Synthese und Transport von Signalen im Phloem nach Verwundung, Induktion einer Pathogenresistenz und abiotischem Stress

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Diplom-Biologe Frank Gaupels
aus Altenberge

Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
Prof. Dr. Aart J. E. van Bel
Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das Phloem 1

1.2 Die Systemisch Aktivierte Resistenz gegen Pathogene 5

1.3 Die Systemische Wundreaktion 8

1.4 Potentielle Abwehr- und Resistenzsignale im Phloem 10
1.4.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies 10
1.4.2 Der Redoxstatus 12
1.4.3 Oligopeptide und Proteine 13
1.4.4 RNA 14

1.5 Ziele dieser Arbeit 17

2 MATERIAL und METHODEN 18

2.1 Pflanzenmaterial 18

2.2 *In vivo* Mikroskopie des Phloems 18

2.3 Behandlungen der Pflanzen 19

2.4 Gewinnung der Siebelement-Säfte 20
2.4.1 Exsudation aus *Cucurbitaceae* 20
2.4.1 Erleichterte Exsudation mit EDTA 20
2.4.2 Blattlaus-Stylektomie 20

2.5 Analyse der mRNA im Phloemsaft mit dem cDNA-AFLP 22
2.5.1 Proben für das cDNA-AFLP 22
2.5.2 Isolierung der mRNA 22
2.5.3 cDNA-Synthese 23
2.5.4 Verdau der cDNA und Aufreinigung der Fragmente 23
2.5.5 Adapterherstellung und -ligation 24
2.5.6 Präamplifikation 24
2.5.7 Selektive Amplifikation 25
2.5.8 Auftrennung der selektiv amplifizierten Fragmente auf Polyacrylamidgelen 26
2.5.9 Fragmentisolation 26
2.5.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen 27
2.5.11 Klonierung von cDNA-Fragmenten, Kolonie-PCR und Plasmidpräparation 27
2.5.12 Sequenzierung und Sequenzvergleiche mit Datenbanken 28

2.6 RT-PCR 28

2.7 Vorbereitung der Proben für die Proteinanalysen 29

2.8 Messung der Proteinkonzentration 29

2.9 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelektrophorese 29

2.10 Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel 30

2.11 Western Blot-Analyse 31
2.11.1 Elektroblot 31
2.11.2 Vakuum-Dot Blot 31
2.11.3 Ponceau-Färbung 31
2.11.4 Immunodetektion von Proteinen mit Nitrotyrosingruppen 31

2.12 Die *Biotin switch*-Methode zur Detektion nitrosylierter Proteine 32
2.12.1 Western Blot-Analyse biotinylierter Proteine 33
2.12.2 Aufreinigung biotinylierter Proteine 33
2.12.3 Massenspektrometrie 34

2.13 Messungen von Enzymaktivitäten **34**
2.13.1 Ascorbatperoxidase 35
2.13.2 Dehydroascorbatreductase 35
2.13.3 Peroxidase 35
2.13.4 Superoxiddismutase 35

3 ERGEBNISSE **37**

3.1 Ergebnisse des cDNA-AFLP und der RT-PCR mit Phloemsaft **37**

3.2 *In vivo* Beobachtung einer induzierbaren NO-Synthese in den Geleitzellen von *Vicia faba* mit konfokaler Lasermikroskopie **40**

3.3 Detektion nitrierter und nitrosylierter Proteine im Phloemsaft von *Cucurbita maxima* **44**

3.4 Regulation antioxidativer Enzyme im Phloemsaft durch *in vitro*-Behandlung mit Peroxynitrit und Nitrosoglutathion **48**

3.5 Effekte von Verwundung und chemischer Resistenzinduktion auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme im Phloemsaft **49**

3.6 Durch einen Inhibitor der NO-Synthase wird die Wirkung von Hitzestress und Verwundung auf antioxidative Enzyme im Phloemsaft teilweise unterdrückt **51**

3.7 Abnahme der Proteinkonzentration im Phloemsaft *in vitro* nach Oxidation der Phloemproteine und *in vivo* nach Induktion einer Pflanzenreaktion **54**

4 DISKUSSION **57**

4.1 cDNA-AFLP als Methode zur Identifizierung von Transkripten, die nach Induktion einer Pathogenresistenz systemisch im Phloem transportiert werden **57**

Untersuchungen zur Rolle von NO bei Signaltransduktionen im Phloem

4.2 Salicylsäure und H_20_2 induzieren in den Geleitzellen des Phloems die Produktion von NO durch eine NO-Synthase **61**

4.3 Influx von NO in die Siebelemente und Bindung an Phloemproteine **66**

4.4 In den Siebelementen hemmt NO die Aktivität der antioxidativen Enzyme Ascorbatperoxidase und Superoxiddismutase **69**

4.5 Redoxsensitive Proteine als Indikatoren für eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies im Phloemsaft infolge der Hemmung antioxidativer Enzyme durch NO **73**

5 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY **77**

6 LITERATUR **80**

7 ANHANG **88**

Abkürzungen

APX	Ascorbatperoxidase
BION®	chemischer Induktor von Pathogenresistenz
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazolcarbothionsäure-S-methylesther (Wirkstoff in BION®)
CC	Geleitzelle des Phloems (*companion cell*)
cDNA-AFLP	*complementary DNA-amplified fragment length polymorphism*
DAF-2DA	4,5-Diaminofluoreszeindiacetat (NO-spezischer Fluoreszenzfarbstoff)
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure (chemischer Resistenzinduktor)
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
EST	*expressed sequence tag*
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSNO	Nitrosoglutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h.a.t.	Stunden nach der Behandlung (*hours after treatment*)
JA	Jasmonsäure
K	Kontrolle
L-NAME	N^G-Nitro-L-argininmethylesther.HCl (Inhibitor der NO-Synthase)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
$ONOO^-$	Peroxynitrit
POD	Peroxidase
PP	Phloemparenchym
PP1/PP2	Phloemproteine 1 und 2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch aktivierte Resistenz gegen Pathogene
SE	Siebelement des Phloems (*sieve element*)
SNP	Sodiumnitroprussid (NO-Donor)
SOD	Superoxiddismutase
SWR	systemische Wundreaktion
WP	BION®-Kontrolle (*wettable powder*)

1 EINLEITUNG

Die Pflanze muss ihre Reaktionen auf äußere Einflüsse zwischen entfernten Geweben und Organen koordinieren. Dabei werden Signale zum Teil über große Distanzen transportiert. In der Literatur wird häufig das Phloem als mögliche Transportroute für solche systemischen Signale angeführt. Gut untersucht sind in diesem Zusammenhang die systemisch aktivierte Resistenz (SAR) nach lokalem Pathogenbefall und die systemische Wundreaktion (SWR) nach Verletzung eines einzelnen Blattes.

Obwohl in Phloemexsudaten diverser Pflanzen potenzielle Signalmoleküle gefunden wurden, konnte nur in wenigen Fällen ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Transport dieser Substanzen und dem Auslösen einer Pathogenresistenz oder einer Wundreaktion im distalen Gewebe gezeigt werden. Bisher wurde weder ein systemisches Signal zweifelsfrei identifiziert noch die Transportroute genau definiert. Eine gezielte Suche nach Signalen, die im Phloemsaft nach Resistenzinduktion und Verwundung transportiert werden, wird durch die schlechte Zugänglichkeit des Phloems erschwert.

Neben der Identifizierung von Signalmolekülen im Phloem ist die nähere Untersuchung von Funktionen dieses Gewebes bei systemischen Signaltransduktionen ein weiteres wichtiges Forschungsziel. Es zeichnet sich ab, dass Signalmoleküle im Massenstrom der Assimilate nicht unspezifisch in der Pflanze verteilt, sondern selektiv und gerichtet transportiert werden. Außerdem scheint das Phloem selbst Ort der Synthese von Signalen, Transportproteinen und anderen Elementen von Signalkaskaden zu sein. Daher verspricht eine Fokussierung auf das Phloem nicht nur neue Erkenntnisse zur systemischen Signaltransduktion in SAR und SWR, sondern auch tiefere Einsichten in die Zellbiologie dieses wichtigen Transportgewebes.

1.1 Das Phloem

Phloem und Xylem bilden das Vaskularsystem, in dem Assimilate und Wasser innerhalb der Pflanze verteilt werden. Das Phloem besteht aus den Phloemparenchym- (PP), Geleit- (CC, *companion cell*) und Siebelementzellen (SE, *sieve element*).

Der SE/CC-Komplex entwickelt sich aus einer gemeinsamen Mutterzelle zur Transporteinheit des Phloems (van Bel 2003). Während die CCs die gesamte zelluläre Ausstattung haben, besitzen die SEs nur ein dünnes parietales Zytoplasma, in dem es keinen

Zellkern und nur wenige Organellen gibt. Durch die metabolisch hochgradig aktiven CCs werden die SEs am Leben gehalten (van Bel und Knoblauch 2000). Sie verbinden sich durch partielle Zellwandauflösungen, den Siebplatten, miteinander zu Siebröhren, in denen der Phloemsaft transportiert wird. Dabei ist das osmotische Potential der Assimilate die Triebkraft des Massenstroms von photosynthetisch aktiven Geweben in junge und in nicht grüne Pflanzenteile (Münch 1930). In den Siebröhren findet man neben den Assimilaten auch Phytohormone, Peptide, Makromoleküle und andere Substanzen. Das führte zu Spekulationen über eine mögliche Rolle des Phloems in systemischen Signaltransduktionsprozessen (Thompson und Schulz 1999, Oparka und Santa Cruz 2000, Ruiz-Medrano et al. 2001, van Bel et al. 2002, van Bel 2003) . Besonders dem Transport von Phloemproteinen wurde große Aufmerksamkeit gewidmet.

Die CCs und SEs stehen kaum mit dem umliegenden Gewebe in Verbindung, bilden aber untereinander in großer Zahl sogenannte Pore-/Plasmodesmos-Einheiten (PPU) aus. Über diese Zellkontakte findet nicht nur ein Influx von Molekülen aus CCs in die SEs, sondern ein reger Austausch zwischen diesen Zellen statt. Dies haben Versuche mit Phloemproteinen, die *in vivo* mit radioaktivem ^{35}S markiert wurden, gezeigt (Fisher et al. 1992, Sakuth et al. 1993). Proteine sind für die Passage von PDs in der Regel zu groß. Um die Frage zu beantworten, wie trotzdem Makromoleküle von CCs in SEs gelangen können, wurden Coinjektionen von Phloemproteinen und Dextranen als Größenmarker in das Mesophyll durchgeführt (Balachandran et al. 1997, Ishiwatari et al. 1998).

Daraufhin stieg das SEL (*size exclusion limit*) der Mesophyll-PDs von etwa 1 kDa auf 20-40 kDa. Daraus schlossen die Autoren, dass auch PPUs unter dem Einfluss von Phloemproteinen wahrscheinlich ein permanent erhöhtes SEL haben. Das wurde in weiteren Versuchen mit Dextranen und GFP bestätigt (Kempers und van Bel 1997, Imlau et al. 1999, Oparka et al. 1999). Solch ein ungewöhnlich großes SEL ermöglicht den Übertritt von Proteinen in die SEs. Auf der anderen Seite wurde die Tatsache, dass die Fremdmoleküle GFP und Dextrane in die Siebröhren gelangen konnten, als Argument gegen einen selektiven Transport durch die PPUs gewertet (Oparka and Santa Cruz 2000). Auch aufgrund der großen Anzahl von Phloemproteinen ohne ersichtliche Funktion in den SEs wurde ein unspezifischer Phloemtransport angenommen (Oparka and Santa Cruz 2000).

Nachdem allerdings Proteomics-Ansätze mit Phloemexsudaten aus *Cucurbitaceae* (Haebel and Kehr 2001, Walz et al. 2004) und *Ricinus communis* (Barnes et al. 2004) zur Identifizierung vieler Proteine geführt hat, offenbart sich nun die im Vergleich zu den CCs einzigartige Zusammensetzung der Proteine in den SEs. So wurden z.B. nur 5 Kinasen

gefunden, während in anderen Zellen mehrere Tausend Kinasen vorkommen (Yoo et al. 2002). Insgesamt wurden besonders viele Proteine identifiziert, die mit oxidativem Stress, Abwehr und Signalübertragung zu tun haben (Walz et al. 2002, Barnes et al. 2004, Walz et al. 2004) während Enzyme der Photosynthese unterrepräsentiert sind.

Neueste Forschungsergebnisse legen einen komplexen Transport von Makromolekülen durch PPUs nahe, in dessen Verlauf die Proteine an Cofaktoren und Rezeptoren binden, sich das SEL erhöht und die Proteine im entfalteten Zustand aktiv transportiert werden (Lucas et al. 2001, Oparka et al. 2004). Diese Mechanismen wurden in der Arbeitsgruppe von W. L. J. Lucas detailiert erforscht. So wurde für den Transkriptionsfaktor KNOTTED1 ein Motiv zur Erhöhung des SEL gefunden sowie ein Transport-Motiv postuliert (Kragler et al. 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass Proteine vor dem Transport durch PDs entfaltet werden müssen (Kragler et al. 1998). Diese Änderung der Konformation könnte durch Hsp70-Isoformen mit Chaperon-Funktionen geschehen (Aoki et al. 2002). Als ein essentieller Faktor für den Transport von Phloemproteinen wurde das Protein NtNCAPP1 identifiziert. Es ist im endoplasmatischen Retikulum nahe der PD's verankert und scheint Proteine zu PD's hin aber nicht hindurch zu leiten (Lee et al. 2003).

RNA wird an Proteinen wie CmPP16 (Xoconostle-Cázares et al. 1999) oder Chaperone (Aoki et al. 2002) gebunden wahrscheinlich ebenfalls selektiv durch die PPUs geschleust (Lucas et al. 2001, Oparka et al. 2004). Für niedermolekulare Signale könnte ein ähnliches Prinzip gelten. Beispielsweise wird das Lipidtransportprotein DIR1 in CCs synthetisiert und in den SEs transportiert. Es könnte ein für die SAR essentielles Lipidsignal systemisch im Phloem transportieren (Kap. 1.2). Dieses Modell würde implizieren, dass alle an Proteine gebundenen Signale selektiv in die SEs transportiert werden. Ayre et al. (2003) schlagen einen alternativen Mechanismus für den selektiven Transport kleiner Moleküle vor: Alle kleinen Moleküle gelangen ungehindert durch die PPUs, werden aber nur transportiert, wenn sie ein Motiv besitzen, das einen Export aus den SEs verhindert (Retentionsmechanismus).

Diese komplexen Selektions- und Transportmechanismen stützen die These, dass im Phloem wichtige systemische Signalprozesse ablaufen. Dabei werden in den CCs Signale, Transportproteine und Enzyme synthetisiert, die PPUs gewährleisten die Selektivität der Signalübertragung und die SEs vermitteln den effizienten Langstreckentransport. Hinweise auf das Phloem als Transportstrecke für systemische Signale gibt es vor allem für die SAR und SWR (Abb. 1.1.1 A, Kap. 1.2, 1.3). So wurden in Pfropfungsversuchen mit Wurzelstöcken, an denen ein einzelnes ausgewachsenes Blatt infiziert oder verletzt worden war, in den Reisern eine Resistenz bzw. Wundreaktion induziert (Jenns und Kuć 1979, Tuzun

und Kuć 1985, McGurl et al. 1994, Vernooij et al. 1994, Li et al. 2002). In anderen Experimenten, in denen der Phloemtransport pharmakologisch oder physikalisch (z.B. durch Ringeln, Abb. 1.1.1 B) unterbrochen wurde, konnten keine systemischen Effekte ausgelöst werden (Ross 1961, Jenns und Kuć 1979, Guedes et al. 1989, Narváez-Vásquez et al. 1995). Daraus wurde geschlossen, dass Signale im Massenstrom des Phloems von photosynthetisch aktiven Blättern in junge Zucker-importierende Pflanzenteile gelangten .

Allerdings fanden Kiefer und Slusarenko (2003) Abweichungen zwischen der Ausbreitung der SAR, erkennbar an einer erhöhten Expression von PR (*pathogenesis related*) Genen, und der vorherrschenden Transportrichtung ^{14}C-markierter Assimilate im Phloem. Außerdem wurde nach Inokulation eines jungen Blattes von *A. thaliana* mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* innerhalb von 6 h eine Expression von SAR-Markergenen in älteren Blättern detektiert (Alvarez et al. 1998), d.h. es fand ein Signaltransport entgegen dem Assimilatstrom statt (Abb. 1.1.1 A). Wie lassen sich diese Ergebnisse mit einer vermuteten systemischen Signalübertragung im Phloem vereinbaren?

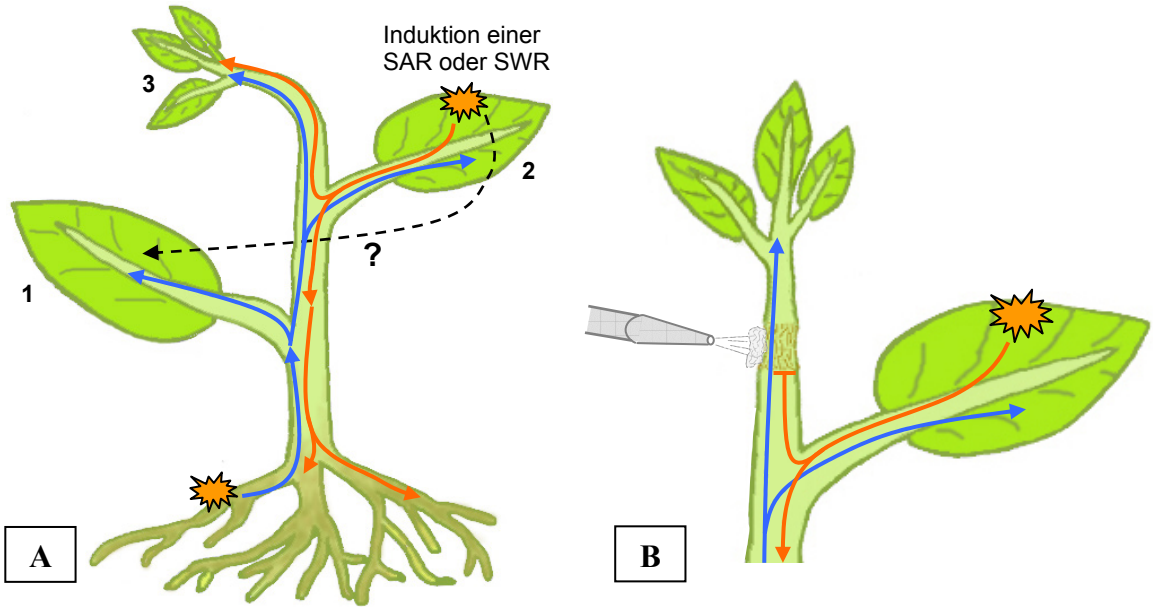


Abb. 1.1.1 Phloem und Xylem als Transportrouten für systemische Signale. **A** Der systemische Signaltransport von der Wurzel in den Spross läuft wahrscheinlich im Xylem ab. Zum Beispiel lösen das nichtinfektiöse Bakterium *Pseudomonas fluoreszenz* und der endophytische Pilz *Piriformospora indica* nach Besiedlung der Wurzel in der gesamten Pflanze eine Pathogenresistenz aus. Nach Induktion einer SAR oder SWR wird ein Signal systemisch im Phloem von einem Assimilat-exportierenden Blatt (2) in Zucker-importierende Pflanzenteile wie die Wurzel und junge Blätter (3) aber nicht in andere ausgewachsene Blätter (1) transportiert. Wie Signale von einem ausgewachsenen Blatt in ein anderes gelangen können, ist noch unbekannt (schwarzer Pfeil). **B** Das Ringeln von Spross und Petiolen mit heißem Wasserdampf unterbricht den Phloem- aber nicht den Xylemtransport. Mit dieser Methode kann die Transportroute systemischer Signale definiert werden. Blauer und roter Pfeil, Xylem- und Phloemtransport; Stern, Induktion einer systemischen Pflanzenreaktion

Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene ist ein kürzlich entdeckter Richtungs-selektiver Transport im Phlom (Aoki et al 2005): Das Phloemprotein CmPP16-1 akkumuliert,

wenn es an Cofaktoren bindet, in der Wurzel, obwohl nur 10 % der Assimilate aus den Blättern in die Wurzel und der Rest in den Spross fließen. Die Mechanismen dieses gerichteten Transports im Phloem sind noch unbekannt. Denkbar wäre ein aktiver Transport entlang des parietalen endoplasmatischen Retikulums in den SEs (Aoki et al. 2005).

Um eine Verteilung systemischer Signale in der gesamten Pflanze zu gewährleisten, könnten in der Pflanze auch verschiedene Transportrouten vernetzt sein. Beispielsweise könnte es einen Austausch von Signalen zwischen Phloem und Xylem geben. Eine Funktion des Xylems beim Signaltransport wird für die ISR (induzierte systemische Resistenz) angenommen. Diese Pathogenresistenz wird im Spross nach Befall der Wurzel durch das nichtinfektiöse Bakterium *Pseudomonas floureszenz* ausgelöst (Pieterse et al. 1996). Der Signaltransport von der Wurzel in den Spross erfolgt wahrscheinlich im Xylem (Abb. 1.1.1 A). Ähnliches gilt für den Pilz *Piriformospora indica*, ein Wurzelendophyt, der in den Blättern von Gerstenpflanzen eine Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* auslöst (Waller et al. 2005). Unabhängig vom Vaskularsystem der Pflanze sind Gase wie Methyljasmonat (Farmer und Ryan 1990), Methylsalicylat (Shulaev et al. 1997) und Ethylen an systemischen Signaltransduktionen beteiligt.

1.2 Die Systemisch Aktivierte Resistenz gegen Pathogene

Nach Infektion eines einzelnen ausgewachsenen Blattes kann gelegentlich bei ursprünglich anfälligen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen einen nachfolgenden Pathogenbefall distaler Blätter beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde als systemisch aktivierte Resistenz bezeichnet (SAR, Ross 1961). Charakteristisch für die SAR ist, dass sie wochenlang anhält und gegen viele unterschiedliche Pathogene wirkt (Ryals et al. 1996). Ausgangspunkt der „Immunisierung“ ist der Tod befallener Zellen als Krankheitssymptom (Nekrose) oder als Folge einer Abwehrreaktion (HR, hypersensitive Reaktion).

In der Folge werden Signale über lange Distanzen transportiert und lösen in systemischen Geweben die Expression von PR Genen aus. Dabei werden je nach Pflanze unterschiedliche SAR Markergene angeschaltet. Es gilt als allgemein akzeptiert, dass der Langstreckentransport des SAR-Signals im Phloem abläuft (Abb. 1.1.1 A). Hierfür sprechen Pfropfungsversuche, in denen vom infizierten Stock ausgehend im gesunden Reiser eine SAR induziert wurde. Die jungen Blätter des Reisers werden über das Phloem von den photosynthetisch aktiven Blättern des Wurzelstocks mit Assimilaten versorgt. Wahrscheinlich wird im

Assimilatstrom vom infizierten Blatt des Stocks in den Reiser ein Signal importiert, das die Resistenz auslöst (z.B. Jenns und Kuć 1979, Tuzun und Kuć 1985, Vernooij et al. 1994).

Guedes et al. (1980) ringelten mit heißem Wasserdampf Stengel oder Petiolen, um auf diese Weise den Phloem- aber nicht den Xylemtransport zu unterbrechen (Abb. 1.1.1 B). Wenn die Petiole geringelt worden war, konnte durch die Inokulation eines ausgewachsenen Blattes mit dem pathogenen Pilz *Colletotrichum lagenarium* in Gurkenpflanzen keine SAR mehr ausgelöst werden. Das spricht dafür, dass das SAR-Signal im Phloem aus dem befallenen Teil der Pflanze exportiert wird. Der Import des Signals in distales Gewebe läuft ebenfalls im Phloem ab, wie das Ringeln der Petiolen systemischer Blätter zeigte. Auch die Beobachtung, dass die SAR in dem Blatt am stärksten ist, welches direkt mit dem befallenen Blatt über das Vaskularsystem verbunden ist, deutet auf eine Kommunikation über das Phloem hin (Shulaev et al. 1995, Kiefer und Slusarenko 2003). Obwohl man weiß, wo man suchen muss, konnte bisher noch kein systemisches Signal sicher identifiziert werden.

Ein essentielles Signalmolekül in der SAR ist die Salicylsäure (SA). Sie akkumuliert am Ort der Infektion und auch in systemischen Geweben. Als SA im Phloem nachgewiesen wurde, hielten einige Autoren dieses Phytohormon für das systemische Signal (Malamy et al. 1990, Métraux et al. 1990, Yalpani et al. 1991, Uknes et al. 1992). Um diese These zu überprüfen wurden Versuche mit transgenen NahG Tabakpflanzen, die ein bakterielles SA-abbauendes Enzym produzieren, durchgeführt. Dabei trat in Wildtyp-Reisern, die auf NahG Wurzelstöcke gepfropft worden waren, eine SAR auf, obwohl die infizierten Blätter der Wurzelstöcke nicht in der Lage waren, SA zu akkumulieren. NahG Reiser konnten dagegen auch auf Wildtyp-Wurzelstöcken keine SAR entwickeln. Diese Ergebnisse zeigten, dass SA zwar essentiell für die Resistenzinduktion im systemischen Gewebe ist (Gaffney et al. 1993, Vernooij et al. 1994), aber wahrscheinlich nicht als systemisches Signal in Frage kommt (Vernooij et al. 1994).

In anderen Studien wurde das infizierte Blatt noch vor dem Anstieg der SA-Konzentration am Infektionsort entfernt. Dennoch akkumulierte SA in distalen Geweben und es kam zur Ausprägung der SAR (Rasmussen et al. 1991, Smith-Becker et al. 1998). Willits and Ryals (1998) konnten außerdem in Tabak am Ort der Erstinfektion nur sehr geringe SA-Konzentrationen messen. Die Akkumulation von SA im befallenen Blatt wäre jedoch eine Voraussetzung für einen systemischen Transport dieses Phytohormons im Phloem. Die erhöhte SA-Konzentration im Phloem nach einer Pathogenattacke scheint nicht von einem Transport der SA aus dem infizierten Blatt, sondern vielmehr von einer SA-Synthese im Vaskularsystem selbst herzurühren (Smith-Becker et al. 1998). In diesem Fall würde die SA-

Produktion im Phloem vermutlich durch ein systemisches Signal induziert und könnte eine Funktion bei der Amplifikation des Signals haben. Andererseits wurde ein systemischer Transport von radioaktiv markierter SA im Phloem und die Akkumulation der SA im distalen Gewebe überzeugend demonstriert (Shulaev et al. 1995, Mölders et al. 1996). Aufgrund dieser Widersprüche bleibt die Rolle der SA als systemisches Signal umstritten.

Eine SAR-ähnliche Resistenz kann in Dikotyledonen durch die SA-Analoga 2,6-Dichloroisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazolcarbothionsäure-S-methyester (BTH, Wirkstoff in BION®) induziert werden. Diese Substanzen wirken wahrscheinlich im Signalweg nach oder anstelle von SA (Delaney et al. 1995, Lawton et al. 1996). In Monokotyledonen ist SAR nicht eindeutig nachgewiesen worden (Kogel und Langen 2005). Durch die oben genannten Chemikalien wird allerdings auch in Monokotyledonen eine chemisch induzierte Resistenz ausgelöst (Kogel et al. 1994, Görlach et al. 1996, Kogel und Langen 2005). Sie ist in Gerste durch die Expression spezieller BCI (*barley chemically induced*)-Gene gekennzeichnet (Beßer et al. 2000).

Auf der Suche nach Komponenten der systemischen Signalkaskade wurde vor kurzem in *Arabidopsis*-Mutanten mit einer konstitutiven Pathogenresistenz ein Enzym mit Aspartat-Protease-Funktion identifiziert (Xia et al. 2004). Die lokale Induktion von *CDR1* (*constitutive disease resistance 1*) führte zu einer systemischen Expression der SAR-Markergene *PR1* und *PR2*. Wahrscheinlich setzte die Protease aus einem Vorläuferprotein ein 3-10 kD großes Peptid frei, das systemisch transportiert wurde und eine SAR auslöste (Xia et al. 2004). Parallelen zu Systemin, einem Signal in der SWR, sind deutlich erkennbar und lassen eine ähnliche Funktion für das Produkt von CDR1 in der SAR vermuten.

Als guter Kandidat für das SAR-Signal wird ein noch unbekanntes Lipid gehandelt. *Arabidopsis* mit einem Defekt im Gen DIR1 (*defective in induced resistance 1*), das für ein Lipidtransferprotein codiert, konnte keine SAR ausbilden (Maldonado et al. 2002). DIR1-Transkripte wurden in CCs von Arabidopsis, aber nicht in benachbarten Geweben gefunden (Ivashikina et al. 2003) und das Protein im Phloemsaft detektiert (Maldonado et al 2002). DIR1 könnte in der SAR eine Funktion als Phloem-spezifischer Transporter eines systemischen Lipid-Signals haben (Maldonado et al. 2002, Kumar und Klessig 2003). Auch die Entdeckung, dass das für die SAR essentielle SA-bindende Protein SABP2 eine Lipase-Aktivität aufweist (Kumar und Klessig 2003), passt in dieses Modell. Lipidsignale könnten aber auch nichtenzymatisch entstehen, wenn SA-Radikale, die nach Hemmung der Catalase (Chen et al. 1993) und Ascobatperoxidase (Durner und Klessig 1995) durch SA freigesetzt werden, Membranlipide oxidieren (Klessig et al. 2000).

1.3 Die Systemische Wundreaktion

Modellpflanzen für die Erforschung der systemischen Wundreaktion sind die Tomate, Tabak und andere Mitglieder der *Solanaceae*. Nach Verwundung eines Blattes dieser Pflanzen durch herbivore Insekten wird systemisch die Expression von Genen für Proteinase-Inhibitoren (PI) und weiteren Abwehrgenen ausgelöst. Als wichtige Signalmoleküle wurden JA (Farmer und Ryan 1992) und Systemin (Pearce et al. 1991) identifiziert.

Systemin ist ein 18 Aminosäuren großes Polypeptid, das nach Verwundung von Prosystemin (200 Aminosäuren) abgespalten wird. Nach der Bindung an den Rezeptor SR160 (Meindl et al. 1998, Scheer und Ryan 1999) kommt es zur Freisetzung von Linolensäure aus Membranen durch eine Phospholipase. Gleichzeitig wird der Oktadekanoid-Metabolismus aktiviert und Linolensäure u.a. durch das Enzym Lipoxygenase zu JA umgesetzt. JA oder andere Produkte des Oktadekanoid-Metabolismus induzieren im Zusammenspiel mit Ethylen (O`Donnell et al. 1996) und H_2O_2 als *second messenger* (Orozco-Cárdenas et al. 1999, 2001) die Expression von Abwehrgenen einschließlich der PI-Gene. Auch ABA ist an diesen Signalprozessen beteiligt (Peña-Cortés et al. 1995). SA ist ein Antagonist des JA-Signalweges (Peña-Cortés et al. 1993, Kunkel und Brooks 2002).

Systemin wurde, wie dem Namen zu entnehmen ist, mit systemischen Effekten von Verwundung in Verbindung gebracht. Es wurde im Phloemsaft von Tomatenpflanzen nachgewiesen (Narváez-Vásquez et al. 1995), außerdem konnte die systemische Verteilung radioaktiv markierten Systemins durch PCMBS, einen Inhibitor des Phloem-Transports von Sucrose, unterbunden werden (Narváez-Vásquez et al. 1995). Untersuchungen an transgenen Pflanzen zeigten, dass die Expression des Prosystemin-Gens mit der Induktion der SWR korrelierte. Bei einer verringerten Expression konnte keine SWR induziert werden (McGurl et al. 1992). Pflanzen, die das Gen konstitutiv exprimierten, wiesen eine größere Menge an PI-Transkripten und eine SWR auf, wobei das systemische Signal in Pfropfungsversuche auch in einen Wildtyp-Reiser transportiert wurde (McGurl et al. 1994).

Insgesamt ergibt sich aus diesen Experimenten eine gute Beweislage für einen systemischen Transport des Systemins im Phloem (Abb. 1.1.1 A). Jüngste Ergebnisse aus Pfropfungsversuchen mit zwei JA-Signalwegmutanten legen jedoch nahe, dass JA und nicht Systemin das essentielle systemische Signal in der SWR ist (Li et al. 2002). Die Tomaten-Mutante *spr-2* ist nicht in der Lage, JA zu synthetisieren. Ein Wildtyp-Reiser exprimiert nach Verwundung eines Blattes am Wurzelstock dieser Mutante nicht das PI-II-Gen, bei umgekehrter Pfropfung wird das Abwehrgen dagegen induziert. Die zweite Pflanzenlinie *jai-1*[2] kann JA nicht perzipieren, d.h. nach Verwundung oder Behandlung mit JA werden keine PI

gebildet. Wird nun ein *jai-1*^{2} –Reiser auf einen Wurzelstock mit konstitutiver Prosystemin-Synthese gepfropft, ist keine Induktion von PI-II festzustellen, dies ist dagegen im *spr-2* – Reiser der Fall.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die JA-Synthese an der Verwundungsstelle, aber nicht im systemischen Gewebe Vorraussetzung für die Etablierung einer SWR ist. Da gleichzeitig JA für die Geninduktion in systemischen Blättern notwendig ist, muss ein Transport von JA oder anderen Oxylipinen aus dem verwundeten in den unverletzten Teil der Pflanze stattfinden. Der Phloemtransport von JA und Linolensäure ist bereits seit längerem bekannt (Anderson 1985, Avdiushko et al. 1994, Zhang und Baldwin 1997). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl Prosystemin (Narváez-Vásquez und Ryan 2004) als auch JA (Stenzel et al. 2003) in den Phloemparenchymzellen produziert werden, wurde die Interaktion der beiden Hormone in einem Modell zusammengefasst: Systemin und JA entstehen in den Phloemparenchymzellen an der Wundstelle und gelangen von dort in das Phloem. Durch den Transport beider Signale wird die JA-Synthese durch Systemin nicht nur lokal induziert, sondern es findet eine Signalamplifikation und -propagation entlang der gesamten Transportroute in die systemischen Blätter statt (Li et al. 2002, Ryan und Moura 2002, Lee und Howe 2003, Stenzel et al. 2003).

Während Systemin oder ähnliche Peptide nur aus den Solanaceen bekannt sind, hat JA in vielen Pflanzen eine Funktion in der Wundreaktion. Auch für die SWR von *Arabidopsis* ist JA als Signalmolekül unerlässlich. Die lokalen Wundreaktion ist dagegen abhängig von Ethylen, das in *Arabidopsis* im Gegensatz zu den *Solanaceae* ein Antagonist von JA ist und die JA-induzierter Gene supprimiert (Rojo et al. 1999). Chang et al. (2004) beschrieben einen weiteren Signalweg, in den weder JA noch Ethylen und ABA involviert sind. An einer systemischen Wundreaktion ohne JA, Ethylen und ABA könnten elektrische Signale im Phloem (Wildon et al. 1992) und Druckwellen im Xylem (Malone und Stankovic 1991) beteiligt sein. Solche physikalischen Signale konnten bisher noch nicht überzeugend in bereits vorhandene Forschungsergebnisse und daraus abgeleitete Modelle integriert werden. Diese extrem schnell fortgeleiteten Signale könnten frühe Ereignisse, wie die systemische Induktion eines MAP-Kinase-Gens 1 Minuten nach der Verwundung (Seo et al. 1995), induzieren.

1.4 Potenzielle Abwehr- und Resistenzsignale im Phloem

Mit den Phytohormonen SA, JA, Systemin und anderen Peptiden sowie Lipidsignalen wurden bereits Kandidaten für systemische Signale angeführt. Andere Signalmoleküle wurden bisher eher mit lokalen Pflanzenreaktionen in Verbindung gebracht oder im Phloem gefunden und noch nicht auf eine Rolle in der Etablierung der SAR und SWR untersucht.

1.4.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffoxidspezies

Nach biotischem und abiotischem Stress entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die einerseits in hohen Konzentrationen toxisch für die Pflanzenzelle sind, aber andererseits auch wichtige Funktionen in Abwehr und Resistenz haben (Grant und Loake 2000, Hückelhoven und Kogel 2003). Neben ihrer direkten Wirkung als Abwehrstoffe gegen Pathogene und Schädlinge sind ROS an der Bildung von Zellwandverstärkungen und Papillen sowie an der hypersensitiven Reaktion beteiligt. Als Signal induzieren ROS Abwehrgene sowohl lokal wie auch systemisch in der SAR (Alvarez et al. 1998, Chamnongpol et al. 1998) und SWR (Orozco-Cárdenas et al. 1999, 2001).

Bei der Induktion von PR-Genen scheint H_2O_2 in der Signalkaskade vor SA zu liegen, da transgenen Pflanzen, die SA-abbauende Enzyme bilden, auch durch hohe Konzentrationen an H_2O_2 keine Expression von SAR-Genen induziert werden kann (Bi et al. 1995, Neuenschwander et al. 1995). Konstitutiv H_2O_2 produzierende transgene Kartoffelpflanzen weisen erhöhte SA-Konzentrationen, eine Induktion von Abwehrgenen und eine erhöhte Pathogenresistenz auf (Wu et al. 1995, 1997), ähnliches gilt für Transgene mit einer verminderten Aktivität der H_2O_2 abbauenden Enzyme Catalase und Ascorbatperoxidase (Chamnongpol et al. 1998, Mittler et al. 1999).

In der Wundreaktion wird die PI-Synthese durch H_2O_2 induziert und durch Inhibitoren der NADPH-Oxidasen unterdrückt (Orozco-Cárdenas et al. 1999). Die H_2O_2-Produktion wiederum wird durch JA ausgelöst und benötigt einen funktionierenden Oktadekanoid-Metabolismus. Pflanzen mit einem konstitutiv aktiven Prosystemin-Gen akkumulieren H_2O_2 und exprimieren PI-Gene. Interessanterweise wurden in diesen Pflanzen keine PR-Transkripte gefunden (Orozco-Cárdenas et al. 1999). Für die oben beschriebenen Transgene mit erhöhter H_2O_2 Konzentration wurde entsprechend keine PI-Expression beschrieben. Möglich wäre eine solche spezifische Steuerung der Genexpression, wenn ROS nur indirekt oder in Kombination mit weiteren Signalen wirken.

Alvarez et al. (1998) schlugen eine umfassende Bedeutung von H_2O_2 in der SAR vor. In ihren Experimenten löste die Inokulation von *A. thaliana* mit einem avirulentem Bakterium

zuerst eine starke ROS-Produktion, die als „*oxidative burst*“ bezeichnet wurde, und eine lokale HR und danach systemische sogenannte *micro-bursts* und *micro-HRs* aus. Als SAR-Signal vermuteten die Autoren H_2O_2. Auch für SAA (*systemic acquired acclimation*) nach Inkubation eines Blattes in Starklicht wurde H_2O_2 als systemisches Signal diskutiert (Karpinski et al. 1999). Die Quelle für ROS in SEs könnten, wie für die systemische Wundreaktion (SWR) und für die SAA beschrieben, Bündelscheidenzellen sein (Karpinski et al. 1999, Orozco-Cárdenas et al. 1999). Aber auch eine Synthese von H_2O_2 im SE ist denkbar, da eine SOD-Aktivität bereits im Phloemsaft von *C. maxima* detektiert werden konnte (McEuen und Hill 1982, Walz et al. 2002). Bisher wurden allerdings weder die Konzentrationen von H_2O_2 noch anderer ROS in Phloemexsudaten gemessen.

Neben den reaktiven Sauerstoffspezies finden auch reaktive Stickstoffoxidverbindungen zunehmend Beachtung als potenzielle Stress- und Resistenzsignale. So wurde in Tabakzellen durch Hitze, hyperosmotischen Stress und Salz eine NO-Produktion ausgelöst (Gould et al. 2003). In *Arabidopsis* konnte eine starke Akkumulation von NO nach Verwundung gemessen werden (Huang et al. 2004). Im Gegensatz dazu entsteht in verwundeten Tomatenpflanzen kein NO, die Wundreaktion wird sogar durch NO-Donoren herunterreguliert (Orozco-Cárdenas et al. 2002). Unumstritten ist, dass NO an der Induktion der HR beteiligt ist (Clarke et al. 2000, Prats et al. 2005). H_2O_2 kann eine HR nur in Interaktion mit NO auslösen (Delledonne et al. 1998 und 2001, de Pinto et al. 2002). Auch bei der Papillenbildung (Prats et al. 2005) und als Signal in der Pathogenresistenz (Guo et al. 2004, Zeier et al. 2004, Xu et al. 2005 b) spielt NO eine Rolle.

Versuche, in denen NO-Donoren und eine tierische NO-Synthase (NOS) injiziert wurden, zeigten, dass durch NO die Synthese von SA und die Expression von Abwehrgenen angeschaltet werden (Durner et al. 1998). Mit cGMP und cADPR konnte dieser Effekt auch für weitere Elemente der aus tierischen und menschlichen Systemen bekannten NO-Signalkaskade gezeigt werden. Mittlerweile wurde in *Arabidopsis* das Gen für eine induzierbare NOS sequenziert. Diese iNOS ist in die Signalübertragung durch Hormone und in die Induktion von Abwehrgenen nach Behandlung der Pflanze mit Lipopolysaccharid-Elicitoren involviert (Guo et al. 2003, Zeidler et al. 2004). Neben den NOS ist die Nitratreduktase ein weiteres wichtiges NO-produzierendes Enzym (Desikan et al. 2002).

Es wird spekuliert, dass NO als Phloem-mobiles Signal an der SAR beteiligt sein könnte (Durner und Klessig 1999, Song und Goodman 2001). Dazu kommen die relativ stabilen redoxaktivierten Formen von NO (z.B. Peroxynitrit) in Betracht (Foissner et al. 2000). Wahrscheinlicher ist jedoch eine Nitrosylierung von Proteinen und Thiolen wie Glutathion

(Durner und Klessig 1999, Lindermayr et al. 2005), das im Phloemsaft in hohen Konzentrationen vorkommt (2 mM in *C. maxima*, Alosi et al. 1988, 3 mM in *R. communis*, Szederkényi et al. 1997). Nitrosoglutathion (GSNO) ist ein effektiver Induktor von Abwehrgenen (Durner et al. 1998). Im Vaskularsystem wurde mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF (Diaminofluorescein) bereits eine NO-Synthese nachgewiesen (Corpas et al. 2004, Requena et al. 2005).

1.4.2 Der Redoxstatus

Der Redoxstatus einer Zelle wird reguliert durch die Freisetzung von ROS auf der einen und durch die Aktivität antioxidativer Enzyme sowie durch die Menge und das Verhältnis oxidierter zu reduzierten Antioxidantien auf der anderen Seite. Sowohl die ROS als auch das antioxidative System können über eine Änderung des Redoxstatus Signalfunktion haben. Besonders Glutathion spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Der Redoxstatus des Glutathionpools wird als GSH/GSSG-Verhältnis angegeben. Es wurde gezeigt, dass GSH aber nicht GSSG in Zellkulturen die Abwehrgene CHS und PAL mittels Glutathion-responsiver Promotoren induziert (Dron et al. 1988, Wingate et al. 1988). Glutathion kann außerdem auch unabhängig von seinem Redoxstatus einen Calcium-Influx in das Zytosol auslösen (Gómez et al. 2004).

Zu den Mechanismen der Signaltransduktion durch Änderungen des Redoxstatus gehört die Aktivierung von Ionenkanälen und die Modifikation von Proteinen. Da der Apoplast eine viel geringere antioxidantive Kapazität als das Zytosol hat, entsteht ein steiler Redoxgradient über der Plasmamembran. Eine Veränderung des Redoxstatus auf einer Seite der Plasmamembran kann die Öffnungsfrequenz von Ionenkanälen beeinflussen (Foyer und Noctor 2005). Proteine werden von oxidierenden oder reduzierenden Substanzen vor allem an ihren Cysteinresten durch Thiolierung (Bindung von GSSG), Oxidierung oder Nitrosylierung (Bindung von NO) modifiziert. Dadurch werden die Konformation und Aktivität betroffener Proteine beeinflusst.

Gute Beispiele für redoxsensitive Signalproteine in Pflanzen sind NPR1 und TGA1, die essentiell sind für die Induktion des PR1-Gens und für die Etablierung einer SAR. Im oxidierten Zustand liegt NPR1 als Oligomer im Zytosol vor. Sobald das Redoxpotential der Zelle stark ansteigt, werden über Disulfidbrücken verbundene Cysteine getrennt und NPR1-Monomere freigesetzt (Mou et al. 2003). Die Monomere gelangen in den Zellkern und binden dort an den Transkriptionsfaktor TGA1. Voraussetzung für diese Bindung ist, dass auch TGA1 im reduzierten Zustand vorliegt (Després et al. 2003). Der auf diese Weise aktivierte

Transkriptionsfaktor induziert das PR1-Gen. In der SAR löst SA wahrscheinlich eine Kaskade von Redoxsignalen aus. Nach Pathogenbefall kommt es zur Akkumulation der SA, wodurch eine transiente ROS-Produktion (*oxidative burst*) und als Reaktion darauf eine starke Aktivierung des antioxidativen Systems und entsprechender Gene (*antioxidative burst*) induziert wird (Mou et al. 2003, Foyer und Noctor 2005). Erst wenn der Redoxstatus über das normale Maß ungestresster Zellen hinaus ansteigt, kommt es zur Monomerisierung von NPR1, zur Reduktion von TGA1 und zur Expression von PR1.

Auch die Tatsache, dass in der SAR und SAA das antioxidative System lokal und systemisch reguliert wird spricht für eine wichtige Rolle der Redoxregulation in systemischen Signalprozessen (Fodor et al. 1997, Karpinski et al. 1999). Für einen Transport von Redoxsignalen über lange Strecken kommt vor allem H_2O_2 in Frage (Foyer und Noctor 2005). Es wird vermutet, dass die Hemmung der antioxidativen Enzyme Catalase und Ascorbatperoxidase durch SA und NO dazu dienen, den Transport von H_2O_2 als Signal zu ermöglichen (Chen et al. 1993, Durner und Klessig 1995, Lamb und Dixon 1997, Clark et al. 2000, Zeier et al. 2004). Aber auch GSH, GSSG oder GSNO (s. Kap. 1.4.1) sind potentielle Langstreckensignale. Für ein systemische Translokation von Redoxänderungen sind im Phloem alle Vorraussetzungen gegeben. Walz et al. 2002 wiesen in Siebelement-Säften von Cucurbitaceen ein komplettes antioxidatives System nach und konnten Effekte von Trockenstress auf die Aktivitäten der Enzyme Superoxiddismutase, Dehydroascorbatreduktase und Peroxidase messen. Auch die Antioxidantien Ascorbat und Glutathion sowie die antioxidativen Enzyme Thioredoxin und Glutaredoxin (Schobert et al. 1997, Szederkényi et al. 1997, Franceschi und Tarlyn 2002) sind vorhanden.

1.4.3 Oligopeptide und Proteine

Im Phloem findet in den Geleitzellen die Synthese und in den Siebelementen ein selektiver Transport von Proteinen statt. Die Mechanismen des selektiven Transports sind komplex und deuten auf eine Beteiligung der Proteine an der Signalübertragung im Phloem hin (Kap. 1.1). Dabei haben Proteine Funktionen in der Synthese und dem Transport von Signalmolekülen. Zu den Signal-generierenden oder -modifizierenden Enzymen, die im SE-Saft gefunden wurden, gehören Kinasen (Nakamura et al. 1993, Yoo et al. 2002, Barnes et al. 2004), eine Lipoxygenase (Avdiushko et al. 1994) und antioxidative Enzyme wie Peroxidase, Superoxiddismutase, Thioredoxin und Glutaredoxin (Szederkényi et al. 1997, Ishiwatari et al. 1998, Schobert et al. 1998, Walz et al. 2002, Barnes et al. 2004).

Transportproteine wurden für RNAs, Proteine und Lipide beschrieben. Chaperone wie die HSPs (*heat shock proteins*) und Cyclophiline transportieren wahrscheinlich Proteine und Peptide im Phloem (Aoki et al. 2002, Barnes et al. 2004, Walz et al. 2004). DIR1 ist ein Lipidtransportprotein, das essentiell für die SAR ist (Maldonado et al. 2002). D.h. ein noch unbekanntes im Phloem transportiertes Lipid könnte als systemisches Signal in der SAR fungieren. CmPP16 (Xoconostle-Cázares et al. 1999), CmmPP2, CmmLec17 und ein 14 kD Protein (Gómez et al. 2005) binden und transportieren unspezifisch mRNAs in SEs von *Cucurbitaceae* und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch mRNAs. Sogar ein gerichteter Transport von mRNA in die Wurzel ist mit CmPP16-1 unter Mitwirkung weiterer Proteine als Cofaktoren möglich (Aoki et al. 2005). Auch für small RNAs (Kap. 1.4.4) ist eine Bindung an Proteine notwendig, um im Phloem mobil zu sein. In *C. maxima* hat das Protein CmPSRP1 die Funktion, small RNAs durch PDs und innerhalb der SEs zu transportieren (Yoo et al. 2005).

Proteine und vor allem Peptide könnten aber auch systemische Signale sein. Ein bekanntes Signalpeptid im Phloem ist das Wundsignal Systemin (Pearce et al. 1991); und auch in der SAR wird wahrscheinlich ein Peptid systemisch transportiert (Xia et al. 2004). Über Transkriptionsfaktoren in den Siebelementen ist bisher nichts bekannt. Sie könnten in systemischen Geweben direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen.

1.4.4 RNA

Vor 8 Jahren wurde mit hoch auflösender *in situ*-Hybridisierung die spezifisch in CCs synthetisierte mRNA des Sucrose Transporter 1 (SUT1) in den SEs diverser *Solanaceae* lokalisiert (Kühn et al. 1997). Seitdem wurden im Phloemsaft weiterer Pflanzen mRNAs (Sasaki et al. 1998, Ruiz-Medrano et al. 1999, Doering-Saad et al. 2002) und small RNAs (18-24 Basen, Yoo et al. 2004) gefunden. Da SEs weder einen Kern noch eine Transkriptions- und Translationsmachinerie besitzen, werden den mRNAs im Phloemsaft Signalfunktionen zugeschrieben. Es wird immer deutlicher, dass sich im Phloem ein hochspezialisiertes Signalsystem entwickelt hat, das auf dem systemischen Transport von RNA basiert (Jorgensen et al. 1998, Lucas et al. 2001). Dabei wird mRNA wahrscheinlich an Proteinen wie CmPP16 gebunden selektiv aus den CCs in die SEs geschleust (Xoconostle-Cázares et al. 1999).

Ruiz-Medrano et al. (1999) identifizierten zehn Transkripte im Kürbisphloemsaft, unter ihnen *CmWRKYP*, *CmNACP* und *CmGAIP*. WRKY-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, von denen einige in die Pathogenabwehr und SAR involviert sind. Bisher wurden

allerdings weder Zielgewebe noch eine mögliche Funktion der CmWRKYP-mRNA definiert. Dagegen konnte für *CmNACP* ein systemischer Transport in das Apikalmeristem gezeigt werden. Aber erst in Experimenten mit Transkripten von mutierten Genen, die nach einem Transport im Phloem auffällige Phänotypen in systemischen Blättern verursachten, konnte eine Funktion der mRNA in Siebelementen nachgewiesen werden.

Eine dieser Mutanten ist die natürlich vorkommende Me-Tomatenpflanze, die durch rundliche Fiederblättchen mit einer palmartigen Nervatur gekennzeichnet ist. Ein solcher Phänotyp entwickelt sich auch bei einem Wildtyp-Reiser, der auf einen Me-Wurzelstock gepfropft wurde (Kim et al. 2001). Als systemisch transportiertes Signal wurde die mRNA des durch die Mutation entstandenen PFP-LeT6-Fusionsgens identifiziert. In ähnlicher Weise konnte auch der Phloemtransport von *CmGAIP* und systemische Effekte von semidominanten Mutationen des entsprechenden Gens demonstriert werden (Haywood et al. 2005). GAI kodiert für einen Negativregulator der Giberellinsäure-Wirkung. Wenn Transkripte des mutierten Gens aus dem Wurzelstock in den Wildtyp-Reiser einer Tomatenpflanze transportiert wurden, verursachten sie in wachsenden Fiederblättchen einen dunkelgrünen Phänotyp als Zeichen dafür, dass diese Blätter die Fähigkeit zur Perzeption von GA zurückgewonnen hatten (Haywood et al. 2005).

Jüngste Studien legen außerdem eine Rolle systemisch transportierter mRNA bei der Blühinduktion nahe (Huang et al. 2005). In transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem Gen FLOWERING LOCUS T (FT) hinter einem Hitze-induzierbaren Promotor konnte die Blütenentwicklung durch Inkubation eines einzelnen ausgewachsenes Blattes in 37 °C induziert werden. Mit Hilfe des Reportergens GUS konnte gezeigt werden, dass FT-mRNA vom behandelten Blatt wahrscheinlich *via* das Phloem in den Sprossapex transportiert und dort translatiert wurde (Huang et al. 2005). Generell scheinen ausgewachsene Blätter als Sensoren interne und externe Stimuli zu empfangen und daraufhin mittels systemisch transportierter mRNA die Entwicklung junger Pflanzenteile zu regulieren (Lucas et al. 2001, Haywood et al. 2005, Huang et al. 2005).

Große Aufmerksamkeit hat die Entdeckung erregt, dass Pflanzen in der Lage sind, systemisch und sequenzspezifisch Viren-RNA und transgene RNA zu degradieren. Dieser Prozess wurde SAS (*systemic acquired silencing*) genannt (Palauqui et al. 1997, Voinnet et al. 1998). Mittlerweile sind kleine RNA-Moleküle mit einer Länge von 18-24 Basen als Signale in der lokalen und systemischen posttranskriptionalen Genregulation erkannt worden (Jorgensen et al. 1998, Hamilton und Baulcombe 1999, Mlotshwa et al. 2002, Baulcombe 2004). Dabei wird zwischen siRNA und microRNA unterschieden. Zwar sind ihre Synthese

und auch ihre Funktion bei der Degradation von RNA gleich, aber sie unterscheiden sich in ihrer Herkunft und Ziel-RNA.

MicroRNAs werden von speziellen eigenen Genen kodiert und sind vor allem an der Steuerung von Entwicklungsprozessen aber auch an Stressreaktionen beteiligt. Viele ihrer Ziel-RNAs kodieren für Transkriptionsfaktoren (Baulcombe 2004). Im Gegensatz dazu entsteht siRNA aus doppelsträngiger, transgener oder viraler RNA sowie aus heterochromatischer DNA und Transposons. Diese „irregulären" RNAs und DNAs sind auch gleichzeitig Ziele der Degradation (Baulcombe 2004). siRNAs haben also hauptsächlich eine Funktion in Schutzmechanismen. Es wird vermutet, dass small RNAs am Schutz des Apikalmeristems vor Viren durch eine „Überwachungszone" (surveillance field, Foster et al. 2002) beteiligt sind.

In Pfropfungsversuchen ergaben sich Hinweise darauf, dass das SAS-Signal im Phloem transportiert wird (Palauqui et al. 1997, Voinnet et al. 1998). Schließlich konnten Yoo et al. (2004) sowohl siRNAs als auch microRNAs im Phloemsaft von Kürbispflanzen nachweisen. Außerdem akkumulierten nach Infektion der Pflanze mit einem Virus siRNAs mit Sequenzhomologie zur viralen RNA (Yoo et al. 2004). Es liegt nun nahe small RNAs als systemische Signale anzusehen, dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von Experimenten mit transgenen Pflanzen, die einen viralen Suppressor der small RNA-Synthese exprimierten. Obwohl im Wurzelstock einer solchen Pflanze keine small RNAs detektiert werden konnten, wurde im Wildtyp-Reiser eine SAS induziert (Mallory et al. 2001). Als Kandidaten für das SAS-Signal werden neben den small RNAs aberrante RNAs, doppelsträngige RNAs und mRNA/Protein-Komplexe gehandelt (Mlotshwa et al. 2002).

1.5 Ziele der Arbeit

Diverse Reize können in Pflanzen systemische Effekte auslösen. In den meisten Fällen sind die genauen Mechanismen des Signaltransports und die Natur des systemischen Signals unbekannt. Obwohl das Phloem als wahrscheinliche Transportroute gilt, wurde in diesem Gewebe bisher noch nicht gezielt nach Abwehr- und Resistenzsignalen gesucht. Der Fokus dieser Doktorarbeit lag auf der Identifizierung von Signalen im Phloem nach Verwundung, Induktion einer Pathogenresistenz und abiotischem Stress. Hierzu wurden verschiedenartige methodische Ansätze verwendet.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von RNA als Informationsmolekül im Phloem erkannt. Um eine mögliche Rolle von mRNAs in der Etablierung einer Pathogenresistenz zu erforschen, sollte Phloemsaft aus Gerste mit Hilfe des cDNA-AFLP (cDNA-*amplified fragment length polymorphism*) auf differentiell nach chemischer Resistenzinduktion transportierte Transkripte untersucht werden. Für diese Experimente wurden Gerstenpflanzen eingesetzt, da der cDNA-AFLP zuvor bereits erfolgreich mit Blatt-mRNA von Gerstenpflanzen durchgeführt worden war. Außerdem kann aus Monokotyledonen mit der Blattlaus-Stylektomie hochreiner Phloemsaft gewonnen werden.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer potenziellen Rolle von NO bei der Signalübertragung im Phloem. Die Detektion der NO-Synthese im Phloem sollte mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA erfolgen. Es wurde eine Mikroskopietechnik gewählt, die *in vivo* die Reizung und Beobachtung des Phloemgewebes von *Vicia faba* erlaubte. Mit diversen Elicitoren von Abwehr- und Stressreaktionen sowie mit Modulatoren der NO-Synthese sollte die Quelle der NO-Produktion im Phloem näher lokalisiert und charakterisiert werden.

Vicia faba ist eine Modellpflanze der Phloemzellbiologie, allerdings ist es unmöglich aus dieser Pflanze große Mengen Phloemsaft zu gewinnen. Dagegen wurden mit Kürbispflanzen zahlreiche Studien zur Proteinzusammensetzung und zu Enzymaktivitäten im Phloemsaft vorgenommen. Um eine Bindung von NO an Proteine im Phloemsaft und mögliche Effekte auf Enzyme des antioxidativen Systems festzustellen, wurden daher Experimente mit Phloemexsudaten aus *C. maxima* durchgeführt. In Western Blot-Analysen sollten Nitrosylierungen und Nitrierungen von Phloemproteinen nachgewiesen werden. Nach einer Behandlung des Phloemsaftes mit NO-Donoren oder einer Induktion der NO-Synthese *in vivo* durch Verwundung, chemischer Resistenzinduktion und Hitzestress, sollte außerdem die Wirkung von NO auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme gemessen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Transkriptanalysen wurden mit Phloemsaft aus Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Ingrid) durchgeführt. Die Anzucht erfolgte in 200 ml-Töpfen mit Einheitserde Typ ED73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa). Nach dem Vorkeimen auf nassem Filterpapier wurden je 5 Samen auf der Mittellinie des Topfes ausgelegt und für 9-12 Tage in einer Klimakammer bei 16-18 °C, einer Beleuchtungsdauer von 16 h und einer Lichtenergie von 22 kLux wachsen gelassen.

Als Versuchspflanze für mikroskopische Untersuchungen wurde die Ackerbohne (*Vicia faba* cv. Witkiem Major) verwendet. Das Substrat für diese Pflanzen bestand aus sterilisierter Komposterde, Torf und Sand im Verhältnis 3:3:1, versetzt mit 1 g/l Dünger (Triabon, Compo, Münster). Die Pflanzen wuchsen für 3-5 Wochen in 150 ml-Töpfen unter nicht standardisierten Bedingungen im Gewächshaus auf (Temperatur nachts mindestens 18 °C, tagsüber mindestens 22 °C; Zusatzbeleuchtung 14 h bei 3 kLux).

Biochemische Untersuchungen wurden mit Phloemsaft von Kürbispflanzen (*Cucurbita maxima* cv. Gele Centenaar) vorgenommen. Anzuchtbedingungen und Substrat entsprachen denen von *V. faba*. Die Versuchspflanzen wurden für 3-5 Wochen in 600 ml-Töpfen angezogen. Vor Experimenten mit Hitzestress wurden die Pflanzen für 2 Tage in eine Klimakammer (s. Anzucht der Gerste) gestellt.

2.2 Mikroskopie

Mit Hilfe der sogenannten Fenstermethode konnten Reaktionen der Phloemzellen auf äußere Stimuli *in vivo* verfolgt werden (Knoblauch et al. 1998). Dazu wurde mit einem flachen Schnitt in die mittlere Blattader an der Blattunterseite das Phloem so weit freigelegt, dass nur noch ein oder zwei Zelllagen über den SE/CC-Komplexen lagen. Das Blatt wurde sofort mit Doppelklebeband auf einem Objektträger fixiert und die Schnittfläche mit dem Puffer APO2 (s.u.) bedeckt. Sowohl die Farbstoffe als auch die Chemikalien zum Reizen wurden in APO2 direkt auf das Gewebe gegeben. In den angeführten Versuchen wurde nur mit einem Schnitt, der gleichzeitig als Behandlungs- und Beobachtungsfenster diente, gearbeitet.

Der Farbstoff DAF-2DA (4,5-Diaminofluoresceindiacetat, Axxora, Grünberg) wurde in einer Konzentration von 10 µM in APO2 appliziert. DAF-2DA gilt als Stickstoffmonoxid

(NO)-spezifisch (Foissner et al. 2000) und wird erst in der Zelle nach Abspaltung des Diacetats durch eine zelleigene Esterase aktiviert. Der Farbstoff blieb mehrere Stunden stabil, ohne dass in unbehandelten Pflanzen die Fluoreszenz anstieg. Nach 30 min Inkubation wurde die Färbelösung gegen Puffer ausgetauscht und Kontrollbilder aufgenommen. Die Behandlung mit einem pilzlichen Elicitor und mit diversen Chemikalien erfolgte in analoger Weise. Modulatoren der NO-Synthese (cPTIO, $LaCl_3$, L-NAME, s.u.) wurden in APO2 gemischt und wirkten somit während des gesamten Experiments auf das Gewebe ein.

Für eine hochauflösende Beobachtung der Fluoreszenz in den Phloemzellen wurde ein konfokales Lasermikroskop (TCS SP2 von Leica Microsystems, Bensheim) verwendet. Die Anregungs-Wellenlänge lag für DAF-2DA bei 488 nm, die maximale Emission bei 500-520 nm. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wurde bei gleicher Anregung im Bereich von 600-700 nm detektiert. Für die digitale Aufbereitung der Bilder wurde die Leica Confocal Software und Adobe Photoshop 7.0 genutzt.

APO2-Puffer: 2 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM $CaCl_2$; 2,5 mM MES; in Wasser; pH 5,7 (NaOH)
Färbelösung: 10 mM DAF-2DA (Alexis Biochemicals, Grünberg) in DMSO auf 10 µM in APO2 verdünnt

Weitere Chemikalien für die Mikroskopie:

25 µM	Octa-N-acetylchitooctaose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	250 mM	NaCl
1-10 mM	Jasmonsäure (0,5 M Stocklsg. in Ethanol)	0,1 %	Triton X-100
1-10 mM	Salicylsäure	0,1-0,5 mM	cPTIO (Axxora, Grünberg)
0,01-100 mM	H_2O_2	0,1 mM	$LaCl_3$
1-100 mM	SNP (Sodiumnitroprussid)	100 mM	L-NAME (Axxora, Grünberg)

2.3 Behandlungen der Pflanzen

Als Resistenzinduktoren wurden 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Benzo(1,2,3)thiadiazolcarbothionsäure-S-methylesther (BTH, Wirkstoff in BION®, Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) benutzt. Für eine 10 ppm DCINA-Lösung (Konzentration in 200 ml Anzuchterde) wurden 200 mg der Reinsubstanz in 2 ml Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vorgelöst und mit Leitungswasser auf einen Liter aufgefüllt. Als Kontrolle diente 0,2 % DMF. Je Topf wurde 10 ml DCINA-Lösung in die Anzuchterde gegeben. Kürbispflanzen wurden mit einer BION-Lösung gegossen, um eine Pathogenresistenz zu induzieren. Zur Verbesserung der Löslichkeit liegt BTH in BION als Formulierung mit 50 % *wettable powder* (WP) vor. Für eine Behandlung mit BTH wurden daher 50 mg BION pro Liter Bodenvolumen benötigt. Als Kontrolle wurde WP appliziert.

Die Verwundung von *C. maxima* erfolgte durch das Zerreiben von ca. 50 % der Blattspreite jedes Blattes zwischen aufgerauten Holzbrettchen. Einem Hitzestress wurden die Pflanzen in einem auf 40 °C aufgeheizten Wasserbad für 20 min ausgesetzt. Kontrollpflanzen wurden bei RT im Wasserbad inkubiert. Drei Stunden vor Verwundung und Hitzeschock wurden die Pflanzen in einigen Experimenten mit L-NAME, einem Inhibitor der NO-Synthase, behandelt. Dazu wurden die Pflanzen mit 100 ml 40 mM L-NAME pro Liter Bodenvolumen gegossen. Diese Behandlung wurde 8 und 16 h nach Verwundung wiederholt.

2.4 Gewinnung der Siebelement-Säfte

2.4.1 Exsudation aus *Cucurbitaceae*

Nachdem die Petiolen oder der Stamm von *C. maxima* mit einer Rasierklinge durchtrennt worden waren, traten für kurze Zeit große Mengen Phloemsaft aus der Schnittfläche aus. Das Verwerfen des zuerst austretenden Phloemsaftes durch Abtupfen mit einem saugfähigen Tuch minimierte Verunreinigungen mit dem Inhalt angeschnittener Zellen. Mit dieser Methode konnten bis zu 100 µl Phloemexsudat aus einer einzigen Pflanze gewonnen werden.

2.4.2 Erleichterte Exsudation mit EDTA

Bei der erleichterten Exsudation verhinderte EDTA den Ca^{2+}-abhängigen Wundverschluss des Phloems (King und Zeevaart 1974). Gerstenpflanzen und Blätter von *C. maxima* wurden abgeschnitten, in 10 mM EDTA pH 7,0 (KOH) gewaschen und dann in Reaktionsgefäße mit dieser Lösung gestellt. Die Petiolen bzw. Sprosse wurden durch Parafilm, mit dem die Gefäße verschlossen worden waren, gestochen. Dadurch wurden die Pflanzen fixiert und die Probe vor Verunreinigungen geschützt. Die Exsudation fand für 5-15 h bei Dunkelheit, 26°C und hoher Luftfeuchtigkeit im Wasserbad statt (Weibull et al. 1990). In Vivaspin2-Filtereinheiten (Vivascience, Hannover) mit einem *cut off* von 5 kD wurden die Proben bei 5000 rpm und 10 °C in einer Rotina 48R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) eingeengt.

2.4.3 Blattlaus-Stylektomie

Phloemsaft kann auch mit Hilfe von Blattläusen gewonnen werden (Fisher und Frame 1984). Wenn man das Stilet einer Blattlaus, die gerade Phloemsaft aufnimmt, durchtrennt, tritt der Saft aufgrund seines hohen osmotischen Drucks aus dem Stilett aus und kann analysiert werden. Diese Methode funktioniert mit Monokotyledonen besonders gut. Bei vielen

Dikotyledonen hingegen verhindert wahrscheinlich ein effizienter Siebelement-Verschluss das Exsudieren des Phloemsaftes.

Um reinen Phloemsaft in möglichst großen Mengen gewinnen zu können, wurde ein System optimiert, bei dem Aphiden in Käfigen auf die Pflanze gebracht und der Phloemsaft unter Öl gesammelt wurde (Doering-Saad et al. 2002). Dazu wurden Plastikringe in verschiedenen Größen ausgeschnitten, mit einem lösungsmittelfreien Kleber auf die Blätter der Versuchspflanzen geklebt und sorgfältig abgedichtet. In diese Käfige wurden nun Blattläuse gesetzt. Am nächsten Morgen nahmen die meisten Aphiden, wie man aus dem Saugverhalten schließen konnte, Nahrung aus dem Phloem auf.

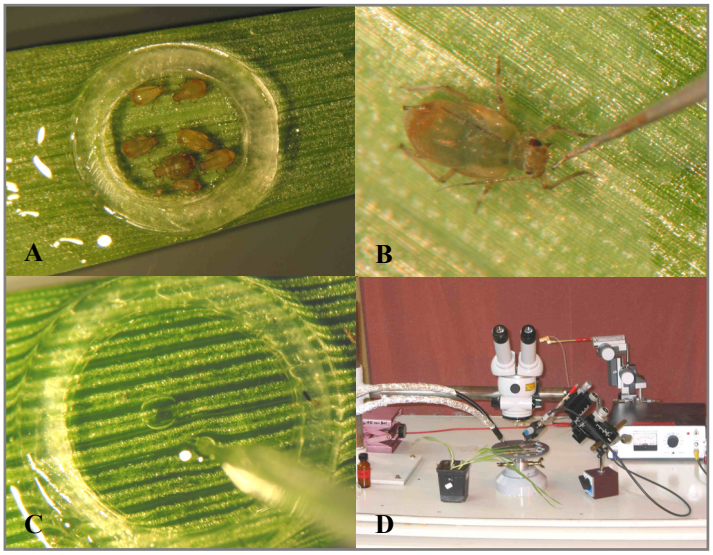


Abb. 2.1 Gewinnung von reinem Phloemsaft aus Gerste mittels Blattlaus-Stylektomie. **A** Blattläuse (*Rhopalosiphum padi*) auf einem Gerstenblatt. Der Käfig wurde mit Kleber abgedichtet. **B** Abschneiden des Stiletts mit einem heißen Wolframdraht. **C** Mit Öl gefüllter Käfig. Das Sammeln des Phloemsaftes erfolgte mit einer Glaskapillare. **D** Versuchsanordnung mit Binokular, dreh- und kippbarer Arbeitsplattform, Mikrokauterisierungseinheit und Sammelkapillare (im Hintergrund).

Die Stylektomie wurde mit einem Wolframdraht, der durch Radiowellen stark erhitzt wurde, durchgeführt. Dabei versetzte die Mikrokauterisierungseinheit CA-50 (Syntech, Hilversum, Niederlande), eine Art umgebautes Radio, den Draht in Schwingungen. Die Wolframnadel wurde mit einem Mikromanipulator an das Stilett der Blattlaus herangeführt und die Mikrokauterisierungseinheit über ein Fußpedal aktiviert. Im besten Fall wich das Insekt nach dem Hitzeschock zurück, und man sah das abgeschnittene Stilett aus dem Blatt ragen. Da Mandibeln und Stilett im unteren Teil der Mundwerkzeuge aus inertem Chitin bestehen, kam es nicht zu Verunreinigungen des Phloemsaftes durch Hämolymphe.

Um auch andere Kontaminationsquellen und eine Verdunstung zu verhindern, wurde der Plastikring mit wassergesättigtem Silikonöl gefüllt. Die aus den Stiletten austretenden Tropfen wurden mit einer Mikrokapillare, die an eine regulierbare Pumpe angeschlossen war, unter Öl gesammelt und sobald wie möglich eingefroren. Das Öl störte bei den Analysen nicht (Doering-Saad et al. 2002). Für die Stylektomie mit Gerste wurde die Blattlausart *Rhopalosiphum padi*, für Kürbispflanzen wurde *Macrosiphum euphorbiae* verwendet.

2.5 Analyse der mRNA im Phloemsaft mit dem cDNA-AFLP

cDNA-AFLP (*cDNA amplified fragment length polymorphism*) wurde in dieser Arbeit angewendet, um Transkripte zu identifizieren, die differenziell nach chemischer Resistenzinduktion bzw. ausschließlich nach der Kontrollbehandlung im Phloem transportiert wurden. Da im SE-Saft mehr als 500 Transkripte vorkommen (Lucas et al. 2001), war das Auftragen der gesamten RNA auf ein einziges Polyacrylamidgel nicht Erfolg versprechend. In dem cDNA-AFLP fand eine Fraktionierung statt, sodass die aus der mRNA hergestellten cDNA-Fragmente, auf mehrere Gele verteilt, besser aufgetrennt werden konnten. Der Versuch wurde auf Basis der Doktorarbeit von Christina Eckey (2002) und nach einem Protokoll von Remy Bruggmann, Universität Zürich, durchgeführt. Die Methode wurde von Bachem et al. (1996) publiziert.

2.5.1 Proben für das cDNA-AFLP

Gerstenpflanzen wurden mit DCINA bzw. DMF (Kontrolle) behandelt. Das Sammeln der Phloemsäfte erfolgte 0-6, 10-16, 24-30 und 46-52 h nach Behandlung. Da die Stylektomie 6 h dauerte, konnten die Proben nicht zu Zeitpunkten, sondern nur in Zeiträumen gewonnen werden. Für das cDNA-AFLP wurden 5 µl Phloemsaft eingesetzt. Die Kalkulation der Probenmenge beruhte auf der Veröffentlichung von Doering-Saad et al. (2002), die in einer RT-PCR mit lediglich 10-60 nl Gerstenphloemsaft Transkripte nachweisen konnten.

2.5.2 Isolierung der mRNA

Ein Merkmal von mRNA ist die Poly-A^+-Sequenz am 3`-Ende. Dynabeads® Oligo$(dT)_{25}$ (Dynal AS, Oslo, Norwegen) enthalten eine Poly-T-Sequenz, die kovalent an magnetische Partikel gebunden ist. Nach Bindung der mRNA an die Dynabeads® durch Basenpaarung wurde das Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gestellt und die nun magnetisch fixierte mRNA mehrmals mit einem Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde der Puffer abgenommen und mit der cDNA-Synthese begonnen.

Bindepuffer: 20 mM TrisCl, pH 7,5; 1 M LiCl; 2 mM EDTA
Waschpuffer: 10 mM TrisCl, pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA

2.5.3 cDNA-Synthese

Zu der an die Dynabeads® gebundenen mRNA wurde 50 µl RT-Mix gegeben, wobei die Poly-T-Sequenz der Dynabeads® als Primer für die Reverse Transkriptase genutzt wurde. Die Erststrangsynthese erfolgte mit der SUPERSCRIPT® II RNase H$^-$ Reverse Transcriptase (200 U/µl, Gibco BRL, Karlsruhe) für 1 h bei 42 °C unter regelmäßigem vortexen. Für die Zweitstrangsynthese wurden zum Produkt der Erststrangsynthese (50 µl Volumen) 100 µl eines DNA-Polymerase-Mixes pipettiert. Nach 1,5 h Inkubation bei 37 °C, unter regelmäßigem vortexen, war die Zweitstrangsynthese abgeschlossen.

Erststrangsynthese:

	mRNA / Dynabeads®
10 µl	5x RT-Puffer
0,5 µl	100 mM DTT
12,5 µl	2 mM dNTP-Mix
2 µl	Reverse Transkriptase
25 µl	Milli-Q Wasser

Zweitstrangsynthese:

50 µl	Produkt der Erststrangsynthese
14 µl	10x Reaktionspuffer
13 µl	2 mM dNTP-Mix
3 µl	DNA-Polymerase I (10 U µl^{-1}, Promega, Madison, USA)
1,5 µl	RNase H (1 U µl^{-1}, Promega, Madison, USA)
68,5 µl	Milli-Q Wasser

Danach wurde die cDNA mit 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5) versetzt und mit 800 µl kaltem Ethanol (96 %) über Nacht bei -20 °C gefällt. Die cDNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl Milli-Q Wasser gelöst. 20 µl Probe wurde für den Verdau eingesetzt.

2.5.4 Verdau der cDNA und Aufreinigung der Fragmente

Der Verdau der cDNA wurde mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt, wobei *Sau*3AI mRNA mit der Erkennungssequenz /GATC und *Nco*I Transkripte mit der Sequenz C/CATGG schneidet. Jedes Enzym wurde 1 h bei 37 °C unter regelmäßigem Vortexen inkubiert.

*Sau*3AI-Verdau:

20 µl	cDNA
3 µl	OPA$^+$ Puffer
0,5 µl	$MgCl_2$ (25mM)
6 µl	Milli-Q Wasser
0,5 µl	*Sau*3AI (10 U µl^{-1}, Amersham Bioscience, Freiburg)

*Nco*I-Verdau:

30 µl	*Sau*3AI-Verdau
5 µl	OPA$^+$ Puffer
4,5 µl	Milli-Q Wasser
0,5 µl	*Nco*I (10 U µl^{-1}, Amerham Bioscience, Freiburg)

Nach dem Verdau wurden die Dynabeads® mit Hilfe des Magnetstands entfernt. Die Probe (40 µl) wurde mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit der cDNA über eine MicroSpin® G-25 Sephadexsäule (Amersham Bioscience, Freiburg) aufgereinigt.

2.5.5 Adapterherstellung und -ligation

Es wurden zwei Adapter, die an die Schnittstellen der beiden Restriktionsenzyme binden konnten, hergestellt. Dafür wurden jeweils ein *sense* (s) und ein am 5´-Ende phosphorylierter *antisense* (as) Primer (MWG-Biotech, Ebersberg) kombiniert.

AdNcoI s	5`-CCTGTAGACTGCGTACAC
AdNcoI as	5`- CATCTGACGCATGTGGTAC
AdSau3 s	5´-AGCGATGAGTCCTGAG
AdSau3 as	5´- TACTCAGGACTCCTAG

Für die Synthese eines Adapters wurden 100 µM jedes Primers vermischt und im Heizblock auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abschalten kühlte der Heizblock langsam auf Raumtemperatur herunter und die Primer konnten in dieser Zeit hybridisieren. Die Adapter wurden auf 2 µM verdünnt und für die Ligation an die cDNA verwendet.

Adapterligation für 3h bei 16°C:

40 µl	cDNA-Verdau
6 µl	Ligationspuffer
1,2 µl	ATP (10mM)
3 µl	*Sau*3AI Adapter (2 µM)
0,3 µl	*Nco*I Adapter (2 µM)
1 µl	Ligase (Promega, Madison, USA)
8,5 µl	Milli-Q Wasser

2.4.5 Präamplifikation

Für die Amplifikation der gesamten cDNA wurden Adapter-spezifische Primer (N+0, S+0) verwendet:

N+0 Primer	5´-AGACTGCGTACACCATGG
S+0 Primer	5´-ATGAGTCCTGAGGATC

Die PCR (*polymerase chain reaction*) wurde mit 10 µl *Template* der Ligation in einem Perkin Elmer 2400 Thermocycler (Perkin Elmer, Boston, USA) gefahren, Während des Laufs durfte die Temperaturänderung maximal 1 °C s^{-1} betragen.

PCR-Ansatz:

10 µl	Template aus Ligation
0,75 µl	N+0 Primer (10 µM)
0,75 µl	S+0 Primer (10 µM)
2,5 µl	10x Puffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl, Quiagen, Heidelberg)
10,3 µl	Milli-Q Wasser

Thermocycler-Programm:

2 min	94 °C	
30 s	94 °C	} 30 Zyklen
1 min	60 °C	
2 min	72 °C	
2 min	72 °C	
∞	4 °C	

5 µl des PCR-Produkts wurden mit einem Xylencyanol-Ladepuffer auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Im Bereich von 500 bp sollte die amplifizierte cDNA sichtbar sein. Die übrigen 20 µl Probe wurden mit 380 µl 0,5x TE versetzt und bei -20 °C eingefroren.

10x TBE: 900 mM TrisCl, pH 8,0; 900 mM Borsäure; 25 mM EDTA

0,5x TE: 10 mM TrisCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA

1,5 % Agarosegel: 2,25 g Agarose wurden in 150 ml 1x TBE gekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde 16 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in einem Gelstand gegossen

2.5.7 Selektive Amplifikation

Um eine Fraktion der gesamten cDNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde eine PCR mit einem selektiven S-Primer und dem radioaktiv markierten N+0 Primer durchgeführt. Der letztgenannte Primer wurde gewählt, da in einem Vorversuch mit zwei selektiven Primern die Anzahl der Banden auf dem PAA-Gel zu gering war.

Kinasierung des N+0 Primers mit [γ-^{33}P]dATP (Amersham Bioscience, Freiburg):

2,5 µl	N+0 Primer (100 µM)
2,5 µl	10x Puffer
5 µl	[γ-^{33}P]dATP (3000 Ci mmol^{-1})
4 µl	verd. T4 Polynucleotidkinase (s.u.)
11 µl	Milli-Q Wasser

Die T4 Polynucleotikinase-Lösung (USB Corporation, Cleveland, USA) wurde vor Gebrauch 1:10 mit einem mitgelieferten Verdünnungspuffer versetzt. Die Kinasierung fand bei 37 °C für 30 min im Thermocycler statt. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 65 °C inaktiviert.

Die selektiven Primer hybridisierten mit der Adaptersequenz und mit je zwei spezifischen Basen an komplementäre Basen des 3´-Endes von cDNA-Fragmenten. Von den 16 möglichen wurden sieben S-Primer für die PCR genutzt.

^{33}P-markierter N+0 Primer	5´-AGACTGCGTACACCATGG
S-Primer mit selektiven Basen (+BB)	5´-ATGAGTCCTGAGGATC+BB (S1-S7)
Verwendete S-Primer + selekive Basen	S1 +AG, S2 +AC, S3 +TA, S4 +TT, S5 +TG, S6 +TC, S7 +GG

PCR-Ansatz:

3 µl	Template aus Präamplifikation
0,6 µl	N+0 Primer (10 µM)
0,6 µl	S-Primer (10 µM)
2 µl	10x Puffer
0,4 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl, Quiagen, Heidelberg)
13,2 µl	Milli-Q Wasser

Thermocycler-Programm:

2 min	94 °C	
30 s	94 °C	9 Zyklen
30 s	65 °C	
2 min	72 °C	
30 s	94 °C	25 Zyklen
30 s	57 °C	
2 min	72 °C	
2 min	72 °C	
∞	4 °C	

2.5.8 Auftrennung der selektiv amplifizierten Fragmente auf Polyacrylamidgelen

Um die Fragmente gut auftrennen zu können, wurde eine Polyacrylamidgel (PAA)-Elektrophorese mit großen Gelen (38 x 50 cm) durchgeführt. Zuerst wurde die vordere Glasplatte des Gelstandes (Sequi-gen II, Bio-Rad, München) silanisiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Platte später nicht an dem Gel haftete. Danach wurden die Glasplatten zusammengebaut, mit schnell polymerisierendem Gel (*sealing gel*) abgedichtet und mit dem Trenngel gefüllt. Durch einen Vorlauf für 45 min bei 110 W wurde die Temperatur auf 50 °C eingestellt. Als Laufpuffer diente vorgewärmtes 1x TBE (s. 2.5.6)

Zu den 25 µl Probe aus der selektiven Amplifikation wurden 10 µl Ladepuffer (98 % Formamid; 10 mM EDTA; etwas Bromphenolblau und Xylencyanol) pipettiert. 6 µl dieser Lösung mit den radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten wurden auf das Gel aufgetragen und für 2 h bei 50 °C aufgetrennt. Sobald die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war, wurde der Gelstand auseinandergebaut, die vordere Glasplatte entfernt und das Gel auf ein Whatman 3M Papier transferiert. Das Trocknen des Gels erfolgte mit Hilfe eines Geltrockners (Model 583 Gel Dryer, Bio-Rad, München) bei 80 °C unter Vakuum. Auf dem Gel wurde nun ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR, Röntgen Bender, Baden-Baden) mit Heftklammern fixiert und die genaue Position markiert. Nach etwa 24 h Exposition bei Raumtemperatur waren die ^{33}P-markierten Banden auf dem Film sichtbar. Der Film wurde maschinell entwickelt.

8 % Gellösung:

16 ml	Long Ranger® Gel Solution (Biozym, Oldendorf)
42 g	Harnstoff
10 ml	10x TBE (s. 2.5.6)

mit A. bidest. auf 100 ml auffüllen

Sealing gel:

40 ml	8 % Gellösung
200 µl	TEMED
200 µl	25 % APS

38 x 50 cm Gel:

80 ml	8 % Gellösung
80 µl	TEMED
500 µl	DMSO
80 µl	25 % APS

2.5.9 Fragmentisolation

Anhand der Markierungen wurde der Film auf dem Gel ausgerichtet. Durch Einstiche mit einer Nadel an allen Ecken einer interessanten Bande, wurde die Position auf dem Gel eingezeichnet. Nun war es möglich, das Gelstück mit einem Skalpell auszuschneiden. Die Elution der cDNA-Fragmente erfolgte zunächst durch Inkubation in 100 µl Milli-Q Wasser für 20 min bei RT, danach für 10 min bei 85 °C. Schließlich wurde die Probe für 15 min bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert. Für die Reamplifikation der Fragmente wurden die nicht-selektiven N+0 und S+0 Primer verwendet.

PCR-Ansatz:

5 µl	Eluat der ausgeschnittenen Bande
0,75 µl	N+0 Primer (10 µM)
0,75 µl	S+0 Primer (10 µM)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
1,5 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl, Quiagen, Heidelberg)
13,8 µl	Milli-Q Wasser

Thermocycler-Programm:

2 min	94 °C	
30 s	94 °C	35 Zyklen
1 min	55 °C	
2 min	72 °C	
2 min	72 °C	
∞	4 °C	

2.5.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

PCR-Produkte aus der Reamplifikation wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.5.6). Interessante Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Extraktionskit (Qiagen, Heidelberg) nach Vorgaben des Herstellers eluiert.

2.5.11 Klonierung von cDNA-Fragmenten, Kolonie-PCR und Plasmidpräparation

cDNA-Fragmente wurden nach dem Protokoll des Herstellers in den pGEM®-T Vektor (Promega, Madison, USA) ligiert. Dabei verursacht klonierte DNA einen Defekt des β-Galactosidase-Gens, während dieses Gen in Plasmiden ohne Fremd-DNA funktional bleibt. Nachdem kompetente *Escherichia coli* DH5α-Zellen (Clontech, Heidelberg) mit den Vektoren transformiert worden waren, konnten Zellen, die Fremd-DNA enthielten, mittels Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden. Kolonien ohne β-Galactosidase waren auf einem Galactose/IPTG-Agar weiß, solche, die dieses Enzym bilden konnten, dagegen blau.

Weiße Kolonien wurden mit Zahnstochern abgenommen und auf eine weitere Agar-Platte („Masterplatte“) für die Plasmid Minipräparation (Miniprep) sowie in Milli-Q Wasser für die Kolonie-PCR überimpft. Der Test auf eine erfolgreiche Transformation wurde mit U/R-Primern (M13fwd[-40], M13rev) in einer Standard-PCR gemacht. Für *E. coli* mit leerem Vektor ergibt sich ein 236 bp großes, bei erfolgreich transformierten Zellen ein, je nach integriertem Fragment, entsprechend größeres Produkt.

Die Kolonien auf der Masterplatte wurden 24 h bei 37 °C inkubiert und dann in 4 ml flüssigem LB-Medium über Nacht vermehrt. Die Plasmidpräparation wurde mit dem NucleoSpin® Multi 8 Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt.

M13fwd[-40]	5`-GTTTTCCCAGTCACGAC
M13rev	5`-AACAGCTATGACCATGA

LB-Medium:

10 g	Trypton (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
5g	Hefe-Extrakt (Gibco™ BRL, Karlsruhe)
10 g	NaCl

mit A. dest auf 1 L auffüllen, pH 7,0

2.5.12 Sequenzierung und Sequenzvergleiche mit Datenbanken

Die Plasmide mit den integrierten cDNA-Fragmenten wurden mit dem LI-COR® DNA Analyzer Gene Readir 4200 (MWG-Biotech AG, Ebersberg) sequenziert. In diesem Gerät laufen Fluoreszenz-markierte Fragmente an einem Laserscanner vorbei, werden erfasst und auf dem Bildschirm als Banden sichtbar. Die Sequenzierung erfolgte mit dem DYEnamic® Direct Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience, Freiburg) nach der didesoxy-Ketten-abbruchmethode (Sanger et al. 1977).

M13fwd[-29]	5´-TGTAAAACGACGGCCAGT (5´ IRD800 Modifikation)
M13rev[-21]	5`-CAGGAAACAGCTATGACC (5´ IRD800 Modifikation)

Thermocycler-Programm:

30 s	95 °C	30 Zyklen
15 s	61 °C	
1 min	70 °C	
∞	4 °C	

LI-COR® Gel:

35 ml	6 % Long Ranger® Gel Solution (Biozym, Oldendorf)
35 µl	TEMED
250 µl	10 % APS in Milli-Q Wasser (w/v)
350 µl	DMSO

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Algorithmus mit Sequenzen aus Gen- und Proteindatenbanken verglichen (Altschul et al. 1997). Dazu wurden die Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) und TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville, USA) genutzt.

2.6 RT-PCR

Um weitere Transkripte zu finden und um die Ergebnisse des cDNA-AFLP zu bestätigen, wurde mit 1 oder 2 µl Phloemsaft von Gerste eine RT-PCR mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die RT-PCR wurden folgende Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) verwendet:

RBCfwd	5´-CCCTGTCTTACCTTCCACCA
RBCrev	5´-GCGTGCAAAGATGTTTCTCAT
UBIfwd	5´-CCAAGATGCAGATCTTCGTGA
UBIrev	5´-TTCGCGATAGGTAAAAGAGCA

Primer für Transkripte, die im cDNA-AFLP identifiziert wurden:

IGPSfwd	5´-ATTTGTCGGTGCAGGAAAAC
IGPSrev	5´-CCTTTGGGAATGGGATTTCT
CAfwd	5´-GTTCGAAACATGGGAGCAGT
CArev	5´-TCAGTCGCTTAACCCAGACC

Thermocycler-Programm:

30 min	50 °C	
15 min	95 °C	
30 s	94 °C	30-60 Zyklen
1 min	X °C	
2 min	72 °C	
10 min	72 °C	
∞	4 °C	

2.7 Vorbereitung der Proben für die Proteinanalysen

Die Phloemexsudate aus Gerste und Kürbis wurden entweder mit dem gleichen Volumen reduzierendem Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,8 + 0,1 % 2-Mercaptoethanol, McEuen and Hill 1982) oder für die Elektrophorese mit Ladepuffer (s. 2.9) versetzt. Beide Puffer verhinderten das Ausfallen von Proteinen durch Oxidation.

Um die Effekte einer Bindung von NO an Proteine zu untersuchen, wurde in mehreren Experimenten der Phloemsaft für 30 min mit 4 mM Peroxynitrit oder 2 mM Nitrosoglutathion (Axxora, Grünberg) in HEN-Puffer (Kap. 2.12, Phloemsaft : NO-Donor = 1 : 1) behandelt. Peroxynitrit wurde wie von Koppenol et al. (1996) beschrieben hergestellt, indem $NaNO_2$ und H_2O_2 zur Reaktion gebracht wurden. Die Konzentration konnte mit dem Photometer bei 340 nm gemessen und das Peroxynitrit in KOH bei -80 °C gelagert werden.

2.8 Messung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsmessung basiert auf der Entstehung blauer Farbkomplexe nach Bindung von Coomassie-Reagenz an freie Aminogruppen von Proteinen (Bradford 1976). 1 µl Phloemsaft bzw. 1 µl Wasser als Kontrolle wurden mit 99 µl Probenpuffer und 900 µl 1 : 4 verdünnter Biorad Protein Assay Lösung (BioRad, München) vermischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde mit einem Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde dann mit Hilfe einer BSA-Eichkurve ermittelt.

2.9 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen durch Elektrophorese wurde mit dem MiniProtean® II System (Bio-Rad, München) in 12 oder 15 %igen Polyacrylamidgelen vorgenommen. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenngels wurde der vorbereiteten Lösung 50 µl 10 % [w/v] APS als Radikalbildner und 5 µl des Katalysators TEMED zugegeben. Genauso wurde mit der Sammelgel-Lösung verfahren. Das Sammelgel wurde vor dem Polymerisieren des Trenngels vorsichtig gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach etwa 45 min war das Gel fest.

Nun wurden die Proben mit dem 4x Ladepuffer Roti®-Load 1 (Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 3:1 versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz bei 4 °C abzentrifugiert und mit

einer Mikropipette in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese lief 2 h bei 100 V bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war.

Trenngel:

	12 %	15 %
1,5 M TrisCl, pH 8,8 + 0,4 % SDS	2,5 ml	2,5 ml
Wasser	4,5 ml	3,75 ml
Acrylamid (40 %)	3 ml	3,75 ml

Sammelgel:

0,5 M TrisCl, pH 6,8 + 0,4 % SDS	2,5 ml
Wasser	6,7 ml
Acrylamid (40 %)	0,8 ml

Elektrophoresepuffer: 25 mM TrisCl, pH 8,8; 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS

2.10 Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel

Die Silberfärbung ist die sensitivste aber auch eine sehr aufwändige Proteinfärbung. Zuerst wurden die Proteine mit einer Lösung aus 10 % Eisessig und 30 % Ethanol zweimal für 15 min fixiert. Danach wurde das Gel für 30 min in einer Thiosulfat-Lösung geschwenkt. Mit sorgfältigem Wässern wurde überschüssiges Thiosulfat entfernt (3 x 10 min). Nun wurde das Gel solange in den Silberfärbelösungen A und B (7 ml + 13 ml) inkubiert bis braun/schwarze Banden zu sehen waren. Die Färbung wurde mit 2 % Essigsäure abgestoppt. Nach 10 min in Essigsäure kam das Gel weitere 30 min in Trocknerlösung (3 % Glycerol, 27 % EtOH). Schließlich wurde das Gel in einem Rahmen zwischen zwei befeuchteten Cellophanfolien eingespannt und über Nacht getrocknet.

Thiosulfat-Lösung:

300 ml Ethanol
675 ml Wasser
25 ml 4 M NaAc
mit Eisessig auf pH 6,0 einstellen

vor Gebrauch 20 mg Na-Thiosulfat zu 20 ml Puffer geben

Silberfärbelösung A: 25 g $NaCO_3$ / 500 ml Wasser

Silberfärbelösung B:

1 g NH_4NO_3
1 g $AgNO_3$
5 g Wolframatokieselsäure
7 ml Formaldehyd (37 %)
500 ml Wasser

Die Färbung von Proteinen mit kolloidalem Coomassie ist im Vergleich zur Silberfärbung unkomplizierter und fast ebenso sensitiv. Die 5x konzentrierte Roti®-Blue Färbelösung (Roth, Karlsruhe) wurde mit 25 % Methanol verdünnt. In dieser Lösung wurde das Gel über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag beseitigte das Waschen in 25 % Methanol die Hintergrundfärbung. Nach einer Inkubation für 30 min in Trocknerlösung konnte das Gel zwischen Cellophanfolien getrocknet werden.

2.11 Western Blot-Analyse

2.11.1 Elektroblot

Für die Western Blot-Analyse mussten die Proteine aus dem Elektrophoresegel mit Hilfe der MiniProtean® Elektroblotting Kammer (Bio-Rad, München) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Dazu wurden die Membran und zwei Whatmanpapiere auf Gelgröße zugeschnitten und zusammen mit zwei Schwämmen und dem Gel kurz in Blottingpuffer (25 mM TrisCl, pH 8,3 / 192 mM Glycin / 20 % [v/v] Methanol) gelegt. Zwischen den beiden Schwammschichten und den Whatmanpapieren wurde die Membran luftblasenfrei auf dem Gel plaziert und in einer Halterung in die Blottingkammer gehängt. Dabei war die Membran zur Anode hin ausgerichtet. Während des einstündigen Proteintransfers bei 100 V stand die Kammer in Eiswasser, um eine Überhitzung zu vermeiden.

2.11.2 Vakuum-Dot Blot

0,5-1 µl Phloemsaft wurde in 50 µl Probenpuffer aufgenommen und die Phloemproteine mit Hilfe einer Bio-Dot® Vakuum-Blot Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine in Blottingpuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran aufgebracht.

2.11.3 Ponceau-Färbung

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Blot kurz mit A. dest. gewaschen und danach mit maximal 1 ml Ponceaulösung (Boehringer, Mannheim) bedeckt. Bereits nach einer Minute waren die Proteine rot angefärbt und die Membran konnte gescannt werden. Wenn die Färbung zu stark war, wurde die Membran vor dem Scannen einmal in PBS/Tween (s. 2.11.4) gewaschen. Mit der Ponceau-Färbung konnte das Auftragen der Proben und die Qualität des Blots überprüft werden. Außerdem ermöglichte das digitale Verschmelzen des Membranbildes mit dem gescannten Ergebnis der Immunodetektion eine Zuordnung der Ponceau-gefärbten Proteinbanden mit dem Signal im Western Blot.

2.11.4 Immunodetektion von Proteinen mit Nitrotyrosingruppen

Nach dem Blotten lagen die Proteine frei auf einer Nitrocellulosemembran und konnten nun weiter analysiert werden. Dazu wurde die Membran dreimal in PBS/0,05 % Tween gewaschen. Dieser Puffer wurde für alle folgenden Schritte der Immunodetektion verwendet. Das Blocken erfolgte über Nacht bei 4 °C mit 5 % Milchpulver. Am nächsten Tag wurde die Membran abermals gewaschen und eine Stunde lang im 1:1000 verdünnten primären Anti-

körper (AK) geschüttelt. Der primäre AK stammte von Mäusen und war spezifisch für nitrierte Tyrosingruppen von Proteinen (Hersteller: Axxora, Grünberg).

Vor der Inkubation mit dem sekundären AK wurde die Membran 5x gewaschen. Der sekundäre *Anti-mouse* AK (Sigma, Saint Louis, USA) band an den primären AK und konnte mittels der an ihn gekoppelten Peroxidase detektiert werden. Er wurde in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt. Auf die einstündige Inkubation folgte ein weiterer Waschschritt.

Für die Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde das Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA) mit dem Hauptbestandteil Luminol verwendet. Luminol emittierte nach Oxidation durch die Peroxidase Chemilumineszenz, die mittels eines Röntgenfilms detektiert wurde. Die Membran wurde für 5 min in dem Substrat inkubiert und nach dem Entfernen des größten Teils der Flüssigkeit in Folie eingeschweißt. Bei Dot Blots waren 10-15 s Exposition ausreichend, um deutliche Signale auf einem XAR-5 Film (Kodak, Baden-Baden) zu erhalten. Im Fall von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen musste bis zu 20 min exponiert werden. Die Entwicklung des Films fand in einem Automaten statt.

PBS/0,05 % Tween: 0,2 g KCl; 8 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4; 1,15 g Na_2HPO_4; 0,5 ml Tween 20 in 1 l Wasser

2.12 Die *Biotin switch*-Methode zur Detektion nitrosylierter Proteine

Die bekannteste Modifikation von Proteinen durch NO ist die Nitrosylierung von Cysteinresten. In der *Biotin switch*-Methode werden nitrosylierte Proteine mit Biotin markiert und können dann für die Massenspektrometrie aufgereinigt oder in einem Western Blot mit Biotin-AK detektiert werden (Jaffrey et al. 2001, Lindermayr et al. 2005). Die Nitrosylierung von Proteinen in den SEs wurde durch Verwundung der Pflanzen oder durch Behandlung des Phloemsaftes mit dem NO-Donor Nitrosoglutathion (GSNO) erreicht.

Bevor der *Biotin switch* mit Phloemsaft durchgeführt werden konnte, mussten die Phloemproteine 1 und 2 (PP1, PP2) aus der Probe beseitigt werden, da sie sonst unter oxidierenden Bedingungen während des Experimentes ausgefallen wären. Diese redox-sensitiven Proteine können mit großen Volumina basischen Puffers zum Gelieren gebracht werden (Alosi et al. 1988). Dazu wurden 100 µl Phloemsaft bei RT mit 400 µl HEN (25 mM HEPES/NaOH; 1 mM EDTA; 0,1 mM Neocuproin; pH 7,7) versetzt, die gelierte Proteinmasse mit einer Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß enfernt und 50 oder 100 µl der flüssigen Phase (entspricht 10 bzw. 20 µl Phloemsaft) in ein neues Gefäß überführt.

Die Probe wurde als nächstes mit HEN auf 500 µl aufgefüllt. Für die *in vitro* Nitrosylierung wurden in dem Puffer 2 mM GSNO gelöst und 45 min bei RT einwirken gelassen. Um freie Cysteine zu blocken, wurden anschließend 56 µl 25 % SDS und 1,5 µl 10,6 M MMTS zugesetzt. Die Methylierung durch Methylmethanthiosulfonat (MMTS) erfolgte 1 h lang bei 50 °C im Heizblock unter regelmäßigem Vortexen. Danach wurden die Proteine mit Aceton über Nacht gefällt. Nach der Fällung wurde das Pellet in 20 µl 1 mM Ascorbat/1 mM Biotin-HPDP (Pierce, Rockford, USA) gelöst. Während einer einstündigen Inkubation bei RT fand nun eine Denitrosylierung der Proteine durch Ascorbat und eine nachfolgende Biotinylierung der vormals nitrosylierten Aminosäuren durch Biotin-HPDP statt. Die biotinylierten Proteine wurden schließlich entweder im Western detektiert oder aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie identifiziert.

2.12.1 Western Blot-Analyse biotinylierter Proteine

SDS-PAGE, Blotting und Immunodetektion wurden wie in den Kapiteln 2.9 und 2.11 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die Proben für die Elektrophorese mit nicht-reduzierendem Roti®-Load 2 Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und nur auf 50 °C erhitzt. So sollte ein mögliches Abspalten des Biotins verhindert werden. Für die Immunodektion wurde ein Biotin-AK mit konjugierter alkalischer Phosphatase (Sigma, Saint Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Nitrocellulosemembran wurde solange im Phosphatase-Substrat aus 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-tetrazolium (NBT) geschwenkt bis schwarze Banden sichtbar waren. Als letztes wurde die Membran in Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

Substratpuffer: 100 mM TrisCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$

Phosphatase-Substrat: 66 µl NBT-Lösung (100 mg in 2 ml 70 % Dimethylformamid, DMF) und
68 µl BCIP-Lösung (50 mg in 2 ml 50 % DMF) zu 10 ml Substratpuffer

2.12.2 Aufreinigung biotinylierter Proteine

Nach der Biotinylierung wurden die Proteine für eine Stunde mit Aceton gefällt. Das Pellet wurde in 200 µl HEN/1 % SDS und 400 µl Neutralisationspuffer (20 mM HEPES/NaOH; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % Triton X-100; pH 7,7) gelöst. Die Extraktion von Proteinen mit gebundenem Biotin erfolgte mit Dynabeads, an die Streptavidin gekoppelt war (Dynal, Oslo, Norwegen). Dazu wurden 1 mg Dynabeads mit Neutralisationspuffer gewaschen und dann die Probe zugegeben. Nach 30 min im Rotations-Mixer wurden die Reaktionsgefäße in den Magnetstand gestellt. Dadurch wurden die magnetischen

Streptavidin-Dynabeads fixiert und die daran gebundenen biotinylierten Proteine konnten durch wiederholtes Waschen mit Neutralisationspuffer aufgereinigt werden.

Die Biotin/Streptavidin-Bindung war sehr stabil und konnte nur gelöst werden, indem die an die Dynabeads gebundenen Proteine in denaturierenden Probenpuffer (SDS) aufgenommen und für 5 min bei 90 °C im Heizblock inkubiert wurden. Danach wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wie oben beschrieben (s. 2.9 und 2.10) durchgeführt. Die Banden wurden ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie vorbereitet.

2.12.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde von Anja Buhtz am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt. Nach dem Entfärben wurden die Proteine im Gel einem tryptischen Verdau unterzogen, die Peptide extrahiert, entsalzt und in einem Q-TOF (*quadropol time-of-flight*) Massenspektrometer (Micromass, Altrincham, UK), wie von Walz et al. (2002) beschrieben analysiert. Mit den erhaltenen partiellen Aminosäuresequenzen wurden Proteindatenbanken durchsucht, um die Peptide zu identifizieren.

2.13 Messungen von Enzymaktivitäten

Die Enzymmessungen wurden mit Kürbisphloemsaft in Probenpuffer (1 : 1) und mit Blattextrakt vorgenommen. Aus Blättern wurden die Enzyme nach dem Mörsern von je 0,5 g Material mit 3 ml Homogenisierungspuffer (0,2 M TrisCl, pH 7,8; 1 mM EDTA; 7,5 % [w/v] PVP) extrahiert. Nach Zentrifugation wurde mit dem Überstand die Messungen durchgeführt. Für die Experimente stand ein Beckman DU® 7400 Spektrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, USA) mit einem beweglichen Schlitten für 6 Küvetten zur Verfügung. Im SE kommt es nach Reizung der Pflanze zu einer selektiven Fällung der redoxsensitiven Phloemproteine 1 und 2 (Kap. 4.5). Andere Proteine sind davon kaum betroffen. Deshalb wurden die Enzymaktivitäten auf das Phloemsaftvolumen und nicht auf die Proteinkozentration bezogen.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\left[\frac{\mu\text{mol Substrat}}{\text{ml x min}}\right] = \frac{V_{total}}{V_P} \times \frac{d}{\varepsilon} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

V_{total}	Gesamtvolumen Messansatz (ml)		
V_P	Volumen Phloemexsudat (ml)		
d	Schichtdicke Küvette (cm)	ε (Ascorbat)	2,8 ml μmol^{-1} cm^{-1}
ε	Extinktionskoeffizient (ml μmol^{-1} cm^{-1})	ε (Dehydroascorbat)	14 ml μmol^{-1} cm^{-1}
ΔE/Δt	Absorptionsänderung pro min	ε (Guaiacol)	26,6 ml μmol^{-1} cm^{-1}

2.13.1 Ascorbatperoxidase

Die Aktivität der Ascorbatperoxidase (APX) wurde nach Zugabe von H_2O_2 über die Oxidation von Ascorbat zu Dehydroascorbat bestimmt (Asada 1999). Da Ascorbat Licht der Wellenlänge 290 nm absorbiert, ist die Abnahme der Absorption ein Maß für die APX-Aktivität. Zu 18 µl Phloemprobe oder 30 µl Blattextrakt wurden 32 µl Homogenisierungspuffer (s.o.) und 1 ml Messpuffer (0,2 M TrisCl, pH 7,8) in eine Quartzküvette pipettiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 5,625 mM Ascorbat und 50 µl 11,25 mM H_2O_2 gestartet. Danach erfolgte die Messung der Absorptionsänderung bei 290 nm über einen Zeitraum von 3 min. Als Messkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser statt Phloemsaft.

2.13.2 Dehydroascorbatreductase

Durch die Aktivität der Dehydroascorbatreduktase wird DHA in Anwesenheit von Glutathion zu Ascorbat reduziert (Asada 1999). Die Zunahme von Ascorbat kann photometrisch gemessen werden. Für die Kinetik wurden 5 µl Probe in einer Quartzküvette mit 1 ml Messpuffer (0,05 mM Natriumphosphat, pH 6,5; 0,1 mM EDTA) vermischt. Die DHAR-Aktivität wurde mit 50 µl 0,5 mM DHA und 1 mM reduziertem Glutathion (beides in Messpuffer gelöst) induziert und 3 min lang bei 265 nm als Zunahme der Absorption registriert. Eine Wasserkontrolle wurde mitgemessen.

2.13.3 Peroxidase

Farbloses Guaiacol kann von bestimmten Peroxidasen mit H_2O_2 als Oxidationsmittel zu braunem Tetraguaiacol umgesetzt werden. Wenn man in eine Plastikküvette 4 µl Phloemprobe oder 10 µl Battextrakt mit 2 ml Messpuffer (0,1 mM Natriumphosphat, pH 6,5; 1 mM EDTA), 50 µl Guaiacol und 50 µl 11,25 mM H_2O_2 vermischte, trat sofort eine sichtbare Farbreaktion ein. Die Zunahme der Färbung wurde bei 480 nm für 3 min aufgezeichnet.

2.13.4 Superoxiddismutase

Superoxiddismutase (SOD) synthetisiert aus Superoxid und Wasser H_2O_2 (Asada 1999). Bei der verwendeten Methode zur Messung der SOD-Aktivität (Beauchamp and Fridovich 1971, Walz et al. 2002) diente Riboflavin im Licht als Radikalbildner, der in wässriger Lösung Superoxid generierte. Das Superoxid reduzierte NBT zu dunkelblauem Formazan. SOD inhibiert diese Farbreaktion, indem es Superoxid aus der Lösung beseitigt. Für die Messung wurden 8 µl Probe mit 1 ml Messlösung (5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8; 25 µM

Riboflavin; 10 mM L-Methionin; 50 µM NBT-Lösung) versetzt und 2 min in 24 kLux starkem Licht inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. In der Messkontrolle wurde der Phloemsaft durch 10 mg ml^{-1} BSA ersetzt. Mit aufgereinigter SOD (EC1.15.1, Sigma, Saint Louis, USA) wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen (Abb. 2.2).

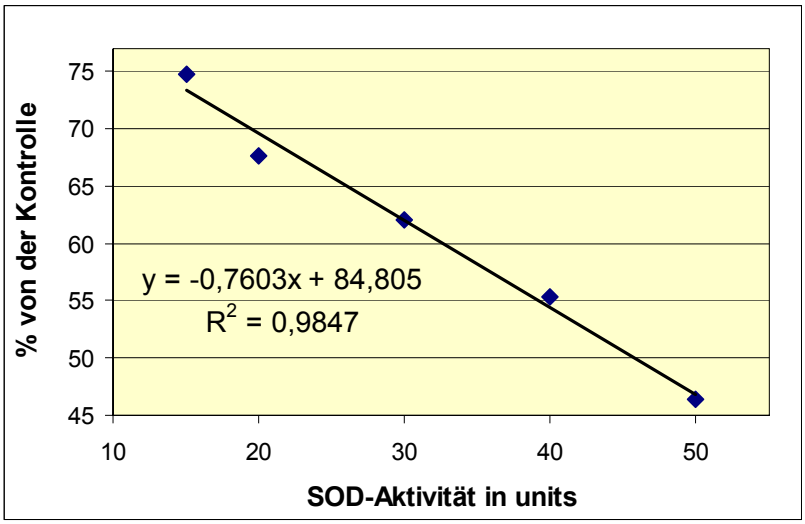


Abb. 2.2 Kalibrierkurve zur Ermittlung der SOD-Aktivität. In dem Diagramm ist die Absorption als Prozent von der Kontrolle und die SOD-Aktivität in units angegeben. 1 unit ist definiert als 50 % Reduktion von Cytochrom b in einem System mit Xanthin / Xanthinoxidase.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse des cDNA-AFLP und der RT-PCR mit Phloemsaft

cDNA-AFLP

Im Phloemsaft von Gerste sollten Transkripte identifiziert werden, die nach Behandlung mit dem Resistenzinduktor DCINA als mögliche Signale in den Siebelementen (SEs) transportiert wurden. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Blattlaus-Stylektomie je Probe 5 µl Phloemsaft gewonnen und die daraus isolierte mRNA in einen cDNA-AFLP eingesetzt. In Abb. 3.1.1 ist an dem Ausschnitt eines Polyacrylamidgels gezeigt, welche Proben bearbeitet wurden und wie ein typisches Resultat des cDNA-AFLP aussah.

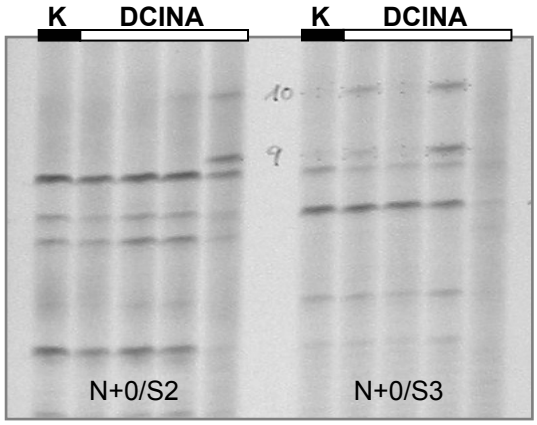
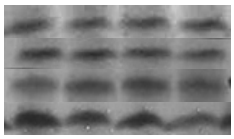
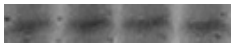
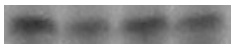
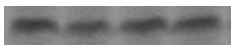
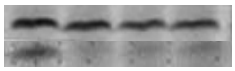
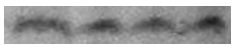


Abb. 3.1.1 Auftragsschema und beispielhaftes Bandenmuster des cDNA-AFLP mit Phloemsaft aus Gerste. Auf das Polyacrylamidgel wurden Proben von Kontrollen (K) und DCINA behandelten Pflanzen (DCINA) aufgetragen. Erntezeitpunkte: 0-6 h (1), 10-16 h (2), 24-30 h (3), 46-52 h (4) nach Induktion der Pathogenresistenz. Aufgetrennt wurden Produkte der selektiven Amplifikation mit den Primerkombinationen N+0/S2 und N+0/S3. Die dargestellten Fragmente sind ca. 70-110 bp lang. Da die cDNA der Probe DCINA/4 teilweise degradiert war, wurden die resultierenden Banden nicht weiter analysiert.

Nach der Elektrophorese wurde die cDNA aus dem Gel eluiert, wobei die Auswahl der Fragmente nach folgenden Kriterien erfolgte: 1. Mit besonders starken konstitutiven Banden sollten die Methoden getestet werden. 2. Alle differenziellen Banden wurden ausgeschnitten, um potenzielle mRNA-Signale zu identifizieren. Insgesamt wurden 24 Banden, generiert mit dem N+0 Primer und 7 selektiven S-Primern, aus den Gelen extrahiert und kloniert. Davon konnte die cDNA von 16 Banden sequenziert werden (Tab. 3.1.1). Daraus resultierten 11 Sequenzen, d.h. einzelne Fragmente wurden mit mehreren S-Primern amplifiziert.

Das 92 bp-Fragment mit Homologie zu einem Imidazolglycerolphosphatsynthase (IGPS)-EST (*expressed sequence tag*) wurde mit mindestens 4 von 7 Primern nachgewiesen. Die entsprechende mRNA kam konstitutiv im Phloemsaft von Kontroll- und DCINA behandelten Pflanzen vor. Auch zwei Fragmente mit Homologien zu ESTs eines Carboanhydrase- (172 bp- Fragment) und eines Proteinkinase-Gens wurden mehrfach detektiert. Da sich für die verschiedenen S-Primer widersprüchliche Bandenmuster ergaben, ist ein Effekt von DCINA auf den Phloemtransport der mRNAs zweifelhaft. Neben den beiden unklaren Fällen konnten den 11 Sequenzen 6 konstitutive und 3 differentielle Bandenmuster zugeordnet werden.

Tab. 3.1.1 Mit dem cDNA-AFLP identifizierte Transkripte im Phloemsaft von Gerste – Sequenzen in **Tab. 7.1**

Code[1]	Banden im cDNA-AFLP[2] K DCINA	Länge (bp)	Homologiesuche mit BLASTN[3] expected value,identities	Homologiesuche mit BLASTX[3] expected value, identities
S1-02 S5-14 S4-18 S7-23		92	BE213945 (*Hv*) $3e^{-44}$, 100 %	imidazoleglycerol-phosphate synthase subunit H-like NP568922 (*At*) $1e^{-04}$, 70 %
S1-03		134	BE421279 (*Hv*) $5e^{-62}$, 97 %	put. ferredoxin AC087851 (*At*) $3e^{-14}$, 79 %
S2-04		77	CD054184 (*Hv*) $4e^{-30}$, 97 %	Hom.[4]: WIR1A protein, plant-hopper inducible protein-like
S2-05		97	CD056186 (*Hv*) $7e^{-45}$, 97 %	put. regulatory protein AA037940 (*Os*) $2e^{-10}$, 100%
S2-06		150	L36959 (*Hv*) mRNA[5] $2e^{-63}$, 94 %	carbonic anhydrase AAC41656 (*Hv*)
S2-07 S1-15		172	CD057212 (*Hv*) $4e^{-51}$, 93 %	Hom.: carbonic anhydrase
S3-09 S6-20		99	AV936683 (*Hv*) $1e^{-34}$, 97 %	protein kinase family NP17196 (*At*) $7e^{-13}$, 100 %
S5-13		82	AV939559 (*Hv*) $2e^{-23}$, 90 %	Hom.: put. glycosyl transferase
S4-17		31	–	–
S6-19		88	CA024028 (*Hv*) $5e^{-36}$, 96 %	Hom.: elongin C
S7-24		110	–	–

At Arabidopsis thaliana, *Hv Hordeum vulgare*, *Os Oryza sativa*
[1] spezifischer S-Primer – Nr. der ausgeschnittenen Banden
[2] Kontrolle (K), Resistenzinduktion (DCINA) Erntezeitpunkte 0-6, 10-16, 24-30 h.a.t.
[3] Homologiesuche mit BLASTN in EST- und mit BLASTX in Proteindatenbanken von NCBI und TIGR
[4] Sequenz des EST für die Homologiesuche mit BLASTX eingesetzt
[5] *carbonic anhydrase full length mRNA*

Drei cDNA-Fragmente stammten möglicherweise von mRNAs, die ausschließlich nach Resistenzinduktion im Phloem transportiert wurden. Nur eines dieser Fragmente brachte in der Homologiesuche ein Ergebnis und wurde als Carboanhydrase (150 bp-Fragment) identifiziert. Um die Ergebnisse des cDNA-AFLP abzusichern, wurde eine technische Reproduktion durchgeführt. Dazu wurden Proben verwendet, die nach dem cDNA-Verdau und der Adaptorligation eingefroren worden waren. Die Fragmente wurden präamplifiziert und dann mit den S-Primern selektiv amplifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Bandenmuster gut reproduzierbar waren. In unabhängigen Experimenten sollten außerdem Primer aus den im cDNA-AFLP gewonnenen Sequenzen in RT-PCRs mit Phloemsaft eingesetzt werden.

RT-PCR

Da der cDNA-AFLP eine sehr aufwändige Methode ist, sollten die Ergebnisse aus diesem Experiment nicht reproduziert, sondern in einer RT-PCR überprüft werden. Dazu wurde eine *one step* RT-PCR mit 1-2 µl Phloemsaft durchgeführt. Zuerst wurde die Reinheit des Phloemsaftes mit Primern der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) getestet (Abb. 3.1.2 A). Auch nach 60 Zyklen wurde keine Rubisco mRNA detektiert, was darauf hindeutet, dass die Exsudate nicht durch Zellinhalte aus umliegenden Geweben verunreinigt waren (Ruiz-Medrano et al. 1999). Ubiquitin-Primer brachten mit mRNA aus Blattextrakten zuverlässig Banden. Mit ihnen konnte gezeigt werden, dass die RT-PCR auch mit Phloemsaft gut funktionierte. In Abb. 3.1.2 B ist außerdem eine deutliche Abnahme der Ubiquitin-Transkripte im Phloemsaft nach Resistenzinduktion festzustellen. Dieses Ergebnis wurde allerdings noch nicht reproduziert.

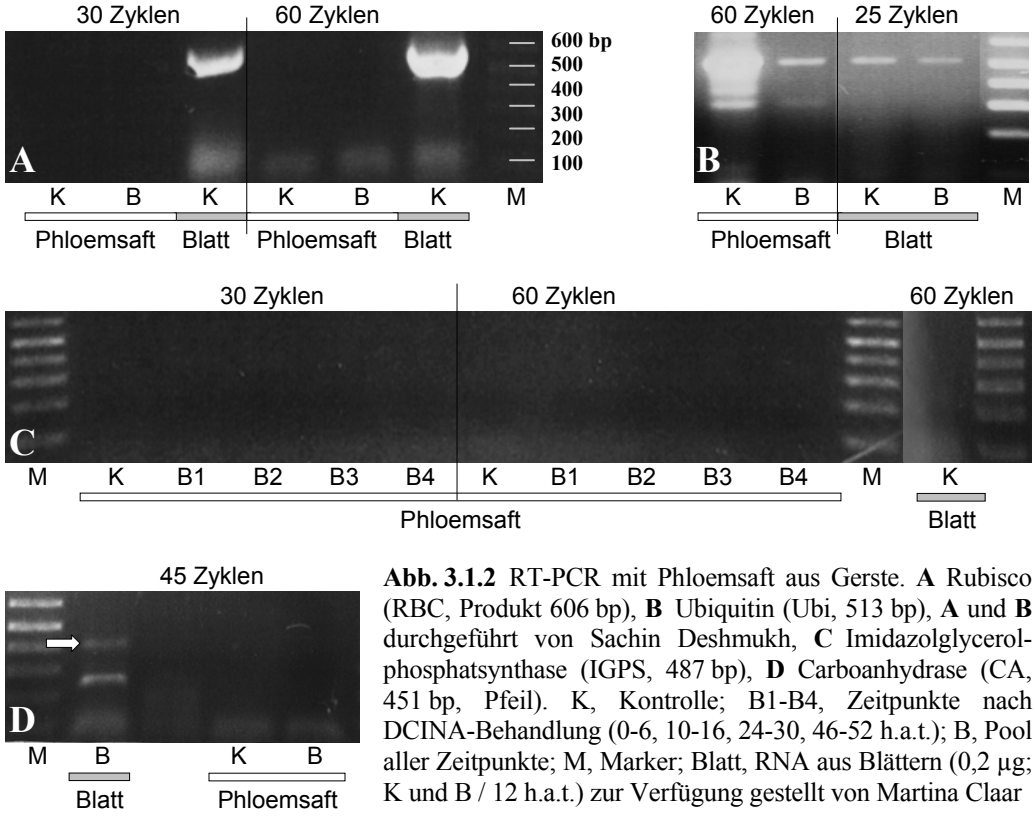


Abb. 3.1.2 RT-PCR mit Phloemsaft aus Gerste. **A** Rubisco (RBC, Produkt 606 bp), **B** Ubiquitin (Ubi, 513 bp), **A** und **B** durchgeführt von Sachin Deshmukh, **C** Imidazolglycerolphosphatsynthase (IGPS, 487 bp), **D** Carboanhydrase (CA, 451 bp, Pfeil). K, Kontrolle; B1-B4, Zeitpunkte nach DCINA-Behandlung (0-6, 10-16, 24-30, 46-52 h.a.t.); B, Pool aller Zeitpunkte; M, Marker; Blatt, RNA aus Blättern (0,2 µg; K und B / 12 h.a.t.) zur Verfügung gestellt von Martina Claar

Primer mit Sequenzen von cDNA-Fragmenten wurden eingesetzt, um im cDNA-AFLP identifizierte Transkripte mit einer unabhängigen Methode nachzuweisen. Als Primer dienten Sequenzen der Fragmente mit Homologien zur Imidazolglycerolphosphatsynthase (IGPS) und zu beiden identifizierten Carboanhydrasen (CA). Die RT-PCR mit diesen Primern ergab für Phloemsaft keine Produkte (Abb. 3.1.2 C und D). IGPS-Transkripte wurden auch im Blattextrakt nicht detektiert, während mRNA der Carboanhydrase im Blatt vorhanden war (Abb. 3.1.2 D, spezifisches Produkt mit Pfeil gekennzeichnet).

3.2 *In vivo* Beobachtung einer induzierbaren NO-Synthese in den Geleitzellen von *Vicia faba* mit konfokaler Lasermikroskopie

Ein flacher Schnitt in die Mittelvene erlaubte eine Beobachtung des intakten Phloemgewebes mit einem konfokalen Lasermikroskop. Für die Detektion der NO-Synthese wurde der Fluoreszenzfarbstoff Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA) benutzt. Als Besonderheit hat *Vicia faba* in ihren SEs spindelförmige Proteine, die nach einem Ca^{2+}-Influx dispergieren.

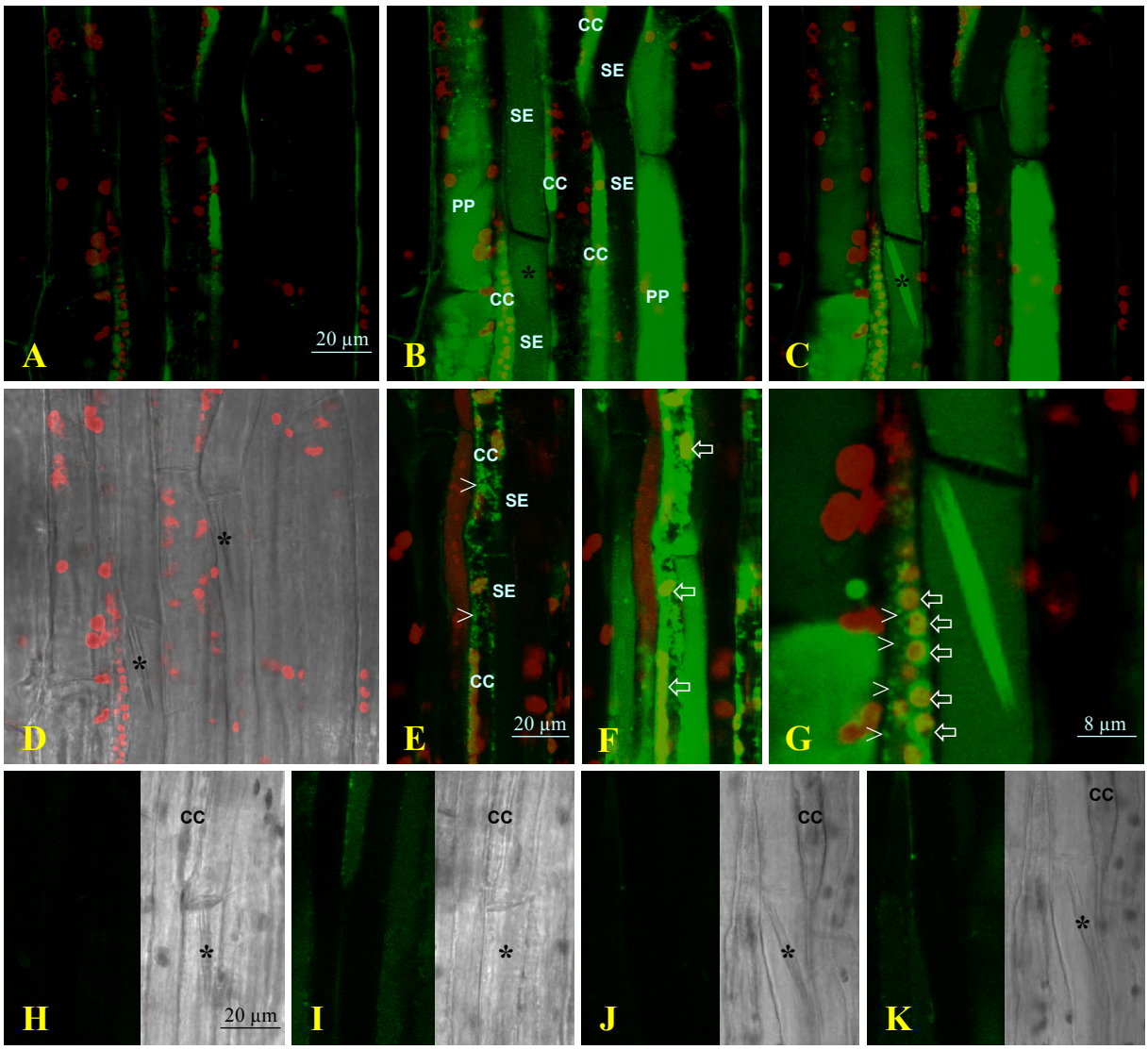


Abb. 3.2.1 Detektion der NO-Synthese im Phloem von *Vicia faba* mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA. **A-G** DAF-Fluoreszenz (grün) bzw. Transmission (**D**) und Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) wurden digital kombiniert. **A, D** Kontrollbilder (DAF-Fluoreszenz, Transmission). **D** Kondensierte Forisomen (Sterne) vor der Behandlung. **B** Aufnahmen 1 min 40 s und **C, G** 9 min nach Reizung des Gewebes mit 1 mM H_2O_2. Forisomen dispergieren (**B**) und rekondensieren (**C, G**). **C**, **G** Sensitivität der Photodetektoren herunterreguliert. **E** 5 min Inkubation des Schnittes in 0,1 % Triton X-100 und **F** derselbe Ausschnitt 1 min 30 s nach Applikation von 1 mM H_2O_2. **F,G** Fluoreszenz in punktförmigen Strukturen (Pfeilspitzen) und in Chloroplasten (Pfeile) der CCs. **H** Phloem nach 30 min Einwirken des NO-Synthase Inhibitors L-NAME (100 mM) und **I** 10 min nachdem 10 mM H_2O_2 / 100 mM L-NAME auf den Schnitt gegeben wurde. Das Forisom dispergiert, rekondensiert aber nicht mehr. **J** Effekt von 100 µM $LaCl_3$ und **K** von 10 mM H_2O_2/100 µM $LaCl_3$ auf die Fluoreszenz. Das Forisom bleibt spindelförmig. CC, Geleitzelle; SE, Siebelement; PP, Phloemparenchym

Diese sogenannten Forisomen (Knoblauch et al. 2003) sind bisher ausschließlich in *Fabaceae* gefunden worden. Ihre Funktion ist wahrscheinlich der vorübergehende Verschluss der SEs als Stressantwort der Pflanze (Knoblauch et al. 2001). In den mikroskopischen Untersuchungen waren kondensierte Forisomen eine wichtige Kontrolle dafür, ob die CC/SE-Komplexe nach dem Freilegen des Phloems intakt und ungestresst waren. Außerdem dienten sie als Indikatoren für eine Reaktion des Gewebes auf Reize, vor allem in den Fällen, in denen die Behandlungen keinen Anstieg der Fluoreszenz auslösten. Als Induktoren der NO-Synthese wurden Substanzen getestet, die in der Literatur im Zusammenhang mit biotischem oder abiotischem Stress beschrieben wurden.

Chitooctaose ist ein pilzlicher Elicitor der Pflanzenabwehr. Außerdem ist von ähnlichen Elicitoren bekannt, dass sie in Epidermiszellen eine NO-Synthese induzieren können (Foissner et al. 2000). Im Phloemgewebe hatte 25 µM Chitooctaose in 7 von 21 Experimenten einen Einfluss auf die NO-Synthese (Tab. 3.2.1). Der Anstieg der Fluoreszenz war erst nach 20-60 min zu beobachten und war meistens gering. Die Färbung trat fast ausschließlich in CC auf. Zu einer Dispersion der Forisomen kam es selten. Als weitere Reize wurden Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA) verwendet. Diese Phytohormone spielen wichtige Rollen in Abwehrreaktionen und Pathogenresistenz. Als effektiver Induktor der NO-Synthese erwies sich SA, das in 14 von 16 Experimenten eine erhöhte Fluoreszenz hervorrief (Tab. 3.2.1). JA hatte diese Wirkung dagegen nur in 5 von 11 Fällen (Tab. 3.2.1). Die Konzentration (1-10 mM) hatte einen Einfluss auf die Geschwindigkeit, aber kaum auf die Intensität der Reaktion. Die Zeitspanne bis zu einer sichtbaren Reaktion variierte zwischen 10 und 20 min. Beide Phytohormone brachten gelegentlich die Forisomen zum dispergieren.

H_2O_2 gilt als universelles Stresssignal und interagiert mit NO in diversen Abwehr- und Signalprozessen (Neill et al. 2002). Es hatte, wie in Tab. 3.2.1 zusammengefasst, den stärksten und am besten reproduzierbaren Effekt auf die NO-Synthese im Phloem von *Vicia faba*. Bereits 10-100 µM H_2O_2 ergaben einen vergleichbaren Anstieg der Fluoreszenz wie 1-10 mM JA und SA, wobei die Forisomen nicht dispergierten. In Konzentrationen von 0,5-1 mM löste H_2O_2 innerhalb von 1-2 min eine starke Fluoreszenz und die Dispersion der Ca^{2+}-sensitiven Forisomen aus (Abb. 3.2.1 A-D). Die Forisomen dispergierten und rekondensierten auch, wenn H_2O_2 auf dem Schnitt blieb. Auf 10-100 mM H_2O_2 reagierte das Gewebe noch rapider. Die Forisomen rekondensierten nicht mehr, das Gewebe wurde braun und starb ab. Die starke Fluoreszenz nach Behandlung des Schnitts mit H_2O_2 ermöglichte die Lokalisation der NO-Synthese in punktförmigen Strukturen und Chloroplasten der CC (Abb. 3.2.1 E-D). In einigen Fällen war die DAF-Fluoreszenz auch in den SE sichtbar, aber nur, wenn Siebröhren

innerhalb oder außerhalb des Beobachtungsfensters verschlossen waren. Normalerweise wurde der Farbstoff im Assimilatstrom abtransportiert. Manchmal konnte auch eine NO-Produktion im Phloemparenchym beobachtet werden (Abb. 3.2.1 B).

Abiotischer Stress wurde mit 250 mM NaCl und dem Detergenz Triton X-100 ausgelöst. Beide Chemikalien hatten keinen Effekt auf die DAF-Fluoreszenz, bedingten jedoch eine Dispersion der Forisomen (Tab. 3.2.1). Während die Forisomen nach dem Salzstress wieder rekondensierten war dies für Triton X-100 nicht der Fall. Wenn H_2O_2 nach der Inkubation in 0,1 % Triton X-100 appliziert wurde, war ein schneller und starker Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen (Abb. 3.2.1 E, F und Tab. 3.2.1).

Tab. 3.2.1 Ergebnisse der Konfokalmikroskopie mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA und mit diversen Elicitoren und Modulatoren der NO-Synthese in der Übersicht

Reiz	Modulator	Forisom[1]	Fluoreszenz[2]	n/∑ Experim.
25 µM Chitooctaose			↑	7/21
1-10 mM SA			↑↑	14/16
1-10 mM JA			↑↑	5/11
10-100 µM H_2O_2			↑↑	4/4
0,5-1 mM H_2O_2			↑↑↑	6/6
10-100 mM H_2O_2			↑↑↑	8/8
250 mM NaCl			=	3/3
0,1 % Triton X-100			=	4/4
Triton X-100/H_2O_2[3]			↑↑↑	3/3
1, 10, 20 mM SNP			↑↑	3/3
1-10 mM H_2O_2	0,1-0,5 mM cPTIO		=	5/5
1-10 mM H_2O_2	0,1 mM $LaCl_3$		=	5/5
1-10 mM H_2O_2	100 mM L-NAME		↑	8/8

[1] Konfiguration des Forisoms: kondensiert (spindelförmig), vorübergehend dispergiert (rund) oder dauerhaft dispergiert (rund, umrahmt)
[2] kein, geringer, mittlerer oder starker Anstieg der Fluoreszenz
[3] 5-20 min Inkubation in 0,1 % Triton X-100, danach Reizung mit 1 mM H_2O_2

In einigen Experimenten wurde der Effekt von H_2O_2 durch Modulatoren beeinflusst, in denen das Gewebe vor und während der Versuche inkubiert wurde. Um die Spezifität von DAF-2DA für NO zu überprüfen, wurde cPTIO verwendet. cPTIO band NO und entfernte es auf diese Weise aus der Zelle. Nach der Inkubation in 100 µM cPTIO konnte auch eine

Behandlung mit 10 mM H_2O_2 keine erhöhte Fluoreszenz von DAF im Phloem auslösen (Tab. 3.2.1). Diese Ergebnisse zusammen mit Ergebnissen aus Versuchen mit dem NO-Donor SNP (Tab. 3.2.1) sprechen für eine Detektion von NO aber nicht von H_2O_2 durch DAF. In den Experimenten mit SNP in Konzentrationen von bis zu 20 mM zeigte sich außerdem, dass NO im Gegensatz zu H_2O_2 keine Dispersion der Forisomen, d.h. keine starke Reaktion des Phloemgewebes, bewirkte.

Die Quelle der NO-Synthese sollte mit Hilfe von $LaCl_3$ und L-NAME näher charakterisiert werden. $LaCl_3$ blockiert Ca^{2+}-Kanäle und L-NAME ist ein L-Arginin-Derivat, das oft für die Inhibierung der NO-Synthase verwendet wird. Beide Substanzen unterdrückten den Anstieg der Fluoreszenz nach Behandlung mit 1-10 mM H_2O_2, wobei $LaCl_3$ effektiver war und zusätzlich die Reaktion der Forisomen verhinderte (Abb. 3.2.1 H-K und Tab. 3.2.1).

3.3 Detektion nitrierter und nitrosylierter Proteine im Phloemsaft von *Cucurbita maxima*

NO bindet an Proteine durch eine Nitrierung von Tyrosin- oder eine Nitrosylierung von Cysteinresten. Für die Detektion solcher modifizierter Proteine im Phloemsaft von Kürbispflanzen wurden Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Nitrotyrosingruppen und die *Biotin Switch*-Methode angewendet.

Nitrotyrosin-Western Blot

Nach dem Dot Blot der Proteine auf die Nitrocellulosemembran sollte überprüft werden, ob die verwendeten Behandlungen überhaupt zu einer Nitrierung von Phloemproteinen führten.

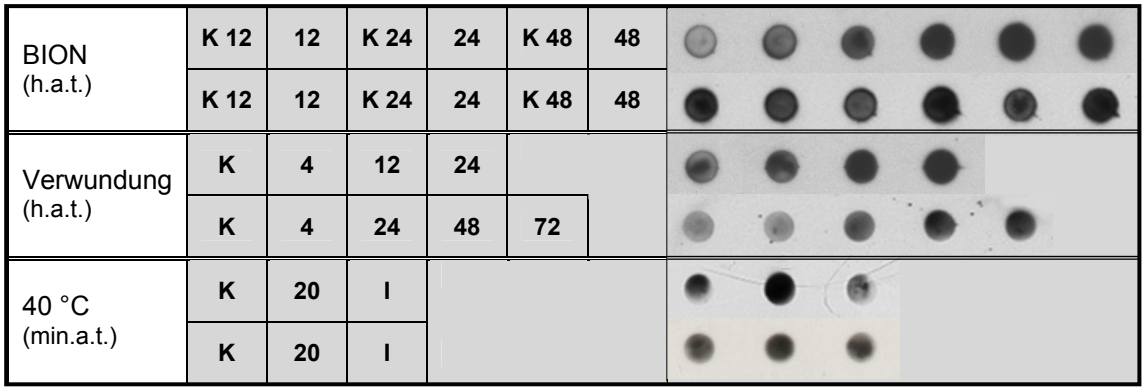


Abb. 3.3.1 Detektion der Nitrierung von Phloemproteinen mit Nitrotyrosin-Antikörpern nach Dot Blot. Induktion der NO-Synthese im Phloem von *C. maxima* durch BION, Verwundung und Hitzestress (40 °C). Es wurden 1 bzw. 0,5 µl Phloemsaft aufgetragen. K, Kontrolle (*wettable powder* für BION); I, Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME; h.a.t., min.a.t., Stunden bzw. Minuten nach Behandlung (Erntezeitpunkte). Dargestellt sind 2 von mindestens 3 ähnlichen Ergebnissen.

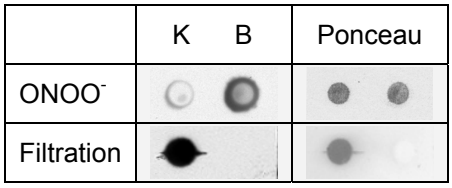


Abb. 3.3.2 Kontrollen der Methode. Phloemproteine aus unbehandelten Pflanzen wurden mit $ONOO^-$ nitriert. Phloemsaft aus verwundeten Pflanzen (48 h.a.t.) wurde ultrafiltriert (cut off 3 kD) und das Filtrat für den Western Blot verwendet. Es wurde je 1 µl Phloemsaft verwendet. K, Kontrolle; B, Behandlung (Nitrierung bzw. Filtration); Ponceau-Färbung der Proteine auf der Blotmembran

Sowohl die Induktion einer Pathogenresistenz durch BION, als auch Verwundung und Hitzestress lösten eine verstärkte Nitrierung von Proteinen im Phloemsaft aus (Abb. 3.3.1). Unterschiede gab es dabei im Zeitablauf der Pflanzenreaktion. Erst nach 24 und 48 h war ein deutlicher Effekt von BION gelegentlich aber auch der Kontrollbehandlung mit *wettable powder* festzustellen. Verwundung bewirkte bereits nach 4 und spätestens nach 12 h eine lang anhaltende Erhöhung der Signalstärke im Western Blot. Auf Hitzestress reagierte die Pflanze sogar innerhalb von 20 min. Der Effekt von Hitzestress konnte durch das Gießen der Pflanzen mit einer L-NAME-Lösung unterdrückt werden. L-NAME ist ein Inhibitor der NO-Synthase.

Als Positivkontrolle wurden die Phloemproteine mit Peroxynitrit ($ONOO^-$) behandelt (Abb. 3.3.2). Außerdem wurde Phloemsaft aus verwundeten Pflanzen ultrafiltriert. Da das Filtrat kein Signal verursachte, wurden in dem Nitrotyrosin-Western Blot wahrscheinlich nicht Peroxynitrit oder freie Nitrotyrosine sondern Proteine mit einer Größe von mehr als 3 kDa detektiert.

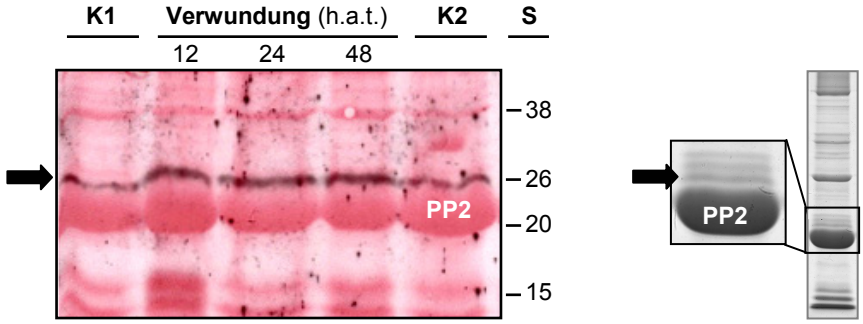


Abb. 3.3.3 Immunodetektion nitrierter Proteine im Phloemsaft mit Nitrotyrosin-Antikörpern. Auf das Gel wurden je 5 µl Kürbisphloemsaft aufgetragen. Die Ponceau-Färbung der Blotmembran und Signale der Immunodektion wurden digital übereinandergelegt. Insgesamt wurden 4 Experimente mit ähnlichen Resultaten durchgeführt. Rechts: SDS-PAGE mit Phloemsaft und anschließende Coomassie-Färbung. Die markierte Bande entspricht dem Signal im Western Blot. K1, K2, Kontrollen; 12, 24, 48, Zeitpunkte nach Verwundung (h.a.t.); S, Proteinstandard (Proteingröße in kD); PP2, Phloemprotein 2

Um nitrierte Proteine im Phloemsaft von *C. maxima* identifizieren zu können, wurden die Phloemproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Nitrotyrosin-Western Blot analysiert (Abb. 3.3.3). Dabei trat ein einzelnes Signal auf, das einer etwa 25-26 kD großen Ponceau-gefärbten Bande entsprach. Mit der *Biotin switch*-Methode wurde das Protein als PP2-Isoform identifiziert (s.u.). Bisher konnte ein Anstieg der Signalstärke nach Verwundung nicht zweifelsfrei gezeigt werden.

Biotin switch-Methode

In der *Biotin switch*-Methode wurde NO von seinen Bindestellen an Cysteinresten verdrängt und durch Biotin ersetzt. Die biotinylierten Phloemproteine konnten dann in Western Blots dargestellt und durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

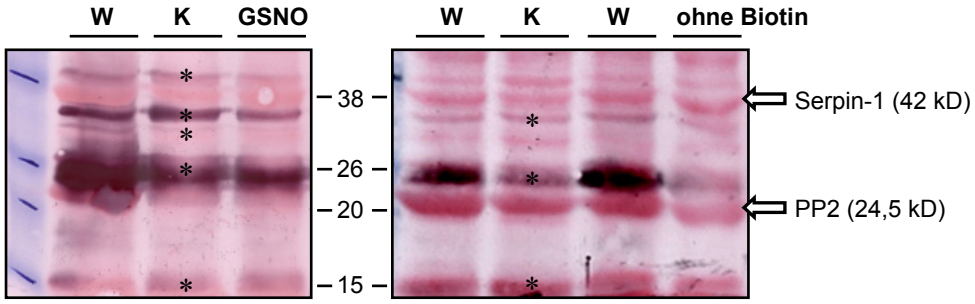


Abb. 3.3.4 Darstellung nitrosylierter Phloemproteine mit Biotin-Antikörpern nach *Biotin switch*. Für den Versuch wurden je 20 µl Phloemsaft aus *C. maxima* eingesetzt. PP2 wurde mit basischem Puffer teilweise gefällt. Die Ponceau-Färbung der Blotmembran und Signale der Immunodetektion (Sterne) wurden digital übereinandergelegt. Rechts sind besonders abundante Proteine aufgeführt. Mitte: Proteinstandard (Proteingröße in kD); GSNO, Behandlung des Phloemsaftes mit 1 mM GSNO; K, Kontrolle; W, Verwundung (24 h.a.t.); ohne Biotin, Proteine im Phloemsaft verwundeter Pflanzen wurde nicht biotinyliert

Zwei repräsentative Ergebnisse der Biotin-Western Blots sind in Abb. 3.3.4 gezeigt. Besonders auffällig, und in jedem Experiment zu sehen, war die Bande bei 25-26 kD. Durch Färbung der Proteine auf der Blotmembran mit Ponceau-Lösung konnte abgesichert werden, dass es sich um das bereits zuvor im Nitrotyrosin-Western Blot detektierte Protein handelte. Desweiteren erschienen in der Immunodetektion eine ca. 16 kD große Bande, zwei Signale im Bereich von 30-40 kD und ein Signal bei etwa 45 kD. Die besonders abundanten Proteine PP2 (Phloemprotein 2; 24,5 kD) und Serpin 1 (42 kD) banden kaum Biotin-Antikörper. Das spricht für die Selektivität der *Biotin switch*-Methode. Um zu kontrollieren, ob Proteine im Phloemsaft *in vivo* biotinyliert werden, wurde einigen Proben kein Biotin zugesetzt. In diesen Negativkontrollen traten im Biotin-Western Blot keine Signale auf.

Bei den in Abb. 3.3.4 sichtbaren Banden handelt es sich um Phloemproteine, die *in vivo* nitrosyliert wurden. In 3 der 4 durchgeführten Western Blots war ein Anstieg der Signalstärke 24 h nach Verwundung der Pflanze festzustellen. Besonders deutlich nahm die Stärke der 25-26 kD großen Bande zu. Dabei war eine Induktion der Proteinsynthese durch Verwundung in Coomassie-gefärbten Gelen oder nach Ponceau-Färbung der Blotmembran nicht erkennbar. Eine Behandlung des Phloemsaftes mit dem NO-Donor Nitrosoglutathion (1 bzw. 10 mM) hatte keinen bzw. nur einen schwachen Effekt (Abb. 3.3.4 und 3.3.5).

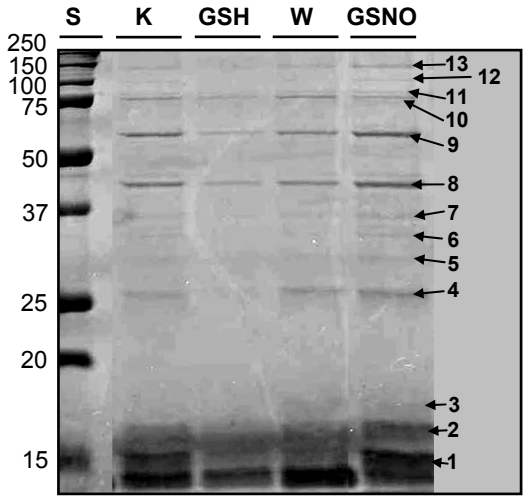


Abb. 3.3.5 Auftrennung biotinylierter Phloemproteine in einem SDS-Gel. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit Streptavidin-Dynabeads. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Rechts sind die Banden nummeriert, die für die Massenspektroskopie ausgeschnitten wurden. K, Kontrolle; GSH, GSNO, Behandlung von Phloemsaft aus Kontrollpflanzen mit 10 mM reduziertem Glutathion bzw. Nitrosoglutathion; W, Verwundung (24 h.a.t.); S, Proteinstandard (Proteingröße in kD)

Für die massenspektrometrische Analyse wurden biotinylierte Proteine mit Streptavidin-Dynabeads aus dem Phloemsaft isoliert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Abb. 3.3.5 zeigt das entsprechende Gelbild nach Coomassie-Färbung. Zwischen der Kontrolle (Phloemsaft aus unbehandelten Pflanzen), der Probe aus verwundeten Pflanzen und den mit 10 mM Glutathion

(GSH) bzw. Nitrosoglutathion (GSNO) versetzten Phloemexsudaten waren keine klaren Unterschiede im Bandenmuster zu sehen. GSH verursachte allerdings eine Verringerung der Bandenstärke. Von den etwa 20 Banden auf dem Gel wurden 13 ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Mittels Tandem Massenspektrometrie wurden Teilsequenzen der Proteine ermittelt und für Datenbanksuchen genutzt. Dadurch konnten in den Banden 1-9 insgesamt 11 Kandidaten für nitrosylierbare Proteine im Phloemsaft von *C. maxima* identifiziert werden (Tab. 3.3.1). Die Banden 3 und 8 enthielten ein Gemisch aus 5 bzw. 2 Proteinen, CmPP16 wurde in 3 verschiedenen Banden gefunden.

Von den aufgelisteten Proteinen wurde bisher nur der putative Actin-depolymerisierungsfaktor (ADF) und die Glyoxalase I mit Nitrosylierung in Verbindung gebracht (Lindermayr et al. 2005, Mitsumoto et al. 2000). ADF und die (*netting associated*) Peroxidase waren in Kürbispflanzen noch nicht als Phloemproteine bekannt. Das 25-26 kD große Protein wurde als eine Isoform von PP2 identifiziert.

Tab. 3.3.1 Mit der *Biotin switch*-Methode identifizierte Kandidaten für S-nitrosylierte Proteine im Phloemsaft

Bande Nr.[1]	Protein	Acc. No.	Masse (kD)	Identifizierte Peptide[2]	Funktion
1,2,3	CmPP16-2	Q9ZT46	15,5	10 (21)	RNA Transportproteine (Xoconostle-Cázares et al. 1999)
3	CmPP16-1	Q9ZT47	16,5	1 (11)	
3	CSF-2	BAA83470	17,5	1 (10)	Fruchtreife- und Wund-induziert (Suyama et al. 1999)
3	put. Actindepolymeri-sierungsfaktor	CAB80877	~17	1 (7)	Actin Depolymerisierung
3	put. Cyclophilin	BAD53620	~17	1 (14)	Chaperon
4	CmPP2	CAA78979	24,5	7 (13)	Lectin (Bostwick et al. 1992)
5	CmPP36	AAK69398	31	2 (15)	Cytochrom b5-Reduktase (Xoconostle-Cázares et al. 2000)
6	Glyoxalase I	BAA36759	33	3 (16)	Detoxifizierung von 2-Oxoaldehyden
7	*netting associated* Peroxidase	AAR19041	~36	4 (20)	Antioxidatives Enzym
8	Phloem-Serpin-1	AAG02411	42	19 (25)	Serin-Proteinase Inhibitor (Yoo et al. 2000)
8	Peroxidase	CAA76680	~42	3 (23)	Antioxidatives Enzym
9	*silverleaf whitefly-induced protein 3*	AAG25897	~60	8 (19)	β-Glucosidase-Aktivität (van de Ven et al. 2000)

[1] Nummerierung der Banden, siehe Abb. 3.3.5
[2] Anzahl identifizierter Peptide (Sequenzen in Tab. 7.2) und längstes Peptid (in Klammern)

3.4 Regulation antioxidativer Enzyme im Phloemsaft durch *in vitro*-Behandlung mit Peroxynitrit und Nitrosoglutathion

NO interagiert mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor allem mit H_2O_2 in Stressantworten der Pflanze. Es wird angenommen, dass ein Mechanismus dieser Interaktion die Hemmung antioxidativer Enzyme durch NO ist (Clark et al. 2000, Zeier et al. 2004). Deshalb wurden die ROS metabolisierenden Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Ascorbatperoxidase (APX) und Peroxidase (POD) sowie das antioxidative Enzym Dehydroascorbatreduktase im Phloemsaft auf eine Regulation ihrer Aktivitäten durch NO untersucht. Die Experimente wurden *in vitro* durch Behandlung der Exsudate aus *C. maxima* mit den NO-Donoren Nitrosoglutathion und Peroxynitrit durchgeführt.

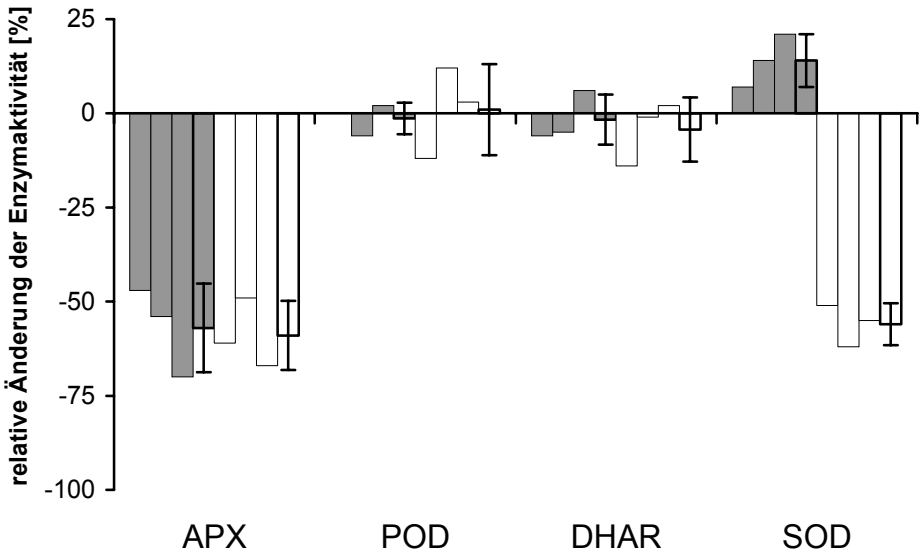


Abb. 3.4.1 Messung der Aktivitäten antioxidativer Enzyme nach Behandlung des Phloemsaftes von *C. maxima* mit NO-Donoren. Nitrosoglutathion (grau) und Peroxynitrit (weiß) wurden in Konzentrationen von 1 bzw. 2 mM eingesetzt. Nach 45 min Inkubation wurden die Aktivitäten der Enzyme Ascorbatperoxidase (APX), Peroxidase (POD), Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und Superoxiddismutase (SOD) photometrisch gemessen. Es wurden 3 Experimente durchgeführt. Die Mittelwerte sind mit Fehlerbalken für die Standardabweichung abgebildet.

Abb. 3.4.1 zeigt, dass NO auf die Enzyme POD und DHAR keinen Einfluss hatte. Dagegen wurde die APX-Aktivität im Phloemsaft durch beide verwendeten NO-Donoren um etwa 60 % reduziert. Ein uneinheitliches Bild ergab sich für die SOD: Während Peroxynitrit dieses Enzym zu 55 % inhibierte, führte die Behandlung des Phloemsaftes mit Nitrosoglutathion sogar zu einer leichten Hochregulation der SOD um etwa 14 %. Oxidiertes Glutathion veränderte die Aktivität der SOD und auch der anderen Enzyme nicht, was gegen eine Thiolierung der SOD durch GSNO spricht (Ergebnis nicht abgebildet).

3.5 Effekte von Verwundung und chemischer Resistenzinduktion auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme im Phloemsaft

Nachdem gezeigt wurde, dass die Behandlung des Phloemsaftes mit NO-Donoren zu einer Hemmung der Enzyme APX und SOD führte (Kapitel 3.4), sollte untersucht werden, ob NO diese Wirkung auch *in vivo* hat. Für die Induktion der NO-Synthese im Phloem von Kürbispflanzen wurde der Resistenzinduktor BION appliziert bzw. Blätter verwundet, da sich diese Reize bereits in den Nitrotyrosin-Western und in der *Biotin switch*-Methode als effektiv erwiesen hatten.

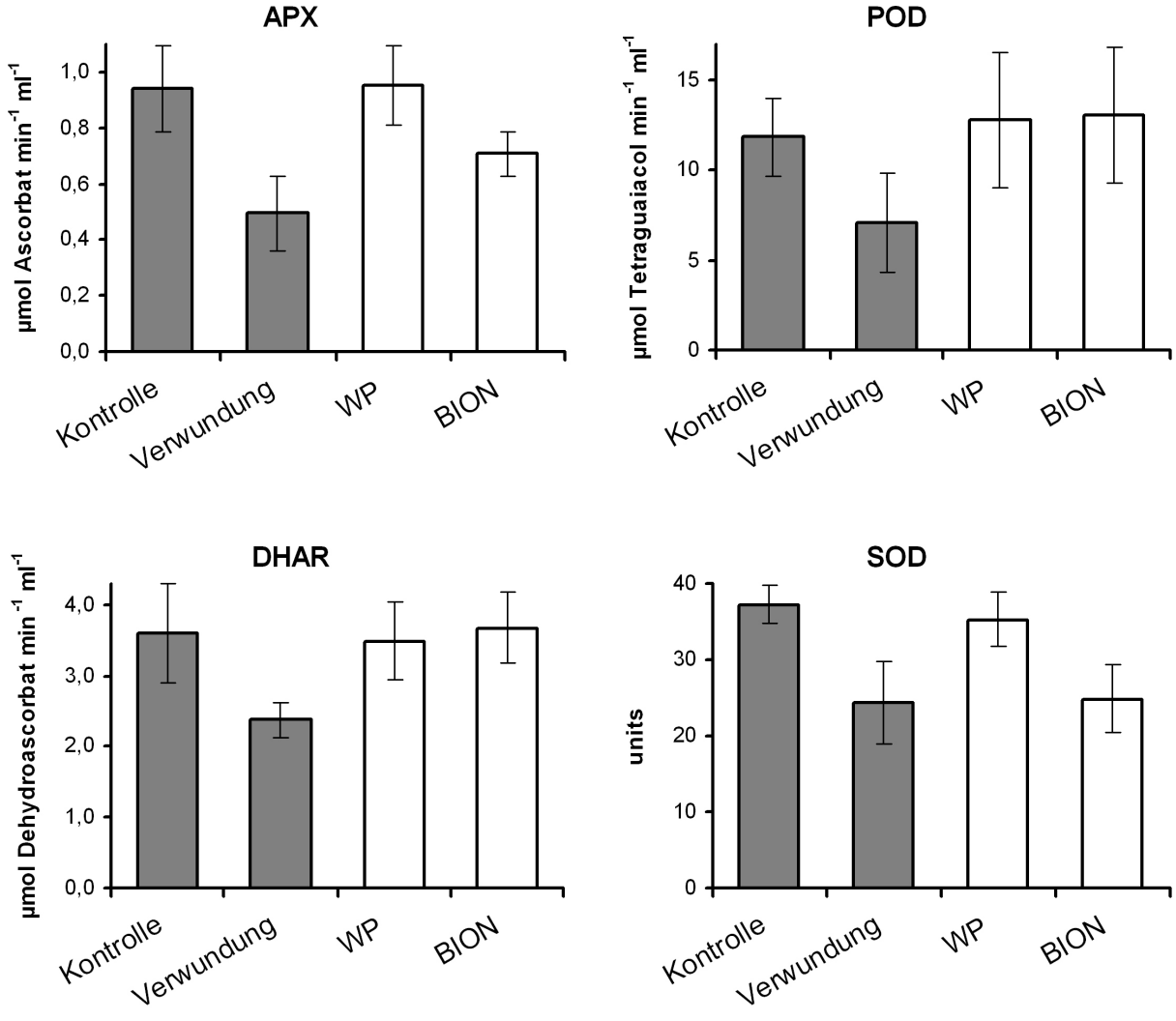


Abb. 3.5.1 Einfluss von Verwundung und Resistenzinduktion durch BION auf Enzyme im Phloemsaft von *C. maxima*. Blätter der Kürbispflanzen wurden verwundet oder die Pflanzen mit einer BION-Lösung gegossen. 24 h.a.t. wurden die Phloemexsudate gewonnen und die Aktivitäten der Enzyme Ascorbatperoxidase (APX), Peroxidase (POD), Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und Superoxiddismutase (SOD) photometrisch bestimmt. Mit SOD EC1.15.1 wurde eine Standardkurve aufgenommen. 1 unit ist definiert als 50 % Reduktion von Cytochrom b in einem System mit Xanthin/Xanthinoxidase. Fehlerbalken indizieren die Standard-abweichung der jeweils 10 Messwerte vom Mittelwert. Für die APX-Aktivität nach Verwundung wurden 15 Phloemproben gemessen. WP, *wettable powder* (BION-Kontrolle)

In ersten Experimenten wurden für alle Enzyme Kinetiken der Wundreaktion im Phloem aufgenommen. In Abb. 3.5.2 ist beispielhaft die Kinetik für APX gezeigt. Alle Enzyme waren in ihrer Aktivität stark durch äußere Faktoren wie die Tageszeit, zu der die Ernte erfolgte, sowie durch Anzuchtbedingungen und das Alter der Pflanzen beeinflusst. Um die Qualität der Messungen zu verbessern, wurden daher für jedes Experiment Pflanzen gleichen Alters verwendet und die Phloemexsudate immer vormittags gewonnen.

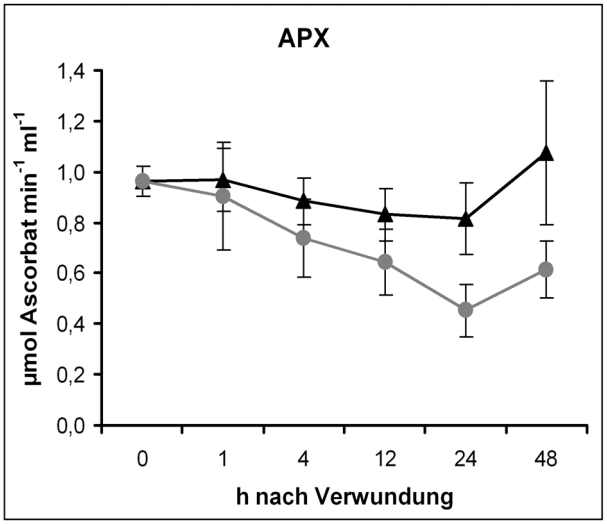


Abb. 3.5.2 Kinetik der Ascorbatperoxidase nach Verwundung. 3 Experimente mit insgesamt 7 Pflanzen pro Zeitpunkt und Behandlung wurden durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Graue Linie, Kontrolle; schwarze Linie, Verwundung

Unter Berücksichtigung aller Enzymkinetiken sowie der Western Blots wurde für weitere Versuche der Erntezeitpunkt 24 h.a.t. gewählt. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die Probenahme nach BION- Behandlung vorgenommen.

Die Ergebnisse der Enzymmessungen mit Phloemsaft 24 h nach Verwundung oder nach Behandlung der Pflanzen mit BION sind in Abb. 3.5.1 zusammengefasst. Auffällig ist, dass alle untersuchten Enzyme durch Verwundung herunterreguliert wurden. Die APX-Aktivität wurde durchschnittlich sogar um 47 % von 0,94 auf 0,50 µmol Ascorbat min^{-1} ml^{-1} reduziert. DHAR und POD wurden zu 34 % bzw. 40 % und die SOD zu 24 % gehemmt. BION dagegen hatte auf die POD und DHAR keinen Effekt. Wie Verwundung hatte auch die Resistenzinduktion eine Verminderung der APX- und SOD-Aktivitäten zur Folge, die allerdings mit 27 % (von 0,95 auf 0,71 µmol Ascorbat min^{-1} ml^{-1}) und 20 % (von 40 auf 32 units) weniger stark ausfiel. Im Gegensatz zu den Phloemexsudaten konnte in Blattextrakten eine starke Hochregulation der APX und POD 48 h nach BION-Behandlung und auch eine Erhöhung der APX-Aktivität nach Verwundung gemessen werden (Abb. 7.2). Die APX war in Blattextrakten 1-4 h nach Verwundung transient gehemmt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die betrachteten Enzyme im Phloem unabhängig von anderen Geweben gesteuert werden.

3.6 Durch einen Inhibitor der NO-Synthase wird die Wirkung von Hitzestress und Verwundung auf antioxidative Enzyme im Phloemsaft teilweise unterdrückt

Mit Hilfe des Inhibitors L-NAME sollte untersucht werden, ob die Aktivität der NO-Synthase für die Hemmung der APX und der SOD im Phloemsaft nach Verwundung und BION-Behandlung verantwortlich war. Für die Experimente wurden Pflanzen verwundet oder einer Temperatur von 40 °C ausgesetzt. Hitzestress hatte den Vorteil, dass die Reaktion der Pflanze sehr schnell ablief und deshalb der Inhibitor nur in einem engen Zeitfenster appliziert werden musste.

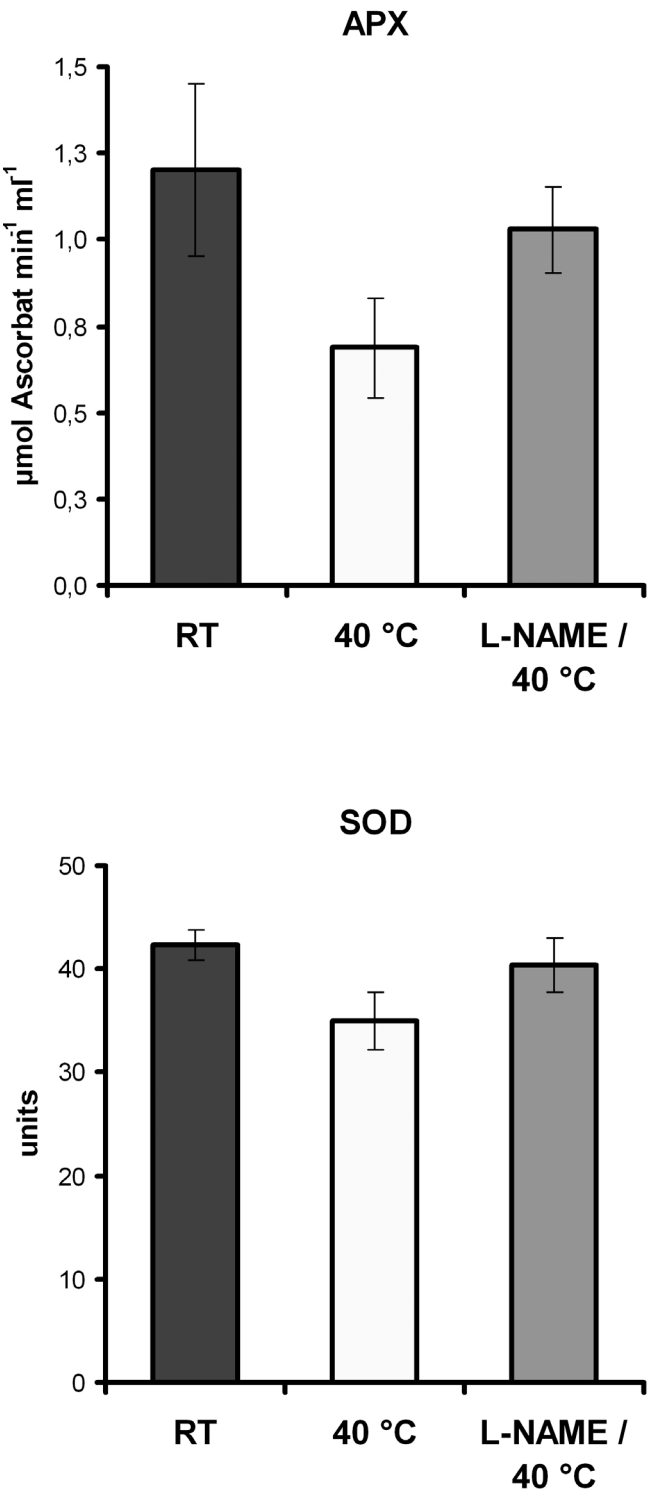
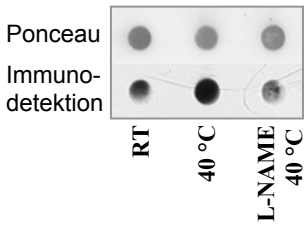


Abb. 3.6.1 L-NAME, ein Inhibitor der NO-Synthase, verhindert die Hemmung der Enzyme Ascorbatperoxidase und Superoxiddismutase durch Hitzestress. 3 Wochen alte Kürbispflanzen wurden mit einer Lösung des Inhibitors gegossen und 3 h später für 20 min einem Hitzestress ausgesetzt (L-NAME / 40 °C). Andere Pflanzen wurden mit Wasser gegossen und bei 40 °C (40 °C) oder bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Mit dem Phloemsaft dieser Pflanzen erfolgte die Messung der Enzymaktivitäten. Jede Säule des Diagramms wurde aus 10 Messwerten errechnet. Fehlerbalken indizieren Standardabweichungen der Mittelwerte. Die Aktivität der SOD wurde mittels einer Standardkurve bestimmt und in Aktivitäts-Einheiten (units) des Enzyms SOD EC1.15.1 angegeben. In einigen Fällen wurden die Phloemproben zusätzlich für Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern eingesetzt. Unten ist als Maß für den NO-Influx in die Siebelemente das Ergebnis eines Western Blots abgebildet. Außerdem ist die Ponceau-Färbung der Proteine auf der Blotmembran gezeigt.



Eine 20 minütige Inkubation bei 40 °C hatte auf die APX im Phloemsaft eine ähnlich starke Wirkung wie die Verwundung der Blätter. Die Aktivität sank um 43 % von 1,20 auf 0,69 µmol Ascorbat min^{-1} ml^{-1}. SOD dagegen wurde durch diesen Reiz nur zu etwa 17 % inhibiert (Abb. 3.6.1). Wenn die Kürbispflanzen 3 h vor dem Hitzeschock mit einer L-NAME-Lösung gegossen wurden, konnten im Phloemsaft Enzymaktivitäten gemessen werden, die etwa denen unbehandelter Pflanzen entsprachen. So wurde für APX ein Wert von 1,03 µmol min^{-1} ml^{-1} (86 % der Kontrolle) ermittelt. Die SOD-Aktivität lag nach Behandlung mit dem Inhibitor bei 96 % (42 units zu 40 units) verglichen mit unbehandelten Pflanzen.

Um zu demonstrieren, dass L-NAME durch Hemmung der NO-Synthase auch tatsächlich die NO-Konzentration im Siebelementsaft verringerte, wurden mit den Proben, die für Enzymmessungen verwendet wurden, zusätzlich Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern durchgeführt (Abb. 3.6.1). Die Signalstärke wurde als Maß für den Influx von NO in die SE gewertet. Für den Phloemsaft aus Hitze-behandelten Pflanzen war in der Immunodetektion ein deutlicher Anstieg der Signalstärke zu sehen, während die Protein-menge, visualisiert durch die Ponceaufärbung der Blotmembran, leicht abnahm. Nach Präinkubation mit L-NAME konnten diese Effekte von Hitzestress nicht mehr beobachtet werden. Sowohl die Menge nitrierter Proteine als auch die Proteinkonzentration entsprachen dem Kontrollniveau.

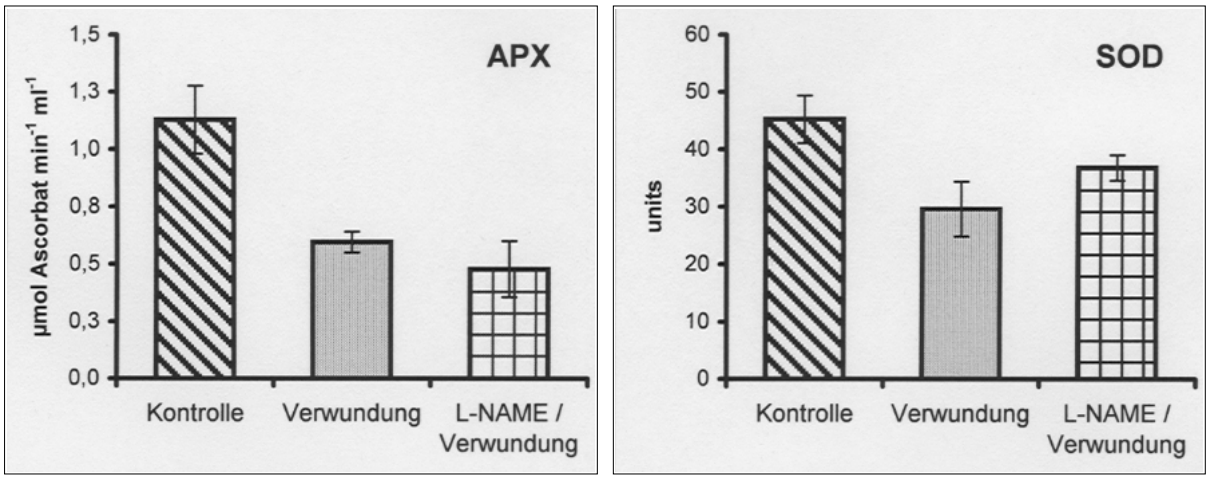
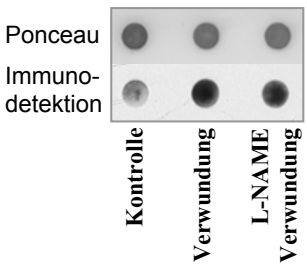


Abb. 3.6.2 Effekte von L-NAME auf die Regulation der APX und SOD im Phloemsaft nach Verwundung der Pflanzen. 3 Wochen alte Kürbispflanzen wurden mit in Wasser gelöstem L-NAME gegossen und 3 h später verwundet. Die Behandlung mit dem Inhibitor wurde 8 und 16 h.a.t wiederholt. Andere Pflanzen wurden mit Wasser gegossen und verwundet oder blieben unbehandelt. Der Phloemsaft wurde 24 h.a.t. gewonnen und für die Enzym-messungen verwendet. Aus je 5 Messungen wurden ein Mittelwert und die Standardabweichung (Fehlerbalken) berechnet. Ein Teil der Phloemproben wurde für Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern eingesetzt, um den Influx von NO in die Siebelemente zu veranschaulichen (siehe rechts). Die Proteine auf der Blotmembran wurden mit Ponceau-Lösung angefärbt.



Wie bereits vorher beobachtet (Kap. 3.5), wurden auch in den oben dargestellten Experimenten durch Verwundung der Pflanzen die Enzyme APX und SOD stark herunterreguliert (Abb. 3.6.1). Die Aktivität der APX verringerte sich um 47 % von 1,13 auf 0,60 µmol min^{-1} ml^{-1}, die der SOD im Phloemsaft um 33 % von 45 auf 30 units. Während die Präinkubation mit L-NAME den Effekt von Hitzestress fast vollständig unterdrücken konnte, war dies für Verwundung nicht der Fall. Die Behandlung mit dem Inhibitor vor und nach der Verwundung hob die Hemmung der APX nicht auf, sondern führte sogar zu einer weiteren leichten Abnahme der Aktivität auf nur noch 42 % der Kontrolle. Für die SOD hingegen wurde nach der Inhibition der NO-Synthase mit 37 units (82 % der Kontrolle) ein Wert gemessen, der zwischen den für die Kontrollpflanzen und verwundeten Pflanzen ermittelten SOD-Aktivitäten lag.

L-NAME hatte nur eine schwache Wirkung auf den Grad der Nitrierung und die Konzentration der Proteine nach Verwundung (Abb. 3.6.2). Im Western Blot stieg die Signalstärke nach Verwundung stark an. Dieser Anstieg konnte durch den Inhibitor nur geringfügig abgeschwächt werden. Auch die Abnahme der Proteinkonzentration wurde nur in einem geringen Maß unterbunden.

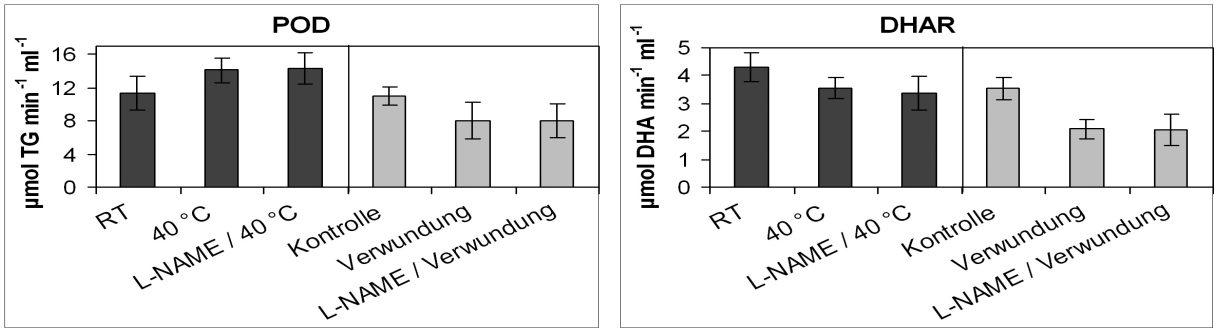


Abb. 3.6.3 Die Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME hat auf die Aktivitäten der Enzyme POD und DHAR keinen Einfluss. Das Gießen der Pflanzen mit der Inhibitor-Lösung erfolgte 3 h vor der Behandlung sowie zusätzlich 8 und 16 h nach Verwundung. Die Mittelwerte wurden aus 5 Messwerten berechnet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. DHA, Dehydroascorbat; TG, Tetraguaiacol

Wie in Abb. 3.6.3 gezeigt, erhöhte sich nach Hitzestress die Aktivität der Peroxidase von 11 auf 14 µmol Tetraguaiacol min^{-1} ml^{-1}, wohingegen die DHAR leicht von 4,3 auf 3,5 µmol DHA min^{-1} ml^{-1} herunterreguliert wurde. Die Steuerung der POD und der DHAR nach Hitzestress und Verwundung wurde durch Applikation von L-NAME nicht beeinflusst. Dieser Befund stimmt gut mit den Resultaten der *in vitro*-Experimente überein, in denen NO-Donoren auf die Enzyme POD und DHAR keine Wirkung hatten.

3.7 Abnahme der Proteinkonzentration im Phloemsaft *in vitro* nach Oxidation der Phloemproteine und *in vivo* nach Induktion einer Pflanzenreaktion

Im Rahmen der Enzymmessungen wurden auch die Proteinkonzentrationen in den Phloemproben ermittelt. Dabei konnte eine leichte Verringerung der Konzentration nach den diversen Behandlungen der Pflanzen festgestellt werden. Diese Tendenz zur Abnahme der Proteinmenge zeichnete sich auch in der SDS-PAGE mit Phloemproteinen und nach Ponceau-Färbung der Proteine auf der Blotmembran (Abb. 3.6.1 und 3.6.2) ab.

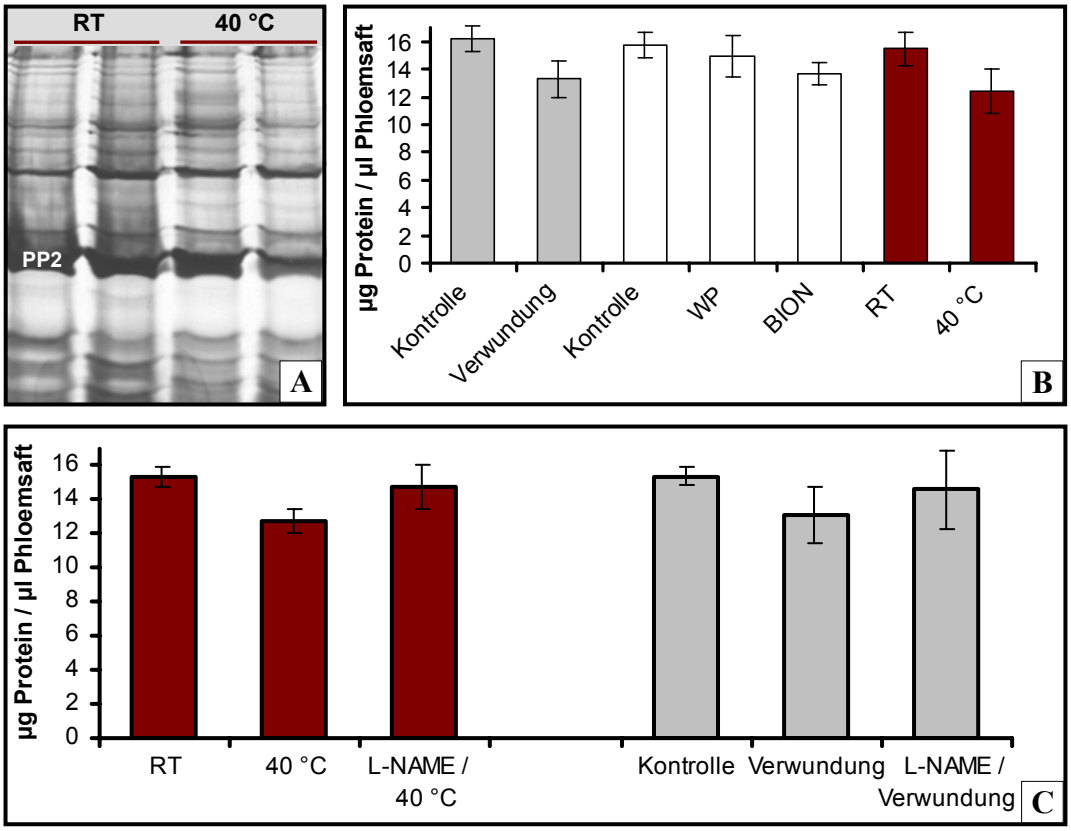
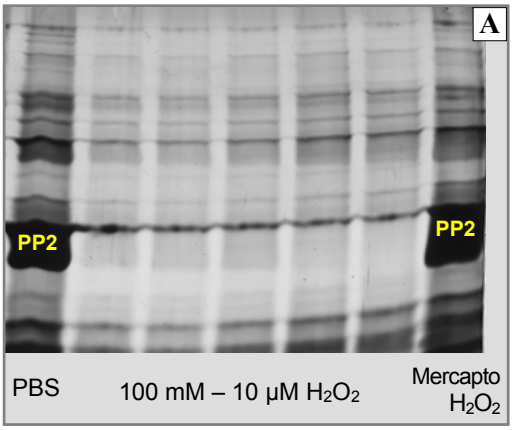


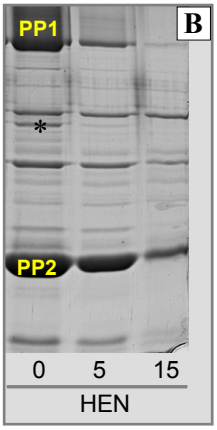
Abb. 3.7.1 Verminderung der Proteinkonzentration im Phloemsaft nach Behandlung der Pflanze. **A** Je 1 µl Phloemsaft aus Kürbispflanzen, die 20 min bei Raumtemperatur (RT) oder 40 °C inkubiert worden waren, wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde eine Silberfärbung durchgeführt. **B** Messung der Proteinkonzentration nach Verwundung, Resistenzinduktion und Hitzestress. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 10 Messwerten. **C** L-NAME verhinderte teilweise die Abnahme der Proteinkonzentration im Phloem nach Hitzestress und Verwundung. Das Gießen der Pflanzen mit der Inhibitor-Lösung erfolgte 3 h vor der Behandlung und außerdem 8 und 16 h nach Verwundung. Die Mittelwerte wurden aus 7 (40 °C) bzw. 5 (Verwundung) Einzelmessungen berechnet. PP2, Phloemprotein 2; WP, *wettable powder*

Das Ergebnis einer Elektrophorese mit Phloemsaft aus 2 Kürbispflanzen, die einem Hitze-stress ausgesetzt worden waren, und aus 2 Kontrollpflanzen ist in Abb. 3.7.1 A dargestellt. Besonders in der rechten Gelspur ist eine Abnahme der Bandenstärke für das Phloemprotein 2 (PP2) zu erkennen, während die übrigen Banden kaum verändert sind.

Insgesamt ergab sich für die Proben aus den gestressten Pflanzen eine geringere Hintergrundfärbung. Dies ist vor allem auf Grund fehlender Schlieren in der Umgebung der PP2-Bande zu erklären, was zudem auf eine verminderte Menge PP2 im Phloemsaft nach Inkubation der Pflanze bei 40 °C hindeutet.

Mit der Bradford-Methode wurde die Proteinmenge im Phloemsaft quantifiziert. Sie lag in den Kontrollen bei 15,5 bis 16,5 µg μl^{-1}. Nach Hitzestress sank dieser Wert auf etwa 12-13 µg μl^{-1}. Verwundung hatte eine ähnliche Wirkung. Beide Formen von Stress verursachten eine Verminderung der Proteinkonzentration um 15-21 % (Abb. 3.7.1 B und C). Der Effekt von BION lag dagegen nur bei 9 % im Vergleich zur Behandlung mit *wettable powder* (WP) und bei 12 % verglichen mit Phloemsaft aus unbehandelten Pflanzen (Abb. 3.7.1 B). Die Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME hob teilweise die Verringerung der Proteinkonzentration durch Hitze und Verwundung auf (Abb. 3.7.1 C), wobei wegen der schwankenden Werte die Ergebnisse aus den Versuchen mit L-NAME und Verwundung noch weiter abgesichert werden müssen.





Phloemsaft : HEN pH 7,7 = 1 : 4	
Zeit bis zur Gelierung der Probe	
Kontrolle	11 min (± 3)
Verwundung	27 min (± 10)

Abb. 3.7.2 Fällung von Phloemproteinen *in vitro*. **A** Aliquots einer Phloemprobe wurden 1 : 1 mit PBS-Puffer, H_2O_2 in PBS oder 1 % Mercaptoethanol / 100 mM H_2O_2 in PBS vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gelierte Proteine wurden mit Pipettenspitzen entfernt und je 4 µl Probe (2 µl Phloemsaft) auf das Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE erfolgte eine Silberfärbung. **B** Aliquots einer Phloemprobe aus unbehandelten Pflanzen wurden 1 : 4 mit HEN-Puffer pH 7,7 versetzt. Nach 0, 5 und 15 min Inkubation wurden gelierte Proteine entfernt, je 7,5 µl Probe (1,5 µl Phloemsaft) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Lösung angefärbt. In der Tabelle ist die Zeit bis zur Gelierung der Proben nach Zugabe des HEN-Puffers zu Phloemsaft aus unbehandelten und verwundeten Pflanzen angeführt. Die Proben galten als geliert, sobald sie durch vortexen nicht mehr durchmischt werden konnten. Angegeben sind Durchschnittswerte von je 5 Messungen mit Standardabweichungen. PP1 und PP2, Phloemprotein 1 und 2; PP2 Dimer (Stern)

Die SDS-PAGE mit Phloemproben aus verwundeten und bei 40 °C inkubierten (Abb. 3.7.1 A) Pflanzen ergab eine leichte Abnahme der PP2-Bande im Vergleich zu Kontrollpflanzen. PP1 und PP2 sind redoxsensitive Proteine, die für die Gelierung des Phloemsaftes aus *Cucurbitaceae* an der Luft und nach Zugabe von oxidierenden Reagenzien verantwortlich sind (Alosi et al. 1988). Deshalb wurde vermutet, dass es nach Verwundung,

Hitzestress und Resistenzinduktion zu einer Erniedrigung der Proteinkonzentration im Phloemsaft kommt, weil redoxsensitive Proteine infolge der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in den Siebelementen gefällt werden. Mit *in vitro*-Experimenten sollte überprüft werden, ob PP1 und PP2 wirklich Redoxindikatoren im Phloemsaft sind.

Der Phloemsaft wurde mit H_2O_2 und mit basischem Puffer versetzt und die Proteine nach der Inkubation bei Raumtemperatur mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In Abb. 3.7.2 A ist zu sehen, dass H_2O_2 sogar bei niedrigen Konzentrationen von bis zu 10 µM zu einer fast vollständigen Beseitigung von PP2 aus dem Phloemsaft führte, wobei auch andere Proteine teilweise gefällt wurden. PP1 ist in dem abgebildeten Gel schlecht aufgetrennt worden. Das reduzierende Mercaptoethanol verhinderte die Präzipitation der Phloemproteine, selbst wenn 100 mM H_2O_2 zugegeben wurden. Die Zugabe des vierfachen Volumens HEN-Puffer, pH 7,7 zu Kürbisphloemsaft hatte vor allem eine Wirkung auf PP1 und PP2 (Abb. 3.7.2 B). Die Banden dieser Proteine waren bereits nach 5 min Inkubation deutlich in ihrer Stärke verringert und nach 15 min kaum noch sichtbar. Auf andere Proteine in der Probe schienen die oxidierenden Bedingungen dagegen fast keinen Effekt zu haben.

Die Proteinkonzentration sank von durchschnittlich 15,5 µg μl^{-1} in unbehandelten Proben auf 3-5 µg μl^{-1} nach Oxidation der Phloemproteine. Diese Werte stimmen gut mit Schätzungen überein, dass PP1 und PP2 zusammen etwa 80 % des Proteingehalts im Phloemsaft von *C. maxima* ausmachen (Sabnis and Hart 1976). Mit den NO-Donoren Peroxynitrit und Nitrosoglutathion konnten Phloemproteine nicht gefällt werden. Interessanterweise wurde die Geschwindigkeit der Gelierung durch eine Behandlung der Pflanze beeinflusst: Verwundung bewirkte eine Verzögerung der Gelierung nach Zugabe des HEN-Puffers. Während Phloemsaft aus Kontrollpflanzen bereits nach 11 min fest wurde, dauerte es 27 min bis Proben aus verwundeten Pflanzen geliert waren. Ähnliches galt für die Gelierung durch Luftsauerstoff, die normalerweise nach 7-12 h eintrat. Verwundung führte jedoch dazu, dass die Exsudate z.T. noch Tage nach der Ernte flüssig blieben.

4 DISKUSSION

4.1 cDNA-AFLP als Methode zur Identifizierung von Transkripten, die nach Induktion einer Pathogenresistenz systemisch im Phloem transportiert werden

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Phloem-mobile mRNAs Funktionen in der Steuerung der Meristementwicklung und Blühinduktion haben (Kim et al. 2001, Lucas et al. 2001, Haywood et al. 2005, Huang et al. 2005). Obwohl die systemische Signalübertragung durch Ribonukleinsäuren zunehmend Beachtung findet, konnten bisher im Phloemsaft aus Reis, Gerste und *Cucurbitaceae* erst 13 mRNAs identifiziert werden (Sasaki et al. 1998, Ruiz-Medrano et al. 1999, Xoconostle-Cázares et al. 1999). Darunter sind mit *WRKY* und *RAB* Transkripte von Genen, die mit der Signalübertragung nach biotischem und abiotischem Stress im Zusammenhang stehen (Ruiz-Medrano et al. 1999). WRKY-Transkriptionsfaktoren induzieren unter anderem das Abwehr-assoziierte Gen PR1 (Rushton et al. 2002). RAB ist als G-Protein an Stressreaktionen der Pflanze beteiligt (Molendijk et al. 2004). Die mRNA in den Siebröhren könnte also neben der Steuerung von Entwicklungsprozessen auch bei Reaktionen der Pflanze auf äußere Reize, wie einen Pathogenbefall, eine Rolle spielen.

Für die Identifizierung von Transkripten im Phloemsaft wurden zwei Strategien verfolgt. Mit RT-PCR wurde zielgerichtet nach Transkripten im Phloemsaft gesucht (Sasaki et al. 1998, Doering-Saad et al. 2002). Mit dieser Methode ist es allerdings nicht möglich, unbekannte Phloem-spezifische mRNAs zu entdecken, und es kann auch nur ein kleiner Ausschnitt der gesamten mRNA im Phloemsaft analysiert werden. Eine effektive Breitbandanalyse der mRNA aus Kürbisphloemsaft wurde mit Hilfe einer cDNA-Bank vorgenommen (Ruiz-Medrano et al. 1999). Bei der wahllosen Sequenzierung der cDNAs wurden auch unbekannte und/oder Phloem-spezifische Transkripte erfasst. Nachteil dieser Methode war jedoch, dass man Informationen zu möglichen Funktionen der mRNAs im Phloemsaft nur aus Datenbanken erhalten konnte, für *Cucurbitaceae* jedoch nur wenige Datenbankeinträge vorhanden sind (Ruiz-Medrano et al. 1999).

cDNA-AFLP mit Phloemexsudaten

Die Transkriptanalysen in dieser Arbeit wurden mit dem cDNA-AFLP durchgeführt. Dabei konnten die cDNAs aus den vermutlich mehr als 500 Transkripten im Phloemsaft (Lucas et al. 2001) auf mehreren Polyacrylamid (PAA)-Gelen gut aufgetrennt werden. Durch den Einsatz

radioaktiv markierter Primer war die Methode außerdem sehr sensitiv. Anhand der Bandenmuster war ein Vergleich der Proben aus unterschiedlich behandelten Pflanzen möglich. Es sollte die Frage untersucht werden, ob bei der Induktion einer Pathogenresistenz mRNAs als systemische Signale im Phloem tranportiert werden. Deshalb wurden Phloemexsudate aus Kontrollpflanzen und aus Pflanzen, die mit dem chemischen Resistenzinduktor DCINA behandelt worden waren, gesammelt und im cDNA-AFLP analysiert. Die cDNA-Fragmente wurden sequenziert, und der Effekt von DCINA auf den Transport der Transkripte im Phloem am Bandenmuster auf den PAA-Gelen abgelesen.

Als Versuchspflanze wurde Gerste gewählt, da der cDNA-AFLP zuvor bereits erfolgreich mit mRNA aus Blättern von Gerstenpflanzen durchgeführt worden war (Eckey 2002, Eckey et al. 2004). Ein Vorteil von Gerste als Modellpflanze ist, dass sowohl umfangreiche EST- als auch Protein-Datenbanken existieren. Außerdem kann aus Monokotyledonen mit Hilfe der Blattlaus-Stylektomie reiner Phloemsaft gewonnen werden (Girousse et al. 1991, Sakuth et al. 1993, Doering-Saad et al. 2002). Wie für *C. maxima* beschrieben, wurde die Reinheit der Exsudate in einer RT-PCR mit Rubisco-Primern überprüft (Ruiz-Medrano et al. 1999). Erwartungsgemäß waren auch nach 60 Zyklen keine Transkripte der kleinen Untereinheit der Rubisco nachweisbar. Gegen eine Verunreinigung der Proben durch Insektenhämolymphe spricht, dass in dem cDNA-AFLP keine Fragmente mit Homologien zu Insekten-ESTs gefunden wurden.

Zum Vergleich wurde die erleichterte Exsudation mit EDTA durchgeführt. Mit dieser Technik gesammelte Phloemproben aus Gerstenpflanzen wiesen nach Auftrennung der Proteine in einem PAA-Gel ein anderes Bandenmuster auf als reiner Phloemsaft, der mittels Stylektomie gewonnen worden war (Abb. 7.1). Das bestätigt Ergebnisse ähnlicher Studien, in denen die Protein- oder Aminosäurekomposition verglichen wurde (Weibull et al. 1990, Girousse et al. 1991, Fisher et al. 1992). Bei der erleichterten Exsudation könnten der Wundstress und die Membran destabilisierende Wirkung von EDTA für methodisch bedingte Artefakte verantwortlich sein (Girousse et al. 1991).

Ergebnisse des cDNA-AFLP

Obwohl das cDNA-AFLP von Phloemsaft nicht vollständig optimiert und nur 7 von 16 möglichen Primerkombinationen benutzt wurden, resultierten aus diesem Versuch 11 Sequenzen für cDNA-Fragmente. Durch eine Homologiesuche in Datenbanken konnten 9 mRNAs, von denen keine zuvor als Phloem-mobil bekannt war, im Phloemsaft identifiziert werden. Vier der 11 Transkripte werden konstitutiv im Phloem transportiert und kodieren für

die Stoffwechselproteine Ferredoxin, ein Element der photosynthetischen Elektronentransportkette, Elongin C, ein Faktor in der Transkriptionsverlängerung, Glycosyltransferase und Imidazolglycerolphosphatsynthase (IGPS). IGPS ist an der Histidin-Synthese beteiligt.

Wahrscheinlich ist die Kopienzahl der IGPS-mRNA im Phloemsaft groß, verglichen mit den übrigen gefundenen mRNAs, da das entsprechende 92 bp-Fragment unspezifisch mit mindestens 4 von 7 Primerkombinationen amplifiziert wurde. Dennoch waren mit der RT-PCR selbst nach 60 Zyklen weder im Blatt noch im Phloemsaft diese Transkripte nachweisbar. Als Positivkontrolle für die RT-PCR mit Phloemsaft kamen daher die IGPS-Primer nicht in Frage. Zu diesem Zweck wurden stattdessen Ubiquitin-Primer eingesetzt. Die Ubiquitin-mRNA konnte in je zwei Proben aus Blättern und dem Phloem bereits nach 25 Zyklen bzw. 60 Zyklen detektiert werden. In RT-PCRs mit Blattextrakten werden Ubiquitin-Primer häufig als Kontrollen für die Verwendung gleicher mRNA-Mengen benutzt (Schultheiss et al. 2002, Eichmann et al. in press). Für Phloemproben scheint das nicht möglich zu sein, da das Gen im Phloem nach Resistenzinduktion durch DCINA vermutlich herunterreguliert wird.

Von zwei weiteren konstitutiv im Phloem transportierten mRNAs kodiert eines für ein putatives regulatorisches Protein mit unbekannter Funktion. Für die zweite mRNA wurde in der Homologiesuche mit BLASTX das *Blumeria graminis f.sp. hordei*-induzierbare Weizen-Protein WIR1a und ein Protein in Reis, das nach Befall der Pflanze mit dem braunen Grashüpfer synthetisiert wird, gefunden. Möglicherweise werden diese Transkripte im Verlauf der Stylektomie als Reaktion der Pflanze auf die Infektion mit Blattläusen gebildet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Aphiden sowohl pathogen- als auch wundresponsive Gene induzieren (Moran und Thompson 2001, Zhu-Salzman et al. 2004). Eventuell wurden also DCINA-Effekte durch die Reaktion der Pflanze auf den Blattlausbefall überlagert.

Für zwei cDNA-Fragmente ergaben sich mit unterschiedlichen Primerkombinationen widersprüchliche Bandenmuster. Das 99 bp-Fragment weist Homologien zu einer Genfamilie von Proteinkinasen auf. Bei der Induktion von Pathogenresistenzen spielen besonders Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) eine wichtige Rolle (Nakagami et al. 2005). In *Arabidopsis* wurde eine vollständige MAPK-Kaskade entschlüsselt, die nach Behandlung der Pflanze mit Bakterienflagellin zu einer Induktion von WRKY-Genen und zur Ausbildung einer Resistenz führte (Asai et al. 2002). Das zweite cDNA-Fragment einer mRNA mit unbekannter Regulation des Phloemtransports war 172 bp groß und wies Homologien zu einer Carboanhydrase (CA) auf.

Im Phloemsaft wurden zwei Transkripte gefunden, die für Carboanhydrasen kodieren. Neben dem oben erwähnten Fragment (CA172) wurde eine 150 bp-cDNA (CA150) mit Homologie zu einer vollständig sequenzierten CA-mRNA entdeckt. Die CA ist ein Enzym, das Kohlendioxid zu Bicarbonat umsetzt. Außerdem hat das Protein eine Funktion in der Pathogenresistenz. In der Interaktion zwischen *Phytophthora infestans* und suszeptiblen Kartoffelpflanzen nahm 12 h nach Infektion die Expression des CA-Gens ab, während in resistenten Pflanzen zum gleichen Zeitpunkt das Gen stark induziert wurde (Restrepo et al. 2005). Dem entspricht auch, dass ein *Silencing* des Gens zu einer erhöhten Anfälligkeit führte (Restrepo et al. 2005). Slaymaker et al. (2002) zeigten, dass CA ein Salicylsäure-bindendes Protein mit antioxidativer Aktivität ist und eine Rolle in der HR spielt. Die genauen Funktionen der CA in der Resistenz sind jedoch noch unbekannt.

Die Transkripte der CA150 wurden ausschließlich nach Resistenzinduktion mit DCINA im Phloem transportiert. Sie waren 10-16 und 24-30 h nach Behandlung (h.a.t.) im Phloemexsudat detektierbar. Noch früher, 0-6 h.a.t., war eine noch nicht identifizierte mRNA im Phloemsaft zu finden (Fragment S7-24, 110 bp). Dieses Transkript könnte an frühen Signalprozessen in der Etablierung der Resistenz beteiligt sein. Ein weiteres cDNA-Fragment (S4-17, 31 bp) stammte von einer mRNA, die 24-30 h.a.t. im Phloem gefunden wurde, und zeigte ebenfalls keine Übereinstimmungen mit Sequenzen in Datenbanken. Alle differentiell transportierten Transkripte sind Kandidaten für systemische Signale. So vermutet man, dass mRNAs *systemic acquired silencing* (SAS) auslösen (Mlotshwa et al. 2002) und dass die mRNA des Blüten-induzierenden Gens FT (nach Translation) im Spross-Apex als Transkriptionsfaktor die Expression des eigenen Gens reguliert (Huang et al. 2005).

Bisher konnte in Monokotyledonen die SAR nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Kogel und Langen 2005). Eines der wenigen Beispiele systemischer Signaltransduktionen in Monokotyledonen ist die Mehltau-Resistenz, die in Blättern von Gerstenpflanzen durch den Wurzelendophyten *Piriformospora indica* ausgelöst wird (Waller et al. 2005). Dabei läuft der Signaltransport aber wahrscheinlich über das Xylem und nicht über das Phloem ab. Mit dem cDNA-AFLP konnten nun zum ersten Mal Hinweise auf systemische Resistenzsignale im Phloem monokotyledoner Pflanzen gefunden werden. Jetzt müssen Funktionsanalysen zeigen, ob es sich bei den Transkripten um essentielle Signale in der Resistenz oder z.B. um Elemente von Signalkaskaden in Phloem-internen Abwehrreaktionen handelt. Dazu müssten die vollständigen Sequenzen ermittelt werden und zum Beispiel unter einem Phloem-spezifischen Promotor überexprimiert oder gesilenced werden. Die Effekte auf den Resistenzstatus könnten dann in Inokulationsversuchen mit verschiedenen Pathogenen überprüft werden.

Untersuchuchungen zur Rolle von NO bei Signalprozessen im Phloem

4.2 Salicylsäure und H_2O_2 induzieren in den Geleitzellen des Phloems die Produktion von NO durch eine NO-Synthase

Das gasförmige Stickstoffmonoxid ist in Pflanzen an der Signalübertragung in Pathogenabwehr, Resistenz und Stressreaktionen beteiligt (Romero-Puertas et al. 2004, Crawford und Guo 2005, Delledonne 2005). NO wurde mit systemischer Signalübertragung in Verbindung gebracht (Durner und Klessig 1999, Song und Goodman 2001) und konnte bereits im Vaskulargewebe nachgewiesen aber nicht exakt lokalisiert werden (Corpas et al. 2004, Requena et al. 2005). Eine Rolle als Signal im Phloem wurde bisher noch nicht untersucht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit versucht, NO im Phloem zu detektieren und eine Funktion in systemischen Signalprozessen nachzuweisen.

In mikroskopischen Studien und fluorometrischen Messungen der NO-Produktion wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA) gearbeitet. DAF-2DA wird in Zellen aufgenommen, wo es nach Abspaltung des Diacetats durch zelleigene Esterasen NO bindet. Durch die spezifische Bindung von NO aber nicht H_2O_2 oder O_2^- entsteht das fluoreszierende Triazolderivat DAF-2 (Kojima et al. 1998, Foissner et al. 2000). Der Farbstoff ist spezifisch, sensitiv und chemisch stabil (Kojima et al. 1998). Für die *in vivo* Mikroskopie des Phloems wurde eine von Michael Knoblauch entwickelte Methode genutzt (Knoblauch et al. 1998). Dabei wird durch einen flachen Schnitt in die Mittelvene auf der Blattunterseite die Epidermis abgetragen, um das Phloemgewebe freizulegen. In diesem Bereich kann durch ein oder zwei Zellschichten hindurch das intakte Phloem beobachtet werden. So konnte zum ersten Mal *in vivo* der Phloemtransport von Fluoreszenzfarbstoffen und Verschlussmechanismen der Siebelemente gezeigt werden (Knoblauch et al. 1998, 2001).

Als Versuchspflanze in der Phloemzellbiologie zeichnet sich *Vicia faba* durch gut erkennbare Siebelement (SE)/Geleitzell (CC)-Komplexe aus. Bei der Identifizierung des Phloems und seiner Zelltypen helfen unter anderem große kristalline Proteine, die in den SEs liegen. Diese sogenannten Forisomen dispergieren nach einem Druckverlust im Siebelement und verschließen es auf diese Weise (Knoblauch et al. 2001). Da die Dispersion der Forisomen Ca^{2+}-abhängig ist (Knoblauch et al. 2001, 2003), eignen sie sich gut als Ca^{2+}- und Stressindikatoren. Für die Experimente wurden ausschließlich Phloemschnitte verwendet, in denen kondensierte Forisomen darauf hindeuteten, dass das Gewebe ungestresst war. Auf der anderen Seite zeigten dispergierte Forisomen empfindlich eine Reaktion des Gewebes auf verschiedene Stressoren an.

Um die NO-Synthese im Rahmen einer Abwehrreaktion der Pflanze zu induzieren, wurde in ersten Experimenten das Chitinoligomer Chitooctaose verwendet. Es existieren zahlreiche Berichte über die Induktion der NO-Synthese in Zellsuspensionen und Epidermiszellen durch pilzliche Elicitoren (z.B. Modolo et al. 2002, Lamotte et al. 2004, Xu et al. 2005 a und b). Foissner et al. (2000) benutzten für ihre Experimente mit Epidermispräparaten von Tabakpflanzen den Elicitor Cryptogein (ein Protein aus *Phytophthora cryptogea*). Die Schnitte wurden zuerst in der DAF-Färbelösung und dann in der Cryptogein-Lösung inkubiert. Mit diesem Verfahren konnte innerhalb von 3-10 min eine NO-Synthese als schnelle Reaktion des Gewebes auf den Elicitor beobachtet werden.

Das gleiche Prinzip sollte auf das Phloemgewebe von *Vicia faba* angewendet werden. Hier wurde Chitooctaose in Apoplasten-Puffer gelöst direkt im Beobachtungsfenster auf den Schnitt gebracht. In 7 von 21 Fällen trat innerhalb von 20-60 min eine erhöhte Fluoreszenz in den CCs des Phloems und vereinzelt auch in SEs auf. Auffallend war, dass die Fluoreszenz fast ausschließlich auf die CCs begrenzt war. Dieses Ergebnis wies auf eine Produktion und nicht nur auf einen Transport von NO im Phloem hin.

Wichtige Signale in der Pflanzenreaktion auf pilzliche Elicitoren sind die Phytohormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) (Kunkel und Brooks 2002). JA ist auch an der Wundreaktion beteiligt (Farmer und Ryan 1992). Nachdem bereits Chitooctaose einen Effekt auf die NO-Produktion in den CCs hatte, wurden die beiden Phytohormone als Induktoren der NO-Synthese getestet. JA löste in etwa 50 % der Versuche nach 10-20 min einen Anstieg der DAF-Fluoreszenz in den CCs aus. Die NO-Menge erreichte ein höheres Niveau und auch die Forisomen dispergierten häufiger als in den Versuchen mit Chitooctaose. In Epidermiszellen von *Arabidopsis* konnte nach Behandlung mit JA ebenfalls eine Induktion der NO-Synthese beobachtet werden (Huang et al. 2004).

1-10 mM SA bewirkte in 14 von 16 Experimenten innerhalb von 20 min einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz in den CCs und z.T. auch ein Dispergieren der Forisomen. Kontrollen zeigten, dass weder der pH noch der Salzgehalt der SA-Lösung für den Effekt verantwortlich waren. In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass in Zellkultur eine NO-Synthese durch SA induziert wurde (Durner und Klessig 1999 und Referenzen darin). In Tabakpflanzen wurde dagegen durch NO eine Akkumulation von SA (Durner et al. 1998, Huang et al. 2004) und in Abhängigkeit von SA die Expression eines MAP-Kinase- und des PR1-Gens (Durner et al. 1998, Kumar und Klessig 2000) induziert. Bei der Induktion der NO-Synthese durch SA könnte es sich um eine spezielle Eigenart des Phloems handeln. Eventuell wird nach einem Pathogenbefall lokal SA produziert, das in das Phloem diffundiert und dort

eine Signalkaskade unter Beteiligung von NO in Gang setzt (Abb. 4.2.1 A). Interessanterweise konnte in Epidermispräparaten von *Vicia faba* durch Behandlung mit SA und JA eine NO-Synthese in den Schließzellen und ein NO-abhängiger Verschluss der Stomata ausgelöst werden (Liu et al. 2003 und 2005).

H_2O_2 ist ein weiteres gut untersuchtes Signal in der Pathogenabwehr. Erhöhte Konzentrationen von H_2O_2 führten in diversen Pflanzen und Zellkulturen zu einer SA-abhängigen Expression von Abwehr- und Resistenzgenen (Wu et al. 1995 und 1997, Alvarez et al. 1998, Chamnongpol et al. 1998, Mittler et al. 1999). H_2O_2 interagiert mit NO in der Induktion der HR (Delledonne et al. 1998 und 2001, de Pinto et al. 2002). Außerdem lösen UV-B-Licht und der Elicitor Cryptogein in Tabakepidermis eine synchrone NO- und H_2O_2-Synthese aus, was ebenfalls auf eine Kooperation dieser Signalmoleküle hindeutet (Allan and Fluhr 1997, Foissner et al. 2000). In tierischen Endothelzellen stimulierte die Applikation von H_2O_2 eine starke NO-Synthese (Shimizu et al. 1998). Lum et al. (2002) beobachteten, dass Epidermis von *Phaseolus aureus*, die in 10 mM H_2O_2 inkubiert wurde, innerhalb weniger Sekunden NO produzierte. Ähnliche Versuche sollten auch mit intaktem Phloemgewebe durchgeführt werden. Dazu wurden 10 µM bis 100 mM H_2O_2 verwendet, um die gesamte in der Literatur angeführte Bandbreite der H_2O_2- Konzentrationen abzudecken.

Nach Inkubation des Phloems in 10-100 µM H_2O_2 stieg innerhalb von 10 min die DAF-Fluoreszenz in den CCs deutlich an. Der Effekt dieser H_2O_2-Konzentrationen war ähnlich stark wie der JA- und SA-Effekt, wobei die Forisomen aber nicht dispergierten. Delledonne et al. (1998) ermittelten für ungestresste Zellen in Zellkultur H_2O_2-Werte von etwa 1 µM und in gereizten Zellen von bis zu 30 µM. In verwundeten Blättern von Tomatenpflanzen wurde die Konzentration auf 1-10 µM geschätzt (Orozco-Cárdenas et al. 1999). Die eingesetzten H_2O_2-Konzentrationen liegen also wahrscheinlich im physiologischen Bereich. In Versuchen mit cPTIO, dass NO aus dem Gewebe beseitigt, sollte sichergestellt werden, dass mit dem Farbstoff DAF nicht H_2O_2, sondern ausschließlich NO detektiert wird. Wie in früheren Tests des Farbstoffs (Kojima et al. 1998, Foissner et al. 2000) lösten in Abwesenheit von NO auch hohe Konzentrationen von H_2O_2 keinen Anstieg der Fluoreszenz aus.

0,5-1 mM H_2O_2 riefen innerhalb von 1-2 min eine starke Reaktion der Pflanze hervor, die durch eine Erhöhung der Fluoreszenz und durch die Dispersion der Forisomen gekennzeichnet war. 10 und 100 mM H_2O_2 töteten das Gewebe ab; es wurde braun und die Forisomen rekondensierten nicht mehr. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass in einigen publizierten Studien H_2O_2 in hohen Konzentrationen (z.B. 10 mM H_2O_2, Lum et al. 2002) nicht als physiologisches Signal sondern als Stressfaktor wirkte.

Die relativ langsamen Reaktionen der Zellen auf JA und SA könnten darauf hindeuten, dass diese Signalmoleküle nur eine indirekte Wirkung auf die NO-Synthese haben. Dagegen könnte H_2O_2 direkt das NO-produzierende Enzym aktivieren, da es auch in niedrigen Konzentrationen effektiv ist. Aus diesen Annahmen läßt sich eine Signalkaskade ableiten, in der nach Reizung mit Chitooctaose aus Epidermis- und Mesophyllzellen SA (oder JA) in die Geleitzellen gelangt und dort eine H_2O_2-Produktion induziert. H_2O_2 aktiviert anschließend das NO freisetzende Enzym (Abb. 4.2.1 A). Allerdings ist nicht bekannt, ob *Vicia faba* überhaupt wie andere Dikotyledonen als Reaktion auf einen Pathogenbefall SA produziert.

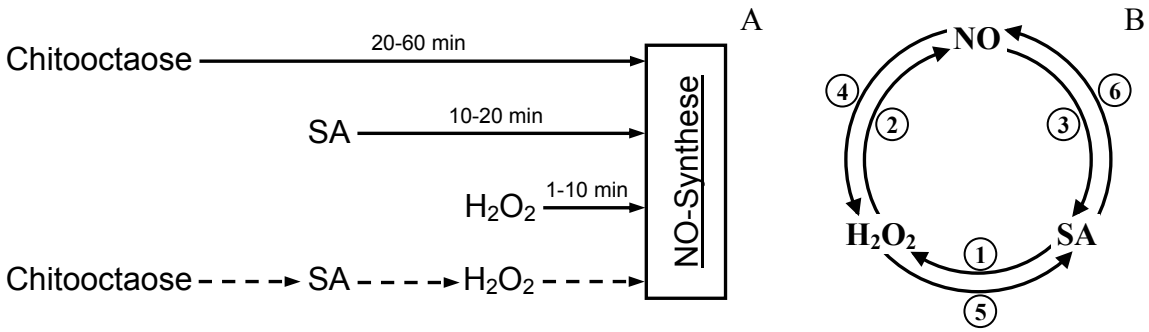


Abb. 4.2.1 Potentielle Interaktionen der Signalmoleküle SA, H_2O_2 und NO im Phloem. **A** Zeitlicher Ablauf der Induktion der NO-Synthese und mögliche Signalkaskade (durchbrochene Linie) nach Reizung mit dem Elicitor Chitooktaose. **B** Neben der linearen Kaskade könnten im Phloem Signalamplifikationen ablaufen. Ausgewählte Referenzen für die abgebildeten Signalwege: (1) Shirasu et al. 1997, (2) Lum et al. 2002, (3) Durner et al. 1998, (4) Clark et al. 2000, (5) Wu et al. 1997, (6) Durner und Klessig 1999 und Referenzen darin

Möglicherweise laufen im Phloem nicht nur lineare Signalkaskaden, sondern auch komplexe Signalamplifikationen ab (Abb. 4.2.1 B). Dafür spricht, dass in den Geleitzellen mit NO (eigene Ergebnisse), H_2O_2 und SA (Smith-Becker et al. 1998) drei Signale synthetisiert werden, die auf vielfältige Weise in der Pathogenabwehr und Resistenz interagieren (van Camp et al. 1998, Durner und Klessig 1999). Die drei Signalmoleküle wurden außerdem alle schon in der Literatur mit systemischen Signalprozessen in Verbindung gebracht (Ryals et al. 1996, Alvarez et al. 1998, Karpinski et al. 1999, Song and Godman 2001). Eine systemische Signalübertragung durch zwei interagierende Signale wird für Systemin und JA in der systemischen Wundreaktion (SWR) vermutet (Ryan und Moura 2002).

Da H_2O_2 in dieser Arbeit ein verlässlicher Induktor der NO-Synthese war, wurde dieser Stimulus genutzt, um die Quelle der NO-Produktion zu lokalisieren und zu charakterisieren. Die konfokale Lasermikroskopie erlaubte eine Zuordnung der Fluoreszenz nicht nur zu den verschiedenen Zellen sondern auch zu Zellstrukturen. So konnte festgestellt werden, dass die NO-Synthese in den CCs und seltener in den Parenchymzellen des Phloems stattfand. Gelegentlich war nach dem Anstieg der Fluoreszenz in den CCs auch eine erhöhte Fluoreszenz in Siebröhren zu sehen. Diese Akkumulation des Farbstoffs trat wahrscheinlich

aufgrund des Verschlusses einzelner SEs auf. Das läßt auf einen Einstrom von NO oder NO-Reaktionsprodukten in die SEs und auf den systemischen Transport im Assimilatstrom schließen. In der Regel war in den SEs keine Fluoreszenz zu sehen, da der Farbstoff abtransportiert wurde.

Im Zytosol der CCs trat häufig eine schwache Grundfluoreszenz auf. Nach der Behandlung mit H_2O_2 stieg zuerst die Fluoreszenz in den Chloroplasten und im Kernbereich stark an. Im Zytosol waren außerdem kleine punktförmige Strukturen angefärbt. In der Größe entsprachen diese Strukturen den Peroxisomen, die durch H_2O_2 und Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht werden konnten (nicht gezeigt). In Chloroplasten, Kernbereich und Peroxisomen wurden schon zuvor mit DAF-2DA und mit biochemischen Methoden eine NO-Synthese detektiert (Foissner et al. 2000, Corpas et al. 2004). Außerdem wurden dort mit Antikörpern gegen NO-Synthasen aus Säugetieren immunologisch ähnliche Enzyme in Pflanzen (Barroso et al. 1999, Ribeiro et al. 1999) lokalisiert.

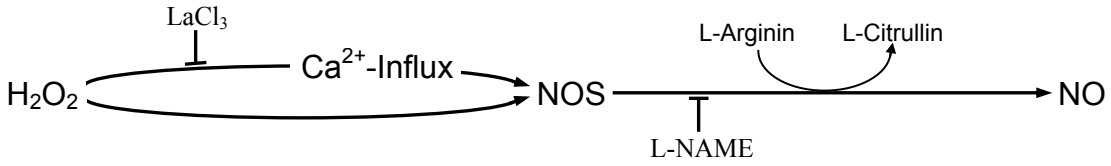


Abb. 4.2.2 In den Geleitzellen des Phloems von *Vicia faba* ist die NO-Synthese durch eine induzierbare NOS abhängig von Ca^{2+}, L-Arginin und H_2O_2 oder einem unbekanntem H_2O_2-aktivierten Cofaktor.

Als mögliche Quellen der NO-Synthese werden in der Literatur die nicht enzymatische Umsetzung von Nitrit sowie die Enzyme Aconitase, Nitratreduktase und NO-Synthase (NOS) genannt. In Reaktionen von Pflanzenzellen auf Elicitoren und Pathogene scheint in der Regel das Enzym NOS involviert zu sein (Crawford und Guo 2005). Dieses Enzym setzt L-Arginin in Ca^{2+}-abhängiger Weise zu L-Citrullin und NO um. Für den Nachweis, dass NO durch eine NOS produziert wird, wurde daher das L-Argininderivat L-NAME als Inhibitor des Enzyms und $LaCl_3$ zur Hemmung von Ca^{2+}-Kanälen eingesetzt. Die Präinkubation des Phloems in L-NAME verhinderte größtenteils und die Behandlung mit $LaCl_3$ fast vollständig die Induktion der NO-Synthese durch H_2O_2. Das deutet auf die Aktivität einer induzierbaren NOS in den CCs des Phloems von *Vicia faba* hin (Abb. 4.2.2).

In einigen Versuchen wurde das nichtionische Detergenz Triton X-100 dazu benutzt, die Membranen der CCs Ca^{2+}-permeabel zu machen. Trotz des Ca^{2+}-Einstroms in das Zytosol der CCs wurde keine NO-Produktion ausgelöst. Wenn aber danach H_2O_2 zugegeben wurde, war innerhalb weniger Sekunden eine starke Fluoreszenz zu beobachten. Ca^{2+} allein ist also offenbar nicht ausreichend für die Aktivierung der NOS in den CCs von *Vicia faba*. Es

scheint zusätzlich H_2O_2 oder ein durch H_2O_2 aktivierter Cofaktor notwendig zu sein. Für die drei NOS-Isoformen der Säugetiere fungieren Calmodulin/Ca^{2+}, Tetrahydrobiopterin, Häm, Flavinadenindinukleotid und Flavinmononukleotid als Cofaktoren (Bruckdorfer 2005). Die Schnelligkeit der Reaktion spricht dafür, dass im Phloem von *Vicia* die Proteinaktivität einer konstitutiv vorhandenen NOS und nicht das korrespondierende Gen induziert wird.

4.3 Influx von NO in die Siebelemente und Bindung an Phloemproteine

Nachdem in den CCs von *Vicia faba* mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine induzierbare NOS-Aktivität und der Einstrom von NO in die SEs demonstriert werden konnte, sollte untersucht werden, welche Funktion NO in den SEs hat. Aus der Literatur ist bekannt, dass NO an Proteine bindet und so zum Beispiel die Aktivität von Enzymen reguliert. Die Effekte der Nitrierung von Tyrosin- und der Nitrosylierung von Cysteinresten auf die Proteinfunktion ist in Tieren und im Menschen bereits gut erforscht (Bruckdorfer 2005). Am Beispiel der humanen Glutahionreduktase wurde die Inaktivierung des Enzyms durch Nitrierung zweier Tyrosinreste gezeigt (Savvides et al. 2002). Das Enzym GAPDH wird durch Nitrosylierung eines einzelnen Cysteins im aktiven Zentrum gehemmt (Padgett und Whorton 1995, Mohr et al. 1996). In Pflanzen sind bisher die Mechanismen der NO-Wirkung kaum erforscht worden.

Für die Biochemie mit Phloemproteinen wurden Kürbispflanzen benutzt, da aus *Vicia faba* nicht ausreichend große Volumina Phloemsaft gewonnen werden konnten. Zuerst sollte festgestellt werden, mit welchen Behandlungen in *C. maxima* ein Influx von NO in die SEs ausgelöst werden konnte. Dazu wurden Pflanzen verwundet, in 40 °C inkubiert oder mit dem Resistenzinduktor BTH behandelt. Mit Hitze und Verwundung wurden zwei Reize gewählt, von denen bekannt ist, dass sie eine NO-Synthese auslösen (Gould et al. 2003, Jih et al. 2003, Huang et al. 2004). Da SA im Phloem von *Vicia faba* die NOS aktiviert hatte (Abb. 4.2.1), wurden außerdem das SA-Analog BTH verwendet. Nach dem Dot Blot der Phloemproben auf eine Nitrocellulosemembran wurde ein Western mit Nitrotyrosin-Antikörpern durchgeführt. Mit diesen Antikörpern war in einer vorhergehenden Studie bereits die Menge Peroxynitrit in Blattextrakten abgeschätzt worden (Morot-Gaudry-Talarmain et al. 2002).

Alle Behandlungen der Pflanzen verursachten einen Anstieg der Signalstärke im Western Blot, wobei Verwundung den stärksten Effekt hatte. Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass Verwundung und Behandlung mit JA eine NO-Synthese auslösten (Huang et al. 2004). Auf

der anderen Seite führte die Infiltration des NO-Donors Sodiumnitroprussid zu einer SA-Akkumulation. Diese Ergebnissen ließen auf eine Rolle von NO in der Feinregulation der JA-Signalkaskade schließen (Huang et al. 2004). Nach Resistenzinduktion dauerte es 12-24 h und nach Verwundung 4-12 h, bevor eine zunehmende Nitrierung von Proteinen in den SEs sichtbar wurde. Den gleichen Effekt hatte eine 20 minütige Inkubation der Pflanze bei 40 °C. Gould et al. (2003) verzeichneten ebenfalls schon nach einem kurzen Hitzestimulus eine Zunahme der NO-Produktion in Tabakepidermis. Der schnelle Anstieg der Signalstärke nach Hitzestress spricht eher für einen Einstrom von NO in die SEs als für eine Neogenese NO bindender Proteine. Wenn die Versuchspflanze vor dem Hitzestress mit dem NOS-Inhibitor L-NAME gegossen wurde, stieg die Signalintensität nicht an. Insgesamt scheint der Western Dot Blot ein gutes Maß für die Proteinnitrierung und für den NO-Influx in SEs zu sein.

Im Nitrosotyrosin-Western Blot nach elektrophoretischer Auftrennung der Phloemproteine war eine einzelne Bande zu sehen, die eine Größe von etwa 25-26 kD hatte. Dank der Ponceau-Färbung der Blotmembran vor der Immunodetektion konnte das Signal im Western einer Bande zugeordnet werden, die auch nach Coomassie-Färbung sichtbar war. Mit der *Biotin switch*-Methode wurde ein Protein entsprechender Größe als PP2-Isoform identifiziert (s.u.). Obwohl die Verwundung der Pflanze im Western Dot Blot eine deutliche Zunahme der Signalstärke zur Folge hatte, war der Effekt auf die Nitrierung des 25-26 kD großen Proteins nur schwach ausgeprägt. Dieser Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass der Dot Blot ein kumulatives Signal vieler nitrierter Proteine ergibt. Die meisten dieser Proteine sind wahrscheinlich niedrig konzentriert und daher nach der Elektrophorese nicht detektierbar.

Mit der *Biotin switch*-Methode sollten nitrosylierte Phloemproteine detektiert werden. Dazu wurden freie Cysteinreste durch Methylierung blockiert und unter reduzierenden Bedingungen das NO von nitrosylierten Cysteinen abgespalten. Die vormals nitrosylierten Cysteine wurden danach biotinyliert (*Biotin switch*, Jaffrey et al. 2001). Durch das Biotin war es möglich die NO-bindenden Proteine in einem Western Blot darzustellen oder mit Anti-Biotin-Dynabeads aus den Phloemproben zu isolieren. Im Western Blot mit Biotin-Antikörpern wurden 5 Banden im Bereich von 16 bis ca. 45 kD gefunden. Wie im Nitrotyrosin-Western Blot trat eine prominente Bande bei 25-26 kD auf. Einige besonders abundante Proteine wie das 24,5 kD große PP2, Serpin 1 und PP1 wurden dagegen nicht detektiert. Das kann als Indiz für die Spezifität der Methode aufgefasst werden. Interessanterweise wurden die Proteine *in vivo* nitrosyliert, wobei besonders für das 25-26 kD Protein nach Verwundung eine deutlich stärkere Bande zu verzeichnen war als in Phloemproben aus Kontrollpflanzen. Eine Nitrosylierung konnte *in vivo* bisher weder in Tier- noch in Pflanzenzellen beobachtet

werden (Jaffrey et al. 2001, Lindermayr et al. 2005). Die Nitrosylierung mit GSNO war vermutlich aufgrund der hohen Glutathion-Konzentration im Phloemsaft kaum effektiv.

Nach der Isolierung und Auftrennung der biotinylierten Proteine wurden 12 Kandidaten identifiziert, bei denen es sich möglicherweise um nitrosylierbare Proteine im Phloem von *C. maxima* handelt. In einer Mischbande wurden die Proteine CmPP16-1, CSF-2, Cyclophilin und ein Actindepolymerisierungsfaktor (ADF) gefunden. Ihre Identität ist unsicher, da sie jeweils nur anhand eines Peptides identifiziert wurden. Allerdings ist in *Arabidopsis* bereits ein ADF als nitrosylierbares Protein charakterisiert worden (Lindermayr et al. 2005). Dieses Protein ist im Phloemsaft wahrscheinlich wenig abundant, da es auch in Coomassie-gefärbten Gelen keine Bande bildet. Es war noch nicht als Phloemprotein bekannt. Dagegen sind Serpin-1 und SWP-3 (*silverleaf whitefly-induced protein 3*) prominente Phloemproteine (Haebel und Kehr 2001, Walz et al. 2004). Sie wurden im Biotin-Western Blot nicht detektiert. Ein möglicher Grund dafür könnte ihre geringe Bindungskapazität für NO sein.

Interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen von potenziellen *in vivo* nitrosylierten Proteinen sind CmPP16-2, CmPP2, CmPP36, Glyoxalase, und die beiden gefundenen anionischen Peroxidasen. Die Molekulargewichte dieser Proteine liegen im Größenbereich von 16 bis ca. 45 kD und stimmen damit etwa mit den Signalen im Biotin-Western Blot überein. Die stärkste Bande im Western Blot wurde über Massenspektroskopie als PP2 identifiziert. Es scheint sich dabei um eine Isoform des hochabundanten 24,5 kD großen Proteins zu handeln. Dementsprechend fanden Read and Northcote (1983) 25 und 26,5 kD große Phloemproteine, die sich zu einem PP2-Dimer zusammensetzten. Nur das größere der beiden Proteine wurde im Biotin-Western Blot detektiert und mit den Anti-Biotin-Dynabeads isoliert. Es kann im Gegensatz zu der redoxsensitiven 24,5 kD Isoform nicht mit basischem Puffer gefällt werden (Kap. 4.5). In Western Blots mit PP2-Antikörpern wurde bis auf eine Ausnahme (Golecki et al. 1999) immer nur eine einzelne Bande bei 24,5 kD detektiert (Schobert et al. 1998, Golecki et al. 1999, Dinant et al. 2003, Gómez et al. 2005). Die Isoproteine haben also wahrscheinlich unterschiedliche chemische Eigenschaften.

Glyoxalase I detoxifiziert Methylglyoxal, ein Beiprodukt des Zucker- und Lipidstoffwechsels. Dabei setzt es im Zusammenspiel mit Glyoxalase II und Glutathion als Cofaktor Methyglyoxal zu Lactat um. Glyoxalase I scheint eine wichtige Rolle in der Salztoleranz zu spielen, da das entsprechende Gen in Tomatenpflanzen durch Salzstress induziert wird, und eine Überexpression des Gens in Tabakpflanzen zu einer erhöhten Salztoleranz beiträgt (Espartero et al. 1995, Singla-Pareek et al. 2003). Das Enzym ist für weitere Untersuchungen besonders interessant, weil bereits bekannt ist, dass es durch Nitrosylierung mit GSNO

gehemmt wird (Mitsumoto et al. 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass die Glyoxalase I im Phloemsaft vorkommt (Haebel und Kehr 2001, Walz et al. 2004) und in den SEs sogar stärker akkumuliert als in umliegenden Zellen (Espartero et al. 1995). Das deutet auf eine wichtige Rolle des Proteins in der Phloemphysiologie oder -funktion hin.

Die Cytochrom b5-Reduktase CmPP36, und die beiden Peroxidasen sind Enzyme, die an der Produktion und Detoxifizierung von ROS beteiligt sein könnten. Eine Regulation dieser Enzyme durch Nitrosylierung könnte mit Aktivitätsmessungen untersucht werden.

4.4 In den Siebelementen hemmt NO die Aktivität der antioxidativen Enzyme Ascorbatperoxidase und Superoxiddismutase

Im Phloemsaft existiert ein vollständiges antioxidatives System (Walz et al. 2002) mit großen Mengen der Antioxidantien Ascorbat und Glutathion. Deshalb könnten die Redoxsignale H_2O_2 und NO nur dann systemisch in den SEs transportiert werden, wenn die Aktivitäten antioxidativer Enzyme herunterreguliert würden. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob NO in die Regulation der Enzyme Ascorbatperoxidase (APX), Dehydroascorbatreduktase (DHAR), Superoxiddismutase (SOD) und Peroxidase (POD) involviert ist. APX reduziert H_2O_2 zu Wasser, wobei Ascorbat oxidiert wird (Asada 1999). Das Enzym spielt eine zentrale Rolle in der Signalübertragung durch H_2O_2 (Mittler 2002). Am Ascorbatzyklus ist auch das Enzym Dehydroascorbatreductase (DHAR) beteiligt. SOD setzt Superoxid und Protonen zu H_2O_2 und O_2 um (Beauchamp and Fridovich 1971, Asada 1999). Peroxidasen können abhängig vom Redoxstatus in der Zelle H_2O_2 produzieren oder beseitigen.

Zunächst sollte durch Behandlung des Phloemsaftes mit Peroxynitrit ($ONOO^-$) und mit dem NO-Donor Nitrosoglutathion (GSNO) getestet werden, welche der 4 Enzyme *in vitro* durch NO reguliert werden. Es zeigte sich, dass NO auf die Aktivitäten der Enzyme POD und DHAR keinen Einfluss hatte. APX dagegen wurde durch NO zu 60 % gehemmt. Das stimmt gut mit der etwa 66-70 %igen Hemmung einer APX durch GSNO überein, die von Clark et al. (2000) in Blattextrakten aus Tabak ermittelt wurde. Im Unterschied dazu hatte GSNO auf die APX-Aktivität in kultivierten Tabakzellen keinen Effekt, sondern wurde ausschließlich durch den NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) inhibiert (Murgia et al. 2004). Solche spezifischen Wirkungen von NO-Donoren wurden für die APX im Phloemsaft nicht gefunden.

Die Aktivität der SOD wurde durch die Behandlung mit Peroxynitrit um 55 % reduziert, während GSNO eine leichte Hochregulierung des Enzyms um 14 % bewirkte. Kontrollen

zeigten, dass die beobachteten Effekte nicht auf eine Glutathiolierung oder Oxidierung zurückzuführen sind. Vielmehr wird die SOD wahrscheinlich durch $ONOO^-$ nitriert. Bei diesem Prozess bindet NO an aliphatische oder aromatische Aminosäuren wie Tyrosin (Savvides et al. 2002, Bruckdorfer 2005). Auf der anderen Seite könnte der Effekt von GSNO auf eine NO-Bindung an Cysteinreste der SOD durch Transnitrosylierung zurückzuführen sein (Jaffrey et al. 2001, Bruckdorfer 2005, Lindermayr et al. 2005). Evtl. ist die SOD ein Protein, das sowohl nitriert als auch nitrosyliert werden kann, wobei beide Proteinmodifikationen anders als bei der APX gegensätzliche Effekte haben.

In weiteren Versuchen wurden Enzymaktivitäten im Phloemsaft 24 h nach Resistenzinduktion und Verwundung bzw. nach einer 20 minütigen Inkubation der Pflanze bei 40 °C gemessen. Für die Enzyme POD und DHAR waren unterschiedliche Effekte der Behandlungen zu erkennen. Während beide Enzymaktivitäten durch die Verwundung der Blätter herunterreguliert waren, wurden die Aktivitäten durch die Behandlung mit BION nicht verändert. Hitzestress verursachte eine Zunahme der POD- und eine leichte Abnahme der DHAR-Aktivität. Ein anderes Bild ergab sich für die APX und SOD. Diese Enzyme waren nach allen Behandlungen gehemmt. Dabei hatten Verwundung in zwei unabhängigen Versuchen mit 55 bzw. 47 % und Hitze mit etwa 43 % die stärksten Effekte auf die APX. Die Aktivität der SOD war durch Verwundung (24 bzw. 35 %) und BION (20 %) am deutlichsten vermindert. In zwei Experimenten wurde außerdem auch die Glutathionperoxidase (GPX) nach Verwundung und Resistenzinduktion in ähnlichem Maß inhibiert wie die APX (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im Phloemsaft von *Cucurbitaceae* ist keine CAT-Aktivität messbar (Eschrich et al. 1971, eigene Messungen), d.h. mit der APX und GPX werden die wahrscheinlich einzigen H_2O_2-abbauenden Enzyme in SEs herunterreguliert. Die Hemmung der APX könnte einen Weg darstellen, den Transport und die Wirkung von H_2O_2 oder seinen Oxidationsprodukten als Signal zu verbessern (Clark et al. 2000, Zeier et al. 2004). Unter diesen Bedingungen könnte H_2O_2 ein guter Kandidat für ein systemisches Signal sein (Abb. 4.4.1). H_2O_2 gilt als universelles Stresssignal und könnte daher sowohl nach biotischem als nach abiotischem Stress im Phloem transportiert werden. Als Orte der H_2O_2-Produktion kommen u.a. Bündelscheidezellen (Karpinski et al. 1999, Orozco-Cárdenas et al. 1999) und Geleitzellen in Frage. Die verringerten Aktivitäten antioxidativer Enzyme und das daraus resultierende Absinken des Redoxstatus könnte außerdem zu einer Fällung der redoxsensitiven Phloemproteine 1 und 2 in den SEs führen (s. Kap. 4.5).

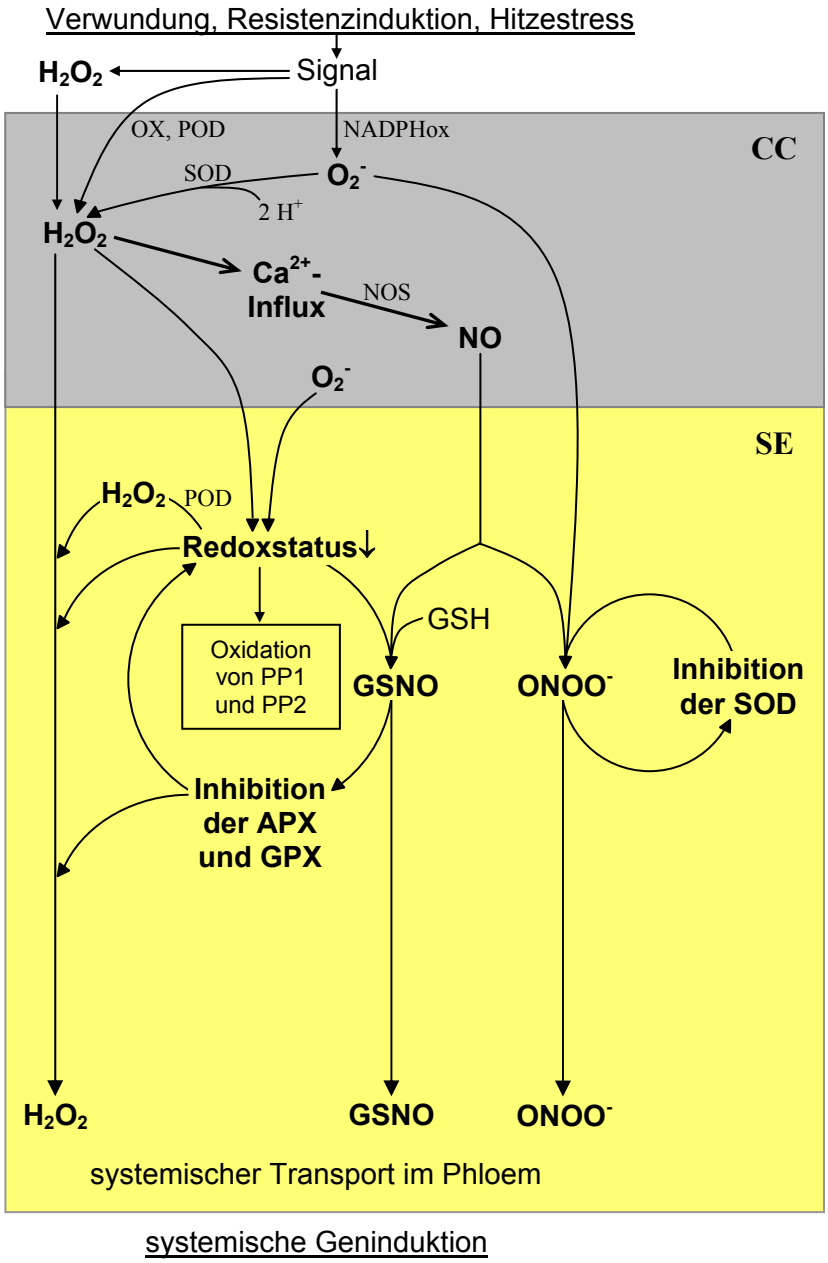


Abb. 4.4.1 Hypothetische Signalübertragung im Phloem durch H_2O_2 und NO. Nach einem Reiz wird durch ein Signal die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die Enzyme Oxidase (OX), Peroxidase (POD), NADPH-Oxidase (NADPHox) und Superoxiddismutase (SOD) induziert. In den Geleitzellen aktiviert H_2O_2 eine Ca^{2+}-abhängige NO-Synthase (NOS). ROS führen im SE zu einem Absinken des Redoxstatus. Dadurch wird die Fällung der Phloemproteine 1 und 2 verursacht (s. Kap. 4.5) und die Nitrosylierung von Glutathion (GSH) und von Proteinen begünstigt. Die Inhibition der H_2O_2 abbauenden Enzyme Ascorbat- (APX) und Glutathion-peroxidase (GPX) durch NO wiederum ermöglicht den systemischen Transport von H_2O_2 und bewirkt eine weitere Abnahme des Redoxpotentials im SE. In diesem Milieu könnte H_2O_2 auch durch POD im SE gebildet werden. Unter oxidierenden Bedingungen entsteht hauptsächlich Nitrosoglutathion (GSNO) aus GSH und NO^+ und in geringerem Umfang Peroxynitrit ($ONOO^-$) aus $NO^\cdot$ und Superoxid. $ONOO^-$ würde durch Hemmung der SOD in CC und SE zu einer weiteren Akkumulation von Superoxid beitragen. H_2O_2, GSNO und $ONOO^-$ könnten als systemische Signale im Phloem transportiert werden.

Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern lieferten Hinweise auf einen Influx von NO in die SEs nach Verwundung, Resistenzinduktion und Hitzestress (Kap. 4.3). Um zu untersuchen, ob die Hemmung der APX und SOD nach diesen Behandlungen der Pflanzen auf der

Wirkung von NO beruhte, wurden Experimente mit dem NOS-Inhibitor L-NAME durchgeführt. Der Inhibitor wurde in wässriger Lösung nicht-invasiv über die Wurzel appliziert, bevor die Pflanzen durch Verwundung oder Hitze gestresst wurden. L-NAME hatte auf die Hemmung der APX nach Verwundung keinen Effekt. Die Inhibition der SOD und der durch Western Blots visualisierte NO-Influx in die SEs wurden teilweise unterdrückt. Für die schwachen Effekte von L-NAME könnten methodische Probleme verantwortlich sein. Trotz mehrfacher Applikation war der Inhibitor in den 24 h zwischen Verwundung und Probenahme phasenweise wahrscheinlich zu niedrig konzentriert, um die NOS-Aktivität vollständig auszuschalten.

Im Gegensatz zur Verwundung rief die Inkubation in 40 °C eine schnelle Reaktion der Kürbispflanzen hervor. Daher brauchte der NOS-Inhibitor nur in einem engen Zeitfenster appliziert werden und lag wahrscheinlich während des gesamten Experiments in einer effektiven Konzentration vor. Western Blots zeigten, dass der NO-Influx in die SEs durch L-NAME unterbunden wurde. Als Konsequenz konnte die Hemmung der Enzyme APX und SOD nach dem Hitzestress fast vollständig verhindert werden. Auf die Regulation der DHAR- und POD-Aktivität hatte L-NAME dagegen keinen Einfluss.

Bei der Interpretation der Enzymmessungen muss beachtet werden, dass nach Reizung der Pflanze die Proteinkonzentration im Phloemsaft abnahm. Allerdings kann die Verringerung der Proteinmenge im Phloemsaft um durchschnittlich 15 % quantitativ nicht die Reduktion der APX- und SOD-Aktivitäten erklären. Außerdem zeigten Analysen der Proteinzusammensetzung, dass in den SEs wahrscheinlich spezifisch die redoxsensitiven Phloemproteine 1 und 2 gefällt werden (Kap. 4.5). Unabhängig davon, ob Enzyme gehemmt werden oder ob ihre Proteinmenge abnimmt, spiegeln die auf das Phloemsaft-Volumen bezogenen Messwerte am besten die tatsächlichen Enzymaktivitäten in den SEs wider.

Insgesamt legen die Ergebnisse der Western Blots und der Experimente mit L-NAME den Schluss nahe, dass nach einem Hitzestimulus NO in die SEs von *C. maxima* fließt. Dort könnte NO direkt oder indirekt die antioxidativen Enzyme APX und SOD inhibieren (Abb. 4.4.1). Gestützt wird diese Hypothese durch die *in vitro*-Hemmung der APX und SOD nach Behandlung des Phloemsaftes mit NO-Donoren. Dabei wurde die SOD-Aktivität ausschließlich durch Peroxynitrit gehemmt. Im Phloem könnte aus NO^+ und Superoxid Peroxynitrit entstehen und durch Nitrierung von Tyrosinresten die SOD inaktivieren (Abb. 4.4.1). Die Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern und die *Biotin switch*-Methode zeigten, dass im Phloem möglicherweise Nitrierungen und Nitrosylierungen von Proteinen gleichzeitig ablaufen.

Die Hemmung der APX und SOD durch NO könnte Element einer selbstpropagierenden systemischen Signalkaskade im Phloem sein (Abb. 4.4.1): Einerseits induziert H_2O_2 die NO-Synthese in den CCs des Phloems, während auf der anderen Seite NO durch Hemmung der ROS-abbauenden Enzyme die Akkumulation und den Transport von ROS, vor allem H_2O_2, in den SEs fördert. Entlang der Transportstrecke könnte H_2O_2 in weiteren CCs die NOS induzieren.

NO kommt aber auch unabhängig von ROS als systemisches Signal in Frage. Dabei könnte das Gas selbst oder redoxaktivierte Formen von NO, wie Peroxynitrit, in den Siebröhren des Phloems transportiert werden. Unter den oxidierenden Bedingungen, die wahrscheinlich nach einer Reizung der Pflanze im Phloem vorherrschen, und bei den hohen Glutathion-Konzentrationen im SE könnte außerdem GSNO entstehen (Abb. 4.4.1). Mit GSNO wurde in Tabak eine Akkumulation von SA und die Expression der Abwehrgene PR1 und PAL induziert (Durner et al. 1998). Die These, dass GSNO an Signalübertragungen in Pflanzen beteiligt ist, wurde durch die Entdeckung von GSNO-Reduktasen mit Funktionen in Pathogenabwehr und Wundreaktion untermauert (Diaz et al. 2003, Feechan et al. 2004). Von Tieren und vom Menschen ist bekannt, dass NO die Guanylylcyclase (GC) aktiviert, die das Signalmolekül cGMP aus GTP freisetzt (Bruckdorfer 2005). Mit cGMP und cADPR wurden zwei aus Säugetieren bekannte Elemente der NO-Signalkaskade in Pflanzen getestet. Beide induzierten wie der NO-Donor GSNO die Expression der Gene PR1 und PAL (Durner et al. 1998). In ersten Vorversuchen (nicht gezeigt) konnte cGMP im Phloemsaft unbehandelter Kürbispflanzen nachgewiesen werden.

4.5 Redoxsensitive Proteine als Indikatoren für eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies im Phloemsaft infolge der Hemmung antioxidativer Enzyme durch NO

Die Hemmung der ROS-abbauenden Enzyme APX, GPX und SOD durch NO *in vivo* könnte eine Signalübertragung durch ROS im Phloem ermöglichen (Abb. 4.4.1). Die Konzentration von H_2O_2 im Phloemsaft von Kontroll- und behandelten Pflanzen wurde zwar bisher noch nicht gemessen, aber es gibt indirekte Hinweise auf eine Akkumulation von ROS und die damit einhergehende Veränderung des Redoxpotenzials in den Siebelementen. Messungen der Proteinkonzentration im Phloemsaft ergaben, dass nach Behandlung mit BION, Verwundung und Hitzestress die Werte etwa 15 % niedriger lagen als in Proben aus Kontrollpflanzen. Die

elektrophoretische Auftrennung der Phloemproteine zeigte eine Abnahme der Bandenstärke für die Proteine PP1 und PP2. Beide Proteine machen zusammen 80 % des Gesamtproteingehalts im Phloemsaft von *Cucurbitaceae* aus. Sie werden in der Literatur als redoxsensitive Proteine beschrieben, die für die Gelierung des Phloemsaftes aus *Cucurbitaceae* an der Luft verantwortlich sind (Read and Northcote 1983, Alosi et al. 1988).

In vitro Experimente mit H_2O_2 und basischem Puffer bestätigten, dass hauptsächlich PP1, PP2 und das PP2-Dimer durch Oxidation gefällt wurden. In diesen Versuchen gelierten Proben aus verwundeten Pflanzen nach Zugabe von oxidierendem Puffer und unter dem Einfluss von Luftsauerstoff viel langsamer als Phloemproben aus Kontrollpflanzen. Möglicherweise handelt es sich bei der durch Verwundung *in vivo* gefällten Proteinfraktion um besonders redoxsensitive Proteine, durch deren Fehlen das Gelieren des Phloemsaftes erschwert wird. Als alternative Erklärung kommt die Veränderung des pH-Wertes oder des Redoxpotentials im Phloemsaft durch die Reizung der Pflanze in Betracht.

Mit Hilfe von L-NAME konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Aktivität einer NOS im Phloem und der Fällung der Phloemproteine 1 und 2 nach Behandlung der Pflanze hergestellt werden. Durch L-NAME wurde die Verringerung der Proteinkonzentration nach Inkubation der Pflanze in 40 °C fast vollständig unterdrückt. Das spricht unter Berücksichtigung der in Kap. 4.4 dargestellten Ergebnisse für eine Hemmung antioxidativer Enzyme durch NO. Die daraus resultierenden oxidierenden Bedingungen im SE könnten für die Fällung von PP1 und PP2 verantwortlich sein (Abb. 4.5.1). Ein direkter Effekt von NO auf PP1 und PP2 ist unwahrscheinlich, da mit Peroxynitrit und GSNO keine Gelierung ausgelöst werden konnte. Der Effekt von L-NAME auf die Fällung redoxsensitiver Proteine unterstützt die Idee, dass die Inhibition der SOD, APX und GPX und evtl. weiterer bisher nicht untersuchter Enzyme für die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in den SEs wichtig ist.

Durch die Fällung von PP1 und PP2 *in vivo* werden wahrscheinlich in den SEs die Poren der Siebplatten verstopft. Knoblauch et al. (1998, 2001) haben Verschlussmechanismen der SEs intensiv untersucht. Je nach Stärke des Reizes sind an der Reaktion des Phloems von *Vicia faba* Forisomen, parietale Proteine oder Plastiden beteiligt. Die Dispersion der Forisomen ist abhängig von einem Ca^{2+}-Influx in das SE. Nach Verletzung der SEs werden vermutlich durch den Turgorverlust Ca^{2+}-Kanäle aktiviert (Knoblauch et al. 2001). In intakten SEs konnte die Behandlung mit H_2O_2 einen Ca^{2+}-Influx auslösen (Kap. 4.2). Bei dieser Reaktion des Phloems könnten ROS-sensitive Ca^{2+}-Kanäle (Mori und Schroeder 2004) eine Rolle spielen. Die Forisomen sorgen durch ihre Dispersion und Rekondensation dafür, dass der Assimilatstrom schnell und reversibel unterbrochen wird.

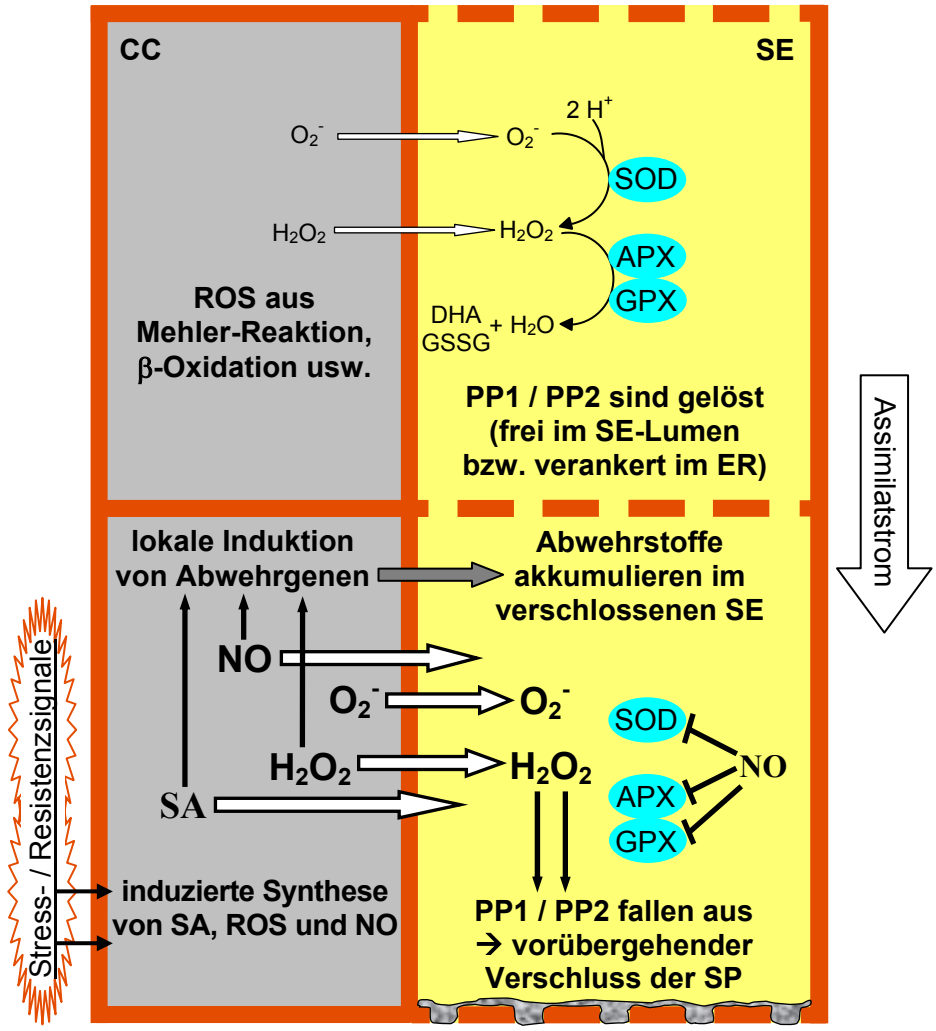


Abb. 4.5.1 Spekulative Reaktion des Phloems auf Stress- und Resistenzsignale. Im ungestressten Zustand werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch die Superoxiddismutase (SOD), Ascorbatperoxidase (APX) und Glutathionperoxidase (GPX) abgebaut. Dabei werden Ascorbat zu Dehydroascorbat (DHA) und Glutathion zu Glutathiondimeren (GSSG) oxidiert. Nach Reizung der Pflanze kommt es zur Synthese von SA, ROS und NO. Durch diese Signalmoleküle werden in der Geleitzelle (CC) des Phloems und im umliegenden Gewebe Stress- und Abwehrgene induziert. Im Siebelement (SE) hemmt NO antioxidativen Enzyme. Dadurch sinkt der Redoxstatus im SE und die redoxsensitiven Phloemproteine 1 und 2 (PP1, PP2) fallen aus. PP1 und PP2 verschließen die Siebplatte und unterbrechen auf diese Weise den Assimilatstrom in der Siebröhre. Das führt dazu, dass Produkte der Abwehrgene in dem verschlossenen SE akkumulieren können.

Ein starker Turgorverlust verursacht in *Vicia faba* das Zerplatzen der Phloemplastiden. Der Inhalt der Plastiden koaguliert dann vor der Siebplatte (Knoblauch et al. 1998). In *Cucurbitaceae* könnten PP1 und PP2 einen langfristigen Verschluss verletzter SEs bewirken. Read and Northcote (1983) fanden, dass PP1 und PP2 größtenteils in den SEs verankert sind und nach dem Durchtrennen von Pflanzenteilen in den Exsudaten mitgerissen werden. Das zeigt auch ein Vergleich der Proben aus der Stylektomie mit den Exsudaten aus durchtrennten Pflanzenteilen. Wegen des langsamen Austretens des Phloemsaftes aus dem Blattlausstilett entsteht im SE kein starker Druckverlust. Deshalb lösen sich PP1 und PP2 nicht aus ihren

Verankerungen im SE und bilden in einem PAA-Gel mit diesen Phloemproben keine starken Banden (Abb. 7.1). Es muss allerdings noch überprüft werden, ob mit den beiden Techniken Proben aus den selben Phloemsystemen gewonnen werden, da Kürbisgewächse neben dem Bündelphloem noch extravaszikuläre Phloemstränge aufweisen. Ob und ggf. wie PP1 und PP2 dem Schutz der SEs im Rahmen einer Wundreaktion dienen, ist noch unklar.

Als Modell für den Verschluss der Siebplatten von *C. maxima* durch PP1 und PP2 in unverletzten SEs könnte die Reaktion des Phloems von *Vicia faba* auf Bestrahlung mit einem starken Laser dienen (Knoblauch et al. 1998). Innerhalb weniger Sekunden lösen sich parietale Proteine aus ihren Verankerungen im endoplasmatischen Retikulum, werden durch den Assimilatstrom zur Siebplatte transportiert und bilden dort eine dichte Ablagerung. Möglicherweise handelt es sich bei den parietalen Proteinen im SE von *Vicia* um PP1 und PP2. Zumindestens PP2 wurde in mehreren *Fabaceae* gefunden (Dinant et al. 2003). Auch könnte die Fällung der parietalen Proteine, wie für PP1 und PP2 vermutet, auf einen Einstrom von ROS in das SE zurückzuführen sein. Eine starke Produktion reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb weniger Sekunden nach Bestrahlung mit UV-Licht wurde in der Epidermis von Tabakpflanzen beobachtet (Allan and Fluhr 1997).

PP1 und PP2 sind im Gegensatz zu den Forisomen, die nur in *Fabaceae* vorkommen, möglicherweise Elemente einer im Pflanzenreich weitverbreiteten lokalen Stressreaktion des Phloems (Abb. 4.5.1). Im Verlauf der Reaktion induzieren SA, H_2O_2 und NO in den CCs Abwehrgene. NO diffundiert aus den CCs in die SEs und inhibiert dort antioxidative Enzyme. Dadurch kommt es zu einem Absinken des Redoxpotentials in den SEs und zu einer Fällung von PP1 und PP2. Der resultierende Verschluss der Siebplatten könnte vorübergehend den Assimilatstrom unterbrechen, damit in den SEs die Produkte der Abwehrgene aufkonzentriert werden. Dieser Prozess könnte dazu dienen, nach Verwundung oder Pathogenbefall die Ausbreitung von Bakterien und Viren im Phloem zu verhindern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden physiologische und molekulare Muster von Reaktionen des Phloems auf diverse Reize untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe des cDNA-AFLP (cDNA-*amplified fragment length polymorphism*) Teilsequenzen von 11 Transkripten im Phloemsaft aus Gerstenpflanzen ermittelt. Drei Transkripte, zu denen auch die mRNA des Abwehrproteins Carboanhydrase gehört, wurden ausschließlich nach chemischer Induktion von Pathogenresistenz gefunden. Die Transkripte sind damit Kandidaten für systemisch transportierte Resistenzsignale.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit Funktionen des Signalmoleküls NO im Phloem. In mikroskopischen Studien mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Diaminofluoresceindiacetat konnte in den Geleitzellen des Phloems von *Vicia faba* eine starke NO-Synthese beobachtet werden. Diese NO-Synthese wurde durch exogene Applikation von Salicylsäure und H_2O_2 ausgelöst. Ein pilzlicher Elicitor und Jasmonsäure bewirkten dagegen eine vergleichsweise schwache NO-Synthese. Pharmakologische Analysen zeigten, dass im Phloem eine Ca^{2+}- und L-Arginin-abhängige NO-Synthase (NOS) aktiv ist.

Während *Vicia faba* gut geeignet ist für die *in vivo*-Mikroskopie des Phloems, können aus dieser Pflanze jedoch nur sehr geringe Mengen Phloemsaft gewonnen werden. Daher wurden biochemische Untersuchungen mit Phloemproben aus Kürbispflanzen vorgenommen. Nach Verwundung, Hitzestress und Behandlung mit dem Resistenzinduktor BION konnte in Western Blots mit Nitrotyrosin-Antikörpern eine zunehmende Nitrierung von Phloemproteinen festgestellt werden. Außerdem wurden mit der *Biotin switch*-Methode potenzielle nitrosylierbare Proteine im Phloemsaft nachgewiesen. Insgesamt wurden 12 Proteine identifiziert, darunter die Phloemproteine 16 und 36 sowie zwei Peroxidasen, die Glyoxalase I und die 25-26 kD große Isoform des Phloemprotein 2 (PP2). Das letztere Protein wurde wahrscheinlich sowohl an Cysteinresten nitrosyliert als auch an Tyrosinresten nitriert.

Durch Behandlung von Kürbis-Phloemproben mit NO-Donoren wurden die antioxidativen Enzyme Ascorbatperoxidase (APX) und die Superoxiddismutase (SOD) *in vitro* inhibiert. Einen ähnlichen Effekt hatten Verwundung, Resistenzinduktion und Hitzestress *in vivo*. Wenn vor dem Hitzestress die Versuchspflanzen mit einem NOS-Inhibitor behandelt wurden, konnte die Hemmung der APX und SOD fast vollständig verhindert werden. Das deutet an, dass diese Enzyme nach Hitzestress direkt oder indirekt durch NO gehemmt wurden. Mit dem gleichen Inhibitor wurde außerdem die partielle Fällung des Phloemproteins 1 und einer 24,5 kD großen PP2-Isoform nach Reizung der Pflanzen unterdrückt.

PP1 und PP2 sind redoxsensitive Proteine, deren Fällung wahrscheinlich ein Absinken des Redoxpotentials im Siebelement anzeigt. Die Ergebnisse werden in Bezug auf eine mögliche Rolle von NO in Redox-abhängigen systemischen Signalkaskaden diskutiert.

5 SUMMARY

In this work, physiological and molecular patterns of responses of the phloem to various stimuli were investigated. Utilising cDNA-AFLP (cDNA-*amplified fragment length polymorphism*) partial sequences of 11 gene transcripts in barley phloem exudates were received. Three transcripts, of which one coded for the defence-related carboanhydrase, were detected exclusively after chemical induction of pathogen resistance. These mRNAs are candidates for systemically translocated resistance signals.

The second part of the PhD project dealt with functions of the signal molecule nitric oxide in the phloem. Microscopic studies with the NO-specific fluorescent dye diaminofluoresceine diacetate revealed a strong NO-synthesis in companion cells of the phloem of *Vicia faba*. The NO burst was induced by exogenously applied salicylic acid and H_2O_2. A fungal elicitor and jasmonic acid were less effective inducers. Pharmacological approaches demonstrated that a Ca^{2+}- and L-Arginin-dependent NO synthase (NOS) is active in the phloem.

After wounding of leaves, heat stress, and treatment with the resistance inducing chemical BION an increase in nitration of proteins in pumpkin phloem sap was recognised using western blot analyses with nitrotyrosine antibodies. Furthermore, potentially nitrosylated phloem proteins were detected by the biotin switch method. 12 proteins were identified, among them the phloem proteins 16 and 36, two peroxidases, glyoxalase I, and a 25-26 kD isoform of the phloem protein 2 (PP2). The latter protein was probably nitrosylated at cysteine residues as well as nitrated on tyrosine residues.

Treatment of pumpkin phloem sap with NO donors caused a decrease in activity of the antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), wounding, resistance induction, and heat stress had a similar effect. Pretreatment of plants with a NOS inhibitor suppressed the inhibition of APX and SOD after heat stress, indicative for a regulation of the enzymes by NO. The NOS inhibitor also prevented the partial precipitation of the phloem protein 1 and of the 24,5 kD PP2 isoform after diverse treatments of pumpkin plants. PP1 and PP2 are redoxsensitive proteins whose precipitation could indicate a drop of the redox potential in the sieve elements. These results are discussed in terms of a potential role of NO in redox-dependent systemic signal cascades.

6 LITERATUR

Allan AC, Fluhr R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9:** 1559-1572

Alosi MC, Melroy DL, Park RB (1988) The regulation of gelation of phloem exudate from *Cucurbita* fruit by dilution, glutathione, and glutathione reductase. *Plant Physiol* **96:** 1089-1094

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92:** 773-784

Anderson JM (1985) Evidence for phloem transport of jasmonic acid. *Plant Physiol* **77S:** 75

Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 16342-16347

Aoki K, Suzui N, Fujimaki S, Dohmae N, Yonekura-Sakakibara K, Fujiwara T, Hayashi H, Yamaya T, Sakakibara H (2005) Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* **17:** 1801-1814

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50:** 601-639

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415:** 977-983

Avdiushko SA, Ye XS, Kuc J, Hildebrand DF (1994) Lipoxygenase is an abundant protein in cucumber exudates. *Planta* **193:** 349-357

Ayre BG, Keller F, Turgeon R (2003) Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. *Plant Physiol* **131:** 1518-1528

Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* **9:** 745-753

Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA, Lucas WJ (1997) Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 14150-14155

Barnes A, Bale J, Constantinidou C, Ashton P, Jones A, Pritchard J (2004) Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadropol time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *J Exp Bot* **55:** 1473-1481

Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupianez JA, del Rio LA (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274:** 36729-36733

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431:** 356-363

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44:** 276-287

Beßer K, Jarosch B, Langen G, Kogel KH (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol* **1:** 277-286

Bi YM, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper J (1995) Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* **8:** 235-245

Bostwick DE, Dannenhoffer JM, Skaggs MI, Lister RM, Larkins BA, Thompson GA (1992) Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* **4:** 1539-1548

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:** 248-254

Bruckdorfer R (2005) The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* **26:** 3-31

Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Van Montagu A, Inze D, Van Camp W (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 5818-5823

Chang CCC, Ball L, Fryer MJ, Baker NR, Karpinski S, Mullineaux PM (2004) Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J* **38:** 499-511

Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262:** 1883-1886

Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* **13:** 1380-1384

Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* **24:** 667-677

Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quiros M, Leon AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gomez M, del Rio LA (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* **136:** 2722-2733

Crawford NM, Guo FQ (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* **10:** 195-200

Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 6602-6606

Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8:** 390-396

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394:** 585-588

Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 13454-13459

de Pinto MC, Tommasi F, De Gara L (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130:** 698-708

Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 16314-16318

Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux P, Fobert PR (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15:** 2181-2191

Diaz M, Achkor H, Titarenko E, Martinez MC (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/ GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett* **543:** 136-139

Dinant S, Clark AM, Zhu Y, Vilaine F, Palauqui JC, Kusiak C, Thompson GA (2003) Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol* **131:** 114-128

Doering-Saad C, Newbury HJ, Bale JS, Pritchard J (2002) Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot* **53:** 631-637

Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85:** 6738-6742

Durner J, Klessig DF (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 11312-11316

Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2:** 369-374

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 10328-10333

Eckey C (2002) Isolierung und Charakterisierung Pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den *Mlg* Resistenzgenlocus mittels cDNA-AFLP. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Eckey C, Korrell M, Leib K, Biedenkopf D, Jansen C, Langen G, Kogel KH (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Mol Biol* **55:** 1-15

Espartero J, SanchezAguayo I, Pardo JM (1995) Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol Biol* **29:** 1223-1233

Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87:** 7713-7716

Farmer EE, Ryan CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4:** 129-134

Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 8054-8059

Fisher DB, Frame JM (1984) A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. *Planta* **161:** 385-393

Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992) Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol* **100:** 1433-1441

Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives T, Kiraly Z (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiol* **114:** 1443-1451

Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23:** 817-824

Foster TM, Lough TJ, Emerson SJ, Lee RH, Bowman JL, Forster RL, Lucas WJ (2002) A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *Plant Cell* **14:** 1497-1508

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17:** 1866-1875

Franceschi VR, Tarlyn NM (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol* **130:** 649-656

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

Girousse C, Bonnemain JL, Delrot S, Bournoville R (1991) Sugar and amino acid composition of phloem sap of *Medicago sativa*: a comparative study of two collecing methods. *Plant Physiol Biochem* **29:** 41-48

Golecki B, Schulz A, Thompson GA (1999) Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* **11:** 127-140

Gomez G, Torres H, Pallas V (2005) Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J* **41:** 107-116

Gomez LD, Noctor G, Knight MR, Foyer CH (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J Exp Bot* **55:** 1851-1859

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

Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* **26:** 1851-1862

Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124:** 21-29

Guedes MEM, Richmond S, Kuc J (1980) Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and the onset of flowering and fruiting. *Physiol Plant Pathol* **17:** 229-233

Guo P, Cao Y, Li Z, Zhao B (2004) Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant Cell Environ* **27:** 473-477

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302:** 100-103

Haebel S, Kehr J (2001) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprints and post source decay: a tool for the identification and analysis of phloem proteins from *Cucurbita maxima* Duch. separated by two-dimensional polyacrylamide gel electro-phoresis. *Planta* **213:** 586-593

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286:** 950-952

Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ (2005) Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* **42:** 49-68

Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy S, Nilsson O (2005) The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Nature* **309:** 1694-1696

Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218:** 938-946

Hückelhoven R, Kogel KH (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* **216:** 891-902

Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11:** 309-322

Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ (1998) Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205:** 12-22

Ivashikina N, Deeken R, Ache P, Kranz E, Pommerrenig B, Sauer N, Hedrich R (2003) Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J* **36:** 931-945

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* **3:** 193-197

Jenns AE, Kuc J (1979) Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **69:** 753-756

Jih PJ, Chen YC, Jeng ST (2003) Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol* **132:** 381-389

Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RL, Lucas WJ (1998) An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279:** 1486-1487

Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284:** 654-657

Kempers R, van Bel AJE (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201:** 195-201

Kiefer IW, Slusarenko AJ (2003) The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation. *Plant Physiol* **132:** 840-847

Kim M, Canio W, Kessler S, Sinha N (2001) Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* **293:** 287-289

King RW, Zeevaart JAD (1974) Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol* **53:** 96-103

Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 8849-8855

Knoblauch M, Noll GA, Müller T, Prüfer D, Schneider-Hüther I, Scharner D, Van Bel AJ, Peters WS (2003) ATP-independent contractile proteins from plants. *Nat Mater* **2:** 600-603

Knoblauch M, Peters WS, Ehlers K, van Bel AJ (2001) Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *Plant Cell* **13:** 1221-1230

Knoblauch M, van Bel AJE (1998) Sieve tubes in action. *Plant Cell* **10:** 35-50

Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Münch S, Romme Y (1994) Acquired resistance in barley (the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance). *Plant Physiol* **106:** 1269-1277

Kogel K-H, Langen G (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cellular Microbiol* **7:** 1555-1564

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70:** 2446-2453

Kragler F, Monzer J, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (2000) Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J* **19:** 2856-2868

Kragler F, Monzer J, Shash K, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (1998) Cell-tocell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* **15:** 367-381

Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275:** 1298-1300

Kumar D, Klessig DF (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13:** 347-351

Kumar D, Klessig DF (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 16101-16106

Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5:** 325-331

Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48:** 251-275

Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* **135:** 516-529

Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T, Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* **10:** 71-83

Lee GI, Howe GA (2003) The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J* **33:** 567-576

Lee JY, Yoo BC, Rojas MR, Gomez-Ospina N, Staehelin LA, Lucas WJ (2003) Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* **299:** 392-396

Li L, Li C, Lee GI, Howe GA (2002) Distinct roles for jasmonate synthsis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 6416-6424

Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137:** 921-930

Liu X, Shi WL, Lou CH (2005) Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba*. *Chin Sci Bulletin* **50:** 1-6

Liu X, Zhang SQ, Lou CH (2003) Involvement of nitric oxide in the signal transduction of salicylic acid regulating stomatal movement. *Chin Sci Bulletin* **48:** 449-452

Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F (2001) RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2:** 849-857

Lum HK, Butt YK, Lo SC (2002) Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide* **6:** 205-213

Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250:** 1002-1004

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419:** 399-403

Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakhshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman LH, Vance VB (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13:** 571-583

Malone M, Stancovic B (1991) Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves following localized wounding by heat. *Plant Cell Environ* **14:** 431-436

McEuen AR, Hill HAO (1982) Superoxide, hydrogen peroxide, and the gelling of phloem sap from *Cucurbita pepo*. *Planta* **154:** 295-297

McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1992) Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255:** 1570-1573

McGurl B, Orozco-Cardenas M, Pearce G, Ryan CA (1994) Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 9799-9802

Meindl T, Boller T, Felix G (1998) The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to ist receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* **10:** 1561-1570

Metraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250:** 1004-1006

Mitsumoto A, Kim KR, Oshima G, Kunimoto M, Okawa K, Iwamatsu A, Nakagawa Y (2000) Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione. *J Biochem* **128:** 647-654

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance *Trends in Plant Sci* **7:** 405-410

Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D, Ellis BE (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen inter-mediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 14165-14170

Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G, Vance VB (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14:** S289-S301

Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol* **130:** 1288-1297

Mohr S, Stamler JS, Brune B (1996) Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem* **271:** 4209-4214

Mölders W, Buchala A, Metraux JP (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol* **112:** 787-792

Molendijk AJ, Ruperti B, Palme K (2004) Small GTPases in vesicle trafficking. *Curr Opin Plant Biol* **7:** 694-700

Moran PJ, Thompson GA (2001) Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol* **125:** 1074-1085

Mori IC, Schroeder JI (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol* **135:** 702-708

Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, Quillere I, Leydecker MT, Kaiser WM, Morot-Gaudry JF (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215:** 708-715

Mou Z, Fan WH, Dong XN (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113:** 935-944

Münch E (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fischer, Jena, Germany

Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol* **161:** 777-783

Nakagami H, Pizschke A, Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* **10:** 339-346

Nakamura SI, Hayashi H, Mori S, Chino M (1993) Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Pysiol* **34:** 927-933

Narvaez-Vasquez J, Ryan CA (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218:** 360-369

Narvaez-Vasquez J, Pearce G, Orozcocardenas ML, Franceschi VR, Ryan CA (1995) Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* **195:** 593-600

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53:** 1237-1247

Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1995) Is hydrogen peroxide a 2nd-messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* **8:** 227-233

O'Donnell PJ, Calvert CM, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274:** 1914-1917

Oparka KJ (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci* **9:** 33-41

Oparka KJ, Santa Cruz S (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51:** 323-347

Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts L, Pradel KS, Imlau A, Kotlizky G, Sauer N, Epel B (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97:** 743-754

Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13:** 179-191

Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 6553-6557

Orozco-Cardenas M, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130:** 487-493

Padgett CM, Whorton AR (1995) S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation. *Am J Physiol* **269:** C739-C749

Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* **16:** 4738-4745

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible inhibitor proteins. *Science* **253:** 895-898

Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191:** 123-128

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 U S A* **92:** 4106-4113

Pieterse CMJ, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC (1996) Systemic resistance induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid and of pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8:** 1225-1237

Prats E, Mur LAJ, Sanderson R, Carver TLW (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp *hordei*. *Mol Plant Pathol* **6:** 65-78

Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* **97:** 1342-1347

Read SM, Northcote (1983) Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the *Cucurbitaceae*. *Planta* **158:** 119-127

Requena ME, Egea-Gilabert C, Candela ME (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophtora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plant* **124:** 50-60

Restrepo S, Myers KL, del Pozo O, Martin GB, Hart AL, Buell CR, Frey WE, Smart CD (2005) Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophtora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol Plant-Microbe Interac* **18:** 913-922

Ribeiro EA, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* **445:** 283-286

Rojo E, Leon J, Sanchez-Serrano JJ (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **20:** 135-142

Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiol* **6:** 795-803

Ross AF (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14:** 340-358

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (1999) Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126:** 4405-4419

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* **4:** 202-209

Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE (2002) Synthetic plant promoters containing defeined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* **14:** 749-762

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8:** 1809-1819

Ryan CA, Moura DS (2002) Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 6519-6520

Sabnis DD, Hart JW (1976) A comparative analysis of phloem exudate proteins from *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Planta* **130:** 211-218

Sakuth T, Schobert C, Pecsverardi A, Eichholz A, Komor E, Orlich G (1993) Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and *in-vivo* labelling. *Planta* **191:** 207-213

Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T (1998) Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39:** 895-897

Savvides SN, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, Schirmer RH (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem* **277:** 2779-2784

Scheer JM, Ryan CA (1999) A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvanium* cultured cells. *Plant Cell* **11:** 1525-1535

Schobert C, Baker L, Szederkenyi J, Grossmann P, Komor E, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ (1998) Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* **206:** 245-252

Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, Hückelhoven R (2002) A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol* **128:** 1447-1454

Seo S, Okamoto N, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y (1995) Tobacco MAP kinase - a possible mediator in wound signal-transduction pathways. Science **270:** 1988-1992

Shimizu S, Nomoto M, Naito S, Yamamoto T, Momose K (1998) Simulation of nitric oxide synthase during oxidative endothelial cell injury. *Biochem Pharmacol* **55:** 77-83

Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9:** 261-270

Shulaev V, Leon J, Raskin I (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* **7:** 1691-1701

Shulaev V, Silverman P, Raskin I (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385:** 718-721

Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2003) Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 14672-14677

Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 11640-11645

Smith-Becker J, Marois E, Huguet EJ, Midland SL, Sims JJ, Keen NT (1998) Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol* **116:** 231-238

Song FM, Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* **14:** 1458-1462

Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C (2003) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J* **33:** 577-589

Suyama T, Yamada K, Mori H, Takeno K, Yamaki S (1999) Cloning cDNAs for genes preferentially expressed during fruit growth in cucumber. *J Am Soc Hort Sci* **124:** 136-139

Szederkenyi J, Komor E, Schobert C (1997) Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from *Ricinus communis* L and characterisation of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* **202:** 349-356

Thompson GA, Schulz A (1999) Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends in Plant Science* **4:** 354-360

Tuzun S, Kuc J (1985) Movement of a factor in tobacco infected with *Peronospora tabacina* Adam which systemically protects against blue mold. *Physiol Plant Pathol* **26:** 321-330

Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 645-656

van Bel AJ, Ehlers K, Knoblauch M (2002) Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci* **7:** 126-132

van Bel AJE (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ* **26:** 125-149

van Bel AJE, Knoblauch M (2000) Sieve element and companion cell: the story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Austr J Plant Physiol* **27:** 477-487

van Camp W, van Montagu M, Inze D (1998) H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* **3:** 330-334

van de Ven W, LeVesque CS, Perring TM, Walling LL (2000) Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* 12: 140-1423

Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditzjawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic-acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* **6:** 959-965

Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95:** 177-187

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel K-H (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 13386-13391

Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J (2004) Proteomics of curcurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* **65:** 1795-1804

Walz C, Juenger M, Schad M, Kehr J (2002) Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant J* **31:** 189-197

Weibull J, Ronquist F, Brishammer S (1990) Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap. *Plant Physiol* **92:** 222-226

Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360:** 62-65

Willits MG, Ryals JA (1998) Determining the relationship between salicylic acid levels and the systemic acquired resistance induction in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interac* **11:** 795-800

Wingate VPM, Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol* **87:** 206-210

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Leon J, Fitzsimmons KC, Levine EB, Raskin I, Shah DM (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H_2O_2 in transgenic plants. *Plant Physiol* **115:** 427-435

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7:** 619-628

Xia YJ, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo ZJ, Patel K, Dixon RA, Lamb C (2004) An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J* **23:** 980-988

Xoconostle-Cazares B, Ruiz-Medrano R, Lucas WJ (2000) Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J* **24:** 735-747

Xoconostle-Cazares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Monzer J, Yoo BC, McFarland KC, Franceschi VR, Lucas WJ (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283:** 94-98

Xu MJ, Dong JF (2005) Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **67:** 40-44

Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol* **139:** 991-998

Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3:** 809-818

Yoo BC, Aoki K, Xiang Y, Campbell LR, Hull RJ, Xoconostle-Cazares B, Monzer J, Lee JY, Ullman DE, Lucas WJ (2000) Characterization of *Cucurbita maxima* phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor. *J Biol Chem* **275:** 35122-35128

Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16:** 1979-2000

Yoo BC, Lee JY, Lucas WJ (2002) Analysis of the complexity of protein kinases within the phloem sieve tube system. Characterization of *Cucurbita maxima* calmodulin-like domain protein kinase 1. *J Biol Chem* **277:** 15325-15332

Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 15811-15816

Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* **136:** 2875-2886

Zhang ZP, Baldwin IT (1997) Transport of [2-^{14}C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **203:** 436-441

Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn JE, Koiwa H (2004) Transcriptional regulation of *Sorghum* defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol* **134:** 420-431

7 ANHANG

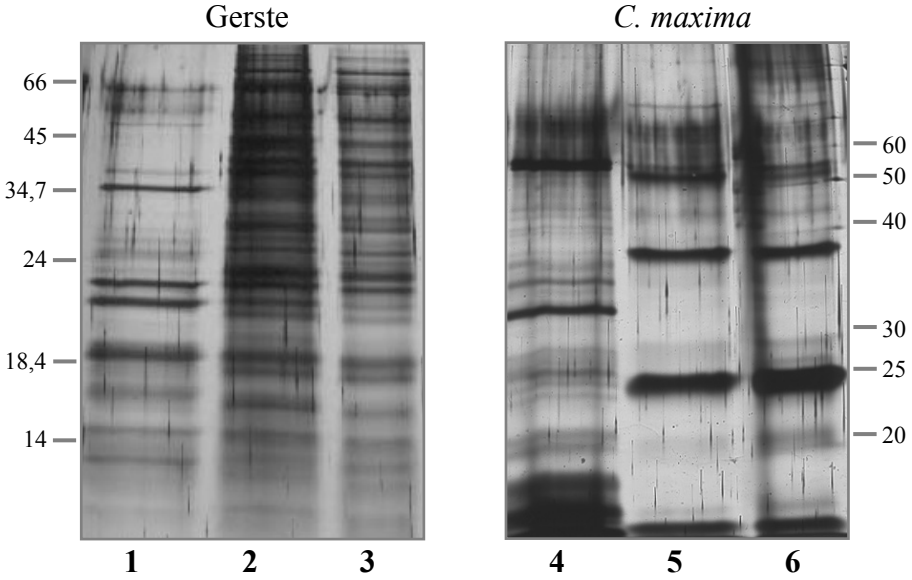


Abb. 7.1 Unterschiede in der Proteinzusammensetzung von Phloemproben aus Gerste und *C. maxima* in Abhängigkeit von der Art der Probenahme. 1-3, Phloemexsudate aus Gerste: 1, Stylektomie (4 µl); 2 und 3, erleichterte Exsudation für 15 h mit 10 mM EDTA (6 bzw. 3 Pflanzen). 4-6, Phloemexsudate aus *C. maxima*: 4, Stylektomie (1,5 µl); 5 und 6, Exsudate aus durchtrennten Petiolen (je 0,5 µl). Die Proben wurden in Ladepuffer aufgenommen und in einem 15 %igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Schließlich wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Rechts und links sind Banden von Proteinstandards angedeutet (Proteingröße in kD).

Tab. 7.1 Nukleotidsequenzen der cDNA-Fragmente aus dem cDNA-AFLP mit Gerstenphloemsaft (Tab. 3.1.1)

S1-02, S5-14, S4-18, S7-23	CCATGGTG GTGCTCTCGC CGCCGGGGAT GATGAGCGAG TCGATGCCCT GCAGCTGCTC CGGCTTGCGC ACCTCCACCC CCTTCACCCC GATC
S2-03	GATC A GAGGAGGGGT AACCAACACA TAACCACGCA TAGCCCTGCT CTCTTAAGTc AGCCGATATT CCAAGGGCTT CAGGCTGTCT TATTTGGcCC GATTTTATCC TAACAGCACA GCTTTTACAG CGACCATGG
S2-04	G ATCACGGCAG AgATGACGAA GAGGGCGATC tGGAGGaGCA CCGGGAAACG CGCGGCTCCG GCGAAGAACC CCATGG
S2-05	C CATGGGGGCG GACATCGCCA TCTCCAGCGA CGTCTTCATC GGGGACCCCT ACAGCCTCGG CAACTTCCCC AACGGCGGCT TCCTCTTCGT GTGATC
S2-06	CCA TGGGGGTGCG TACCCGTTAT TGTCCAGTAC TGGATGCCGG ATGGCCCGAT GTGAATTTGC CATAAGCAAT AGAACCTTTT TTTCTTCACC ATTTTCTGAC GAGGAATTGT ACTGCtATGT GATGCATAAT TTGAtCGTCT TGTGATC
S2-07, S1-15	CCATGGG GGTGCGTACC CGTTATTGTC CAGTACTGGA TGCCGGATGG CCCGATGTGA ATTTGCCATA AGCAATAGAA CCTTTTTTTC TTCACCATTT TCTGACGAGG AATTGTACTG CTATGTGATG CACGGTGAAA CACCAGCGTC ATCACAGGGT TTTCAACGTG TGATC
S3-09, S6-20	CCATGGC AGGGTGCCCC GTACACCACC AGAAACCAAA GTGTTGCGCT TAATTCTCGA TAATCCAAAG TCTCCAACCT TGCAGATTGG TCTCTGGGGA TC
S5-13	CC ATGGTCTGAc CTCCCATAGC TCGCTCCAAT CGACGACGTG CCAaATTCAG AGAAGGTTAG GGTTCCTCGC TCGCcCGATC
S4-17	GATCG GGAGGGatCT GCGGCACTCA CCATGG
S6-19	GATC TCCGGGAACC TCACCTCGCC CTCGCGcGTG TcCGCGAASc ACCAGGtGAG GTGAGCaTGT TCCTAAgGGT GTTGGAgACC ATGG
S7-24	CCA TGGCACAGAA TGTCACCCTG GCGGACGCGA CGACCGGTGC GACGATCTAC TACACCACCG ATGGTTCGAC GCCCACGACC TCATCGACGG TGTATAGCGG GCCGATC

Tab. 7.2 Peptidsequenzen potentiell nitrosylierbarer Proteine im Phloemsaft von *C. maxima*

Bande[1]	Peptidsequenz	Ergebnis der Homologiesuche in Proteindatenbanken
1	NAGPDPIWNEK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
1	FLVEYPGSGGDFHILFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
1	GLQALDPLNKPIDPYAEINFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	PDPIQNEKFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	DGDDYIGDVK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	YPGSGGDFHILFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	NKPIDPYAEINFKGQER	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	NAGPNPIWNEKFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	VMDHDAIDGDNYIGDVK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
2	AHDPLNKPIDPYAEINFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
3	NAGPNPLWDEK	gi|25090878|sp|Q9ZT47|PP16A_CUCMA 16 kDa phloem protein 1
3	DGDDYIGDVK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
3	YPGSGGDFHILFK	gi|25090875|sp|Q9ZT46|PP16B_CUCMA 16 kDa phloem protein 2
3	VEAVDEENNK	gi|5762258|dbj|BAA83470.1| Csf-2 [Cucumis sativus]
3	YAVYDFD	gi|7267407|emb|CAB80877.1| putative actin-depolymerizing factor [Arabidopsis thaliana]
3	VFFDFTIGGKGPAR	gi|53792605|dbj|BAD53620.1| putative cyclophilin [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
4	NADVALHYPSFLK	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	SIAWIEDKR	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	DVALHYPSFLK	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	SNSNWYFIFAR	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	LYDQLVAGILLNK	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	NADVALHYPSFLK	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
4	VYEVALQVQLNSR	gi|18069|emb|CAA78979.1| dimeric phloem specific lectin PP2 [Cucurbita maxima]
5	LEFELQDVAR	gi|14582160|gb|AAK69398.1| cytochrome b5 reductase PP36 [Cucurbita maxima]
5	SLIFANVSADDILLK	gi|14582160|gb|AAK69398.1| cytochrome b5 reductase PP36 [Cucurbita maxima]
6	VVLVDNADFQK	gi|4126809|dbj|BAA36759.1| glyoxalase I [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6	DPDGYLFELIQR	gi|4126809|dbj|BAA36759.1| glyoxalase I [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6	GNAYAQVAIGTDDVYK	gi|4126809|dbj|BAA36759.1| glyoxalase I [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
7	AVGLGCVDLVALSGAHTFGR	gi|38373428|gb|AAR19041.1| netting associated peroxidase [Cucumis melo]
7	ANFDPTTPDVFDKNY	gi|38373428|gb|AAR19041.1| netting associated peroxidase [Cucumis melo]
7	DANLASPFETLVQLK	gi|38373428|gb|AAR19041.1| netting associated peroxidase [Cucumis melo]
7	LFSTPGADTIPSVDSFADR	gi|38373428|gb|AAR19041.1| netting associated peroxidase [Cucumis melo]
8	LDSEPGFIDR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	AFIEVDEEGTK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	DFYLIDGSSVK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	DQYVAVFDGFK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	YFFLPDR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	ALPYSQGPDPR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	PFMSGEKDQYVAVFDGFK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	APFFSGEKDQYVAVFDGFK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	FSFYFFLPDRK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	SSFQQVVDKYYK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	AAWQQAFDASITMK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	ANEVISEVNSWVEK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	VLFSTPGADTIEIVNR	gi|3927894|emb|CAA76680.1| peroxidase [Cucurbita pepo]
8	LPNIV	gi|3927894|emb|CAA76680.1| peroxidase [Cucurbita pepo]
8	AAASSAVTVGIVSLPINR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	VESPVAQNLR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	LAFVNGVWIDQSLSLK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	VNFDPTTPDTFDKNYYTNLQANR	gi|3927894|emb|CAA76680.1| peroxidase [Cucurbita pepo]
8	SNSIDNLNAFASHIIDK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	DGLASLIEKLDSEPGFIDR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	EILPAGSVGSSTQLVLANALYFK	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
8	LGLVLPFTEGGLLGFVESPVAQNLR	gi|9937311|gb|AAG02411.1| phloem serpin-1 [Cucurbita maxima]
9	WDLYTHQ	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	DVAVDQLHR	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	FGLLYLDFLNDLK	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	YITENGYFDYDSP	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	EYYNNLIDDMLSK	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	IEYYNNLID	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	DFLGVNYYTSNYAK	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]
9	FLFGAASSAYQYEGGLSEK	gi|10998338|gb|AAG25897.1| silverleaf whitefly-induced protein 3 [Cucurbita pepo]

[1] Nr. der Bande im Proteingel nach der Isolierung und Auftrennung biotinylierter Phloemproteine (Abb. 3.3.5)

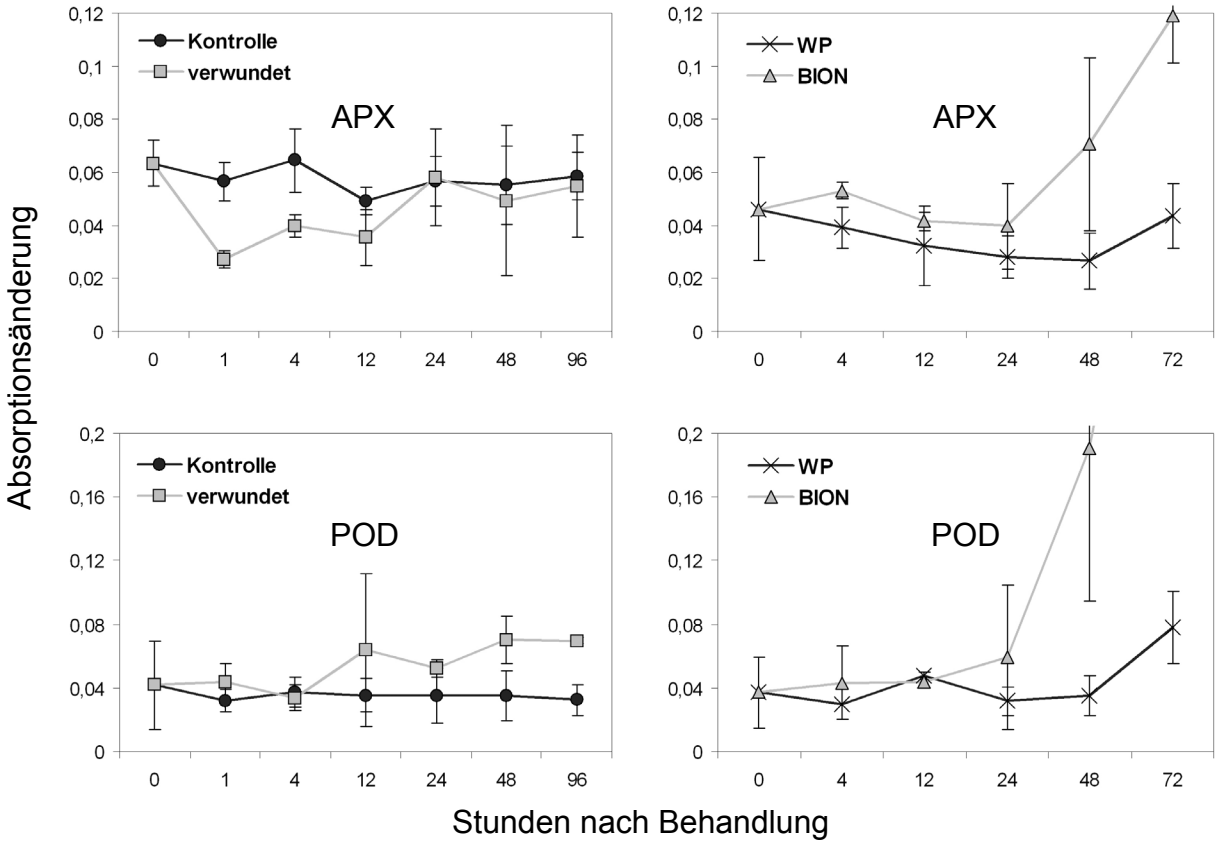


Abb. 7.2 Die Aktivitäten der Enzyme Ascorbatperoxidase (APX) und Peroxidase (POD) im Blattextrakt von Kürbispflanzen werden durch Resistenzinduktion mit BION und durch Verwundung der Blätter beeinflusst. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 Einzelmessungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Kogel und Herrn Prof. Dr. van Bel für die Überlassung des Projekts und dafür, dass sie mir so viel Zeit eingeräumt haben.

Dr. Christina Eckey möchte ich für die Unterstützung bei dem molekularbiologischen Teil meiner Arbeit und Torsten Will für die Hilfe bei der Stylektomie sowie bei der Zucht und Bändigung der Blattläuse danken.

An dieser Stelle gilt mein Dank auch Dietmar Haffer, Bettina Fischer und Diether Koch dafür, dass sie liebevoll hunderte Kürbispflanzen für mich angezogen haben, die ich dann gnadenlos zerstückelt habe.

Im Schlussspurt meiner Doktorabeit durfte ich eine Woche am Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm forschen. Für die gute Zusammenarbeit während der Zeit und für einige gute Tipps möchte ich mich bei Dr. Julia Kehr und Anja Buhtz bedanken.

Dr. Frank Waller, Dr. Patrick Schäfer und Dr. habil. Ralph Hückelhoven haben meiner Doktorarbeit den nötigen Schliff verpasst und mir zahlreiche wichtige Hinweise gegeben. Außerdem haben mir Dr. habil. Ralph Hückelhoven und Dr. Gregor Langen immer wieder die Gelegenheit gegeben, meine neuesten Einfälle und Planungen mit ihnen zu besprechen. Vielen Dank dafür.

Ich hatte das große Glück, an zwei Instituten arbeiten zu dürfen. Dadurch habe ich zahlreiche nette Kollegen kennengelernt, die mich auf vielfältige Weise unterstützt, mit mir Fußball gespielt und mich mit leckeren Kuchen und Sekt versorgt haben. Ich danke Euch allen für die unvergessliche Zeit!

Ein herzliches Dankeschön geht schließlich an meine langjährigen Freunde und Mitbewohner Martin Zenke und Peter Günther sowie an meine Familie in Altenberge, die mir immer wieder klar gemacht haben, dass es eine Welt außerhalb der Uni gibt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Frank Gaupels
geboren am 04.11.1974 in Ochtrup
deutsch, single

Schulausbildung

1981 – 1982	Grundschule Metelen
1982 – 1985	Grundschule Altenberge
1985 – 1994	städtisches Gymnasium Borghorst

Ersatzdienst

Juni 1994 – September 1995	Zentrum für therapeutisches Reiten, Südlohn-Öding

Studium und Beruf

Oktober 1995	Beginn des Biologiestudiums an der JLU Gießen
Mai 1999	vierwöchiges Praktikum bei der unteren Landschaftsbehörde der Stadt Münster
August 1999 – Januar 2000	Auslandssemester an der Universität Lund, Schweden
Mai – Juni 2000	Tätigkeit als studentische Hilfskraft (5 Wochen)
Juni – Juli 2000	Diplomprüfungen
August 2000 – Oktober 2001	Diplomarbeit am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen zum Thema: „Untersuchungen zum Einfluss von Licht auf die Abwehr der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegen den Echten Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)“
ab Dezember 2001	Promotion am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie sowie am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der JLU Gießen