transkriptakkumulation der RNaseLER zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Das verwundete und unverwundete (mock-Behandlung) Pflanzenmaterial wurde 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Verwundung geerntet. Als Induktionskontrolle wurde das Transkript des PIN2, für den eine Wundresponsivität beschrieben ist (Sanchez-Serrano et al., 1986), verwendet.



Abbildung 28: Vergleich der Transkriptmengen des *RNaseLER*- und des *PIN*2-Gens nach Verletzung in *S. lycopersicum* durch qRT-PCR-Analyse.

Es wurden Blätter fünf Wochen alter, auf Erde angezogener Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum* cv. Lukullus) verwendet, die mit einem Markierrädchen großflächig über die Blattfläche geritzt wurden. Die verwundeten Blätter und nicht verwundeten Kontrollblätter wurden in einer Petrischale auf sterilem Wasser inkubiert. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0; 3; 6 und 24h) wurden jeweils 3 Blätter zu einer Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, konnte zu den untersuchten Zeitpunkten keine deutliche Veränderung der *RNaseLER*-Transkriptmenge infolge der Verwundung festgestellt werden. Die qRT-PCR mit der Induktionskontrolle *PIN2* zeigte für dieses Gen eine Wund-induzierte Akkumulation der mRNA, die nach 3 Stunden am höchsten ist und sukzessive innerhalb von 24 Stunden abnimmt. Dies zeigt, dass *RNaseLER* auf transkriptioneller Ebene durch Verwundung nicht beeinflusst wird.

# 3.3 Rekombinante Expression der RNaseLER

Es konnte gezeigt werden, dass die *RNaseLER* eine konstitutive Expression zeigt (Kapitel 3.2) und eine spezifische Promotoraktivität in Schließzellen und Trichomen aufweist (Kapitel 3.1.7.1). In dem nachfolgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob es sich bei der RNaseLER um ein aktives Enzym handelt, welche Auswirkungen eine vermehrte Expression, Transkription und Proteinsynthese auf den pflanzlichen Phänotyp haben sowie die biochemischen Eigenschaften der RNaseLER bestimmt werden.

Zunächst wurde versucht die RNaseLER-Aktivität mittels *In-Gel-Assay* in Epidermis (Stomata), Trichomen und Blüten, im Zellkulturmedium und einer Tomatenzellkultur

nachzuweisen. In keinen der verwendeten Extrakte konnte eine spezifische Aktivitätsbande der RNaseLER zugeordnet werden. Es ist möglich, dass aufgrund einer geringen Abundanz des Vorkommens der RNaseLER in *S. lycopersicum* die RNaseLER-Aktivität außerhalb des Detektionsbereiches liegt. Somit war auch eine direkte Isolierung des reifen RNaseLER-Proteins aus Pflanzen nicht möglich. Deshalb sollte ein rekombinantes Protein aus transgenen Pflanzen isoliert werden. Es wurde ein pflanzliches Expressionssystem ausgewählt, da während der Sequenzanalysen der RNaseLER eine spaltbare N-terminale Signalsequenz für den kotranslationalen Transport in das ER vorhergesagt wurde, für dessen korrekte Spaltung ein artverwandtes System am besten geeignet ist. Desweiteren ermöglicht es eventuelle Glycosylierungen oder andere pflanzenspezifische Modifikationen.

#### Klonierung des His-getaggten RNaseLER-Proteins

Der Nachweis des RNaseLER-Proteins und die Isolierungsstrategie basiert darauf, das RNaseLER-Protein mit sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Kodonen, einem sogenannten 6 x *His-tag*, zu versehen. Dadurch ist eine Detektion des Fusionsproteins mit einem Antikörper gegen diesen Histidin-Tag sowie eine Isolation und Affinitätsaufreinigung des RNaseLER-Fusionsproteins über eine Cobaltsäule möglich. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Kapitel 2.2.6.3 beschrieben. Abbildung 29 zeigt eine schematische Darstellung des *RNaseLER::His* Fusionskonstruktes.



Abbildung 29: Schematische Darstellung des *RNaseLER::His*-Konstrukts (Vektor pCPLERHis). Das *RNaseLER::His*-Konstrukt wurde in den Vektor pCP60 eingebracht. Das Stoppkodon der *RNaseLER*-cDNA wurde überschrieben, so dass die Proteintranslation erst mit eingefügten Stoppkodon hinter dem His-*Tag* endet. CaMV-35S: Promotor des *Cauliflower-Mosaikvirus*; **RNaseLER**: kodierte Sequenz der *RNaseLER* ohne Stoppkodon; *6 x His*: 6 aufeinanderfolgende Nukleotidsequenzen, die für die As Histidin (His) kodieren; pAnos: Nopalin-Synthase-Polyadenylierungssignal, türkise Box: spaltbares ER-Signalpeptid

Mittels der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation wurde das *RNaseLER::His* Fusionskonstrukt, stabil in Wildtyp *N. benthamiana*-Pflanzen eingebracht (Kapitel 2.1.6.2, Stabile Pflanzentransformation). Aus dieser Transformation gingen 25 auf Kanamycin selektierte potentiell transgene Pflanzen (T<sub>0</sub>-Pflanzen) hervor, die durch genomische PCR-Analysen, mit denen die Integration des *RNaseLER::His*-Konstruktes nachgewiesen werden sollte, getestet

#### **ERGEBNISSE**

wurden. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem *CaMV-35S*-Promotor-spezifischen sense Oligonukleotid und einem His-*Tag* spezifischen antisense Oligonukleotid (Oligonukleotid 40 und 36, Tabelle 4) durchgeführt. Da in diesen PCR-Analysen das Konstrukt in den transgenen Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere PCR-Strategie mit dem Oligonukleotidpaar 35/36 (Tabelle 4), welches spezifisch für das RNaseLER::His-Konstrukt ist bzw. mit dem Oligonukleotidpaar 40/41 (Tabelle 4), welches spezifisch für die *CaMV-35S*-Promotorsequenz ist, durchgeführt. In 23 der 25 getesteten Pflanzen konnte ein 780 bp langes Amplikon, das dem *RNaseLER::His*-Konstrukt entspricht, nachgewiesen werden. Ein PCR-Fragment, welches dem *CaMV-35S*-Promotor entspricht, konnte nicht amplifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde in der PCR das Plasmid pBI1LERHis, welches zur Transformation der *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet wurde, eingesetzt. In diesem Kontrollansatz konnten beide Fragmente amplifiziert werden. Ein Auszug der Analyseergebnisse ist in Abbildung 30 dargestellt.



Abbildung 30: PCR zum Nachweis der Integration des RNaseLER::His-Konstruktes.

Aus RNaseLER::His transgenen T<sub>0</sub>-*N. benthamiana* Pflanzen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit des *CaMV35S RNaseLER::His* T-DNA-Inserts analysiert.

A: Oligonukleotidkombination BamHI\_LER/His\_TAG\_SacI,

B: Oligonukleotidkombination HindIII\_CaMV/CaMV\_XbaI,

**WT:** Negativkontrolle nicht transformierte *N. benthamiana*, **P:** Positivkontrolle Plasmid pB11LER::His, **H:** H<sub>2</sub>0-Kontrolle **M:** 1 kb Gene Ruler DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

Da der *CaMV-35S*-Promotor nicht nachgewiesen werden konnte und somit eine Expression des *RNaseLER::His* nicht möglich ist, wurden die transgenen Pflanzen verworfen. Als Ausgleich sollte die transiente *Agrobacterium*-vermittelte Transformation die Expression der *RNaseLER::His* ermöglichen. Dazu wurde das *RNaseLER::His*-Konstrukt in den binären Pflanzenexpressionsvektor pCP60 unter die Kontrolle des *CaMV-35S*-Promotors umkloniert. Das erhaltene Plasmid, pCPLERHis (Tabelle 6), wurde in den *Agrobacterium*-Stamm GV3101 transformiert. Die erhaltenen Transformanten (GV3101pCPLERHis) wurden

anschließend mittels Restriktionsanalysen und *RNaseLER::His* spezifischer PCR auf das Vorhandensein und die richtige Orientierung des *LER::His*-Konstrukts überprüft.

#### Nachweis des RNaseLER::His Fusionsproteins mittels Western-Blot

Zum Nachweis des RNaseLER::His Fusionsproteins wurden Blätter fünf Wochen alter N. benthamiana Pflanzen, wie unter Kapitel 2.1.6.2 (Transiente Agrobacterium-vermittelte Transformation von *N. benthamiana*) beschrieben, mit zwei unabhängigen GV3101pCPLERHis GV3101pCPLERHis7.2 Klonen, und GV3101pCPLERHis9.1, infiltriert. Zur Kontrolle wurden mock-inokulierte Kontrollblätter (WT=Inokulation mit einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, P = Inokulation mit GV3101-Bakterien ohne Plasmid) verwendet. Drei Tage nach der Agrobacterium-vermittelten transienten Transformation wurden Blattproben von den Pflanzen entnommen.

Detaillierte Analysen der RNaseLX in Bezug auf subzelluläre Lokalisation und Funktion in vivo hatten gezeigt, dass diese RNase im ER lokalisiert ist und ins Zytoplasma von Zellen, die einer Autolyse unterliegen, freigegeben wird (Kaletta et al., 1998; Lehmann et al., 2001). Auch die paraloge RNaseLE wird unter Phosphatmangelbedingungen in den extrazellulären Raum freigesetzt (Nurnberger et al 1990, Kock et al., 2004). Aufgrund dieser Berichte und der Tatsache, dass die RNaseLER ein N-terminales Signalpeptid für den sekretorischen Weg aufweist, konnte ein Transfer der reifen RNase in den Extrazellularraum des Blattgewebes nicht völlig ausgeschlossen werden. Daher wurden apoplastische Waschflüssigkeiten (AWF) aus *mock*- und GV3101pCPLER-infiltrierten und Gesamtblattextrakte (GBE) N. *benthamiana*-Blättern gewonnen (Kapitel 2.3.1). In den GPE konnten nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben in einer SDS-PAGE keine Unterschiede im Bandenmuster der mock- und GV3101pCPLER-infiltrierten N. benthamiana-Blättern beobachtet werden (Abbildung 31A). Der Vergleich der Bandenmuster der AWF von mockinfiltrierten mit den GV3101pCPLERHis-infiltrierten Blättern zeigte dagegen einige deutliche Unterschiede im Molekulargewichtsbereich von 36 bis 27 kDa (Abbildung 31A, gelbe Pfeile). Um die Banden der His-getaggten RNaseLER zuzuordnen, wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinextrakte gleichmäßig auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Abbildung 32B). Der Nachweis der RNaseLER::His-Fusionsproteine erfolgte anschließend über einen anti-His-spezifischen monoklonalen Antikörper; als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase konjugierter Anti-Hase-IgG Antikörper verwendet. Wie aus der Abbildung 31B ersichtlich, konnten auch im Western-Blot dieselben Banden in der

95

ERGEBNISSE

Apoplastenfraktion detektiert werden, die sich im Bereich des ermittelten Molekulargewichts der RNaseLERHis (28, 2 kDa) befinden. Die postulierte Proteingröße wurde anhand ihrer Aminosäuresequenzen mit Hilfe der Lasergene Software "DNA-Star" berechnet.

Für WT (nicht inokulierte *N. benthamiana*) und P (GV3101 ohne Plasmid inokulierte *N. benthamiana*) wurden keine Signale detektiert.



Abbildung 31: Transiente Expression der RNaseLER::His in *N. benthamiana*. RNaseLER wurde als N-terminale Fusion an ein 6x His-*tag* transient *Agrobacterium*-vermittelt in *N. benthamiana* exprimiert. Proteinmuster einer elektrophoretischen Auftrennung von je 20 µl Apoplasten(AWF)- und Gesamtblattextrakten von *mock*-inokulierten Kontrollblättern (WT, P) und GV3101pCPLERHis-inokulierten Blättern (GBE) im SDS-PAGE (15 % Gel). Die Fraktionen wurden mittels Immunoblot unter Verwendung von anti-His-Antikörpern analysiert. Die Extrakte wurden drei Tage nach Inokulation gewonnen. Die Pfeile zeigen Proteinbanden, die sich in der AWF von mock- und GV3101pCPLERHis -inokulierten Pflanzen unterscheiden. Die Molekulargewichte (MW) des Proteinstandards sind neben dem Gelbild angegeben. **7.2:** GV3101pCPLERHis7.2, **9.1:** GV3101pCPLERHis9.1, **WT:** nicht inokulierte *N. benthamiana*, Negativkontrolle; **P:** GV3101 ohne Plasmid, **K:** Positivkontrolle GFP als Nterminale Fusion an ein 6x His-*tag*, **M:** Prestained Protein Molecular Weight Marker.

Da eine Aufreinigung und Anreicherung der rekombinanten RNaseLER aus beiden Fraktionen mittels Affinitätschromatographie an einer Cobaltsäule (Kapitel 2.3.2) nicht erfolgreich war, sollte versucht werden, die Proteine der detektierten Banden durch eine Nterminale Protein-Sequenzierung der RNaseLER zuzuordnen. Dazu wurden die beiden Banden (Abbildung 32A, gelbe Pfeile) mit einem Skalpell aus dem PAA-Gel ausgeschnitten. Nach einem tryptischen Verdau wurden die Banden in der Massenspektroskopie N-terminal ansequenziert. Die massenspektroskopischen Arbeiten wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Schierhorn durchgeführt (Max Plank Forschungsstelle für Enzymologie und Proteinfaltung). Die Auswertung der Daten ergab, dass es sich bei den detektierten Banden nicht um die RNaseLER handelte.

Die Konstrukte liegen im Labor zur weiteren Analyse vor.
## 4 Diskussion

Der molekularen Wirkung von T2-Typ-RNasen auf die Stressbewältigung und Entwicklungsprozesse höherer Pflanzen gilt seit vielen Jahren ein besonderes Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Struktur der Ribonuklease RNaseLER aufgeklärt, gewebespezifische und subzelluläre Expressionsstudien und Untersuchungen zur biologischen (physiologischen) Funktion der RNaseLER durchgeführt.

Es ist gelungen die RNaseLER in die Klasse 2 der T2-Typ-RNase Familie einzugliedern und erste physiologische Charakteristika zu ermitteln.

Sequenzvergleiche mit den RNasenLE und RNaseLX führten zu der Identifikation einer Sequenz, die nicht den RNasen LE und LX zuzuordnen war, jedoch Homologien zu T2-Typ-RNasen aufwies. In der aus der RNaseLER-CDS abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich für T2-Typ-RNasen charakteristische Motive. Allen T2-Typ RNasen sind zwei konservierte Disulfidbrücken gemein, die für den Erhalt der aktiven Konformation essentiell sind (Irie, 1999). Hervorheben kann man die Konservierung zweier in RNasen der T2-Typ-Familie Bereiche, CAS I (F(T/G/S)IHGLWP) und CAS II (FW(S/E/G/T)HEWE(K/R)HG(T/I/M)C (*conserved active-site segment*; Kawata *et al.*, 1990; Kurihara *et al.*, 1992), die das aktive Zentrum bilden. Auch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der RNaseLER treten diese Domänen mit einem AS-Austausch an der Position 84 von der hydrophoben AS Prolin zur hydrophilen AS Threonin auf. Dieser AS-Austausch tritt auch in der nomologen RNaseNGR2 auf. Inwiefern dieser Austausch eine Wirkung auf die Aktivität der RNase hat, ist derzeit ungeklärt und sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

### 4.1 RNaseLER ist ein Mitglied der Klasse 2 der T2-Typ-RNase Familie

Die 5'-stromaufwärts Region von 908 bp beinhaltet den Promotor, daran schließt sich die kodierende Region mit 6 Exons und 5 Introns an, gefolgt vom 3'-untranslatierten Bereich mit 283 bp. Das Gen hat also eine Größe von 5591 bp und kodiert für 260 Aminosäuren, die denen anderer T2-Typ-RNase-Proteinen sehr ähnlich sind (siehe Anhang C; EMBL-Datenbank Acc.Nr. #AM408589).

Der putative Transkriptionsstartpunkt, der 56 bp stromaufwärts des ATG's identifiziert werden konnte, ist ein von Pyrimidinbasen umgebenes Adenin. Die von Joshi (1987a) veröffentlichte Studie mit 79 publizierten genomischen DNA-Sequenzen höherer Pflanzen zeigte, dass bei 85 % der pflanzlichen Promotoren ein von Pyrimidinbasen flankiertes Adenin die Transkriptionsinitiationsstelle ist. Als Translationsstart wurde das erste ATG der RNaseLER-cDNA bestimmt. Bei der Mehrzahl der Pflanzengene dient das erste AUG-Kodon auf der mRNA als Translationsinitiationsstelle (Joshi, 1997). Die Analysen zur Identifikation des 3'-terminalen Transkriptionsendes zeigten die Termination der Transkription 306 bp stromabwärts des Stoppkodons. Ein der klassischen Konsensus-Sequenz AATAAA (Proudfoot und Browlee, 1976) ähnlicher Bereich konnte in der Terminationsregion von RNaseLER nicht nachgewiesen werden. Das stimmt mit Beobachtungen überein, die von Hunt (1994; 1988) an Pflanzengenen gemacht wurden, bei denen weniger als 50 % der pflanzlichen mRNA's eine AATAAA-Sequenz in der Nähe ihrer polyA-Stelle aufweisen. Joshi (1987b) beschrieb bei 46 publizierten genomischen DNA-Sequenzen höherer Pflanzen eine Vielzahl verschiedener AATAAA-ähnlicher Konsensus-Sequenzen (A/GAUG(G)AAA) als Polyadenylierungssignale. Ein Polyadenylierungssignal (AAGTAAA) mit Ähnlichkeit zu dieser Konsensussequenz liegt bei der RNaseLER an Position 1080-1086 im Abstand von 240 bp zum Stoppkodon.

Ein phylogenetischer Vergleich der *RNaseLER* mit anderen T2-Typ-RNase-Genen gab Aufschluss über die Zugehörigkeit der RNaseLER in die T2-Typ-RNase-Familie (Abbildung 32). Pflanzliche T2-Typ-RNasen wurden in drei Klassen entsprechend ihrer Exon/Inton-Struktur eingeteilt (Igic und Kohn, 2001). RNasen, die zwei bis drei Introns mit hochkonservierten Positionen aufweisen, bilden die Klasse 1. RNasen mit mehr als drei konservierten Intronpositionen die Klasse 2. Die dritte Klasse bilden die S-RNasen, die in Bezug auf die Position nur ein stark konserviertes Intron besitzen.

Im Vergleich mit Genen der Klasse 2 T2-Typ-RNasen besitzt *RNaseLER* diese Charakteristika auch und kann ebenfalls als ein Mitglied der Klasse 2 T2-Typ-RNasen eingeordnet werden (Abbildung 32).

98



Abbildung 32: Phylogenetische Eingruppierung der RNaseLER in den Stammbaum ausgewählter pflanzlicher T2-Typ-RNasen.

Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Familie der pflanzlichen T2-Typ-RNasen. Die kodierende Sequenz der *RNaseLER* wurde zusammen mit den entsprechenden Sequenzen der anderen bekannten S-RNasen und S-*like* RNasen entsprechend ihrer Ähnlichkeiten zu einem phylogenetischen Stammbaum angeordnet. Phylogenetische und molekular-evolutionäre Analysen wurden mit Hilfe des MEGA4-Programms erstellt (Tamura *et al.*, 2007). Die Länge des Balkens stellt einen Sequenzunterschied von 10 % dar. Der Stammbaum basierend auf die Proteinsequenzen der

S-like RNasen:

S/RNaseLER, S/RNaseLE und S/RNaseLX aus S. lycopersicum (diese Arbeit, Jost et al., 1991; Loffler et al., 1993), NgRNaseNGR1, NgRNaseNGR2, NgRNaseNGR3 aus N. glutinosa (Kariu et al., 1998; Kurata et al., 2002), AhSL28 aus Antirrhinum hispanicum (Liang et al., 2002), CsCalsepRRP aus Calystegia sepium (Van Damme et al., 2000), AtRNS1, AtRNS2 und AtRNS3 aus A. thaliana (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994), Trichomaglin aus Trichosanthes lepiniate (Gan et al., 2004), ZeZRNaseI und ZeZRNaseII aus Zinnia elegans (Ye und Droste, 1996)

#### S-RNasen:

NaS2-RNase, NaS3-RNase und NaS6-RNase aus Nicotiana alata (Matton et al., 1995; Anderson et al., 1989), StS2-RNase aus Solanum tuberosum (Kaufmann et al., 1991), AhS2-RNase, AhS3-RNase und AhS5-RNase aus Antirrhinum hispanicum (Lai et al., 2002; Xue et al, 1996).

Eine Korrelation zwischen der Zahl der Exons bei der genomischen *RNaseLER*-Sequenz aus Tomate und der Zahl der Exons bei den publizierten Gensequenz der RNasen RNaseNGR2 aus *N. glutinosa* (Kurata *et al.*, 2002), AhSL28 aus *A. hispanicum* (Liang *et al.*, 2002) und RNS2 aus *A. thaliana* (Taylor *et al.*, 1993, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\_003071.7), die aus acht Exons und sieben Introns bzw. neun Exons und acht Introns zusammensetzt sind, besteht nicht. Beide RNasen wurden in die Klasse 2 eingruppiert. Jedoch korrelieren die relative Lage und Größe der ersten fünf Exons im Gen der *RNaseLER* mit den Exon/Intron-Strukturen dieser beiden Gene (Abbildung 33). Zum Beispiel unterbrechen Introns der *RNS2*-Gensequenz die kodierende Sequenz an korrespondierenden Positionen zur *RNaseLER*-Gensequenz (Abbildung 33).

Das erste Intron der RNaseLER beginnt, die kodierende Sequenz nach der 2. Base des Tripletts unterbrechend, in der AS Arg70 des Vorläufer-Proteins. Intron 2 unterbricht nach der 1. Base des Tripletts der AS His80. Auch das Intron 2 der RNase RNS2 unterbricht die kodierende Sequenz im Triplett, das für den katalytischen Rest His71 der CAS I-Domäne kodiert. Nach dem korrekten Spleißen des Intron 2 kodieren das Exon 2 und Exon3 zusammen für die konservierte CAS I-Domäne. Die Position des dritten Introns der RNaseLER entspricht dem konservierten Intron der pflanzlichen T2-Typ-RNasen. Es befindet sich an derselben Position, hinter der AS Glu104, wie das Intron 1 der S-RNasen (Klasse 3) und Intron 2 der Klasse 1 T2-Typ-RNasen. Das vierte Intron beginnt hinter der AS Trp140 und unterbricht die kodierende Sequenz zwischen dem Exon 4 und Exon 5, die zusammen für die zweite konservierte Domäne CAS II des Vorläufer-Proteins kodieren. In der RNS2 jedoch wird das CAS II-Motiv durch zwei Introns (Intron 4 und Intron 5) unterbrochen. Das Intron 4 der RNS2 unterbricht das CAS II-Motiv hinter der AS Glu129, die zum Glu140-Rest der RNaseLER korrespondiert. Das fünfte Intron der RNS2 unterbricht die CAS II-Sequenz im Glu131, wodurch ein Exon 5 von 4 Basenpaaren entsteht (Abbildung 33). Dieses Exon 5 tritt nur in der RNS2 und nicht in den anderen RNasen der Klasse 2 auf. Das fünfte Intron der RNaseLER unterbricht die kodierende Sequenz hinter der AS Thr170 des Vorläufer-Proteins, was der Position des Intron 6 der RNS2 entspricht.



#### Abbildung 33: Konservierte Intronpositionen der pflanzlichen T2-Typ-RNasen.

Dargestellt sind Aminosäuresequenzausschnitte der Klasse 2 Ribonukleasen RNaseLER aus *S. lycopersicum*, RNaseNGR2 aus *N. glutinosa*, RNS2 aus *A. thaliana*, AhSL28 aus *A. hispanicum*, der Klasse1 RNaseLE und RNaseLX aus *S. lycopersicum* und der Klasse 3 S2-RNase (*St*S2-RNase) aus *S. tuberosum*, S2-RNase (*Ah*S2-RNase) aus *A. hispanicum*. Schwarze Pfeile deuten die Intronpositionen an, Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren innerhalb der Sequenz an. Rot hinterlegt sind die katalytisch wichtigen Regionen CAS I und CAS II.

*RNaseLER* spiegelt somit den typischen Aufbau eines T2-Typ-RNase-Gens der Klasse 2 wieder. Wie andere T2-Typ-RNasen repräsentiert auch das *RNaseLER*-Gen eine *single copy* Sequenz im Tomatengenom, wie es durch Southern-Blot-Analysen gezeigt werden konnte. Das entspricht den Klasse 1 Paralogen *RNaseLE* und *RNaseLX*, die auch nur in je einer Kopie im Genom der Tomate nachzuweisen sind (Kock *et al.*, 1995; Stenzel, 1998, Dissertation).

Für die Klasse 2 Mitglieder ist es nicht nur bemerkenswert, dass die Introns, die die CAS-Strukturen unterbrechen, sich an konstanten Positionen relativ zur kodierenden Sequenz befinden, sondern auch das Auftreten von Peptideinschüben von vier Aminosäuren vor der CAS I-Domäne und fünf Aminosäuren vor der CAS II-Domäne. Diese Peptideinschübe sind auf die RNasen der Klasse 2 beschränkt und treten nicht bei Mitgliedern der Klasse 1oder Klasse 3 auf. Ob die Peptideinschübe tatsächlich eine Verstärkung der Substratbindung zur Folge haben, wie es von MacIntosh *et al.* (2010) vermutet wird, bleibt zu überprüfen. Bisher wurden die Exon/Intron-Struktur und die biologische Funktion für phylogenetische Studien verwendet. Zusätzlich könnten jetzt die Peptideinschübe und die festgestellte Verbindung der Intron-Positionen in den verschiedenen Spezies zusammen mit den vor kurzem erstellten evolutionären Daten tierischer T2-Typ-RNase-Proteine (Hillwig *et al.*, 2009) für die Erstellung phylogenetischer Daten und evolutionärer Analysen der pflanzlichen T2-Typ-RNasen verwendet werden.

Detaillierte phylogenetische Analysen mit einer Vielzahl an Pflanzenspezies führten MacIntosh *et al.* (2010) zu der Annahme, dass Klasse 2 T2-Typ-RNasen evolutionär frühe RNasen sind, da Vertreter dieser Klasse in allen bisher analysieren pflanzlichen Genomen, von Algen bis hin zu höheren Pflanzen, auftreten. MacIntosh *et al.* (2010) beziehen in dieser Arbeit auch das Expressionsmuster der T2-Typ-RNasen in die Untersuchungen ein. Die experimentellen und computergestützten Studien legen den Schluss nahe, dass Klasse 2 RNasen anzestrale Charakteristika aufweisen, da sie ubiquitär und zumeist konstitutiv exprimiert werden, aufgrund dessen ihnen eine *housekeeping*-Funktion zugesprochen wird. Dies unterscheidet sie von den Klasse 1 RNasen, die organspezifisch und unter Stressbedingungen verstärkt exprimiert werden. Hier wird angenommen, dass diese RNasen durch Genduplikationen entstanden sind und in Zuge der Spezialisierung neue spezifische physiologische Rollen übernommen haben.

Ähnliche phylogenetische Analysen führten Hillwig *et al.* (2009) mit tierischen T2-Typ-RNasen durch. Auch sie kommen zu dem Schluss, dass tierischeT2-Typ-RNasen konstitutiv exprimiert werden und eine *housekeeping*-Rolle über die gesamte Lebensdauer der Zellen haben und nicht ausschließlich unter Nährstoffmangelbedingungen.

### 4.2 Die Promotorregion des *RNaseLER*-Gens

Zur Isolierung der 5`-stromaufwärts Sequenz und zur Zuordnung eines putativen Promotors des *RNaseLER*-Gens wurden *Genome Walking*-Experimente durchgeführt. So konnten zusätzliche Sequenzinformationen von 908 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes ermittelt werden (Abbildung 34).

cgacggctcg ggctgatgac aaatctgtac tgattattgc aacatttgaa tcatatgtgg caacagatga 70 ccaatatatc actaaaatgt ggcaacgcac gttaaaatca tatcaacaaa atggccaaaa aaaagaacta 140 caacagcaac aaaaaataac ttttcactga atgataacat tacagataca tttcctcaaa ataaggattt 210 tttgagttgg ctgattttct ttcaaaaatg atagataata cacaccatta agtcgattgt tcagttttta 280 cacctaaaga acattttatt gttcattaat ctaagaaaag aacttcgaaa attgtaaagt atttcaaaaa 350 aatacttatt catttctggt ctaacacaat tacagaatag aaagatgaga gagtaataga ggactggaga 420 ggaagagtaa cgatggcaga tgaagagtaa cgacaaattc ccgaatttct aaggaaaaaag atgaagagaa 490 gaagagagag aagagaggag ggaagatgaa atatttttct ttttaaatga tttggttcga attataacag 560 tgtgcctttt tgtattttat taaaaattag aaaattttta aaatgttaat ttagtccata attaattaat 630 tatatttttt aaaaaaattt aaccagctct taattaatcc atcgtcaaaa ataaaaacga gatttatttg 700 acacctttgc ttaattttct caagttgcat tttatgcctc tactcatttt catttatttt tttcaaaaaat 770 aatccaaaac tgccgtgtcc taccagtctt cgtcttcttt cattattagt atttaataca gtttgacaat 840 

Abbildung 34: Sequenz des putativen Promotorbereiches von RNaseLER.

Dargestellt ist der Positivstrang des durch *Genome Walking*-Experimente isolierten 5`-stromabwärts des ATG gelegenen Sequenzbereiches.

Fettschwarz und unterstrichen: Translationsstartkodon, Rot: Transkriptionsstartpunkt, Grün: mögliche TATA-Box-Bereiche. Blau: putative CAAT-Box Bereiche.

Wie anhand der Sequenz in Abbildung 34 zu erkennen, konnten durch die *in silico*-Analyse verschiedene regulatorische Promotorelemente beobachtet werden. So ist ausgehend von Transkriptionsstart von -26 bis -33 ein Bereich zu erkennen, welcher eine putative TATA-Box darstellen könnte. TATA-Boxen liegen bei eukaryotischen Genen zumeist 25-30 bp vom Transkriptionsstart entfernt und besitzen eine Konsensussequenz von TATA(A/T)AA(G/A) (Smale und Kadonaga, 2003). Darüber hinaus wurden weiter stromaufwärts zwei zusätzliche TATA-Box ähnliche Sequenzen identifiziert, die jedoch außerhalb des Bereichs des Transtriptionsstarts liegen. An der Regulation der Transkription beteiligte CAAT-Boxen werden zumeist -50 bis -100 bp von Transkriptionsstart gefunden. Die drei hier vorhergesagten CAAT-Boxen liegen somit nicht im erforderlichen Bereich. Da die 5'-stromabwärts liegende Sequenz von *RNaseLER* deutliche Unterschiede zu Promotoren von Haushaltsgenen aufweist, z.B. durch die Anwesenheit einer TATA-Box in der exakten Position, die Abwesenheit einer CAAT-Box in der typischen Entfernung sowie dem niedrigen Anteil von GC-Basenpaaren, zeigt der putative *RNaseLER*-Promotor vielmehr Ähnlichkeit zu Promotoren regulierter Gene.

Um zu überprüfen, ob die Region stromaufwärts des Translationsstartpunktes tatsächlich Promotorfunktion besitzt, wurden 908 bp stromabwärts des *RNaseLER*-Gen in den  $\beta$ -Glucuronidasevektor pBI101 kloniert (Tabelle 6; pBIP367-3). Der Vektor wurde anschließend zur *Agrobacterium*-vermittelten stabilen Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet.

Da die GUS-Aktivität der transgenen P367:*uidA* T<sub>2</sub>-Linien gegenüber den  $\Delta 35S$ :*uidA*-Kontrollpflanzen, deutlich erhöht war (Abbildung 19), konnte davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt P367:*uidA* den *RNaseLER*-Promotor enthielt. Als nächstes wurden Versuche durchgeführt, die die ermittelte Promotorsequenz auf einen Minimalpromotor eingrenzen sollten. Dazu wurden zwei weitere transgene *N. benthamiana*-Linien, P134:*uidA* und P221:*uidA* erstellt, die verkürzte Promotorbereiche enthielten (Kapitel 3.1.7). Bei dem P134:*uidA*-Konstrukt handelt es sich um den Promotorbereich 750 bp stromaufwärts der Translationsstartpunktes.

Der Vergleich der GUS-Aktivitäten der *P134:uidA*-11-T<sub>2</sub>-Linien mit der Negativkontrolle zeigte deutlich höhere Werte als die Hintergrundwerte der Negativkontrolle (Abbildung 19). Ein Vergleich dieser Linien mit der Positivkontrolle, *35S:uidA*, ist nicht sinnvoll, da die GUS-Aktivität der *P134:uidA*- und *P367:uidA*-Konstrukte während der histochemischen Untersuchungen in den Blättern auf Stomata und Trichome begrenzt war (siehe unten, Abbildung 17). Die Positivkontrolle zeigte jedoch im gesamten Blatt eine GUS-Aktivität. Dies könnte auch erklären, warum die Promotoraktivität der *RNaseLER* niedriger als die des *CaMV-35S*-Promotors unter normalen Bedingungen war.

Aus der Abbildung 19 ist auch ersichtlich, dass die transgenen  $T_2$ -Linien untereinander schwankende Aktivitätswerte, wenn auch mit geringen Unterschieden, aufweisen. Eine Erklärung für diese Beobachtung sind mögliche unterschiedliche Integrationsorte der Promotor:GUS-Konstrukte. In einem euchromatischen Bereich der genomischen DNA ist eine höhere Expressionsrate der Konstrukte zu erwarten als in oder in der Nähe eines heterochromatischen Bereiches.

Funktionsanalysen mit transgenen  $T_2$ -Linien, die das Promotorkonstrukt P221:*uidA* (auf 200 bp verkürzter Promotorbereich) enthalten, zeigten keine GUS-Aktivität.

Auch wenn man davon ausgehen kann, dass die klonierte Länge der 5`-stromausfwärts Sequenz des *RNaseLER* nicht notwendigerweise die vollständige Promotorsequenz des *RNaseLER*-Promotors umfasst und somit mit der funktionellen Promotorregion übereinstimmt, kann man aus den oben genannten Ergebnissen schließen, dass:

- die durch *Genome Walking*-Experimente isolierte 908 bp lange 5'-stromaufwärts Sequenz des *RNaseLER*-Gens Promotoraktivität besitzt,
- die 750 bp lange Sequenz stromaufwärts des Translationsstartpunktes vergleichbare Aktivität wie das 908 bp Fragment aufweist,
- die 200 bp 5`-stromaufwärts Sequenz, die noch einen TATA-Box ähnlichen Bereich enthält, keine Promotoraktivität aufweist.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein "*Core*"-Promotor" nicht ausreicht und dass zusätzliche regulatorische Elemente an der Transkription des *RNaseLER*-Gens beteiligt sein müssen. Entsprechend den *in silico*-Analysen besitzt die in dieser Arbeit isolierte Promotorregion einige potentielle *cis*-regulatorische Elemente (Kapitel 3.1.6.1). Darunter wurden auch Elemente vorhergesagt, die an einer gewebespezifischen Expression sowie an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sind, die in Stressbewältigungsreaktionen wie Trockenheit, Verwundung, Pathogenbefall aber auch Seneszenz involviert sind.

Eine gewebespezifische Expression des RNaseLER wurde mittels histochemischer GUS-Aktivitätsanalysen mit transgenen T<sub>1</sub>-Linien, die das RNaseLER-Promotor-GUS-Fusionskonstrukt enthalten, untersucht. Die durch die RNaseLER-Promotoraktivität detektierte Blaufärbung in den unterschiedlichen pflanzlichen Geweben lässt eine Schluss auf die Genexpression des RNaseLER sowie eine damit zusammenhängende Akkumulation der zugehörigen mRNA zu. Die Untersuchungen zeigten deutlich eine RNaseLER-Promotorvermittelte  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in spezialisierten Zellen, wie Schließzellen und Trichomen transgener Tabakpflanzen (Abbildung 17). Dieses Expressionsprofil ist für die T2-Typ-RNase Genfamilie bisher einzigartig und wird durch die Vorhersage eines (T/A)AAAG-Elements in zweifacher Kopie in dem Promotorbereich -512 bis -568 bp unterstützt. Plesch et al. (2001) zeigten, dass die Expression der Schließzellen-spezifischen Gene StKST1 aus Kartoffel und AtKAT1 aus Arabidopsis (beide kodieren für Kalziumkanäle) aber auch anderer Schließzellen-spezifischer Gene von der Anwesenheit dieses Motivs abhängt (Mueller-Roeber et al., 1995; Nakamura et al., 1995). Das (T/A)AAAG-Element beinhaltet eine AAAG-Kernsequenz, die Prolamin-Box, die als DNA-Bindestelle für DOF-Proteine dient (DNA binding with one finger, Colot et al., 1987). DOF-Transkriptionsfaktoren gehören den Ein-Zink-Finger DNA-Bindeproteinen an, die nur in Pflanzen vorkommen (Yanagisawa und Schmidt, 1999). DOF-Proteine sind weiterhin an einer Vielzahl von signalvermittelter bzw. gewebespezifischer Genexpression beteiligt, wie z. B. die Expression photosynthetischer und samenspezifischer Gene sowie einer Pflanzen-okogenen und Pathogen-responsiven Genexpression (Yanagisawa und Schmidt 1999). Zusätzlich konnte eine *RNaseLER*-Promotor-spezifische GUS-Expression in Stängeln, Antheren, Sepalen sowie in einigen seltenen Fällen in den Wurzeln nachgewiesen werden. Die GUS-Aktivität in den Sepalen beschränkte sich ähnlich wie bei den Blättern auf Stomata und die Blattnerven. Längsschnitte der Stängel zeigten, dass die GUS-Expression ausschließlich im Parenchymgewebe nachweisbar ist. Diese gewebespezifische Expression der *RNaseLER* geht mit der großen Anzahl im 5'-Bereich des *RNaseLER*-Promotors vorhergesagten **GATA-Elementen** einher, für die eine Bedeutung der gewebespezifischen und lichtabhängigen Genregulation beschrieben ist (Gidoni *et al.*, 1989; Gilmartin *et al.*, 1990).

Innerhalb der 908 bp vor dem Translationsstart des *RNaseLER*-Gens konnten insgesamt sechs GATA-Elemente identifiziert werden, wobei sich in der Region um -609 bis -680 vor dem Translationsstart eine Gruppierung von vier dieser Promotor-Elemente befindet (Abbildung 15 und in Tabelle 15).

Neben den GATA-Elementen wurden weitere lichtabhängige *cis*-regulatorische Elemente in der *RNaseLER*-Promotorsequenz wie das **GT-1-Element** (Lam und Chua, 1990) gefunden. Sequenzen abschnitte mit Homologie zur Konsensus-Sequenz GRWAAW=GT-1-Element wurden in zwölffacher Ausführung über die gesamte Promotorsequenz verteilt gefunden. Millar und Kay (1996) zeigten, dass lichtabhängige Promotorelemente an der Ausprägung der circadianen Rhythmik beteiligt sein können. Dies und das Auffinden eines *circadian core*-**Elementes** (-158 (-)) im *RNaseLER*-Promotor, das als Auslöser der circadianen Regulation des *lhc*-Gens der Tomate identifiziert wurde (Piechulla *et al.*, 1998), gibt einen Hinweis auf eine mögliche licht- und tageszeitabhängige Regulation der *RNaseLER*-Expression. Umweltreize wie Lichtintensität, Konzentration von atmosphärischem Kohlendioxid und endogene pflanzliche Hormone steuern die Öffnung und Entwicklung der Stomata. Eine Beteiligung der RNaseLER an der lichtabhängigen Funktion und Entwicklung der Stomata wäre somit denkbar bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Die Erkennung *cis*-regulierender Elemente, wie *enhancer* und *silencer*, ist schwierig. Dies liegt zum einen daran, dass für diese Elemente keine bestimmte Position und auch Richtung festgelegt werden kann, zum anderen fehlen für die in den Vorhersageprogrammen

gesammelten Elemente zumeist genauere Untersuchungen. So sind die in Tabelle 15 (Kapitel 3.1.6.1) angegebenen Elemente, die über die Programme, PLACE-Datenbank (Higo et al., 1999), PlantCare-Datenbank (Lescot et al., 2002) und PlantPAN (Chang et al., 2008) ermittelt wurden, lediglich durch Sequenzvergleiche gefunden worden. Zudem kann die Kombination verschiedener Elemente innerhalb einer Promotorsequenz in einem synergistischen oder antagonistischen Effekt resultieren, was schließlich zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung der Genexpression führt (Miner und Yamamoto, 1991), so dass eine Verallgemeinerung der Wirkung einer bestimmten Kombination von cis-Elementen auf die Transkriptionsregulation nicht möglich ist. Außerdem spielt auch die relative Lage der einzelnen cis-Elemente zueinander eine große Rolle für ihre Funktionalität. Die in Tabelle 15 aufgelisteten Elemente können daher nur als Indiz für eine eventuell existierende regulierende Region dienen. Um jedoch eine tatsächliche Beteiligung an der Regulation des Gens nachzuweisen sind in vitro-Untersuchungen wie DNaseI-Footprinting oder Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nötig. Welche regulatorische Funktion die einzelnen cis-Elemente, die mit trans-Faktoren binden, auf die RNaseLER Expression haben, könnte ebenfalls mittels transgener Pflanzen, die spezielle Promotorverkürzungen enthalten, untersucht werden.

Dies war aus Zeitgründen während dieser Arbeit nicht möglich und sollte in weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden. Jedoch wurden Experimente durchgeführt, die Aufschluss über eine differenzielle Expression des *RNaseLER*-Gens in Bezug auf diverse Stimuli geben sollten.

## 4.3 Expression des *RNaseLER*-Gens

Pflanzen sind in der Lage, Umweltfaktoren zu erkennen und über Signaltransduktionsprozesse in veränderte Genexpressionsmuster zu übersetzen. Nach der Perzeption der veränderten Umweltbedingungen werden Signale in Form von Phytohormonen und/oder *"second messengern"* wie z. B. Calcium, in der Regel über eine Signalkaskade bestehend aus Proteinkinasen/-Phosphatasen, bis hin zu Transkriptionsfaktoren geleitet. Diese Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte *cis*-aktive Elemente und aktivieren dann Gene, deren Genprodukte es der Pflanze ermöglichen eine Stresstoleranz zu entwickeln.

### 4.3.1 Gewebe- und Stimulus-spezifische Expressionsanalysen

Im Gegensatz zu den Promotorreportergenanalysen, in denen die *RNaseLER*-Promotoraktivität in diversen pflanzlichen Organen nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1.7.1), ließ sich die mRNA in *in situ*-Hybridisierungsexperimenten nicht nachweisen (Kapitel 3.2.2). Das Expressionsniveau von *RNaseLER* ist offenbar entweder sehr niedrig oder aber auf sehr spezifisches Gewebe oder Zelltypen limitiert. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die *RNaseLER*-Promotoraktivität insbesondere in den Schließzellen und Trichomen detektiert wurde. Alle anderen Analysen wurden daher mittels der wesentlich sensitiveren RT-PCR durchgeführt.

Stomata und Trichome treten in allen Pflanzenteilen einschließlich Blättern, Stängel und reproduktiven Strukturen auf. Daher ist es nicht ungewöhnlich, dass *RNaseLER*-Transkripte in allen Organproben detektiert werden konnten (Kapitel 3.2.1, Abbildung 20). Die konstitutive Transkription der *RNaseLER* entspricht den Berichten über die konstitutive Expression von homologen Klasse 2 Genen, wie dem *AtRNS2* mit ubiquitärer Expression in Blättern, Stängeln, Wurzeln und Blüten (Taylor *et al.*, 1993), dem konstitutiv im Blattgewebe exprimierten *NgNGR2*-Gen (Kurata *et al.*, 2002) und *AhSL28* mit Expression in Blättern und allen Blütenteilen (Liang *et al.*, 2002). Die Beobachtungen sprechen für ein gemeinsames Expressionsmuster, das auf RNaseLER und homologe Enzyme der Klasse 2 limitiert ist. Im Gegensatz dazu wurden Tomaten-Klasse 1 Gene, wie RNaseLE und RNaseLX nicht in Spaltöffnungen oder Trichomen detektiert, wenn sie mit Reportergenkonstrukten und *in situ*-Hybridisierungsexperimenten analysiert wurden. Die extrazelluläre RNaseLE wird phloemspezifisch exprimiert, während die phosphatmangelinduzierte, intrazelluläre RNaseLX in sich differenzierung leistet (Lehmann *et al.*, 2001; Kock *et al.*, 2004; 2006).

Auch die ZRNaseI von *Zinnia elegans* wurde in sich entwickelnden trachealen Elementen nachgewiesen und ist hier wahrscheinlich an autolytischen Prozessen der Xylogenese durch Abbau der RNA's beteiligt (Ye und Droste 1996).

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass *RNaseLER* ubiquitär und konstitutiv exprimiert wird. Dies wird durch MacIntosh *et al.* (2010) unterstützt, die durch ihre Untersuchungen an homologen RNasen aus Reis ebenfalls zu dem Schluss kommen, dass Klasse 2 T2-Typ-RNasen konstitutiv und ubiquitär exprimiert werden. Das RNase-Gen *OsRNS2* aus *Oryza sativa* ist ebenfalls in allen Geweben stark exprimiert, jedoch schein das Gen nicht durch biotische oder abiotische Stressbedingungen reguliert zu werden (MacIntosh *et al.*, 2010). Dennoch haben einige Klasse 2 RNasen zusätzlich zu ihrer vermeintlichen *housekeeping*-Rolle auch neue Funktionen übernommen. Proteine wie Trichomaglin und CalsepRRP sind wahrscheinlich Speicherproteine und zeigen Unterschiede in ihrem Expressionsmuster. Andere Klasse 2 RNasen, wie RNS2 und AhSL28 sind während der Seneszenz verstärkt exprimiert (Taylor *et al.*,1993; Liang *et al.*, 2002), was darauf hindeutet, dass diese Enzyme neben der *housekeeping*-Funktion eine Rolle bei der Entwicklung spielen könnten.

Das Expressionsniveau des *RNaseLER* ist offensichtlich gering, da das Transkript zwar durch die semiquantitative RT-PCR jedoch nicht durch *in situ*-Hybridisierung mit einer spezifischen RNA-Sonde nachgewiesen werden konnte. Auch Versuche die RNaseLER-Aktivität durch *In-Gel-Assays* nachzuweisen, blieben erfolglos.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass RNasen ihre enzymatische Aktivität verloren haben und trotzdem antibakterielle oder antifungale Aktivitäten aufweisen. Beispiele für solche inaktiven Klasse 2 RNasen sind OsRNS4, OsRNS5 und OsRNS7 aus Reis, die nach Pathogenbefall oder Wasserstress exprimiert werden (MacIntosh et al., 2010). Auch CalsepRRP aus C. sepium ist eine inaktive RNase (VanDamme et al., 2000). In diesen RNasen führen AS-Austausche bzw. Veränderung von Aminosäuren in den CAS-Domänen, die an der Grundreaktion der RNA-Hydrolyse beteiligt sind, zum Verlust der RNase-Aktivität. Die CAS-Domänen der RNaseLER weisen eine hohe Homologie zu den CAS-Domänen intakter T2-Typ-RNasen auf (Abbildung 9). Allerdings tritt ein Aminosäureaustausch an der Position 84 von einer hydrophoben zu einer hydrophilen AS (Austausch von Prolin zu Threonin) in der CAS I-Domäne auf. Wenn auch bisher experimentell nicht nachgewiesen, so ist es denkbar, dass die RNaseLER durch diesen Austausch eine enzymatisch inaktive RNase ist oder zumindest die RNase-Aktivität deutlich vermindert ist. Durch den Austausch von Prolin zu Threonin könnte es zu einer Veränderung der Proteinfaltung kommen, die dazu führt, dass die beiden CAS-Domänen nicht korrekt zueinander angeordnet sind. Dies könnte die Ausbildung des aktiven Zentrums behindern. So führt Prolin in α-Helices aufgrund seiner sekundären Aminogruppe und seiner zyklische Struktur zu einem Knick in der Helix (Barlow et al., 1988). Mit Threonin an dieser Position kommt es nicht zu dieser Knickbildung, die jedoch für die Bildung des aktiven Zentrums wichtig sein könnte. Ob dieser AS-Austausch tatsächlich zur Veränderung der RNase-Aktivität führt, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Dafür könnte ein rekombinantes Protein mit einer Mutation an entsprechender AS-Position (AS 84 Threonin zu Prolin) exprimiert und mittels In-Gel-Assay getestet werden.

Ob die RNaseLER ein enzymatisch inaktives Protein ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, dennoch wurde untersucht, ob die *RNaseLER*-Expression durch biotische oder abiotische Stimuli gesteigert werden kann. Wie bereits oben beschrieben ist die Expression enzymatisch inaktiver T2-Typ-RNasen, wie OsRNS5, OsRNS7 und CalsepRRP durch Pathogenbefall oder Pi-Mangel regulierbar (VanDamme *et al.*, 2000; MacIntosh *et al.*, 2010).

Ein Anzeichen für eine regulierte Expression des *RNaseLER* ist das Auffinden von TATA-Box-ähnlichen Elementen und anderen *cis*-regulatorischen Elementen. Ob, und wenn ja welche der vorhandenen *cis*-Elemente tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität des *RNaseLER*-Promotors nehmen, wurde durch quantitative *real time* PCR-Experimente *in vito* anhand Stressstimuli-behandelter Tomatenpflanzen untersucht. Bisher ist nichts oder nur sehr wenig über die Regulation der Expression und die Funktion der Klasse 2 T2-Typ-RNasen bekannt. Es gibt einige Arbeiten, in denen nachgewiesen werden konnte, dass T2-Typ-RNasen, insbesondere der Klasse 1 RNasen, an der Phosphat-Remobilisierung, Pathogenabwehr, in Verwundungsprozessen und RNA-Abbau während der Xylogenese beteiligt sind (Ye und Droste 1996; Hugot *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2001; Kock *et al.*, 2004; 2006;).

Stress durch Phosphatmangel ist primär auf die oft niedrige Phosphatkonzentration im Boden zurückzuführen, kann aber sekundär auch durch Stressfaktoren wie Anaerobiose oder Kälte verursacht werden, da diese die Phosphataufnahme durch Wurzelzellen reduzieren (Carystinos et al., 1995). Phosphatmangel führt zu einer Verminderung von zytosolischem Phosphat (Pi) und als Folge zu einen bis zu 80 % erniedrigten ATP-Gehalt, was sich in einer drastischen Drosselung ATP-abhängiger Stoffwechselwege niederschlägt. Expressionsstudien an verschiedenen Pflanzenarten haben gezeigt, dass Pflanzen unter Pi-Mangelbedingungen mit einer veränderten Genexpression reagieren. In der Tomate konnten zahlreiche Gene bekannter und unbekannter Funktion identifiziert werden, die unter Phosphatmangel induzierbar sind. Dazu gehören extrazelluläre und intrazelluläre saure Phosphatasen (Goldstein et al., 1988; Duff et al., 1994), 2',3'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (Abel et al., 2000) und Ribonukleasen (Nurnberger et al., 1990), durch deren Enzymaktivität Phosphat aus organischen Phosphatverbindungen oder Nukleinsäuren freigesetzt bzw. recycelt wird. Expressionsstudien der Ribonukleasen, RNaseLE und RNaseLX aus S. lycopersicum, RNS1 und RNS2 aus A. thaliana, RNaseNE aus N. alata und AhSL28 aus Antirrhinum berichten über eine Expressionsinduktion infolge von Pi-Mangel (Kock et al. 1995; Kock et al. 1998; Bariola et al., 1994; Taylor et al., 1993; Dodds et al., 1996; Liang et al., 2002). Die RNaseLER zeigte innerhalb von 24 Stunden nur ein schwach gesteigertes Expressionsmuster als Reaktion auf limitiertes Phosphat im Vergleich zu der stark induzierten RNaseLX-Expression (Kapitel 3.2.3.2, Abbildung 22). Betrachtet man die Promotorsequenz des *RNaseLER* dann war eine Phosphatmangel-induzierte bzw. gesteigerte Expression der *RNaseLER* nicht zu erwarten. Im Gegensatz zu den Promotoren der paralogen *RNaseLX* und *RNaseLER* konnte im *RNaseLER*-Promotor kein *cis*-aktives Element identifiziert werden, welches dem PHR1-Bindemotiv entspricht. PHR1 ist ein Transkriptionsfaktor der MYB-Klasse, der an Sequenzbereiche in Promotoren von Phosphatmangel-induzierten Genen bindet (Rubio *et al.*, 2001).

Die Vorhersage von Promotorelementen, die an der Expression Pathogen-induzierter und Wund-responsiver Gene beteiligt sind, führte zu den Untersuchungen des *RNaseLER*-Expressionsmusters nach Infektion mit pathogenen Organismen und infolge einer mechanischen Verwundung von Tomatenblättern. Es wurden vier **W-Box**-ähnliche Sequenzen in den Positionen -20(+), -55(+), -785(+) und -175(-) im Promotor von *RNaseLER* identifiziert (Abbildung 15 und Tabelle 15). W-Boxen sind *cis*-aktive Elemente mit dem DNA-Sequenzmotiv (T)(T)TGAC(C/T), das mit seiner invarianten Kernsequenz TGAC die spezifische Bindungsstelle für WRKY-Proteine darstellt (Eulgem *et al.*, 2000). Die von den Pflanzen-spezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren über die W-Boxen vermittelten Expressionsmuster sind zahlreich, obwohl die Regulation der Genexpression häufig im Zusammenhang mit Pathogen-Responsivität, Verwundung oder Seneszenz steht. Für einige der WRKY-Faktoren wurde dies bereits klar gezeigt z.B. Induktion von WRKY-6 im Zusammenhang mit pathogenen Bakterien und WRKY-11 in seneszenten Blättern (Rushton *et al.*, 1996; Rushton und Somssich, 1998; Robatzek *et al.*, 2001). W-Boxen können sowohl positiv- als auch negativ-regulatorisch wirken (Eulgem *et al.*, 2000).

Zusätzlich wurden zwei TC-*rich repeats* Regionen in den Positionen -97 (+) und -139 (+) vorhergesagt (siehe Tabelle 14 und in Tabelle 15). Diaz-De-Leon *et al.* (1993) zeigten, dass eine TC-reicher Promotorbereich mit der Konsensussequenz ATTTTCT(T/C)CA an der Abwehr- und Stress-Reaktionsfähigkeit der anionischen Peroxidase von *Nicotiana tabacum* beteiligt ist.

Für einige Ribonukleasen, wie RNaseNE aus *N. alata* und NGR3 aus *N. glutinosa* wurde eine Funktion in der Pathogenabwehr belegt (Galiana *et al.*, 1997, Hugot *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003 NGR3). Für die Expressionsanalyse der *RNaseLER* wurden als erstes das Pathosystem *S. lycopersicum* cv. Moneymaker / *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pto*) DC3000 gewählt. *P. syringae* dringt über Stomata und Wunden in die Pflanze ein und verursacht die bakterielle Fleckenkrankheit (Cuppels, 1986). Die Tomatenpflanze ist für *Pto*  DC3000 anfällig, die Interaktion ist kompatibel und die Bakterien sind pathogen (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005). Die nicht-pathogene *hrcC*-Mutante, *Pto* TLR 1, die kein intaktes Typ III-Sekretionssystem besitzt, ist nicht in der Lage Krankheitssymptome auf Wirtspflanzen bzw. eine HR auf Nicht-Wirtspflanzen auszulösen (Boch *et al.*, 2002).

Die Expressionsanalyse nach Infiltration von pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien ermöglicht eine Aussage über eine mögliche RNaseLER-Beteiligung an spezifischen Resistenzmechanismen und basalen Abwehrreaktionen. Jedoch konnte in allen Analysen keine deutlich veränderten *RNaseLER*-Transkriptmengen in Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Woraus sich schließen lässt, dass die RNaseLER an Abwehrmechanismen gegen pathogene Bakterien nicht beteiligt ist.

Als zweites Pathosystem wurde die Interaktion zwischen dem Oomyzeten *Phytophthora infestans* und Tomate untersucht. *P. infestans* ist ein hemibiotropher Erreger, der Kraut- und Braunfäule an Tomaten verursacht. Anfällige Tomatenpflanzen werden durch Penetration der Epidermiszellen oder durch direktes Eindringen des Erregers in das Blattgewebe über Spaltöffnungen infiziert. Hugot *et al.* (2002) zeigten, dass die RNaseNE das Hyphenwachstum von *Phytophthora parasitica* inhibiert, indem pilzliche RNA's nach Translokation der intrazellulären RNaseNE in Golgistrukturen, abgebaut wird.

Die Infektion der Tomatenblätter mit *P. infestans* führte zunächst zu einer schwachen Reduktion der *RNaseLER*-Transkriptmenge innerhalb von drei Tagen nach der Infektion. Eine tatsächliche Reduktion der *RNaseLER*-Expression kann, aufgrund der hohen Standardabweichung, angezweifelt werden. Jedoch kehrte sich diese Reduktion vier Tage nach der Infektion in eine schwach gesteigerte Expressionsrate um (Kapitel 3.2.3.4). Dieses variable Expressionsmuster deutet eine Regulation der *RNaseLER*-Expression durch *P. infestans* an. Inwiefern die RNaseLER an der Abwehr des Oomyzeten beteiligt ist und ob sie, wie die RNaseNE, das Hyphenwachstum inhibieren kann, bleibt weiter zu untersuchen.

Ob RNaseLER an Reaktionen, die durch Verwundung von Gewebe ausgelöst werden, beteiligt ist, wurde in Experimenten untersucht, in den Blattmaterial mit einem Markierrädchen mechanisch verwundet wurde. Die mechanische Infiltration der Bakterien und die Penetration der Epidermiszellen durch den Oomyzeten *P. infestans* hätte schon Hinweise auf eine Verwundungsinduktion des *RNaseLER*-Gens geben sollen. Das war nicht der Fall, jedoch gab das Auffinden von W-Box-Elementen einen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der RNaseLER an der Reparatur von verwundeten Geweben, da es auch hier zum Umbau und Neubildung von Zellen kommt. Es existieren Berichte, dass T2-Typ-RNasen, wie NGR1, RNaseLE und ZRNaseI aus *Zinnea elegans* durch eine mechanische Verwundung in

111

Pflanzen induziert werden (Ye und Droste, 1996; Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998). Die Verwundung von Blättern führte in *S. lycopersicum* nicht zu einer differenziellen Expression des *RNaseLER*-Gens. Somit ist auch eine Beteiligung der RNaseLER an Verwundungsreaktionen unwahrscheinlich.

Auch Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA) und Ethylen spielen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und für beide wurden Promotorelemente beschrieben, die diese Regulation vermitteln.

Die E-Box (CANNTG) ist ein weitverbreitetes DNA-Kontrollelement, das trotz seiner Kürze eine ausgeprägte regulatorische Funktion zeigt und viele verschiedene genetische Programme wie Proliferation, Zelldifferenzierung, gewebespezifische Zellantworten und Zelltod beeinflusst (Munoz *et al.*, 2002). Von E-Box-Elementen ist bekannt, dass sie in der Aktivierung der Genexpression durch osmotischen Stress, ausgelöst durch Kälte und/oder ABA-Applikation, involviert sind (Stalberg *et al.*, 1996). Die E-Box dient in unterschiedlichsten zellulären Prozessen als Promotorelement für bHLH (basische Helix *loop* Helix)-Transkriptionsfaktoren zu denen auch das pflanzliche Protein PIF3 zu zählen ist (Atchley und Fitch, 1997). Im Promotor eines Pathogen-induzierten frühen Abwehrgens, CAZFP1 aus *Capsicum annuum* wurden E-Box-Elemente identifiziert, die für die gesteigerte Expression des Gens infolge einer ABA-Applikation und Kälte verantwortlich sind. (Kim und Hwang, 2005).

Vier E-Box-Sequenz an den Nukleotidpositionen -416, -789, -801 und -810 relativ zum Transkriptionsstart konnten im *RNaseLER*-Promotor vorhergesagt werden (Abbildung 15 und in Tabelle 15).

Ferner konnte ein Sequenzabschnitt lokalisiert werden, der mit dem **MYB-Kernmotiv** CNGTTR aller tierischen sowie mit dem Trockenstress-induzierter pflanzlicher MYB-Proteine übereinstimmt (Luscher und Eisenman, 1990; Urao *et al.*, 1993). ATMYB2 (MYB) Proteine fungieren als Transkriptionsaktivatoren der Dehydratisierung-und ABA-induzierbare Expression des Gens *rd22* (Urao *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 1997). Dieses Kernmotiv liegt innerhalb der 5'-stromaufwärts Sequenz des *RNaseLER* in gegenläufiger Orientierung auf dem Minusstrang (-) an den Positionen -293, -707 und -787 (Abbildung 15 und in Tabelle 15).

Trotz des Auftretens dieser Elemente hat eine breite Palette abiotischer und biotischer Faktoren auf transkriptioneller Ebene keinen Einfluss auf die *RNaseLER*-Expression.

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) beispielsweise, wurde als regulierende Substanz während der Blattseneszenz und Knospendormanz beschrieben. Anhand von ABA- Biosynthesemutanten (ABA-defizienten und ABA-insensitiven Mutanten) verschiedener Pflanzenarten konnte eine ABA-Beteiligung an physiologischen Prozessen, Entwicklungsvorgängen und stressregulierten Reaktionen gezeigt werden. Zum Beispiel wird bei Trockenstress durch die Verminderung des Turgordruckes infolge von Wasserverlust ABA in der Wurzel und auch im Blatt gebildet. Anschließend beeinflusst die Abscisinsäure an den Zielzellen und Zielgeweben physiologische und biochemische aber auch transkriptionelle Reaktionen. Eine wichtige Aufgabe von Abscisinsäure ist die Induktion des Stomataschlusses infolge von Wassermangel (Bray, 1997; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1996 und 1997).

Jedoch hatte die Applikation von ABA keinen Einfluss auf das Expressionslevel des *RNaseLER*-Gens (Kapitel 3.2.3.3) und auch osmotischer Stress, der durch Sorbitol ausgelöst wurde, führte nicht zu einer Veränderung der *RNaseLER*-Transkription (Kapitel 3.2.3.1). Demnach kann für die RNaseLER eine Rolle im Spaltöffnungsmechanismus ausgeschlossen werden.

Seneszenz ist das letzte Entwicklungsstadium der Pflanzen. Sie ist stark reguliert und genetisch programmiert. Blattzellen durchleben eine Umorganisation der Zellorganellen und eine dramatische Veränderung des Zellmetabolismus. Die Blattseneszenz wird begleitet durch die Induktion verschiedener Gene. Diese sind hauptsächlich am Abbau beteiligte Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen (Thomas und Stoddart, 1980; Davies und Grierson, 1989).

Es wurde bereits eine Erhöhung einer RNase-Aktivität während der Blattseneszenz beobachtet. Diese Aktivität spielt vermutlich eine Rolle im organisierten Abbau der Zellen und Umverteilung der freigesetzten Stoffe während der Seneszenz. Die hydrolysierten Nukleinsäuren werden zu einer Quelle von Phosphat mobilisiert und in der Pflanze an andere Orte transportiert. Lers *et al* (1998) zeigten, dass die Begasung von Blättern mit Ethylen, das als Regulator von Prozessen der Blattseneszenz bekannt ist, die Akkumulation der *RNaseLX*-mRNA induzieren kann. Daraus und aus Untersuchungen mit RNaseLX-defizienten Tomatenpflanzen schlussfolgerten Lers *et al.* (2006), dass die Phosphatmangel-induzierte RNaseLX an Seneszenzprozessen in Pflanzen beteiligt sein könnte. Taylor *et al.* (1993) berichteten ebenfalls, dass Seneszenz in Blättern und Petalen von *A. thaliana* zu einer gesteigten Expression von *AtRNS2* führt.

Die Beobachtungen, dass die Behandlung von Tomatenblättern mit ACC oder Ethephon, einem Analogon, das nach Hydrolyse Ethylen freisetzt, zu einer Reduktion der *RNaseLER*-Transkriptmenge führt (Kapitel 3.2.3.3, Abbildung 24 und Abbildung 25), können ein

113

Hinweis auf einen Ethylen-regulierten Faktor sein, der die *RNaseLER*-Expression negativ beeinflusst. Im *RNaseLER*-Promotor konnte eine **ERELEE4**-Konsensussequenz (AWTTCAAA) identifiziert werden (Itzhaki *et al.*, 1994). ERELEE4 ist ein <u>Ethylen-<u>Responsive-Element</u> (ERE) des Tomaten E4- Gens (Montgomery *et al.*, 1993) und wurde ebenfalls im Promotor des Seneszenz-induzierten *GST1*-Gens der Nelke gefunden (Itzhaki *et al.*, 1994).</u>

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit ein verändertes Transkriptionsniveau des *RNaseLER* infolge der Ethephon- und der ACC-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 24, Abbildung 25). Jedoch führten die Applikationen zur Reprimierung der Expression des *RNaseLER*-Gens, womit eine Beteiligung der RNaseLER an der Seneszenz unwahrscheinlich scheint.

Schließzellen und Trichome entwickeln sich aus protodermalen Zellen wobei ein kompliziertes Netzwerk an Signaltransduktionen und eine Umorganisation der Zellen abläuft. Die Reduktion der *RNaseLER*-Expression durch Ethylen und die bevorzugte Promotoraktivität in Trichomen und Schließzellen transgener Tabakpflanzen könnte ein Hinweis auf die Beteiligung der RNaseLER an einem Entwicklungsprozess sein, den die genannten Zellentypen gemeinsam haben. Eine Verknüpfung zwischen RNA-Metabolismus und der Spaltöffnung- bzw. Trichomentwicklung ist bisher nicht untersucht.

Zur Entschlüsselung der Funktion der RNaseLER sind weitere Studien erforderlich.

Zum Beispiel wäre es von großem Interesse das *RNaseLER*-Expressionslevel in transgenen Tomatenpflanzen, die das *RNaseLER*-Gen überexprimieren oder in denen es durch RNAi-Konstrukte stilllegt wurde, mit entsprechenden phänotypischen Veränderungen zu vergleichen. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich die Expression der *RNaseLER* in Pflanzen mit defekter Stomata- bzw. Trichomentwicklung verändert.

#### 4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der RNaseLER

Die ersten 23 Aminosäuren im N-Terminus des RNaseLER Vorläufer-Proteins sind typisch für eine eukaryotische Signalsequenz. Dies deutete an, dass die RNaseLER einen sekretorischen Weg in der Tomate nimmt, ähnlich wie es für S-RNasen der *Solanaceae*-Familie und einigen S-*like* RNasen angenommen wird.

Das mit der Wahrscheinlichkeit von P=0,952 identifizierte Peptid (Kapitel 3.1.2, Abbildung 35) entspricht den Anforderungen einer sekretorischen Signalsequenz.

114

 Alle sekretorischen Proteine und die meisten in die Membran integrierten Proteine haben eine Signalsequenz mit einer Länge von 15 bis 50 Aminosäuren (Blobel und Dobberstein 1975; Martoglio und Dobberstein, 1998; Bassham und Raikhel, 2000).

Somit hat das gefundene Peptid mit 23 Aminosäuren eine durchschnittliche Länge.

- Die Signalsequenz enthält einen zentralen hydrophoben Kern von acht oder mehr nicht polaren AS (von Heijne, 1983) flankiert von:
  - N-terminal positiv geladenen AS im Fall der RNaseLER sind es zwei Serine (Abbildung 35),
  - C-terminal polaren AS im Fall der RNaseLER sind es zwei Cysteine (Abbildung 35).
- Eine Signalpeptidaseschnittstelle gekennzeichnet durch ungeladene Aminosäurereste in der C-terminale polaren Region der Signalsequenz.

# M<u>SS</u>PAIVNLWLLV<u>CC</u>ILIAVKG

Abbildung 35: Die Aminosäuresequenz des sekretorischen Signalpeptids der RNaseLER aus S. lycopersicum. Die Aminosäuren des hydrophoben Kerns sind fettgedruckt; die Aminosäuren Serin und Cystein sind einfach unterstrichen.

Somit enthält die cDNA-Sequenz der *RNaseLER* eine N-terminale Sequenz, die zum kotranslationalenTransport in das endoplasmatische Retikulum (ER) beiträgt.

In Pflanzenzellen transportiert das sekretorische System viele verschiedene Proteine zu vier grundlegenden Strukturen:

- der Zellwand,
- den Vakuolen,
- der Plasmamembran,
- den Tonoplasten.

Alle Proteine, die an diese Kompartimente adressiert sind, werden kotranslational in das ER eingeschleust, dann selektiv zu den verschiedenen Kompartimenten transportiert und / oder verbleiben im ER. Die Selektion erfolgt anhand bestimmter Signalsequenzen.

Mit Hilfe des RNaseLER::eYFP Fusionsproteins wurde vor diesem Hintergrund der subzelluläre Ort der *RNaseLER*-Expression identifiziert werden (Kapitel 3.1.3). Nach der transienten Koexpression der Fusionskonstrukte zeigte sich ein nahezu identisches

Expressionsmuster der RNaseLER zu der ER-Kontrolle. Das ER bildet, wie sein Name es andeutet, ein ausgeweitetes Netzwerk durch das Zytoplasma. Die gelbe Fluoreszenz des eYFP-Fusionskonstrukts zeigt deutliche eine netzartig Akkumulation der RNaseLER in der gesamten Zelle (Abbildung 12, Anhang B) an, was den Schluss zulässt, dass das ER das Zielkompartiment der RNaseLER ist. Dieses Verhalten erinnert an Eigenschaften, die bereits für RNaseLE und RNaseLX beobachtet wurden. Beide RNase-Proteine wurden in verschiedenen Teilen des Sekretionsweg detektiert. RNaseLE erwies sich als sekretiertes Protein, das jedoch auch aus Vakuolen isoliert werden konnte (Nurnberger et al, 1990; Loffler et al., 1992). Das RNaseLX-Protein lokalisiert innerhalb der ER-Fraktion solange sein Cterminales ER-Retentionssignal HDEF vorhanden ist (Lehmann et al., 2001). Wohingegen die C-terminal verkürzte Mutante ebenfalls in den Vakuolen detektiert werden konnte (Loffler et al., 1992; Kock et al., 1995). Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, dass RNase T2-Proteine in Reaktion auf Entwicklungs- oder Umweltsignalen in Kompartimente des Endomembransystems transloziert werden. Zum Beispiel beinhaltet die biologische Funktion der Selbst-Inkompatibilitäts-RNasen (S-RNasen) der T2-Typ-RNase-Familie einen vesikulären Transport. McClure (2009) zeigte, dass S-RNasen aus den Zellen des Pistills in die extrazelluläre Matrix sezerniert, anschließend in die wachsenden Pollenschläuche durch Endozytose aufgenommen und über Endosomen zur Vakuole transportiert werden. Dabei wird angenommen, dass S-RNasen aus dem ER oder später aus den Vakuolen in das Zytoplasma der Pollenschlauchzellen gelangen (McClure, 2009). ScRny, die einzig bekannte S-like RNase der Hefe wird ebenfalls sekretiert und zeigte einen Einfluss auf die Membranpermeabilität oder -stabilität (Macintosh et al., 2001). Wurden die Hefezellen oxidativem Stress ausgesetzt, dann wurde ScRny1 aus den Vakuolen in das Zytosol abgegeben (Thompson und Parker, 2009). Ebenso ist RNS2 aus A. thaliana eine intrazelluläres Enzym, das in der Vakuole, dem ER, oder in beiden gefunden werden konnte (Bariola et al., 1999; Carter et al., 2004).

Eine dem Retentionssignal homologe Sequenz konnte im C-Terminus der RNaseLER nicht detektiert werden. Trotzdem führten auch längere Inkubationszeiten der Tabakepidermiszellen zu keiner Veränderungen im Expressionsmuster. Ein Verbleib der RNase im Lumen des ER kann demzufolge nicht ausgeschlossen werden. In einigen Fällen tritt auch eine signalunabhängige Retention im ER auf (Pagny *et al.*, 1999). In solchen Fällen treten Proteinaggregationen, die einen Transport nicht ermöglichen oder Interaktion mit Chaparonen auf. Ob dies auf die RNaseLER zutrifft muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

116

## 5 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. Plant Cell **9**: 1859-1868.
- Abel, S., Nurnberger, T., Ahnert, V., Krauss, G.J., Glund, K. (2000). Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. Plant Physiol 122: 543-552.
- Acquati F, Possati, L., Ferrante, L., Campomenosi, P., Talevi, S., Bardelli, S., Margiotta.
  C., Russo, A., Bortoletto, E., Rocchetti, R., Calza, R., Cinquetti, R., Monti, L., Salis,
  S., Barbanti-Brodano, G., Taramelli, R. (2005). Tumor and metastasis suppression by the human *RNASET2* gene. Int J Onc 26: 1159-1168.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.
- Anderson MA, Cornish EC, Mau SL (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. Nature **321**: 38-44.
- Anderson, M.A., McFadden, G.I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R., Clarke, A.E. (1989). Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. Plant Cell 1: 483-491.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (2001). A natural classification of ribonucleases. Methods Enzymol 341: 3-28.
- Atchley, W.R., and Fitch, W.M. (1997). A natural classification of the basic helix-loophelix class of transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 94: 5172-5176.
- Bariola, P.A., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D., Green, P.J. (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. Plant J 6: 673-685.
- **Bariola, P.A., MacIntosh, G.C., Green, P.J.** (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. Plant Physiol **119**: 331-342.
- Barlow, D. J. und Thornton, J. M. (1988) Helix geometry in Proteins, J. Mol. Biol. 201: 601-619.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. Trends Plant Sci. 2: 48-54.
- Bassham, D.C., and Raikhel, N.V. (2000). Plant cells are not just green yeast. Plant Physiol 122: 999-1001.
- **Blobel, G., and Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol **67:** 835-851.
- **Blume, B., and Grierson, D.** (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. Plant J **12:** 731-746.
- Boch, J., Joardar, V., Gao, L., Robertson, T.L., Lim, M., Kunkel, B.N. (2002). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. Mol Microbiol 44: 73-88.

- **Carystinos, G.D., MacDonald, H.R., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S., Poole, R.J.** (1995). Vacuolar H (+)-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. Plant Physiol **108**: 641-649.
- Carter, C., Pan, S., Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., Raikhel, N.V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. Plant Cell 16:3285–3303.
- Chang, W.C., Lee, T.Y., Huang, H.D., Huang, H.Y., Pan, R.L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. BMC Genomics 9: 561.
- Colot, V., Robert, L.S., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., Thompson, R.D. (1987). Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. EMBO J 6: 3559-3564.
- Cuppels, D.A. (1986). Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Appl Environ Microbiol **51**: 323-327.
- **D'Alessio G., and Riordan J.F.** (1997) *Ribonucleases: Structure and functions.*, New York: Academic Press Inc.
- **Davies, K.M., and Grierson, D.** (1989). Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. Planta **179:** 73-80.
- Deshpande, R.A., and Shankar, V. (2002). Ribonucleases from T2 family. Crit Rev Microbiol 28: 79-122.
- Diaz-De-Leon, F., Klotz, K.L., Lagrimini, L.M. (1993). Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. Plant Physiol 101: 1117-1118.
- **Dodds, P.N., Clarke, A.E., Newbigin, E.** (1996). Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana alata* that is induced by phosphate starvation. Plant Mol Biol **31:** 227-238.
- **Doyle J.J., and Doyle J.L.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus **12:** 13-15.
- **Dubro, R.J. and Thompson, R.H.S.** (1938) The decomposition of yeast nucleic acid by a heat-resistant enzyme. J Biol Chem **124:** 501-510.
- **Duff, S.M.G., Sarath, G., Plaxton, W.C.** (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Physiologia Plantarum **90**: 791-800.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol **300**: 1005-1016.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc 2: 953-971.
- **Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci **5:** 199-206.
- Fritig, B., Heitz, T., Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr Opin Immunol 10: 16-22.

- Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabieres, F., Ponchet, M., Poupet, A., Ricci, P. (1997). RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitin. Plant Physiol 115: 1557-1567.
- Gan, J.H., Yu, L., Wu, J., Xu, H., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., Liu, W.Y., Xia, Z.X. (2004). The three-dimensional structure and X-ray sequence reveal that trichomaglin is a novel S-like ribonuclease. Structure 12: 1015-1025.
- Gidoni, D., Brosio, P., Bond-Nutter, D., Bedbrook, J., Dunsmuir, P. (1989). Novel cisacting elements in Petunia Cab gene promoters. Mol Gen Genet 215: 337-344.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.H. (1990). Molecular light switches for plant genes. Plant Cell 2: 369-378.
- Goldstein, A.H., Danon, A., Baertlein, D.A., McDaniel, R.G. (1988). Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*: II. Characterization of the Phosphate Starvation Inducible-Excreted Acid Phosphatase. Plant Physiol **87**: 716-720.
- Green, P.J. (1994). The Ribonucleases of higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 45: 421-445.
- Gross, N., Wasternack, C., Kock, M. (2004). Wound-induced RNaseLE expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). Phytochemistry 65: 1343-1350.
- Gutte, B. and Merrifield, R.B. (1969) The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. J Am Chem Soc 91: 501-502.
- Hauck, P., Thilmony, R., He, S.Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. Proc Natl Acad Sci USA 100: 8577-8582.
- Hayano, K., Iwama, M., Sakamoto, H., Watanabe, H., Sanda, A., Ohgi, K., Irie, M. (1993). Characterization of poly C preferential ribonuclease from chicken liver. J Biochem 114: 156-162.
- Hayashi, T., Kobayashi, D., Kariu, T., Tahara, M., Hada, K., Kouzuma, Y., Kimura, M. (2003). Genomic cloning of ribonucleases in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection, and characterization of their promoters. Biosci Biotechnol Biochem 67: 2574-2583.
- He, P., Shan, L., Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. Cell Microbiol 9: 1385-1396.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Res 27: 297-300.
- Hillwig, M.S., Rizhsky, L., Wang, Y., Umanskaya, A., Essner, J.J., MacIntosh, G.C. (2009). Zebrafish RNase T2 genes and the evolution of secretory ribonucleases in animals. BMC Evol Biol 9: 170.
- Hon, W.C., Griffith, M., Chong, P., Yang, D. (1994). Extraction and Isolation of Antifreeze Proteins from Winter Rye (*Secale cereale* L.) Leaves. Plant Physiol **104**: 971-980.
- Hugot, K., Ponchet, M., Marais, A., Ricci, P., Galiana, E. (2002). A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. Mol Plant Microbe Interact 15: 243-250.

- **Hunt, A.G.** (1988). Identification and characterization of cryptic polyadenylation sites in the 3' region of a pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene. DNA 7: 329-336.
- Hunt, A.G. (1994). Messenger RNA 3'-end formation in plants. Plant Mol Biol 45: 47-69.
- Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A.E., Sakiyama, F., Sato, M. (2001). The 1.55 A resolution structure of *Nicotiana alata* S(F11)-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. J Mol Biol 314: 103-112.
- Igic, B., and Kohn, J.R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. Proc Natl Acad Sci USA 98: 13167-13171.
- Inokuchi, N., Koyama, T., Sawada, F., Irie, M. (1993). Purification, some properties, and primary structure of base non-specific ribonucleases from *Physarum polycephalum*. J Biochem 113: 425-432.
- Irie, M. (1997). RNase T1/RNase T2 family RNases. *Ribonucleases: Structure and functions.*, Ed D'Alessio G.; Riordan J.F. New York: Academic Press Inc., pp 101-130.
- Irie, M. (1999). Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. Pharmacol Ther **81:** 77-89.
- Irie, M., and Ohgi, K. (2001). Ribonuclease T2. Methods Enzymol 341: 42-55.
- Itzhaki, H., Maxson, J.M., Woodson, W.R. (1994). An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. Proc Natl Acad Sci USA 91: 8925-8929.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907.
- Jones, W. (1920) Amer. J. Physiol. 52: 203.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature 444: 323-329.
- Joshi, C.P. (1987a) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. Nucleic Acids Res 15: 6643-6653.
- Joshi, C.P. (1987b). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. Nucleic Acids Res 15: 9627-9640.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., Chiang, V.L. (1997). Context sequences of translation initiation codon in plants. Plant Mol Biol 35: 993-1001.
- Jost, W., Bak, H., Glund, K., Terpstra, P., Beintema, J.J. (1991). Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. Eur J Biochem **198:** 1-6.
- Kaletta K, Kunze I, Kunze G, Kock M (1998) The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. FEBS Lett 434: 377-381.
- Kariu, T., Sano, K., Shimokawa, H., Itoh, R., Yamasaki, N., Kimura, M. (1998). Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves. Biosci Biotechnol Biochem 62: 1144-1151.
- Kaufmann, H., Salamini, F., Thompson, R.D. (1991). Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. Mol Gen Genet **226**: 457-466.

- Kawano, S., Kakuta, Y., Kimura, M. (2002). Guanine binding site of the *Nicotiana* glutinosa ribonuclease NW revealed by X-ray crystallography. Biochemistry **41**: 15195-15202.
- Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F., Kyogoku, Y. (1990). Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. Eur J Biochem 187: 255-262.
- Kehoe, D.M., Degenhardt, J., Winicov, I., Tobin, E.M. (1994). Two 10-bp regions are critical for phytochrome regulation of a *Lemna gibba* Lhcb gene promoter. Plant Cell 6: 1123-1134.
- Kim, S.H., and Hwang, B.K. (2005). Functional Analysis of Pepper Cys2/His2-Type Zinc-Finger Protein Promoter Region in Response to Bacterial Infection and Abiotic Stresses in Tobacco Using *Agrobacterium*-Mediated Transient Assay. Plant Pathol J **21**: 39-46.
- Kim, W.C., and Lee, C.H. (2009). The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. Biochim Biophys Acta **1796**: 99-113.
- Kock, M., Theierl, K., Stenzel, I., Glund, K. (1998). Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. Planta 204: 404-407.
- Kock, M., Loffler, A., Abel, S., Glund, K. (1995). cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. Plant Mol Biol 27: 477-485.
- Kock, M., Gross, N., Stenzel, I., Hause, G. (2004). Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). Planta 219: 233-242.
- Kock, M., Stenzel, I., Zimmer, A. (2006). Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. J Exp Bot 57: 3717-3726.
- Kurata, N., Kariu, T., Kawano, S., Kimura, M. (2002). Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. Biosci Biotechnol Biochem 66: 391-397.
- Kurihara, H., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M., Mizuno, H., Nakamura, K.T. (1992). Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. FEBS Lett **306**: 189-192.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of Antirrhinum is expressed specifically in pollen and tapetum. Plant Mol Biol 50: 29-42.
- Lal, S., Choi, J.H., Shaw, J.R., Hannah, L.C. (1999). A splice site mutant of maize activates cryptic splice sites, elicits intron inclusion and exon exclusion, and permits branch point elucidation. Plant Physiol 121: 411-418.
- Lam, E., Chua, N.H. (1989). ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. Plant Cell 1: 1147-1156.
- Lam, E., Chua, N.H. (1990). GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. Science 248: 471-474.
- Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. Mol Cell Biol 7: 335-341.

- LeBrasseur, N.D., MacIntosh, G.C., Perez-Amador, M.A., Saitoh, M., Green, P.J. (2002). Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in Arabidopsis: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. Plant J **29**: 393-403.
- Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D., Kock, M. (2001). Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. Plant Physiol 127: 436-449.
- Leitch, A.R., Scwarzacher, T., Jackson, D., and Leitch, I.J. (1994). Microscope Handbooks: in Situ Hybridization. Oxford: Royal Microscopical Society.
- Lers, A., Khalchitski, A., Lomaniec, E., Burd, S., Green, P.J. (1998). Senescence- induced RNases in tomato. Plant Mol Biol **36**: 439-449.
- Lers, A., Sonego, L., Green, P.J., Burd, S. (2006). Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. Plant Physiol 142: 710-721.
- Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de P.Y., Rouze, P., Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res 30: 325-327.
- Liang, L., Lai, Z., Ma, W., Zhang, Y., Xue, Y. (2002). AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. Biochim Biophys Acta 1579: 64-71.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.
- Loffler, A., Abel, S., Jost, W., Beintema, J.J., Glund, K. (1992). Phosphate-Regulated Induction of Intracellular Ribonucleases in Cultured Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Cells. Plant Physiol **98**: 1472-1478.
- Loffler, A., Glund, K., Irie, M. (1993). Amino acid sequence of an intracellular, phosphatestarvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. Eur J Biochem 214: 627-633.
- MacIntosh, G.C., Bariola, P.A., Newbigin, E., Green, P.J. (2001). Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes? Proc Natl Acad Sci USA **98**: 1018-1023.
- MacIntosh, G.C., Hillwig, M.S., Meyer, A., Flagel, L. (2010). RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. Mol Genet Genomics 283: 381-396.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends Cell Biol 8: 410-415.
- Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., Norioka, S. (2001). Crystal structure at 1.5-A resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. J Biol Chem **276**: 45261-45269.
- Matton, D.P., Mau, S.L., Okamoto, S., Clarke, A.E., Newbigin, E. (1995). The S-locus of *Nicotiana alata*: genomic organization and sequence analysis of two S-RNase alleles. Plant Mol Biol 28: 847-858.
- McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A., Clarke, A.E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. Nature **347**: 757-760.
- McClure, B.A. (2009). Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. J Exp Bot **60**: 1069-1081.

- McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F., Clarke, A.E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. Nature **342**: 955-957.
- McCubbin, A.G., Kao, T. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 333-364.
- Meador III, J., and Kennell, D. (1990). Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. Gene **95:** 1-7.
- Miner, J.N., and Yamamoto, K.R. (1991). Regulatory crosstalk at composite response elements. Trends Biochem Sci 16: 423-426.
- Montgomery, J., Goldman, S., Deikman, J., Margossian, L., Fischer, R.L. (1993). Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5939-5943.
- Monti, L., Rodolfo, M., Lo, R.G., Noonan, D., Acquati, F., Taramelli, R. (2008). RNASET2 as a tumor antagonizing gene in a melanoma cancer model. Oncol Res 17: 69-74.
- Mueller-Roeber, B., Ellenberg, J., Provart, N., Willmitzer, L., Busch, H., Becker, D., Dietrich, P., Hoth, S., Hedrich, R. (1995). Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K<sup>+</sup> channel expressed in potato guard cells. EMBO J 14: 2409-2416.
- Munoz, E., Brewer, M., Baler, R. (2002). Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. J Biol Chem 277: 36009-36017.
- Nakamura, R.L., McKendree, W.L., Jr., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F., Sussman, M.R. (1995). Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. Plant Physiol 109: 371-374.

Nelson, B.K., Cai, X., Nebenfuehr, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. Plant J **51**: 1126-1136.

- Nicholson, A. (1997). *Escherichia coli* Ribonucleases: Paradigms for understanding cellular RNA metabolism and regulation. *Ribonucleases: Structure and functions.*, Ed D'Alessio G.; Riordan J.F. New York: Academic Press Inc., pp 1-49.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Int J Neural Syst 8: 581-599.
- Nurnberger, T., Abel, S., Jost, W., Glund, K. (1990). Induction of an Extracellular Ribonuclease in Cultured Tomato Cells upon Phosphate Starvation. Plant Physiol 92: 970-976.
- Nurnberger, T. and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular plant pathology 6: 335-345.
- Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-812.
- **Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., Irie, M.** (1992). Evidence that three histidine residues of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Rhizopus niveus* are involved in the catalytic function. J Biochem **112**: 132-138.

- Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., Irie, M. (1993). Role of Asp51 and Glu105 in the enzymatic activity of a ribonuclease from *Rhizopus niveus*. J Biochem 113: 219-224.
- Ohgi, K., Iwama, M., Tada, K., Takizawa, R., Irie, M. (1995). Role of Lys108 in the enzymatic activity of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. J Biochem 117: 27-33.
- Ohgi, K., Iwama, M., Ogawa, Y., Hagiwara, C., Ono, E., Kawaguchi, R., Kanazawa, C., Irie, M. (1996). Enzymatic activities of several K108 mutants of ribonuclease (RNase) Rh isolated from *Rhizopus niveus*. Biol Pharm Bull **19**: 1080-1082.
- **Ohno, H., and Ehara, Y.** (2005). Expression of Ribonuclease Gene in Mechanically Injured or Virus-Inoculated *Nicotiana tabacum* Leaves. Tohoko Journal of Agricultural Research **55:** 99-109.
- Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L., Gomord, V. (1999). Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. Journal of Experimental Botany 50: 157-164.
- Parry, S.K., Liu, Y., Clarke, A.E., Newbigin, E. (1997). S-RNases and other plant extracellular ribonucleases. Ribonucleases-Structures and Functions (Ed. D'Alessio G and Riordan JF), Academic Press, New York, pp 192-211.
- Pena-Cortes, H., Fisahn, J., Willmitzer, L. (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4106-4113.
- **Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., Alfano, J.R.** (2005). The hrpK operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. J Bacteriol **187:** 649-663.
- **Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res **29:** 2002-2007 (e45).
- Piccinelli, P., Rosenblad, M.A., Samuelsson, T. (2005). Identification and analysis of ribonuclease P and MRP RNA in a broad range of eukaryotes. Nucleic Acids Res 33: 4485-4495.
- Piechulla, B., Merforth, N., Rudolph, B. (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. Plant Mol Biol 38: 655-662.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1571-1580.
- Plesch, G., Ehrhardt, T., Mueller-Roeber, B. (2001). Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. Plant J 28: 455-464.
- Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263: 211-214.
- Raines, R.T. (1998). Ribonuclease A. Chem Rev 98: 1045-1066.
- Riordan, J.F. (1997). Structure and function of angiogenin. *Ribonucleases: Structure and functions.*, Ed D'Alessio G.; Riordan J.F. New York: Academic Press Inc., pp 445-489.
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. Curr Opin Plant Biol 2: 198-206.

- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. Genes Dev 15: 2122-2133.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. EMBO J 15: 5690-5700.
- Rushton, P.J., and Somssich, I.E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. Curr Opin Plant Biol 1: 311-315.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,.
- Sanchez-Serrano, J.J., Schmidt, R., Schell, J., Willmitzer, L. (1986). Nucleotide sequence of a proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (Solanum tuberosum) and its mode of expression. Mol Gen Genet 203: 15-20.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., Thiel, H.J. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. Science 261: 1169-1171.
- Shimizu, T., Inoue, T., Shiraishi, H. (2001). A senescence-associated S-like RNase in the multicellular green alga *Volvox carteri*. Gene 274: 227-235.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996): Molecular responses to drought and cold stress. Curr. Opin. Biotechnol. 7: (2), 161-167.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997): Gene expression and signal transduction in waterstress response. Plant Physiol. 115: 327-334.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Res 23: 1087-1088.
- Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. Annu Rev Biochem 72: 449-479.
- Smyth, D.G., Stein, W.H., Moore, S. (1963) The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. J Biol Chem 238: 227-234.
- Stalberg, K., Ellerstom, M., Ezcurra, I., Ablov, S., Rask, L. (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. Planta 199: 515-519.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. Science 268: 661-667.
- **Stenzel, I.** (1998). Isolierung und Charakterisierung genomischer Sequenzen Phosphatmangel-induzierbarer Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Dissertation
- Suzuki, A., Yao, M., Tanaka, I., Numata, T., Kikukawa, S., Yamasaki, N., Kimura, M. (2000). Crystal Structures of the Ribonuclease MC1 from Bitter Gourd Seeds, Complexed with 29-UMP or 39-UMP, Reveal Structural Basis for Uridine Specificity. Biochemical and Biophysical Research Communications 275: 572-576.

- Taketo, A. (1988). DNA transfection of *Escherichia col*i by electroporation. Biochim Biophys Acta 949: 318-324.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Tanaka, N., Arai, J., Inokuchi, N., Koyama, T., Ohgi, K., Irie, M., Nakamura, K.T. (2000). Crystal structure of a plant ribonuclease, RNaseLE. J Mol Biol **298**: 859-873.
- Taylor, C.B., and Green, P.J. (1991). Genes with Homology to Fungal and S-Gene RNases Are Expressed in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol **96**: 980-984.
- Taylor, C.B., Bariola, P.A., delCardayre, S.B., Raines, R.T., Green, P.J. (1993). RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5118-5122.
- Tewes, A., Glund, K., Walter, R., Reinbothe, H. (1984). High yield isolation and recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Pflanzenphysiol **113**: 141-150.
- Thomas, H., and Stoddart, J.L. (1980). Leaf Senescence. Annual Review of Plant Physiology 31: 83-111.
- **Thompson, D.M., and Parker, R.** (2009). The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol **185**: 43-50.
- **Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res **25**: 4876-4882.
- **Trubia, M., Sessa, L., Taramelli, R.** (1997). Mammalian Rh/T2/S-glycoprotein ribonuclease family genes: cloning of a human member located in a region of chromosome 6 (6q27) frequently deleted in human malignancies. Genomics **42:** 342-344.
- **Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Shinozaki, K.** (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. Plant Cell **5:** 1529-1539.
- VanDamme, E.J., Hao, Q., Barre, A., Rouge, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (2000). Major protein of resting rhizomes of *Calystegia sepium* (hedge bindweed) closely resembles plant RNases but has no enzymatic activity. Plant Physiol **122**: 433-446.
- VanLarebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J. (1974). Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170.
- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G., Coen, E.S. (1996) Origin of allelic diversity in antirrhinum S locus RNases. Plant Cell 8: 805-814.
- Yanagisawa, S., and Schmidt, R.J. (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. Plant J 17: 209-214.
- Ye, Z.H., and Droste, D.L. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. Plant Mol Biol **30**: 697-709.
- Yoshida, H. (2001). The ribonuclease T1 family. Methods Enzymol 341: 28-41.

## ANHANG

## A) RNaseLER cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz

Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert, der Translationsstart und Translationsstopp ist fett gedruckt und das Polyadenylierungssignal im 3'-Bereich ist unterstrichen dargestellt. Die farblich hinterlegten Bereiche markiert die Sequenz des <u>conserved active-site segments</u> (CAS I und CAS II). Die Aminosäuresequenz (grau) des Proteins RNaseLER ist proportional zur Nukleotidsequenz dargestellt.

+1 ATCCATAGAAAGAAATCCAAAAAAAAAAAAGAGTGAAAAATTTGAAGAGAAAAGCCACC**ATG** TCT TCT  $\underset{\mathrm{S}}{\mathrm{TCT}}$ CCT 68 122 22 GGT GGA TGG GAT GAG GAA GTT GGA TTA CTT AGA AGA GGA GGA AAA CAG AGA CAG 176 G G W D E E V G L L R R G G K Q R Q 40 CTT CAA TGG CCC GGC ACC TAT 230 58 TTC GAT TAC TTC AAG CTA GCT TGC CGA AAA ACT Ά Т. 0 R K CGC CAT TGC TGC TCT TCC AAC GCT TGT TGC AGC CGC TCA AAC TCG CCA TCT GTA 284 TTC ACA ATT CAT GGA CTT TGG ACT GAA TAT AAC GAT GGA ACT TGG CCT TCC TGT 338 392 112 TGG CCT TCC TTA AGT TGT AGT TCC CCC AGA TCT TGC W P S L S C S S P R S C CAT CAC AAA AGG AAG TAT 446 H H 130 ĸ AAA GGA CCA TTC TGG GGT CAT GAG TGG GAA AAA CAC GGG ACA TGT GCT TAT CCA 500 GȚT GȚC CȚT GẠC GẠA TẠT GẠA TṬC TṬT TṬG AဣA AဣG TṬG AẠT GȚT TẠC TỊC AẠA 554 TAT AAC GTC ACA GAA GTT CTA TTT GAA GCT GGA TAT GTA CCA TCA GAT Y N V T E V L F E A G V V P S D 608 TCT GAA 184  $\underset{K}{\text{AAG}} \ \underset{V}{\text{TAT}} \ \underset{V}{\text{CCA}} \ \underset{L}{\text{TTA}} \ \underset{G}{\text{GGA}} \ \underset{G}{\text{GGC}} \ \underset{T}{\text{ATC}} \ \underset{T}{\text{ATT}} \ \underset{S}{\text{ATT}} \ \underset{S}{\text{CC}} \ \underset{T}{\text{ATT}}$  $\operatorname{GCT}_{A}$   $\operatorname{TTT}_{F}$  $\underset{H}{\operatorname{CAT}} \operatorname{ACA}_{T} \operatorname{ACC}_{T}$ CAA AAT 662 202 N TGT TTC TAT **716** 220 AAG AAT TTT GAG CCT CGT GAC TGT GCA CAT GAT ACA AGC TCA AGA GGG TCA TGT 238  $\underset{\frown}{\mathrm{CCT}} \ \underset{\frown}{\mathrm{CAG}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{TAC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{GC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{CAG}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{TC}} \ \ \underset{\frown}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \underset{\leftarrow}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{CC}} \ \ \atop\\}{\mathrm{$ 824  ${\tt TAG} {\tt TTTGCAGAATGGTCTCTGGTTTCATCAGATAATTTGACAAAGTTGCCGAATG$ 891 ACA GCA GCT TCT ACCTTGGCTTTATTGCTTTACAGTGAAGCCTGTCATAATACAAGTTTCAGCTTCGGATTGGTTAATCCTTT 962 CTCACGTGCAAAATCTACAGGTGGATAAATGATGTTTCCTCTATACTTTCTAGGTCTATTATCAATGCAACC 1033 GTAACCAGATTAATAATGTTCCCCTTTTCTGCTATTCCAGTTTATCAAAGTAAATTTTCGACATGGTTTGTA 1104 1174

## **B)** RNaseLER::eYFP Lokalisation im ER

Derivate des *Agrobacterium*-Stamms GV3101 mit pCPLEReYFP und ER-ckCD3-953 wurden in *N. benthamiana*-Blättern (je 1x10<sup>9</sup> cfu/ml) koinokuliert. (A) und (B) CLSM-Aufnahme aus 4 unabhängigen Lokalisationsexperimenten zwei Tag nach Inokulation, (C) und (D) Detailaufnahme von (B). (1) eYFP-Fluoreszenz des RNaseLER::eYFP; (2) CFP-Fluoreszenz des ER-ckCD3-953 (ER-Kontrolle); (3) kombiniertes Bild; rot=Autofluoreszenz der Chloroplasten.



acgt	Promotorsequenz
ACGT	Exonbereich
acgt	Intronbereich
ACGT	conserved active-site segments (CAS I und CAS II)
+1	markiert den Transkriptionsstart
$\rightarrow$	Oligonukleotid-Orientierungsrichtung

## C) Genomische RNaseLER-Sequenz (Acc. Nr. AM408589)

Dargestellt ist die gesamte genomische DNA-Sequenz inklusive dem Promotorbereich. Die aus cDNA-Analysen abgeleitete Exon/Intron-Struktur ist ergänzt (kursiv, kleine Buchstaben). Das Start- bzw. Stoppkodon ist unterstrichen und fett gedruckt. Oligonukleotide (Tabelle 4), die zur Amplifikation der Promotorfragmente verwendet wurden sind durch Pfeile eingezeichnet.

#### PstI\_P3

Pstl_P3	
cgacggctcgggctgatgacaaatctgtactgattattgcaacatttgaatcatatgtggcaacagatgaccaatatatcactaaaatgt	-763
PstI_P1	
ggcaacgcacgttaaaaatcatatcaacaaaatggccaaaaaaagaactacaacagcaacaaaaaataacttttcactgaatgataacat	-673
${\tt tacagatacatttcctcaaaataaggattttttgagttggctgattttctttc$	-583
${\tt t} cagtttttacacctaaagaacattttattgttcattaatctaagaaaagaacttcgaaaattgtaaagtatttcaaaaaaaa$	-493
catttctggtctaacacaattacagaatagaaagatgagagagtaatagagggactggagaggaagagtaacgatggcagatgaagagtaa	-403
cgacaaattccccgaatttctaaggaaaaaagatgaagaagaagaagaagaagaagagaggag	-313
$\tt tttggttcgaattataacagtgtgcctttttgtatttatt$	-223
tatattttttaaaaaaaatttaaccagctcttaattaatccatcgtcaaaaataaaaacgagatttattt	-133
caagttg cattttatgcctctactcattttcatttattttttcaaaaataatccaaaactgccgtgtcctaccagtcttcgtcttcttt	-43
cattattagtatttaatacagtttgacaattcattggattgcATCCATAGAAAGAAATCCAAAAAAAAAAGAGTGAAAATTTGAAGAGAAA	48
AAGCCACCATGTCTTCTCCTGCAATTGTGAATCTGTGGATGTGGATGTGTATTAGTATGTTGTATTCTCATTGCAGTGAAGGGTGGATGGGATGAGG Pl_2Sall	138
${\tt AAGTTGGATTACTTAGAAGAGGAGGAAAAACAGAGACAGTTCGATTACTTCAAGCTAGCT$	228
${\tt CTCGCCATTGCTGCTCTTCCAACGCTTGTTGCAGCCGgtatctattttaatttatactattacgttcaaatttgggcaaatccattcatt$	318
tcttcttggaatattgggtctttcataactaaatctactcgggccaccgacacgactctttgttttcctacaatttcaaataggagctta	408
$cctttgtgattttttttgtatttttccag {\tt CTCAAACTCGCCATCTGTA {\tt TTCACAATTC} gtaagtcccactcccttctgccagagctc}$	498
$tgtagtagttcagtttcatgtggtcacaagtgaaacatacaactgaataaggtttcttgtcttctag {\tt ATGGACTTTGGACT} {\tt GAATATAAC}$	588
${\tt GATGGAACTTGGCCTTCCTGTTGTTCTGGTCGCCCTTTTGATCAGAAGGAGgtaagtttgcttattctgcttttcgcccgagaagatttc}$	678
a atgtgagaactatctgcattgctactcaacagtttgtaactggaacaacagtgtcttctgatgccacgactaagtcacaggagctcaca	768
a agttctttttcttttcttttgttgggatagtagtggcgtcagccgtcagttaaaaatcacctacatctttcgcttctgctggggtt	858
caaacatttgtctcccgttgtcctcattccagctatatcactggcaacacctttggctgcacagctctgataaagtttaggcattcaaca	948
acttaggatttcccaaattttacattgagcatttcttcttgtgtgaacacttatgctttgttctacatgctattattttaactattaatc	1038
atgaagtatgtgaatatatgaccttctgtctatgtatgatttaagttttcagatcttaattctgtgatatgattcacatatttatt	1128
a catagactaggatgtgagattatgtgatgtgcaccaaagaatttttgcaaaacaattagagcgttaagccatcagtaatcttttggtgt	1218
gtactggcttgaaatgatttatcctatttagcagcggcaagcgtctgtgaactatattggttagctaggatatttgcaaattccggaact	1308
ttattggttagctaggatatttgcaaattccgaggtcattgagaagcttagatttccttaatcatagtggtgtttctctttaatctattt	1398
$catgettactcctcatcactgagatcactttttttgtttatgagccaagtttttttgtcag{\tt ATTTCAACATTGCTTGAGCCAATGAGG}$	1488
${\tt AAGTATTGGCCTTCCTTAAGTTGTAGTTCCCCCCAGATCTTGCCATCACAAAAAAGGACCATTCTGGGGTCATGAGTGGtttcactgttat$	1578

cttactcattgattatttgaattggataccattaaggaactgacacattcttcttgcactcctctatgctgactctggagataattacag 1668 ttaatqctataqtttactaqctqatacttqaqqqacttqqqqqctatqaqtactttqctqttaqttqtaqctqqcttqqqtcttcatqtcc 1848 agctgggcctctctgtttttctgtttttgtttttctggattgtaatgttggcttctgtaataatattgtcatttaccaaaaaataaaatt 1938 aattqtacaaqatqaaaqaqqttaaqaqcttqctattttctaqaatctaattqaqaaqcaqqqttctaqatttctqcaqcaaqqaqcca 2028 aggatgtaaaaacctagaaattacttgattctttacatctcttaaaaaattgagagtagctcctttcttcaccttggatactgataagtg 2118 tctccttctaaaactgaggtatgaggtagttttttccttctgcttttgtcatttcatcaatgagatgtctttgggtgtgcacttaatgtg 2298ggacactatacaaggttatgctattccgtcccttggatgtttctcaaattcaattgccaatgcattttaatgagagttcacatcagtggt 2568 ggattgtgacggaccctaatgcaaccagatctagagagattcacagaactagattagggatgggctttacttttgcctactttttaacca 2658 accaaaaaaagattgtggatgggcttgaataactcatattctgcatttggtagcggttaaggagtatcgagggggggtgtggggttatcag 2748 gttctttcctcatccaacacttcatagtagtattatgctgtggtataatatattgtgggttaccaacgaaacgcctggtttcaataggga 2928 ggtatatggagtttgacacatggccttatctctctactaatccaatctgattatagtacagaaggtctggtacagttatatgcgcttta 3018CGGGACATGTGCTTATCCAGTTGTCCTTGACGAATATGAATTCTTTTTGACAACGTTGAATGTTTACTTCAAATATAACGTCACAgtaag 3198 ttctttttggttatacattctaattttttctaatgttggtgggatattttcgttctatgaagttgatgatgatatcaaacacagaagaag 3378ttg catcttg aataattatatg ctaaaacttacttatg gatg ttattag tacctag ttcttg ccg atacaaa atatatcaag aaggaa a 3468gctgtaacttgtcaattaatcaactgtaccagaacattcttgatatcattgcttatgcattaaaaatggtttataatggtattattgttg 3648tgtaacttgtgggattaatcaactgtatcaaaatattcttgatatcattgtttatgcactaaaactctttataatggtattattgttgata 3918cagttccattttgttatcagatgaatattaataagacctcttcaatgtcaataaactaatcacctcacgattttatgcctgatagttgca 4008 ctaaccaaataqtqqttatqtqqtacttqactaaaattacacactcaaacacaatqccaqGAAGTTCTATTTGAAGCTGGATATGTAC~4188CATCAGATTCTGAAAAGTATCCATTAGGAGGCATCATTTCATCCATTCAAAATGCTTTTCATACAACCCCCAGAGTTGGTATGCTCAGGCG 4278 ATGCCCTGGAAGAACTTCGTATATGTTTCTATAAGAATTTTGAGCCTCGTGACTGTGCACATGATACAAGCTCAAGAGGGTCATGTCCTC 4368 AGTACGTCAGCTTGCCAGCCCATGGATCATGGGGGGTTTAGAAGCAATACAACAGCAGCTTCTTAGTTTGCAGAATGGTCTCTGGTTTCAT 4458  $CAGATAATT \\ \underline{TGA} CAAAGTTGCCGAATGACCTTGGCTTTATTGCTTTACAGTGAAGCCTGTCATAATACAAGTTTCAGCTTCGGATTGGTT \ \mathbf{4548}$ AATCCTTTCTCACGTGCAAATCTACAGGTGGATAAATGATGTTTCCTCTATACTTTCTAGGTCTATTATCAATGCAACCGTAACCAGATT 4638 GGGTTTCTTC 4739

## **D)** Vektorkarten



## pBI101-Vektorkarte mit RNaseLER-Promotor-Insertion

Bezeichnung: pBI101 Größe: 13,88 kb Referenz: Clontech

Kommentar: Expressionsvektor abgeleitet von pBin19, Ausgangsvektor für die Konstruktion von pBIP134-1, pBIP221-2 und pBIP367-3 (Tabelle 6), wurde für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation und Expression eingesetzt

Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind grau hinterlegt.

### pCP60-Vektorkarte mit RNaseLER::His-Insertion



Bezeichnung: pCP60

Größe: 12,42 kb

Referenz: Coronado, C. und Ratet, P.; unveröffentlicht

Kommentar: Expressionsvektor abgeleitet von pBin19, Ausgangsvektor für die Konstruktion von pCPLER-His (Tabelle 6), wurde für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation und Expression eingesetzt

Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind grau hinterlegt.
#### pCP60-Vektorkarte mit RNaseLER::eYFP-Insertion



Bezeichnung: pCP60

Größe: 12,42 kb

Referenz: Coronado, C. und Ratet, P. ; unveröffentlicht

Kommentar: Expressionsvektor abgeleitet von pBin19, Ausgangsvektor für die Konstruktion von pCPLER-eYFP (Tabelle 6), wurde für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation und Expression eingesetzt

Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind grau hinterlegt.

#### Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau PD. Dr. Margret Köck für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, für Ihre Betreuung und die Begutachtung der Arbeit bedanken. Vielen Dank für Ihre Unterstützung bei zahlreichen praktischen und theoretischen Fragen.

Ralitza, Clemens und Anett möchte ich für die vielen schönen Labortage und die zahlreichen Hilfen im Laboralltag danken.

Bei Karin möchte ich mich für die Unterstützung im Laboralltag, für die Anzucht und Pflege unzähliger Pflanzen und die Hilfe bei Hochdurchsatzexperimenten bedanken. Es hat viel Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten.

Dankeschön!

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und all denen bedanken, die mich besonders in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch unentwegtes Korrekturlesen, intensive Diskussionen, den ein oder anderen Kaffee, abwechslungsreiche Unterhaltungen und gemeinsame sportliche Aktivitäten oder einfach nur durch Gespräche unterstützt haben.

Annett, vielen Dank für deine Hilfe im letzten Abschnitt dieser Arbeit, für Dein stets offenes Ohr und Deine Diskussionsbereitschaft im Lebens- und Laboralltag.

Albrecht, vielen Dank für deine Hilfe im letzten Abschnitt dieser Arbeit.

Anna, Antje, Annett, Kristin und Martin möchte ich für die vielen abwechslungsreichen Stunden nach der Arbeit danken.

Ilka und Martina vielen Dank für die sportliche Abwechslung, die oft dringend nötig war und die Unterstützung bei der Erstellung der schriftlichen Arbeit.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie. Ihnen danke ich für die Liebe, das Verständnis und die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Vielen Dank!

### Veröffentlichung

in Fachzeitschriften Köthke, S.; Köck, M. (2011) The Solanum lycopersicum RNaseLER is a class II enzyme of the RNase T2 family and shows preferential expression in guard cells. Journal of Plantphysiology, doi:10.1016/j.jplph.2010.11.012

KonferenzbeiträgeKöthke, S.; Köck, M. (2010) The T2-type RNase Family<br/>in Tomato (Solanum lycopersicum)-Structure, Location<br/>and Expression Pattern of the new Member RNaseLER.<br/>(Poster) 8<sup>th</sup> RNase Congress, Naples, Italy.

Köthke, S.; Deising, H.B. (2005) Die Bedeutung der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase für die Pathogenität von *Colletotrichum graminicula*. Vortrag, Tagung Wirt-Parasit-Interaktion-Freiburg i. Br.

**Köthke, S.; Deising, H.B.** (2004) Die Bedeutung der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase für die Viabilität und Virulenz in *Colletotrichum graminicula*. Vortrag, 54. Pflanzenschutztagung Hamburg

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name:	Sabine Köthke
Anschrift:	Robert-Franz-Ring 2
	06108 Halle/Saale
Geburtsdatum:	01.09.1970
Geburtsort:	Bismark/Altmark

## Ausbildung

1977 - 1982	Polytechnische Oberschule Werner Seelenbinder, Bismark
1982 - 1987	Polytechnische Oberschule Fritz Heckert, Berlin
1987 - 1990	Ausbildung zum FA f. Nachrichtentechnik, Berliner Verkehrsbetriebe
1993 - 1997	Abendgymnasium Prenzlauer Berg, Berlin
1997 - 2002	Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
2002	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität
	Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Bonas,
	Thema: "Charakterisierung der N-terminalen Region von AvrBS3 und
	AvrBS4 aus Xanthomonas. "
	Abschluss: Diplom-Biologin

# Berufserfahrung

1990 - 1997	Tätigkeit als Fernmeldemonteurin Berliner Verkehrsgemeinschaft
	(BVG)
2003 - 2004	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-
	Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr.
	H. Deising,
	<u>Thema:</u> "Die Rolle der pilzlichen $\beta$ -1,3 Glucansynthase für die
	Pathogenität des Maispathogens Colletotrichum graminicola."
2005 - 2009	Promotion am Institut für Biologie an der Martin-Luther-Universität
	Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. M. Köck,
	Thema: "Charakterisierung der RNaseLER aus Solanum lycopersicum."
2009 - 2010	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin, Firma: Generic Assays
	Thema: Etablierung von Autoimmunantikörper-Assays mittels diverser
	humaner Tumor- und Blutzellen.

#### Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von der aufgeführten Teilpublikation noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD Dr. Margret Köck betreut worden.

Halle/Saale, 09. 03. 2011

Sabine Köthke