

**Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen (S/MMP1 & S/MMP2)
aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) und ihre Rolle in der pflanzlichen
Entwicklung und Pathogeninteraktionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

aus dem Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
der Universität Hohenheim

Prof. Dr. A. Schaller

von

Christian Pasule

aus Biled/Rumänien

2010

Die vorliegende Arbeit wurde am 30.8.2010 von der
Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim
als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften“
angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2010

1. Dekan: Prof. Dr. H. Breer

1. Prüfer und Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schaller

2. Prüfer und Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Pfitzner

3. Prüfer: Prof. Dr. O. Spring

für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Zielsetzung	7
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide, Antikörper und Kit	9
2.2 Organismen	11
2.2.1 Bakterienstämme <i>E. coli</i>	11
2.2.2 Bakterienstämme <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i> (Xcv)	11
2.2.3 Pilz <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	11
2.2.4 Tomatenpflanzen	12
2.3 Anzucht des biologischen Materials	12
2.3.1 Tomatenpflanzen	12
2.3.2 Desinfektion der Samen	13
2.3.3 Samenernte und Stratifikation	13
2.3.4 Wachstumsbedingungen für Tomatenpflanzen	13
2.3.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
2.3.6 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10	15
2.4 Identifizierung von <i>SlMMP2</i> in Tomate mittels Datenbankanalysen und Ermittlung der cDNA-Sequenz	16
2.4.1 Verwendete Datenbanken und identifizierte Klone	16
2.4.2 Amplifikation des <i>SlMMP2</i> Gens mittels PCR	17
2.4.3 Aufreinigung und Ligation von <i>SlMMP2</i> -DNA in pCR [®] 2.1-Topo [®]	17
2.4.4 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> DH10b	18
2.4.5 Sequenzanalyse	18

2.5	Erstellung eines <i>S/MMP2(kat)</i>-(His)₆ Expressionskonstrukts	19
2.5.1	Klonierung der katalytischen Domäne von <i>S/MMP2</i> (<i>S/MMP2kat</i>) in den Expressionsvektor pET-21d(+)	19
2.6	Expression und Aufreinigung von <i>S/MMP2(kat)</i>-(His)₆	20
2.6.1	Expression von <i>S/MMP2(kat)</i> -(His) ₆ in <i>E. coli</i> BL-21-RIL	20
2.6.2	Aufreinigung des Expressionsproduktes	20
2.7	Proteinanalytische Methoden	21
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	21
2.7.2	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.7.3	Western Blot	22
2.7.4	Immunodetektion	22
2.7.5	Reinigung der IgG-Fraktion aus anti- <i>S/MMP1</i> -Serum	23
2.7.6	Reinigung von anti- <i>S/MMP1</i> -IgGs aus der IgG-Fraktion	24
2.7.7	Immunohistochemische Detektion von <i>S/MMP1/2</i>	24
2.8	Enzymaktivitätstest	25
2.9	Molekularbiologische Methoden	26
2.9.1	Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.9.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmid-Mini-Präparation)	26
2.9.1.2	Isolierung genomischer Tomaten-DNA (CTAB-Methode)	26
2.9.1.3	Isolierung von RNA (Mini-Präparation)	27
2.9.1.4	Isolierung von RNA (Midi-Präparation)	27
2.9.1.5	Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäuren	28
2.9.1.6	PCR und RT-PCR	28
2.10	Southern Blot Analyse	30
2.10.1	Enzymatische Spaltung von genomischer Tomaten-DNA	30
2.10.2	Auftrennung der DNA-Fragmente und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran	30
2.10.3	Sondenherstellung und Hybridisierung	31
2.10.4	Strippen von Blots	32
2.11	Mikroarray Analysen	32
2.11.1	cDNA Mikroarray	32

INHALTSVERZEICHNIS

2.11.2	RNA-Isolierung	33
2.11.3	Fluoreszenz-Markierung der Proben	33
2.11.4	Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays	33
2.11.5	Scannen und Auswerten der Mikroarrays	34
2.12	Histologische Untersuchungsmethoden	35
2.12.1	Einbettung von pflanzlichem Gewebe in Technovit 7100®	35
2.12.2	Schneiden von Querschnitte am Mikrotom	36
2.12.3	Färben mit Toluidin Blau	36
2.12.4	Färben mit Sudan Black	36
2.12.5	Färben mit Anilin Blau	37
2.12.6	Färben mit Trypanblau	37
2.13	Extraktion phenolischer Verbindungen (nach Goldwasser et al. 1999)	37
2.13.1	Bestimmung des Gehalts an löslichen und gebundenen Phenolen (Folin-Ciocalteu) (nach Goldwasser et al. 1999)	38
2.14	Behandlung von Tomatenpflanzen	38
2.14.1	Fusicoccin Behandlung	38
2.14.2	Infiltration von <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i> in Tomatenblätter	38
2.14.3	Reisolierung von <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i> aus Blättern	39
2.14.4	Inokulation von Tomatenblättern mit <i>S. sclerotiorum</i>	40
2.15	Kultivierung von Tomatenpflanzen, zur Untersuchung der Wurzelentwicklung	40
2.15.1	Kultivierung von Tomatenpflanzen auf Filterpapier	40
2.15.2	Kultivierung von Tomatenpflanzen in Rhizoboxen	41
2.15.3	Erfassung der Wurzelentwicklung	41
2.16	Quantifizierung der Ethylenemission in Blättern und Hypokotylen von SiMMP1/2-RNAi- und Wildtyppflanzen	42
3.	ERGEBNISSE	43
3.1	Identifizierung einer zweiten MMP in Tomate	43

3.2	Herstellung eines <i>S/MMP2</i>-His₆-Expressionskonstruktes	47
3.2.1	Klonierung von <i>S/MMP2</i> -kat in pET-21d (+)	47
3.3	Expression und Reinigung von <i>S/MMP2</i>-kat	48
3.3.1	Enzymkinetik	49
3.4	Reverse Transkriptase (RT)-PCR Analyse der Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in verschiedenen Organen von <i>Solanum lycopersicum</i>	53
3.5	Histochemische Lokalisation von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Hypokotyl und Wurzel von <i>Solanum lycopersicon</i> (UC82b)	54
3.6	Charakterisierung von <i>S/MMP1</i>-RNA-Interferenz- (RNAi) Pflanzen	57
3.6.1	Identifizierung unabhängiger Transformanten mittels Southern Blot Analyse	57
3.6.2	RT-PCR-Analyse von <i>S/MMP1</i> -RNAi-Pflanzen	58
3.6.3	cDNA-Mikroarray Expressionsanalyse in Hypokotylen von <i>S/MMP1/2</i> -RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	60
3.6.4	Phänotypische Charakterisierung von <i>S/MMP1/2</i> -RNAi-Pflanzen	73
3.6.5	Histologische Analyse von Hypokotylen zwei Wochen alter <i>S/MMP1/2</i> -RNAi- und Wildtyp-Pflanzen	75
3.6.6	Histochemische Lokalisation von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Hypokotylen von zwei Wochen alten UC82b-Pflanzen	76
3.6.7	Histologische Analyse von Hypokotylen und Stängeln vier Wochen alter <i>S/MMP1/2</i> -RNAi- und Wildtyp- Pflanzen	77
3.6.8	Quantifizierung des Gehalts löslicher und gebundener phenolischer Substanzen in <i>S/MMP1/2</i> -RNAi- und Wildtyp-Pflanzen	81
3.6.9	Charakterisierung des Phänotyps in Blättern von <i>S/MMP1/2</i> -RNAi-Pflanzen	83
3.7	Untersuchungen zur Wurzelentwicklung in <i>S/MMP1/2</i>-RNAi- und Wildtyp- Pflanzen	84
3.8	Quantifizierung des Gehalts an Ethylen in Hypokotylen und Blättern von <i>S/MMP1/2</i>-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen	88

3.9	Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Reaktion auf verschiedene Stimuli	90
3.9.1	Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> nach Fusicoccin Behandlung	90
3.9.2	Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Tomatenblättern nach Infektion mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	91
3.9.3	Wachstumsverhalten von <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>) in <i>S/MMP1/2</i> -RNAi, <i>S/MMP1</i> -Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen	94
3.9.3.1	Wachstum des virulenten Stamms <i>Xcv</i> 85-10	95
3.9.3.2	Wachstum des avirulenten Stamms <i>Xcv</i> 85-10 pDsK 200	96
3.9.3.3	Wachstum des hrp-defizienten Stamms <i>Xcv</i> 85-10 hrpA-G	97
3.9.4	Untersuchung der Symptome in Blättern von <i>S/MMP1/2</i> -RNAi, <i>S/MMP1</i> -Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen nach Infiltration von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> und <i>E. coli</i> DH10b	99
3.9.5	Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Tomatenblätter nach Infiltration von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	106
4.	DISKUSSION	108
4.1	Identifizierung einer zweiten Tomaten-MMP (<i>S/MMP2</i>) und Ermittlung der cDNA Sequenz von <i>S/MMP2</i>	109
4.2	Strukturanalyse und Aufreinigung von <i>S/MMP2</i>	109
4.3	Biochemische Charakterisierung	110
4.4	Enzymkinetik	112
4.5	RT-PCR Analyse der Expression von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in verschiedenen Organen von <i>Solanum lycopersicum</i>	112
4.6	Histochemische Lokalisation von <i>S/MMP1</i> und <i>S/MMP2</i> in Hypokotyl und Wurzel von <i>Solanum lycopersicum</i> (UC82b)	114
4.7	Phänotypische Charakterisierung von <i>S/MMP1/2</i>-RNA-Interferenz-Pflanzen (RNAi)	115
4.8	Untersuchungen zur Wurzelentwicklung in <i>S/MMP1/2</i>-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen	119
4.9	cDNA-Mikroarray Expressionsanalyse in Hypokotylen von <i>S/MMP1/2</i>-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	121
4.10	Expression von <i>S/MMP1/2</i> in Reaktion auf verschiedene Stimuli	123
4.11	Fazit und Ausblick	128

INHALTSVERZEICHNIS

5.	LITERATURVERZEICHNIS	130
6.	ANHANG	150

Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen gehören zu der Familie der Metzinkine und sind sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen weit verbreitet. Im Tierreich steuern sie wichtige physiologische Prozesse wie z.B. die Reifung von Peptidhormonen, Wachstumsfaktoren und Rezeptorproteinen. Die Rolle von Matrixmetalloproteinasen in Pflanzen ist erst in wenigen Fällen für einzelne Enzyme beschrieben. Ihre Funktion in Tomatenpflanzen ist noch gänzlich ungeklärt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Matrixmetalloproteinasen in Tomatenpflanzen eine wesentliche Rolle bei Entwicklungsprozessen und bei der Regulation der Pathogenabwehr spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen *SIMMP1* und *SIMMP2* aus Tomatenpflanzen mittels Aufreinigung und biochemischer Charakterisierung der rekombinanten Proteine, detaillierter Expressionsstudien in Tomatenpflanzen, sowie phänotypischer und molekularer Analyse transgener Pflanzen mit veränderter Expression von *SIMMP1/2* (*SIMMP1/2*-RNAi).

Die Enzyme *SIMMP1/2* wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Aktivität der rekombinanten MMPs wurde durch Ca^{2+} -Ionen stimuliert. Für *SIMMP1* konnte ein Aktivitätsoptimum bei pH 6,5 und für *SIMMP2* bei pH 7 gemessen werden. Der apparente K_m -Wert für ein fluorogenes Peptidsubstrat wurde für *SIMMP1* bei 19,5 μM und für *SIMMP2* bei 19,9 μM ermittelt, bei einer katalytischen Effizienz (K_{cat}/K_m) von 0,010 bzw. 0,024 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Diese Daten lassen vermuten, dass es sich bei der *SIMMP1* und *SIMMP2* um Enzyme mit redundanten Eigenschaften handelt.

Die Expressionsanalyse ergab, dass *SIMMP1* in allen untersuchten Organen und Entwicklungsstadien exprimiert wird, wobei die stärkste Expression in acht Tage alten Keimlingen und in Stängeln von sechs Wochen alten Pflanzen zu beobachten war.

SIMMP2 zeigte dagegen keine konstitutive Expression in Blättern sechs Wochen alter Pflanzen. In acht Tage alten Keimlingen ist die Expression von *SIMMP2* in Wurzel und Hypokotyl deutlich stärker als in Kotyledonen. Die gewebsspezifische Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* weist darauf hin, dass die Enzyme trotz ähnlicher biochemischer Eigenschaften spezifische Substrate und Funktionen in den jeweiligen Geweben haben könnten.

Mit Hilfe immunohistochemischer Methoden wurde gezeigt, dass *SIMMP1/2* in Zellwänden von Hypokotyl und Wurzel lokalisiert ist. Dies bestätigte die Annahme, dass es sich bei

SIMMP1/2 um extrazelluläre Enzyme handelt. In transgenen Pflanzen mit verminderter *SIMMP1/2* Expression zeigten sich zwei Wochen nach der Keimung Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Hypokotyle, die zu nekrotischen Läsionen führten. Mit fortschreitendem Alter der Pflanzen wird das gesamte Hypokotyl von den Nekrosen erfasst. Ebenso zeigen sich veränderte Zellmuster im Kortex und Zelltodereignisse in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht. Während späterer Entwicklungsstadien werden diese Effekte auch auf Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen sichtbar. Des Weiteren kommt es zur massiven Akkumulation phenolischer Sekundärmetabolite, sowie zu einer Beeinträchtigung der Wurzelentwicklung in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen, was sich in einer Reduktion der Gesamtwurzellänge und in der Ausbildung primärer und sekundärer Seitenwurzeln äußert.

Viele der beobachteten Effekte in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen lassen eine Beteiligung von Ethylen vermuten. Eine gesteigerte Ethylenproduktion konnte in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen experimentell bestätigt werden.

Mittels Mikroarray Analysen wurde untersucht, in welcher Weise sich der Verlust von *SIMMP1/2* auf die Genexpression in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen auswirkt. Es wurden 522 Gene identifiziert, welche in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen differentiell reguliert sind. Davon waren 332 Gene stärker, und 190 Gene schwächer exprimiert als in Wildtyp-Pflanzen. Erhöht, aber nicht signifikant überrepräsentiert war in den RNAi-Pflanzen der Anteil an Genen, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen, bei Stressreaktionen, bei Reaktionen auf abiotische und biotische Reize spielen, und Gene die bei noch unbekannten biologischen Prozessen beteiligt sind. Der Anteil an Genen mit einer Funktion bei Transportvorgängen ist in RNAi-Pflanzen deutlich erniedrigt.

Nachdem beobachtet wurde, dass die Expression von *SIMMP1/2* nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum* induziert wird, wurde eine mögliche Beteiligung in der Pathogenabwehr untersucht. Eine direkte Beteiligung in der Abwehr von *Sclerotinia sclerotiorum* ist aber auszuschließen, da keine Unterschiede in der Wachstumskinetik des Pilzes auf Wildtyp- oder *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zu erkennen waren.

Des Weiteren wurde überprüft, ob es zwischen *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen Unterschiede in der Resistenz gegenüber dem biotrophen Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) gibt. Auf *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigte sich ein vermindertes bakterielles Wachstum für virulente, avirulente, als auch für nicht pathogene Bakterienstämme, was mit starken Nekrosen in Blättern der *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen

einherging. Das deutet auf eine regulatorische Funktion von *S/MMP1/2* in der unspezifischen Reaktion auf biotische Stressfaktoren.

Die erzielten Ergebnisse bilden die Grundlage zur noch ausstehenden vollständigen Aufklärung der Funktion von *S/MMP1/2* in der pflanzlichen Entwicklung und in Abwehrreaktionen von Tomatenpflanzen gegenüber Pathogenen.

Summary

Matrixmetalloproteinases belong to the family of metzincins and are widely distributed in prokaryotic as well as eukaryotic organisms. Mammalian matrixmetalloproteinases function in the formation of peptide hormones, growth factors and receptor proteins and regulate important physiological processes. Little is known about the function of the related plant matrixmetalloproteinases, except for a few enzymes in plants. Their function in tomato plants is still unresolved. However, preliminary data suggest that matrixmetalloproteinases may play essential roles in the regulation of development and pathogen defense in tomato plants.

The present study aimed at the elucidation of the function of the tomato matrixmetalloproteinases *SlMMP1* and *SlMMP2* by purification and biochemical characterization of the recombinant proteins, detailed expression analysis in tomato plants, as well as the phenotypical and molecular analysis of transgenic plants with reduced expression levels for *SlMMP1/2* (*SlMMP1/2*-RNAi).

SlMMP1/2 were expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Activity of recombinant MMPs was stimulated by Ca^{2+} -ions. The highest activity was measured for *SlMMP1* at pH 6,5 and for *SlMMP2* at pH 7. The apparent *K_m*-values for a fluorogenic peptide substrate were 19,5 μM for *SlMMP1* and 19,9 μM for *SlMMP2*, with a catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of 0,010 and 0,024 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ respectively. These data suggest redundant functions for *SlMMP1* and *SlMMP2*.

SlMMP1 was found to be expressed in all tested organs and developmental stages with highest expression levels in eight days old seedlings and stems from six weeks old plants. A constitutive expression in leaves from six weeks old plants was not observed for *SlMMP2*. In eight days old seedlings, *SlMMP2* showed higher expression in roots and hypocotyls than in cotyledons. The tissue-specific expression of *SlMMP1* and *SlMMP2* suggests specific functions and substrates for the two enzymes in different tissues, inspite of their similar biochemical properties.

SlMMP1/2 were localised to cell walls from hypocotyls and roots using immunohistochemistry. This confirms the assumed extracellular localisation of the enzymes. Transgenic plants with reduced *SlMMP1/2* expression levels exhibit alterations in surface structure leading to necrotic lesions two weeks after germination.

The lesions spread over the entire hypocotyl during later stages of development. Cellular organisation was altered in cortical tissues accompanied by cell death events in the epidermis

and subepidermal cell layer. These effects spread over leaves during later stages of development. *SIMMP1/2*-RNAi-plants accumulate massive amounts of phenolic compounds, and exhibit impaired root development with a reduction in overall root length and reduced numbers of primary and secondary lateral roots. Many of the observed effects suggest an involvement of ethylene and a higher ethylene production was in fact confirmed in *SIMMP1/2*-RNAi-plants.

The effects of the loss of *SIMMP1/2* on gene expression were analyzed with microarrays in hypocotyls from *SIMMP1/2*-RNAi-plants. 522 genes were found to be differentially regulated in *SIMMP1/2*-RNAi-hypocotyls, with 332 up- and 190 downregulated as compared with wildtype plants. Genes with roles in plant development, stress, reaction during abiotic and biotic stimuli, and genes with unknown roles in biological processes appeared to be overrepresented among the differentially regulated genes, however, statistically not significantly. Genes with functions in transport were found to be underrepresented in RNAi-plants.

Based on the observation that infection with *Sclerotinia sclerotiorum* led to induction of *SIMMP1/2* gene expression, a possible function for the enzymes in pathogen defense was analyzed. A direct involvement of the enzymes in plant defense against the fungus can be excluded, however, because no differences in fungal growth were detected between wildtype and *SIMMP1/2*-RNAi-plants. Furthermore, it was analyzed if there are differences in resistance against the biotrophic pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) between wildtype and *SIMMP1/2*-RNAi-plants. Bacterial growth was found to be reduced for virulent, avirulent and non-pathogenic bacteria, accompanied by strong necrosis in *SIMMP1/2*-RNAi-plants. These data suggest a function for *SIMMP1/2* in the regulation of non-specific reactions against biotic stresses.

The results of the present study provide a basis for a more complete understanding of the function of *SIMMP1/2* in development and pathogen defense of tomato plants.

Abkürzungsverzeichnis

ACO	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylatoxidase
ACS	1-Aminocyclopropan 1-Carboxylatsynthase
BMP	Biomalz-Peptonagar
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin
CaMV	Blimenkohl Mosaik Virus
cDNA	komplementäre DNA
Cfu	Kolonie bildende Einheiten
CSP	cold-shock-Protein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ECL	Enhanced Chemo Luminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EST	expressed sequence tag
FC	Fusicoccin
gDNA	genomische DNA
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GWH	Gewächshaus
Hin1	Harpin inducible-like protein
HP	hairpin
HR	Hypersensitive Reaktion
hrp	hypersensitive reaction and pathogenicity
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactopyranosid
Kb	Kilobase
LB	lysogeny broth
LPS	Lipopolylsacharid
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA
MS	Murashige & Skoog Medium
Nat	Überexpressionspflanzen
NOS	Nopalinsynthase

<i>NPT II</i>	Gen für die Neomycin Phosphotransferase
NYG	Nutrient-Yeast-Glycerol
OCS	Octopin-Synthase
ORF	offener Leserahmen
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PPI	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PR	Pathogenesis-related protein
PR3a	Acidic 26 kDa endochitinase
PRR	pattern recognition receptors
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Chain Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SiMMPx</i>	Matrixmetalloproteinase aus <i>Solanum lycopersicum</i>
<i>SiSBTx</i>	Subtilisin-ähnliche Protease aus <i>Solanum lycopersicum</i>
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TMV	Tomaten Mosaik Virus
TNP	Tri-Natriumphosphat
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris pv vesicatoria</i>

1. Einleitung

Die Ausbildung einer Zellwand ist ein charakteristisches Merkmal, das pflanzliche Zellen von tierischen Zellen unterscheidet. Der Apoplast ist ein essentieller Bestandteil des pflanzlichen Organismus, welcher wichtige Funktionen während Wachstums- und Entwicklungsprozessen in der Pflanze übernimmt. Der Zellwand werden vier Hauptfunktionen zugesprochen. Sie ist beteiligt an der Regulation des pflanzlichen Wachstums, sie verleiht dem pflanzlichen Körper Stabilität, sie ist an Prozessen beteiligt, welche zum Erweichen von Früchten führt, und verleiht Pflanzen Schutz vor mikrobiellen Pathogenen (Sakurai, 1991).

Die pflanzliche Zellwand besteht aus einer amorphen Matrix aus Hemicellulosen und Pektinen, sowie einem geringen Anteil an Strukturproteinen, in welche die Cellulosemikrofibrillen eingebettet sind. Hemicellulosen bilden eine heterogene Gruppe von Polysacchariden. Die am besten untersuchte Hemicellulose bei Dikotyledonen ist das Xyloglucan. Xyloglucan ist ein Polysaccharid aus β -1-4-verknüpften β -D-Glucosebausteinen, mit 1-6-verknüpften Seitenketten aus Xylose, Galaktose und oftmals, aber nicht immer, mit endständiger Fucose. Molekulare Modelle besagen, dass sich die terminale Fucose der Seitenkette zurückfaltet, und dabei mit der Glucankette in Wechselwirkung tritt. Die nächstgelegenen Glucosereste werden dabei in einer linearen Konfiguration fixiert. Die nun entstandene flache Struktur erleichtert die Anlagerung kurzer Bereiche des Xyloglucanrückgrats an die Oberfläche der Cellulosemikrofibrille (Levy et al, 1997).

Pektine bilden wie Hemicellulosen eine heterogene Gruppe von Polysacchariden. Charakteristischerweise enthalten Pektine saure Zucker wie Galacturonsäure und neutrale Zucker wie Rhamnose, Galactose und Arabinose. Sie sind lösliche Zellwandpolysaccharide und können sehr einfach aufgebaut sein, wie Homogalacturonan (lineares Polymer aus 1-4 verknüpfter α -D-Galacturonsäure). Pektine können aber auch sehr komplex aufgebaut sein wie das Rhamnogalacturonan II, das aus mindestens zehn verschiedenen Zuckern besteht, mit einem komplizierten Verknüpfungsmuster. Pektine bilden molekulare Netzwerke, indem sich die Carboxylgruppen benachbarter Pektinmoleküle über Calcium-Ionen miteinander verbinden. Die Komplexität mancher Pektine deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht ausschließlich um Strukturkomponenten handelt. Eine mögliche Rolle als Elicitoren bei der Pathogenantwort wurde vorgeschlagen (Van Cutsem und Messiaen, 1993).

Im Zuge der Differenzierung, kann der Primärwand eine Sekundärwand aufgelagert werden. Sekundärwände sind durch den Verlust der Verformbarkeit gekennzeichnet. Sie bestehen aus

Cellulosemikrofibrillen, Hemicellulose und Lignin. Cellulosemikrofibrillen und Hemicellulose scheinen in der Sekundärwand strukturell besser organisiert zu sein als in der Primärwand. Die Sekundärwand lässt sich in drei Schichten (S_1 bis S_3) unterteilen. S_1 besteht aus links- und rechts-gedrehten Mikrofibrillenhelices. S_2 und S_3 , bestehen jeweils aus nur einer Art Mikrofibrillenhelices (entweder links- oder rechtsgedrehten). Die Orientierung der Helices in S_2 und S_3 unterscheidet sich jedoch. Während der Sekundärwandbildung, kommt es in der S_1 , S_2 , in der Primärwand und in der Mittellamelle, seltener aber in S_3 , zur Lignifizierung (Goodwin et al, 1983). Sekundärwände sind häufig in Festigungsgewebe und Leitgewebe (Xylem) zu finden.

Nach neueren Erkenntnissen geht man davon aus, dass in Zellwänden von *Arabidopsis thaliana* hunderte verschiedener Proteine lokalisiert sind, welche etwa 10 % des Trockengewichtes von Zellwänden ausmacht (Boudart et al, 2005).

Diese Zellwandproteine können in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Diese Einteilung fasst Proteine zusammen, welchen eine Funktion als Strukturproteine (Showalter, 1993), bei der Zell-Zell-Kommunikation, und bei der Pathogenantwort zugesprochen wird (Cassab, 1998).

Die Isolierung und Untersuchung von apoplastischen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* Blättern führte zur Identifizierung von pflanzlichen Proteinen mit proteolytischen Eigenschaften (Proteasen) die an jeder der drei zuvor genannten Funktionen beteiligt sind (Boudart et al, 2005).

Der kontrollierte Abbau (Proteolyse) von beschädigten, missgefalteten oder schädlichen Proteinen ist essentiell für die zelluläre Regulation aller Organismen. Dieser Prozess dient neben einer hocheffektiven Protein-Qualitätskontrolle zur Bereitstellung frei werdender Aminosäuren für die Proteinbiosynthese oder zur Energiegewinnung. Die Aktivität von Proteasen beschränkt sich nicht nur auf die proteolytische Zerlegung von Proteinen, sie ist vielmehr an nahezu allen Lebensprozessen beteiligt. Proteasen sind an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt, was durch spezifische Proteolyse zur Maturation und Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen führt. Dadurch üben Proteasen auf nahezu alle zellulären Prozesse einen direkten oder indirekten Einfluss aus.

Die bedeutendsten Proteasen werden in sechs katalytische Klassen zusammengefasst, nämlich Serin-, Cystein-, Aspartat-, Glutamin-, Threonin-, und Metalloproteasen. Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche zur katalytischen Klasse der Metalloproteinasen gehören, wurde in den letzten Jahren ein zunehmendes Interesse gewidmet (Schaller, 2004).

MMPs sind Zink abhängige Proteasen, welche der Proteinfamilie der Metzinkine zugeordnet werden (Bode et al, 1993). MMPs werden in Säugern wichtige Funktionen in Ab- und Umbau der Extrazellulären Matrix (ECM) zugesprochen. Zusätzlich zu ihrer Fähigkeit Bestandteile der ECM zu spalten und zu modifizieren, nehmen MMPs Funktionen bei biologischen Prozessen wie Embryogenese, Organogenese und Wundheilung ein (Nagase und Woessner, 1999; McCawley und Matrisian, 2001). Die Regulierung von MMPs erfolgt auf Ebene der Transkription, posttranslationalen Modifikation, durch Komponenten der ECM, oder durch TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) welche MMPs spezifisch inhibieren können (Gomez et al, 1997). Es konnte beobachtet werden, dass Wachstumsfaktoren wie Cytokine oder biotische und abiotische Stressfaktoren zur Induktion von MMP-Genen führen (Nagase und Woessner, 1999). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Störungen in den genannten Regulierungsmechanismen oder Induzierbarkeit von MMPs zu Krankheiten wie Arthritis, Nephritis, Fibrosis, Arteriosklerose oder Krebs in Vertebraten führt (Visse und Nagase, 2003).

Die Familie der Metzinkine zeichnet sich durch charakteristische strukturelle Gemeinsamkeiten aus. Diese beinhalten ein N-terminales Signalpeptid für den Eintritt in den sekretorischen Weg, eine N-terminale Propeptiddomäne, bestehend aus ca. 80-90 Aminosäuren mit der Thiol- (SH-) Gruppe im Motiv PRCGXPD ("cystein switch"), sowie das konservierte katalytische Sequenzmotiv HEXXHXXGXXH, und ein den „Met-turn“ bildendes Methionin (Bode et al, 1998). MMPs aus Vertebraten lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität, Sequenzähnlichkeit und der Organisation ihrer Domänen in sechs Gruppen, die Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Typ MMPs und keine der genannten Gruppen zugehörige MMPs eingeteilt werden (Nagase und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003).

Aktiviert werden MMPs durch die Proteolyse der Prä- und Prodomäne (Nagase, 1997, Visse und Nagase 2003). Die Aktivierung von MMPs kann sowohl intrazellulär als auch extrazellulär erfolgen (Nagase, 1997). MMPs können *in vitro* auch durch Applikation von Thiol-modifizierenden Substanzen wie z.B. 4-Aminophenyl-Quecksilberacetat oder HgCl_2 aktiviert werden, ebenso aber auch durch SDS, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), einen niedrigen pH Wert und Hitze (Visse und Nagase, 2003).

Bei MMPs erfolgt die Bindung zum Substrat durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Substrat, was zur Bildung einer gegenläufigen β -Faltblattstruktur führt. Essentiell für die katalytische Aktivität von MMPs ist ein mit dem Zn^{2+} -Ion interagierendes Wassermolekül in der katalytischen Domäne.

Entscheidend für die Substratspezifität von MMPs scheint die Aminosäure in der Position P1' des Substrats zu sein und die Zusammensetzung und chemischen Eigenschaften der S1' Substratbindestelle von MMPs. Zusätzlich zu den eben beschriebenen Eigenschaften des aktiven Zentrums wird die Substratspezifität bei MMPs auch durch spezialisierte sekundäre Substratbindestellen bestimmt, so genannte "Exosites". So wird mit Ausnahme von MMP7 (Matrilysin) bei allen MMPs aus Vertebraten die Interaktion mit ihren Substraten durch die Hemopexin-Domäne bestimmt.

In Vertebraten wurden bisher 24 MMPs identifiziert, davon 23 beim Menschen (Overall, 2002). Metzinkine wurden ebenfalls in weitere Organismen wie Hydra (*Hydra vulgaris*), Seeigel, Nematoden (*C.elegans*) und *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Leontovich et al, 2000, Lepage et al, 1990, Wilson et al, 1994, Maidment et al, 1999).

Die ersten pflanzlichen Metalloproteinasen wurden in Kürbis-, Soja-, und Schwertbohnsamen gefunden (Hara und Matsubara, 1980, Bond und Bowles, 1983, Dalkin et al, 1983). Die erste Aufreinigung und Charakterisierung einer pflanzlichen Metalloproteinase gelang 1990 aus Buchweizensamen (Belozersky et al, 1990). 1991 konnte eine Matrixmetalloproteinase (SMEP1) in Blättern der Sojabohne identifiziert und charakterisiert werden. SMEP1 zeigt eine hohe Übereinstimmung auf der Ebene der Primärstruktur und ähnliche katalytische Eigenschaften wie die bekannten tierischen MMPs, und konnte durch Applikation von TIMP-1 aus Säugetieren in ihrer Funktion inhibiert werden (McGeehan et al, 1992). Die vollständige Ermittlung der cDNA-Sequenz von SMEP1 (*GmMMP1*) und deren Charakterisierung durch Pak et al, (1996), führte zur ersten Beschreibung einer MMP mit Prä-Pro-Domäne in höheren Pflanzen.

In *Arabidopsis thaliana* konnten über Datenbankanalysen fünf verschiedene MMP-Gene identifiziert werden (*At1-MMP* - *At5-MMP*). Die Sequenzen aller fünf *AtMMPs* kodieren für ein N-terminales Signalpeptid, eine Propeptiddomäne und eine katalytische Domäne. Damit ähneln sie strukturell am ehesten der MMP-7 (Matrilysin) aus Vertebraten, welche ebenfalls nicht über eine Hemopexin-Domäne verfügt. Des Weiteren enthalten alle *AtMMPs* das für den „cystein switch“ charakteristische PRCGXXD-Motiv sowie die Zink-bindende Region HEXGHXXGXXH, gefolgt von einem konservierten Methionin („Met-turn“). Für *At1-MMP*, *At2-MMP*, *At3-MMP* und *At5-MMP* wurden N-terminale Signalpeptide, C-terminale Transmembrandomänen und eine Verankerung der Enzyme in der Plasmamembran via einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker prognostiziert. *At4-MMP* besitzt ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid, welches jedoch nicht abgespalten werden kann, was für eine Lokalisation des Enzyms in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums spricht. RT-

PCR-Analysen zur Ermittlung der Expression von AtMMPs in Blüten, Blättern, Wurzeln und Stängeln von *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass alle AtMMPs in allen untersuchten Organen exprimiert wurden, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Expressionsmustern für jede einzelne MMP, was für eine jeweils spezifische Funktion der MMPs spricht. Für At1-MMP konnte nach Expression in *Escherichia coli* die autokatalytische Aktivierung von Pro-At1-MMP (Abspaltung des Propeptids) gezeigt werden. Das Enzym zeigte keinerlei gelatinolytische oder caseinolytische Aktivität, spaltete aber Myelin und drei weitere MMP-Peptidsubstrate. Ebenso konnte gezeigt werden, dass humane TIMPs eine inhibierende Wirkung auf At1-MMP ausüben (Maidment et al, 1999).

Intensiver erforscht wurde At2-MMP. Durch Transkriptanalysen in vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen konnte At2-MMP in Blättern und Wurzel detektiert werden, mit den höchsten Expressionsraten in den Blättern. Bei 10 Wochen alten Pflanzen konnten Transkripte von At2-MMP in Blättern, Wurzeln und Blütenständen detektiert werden, mit den höchsten Expressionsraten in der Wurzel. Ebenso konnte in vier Wochen alten Pflanzen die Induzierbarkeit von At2-MMP durch Methyl-Jasmonat, Cadmium und NaCl gezeigt werden (Golldack, et al 2002). Eine tDNA-Insertionsmutante (at2-mmp-1) entwickelte sich zunächst normal, um mit dem Beginn der regenerativen Phase ein deutlich reduziertes Wachstum von Wurzeln, Blättern und Sprossen zu zeigen, welches sich in verspätetem Blühen äußerte. Weiterhin zeigten die Mutanten verfrühte Seneszenz und schnellen Chlorophyll-Abbau (Golldack et al, 2002).

Untersuchungen zur Entwicklung von Kotedonen in Gurke (*Cucumis sativus* L. cv Marketmore) führten zur Identifizierung einer MMP (Cs1-MMP) deren Transkripte erst in der Übergangsphase zwischen Seneszenz und Zelltod detektierbar waren, was für eine Rolle des Enzyms während der Apoptose spricht (Delorme et al, 2000).

2001 konnte in Soja (*Glycine max*) die Akkumulation von Transkripten einer zweiten MMP (*GmMMP2*) nach Pathogenbefall (*Phytophthora sojae* und *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) und Verwundung gezeigt werden (Liu et al, 2001). In Suspensionskultur konnte nach Infektion mit Bakterien über Azocoll-Verdau (Graham et al, 1991) eine erhöhte Aktivität festgestellt werden. Nach Expression in *E.coli* konnte die Spaltung von Myelin nachgewiesen werden. Das rekombinante Enzym inhibierte gemeinsam mit Protein-Extrakten aus Soja das Wachstum von Pathogenen stark. Daher vermuten Liu et al. eine Abspaltung antimikrobieller Substanzen oder die Freisetzung extrazellulärer Elicitoren durch *GmMMP2*.

Die erste MMP aus Tabak (*NtMMP1*) wurde 2009 von Schiermeyer et al beschrieben, nachdem beobachtet wurde, dass diese in Tabak-Zellsuspensionskulturen (BY-2) nach

Pathogenbefall induziert wurde. Sie beinhaltet alle strukturellen Eigenschaften die für MMPs charakteristisch sind. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *NtMMP1* in der Plasmamembran lokalisiert ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für *NtMMP1* eine Rolle in der Pathogenerkennung und Pathogenabwehr an der Zellperipherie postuliert (Schiermeyer et al, 2009).

Von der Matrixmetalloproteinase *SlMMP1* aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) ist die cDNA-Sequenz bekannt und auf beiden Strängen vollständig bestimmt (EST Klon cLEC15M21, Clemson University). Interesse weckte das Enzym nachdem über Mikroarray-Analyse eine Induktion durch das Pilztoxin Fusicoccin beobachtet wurde (Frick und Schaller, 2002). Die cDNA Sequenz von *SlMMP1* umfasst 1181 Basenpaare mit einem offenen Leserahmen (ORF) von 1104 Basenpaare und sie codiert für ein Prä-Pro-Protein von 367 Aminosäuren, bei einem errechneten Molekulargewicht von 40,2 kDa. Von zwei potentiellen Transmembrandomänen ist eine Teil des N-terminalen Signalpeptides, die andere bildet einen Membrananker am C-Terminus, in dessen Nähe eine ω -site zur Verknüpfung mit einem GPI-Anker prognostiziert wird (Zimmermann, 2004). Es findet sich ebenso das Zink-Binde-Motiv HEXGHXXGXXH wie auch der konservierte „Met-turn“ im Motiv AIMYP. Im Propeptid befindet sich ein PRCG(V/N)(P/A)D-Motiv mit dem charakteristischen „cystein-switch“. Die in *E.coli* exprimierte katalytische Domäne von *SlMMP1* (K2MMP) wurde mittels Zymographie, mit einem fluorigenen Peptidsubstrat und durch massenspektrometrische Bestimmung der Spaltprodukte synthetischer Peptide auf ihre Aktivität hin untersucht. Es konnten caseinolytische und gelatinolytische Aktivität beobachtet werden. Chelatoren zweiwertiger Metallionen (EDTA, EGTA und 1,10-Phenanthrolin) sowie in geringerem Masse Thiol-modifizierende Reagenzien hemmten die Aktivität. Maximale Aktivität konnte bei pH 6.3 in Gegenwart von 500 μ M CaCl_2 beobachtet werden. *SlMMP1* zeigte eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren beiderseits hydrolysierter Bindungen bei der Spaltung von Insulin, Melittin, Glucagon und Substanz P. Systemin und Neurotensin wurden nicht geschnitten (Frick, 2002). Aufgrund der Charakteristika von pflanzlichen MMPs und der für die *SlMMP1* beobachteten Induzierbarkeit durch das Pilztoxin Fusicoccin wurde für die *SlMMP1* eine Funktion im Umbau der Zellwand in Verbindung mit der Abwehr von mikrobiellen Pathogenen vorgeschlagen (Frick und Schaller, 2002). Weiterhin wäre, wie für *GmMMP2* vermutet (Liu et al., 2001), die Freisetzung von Elicitoren und die Produktion antimikrobieller Substanzen auch für *SlMMP1* denkbar (Frick, 2002).

1.1 Zielsetzung

Da Erkenntnisse vorliegen welche vermuten lassen, dass MMPs an der Regulation der Zellwand und bei der Pathogenabwehr in Tomatenpflanzen beteiligt sind und aufgrund der wichtigen Stellung der tierischen MMPs für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, ist die Aufklärung der Funktion der Tomaten MMPs von großem wissenschaftlichen Interesse. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, exemplarisch Tomaten-MMPs zu charakterisieren und zur Aufklärung der Funktion dieser MMPs im lebenden System beizutragen.

In Tomate (*Solanum lycopersicum*) wurden zwei MMPs (*SIMMP1* & *SIMMP2*) identifiziert, deren genaue Funktion und physiologischen Substrate noch unbekannt sind. *SIMMP1* wurde bereits zuvor biochemisch charakterisiert und die hier durchzuführende biochemische Charakterisierung von *SIMMP2* in Tomate ist essentiell, um zu klären, inwieweit die Eigenschaften der beiden Tomaten MMPs redundant sind. Die große Sequenzähnlichkeit zwischen *SIMMP1* und *SIMMP2* auf Nukleotid- und Aminosäurenebene deutet darauf hin. In diesem Zusammenhang sollen insbesondere die pH-Abhängigkeit, die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen und die Substratspezifität des Enzyms untersucht werden.

Strukturanalysen prognostizieren für *SIMMP1* und *SIMMP2* eine Lokalisation im Apoplasten der pflanzlichen Zelle. Die Anwendung immunohistochemischer Methoden unter Applikation eines spezifischen Antikörpers, welcher gegen die katalytische Domäne von *SIMMP1* gerichtet ist, sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob es sich bei den erwähnten Enzymen um extrazelluläre Proteine handelt.

Zur Aufklärung der *in vivo* Funktion der MMPs soll der Phänotyp von „Loss-of-function“-*SIMMP1*-RNAi-Linien zunächst auf zellulär-morphologischer Ebene unter Einsatz histologischer Methoden (Dünnschnitte, Färbungen) mit anschließender mikroskopischer Analyse untersucht werden.

Weiterhin soll der Phänotyp von MMP-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp auch auf molekularer Ebene, nämlich im Hinblick auf Veränderungen in der Genexpression untersucht werden. Dabei werden Tom1 cDNA Mikroarrays zum Einsatz kommen, die einen großen Teil des Tomate-Genoms abdecken. Die Arrays sollen mit differentiell (Cy3/Cy5) markierten cDNAs hybridisiert werden, um die Änderungen des Transkriptoms infolge des MMP „Loss-of-function“ mit dem Wildtyp zu vergleichen.

Um eine mögliche Rolle der MMPs bei der Pathogen-Abwehr zu untersuchen, sollen MMP-RNAi-Pflanzen, Wildtyp und MMP-überexprimierende Tomatenpflanzen mit verschiedenen

Pflanzenpathogenen (*Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Dachbrand) infiziert werden, um das Wachstumsverhalten der Pathogene und die Abwehrreaktion der verschiedenen Tomaten-Genotypen zu erfassen. Weiterhin soll mittels semiquantitativer PCR untersucht werden, ob eine Induktion der MMPs infolge der Applikation des Pflanzen-Pathogens nachweisbar ist.

Diese Experimente werden es erlauben, Einblicke in die jeweils spezifischen Funktionen der MMPs zu erhalten. Darüber hinaus werden die hier erzielten Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der pflanzlichen Entwicklung (Umbauprozesse der Zellwand) beitragen, und möglicherweise Strategien zur Erhöhung der Toleranz gegenüber pflanzlichen Pathogenen aufzeigen können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide, Antikörper und Kit

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fluka und Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), und Merck (Darmstadt) bezogen. Die eingesetzten Enzyme und dazugehörigen Puffer stammten von Fermentas und hatten eine Aktivität von 10 U/ μ l.

Alpha [32 P]-dCTP, 10 μ Ci/ μ l wurde von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen. Das Sondenmarkierungskit, RadPrime Labelling System, stammte von der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Biotechnologies (Köln) hergestellt (vgl. Tabelle 2.1).

5a <i>S</i> MMP2	GGAATGAGGAGGATTCATCTATA
51 <i>S</i> MMP2	GTGGCTCACTACTCCTTCTT
52 <i>S</i> MMP2	TATTGGGTTTGGGTCATTCA
3 <i>S</i> MMP2	ACAAAAAGTACAGCTGTTATTTA
31 <i>S</i> MMP2	GTCCCAGTATAATTCGGGTT
32 <i>S</i> MMP2	AAGGCATAAGTCAAATCA
M13for	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13rev	CAGGAAACAGCTATGACC
Aktin F	TGTGGGAGATGAAGCTCAATCG
Aktin R	TCAAACATCAGTGAGGTCACG
MMP 15	CCTTTATTCATCGCCATACT
MMP13	TCTTGTTGCGCCGCCACCGT
MMP25b	TGCCATTGCTTATGTTGTAATA
MMP23	GTCTTACCCTCGGGCCACTT
150- <i>Le</i> EF1 α F	ACACCTCCCACATTGCTGTCAAGT
428- <i>Le</i> EF1 α R	TTTGGGCAGCCTTGGTGACTTTAG
AccS F	TTTGTTTGGCTGATCCTGGCGATG
AccS R	TGTCAAAGACAGTGGCTGCGTAGA

PR 10 F	ATGAGTCCACAACCACAATTGCCC
PR 10 R	ACCTCCATCTCCAGCAGCTTCAAA
Acidic 26 kDa F	GAACAATGACGCATGTCCTGCCAA
Acidic 26 kDa R	ACACCAATACCTTGTCCAGCTCGT
Cyclophilin F	ATCCCAGGGTTCATGTGTCAAGGA
Cyclophilin R	AGATCCAACAGCCTCTGCCTTCTT
S/SBT3 forward	ACTCCTCAAGATTACGTAAATCTCC
S/SBT3 reverse	CAATAATAGGAGATGTTACTATCGGAC
Hin 1 F	AATTATGGCCCGTCCATTCCGC
Hin 1 R	ACCAATCAAAATGGCACCTAG
topxC1 F	TGGAAGTTCATCAGCACAGCT
topxC1 R	CTACAGCAGATTTGATGTTGTC
hsr203J F	CCTGTTCCACCGCATGACGACTTC
hsr203J R	TGGCGGCAACTTGATTGGACGAC

Tabelle. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

Der verwendete polyklonale Antikörper, gerichtet gegen die katalytische Domäne von SIMMP1, welche in *E. coli* heterolog exprimiert und über eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgereinigt wurde, wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) erstellt. Das anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat stammte von der Firma Calbiochem (Darmstadt/Schwalbach). Der für die immunohistochemische Analyse verwendete sekundäre Antikörper (Goat-anti rabbit IgG, markiert mit Alexa Fluor® 568) stammte von der Firma Invitrogen.

2.2 Organismen

2.2.1 Bakterienstämme *E. coli*

Escherichia coli DH10B F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74
Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-
mcrBC) λ⁻

Escherichia coli BL21RIL *E. coli* B F- dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S)

2.2.2 Bateriaenstämme *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Xcv)

Die drei in dieser Arbeit verwendeten isogenen Stämmen von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* wurden von dem Institut für Pflanzengenetik der Universität Halle (Prof. Dr. U. Bonas) zur Verfügung gestellt.

Stamm	Pathogenität
Xvc 85-10	virulent
Xcv 85-10 pDSk200	avirulent
Xcv 85-10 ΔhrpA-G	nicht virulent

2.2.3 Pilz *Sclerotinia sclerotiorum*

Das in dieser Arbeit verwendete Isolat wurde vom Institut für Phytomedizin (Dr. A. Walz) der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt.

Name	Isolat	Herkunft
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Dachbrand	<i>Nicotiana benthaminiana</i>

2.2.4 Tomatenpflanzen

Alle verwendeten Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum* – früher *Lycopersicon esculentum* Mill) waren vom Kultivar UC82B. Die Wildtyp-Samen wurden von Royal Sluis (Enkhuizen, Niederlande) bezogen.

***SIMMP*-RNAi-Pflanzen**

Die *SIMMP*-RNAi-Pflanzen wurden mittels RNAi-Technik bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt (Sieferer & Schaller, unveröffentlicht). Dabei wurde ein ca. 450 bp großes Fragment vom 5'-Ende der *SIMMP1*-cDNA in sense und in anti-sense Orientierung in pHANNIBAL (Wesley et al. 2001) kloniert. Die RNAi-Expressionskassette wurde dann in den Expressionsvektor pART27 (Gleave, 1992) kloniert und transgene Tomatenpflanzen unter Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation hergestellt.

***SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen**

Die *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt (Zimmermann & Schaller, unveröffentlicht). Dazu wurde der ORF der *SIMMP1*-cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors und des OCS Terminators in den Expressionsvektor pART27 (Gleave, 1992) kloniert. Transgene Tomatenpflanzen wurden mittels der Agrobakterium vermittelten Transformation generiert.

2.3 Anzucht des biologischen Materials

2.3.1 Tomatenpflanzen

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Tomatenpflanzen im Gewächshaus oder in Klimakammern bei 16 bzw. 12 h Licht angezogen. Vier Wochen nach der Keimung wurde einmal wöchentlich im Gießverfahren gedüngt (NPK-Dünger: GABI Plus® 12-8-11, 2

ml/l Gießwasser). Vor und während der Experimente wurden keine Pflanzenschutzmaßnahmen durchgeführt, und es wurde auch auf ein Ausgeizen der Tomatenpflanzen verzichtet.

2.3.2 Desinfektion der Samen

Alle verwendeten Tomatensamen wurden über Nacht bei 70 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 10% Trinatriumphosphat (TNP) für 3 h. Nach dem Einweichen in TNP wurden die Samen in einem großen Volumen H₂O fünfmal gewaschen, bevor die Samen ausgesät wurden.

Samen, welche auf Filterpapier angezogen wurden, wurden einer Oberflächensterilisationsprozedur unterzogen. Hierfür wurden die Samen 3 Minuten in 70 % Ethanol und 10 Minuten in 1,5 % Natrium-Hypochlorit, versetzt mit fünf Tropfen Tween 20/100 ml, bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Samen in einem großen Volumen ddH₂O gewaschen und in der Sterilbank getrocknet.

2.3.3 Samenernte und Stratifikation

Samen wurden aus reifen Früchten von Tomatenpflanzen geerntet, gewaschen und getrocknet. Gelagert wurden die Samen in Papiertütchen bei Raum-Temperatur. Samen, welche jünger als ein halbes Jahr waren, wurden vor der Aussaat für 48 h bei 4 °C stratifiziert.

2.3.4 Wachstumsbedingungen für Tomatenpflanzen

Tomatenpflanzen, welche nicht für die Samengewinnung sondern für Experimente verwendet wurden, wurden entweder im Gewächshaus (GWH) auf Erde oder in der Klimakammer auf einem geeigneten Medium (1/2 MS) bei definierten Wachstumsbedingungen aufgezogen (Tabelle 2.2).

Experiment	Pflanzenalter	Verwendete Organe	Wachstumsbedingungen
Expersionsmuster	8 Tage 6 Wochen	Wurzel, Hypokotyl, Kotyledonen, Blätter, Blüten, Stängel	½ MS (Kulturraum) GWH
Histochemie	2 Wochen 4 Wochen	Hypokotyl Wurzel	GWH
Southern Blot	4 Wochen	Blätter	GWH
RT-PCR "silencing"	24 Tage	Blätter Hypokotyl	GWH
Mikroarray	3 Wochen	Hypokotyl	GWH
Phänotyp/Histologie	2 Wochen 4 Wochen	Hypokotyl, Stängel	GWH
Quantifizierung phenolischer Substanzen	4 Wochen	Hypokotyl, Petiole	GWH
Blattphänotyp	6 Wochen	Blätter	GWH
Wurzelentwicklung	Makrostadium 1 (Code 12) Feller, 1995b	Wurzel	Kulturraum
Expression von S/MMP1/2 in Tomate nach Fusicoccin- Behandlung	2 Wochen	Blätter	Kulturraum
Expression von S/MMP1/2 in Tomate nach Infektion mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4 Wochen	Blätter	GWH
Wachstum von <i>Xanthomonas campestris</i> auf S/MMP1/2-RNAi- und UC82b- Pflanzen und Expression von S/MMP1/2.	6 Wochen	Blätter	GWH

Tabelle. 2.2: Alter und Wachstumsbedingungen der Tomatenpflanzen in den verschiedenen Experimenten. Das Alter der Pflanzen ist in Wochen angegeben.

Gewächshaus (GWH)	Temperatur: 25 °C ± 2 °C, Lichtintensität: ~ 250 µmol*m ⁻² *s ⁻¹ , 16 h
Klimaraum	Temperatur: 22 °C, Lichtintensität: 110 µmol*m ⁻² *s ⁻¹ , 12 h

2.3.5 *Sclerotinia sclerotiorum*

Als Dauerkultur und zur Erhaltung der Virulenz, wurde *Sclerotinia sclerotiorum* bei 20 °C auf Biomalz-Peptonagar (BMP, Tabelle 2.3) kultiviert. Das Isolat welches für Inokulations-Experimente verwendet wurde, wurde von BMP auf ¹/₂ Potato Dextrose Agar (PDA, Tabelle 2.3) überführt, und für vier Tage im Dunkeln inkubiert.

Biomalz-Peptonagar (BMP)	2 % (w/v) Malzin 0,2 % (w/v) Pepton (Fleischextrakt) 1,5 % (w/v) Agar
¹/₂ Potato Dextrose Agar (PDA)	1,95 % (w/v) PDA 0,2 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Weizenstärke

Tabelle 2.3: Übersicht über die Zusammensetzung der für die Kultivierung von *Sclerotinia* verwendeten Medien.

2.3.6 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10

Zur Kultivierung von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) wurde das Nutrient-yeast-growth (NYG, Tabelle 2.4) Medium verwendet. Bei NYG handelt es sich um ein Minimalmedium, welches zur Induktion der Virulenz in Bakterien verwendet wird. Zur Anzucht der verschiedenen Stämme wurden abhängig von der jeweiligen Resistenz verschiedene Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen verwendet (Tabelle 2.5).

Nutritient yeast growth (NYG)	5 g/l Bactopepton
	3 g/l Hefeextrakt
	20 % (w/v) Glycerin

Tabelle 2.4: Übersicht über das zur Kultivierung von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Stämmen, verwendete Medium. Angaben zu verwendeten Antibiotika und deren Konzentration sind in Tabelle 2.5 ersichtlich.

Xcv Stamm	Antibiotikum
Xcv 85-10	Rifampicin 100 µg/ml
Xcv 85-10 pDSk 200	Rifampicin 100 µg/ml Spectinomycin 50 µg/ml
Xcv ΔhrpA-G	Rifampicin 100 µg/ml

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Stämme, mit Angaben zur Antibiotikakonzentration, abhängig vom Stamm.

Für Dauerkulturen wurden Bakterien aus einer bestehenden Glycerinkultur auf einer Agarplatte (NYG+Antibiotika+Agar 10%) ausgestrichen, und diese für 48 h bei 28 °C inkubiert. Für eine Über-Nacht-Kultur wurde eine einzelne Kolonie in Flüssigmedium bei 28 °C geschüttelt.

2.4 Identifizierung von SIMMP2 in Tomate mittels Datenbankanalysen und Ermittlung der cDNA-Sequenz

2.4.1 Verwendete Datenbanken und identifizierte Klone

Sequenzvergleichsanalysen zur Identifizierung des SIMMP2-Klons cLHT-22-F10 mit der cDNA-Sequenz von SIMMP1 als Matrize wurden mit der Datenbank Sol genomics network (<http://solgenomics.net>) durchgeführt. Die Identifizierung von weiteren EST-Klonen, welche überlappende Sequenzen zum SIMMP2-Klon aufwiesen (cLEC52A23, cLEW23A21) erfolgte

ebenfalls mit der Datenbank Sol genomics network. Die Sequenz DV105558 wurde in einer cDNA-Bank aus *Solanum lycopersicon* Wurzeln gefunden (<http://lifesciencedb.jp>).

Die multiple Aneinanderlagerung der Sequenzen, welche zur Identifizierung der hypothetischen cDNA-Sequenz von *SIMMP2* führten, wurde mit dem online frei verfügbaren Programm MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr>) durchgeführt.

2.4.2 Amplifikation des *SIMMP2* Gens mittels PCR

Die mittels Datenbankanalysen ermittelte hypothetische cDNA Sequenz von *SIMMP2* (2.4.1) diente als Matrize zur Erstellung von spezifischen Primern (5a-*SIMMP2*, 3-*SIMMP2*), um die *SIMMP2*-DNA, ausgehend von genomischer Tomaten DNA spezifisch zu amplifizieren. Als DNA-Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix) von Clontech verwendet, welche eine 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wodurch der Einbau nicht komplementärer Nukleotide reduziert wird. Ausgehend von der ermittelten hypothetischen Sequenz, wurde eine Fragmentgröße von 1141 bp für das amplifizierte *SIMMP2*-PCR-Produkt erwartet.

2.4.3 Aufreinigung und Ligation von *SIMMP2*-DNA in pCR® 2.1-Topo®

Nach Amplifikation von *SIMMP2* mittels PCR, unter Verwendung spezifischer Primer, wurden die amplifizierten Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten, und mittels dem QIAquick-PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben vom Hersteller aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation in den pCR® 2.1-Topo®-Vektor (Karte, Beschreibung und Protokoll siehe http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf (Invitrogen)).

2.4.4 Elektrotransformation von *E. coli* DH10b

Die Übertragung von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation (Easyjec T, EQUIBIO). Hierfür wurden 40 µl kompetenter Zellen (*E. coli*, DH10b) auf Eis aufgetaut, und 1 µl Ligationsansatz wurde dazugegeben. Die Suspension wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette übertragen, und die Elektroporation wurde mit 15 µF, 2500 V und 335 Ω durchgeführt. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben, und die Suspension in ein Kulturröhrchen überführt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf ein Selektionsmedium (LB mit 50 µg/ml Kanamycin und X-Gal (40 µl/2 % X-Gal Lösung in Dimethylformamid) und IPTG (40 µl/100 mM)) zur Blau-Weiß Selektion ausplattiert. (Es wurden drei unabhängige Klonierungen durchgeführt, wobei die zu ligierende DNA aus drei unterschiedlichen PCR-Reaktionen stammte)

2.4.5 Sequenzanalyse

Um die Plasmid-DNA aus *E. coli* DH10b zu gewinnen, wurde je Transformationsereignis eine transformierte Kolonie für eine Über-Nacht-Kultur verwendet, welche am folgendem Tag für eine Plasmid-Mini-Präparation (Kapitel 2.9.1.1) verwendet wurde. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI* enzymatisch gespalten, um die Fragmentgröße von 1141 bp zu überprüfen.

Die Plasmid-DNA wurde anschließend zur Sequenz-Analyse an MacroGen (Korea) übersandt. Die Sequenz von *SIMMP2* wurde somit auf beiden Strängen unter Verwendung von Oligonukleotiden (5a *SIMMP2*, 51 *SIMMP2*, 52 *SIMMP2*, 3 *SIMMP2*, 31 *SIMMP2*, 32 *SIMMP2*), welche von der hypothetischen *SIMMP2*-cDNA-Sequenz abgeleitet wurden, ermittelt und die Sequenz der EST-Klone (vgl. 2.4.1) bestätigt.

2.5 Erstellung eines *S/MMP2(kat)*-(His)₆ Expressionskonstrukts

2.5.1 Klonierung der katalytischen Domäne von *S/MMP2* (*S/MMP2kat*) in den Expressionsvektor pET-21d(+)

Zur heterologen Expression von *S/MMP2* in *E. coli* zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften sollte nur die katalytische Domäne von *S/MMP2* (*S/MMP2(kat)*) in pET-21d(+) kloniert werden. Dabei sollte die C-terminale Transmembrandomäne durch (His)₆ ersetzt werden, was eine Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie über eine Nickel-NTA-Agarose-Säule erlaubt. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, welche eine spezifische Amplifikation der katalytischen Domäne von *S/MMP2* erlaubten.

Primer1 (For)	5-CG <u>CCATGG</u> CTTCCTTCTTTCCTGGAAGACCA-3
Primer2 (Rev)	3-GGCTCGAGCGGGGCTCCATTCGTATCATT-5

Tabelle 2.6: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der katalytischen Sequenz von *S/MMP2*. Die Restriktionsschnittstellen für *Nco*I und *Xho*I sind unterstrichen.

Primer1 (For) trägt ein Startcodon (Nukleotide 5-7) und eine Restriktionsschnittstelle (*Nco*I, unterstrichen) für spätere Umklonierungsschritte und 21 Nukleotide (11-32), welche die spezifische Anlagerung an die Sequenz der katalytischen Domäne von *S/MMP2* sicherstellen sollen. Primer2 (Rev) trägt die Sequenz für den Einbau einer *Xho*I Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) und 21 Nukleotide, vom 3' Ende der *S/MMP2* Sequenz. Die katalytische Domäne wurde per PCR amplifiziert und in pCR[®]2.1-Topo[®] kloniert. Die Umklonierung der katalytischen Domäne von *S/MMP2* in pET-21d(+) erfolgte durch Doppelverdau von *S/MMP2* aus pCR[®]2.1-Topo[®] sowie pET-21d(+) mit *Nco*I und *Xho*I. Nach der enzymatischen Spaltung von pET-21d(+) wurde dieser durch Zugabe von CIAP dephosphoryliert und gemeinsam mit *S/MMP2* ligiert.

Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH10b transformiert, auf Selektions-Medium übertragen, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien zum Animpfen von 2 ml Über-Nacht Kulturen in selektivem LB-Medium verwendet. Plasmid-DNA wurde über eine Plasmid-Mini-Präparation aus den Kulturen gewonnen, und diese wurde zur Transformation des *E. coli* Expressionsstammes BL21-RIL verwendet. Die

Transformationsansätze wurden auf selektive LB-Agarplatten (40 µg/ml Chloramphenicol; 100 µg/ml Ampicilin) übertragen, und bei 37 °C inkubiert.

2.6 Expression und Aufreinigung von *S/MMP2(kat)*-(His)₆

2.6.1 Expression von *S/MMP2(kat)*-(His)₆ in *E. coli* BL-21-RIL

E. coli BL-21-RIL, transformiert mit *S/MMP2(kat)* wurden auf LB-Medium mit (40 µg/ml Chloramphenicol; 100 µg/ml Ampicilin) selektioniert. Eine 3 ml Vorkultur (Über-Nacht) wurde verwendet, um 200 ml LB (40 µg/ml Chloramphenicol; 100 µg/ml Ampicilin) anzuimpfen. Die Kultur wurde auf einem Schüttler mit 200 U/min bei 37 °C inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht hatte. Anschließend wurde durch Zugabe von 1mM Isopropyl-β-D thiogalactopyranosid (IPTG) die Proteinexpression induziert. Diese erfolgte bei 30 °C für 4 h. Nach der Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (10000g, 10 min bei 4 °C, in Sorvall RC5B plus, Rotor HS 4), und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.6.2 Aufreinigung des Expressionsproduktes

Der Aufschluss der Bakterien nach der Induktion von *S/MMP2(kat)*-(His)₆ in BL-21-RIL erfolgte mit BugBuster (Novagen) nach der vom Hersteller beschriebenen Methode.

Die Reinigung des Proteins erfolgte unter nativen Bedingungen durch Affinitätschromatographie über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose Säule. 2,3 ml Ni-NTA-Agarose wurde in eine leere Säule (10 ml, Polypropylen, Econo Column, BioRad) gegeben, und der Lagerungspuffer wurde durch Abtropfen entfernt. Anschließend wurde drei Mal je 8 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol) zugegeben und durchlaufen gelassen. Nun wurde der Proteinextrakt nach dem BugBuster Aufschluss zugegeben, und bei 4 °C im Invertierrad inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss (D) aufgefangen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 4 ml Waschpuffer (W I, W II) (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von sechs Mal 0,5 ml

Elutionspuffer (E1-E6) (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der Säule eluiert. Nach der Elution wurde die Säule zweimal mit 4 ml Säulenwaschpuffer (EQ₁, EQ₂) (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Reinigung für 30 min mit 0,5 M NaOH. Zur Lagerung, wurde die Säule in 30 % EtOH bei 4 °C aufbewahrt. Eluatfraktionen wurden durch Dialyse (ZelluTrans, Roth, MWCO 12.000), gegen 50 mM MES/HCl pH 5,5 umgepuffert.

Aliquote von R, D, W I und E wurden mit Ladepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 100 mM Dithiothreitol; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % Glycerin) versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse unterzogen (Kap. 2.7).

2.7 Proteinanalytische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der löslichen Fraktion, erfolgte mittels einer photometrischen Methode nach Bradford (1976). Die Extinktion bei 595 nm wurde mit einem UV-Vis Spektrophotometer (DU530, Beckmann) gemessen und die Proteinkonzentration wurde anschließend anhand einer BSA-Standardkurve errechnet.

2.7.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970), mit 12 %igen (w/v) Trenngel in Mini-PROTRAN® 3 Cell-Apparaturen (BioRad, München). Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2 h bei 100 V in Laemmli-Puffer. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung diente ein Protein-Standard (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, # SM671, Fermentas, St. Leon-Rot).

Zur Anfärbung der Proteine wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R 250, 10 % Essigsäure,

45 % Methanol) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Färbung wurden die Gele über mehrere Schritte mit einer Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 30 % Methanol) entfärbt.

2.7.3 Western Blot

Die Übertragung von Proteinen nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman, Dassel) erfolgte nach dem "semi dry" Verfahren. Hierfür wurden sechs Filterpapiere (3MM, Whatman, Dassel) in Anodenpuffer 2 (25 mM Tris/HCl, pH 10,4; 20 % Methanol) eingelegt und auf die Graphitelektrode gelegt. Diesen wurden drei Filterpapiere aufgelegt, welche in Anodenpuffer 1 (300 mM Tris/HCl, pH 10,4; 20 % Methanol) eingelegt waren. Die Nitrozellulosemembran wurde zuerst in ddH₂O geschwenkt, um danach für 10 min in Anodenlösung 1 inkubiert zu werden, bevor diese auf dem Filterpapier-Stapel gelegt wurde. Das SDS-Gel wurde auf den Stapel gelegt, gefolgt von sechs Filterpapiere, welche in Kathodenpuffer (40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol) eingelegt waren. Die Graphitkathode wurde anschließend auf diesem Aufbau gelegt, und die elektrophoretische Übertragung erfolgte bei 100 mA/Gel für 90 min.

2.7.4 Immunodetektion

Nach der elektrophoretischen Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in dem Blockierungspuffer 1x TBS (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 135 mM NaCl), 0,1 % Tween 20, 6 % Milchpulver (Regilait, Saint Martin Belle Roche, Frankreich) unter ständigem Schütteln zur Absättigung der freien Bindestellen inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (anti-S/MMP1-IgG, Verdünnung 1:1000) erfolgte in Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1x TBS, 0,1 % Tween 20 gewaschen um Antikörper welche nicht gebunden hatten zu entfernen. Dem folgte die Inkubation der Membran in Blockierungspuffer, welchem ein sekundärer Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Heavy and Light Chain (Goat), Peroxidase Conjugated) zugegeben wurde

(1:10000). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln. Danach wurde die Membran erneut zweimal 5 min mit 1x TBS, 0,1 % Tween 20, und einmal für 10 min mit 1x TBS gewaschen.

Nach dem Waschen wurde die Membran für 1 min in ECL-Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 200 µM p-Coumarsäure; 1,25 mM Luminol; 0,01 % H₂O₂) inkubiert, zwischen Plastikfolie gelegt, und für 30-60 sec gegen einen Röntgenfilm (CL-Xposure™ Films, Pierce, Bonn) exponiert.

2.7.5 Reinigung der IgG-Fraktion aus anti-S/MMP1-Serum

Die Aufreinigung der IgG-Fraktion aus anti-S/MMP1-Serum erfolgte über eine Protein A-Sepharose (Protein A Sepharose™ CL-4B, GE Healthcare)-Säule. Das Material wurde nach der vom Hersteller beschriebenen Methode vorbereitet. Als Säule diente eine Pasteur-Pipette, welche am schmalen Ende ca. 0,5 cm hoch mit Glaswolle ausgestopft wurde. Anschließend wurde ca. 1 ml Medium hinzugegeben. Das Säulenmaterial wurde mit 10 ml 2 M Urea, 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 3,0, und 10 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen. Der pH Wert des verwendeten Serums wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl pH 8,0 an den pH Wert des Säulenmaterials angepasst. Anschließend wurde das Serum (1 ml) auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Anschließend wurden erneut zwei Waschschrte mit 10 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 und 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0 durchgeführt, um nicht gebundene Serumbestandteile von der Säule zu entfernen. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte durch 100 mM Glycin/HCl pH 3,0. Jede Eluatfraktion (E1-E12; 500µl) wurde sofort durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert. Die Bestimmung der Konzentration an aufgereinigten IgGs erfolgte im Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bei 280 nm ($1 \text{ OD}_{280} = 0,8 \text{ mg/ml IgG}$). Die Elutionen mit den höchsten IgG-Konzentrationen wurden vereinigt (1,5 ml). Zur Stabilisierung der aufgereinigten IgG-Fraktion, wurde Rinderserumalbumin (BSA, 1 mg/ml), und 0,02 % Timerosal zugefügt.

2.7.6 Reinigung von anti-S/MMP1-IgGs aus der IgG-Fraktion

Aus einem Aliquot der gereinigten IgG-Fraktion sollten nun spezifisch anti-S/MMP1-IgGs entfernt werden, um die IgG-Fraktion ohne anti-S/MMP1-IgGs als Negativkontrolle für die Immunohistochemische Lokalisation von S/MMP1/2 zu verwenden.

Die Reinigung von anti-S/MMP1-IgGs aus der IgG-Fraktion (Kapitel 2.7.6) erfolgte mittels einer HiTrap NHS-aktivierter HP Säule (GE Healthcare), an welche S/MMP1-Protein gebunden wurde das zuvor in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-Säule gereinigt worden war. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers (<http://www4.gelifesciences.com/>) vorgegangen. Für die Reinigung von anti-S/MMP1-IgGs aus der IgG-Fraktion wurde ein Volumen von 0,75 ml der IgG-Fraktion verwendet. Zur Stabilisierung der IgG-Fraktion nach der Entfernung von anti-S/MMP1-IgGs, wurde Rinderserumalbumin (BSA, 1 mg/ml), und 0,02 % Timerosal zugefügt.

2.7.7 Immunohistochemische Detektion von S/MMP1/2

Hypokotyl- und Wurzel-Segmente wurden wie in Kapitel 2.12 beschrieben fixiert, in Ethanol dehydriert und in Kunstharz eingebettet (Technovit 7100). Anschließend wurden 5µm starke Querschnitte am Microtom (RM 2255, Leica) angefertigt, und auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH & Co KG) übertragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Querschnitte für 1 h in 1 % SDS, gefolgt von dreimal 5 min Waschen in 1 x PBS ((aus 20 x PBS (160g NaCl, 4g KCl, 28,8g Na₂HPO₄ und 4,8g KH₂PO₄, pH 7,4)). Die Querschnitte wurden mindestens für 1 h bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung (5 % BSA in 1 x PBS, 0,01 % Tween 20) zur Vermeidung von unspezifischen Antikörper-Antigen-Bindungen behandelt. Zur Immunodetektion von S/MMP1/2 wurde eine IgG-Konzentration (vgl. 2.7.5 und 2.7.6) von 25 µg/ml in 1 x PBS/Tween 20 angewendet, und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde drei Mal für 5 min in 1 x PBS/Tween gewaschen, und mit einem sekundären Antikörper (Goat-anti rabbit IgG, markiert mit Alexa Fluor® 568, Invitrogen) bei einer Verdünnung von 1:1000 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 min mit 1 x PBS/Tween gewaschen. Vor der Analyse im Fluoreszenz-Mikroskop (Axio Imager Z.1, Zeiss), wurden die Objekte mit eine Tropfen SlowFade®Gold

anitfade Reagent (Invitrogen) überschichtet, und mit einem Deckglas (24 x 50 mm, Roth) überdeckt. Betrachtet wurde unter Anwendung des Filtersets 43 HE ($\lambda_{ex} = 550/25 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605/70 \text{ nm}$).

2.8 Enzymaktivitätstest

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Substratspezifität für die *S*/MMP1(His)₆ (Frick, 2002) und für die *S*/MMP2(His)₆ (Nicholson, 2007) anhand verschiedener Peptidsubstrate bestimmt. Es zeigte sich eine starke Präferenz der *S*/MMP1 und *S*/MMP2 für hydrophobe Aminosäuren in den P₃, P'₁, und P'₂ Positionen des Peptidsubstrates. Ebenso scheinen hydrophobe Aminosäuren auch in den Positionen P₂ und P₁ häufig vorzukommen.

Aufgrund dieser Erkenntnissen wurde zur Bestimmung des Einflusses von pH Wert, zweiwertigen Metall-Ionen und zur Bestimmung des apparenten *K_m*-Wertes die Hydrolyse eines fluorogenen Peptidsubstrates, welches teilweise die zuvor bestimmten Präferenzen erfüllt, spektrofluorimetrisch beobachtet. Es wurde ein Resonanz-Energie-Transfer-gedämpftes Substrat (M-2350, Bachem: Mca-Lys-Pro-Leu-Gly~Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) verwendet. Mca (7-Methoxycoumarin-4-Acetyl) ist die fluoreszierende Gruppe ($\lambda_{EXITATION} = 325 \text{ nm}$; $\lambda_{EMMISSION} = 400 \text{ nm}$), und Dpa (*N*³-Dinitrophenyl-*L*-2,3-Diaminopropion-Säure) ist die Fluoreszenz-dämpfende Gruppe. Wenn nicht anders angegeben wurde der Enzymtest in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Das pH Optimum von *S*/MMP1 und *S*/MMP2 wurde zwischen pH 5 und 9 bestimmt. Als Puffersystem für die pH Bereiche 9, 8,5 und 8 wurde 100 mM Tris/HCl verwendet. Für die pH Bereiche 7,5 und 7, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ und für die pH Bereiche 6,5, 6, 5,5, und 5, 100mM Na(CH₃COO) verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 ng Enzym gestartet. Die Fluoreszenzänderung wurde über einen Zeitraum von 70 min bei Raumtemperatur verfolgt.

Um den Einfluss von zweiwertigen Metall-Ionen auf die Aktivität von *S*/MMP2 zu untersuchen, wurde die Aktivität von *S*/MMP2 in 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7 mit 7 μ M Substrat und 500 ng Enzym bei verschiedenen CaCl₂-Konzentrationen (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μ M CaCl₂) im Spektralfluorometer bestimmt.

Zur Bestimmung des apparenten *K_m*-Wertes, wurden die zuvor für die *S*/MMP1 und *S*/MMP2 ermittelten optimalen Bedingungen (2.8.1 & 2.8.2) verwendet. Für *S*/MMP2 enthielt ein

typischer Reaktionsansatz von 1 ml, 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7, 500 µM CaCl₂, 100 ng *SIMMP2* bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen.

SIMMP1 wurde ebenfalls in 1 ml, mit 100mM Na(CH₃COO) pH 6,5, 500 µM CaCl₂, 500 ng *SIMMP1* bei verschiedenen Substratkonzentrationen vermessen.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmid-Mini-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly, 1979.

2.9.1.2 Isolierung genomischer Tomaten-DNA (CTAB-Methode)

2 g Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert, und zu 10 ml, 65 °C warmen CTAB-Extraktionspuffer ((2 % (w/v) CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid); 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 2% β-Mercaptoethanol) hinzugegeben. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei 65 °C belassen. Danach wurde mit einem Volumen Chloroform gemischt, und anschließend für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, und dieser 1/10 Volumen CTAB-NaCl-Puffer (10 % (w/v) CTAB; 0,7 M NaCl) unter vorsichtigem Mischen beigefügt. Anschließend wurde erneut mit ein Volumen Chloroform extrahiert, und 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und ein Volumen CTAB-Präzipitationspuffer ((1 % (w/v) CTAB; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) wurde zugegeben. Danach wurde das Präzipitat 5 min bei 500 x g zentrifugiert und in 2 ml high-salt-TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 M NaCl) gelöst (30 min, 65 °C). Die DNA wurde erneut durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol über Nacht bei Raumtemperatur gefällt. Am nachfolgenden Tag wurde das Präzipitat für 15 min bei 7500 x g zentrifugiert, und das Sediment mit 80 % Ethanol

gewaschen, getrocknet, und erneut in 0,5 ml TE/RNase (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 10 µg/ml RNase) gelöst. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die DNA erneut mit 1/3 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2,5-fachem Volumen 100 % Ethanol 30 min auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation bei 7500 x g für 20 min (4 °C) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

2.9.1.3 Isolierung von RNA (Mini-Präparation)

Zur Gewinnung von RNA aus Wurzel, Hypokotyl, Blättern oder sonstigen pflanzlichen Organen, wurde ca. 300 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert und mit 750 µl Extraktionspuffer (75 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA; 1 % SDS; 1 M β-Mercaptoethanol) versetzt und kräftig gemischt. Anschließend wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/24/1) extrahiert und das Gemisch für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/48/2) extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und 4 °C, wurde einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert.

Die wässrige Phase wurde erneut durch Zentrifugieren gewonnen, und dieser wurde das 0,25fache Volumen an 10 M LiCl zugegeben, und über Nacht bei 4 °C zur Fällung der RNA auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde am darauf folgenden Tag für 30 min bei 10000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 µl, 70 % Ethanol gewaschen und in 400 µl ddH₂O gelöst.

Die RNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8 und 2,5-fachem Volumen 100 % Ethanol und Inkubation für 2 h bei -20 °C gefällt. Danach wurde die gefällte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl ddH₂O gelöst.

2.9.1.4 Isolierung von RNA (Midi-Präparation)

Diese Methode wurde zur Isolierung von RNA aus Hypokotylen von Tomatenpflanzen für die Mikroarray-Analysen verwendet.

30-40 Hypokotyle von drei bis vier Wochen alten Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert, und mit einem Gemisch aus 2 ml Phenol und 2 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 vermengt, und kräftig gemischt. Anschließend wurde 5 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die Phenolphase wurde erneut mit 1 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8 extrahiert. Nach der Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen vereinigt und erneut mit 3 ml Phenol vermengt, kräftig gemischt und zentrifugiert. Die Extraktion mit Phenol wurde noch zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase einmal mit 3 ml Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, und zentrifugiert. Die RNA wurde gefällt durch Zugabe von 250 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8 und 6,5 ml, 100 % Ethanol zu 2,5 ml wässriger Phase und Inkubation von 2 h bei -20 °C. Das Präzipitat wurde zentrifugiert und in 3 ml ddH₂O gelöst. Die RNA wurde erneut über Nacht bei 4 °C durch Zugabe von 1 ml 8 M LiCl gefällt. Am darauf folgenden Tag wurde das Präzipitat zentrifugiert und in 2,5 ml TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) gelöst. Es folgte erneut eine Ethanol-Fällung wie bereits beschrieben, mit nachfolgendem Waschen des Präzipitats mit 800 µl 80 % Ethanol, Zentrifugation und Trocknung. Anschließend wurde die RNA in 200 µl TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch OD₂₆₀ Bestimmung einer 1/200 Fachen Verdünnung im Photometer (1 OD₂₆₀ = 38 µg/µl) ermittelt.

2.9.1.5 Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten wurden 0,8 bis 1,5 %-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA) mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid unter Verwendung horizontaler Elektrophoresekammern benutzt. Als Größenstandard diente ein 1 kb-DNA-Standard (Gene Ruler™ DNA Ladder, Fermentas).

2.9.1.6 PCR und RT-PCR

2 µg RNA wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase "RevertAID™ M-MuLV" nach Protokoll des Herstellers (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in cDNA umgeschrieben. Die Standard-PCR wurde in einem Volumen von 25 µl in Gegenwart von 5 µl 5 x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 0,08 % Triton X-100; 20 % DMSO;

250 mM KCl; 50 mM Tris/HCl, pH 8,3); 0,5 µl dNTPs (10 mM), jeweils 1 µl Taq-Polymerase und je 0,5 µl Forward und Reverse Primer (10 µM) durchgeführt. Die Menge an als Matritze eingesetzter DNA variierte je nach Ausgangsmaterial: Für die Herstellung von DNA-Sonden wurde eine DNA-Konzentration von 1 ng/µl verwendet. Wurde die PCR benutzt, um cDNA nach erfolgter Reverser Transkription zu amplifizieren, dienten 2 µl cDNA als Matritze. Die jeweils verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 2.7 angegeben.

PCR/RT-PCR*	S/MMP1/2 + (Sonde)	S/MMP2-Full-lenght	S/SBT3*
Denaturierung	95 °C, 2 min 95 °C, 20 s	95 °C, 2 min 95 °C, 20 s	95 °C, 2 min 95 °C, 20 s
Anealing	58 °C, 30 s	58 °C, 30 s	64 °C, 40 s
Elongation	72 °C, 45 s	72 °C, 80 s	72 °C, 90 s
	35 Zyklen	35 Zyklen	30 Zyklen

RT-PCR	Aktin/Elongation Faktor	ACO	ACS
Denaturierung	95 °C, 2 min 95 °C, 20 s	95 °C, 2 min 95 °C, 30 s	95 °C, 5 min 95 °C, 30 s
Anealing	58 °C, 30 s	60 °C, 30 s	63 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s
	25 Zyklen	35 Zyklen	35 Zyklen

RT-PCR	Hin 1	hsr 203j	tpox C1
Denaturierung	95 °C, 2 min 95 °C, 20 s	95 °C, 5 min 95 °C, 30 s	95 °C, 5 min 95 °C, 30 s
Anealing	58 °C, 30 s	66 °C, 30 s	58 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s
	35 Zyklen	35 Zyklen	35 Zyklen

RT-PCR	PR-10	PR3a	PPI
Denaturierung	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s
Anealing	64 °C, 30 s	64 °C, 30 s	60 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 45 s	72 °C, 45 s	72 °C, 30 s
	25 Zyklen	25 Zyklen	20 Zyklen

Tabelle 2.7: Übersicht, über die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme.

2.10 Southern Blot Analyse

2.10.1 Enzymatische Spaltung von genomischer Tomaten-DNA

Zur enzymatischen Spaltung der genomischen DNA wurden 10 µg DNA mit je 50 U des Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer in einem Endvolumen von 350 µl bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden nochmals 20 U des jeweiligen Enzyms zugesetzt, und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die gespaltene DNA wurde anschließend mit einem Volumen Isopropanol gefällt, und das Präzipitat in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

2.10.2 Auftrennung der DNA-Fragmente und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran

Die durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 %-igen TAE-Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Ansätze wurden diese mit Ladepuffer (5 % Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Größenmarker diente die 1 kb-DNA-Ladder von Fermentas. Die Gele liefen über Nacht bei 20 V in 1 x TAE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und für 20 min in 0,25 N HCl inkubiert. Anschließend folgten weitere Inkubationen für 30 min in Denaturierungs-Lösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) und zweimal 15 min in Neutralisierungs-Lösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 7,2; 1 mM EDTA). Für den Blot-Aufbau wurde das Blotting-Papier (3MM, Whatman) mit 20

x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-Na-Citrat-Dihydrat; pH 7,0) angefeuchtet, die Nitrocellulose-Membran (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman) gewässert und dann kurz in 20 x SSC inkubiert. Der Blotaufbau erfolgte luftblasenfrei in leicht modifizierter Form nach THOMAS (1980). Der Unterschied zu der beschriebenen Methode bestand darin, dass die zwei Lagen Blotting-Papier, auf welchen der Blot aufgebaut wurde, auf einer Glasplatte lagen, welche quer über eine mit 20 x SSC gefüllte Glasschale platziert wurde. Die Enden des Blotting-Papiers tauchten in die 20 x SSC-Lösung ein, wodurch eine Flüssigkeitsbrücke gebildet wurde, welche den Kapillartransfer ermöglichte. Nach erfolgtem Transfer über Nacht in 20 x SSC wurde die Nitrocellulose-Membran kurz in 2 x SSC gespült, getrocknet und anschließend durch UV-Strahlung auf der Membran fixiert (120 mJ Stratalinker® 1800 Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Membran wurde bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.10.3 Sondenherstellung und Hybridisierung

Die *S/MMP1*-Sonde wurde mittels PCR mit den Primerpaaren MMP1.3/1.5 von genomischer-DNA amplifiziert. Es folgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes mittels Perfectprep®Gel Cleanup-Kit (Eppendorf) und einer anschließenden Ethanol-Fällung. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die Sonde in 20 µl ddH₂O gelöst. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mit dem RadPrime Labelling-Kit nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Hierfür wurden 25 ng Template-DNA und α [32P]-dCTPs verwendet. Die radioaktiv markierte Sonde wurde durch Zentrifugation (1.000 x g, 3 min, rt) durch eine Säule (Bio-Spin-Column, Invitrogen, Karlsruhe) von freien Nucleotiden getrennt. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Sonde an einem Tischszintillationszähler (Bench-Count, Du Pont de Nemours, Dreieich) bestimmt. Für die Hybridisierung wurden die Nitrocellulose-Membranen mit ddH₂O angefeuchtet, kurz in 5 x SSC inkubiert und dann in eine Hybridisierungs-Röhre mit 20 ml Hybridisierungs-Lösung (50 % Formamid; 5 x SSC; 50 mM KPP pH 7,0; 0,5 % (w/v) SDS; 2 x Denhardts Reagenz (0,04 % (w/v) Ficoll 400; 0,04 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon; 0,04 % (w/v) BSA); Lachssperma-DNA (partiell hydrolysiert, denaturiert, 100 µg/ml) überführt. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei 42 °C. Die Hybridisierungs-Lösung wurde erneuert, die Sonde, welche für 5 min auf 95° C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt wurde, zugesetzt und über Nacht bei 42 °C

inkubiert. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde erfolgte je ein Waschschrift für 30 min bei 60 °C mit Waschlösung 1 (1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS) und Waschlösung 2 (0,2 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS). Die Auswertung der Blots erfolgte mittels PhosphoImager (Typhoon-Imager, GE Healthcare, Freiburg) und einer ImageQuant Software.

2.10.4 Strippen von Blots

Die Waschlösung (0,04 x SSC; 0,04 % SDS) wurde in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt, der Blot dann in die heiße Waschlösung überführt und für weitere 2 min in der Mikrowelle am Siedepunkt gehalten. Anschließend wurde die Waschlösung mit der Membran für 30 min unter Schütteln abgekühlt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

2.11 Mikroarray Analysen

2.11.1 cDNA Mikroarray

Bei den verwendeten Mikroarrays handelte es sich um die Tom1-Arrays, die vom Boyce Thompson Institute (Ithaca, New York) bezogen wurden (<http://ted.bti.cornell.edu/>). Beim Tom 1 Array handelt es sich um ein EST Array, welcher insgesamt 13440 Spots enthält. Diese beinhalten 12899 verschiedene EST-Klone, welche ca. 8500 Tomaten-Gene aus verschiedenen pflanzlichen Organen, Geweben, Entwicklungsstadien usw., repräsentieren, was die Untersuchung eines großen Spektrums an Genexpressionsänderungen in Tomate erlaubt.

Da für eine Vielzahl der verwendeten Gene keine Nukleinsäuresequenz vorlag, wurde für statistisch signifikant differentiell regulierte Gene der entsprechende EST-Klon bezogen (unter: <http://ted.bti.cornell.edu/>), die Plasmid-DNA mittels Plasmid Mini Präparation gewonnen, und zur Ermittlung der Sequenz zu Macrogen (Korea) gesandt. Die erhaltene Sequenzen dienten als Suchsequenzen für ein Datenbankvergleich (unter: <http://solgenomics.net/>) zur Ermittlung der nächsten Homologe (siehe Anhang 6.3).

2.11.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Hypokotyle von Tomatenpflanzen, erfolgte wie in Kapitel 2.9.1.4 beschrieben.

2.11.3 Fluoreszenz-Markierung der Proben

Unter Einbau von fluoreszenz-markierten Nukleotiden (Cy5-dCTP und Cy3-dCTP, Amersham Bioscience) wurden gleiche Mengen RNA (80 µg) von Wildtyp (UC82b) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen in cDNA revers transkribiert. Dabei wurde nach der Methode von Reymond, et al. 2000, vorgegangen (Details, <http://www.unil.ch/ibpv>). Es wurde RNA aus Hypokotylen von drei unabhängigen *SIMMP1/2*-RNAi-Linien mit Cy3-dCTP markiert (entspricht Grün im Falschfarbenbild) und die korrespondierende RNA aus Wildtyp-Hypokotylen mit Cy5-dCTP (entspricht Rot im Falschfarbenbild) markiert. Ebenso wurde RNA aus *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen mit Cy5-dCTP und die korrespondierende RNA aus Wildtyp-Hypokotylen mit Cy3-dCTP markiert ("dye-swap"). Nach der Markierung wurden die korrespondierenden Proben zusammengefügt, und die Reaktion durch Zugabe von 2,65 µl 25 mM EDTA abgestoppt. Die RNA wurde durch Zugabe von 3,3 µl 1 M NaOH hydrolysiert, und die markierte cDNA wurde mittels Anwendung des Qiagen MinElute PCR purification kit (# 28004) nach Vorgabe des Herstellers gereinigt und mit 20 µl ddH₂O von der Säule des PCR purification kit eluiert.

2.11.4 Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays

Ein typischer Ansatz für die Hybridisierung bestand aus 18 µl markierter cDNA, 53,2 µl ddH₂O, 15 µl 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-Na-Citrat-Dihydrat; pH 7,0), 10 µl tRNA ((2 µg/µl), Endkonzentration 0,2 µg/µl) und 3,8 µl 10 % SDS (Endkonzentration, 0,38 %), in einem Volumen von 100 µl. Vor der Hybridisierung wurde die Probe für 1 min bei 95 °C denaturiert, und sofort auf das Mikroarray pipettiert und mit einem Deckglas (LifterSlip, Erie scientific company) zugedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungskammer

(VersArray™ HYB. CHAMBER, Bio-Rad Laboratories) bei 64 °C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurden die Mikroarrays zwei Mal 5 min mit 2 x SSC mit 0,1 % SDS, zwei Mal 1 min mit 0,2 x SSC, und zwei Mal 1 min mit 0,1 x SSC gewaschen. Getrocknet wurden die Mikroarrays durch Zentrifugieren (Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-81, Eppendorf) für 2 min bei 2600 rpm.

2.11.5 Scannen und Auswerten der Mikroarrays

Die Mikroarrays wurden in einem GenePix™4000B-Scanner (Axon Instruments, Inc.) eingelesen. Dabei wurden separate Bilder für Cy3 ($\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$) und Cy5 ($\lambda_{ex} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$) erstellt. Es erfolgte eine automatische Einstellung des Photomultipliers (Gain), um vergleichbare Signalstärken zu erhalten. Die Auswertung der Bilder erfolgte unter Anwendung der Software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Die Auswertung der Mikroarray-Daten welche nach Anwendung von GenePix Pro 6.0 erhalten wurden, erfolgte mit Acuity 4.0 (Molecular Devices).

Im ersten Schritt wurden Signale herausgefiltert, welche ein SNR (Signal to noise Ratio) $532 > 2$ oder $635 > 2$ aufwiesen. Zur weiteren Berechnung der Expressionsverhältnisse wurden die Signalintensitäten normalisiert. Es erfolgte eine Ratio-Basierende-Normalisierung. Die Daten wurden so normalisiert, dass der Mittelwert der Verhältnisse der Mediane der Signalstärke aller Signale gleich 1 ist. Dabei wurden Ratios kleiner als 0,1 und größer als 10 ausgeschlossen. Ebenso wurden schlechte, nicht gefundene Spots von der Normalisierung ausgeschlossen.

Als differentiell exprimiert wurden solche Gene ausgewählt, welche eine um das mindestens 2fache erhöhte Signalintensität im Cy3 ($\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$) oder Cy5 ($\lambda_{ex} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$) Kanal in mindestens drei Mikroarrays aufwiesen.

Um die statistische Signifikanz der differentiellen Expression zu bestimmen wurde ein one-sample t-test (nach Bonferroni) ($p < 0,05$) durchgeführt.

Für die Einteilung der als signifikant differentiell reguliert identifizierten Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen nach ihrer Funktion während biologischer Prozesse, wurde das nächste *Arabidopsis thaliana* Homolog ermittelt (<http://www.arabidopsis.org/>) und dessen GO (Gene Ontology)- Klassifizierung übernommen.

2.12 Histologische Untersuchungsmethoden

2.12.1 Einbettung von pflanzlichem Gewebe in Technovit 7100®

Hypokotyle und Wurzeln von Tomatenpflanzen (UC82B und *SlMMP1/2-RNAi*) wurden unter fließendem Wasser von Verunreinigungen befreit, und mit einer Rasierklinge in 0,5 cm große Segmente geschnitten.

Die Segmente wurden in einem Gemisch aus Formaldehyd (5 % Formaldehyd, Roth (37 %, p.a.)), Eisessig (5 % Eisessig, Roth (99 %, p.a.)), und 70 % Ethanol (99,8 % Ethanol, Roth (70 %)) fixiert, welches unter Vakuum infiltriert wurde, bis keine Bläschenbildung mehr zu erkennen war (Ruzin, 1999). Die Fixierungslösung wurde 3-mal ausgetauscht. Die Segmente wurden für drei Tage in der Fixierungslösung belassen.

Nach der Fixierung erfolgte ein Waschschrift, 30 min mit 75 % Ethanol. Anschließend wurde zweimal mit 75 % Ethanol 30 min infiltriert. Die Segmente wurden über Nacht in 75 % Ethanol belassen.

Anschließend wurde das Gewebe dehydriert. Dazu wurde das Gewebe zunächst für sechs Stunden mit 90 % Ethanol, dann für 18 Stunden mit 95 % Ethanol infiltriert, bis keine Bläschen mehr zu erkennen waren. Anschließend wurde dreimal für drei Stunden mit absolutem Ethanol und abschließend für 18 Stunden mit absolutem Ethanol infiltriert. Es folgte die Infiltration eines Gemisches aus zwei Teilen Ethanol und einem Teil Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) Basislösung, gefolgt von Ethanol/Technovit 1/1, Ethanol/Technovit 1/2, und reiner Technovit Basislösung. In der Basislösung wurden die Segmente für 18 Stunden belassen. Anschließend wurde Technovit Basislösung mit Härter I infiltriert (Vorbereitungsflüssigkeit). Der Vorbereitungsflüssigkeit wurde der Härter II zugegeben, die Segmente wurden in der Histoform S (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) ausgerichtet und bei Raumtemperatur zur Polymerisation belassen. Nach der Polymerisation wurden die Technovit Blöcke mit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) auf die Histoblocks (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) aufgeklebt.

2.12.2 Schneiden von Querschnitte am Mikrotom

Der Histoblock wurde in den Objekthalter vom Rotationsmikrotom (RM 2255, Leica) fest eingespannt. Durch gleichmäßige Bewegung wurden Schnitte von 5 µm erstellt. Die Sektionen wurden mit einem Pinsel auf die Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel-Gläser) übertragen, auf die vorher Wasser (100 µl) getropft wurde. Anschließend wurden die Schnitte bei 60 °C auf einer Heizplatte gestreckt. Im Folgenden sind die eingesetzten Färbemethoden aufgeführt. Der immunohistochemische Nachweis von *SMMP1/2* ist unter 2.7.8 beschrieben.

2.12.3 Färben mit Toluidin Blau

Die auf den Objektträgern haftenden Schnitte, wurden anschließend zur weiteren Untersuchung gefärbt. Dafür wurde 0,03 g Toluidin Blau O (Serva) Salz in 100 ml Wasser gelöst. Anschließend gab man einen Tropfen (50 µl) der Färbelösung auf die Schnitte und inkubierte diese 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden sie unter fließendem Wasser gewaschen, um die überschüssige Farbe zu entfernen. Die Objekte wurden danach im Hellfeld am Mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss) ausgewertet.

2.12.4 Färben mit Sudan Black

0,1 g Sudan Black (Fluka) Salz wurde in 50 ml 96 % Ethanol gelöst. Anschließend wurde die Suspension filtriert, und mit 50 ml Glycerin versetzt. Zum Färben wurden die Segmente mit je einem Tropfen (50 µl) der Sudan Black Färbelösung für 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objekte unter fließendem Wasser gewaschen. Die Objekte wurden danach im Hellfeld am Mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss) ausgewertet.

2.12.5 Färben mit Anilin Blau

0,001 g Anilinblau-Salz (Serva) wurde in 50 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 9 gelöst. Anschließend wurden die Segmente mit je einem Tropfen (50 μl) Färbelösung für 10 min inkubiert. Danach wurden die Objekte unter fließendem Wasser gewaschen. Die Objekte wurden danach unter Anregung mit UV-Licht am Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 2 plus, $\lambda_{\text{ex}} = 395 - 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ Zeiss) ausgewertet.

2.12.6 Färben mit Trypanblau

Trypanblau dient zum selektiven Anfärben abgestorbener Zellen oder Pilzstrukturen. Die Färbung mit Trypanblau wurde mit Modifikationen nach der Methode von Cao et al, (1998) durchgeführt. Das Gewebe wurde in einem Volumenanteil Lactophenol-Trypanblau-Lösung (10 ml Milchsäure, 10 ml Phenol, 0,01 % Trypanblau) und zwei Volumenanteilen 95% (v/v) Ethanol 5 Minuten lang gekocht. Das Gewebe wurde für 24 Stunden in Chloralhydrat-Lösung (2,5 g/ml) entfärbt und in 80% (v/v) Glycerin gelagert.

2.13 Extraktion phenolischer Verbindungen (nach Goldwasser *et al.* 1999)

Hypokotyle und Blattstiele von vier Wochen alten Tomaten-Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurde das Pflanzenpulver in ein Eppendorfgemäß mit 1 ml 50 % Methanol übertragen und 90 Minuten bei 80 °C inkubiert, um die löslichen Phenole zu extrahieren. Nach anschließender Zentrifugation bei 14 000 rpm für 15 Minuten in der Eppendorf Zentrifuge 5402 wurde der Überstand dekantiert und bis zur Bestimmung der löslichen Phenole im Kühlschrank gelagert. Zur Hydrolyse gebundener Phenole wurde das Sediment in 1 ml 0,5 N NaOH aufgenommen und für 24 Stunden bei RT geschüttelt. Anschließend wurde mit 0,5 ml 1 N HCl neutralisiert. Nach Zentrifugation (15 min, 14 000 rpm in Eppendorf 5402) wurde der Überstand dekantiert und zur Bestimmung der gebundenen Phenole verwendet.

2.13.1 Bestimmung des Gehalts an löslichen und gebundenen Phenolen (Folin-Ciocalteu) (nach Goldwasser et al, 1999)

Jeweils 100 µl der Methanol (lösliche Phenole) bzw. NaOH (gebundene Phenole) Extrakte, wurden mit 900 µl ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt, mit 0,5 ml 2 N Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz versetzt, gut gemischt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3 Minuten wurden 2,5 ml 20 % Na₂CO₃ hinzugegeben, ordentlich vermischt, und für eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Konzentration der Phenole als *p*-Cumarsäure-Äquivalente bei einer Wellenlänge von 725 nm im Photometer (Carry 100 BIO) ermittelt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde zuerst 100 mg *p*-Cumarsäure (Sigma) in ein ml Methanol (99,8 %, Roth) gelöst. Aus dieser wurde anschließend über verschiedene Verdünnungsstufen Lösungen mit Konzentrationen von 20 – 200 µg/ml *p*-Cumarsäure in 20 µg/ml Intervallen erstellt und wie zuvor beschrieben am Photometer gemessen.

2.14 Behandlung von Tomatenpflanzen

2.14.1 Fusicoccin Behandlung

Zwei Wochen alte Wildtyp-Tomatenpflanzen wurden mit 3 µM Fusicoccin (Sigma, aus 1mM Stammlösung in Ethanol) in Phosphatpuffer (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6,5) behandelt, wie von Schaller et al. (2000) beschrieben. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die nur mit Pufferlösung behandelt worden waren. Blattmaterial von sechs Pflanzen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung für spätere RNA-Extraktion geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.14.2 Infiltration von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* in Tomatenblätter

Zur Inokulation wurden aus einer Über-Nachtkultur (NYG, 28 °C) 100 µl und auf NYG-Medium mit 10% Agar ausplattiert und für 48 h bei 28 °C inkubiert. Die Bakterien wurden steril von Agarplatten entnommen und in 25 ml 1 mM MgCl₂ aufgenommen. Die optische

Dichte der Suspension wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt. Ausgehend von diesem Wert wurde dann die Bakteriendichte auf 10^8 cfu/ml (OD600: 0,4) eingestellt; für die Erstellung der Wachstumskurven wurden die Bakterien auf eine cfu/ml von 10^4 verdünnt.

Zur Untersuchung der Symptome und des Bakterienwachstums im Blattgewebe wurde die Suspension an der Blattunterseite mit der Spritze injiziert. Die Suspension wurde in den vorderen Teil der Blattfiedern an der Blattunterseite mit der Spritze bis in die Blattspitze infiltriert. Dabei wurden möglichst wenige Infiltrationspunkte gesetzt, d.h. maximal drei, damit eine homogene Verteilung der Bakterien im Blattgewebe gewährleistet war.

2.14.3 Reisolierung von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* aus Blättern

Pro Probenzeitpunkt wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 1 cm) aus einem infiltrierten Fiederblatt von je drei sechs Wochen alten Pflanzen eine Blattscheibe aus der Blattspitze ausgestanzt. Nach kurzer Oberflächensterilisation der 3 Blattscheiben in 25 ml 70 % Ethanol und anschließendem kurzen Waschen in 1 mM MgCl_2 wurden die Blattscheiben auf Zellstoff getrocknet und jeweils in 100 μl 1 mM MgCl_2 in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem sterilen Plastikpistill homogenisiert. Das Pistill wurde mit 900 μl 1 mM MgCl_2 abgespült. Ausgehend von dieser ersten Verdünnung (1:10) wurden die folgenden Verdünnungen abhängig vom Bakterienstamm bis zu einer Verdünnung von $1:10^8$ hergestellt. Nach Erstellung der Verdünnungstufen wurden 10 μl auf eine Agarplatte getropft, die Agarplatte um 90° gedreht, damit die Suspension sich bis ca. 1 cm vor dem unteren Rand verteilt, und vollkommen trocknen gelassen. Um eine Kontamination mit Pilzen zu vermeiden, wurde dem verwendeten Selektionsmedium zusätzlich Cefotaxim (50 $\mu\text{g/ml}$) als Antimykotikum zugesetzt. Die so beimpften Platten wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien pro Verdünnung ausgezählt.

2.14.4 Inokulation von Tomatenblättern mit *S. sclerotiorum*

Zur Inokulation wurden aus vier Tage inkubierten Agarplatten Blöcke von einem Durchmesser von 0,5 cm mit einem Korkbohrer ausgestanzt. Dabei wurden ausschließlich Bereiche des randständigen, also jüngsten Myzels verwendet. Die Blöcke wurden mit der Seite des Myzels auf die Oberseite eines vorderen Fiederblatts von fünf Wochen alten Pflanzen inokuliert. Die Blätter wurden hierfür abgeschnitten und drei Blätter pro Probenzeitpunkt in durchsichtige Plastikboxen gelegt. Für die Erhaltung dieser Blätter über den Versuchszeitraum wurden die Boxen mit feuchtem Zellstoff (20 ml ddH₂O auf zwei Lagen Zellstoff) bis zum Rand ausgelegt, mit Frischhaltefolie am Boden bedeckt und bis zu vier Tagen im Gewächshaus belassen (vgl. Tabelle, 2.2).

2.15 Kultivierung von Tomatenpflanzen, zur Untersuchung der Wurzelentwicklung

2.15.1 Kultivierung von Tomatenpflanzen auf Filterpapier

Die verwendeten Filterpapiere (MN 710, Marcherey-Nagel, Düren) wurden ein Mal in der Mitte gefaltet, und drei Mal der Länge nach. Anschließend wurden die Filterpapiere zur Sterilisation für mindestens 30 Minuten unter UV-Licht gehalten.

Tomatensamen wurden wie in 2.3.2 beschrieben sterilisiert und auf mit sterilem ddH₂O befeuchtetem Filterpapier ca. 1 cm unter der oberen Kante, mit mindestens 2 cm Abstand zueinander, ausgelegt. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte im Kulturraum (vgl. Tabelle, 2.2). (Zusätzlich wurde nach der Keimung der Samen als Nährstoffquelle eine Nährlösung (Makroelemente: 0,7 mM K₂SO₄, 0,1 mM KCl, 0,5 mM MgSO₄; Mikroelemente: 10 µM H₃BO₃, 0,5 µM MnSO₄, 0,5 µM ZnSO₄, 0,2 µM CuSO₄, 0,01 µM (NH₄)₂MoO₇; zusätzlich wurde noch 2 mM Ca(NO₃)₂, 20 µM Fe-EDTA, und 100 µM KH₂PO₄ hinzugegeben) welche alle benötigten Mikro-, Makroelemente ebenso eine Phosphor und Stickstoffquelle enthielt zugesetzt).

2.15.2 Kultivierung von Tomatenpflanzen in Rhizoboxen

Zur Kultivierung von Tomatenpflanzen in Rhizoboxen (40 x 20 x 2 cm, Abb. 2.1) wurde die Erde (Calcareous sub soil, Institut 330), gesiebt (2 mm Maschen), und dieser wurden Nährstoffe (100mg/kg CaNO_3 , 150 mg/kg K_2SO_4 , 50 mg/kg MgSO_4 , 80 mg/kg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ und 7,5 mg/kg Fe-EDTA beigemischt. Anschließend wurde die präparierte Erde wieder gesiebt.

Jede Rhizobox wurde mit 3 kg präparierter Erde befüllt und unter Zugabe von ddH₂O gewässert bis der Feuchtegrad, 17% des Gesamtgewichtes erreichte. Anschließend wurden diese mit zwei Pflanzen je Box bestückt, welche zuvor auf Filterpapier kultiviert wurden (2.15.2), bis die Keimblätter voll entwickelt waren.

Das weitere Wachstum der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus.



Abb. 2.1: Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Erfassung des Wurzelwachstums in Rhizoboxen.

2.15.3 Erfassung der Wurzelentwicklung

Wurzeln von Tomatenpflanzen kultiviert auf Filterpapier, wurden am Scanner eingelesen, und die Wurzelentwicklung wurde unter Anwendung der Software SimplePCI 5.3, Compix IMAGING[®], Pennsylvania, USA bestimmt.

Zur Erfassung der Wurzelentwicklung bei Tomatenpflanzen, welche in Rhizoboxen kultiviert wurden, wurden die Wurzeln, welche entlang der Plexiglasscheibe wuchsen auf durchsichtiger Folie abgezeichnet. Diese wurden am Scanner erfasst, und die Bilder Mittels SimplePCI 5.3, Compix IMAGING[®], Pennsylvania, USA ausgewertet. Dabei wurden die Gesamtwurzellänge und die Anzahl an primären und sekundären Seitenwurzeln ermittelt.

2.16 Quantifizierung der Ethylenemission in Blättern und Hypokotylen von *S/MMP1/2-RNAi*- und Wildtyppflanzen

Die Quantifizierung der Ethylenemission erfolgte soweit nicht anders angegeben wie von Kramer et al, 2003 beschrieben. Im Gegensatz zu Kramer et al, 2003, wurden Hypokotyle und Blattscheiben (je 1 cm²) von drei Wochen alten Tomatenpflanzen in Glasbehältern (Gewindeflaschen ND 24, 30 ml, 72,5 x 27,5 mm, Klarglas, Fischer Scientific) für drei Stunden bei 26 °C inkubiert, welche mit Schraubverschlüsse (ND 24 mit martierten Septum, Silikon weiß/PTFE beige, 12,5 mm Loch, Fischer Scientific) gasdicht verschlossen waren. Nach drei Stunden wurde mit einer Spritze 1 ml Volumen aus den Glasflaschen entnommen und zur Quantifizierung in einem INVIVO-Laserspektrometer C₂H₄-10 (invivo GmbH, Sankt Augustin) injiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung einer zweiten MMP in Tomate

Ein Datenbankvergleich (<http://solgenomics.net/>) mit *S/MMP1* als Suchsequenz führte zur Identifizierung eines "expressed sequence tag" (EST)-Klons (cLHT22F10) welcher auf Nukleinsäureebene 84% Sequenzähnlichkeit zur cDNA Sequenz von *S/MMP1* aufweist (Abb.3.1).

<i>S/MMP1</i>	ATATATATATAATAAGAGCAGAGAGAAGTTGCAAGTAAGCAAATTAGAACAATTTAGCA
cLHT	-----
<i>S/MMP1</i>	AGCAAGTTTCTGATGAGGATTCCTTTATTCATCGCCATACTTTTGTCTTAGTGTTCCA
cLHT	--AA----TGAGGAGGATTCATCTATACATTGCCATTGCTTATGTTGT-AATATTGCA
	*** **
<i>S/MMP1</i>	TTTCATC-TTCAGCTCATTTCTTCCCAAATATTTCTCAATTCCTCCTAATTTATTGAA
cLHT	AACTAGTTGTTTCAGCTCATTTCTTCCCAAATATTTCAATCCCTTCTTTACTCAA
	* **
<i>S/MMP1</i>	ACCAAATGCCACTGCCTGGGATGCTTTTAACAAGTTATTAGGATGCCATTCCGGTCAGAC
cLHT	ACCTAATGCCACTGCTTGGACTTCTTTTCAAAGTTGTTAGGATGTCAACCTGCTCAGAA
	*** **
<i>S/MMP1</i>	GGTCGACGGCTTAGCGAAAATCAAAAATATTTTCACTACTTTGGATACATTAATAATTC
cLHT	AGTCGACGGCATTGCTAAAATCAAAAATATTTTCAACATTTTGGTTACATTAATAATTT
	***** *
<i>S/MMP1</i>	TTCCA--CTAACTTCACTGATGATTTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACCTA
cLHT	GAGTAGTTTAAATTTCACTGATGAATTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACGTA
	* **
<i>S/MMP1</i>	CCAGCTTAACCTCAACCTCAACACCGGTGTGCTCGACGCGAACACCATTCAGCATCT
cLHT	TCAGAGAAATTTCAACCTCAAAGCCACCGGTGTGCTCGATGCGCCACCATTCAGCATCT
	*** **
<i>S/MMP1</i>	CATAAAACCCAGATGTGGAACGCTGATGTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACCTCCGG
cLHT	CATAAAACCCAGATGTGGAATGCCGATCTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACGCTGG
	***** **
<i>S/MMP1</i>	TAAGCCACCGGCAGGTTCTCCGACGATGCACACCGTAGCTCACTACTCCTTCTTTCCGGG
cLHT	AAAGCC-----GCACACGGNGGCTCACTACTCCTTCTTTCTG
	***** *
<i>S/MMP1</i>	AAGTCCACGGTGGCCGGCGAACAAGAGAGATCTGACATATGCTTTGCACCGCAGAATGG
cLHT	AAGACCAAAGTGGCCGAGGGTAAGACTGATTTGACTTATGCCTTTCTACCGGCAAACAA
	*** **
<i>S/MMP1</i>	ACTGACGGATGATATTAAGATTGTGTTACACGAGCGTTTGATAGGTGGTCGGAGGTGAC
cLHT	TTTGACGGATGATATTAAGAGTGTCTTCTACGTGCGTTTGATCGGTGGTCGGAGGTAA
	***** **
<i>S/MMP1</i>	TCCATTGACGTTTACTGAAATAGCATCGTACCAATCGGCTGATATTAAGATCGGGTTTTT
cLHT	CCCGTTGA-----GCT-----
	** **
<i>S/MMP1</i>	CAGCGGAGATCACAACGATGGAGAGCCGTTTGATGGTCTATGGGGACATTAGCACACGC
cLHT	-----TCACGG-----

Abb. 3.1 cDNA Sequenz von *S/MMP1* und cLHT22F10. Sternchen (*) markieren in beiden Sequenzen übereinstimmende Nukleotide. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von Multialin 5.4.1 erstellt.

Des Weiteren wurden verschiedene EST-Klone identifiziert, (cLEC52A23, cLEW23A21, DV105558) welche mit cLHT22F10 überlappende Sequenzen aufweisen. Die Aneinanderlagerung (mit Multialin 5.4.1) dieser Sequenzen, und der Vergleich mit der cDNA Sequenz von *SIMMP1* führten zur hypothetischen cDNA-Sequenz einer zweiten MMP in Tomate, die als *SIMMP2* bezeichnet wurde. Ausgehend von dieser hypothetischen Sequenz wurden Oligonukleotidprimer (5a *SIMMP2*, 3 *SIMMP2*) abgeleitet, um *SIMMP2* ausgehend von genomischer Tomaten DNA zu amplifizieren. Die erhaltenen PCR-Fragmente entsprachen der auf Grund der ermittelten hypothetischen Sequenz erwarteten Fragmentgröße von 1141 bp (Abb. 3.2).

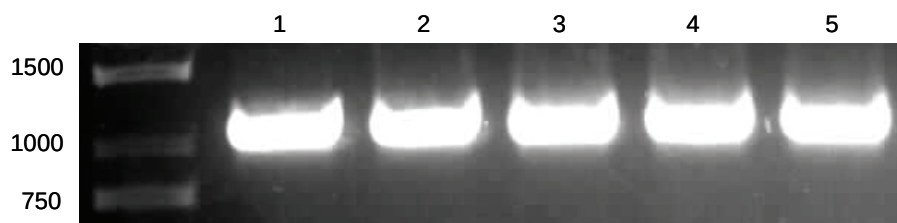


Abb. 3.2: Amplifikation des *SIMMP2* Gens mittels PCR. In fünf unabhängigen PCR Ereignissen wurde ausgehend von genomischer DNA ein PCR-Fragment amplifiziert mit einer Größe von 1141 bp. Als Größenstandard diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Länge der Fragmente ist in bp angegeben.

Die PCR Fragmente von *SIMMP2* wurden in pCR[®]2.1-Topo[®] kloniert, in *E. coli* DH10b amplifiziert und auf beiden Strängen vollständig sequenziert. Es wurde eine Sequenz von 1119 bp ermittelt, die einen intronfreien offenen Leserahmen von 1084 Basenpaaren enthält, welcher für ein *SIMMP2* Protein von 363 Aminosäuren mit einer errechneten molekularen Masse von 40,7 kDa kodiert. In Abbildung 3.3 ist die Nukleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zu sehen. In Abbildung 3.4 ist die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in der Aminosäuresequenz gezeigt, die auf das Vorhandensein von zwei potentiellen Transmembrandomänen schließen (Abb. 3.4: unter <http://www.expasy.ch> mit ProtScale erstellt).

ERGEBNISSE

GGAATGAGGAGGATTTCATCTATACATCGCCATTGCTTATGTTGTAATATTTCAAAC TAGT	60
- M R R I H L Y I A I A Y V V I F Q T S	20
TGTTCAAGTCATTTCTTTCCAAATATTTTCATCAATCCCTTCTTCATTACTCAAACCTAAT	120
C S A ▼ H F F P N I S S I P S S L L K P N	40
GCCACTGCTTGGACTTCTTTTCAAAGTTGTTAGGATGTCAACCTGGTCAGAAAGTCGAT	180
A T A W T S F Q K L L G C Q P G Q K V D	60
GGCATTGCTAAAATCAAAAAATATTTTCAACATTTTGGTTACATTAATAATTTGACTAGT	240
G I A K I K K Y F Q H F G Y I N N L T S	80
TTTAATTTCACTGATGAATTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACGTATCAGAGA	300
F N F T D E F D D T L E S A L K T Y Q R	100
AATTTCAACCTCAAAGCCACCGGTGTGCTCGATGCGCCACCATTCAGCATCTCATAAAA	360
N F N L K A T G V L D A P T I Q H L I K	120
CCCAGATGTGGAATGCCGATCTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACGCTGGAAAGCCG	420
P R C G N A D L V N G T S T M N A G K P	140
CACACGGTGGCTCACTACTCCTTCTTTCTGGAAGACCAAAGTGGCCCGAGGGTAAGACT	480
H T V A H Y ▼ S F F P G R P K W P E G K T	160
GATTTGACTTATGCCTTTCTACCGGCAAACAATTTGACGGATGATATTAAGAGTGTCTTC	540
D L T Y A F L P A N N L T D D I K S V F	180
TCACGTGCGTTTGATCGGTGGTCGGAGGTAACCCGTTGAGCTTCACGGAAATACCGTCA	600
S R A F D R W S E V T P L S F T E I P S	200
TTTCAATCGGCTGATATCAAGATCGGATTTTAAACGGAGATCACAATGATGGAGAGCCG	660
F Q S A D I K I G F L T G D H N D G E P	220
TTTGATGGTCCGATGGGGACATTAGCGCACGCGTTTTACCGCCGGCGGGGCATTTTTCAC	720
F D G P M G T L A H A F S P P A G H F H	240
TTGGACGGCGAGGAAAATTGGGTCGTCGACGGTGTGCCGGTAAATGAAGGGAACTTTTTT	780
L D G E E N W V V D G V P V N E G N F F	260
TCTATATTGTCGGCTGTGGATCTCGAATCGGTTGCGGTTTCATGAAATCGGGCATTTATTG	840
S I L S A V D L E S V A V H E I G H L L	280
GGTTTGGGTCAATTCATCGGTAGAAGATTCGATTATGTATCCGAGTTTGAATCGGGTATT	900
G L G H S S V E D S I M Y P S L E S G I	300
CGAAGAGTGGAGCTGGTGGAGGATGATATTAAGGGGGTTAGGAATTATACGGGTCAAAC	960
R R V E L V E D D I K G V Q E L Y G S N	320
CCGAATTATACTGGGACCAATACAACATTGACTCCGAGCGGCCTGGATAATGATACGAAT	1020
P N Y T G T N T T L T P S G L D N D T N	340
GGAGCCCCGATTGCTAGCTCAGTATGGATTCATGGGTTTTATTGGTGGTTGGATTTTTTC	1080
G A P I R S S V W I H G F L L V V G F F	360
ATTTATTCAATTTAATAAATAACAGCTGTACTTTTTGT	1119
I Y S I *	363

Abb. 3.3: cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der *SIMMP2* mit Signalpeptid, Propeptid, katalytischer Domäne, und Transmembrandomäne. Das Stoppcodon ist mit * markiert. Die vorhergesagten Spaltstellen sind durch ein ▼ markiert. Das Signalpeptid (Reste 1-22) ist rot hervorgehoben, die Prodomäne (Reste 23-146) ist blau hervorgehoben. Das Motiv PRCG(V/N)(P/A)D („Cystein-Switch“) ist blau unterstrichen. Das Zink bindende Motiv in der katalytischen Domäne ist violett markiert. Das Methionin im Met turn ist ebenfalls violett markiert und unterstrichen. Die putative ω-site an Position 339, an der nach dem Abspalten des C-Terminus die GPI-Verankerung prognostiziert wird, ist orange und unterstrichen. Die C-terminale Transmembrandomäne (Reste 342-363) ist grün hervorgehoben. Ebenfalls unterstrichen sind die aus der hypothetischen Sequenz abgeleiteten Primer.

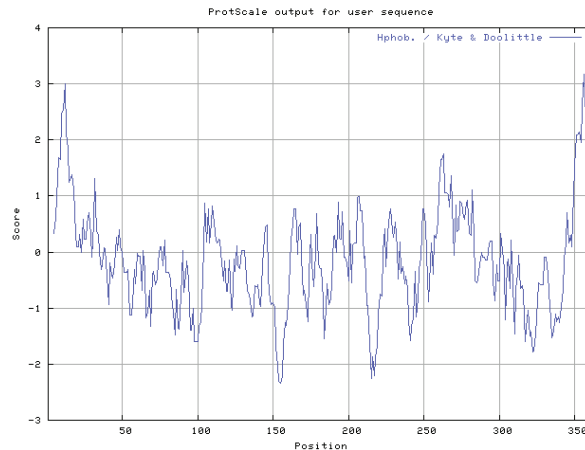


Abb. 3.4: Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in der SIMMP2 Sequenz nach Kyte & Doolittle

Der N-terminale hydrophobe Bereich scheint Teil eines Signalpeptids zu sein, mit einer errechneten Spaltstelle zwischen Ala22 und His23 (errechnet mit <http://www.expasy.ch> Signal IP 3.0). Bei der zweiten Transmembrandomäne scheint es sich um einen C-terminalen Membrananker zu handeln, wobei an der Position 339 eine ω -site zur Verankerung des Proteins mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI) prognostiziert wird (<http://www.expasy.ch> big-PI Predictor).

Des Weiteren findet man das Zink-bindende-Motif HEXGHXXGXXH, welches charakteristisch ist für die Superfamilie der Metzinkine. Als weiteres konserviertes Motif, besitzt die SIMMP2 einen so genannten "Met-turn" in der katalytischen Domäne, dem eine Funktion als vierter Zink-Ligand zugesprochen wird. MMPs werden als PrePro- Enzyme in einer inaktiven Form (Zymogen) synthetisiert. In der Prodomäne findet man das Motif PRCG(V/N)(P/A)D, den so genannten „Cysteine Switch“, welcher mit dem Zinkion in der katalytischen Domäne interagiert und dadurch das Enzym in einer inaktiven Form hält. In Abbildung 3.3, sind die prognostizierten Spaltstellen gekennzeichnet, ebenso die beschriebenen Domänen und Sequenzmotive.

3.2 Herstellung eines *SIMMP2*-His₆-Expressionskonstruktes

Die biochemischen Eigenschaften von *SIMMP2* sollten untersucht und mit denen von *SIMMP1* verglichen werden. Hierfür sollte aktives *SIMMP2* in rekombinanter Form gewonnen werden. Dafür sollte die C-terminale Transmembrandomäne von *SIMMP2* durch einen His-Tag ersetzt werden, was die Reinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie ermöglichen sollte. Aus diesem Grund wurde die katalytische Domäne von *SIMMP2* (*SIMMP2*-kat) in einen Expressionsvektor (pET-21d (+)) kloniert, in *E. coli* exprimiert und anhand des (His)₆-Ankers gereinigt.

3.2.1 Klonierung von *SIMMP2*-kat in pET-21d (+)

Die katalytische Domäne von *SIMMP2* (Reste 145-363) wurde über PCR amplifiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das 610 bp Fragment wurde zunächst in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert, und in *E. coli* DH10b amplifiziert. Anschließend wurde das Fragment durch Restriktion mit den Enzymen *Nco*I und *Xho*I aus pCR[®]2.1-TOPO[®] herausgetrennt und in die korrespondierenden Restriktionsstellen von pET 21d (+) kloniert. Dabei wurde die C-terminale Transmembrandomäne (Reste 342-363) durch einen His₆-Tag ersetzt, was die Reinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie ermöglichen sollte. Sequenzanalysen bestätigten die richtige Integration des Konstruktes in den Zielvektor. In Abbildung 3.5 ist das *SIMMP2* Expressionskonstrukt gezeigt. Die Vektorkarte zeigt *SIMMP2*-kat unter der Kontrolle des T7-Promotors sowie den C-terminalem (His)₆-Anker und den T7 Terminator.

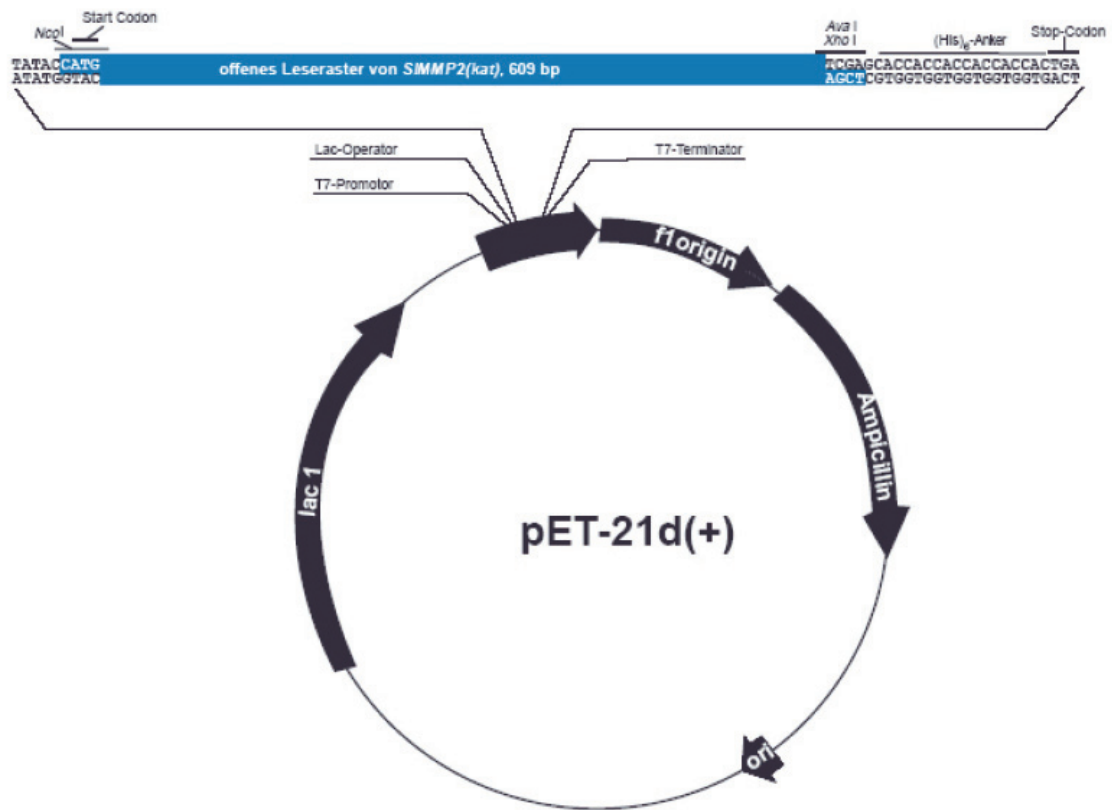


Abb 3.5: Vektorkarte des SIMMP2-kat Expressionskonstruktes. Das offene Leseraster für die katalytische Domäne von SIMMP2 (blau) wurde in den Vektor pET 21d(+) kloniert.

3.3 Expression und Reinigung von SIMMP2-kat

Das Konstrukt SIMMP2-(His)₆-pET-21d(+) wurde in *E. coli* (Bl 21 RIL) transformiert und die Expression wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das in *E. coli* gebildete Protein wurde mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Ni-NTA-Agarose Säule aus der löslichen Fraktion bakterieller Extrakte gereinigt. Auf diese Weise erhielt man aus 200 ml *E. coli* Kultur rund 1 mg SIMMP2-kat. Nach Auftrennung von SIMMP2-kat auf einem SDS-PAGE Polyacrylamidgel und Visualisierung mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung, zeigte das Protein eine apparente Masse von ca. 25 kDa was annähernd übereinstimmt mit der errechneten Masse von 22,4 kDa. Abbildung 3.6 zeigt die Reinigung von SIMMP2-kat im vergleich zur Reinigung von SIMMP1.

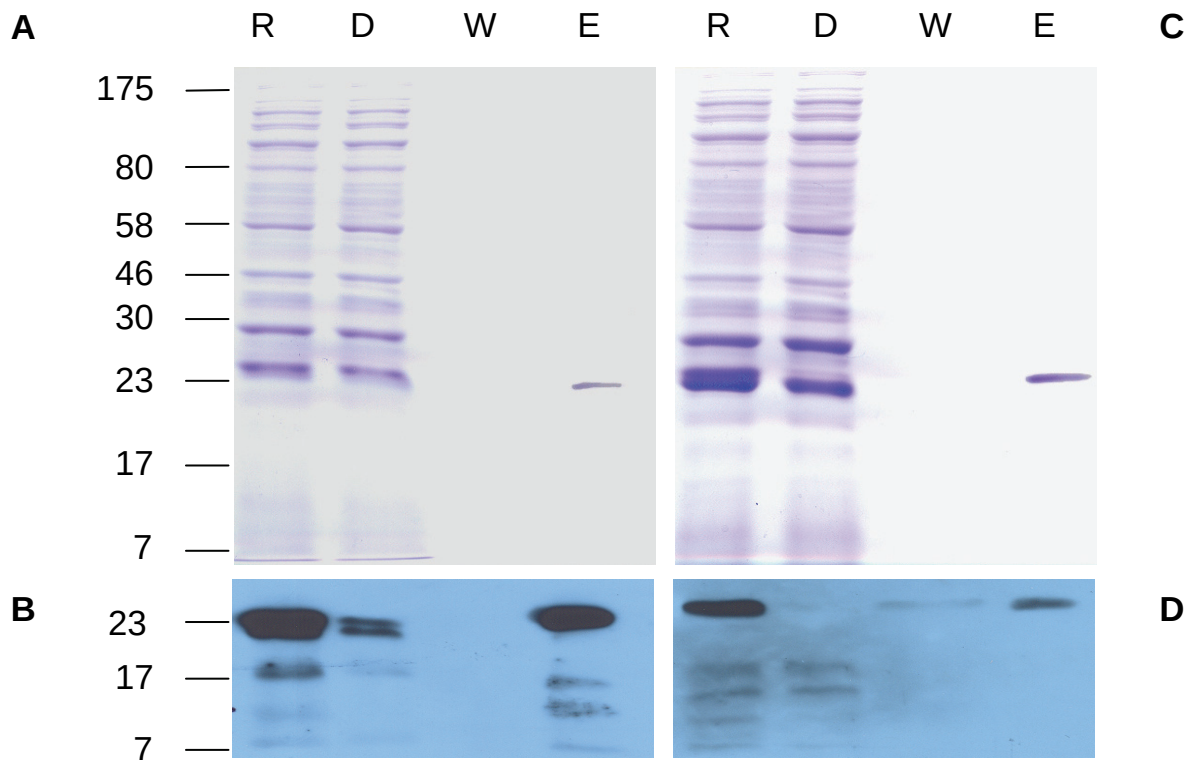


Abb. 3.6: SDS-PAGE Polyacrylamidgele, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (A, C) und Western Blot (B, D) mit aufgereinigtem anti-SIMMP1-IgG zur Visualisierung der Aufreinigung von SIMMP1-kat (A, B) und SIMMP2-kat (C, D). Aufgetragen wurden Rohextrakt (R), Durchlauf (D), Waschfraktion (W) und Elution (E). Vom Rohextrakt (20 ml) und Durchlauf (20 ml) wurden 4 μ l aufgetragen, von der Waschfraktion (8 ml) wurde jeweils 4 μ l einer 5fachen Verdünnung (1/2 von R) aufgetragen. Vom Eluat (500 μ l) wurde 4 μ l einer 40fachen Verdünnung aufgetragen. Zur Bestimmung der Molekulargröße wurde die Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

3.3.1 Enzymkinetik

Ein Vergleich von SIMMP1 und SIMMP2 auf Aminosäurenebene (Abb. 3.7) und des hohe Maß an Sequenzübereinstimmung (77 %) lässt vermuten, dass es sich bei der SIMMP1 und SIMMP2 um Enzyme mit redundanten Eigenschaften handelt. Die SIMMP1, wurde bereits unter Verwendung eines fluorogenen Peptidsubstrats (M-1895, Bachem: Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) biochemisch charakterisiert (Frick, 2002). Zur Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften (pH Optimum, Einfluss von zweiwertigen Metallionen, *K_m*-Wert) von SIMMP2 wurde ebenfalls ein fluorogenes Peptidsubstrat verwendet (M-2350, Bachem: Mca-Lys-Pro-Leu-Gly~Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂: ~ hydrolysierte Bindung) dessen Sequenz teilweise die zuvor bestimmte Substratpräferenz der SIMMP2 erfüllt (Nicholson,

2007). Dieses Substrat unterscheidet sich von dem von Frick (2002) verwendeten durch einen zusätzlichen Lysinrest, durch den die Wasserlöslichkeit erhöht wird. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde neben *S*/MMP2 auch *S*/MMP1 mit dem Substrat M-2350 erneut vermessen.

```

S/MMP1      -MRIPLFIAILFVLSVPFPSSAHFFPNISSIPPNNLLKPNATAWDAFNKLLGCHSGQTVDG 59
S/MMP2      MRRIHLYIAIAYVVFQTSCSAHFFPNISSIPSSLLKPNATAWTSFQKLLGCQPGQKVDG 60
              ** *:*** :*: . . *****.***** :*:*****:*.***

S/MMP1      LAKIKKYFHYFGYINN-SSTNFTDDFDDTLESALKTYQLNFNLNTTGVLDA NTIQHLIKP 118
S/MMP2      IAKIKKYFQHFGYINNLTSTNFTDEFDDTLESALKTYQRNFNLKATGVLDAPT IQHLIKP 120
              :*****:***** :* *****.***** ***** :*:***** *****

S/MMP1      RCGNADVVNGTSTMNSGKPPAGSPTMHTVAHYSFFPGSPRPANKRDLTYAFAPQNGLTD 178
S/MMP2      RCGNADLVNGTSTMNAGKP-----HTVAHYSFFPGRPKWPEGKDLTYAFLPANNLTD 173
              *****:*****:*** ***** *:*** * ***** * *

S/MMP1      DIKIVFTRAFDRWSEVTPLTFTEIASYQSADIKIGFFSGDHNDGEPFDGPMGTLAHA FSP 238
S/MMP2      DIKSVFSRAFDWSEVTPLSFTEIPSFQSADIKIGFLTGDHNDGEPFDGPMGTLAHA FSP 233
              *** **:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S/MMP1      PAGHFHLDGEENWVIDGAPIVDGNFFSILSAVDLESVAVHEIGHLLGLGHSSVEDAIMYP 298
S/MMP2      PAGHFHLDGEENWVDGVPVNEGNFFSILSAVDLESVAVHEIGHLLGLGHSSVEDSIMYP 293
              *****:****: :*:*****:*****:*****:*****:*****

S/MMP1      TLGAGTRRVELRNDDILGVQELYGSNPNTGTGPNNLTPS-QESDTNGAPIFELSWFHGFL 357
S/MMP2      SLESGIRRVELVEDDIKGVQELYGSNPNTGTNTTLTPSGLDNDTNGAPIRSSVWIHGFL 353
              :* :* ***** :*** *****:*****:*.***** :*:***** :*.****

S/MMP1      GLFFALFIQL- 367
S/MMP2      -LVVGFFIYSI 363
              *...: **

```

Abb. 3.7: Vergleich von *S*/MMP1 und *S*/MMP2 auf Aminosäuresequenzebene. (*) markiert identische Aminosäuren. Die Sequenz für das Signalpeptid ist rot markiert. Die Propeptiddomäne ist blau markiert. Die Zinkbindende Sequenz (Cystein-switch) in der Prodomäne ist Gelb markiert. Die Zinkbindende Domäne in der katalytischen Domäne ist Violett markiert. Die putative ω -site zur GPI-Verankerung des Enzyms ist Orange markiert. Die Transmembrandomäne ist Grün gefärbt. Die katalytische Domäne (reifes Enzym) ist schwarz markiert.

Es ist bekannt, dass zweiwertige Ionen einen positiven Einfluss auf die Aktivität von *S*/MMP1 haben (Frick, 2002). Einen positiven Effekt von zweiwertigen Ionen auf die Aktivität wurde auch bei der *S*/MMP2 beobachtet. CaCl_2 hatte einen deutlich positiven Effekt auf die Aktivität von *S*/MMP2. Eine maximale Aktivität von *S*/MMP2 wurde in Anwesenheit von 250-500 μM CaCl_2 beobachtet (Abb. 3.8). Höhere Konzentrationen an CaCl_2 verminderten die Aktivität des Enzyms nicht, führten aber auch nicht zu einer nennenswerten Aktivitätssteigerung.

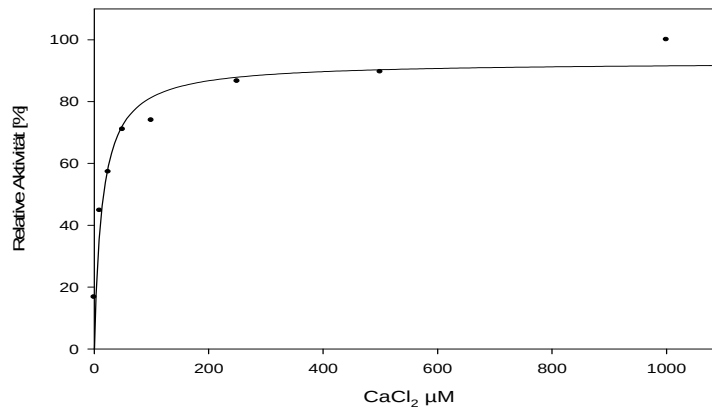


Abb. 3.8: Aktivität von *S/MMP2* in Abhängigkeit von CaCl_2 . der Test enthielt 0,5 ng/µl *S/MMP2* und steigende Konzentrationen an CaCl_2 . Die Aktivität ist relativ zur maximalen bei 1mM CaCl_2 in Prozent angegeben (100 % = 7,01 pmol/min).

Um den Einfluss des pH Wertes auf die Aktivität der Enzyme zu untersuchen, wurde in drei unabhängigen Experimenten die Aktivität von *S/MMP1* & *S/MMP2* in einem pH Bereich von pH 5,5 bis 9 in Anwesenheit von 500 µM CaCl_2 bestimmt. *S/MMP1* zeigte ein Aktivitätsoptimum in 100 mM Na-Acetat pH 6,5 (Abb. 3.9). Diese Beobachtung stimmt mit dem zuvor bestimmten pH Optimum für die *S/MMP1* überein (Frick, 2002). Für *S/MMP2* wurde ein Aktivitätsoptimum bei pH 7 in 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in Anwesenheit von 500 µM CaCl_2 beobachtet. Das pH Optimum von *S/MMP2* ist also im Vergleich zu *S/MMP1* etwas zum Alkalischen verschoben. Die Aktivität von *S/MMP2* war weiterhin im Sauren (pH 5,5 und 6) deutlich geringer als die von *S/MMP1*.

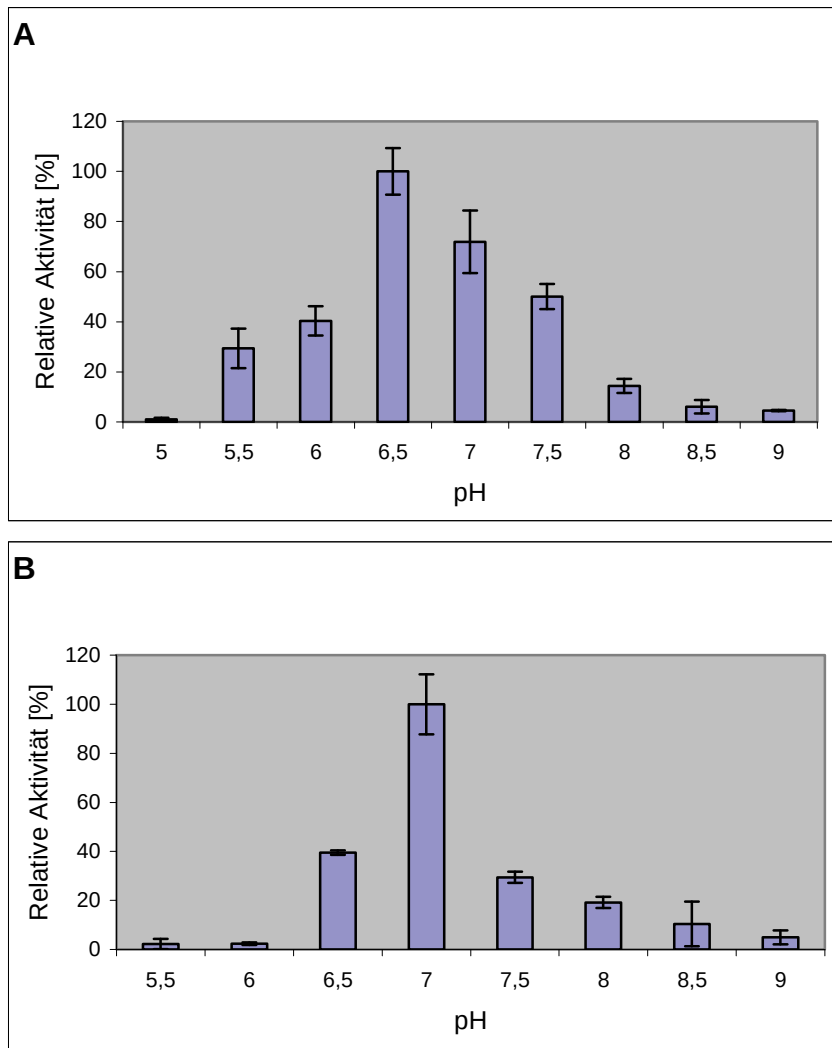


Abb. 3.9: Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von **(A)** *SIMMP1* und **(B)** *SIMMP2* wurde mittels Enzymaktivitätstest unter Verwendung des fluorogenen Peptids (M-2350, Bachem) bestimmt. Aufgereinigtes *SIMMP1* bzw. *SIMMP2* wurde in einer Konzentration von 0,5 ng/μl eingesetzt. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung dar. Die Aktivität ist relativ zur maximalen Aktivität bei pH 6,5 für *SIMMP1* (100 % = 7,3 pmol/min) und pH 7 für *SIMMP2* (100 % = 7,4 pmol/min) in Prozent angegeben.

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für die *SIMMP1/2* erfolgte bei optimalen Reaktionsbedingungen (*SIMMP1*: 100 mM Na-Acetat, pH 6,5 mit 500 μM CaCl_2 , *SIMMP2*: 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7 mit 500 μM CaCl_2) für das Substrat M-2350 unter Verwendung von 0,5ng/μl *SIMMP1* und 0,1ng/μl *SIMMP2* Enzym. Zur Ermittlung des K_m -Wertes, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration von 1 μM bis 20 μM bestimmt. Bei Substratkonzentrationen über 20 μM trat absorptive Dämpfung auf, welche die Messung verfälschte.

Der K_m -Wert wurde nach der Methode von Michaelis-Menten für die *SIMMP1* als 19,5 μM mit einer $V_{\max}$ von 0,268 pmol/s und für die *SIMMP2* als 19,9 μM mit einer $V_{\max}$ von 0,184 pmol/s für das Substrat M-2350 errechnet. Als weitere kinetische Parameter wurde die Wechselzahl (kcat) Für *SIMMP1/2* berechnet. Sie lag für *SIMMP1* bei 0,102 s^{-1} , und für die *SIMMP2* bei 0,460 s^{-1} . Die errechnete katalytische Effizienz (kcat/ K_m) wurde für die *SIMMP1* bei 0,010 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ und für *SIMMP2* bei 0,024 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ berechnet.

3.4 Reverse Transkriptase (RT)-PCR Analyse der Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* in verschiedenen Organen von *Solanum lycopersicum*

Für die Analyse der *SIMMP1/2*-mRNA Expression in Tomate, wurde RNA aus Wurzel, Hypokotyl, und Kotyledonen von 8 Tage alten Keimlingen benutzt, die steril im Kulturraum bei 22°C und einer Photoperiode von 12 Stunden angezogen wurden. Des weiteren wurde RNA aus Wurzel, unterem und oberem Teil des Stängels, jungen, halbentwickelten und vollentwickelten Blättern, aus adulten, sechs Wochen alten Pflanzen verwendet. Zusätzlich wurde die *SIMMP1/2*-mRNA Expression in verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung untersucht. Das Blütenmaterial wurde dabei in drei verschiedenen Entwicklungsstadien gesammelt: Stadium 1 (S1) entspricht fünf, Stadium 2 (S2) drei Tagen vor der Anthese, in Stadium 3 (S3) findet die Anthese statt. Die aus den genannten Organen und Geweben isolierte RNA, wurde zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR genutzt. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, in welchen pflanzlichen Organen und Entwicklungsstadien *SIMMP1* und *SIMMP2* eine Rolle spielen, und ob es Unterschiede im Expressionsmuster gibt.

SIMMP1 wurde in allen untersuchten Organen und Entwicklungsstadien exprimiert (Abb. 3.10), wobei die stärkste Expression in acht Tage alten Keimlinge und in Stängeln von sechs Wochen alten Pflanzen zu beobachten war.

SIMMP2 wurde im Gegensatz zur *SIMMP1* nicht in allen untersuchten Organen und Entwicklungsstadien exprimiert. In acht Tage alten Keimlingen, ist die Expression von *SIMMP2* in Wurzel und Hypokotyl deutlich stärker als in Kotyledonen. *SIMMP2* ist in sechs Wochen alten Pflanzen relativ stark im oberen Stängel nur sehr schwach im unteren Stängel und Blüten in Stadium 1 (S1) exprimiert. Eine konstitutive Expression von *SIMMP2* konnte in Blättern nicht beobachtet werden.

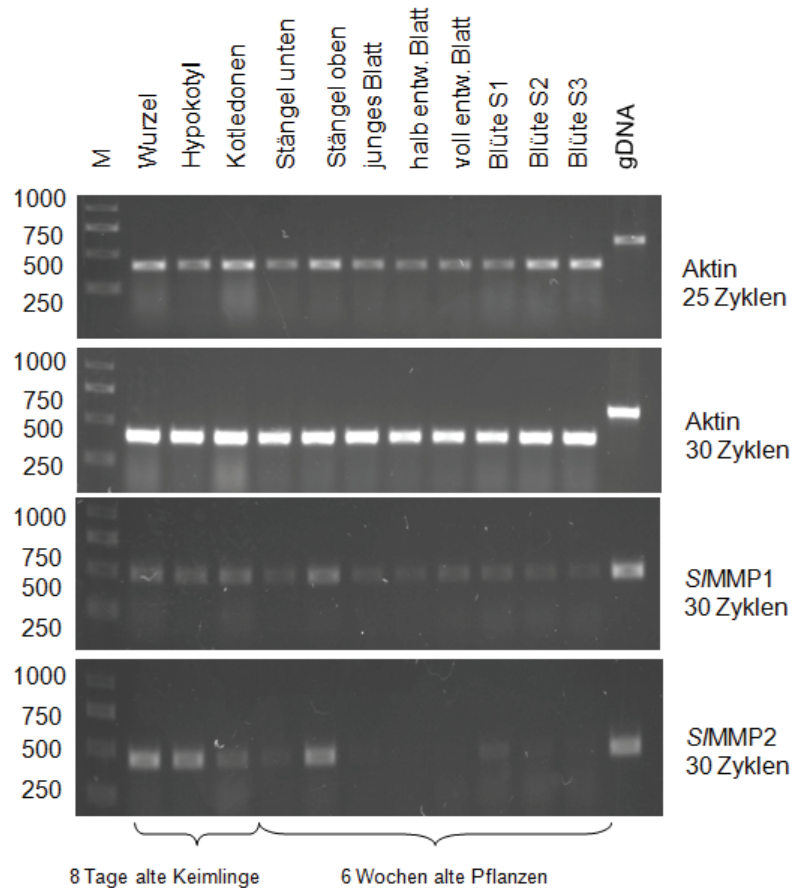


Abb. 3.10: Nachweis der Transkripte von *S/MMP1* und *S/MMP2* in verschiedenen Organen und Entwicklungsstufen von Keimlingen und adulten Wildtyp-Tomatenpflanzen durch RT-PCR. PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch im exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle der PCR, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Länge der Fragmente ist in bp angegeben.

3.5 Histochemische Lokalisation von *S/MMP1* und *S/MMP2* in Hypokotyl und Wurzel von *Solanum lycopersicon* (UC82b)

Um die Lokalisation von *S/MMP1* und *S/MMP2* *in vivo* zu bestimmen, kamen immunohistochemische Methoden zur Anwendung.

Wurzel und Hypokotyl Segmente von vier Wochen alten Tomatenpflanzen (UC82b) wurden in ein Kunstharz (Technovit 7100) eingebettet, und anschließend wurden Dünnschnitte (5 µm) am Mikrotom angefertigt. Zur Detektion von *S/MMP1* und *S/MMP2* kam ein Antiserum (anti-*S/MMP1*) zur Anwendung welches gegen die katalytische Domäne von *S/MMP1* gerichtet ist (Frick, 2002). Zur Visualisierung der Antikörper-

Antigen Bindung wurde ein zweiter Antikörper verwendet, welcher gegen die schwere Kette von Kaninchen IgG gerichtet ist. Da der sekundäre Antikörper mit einer Fluorophore ausgestattet ist, kann man bei Anregung mit einer geeigneten Wellenlänge eine rote Fluoreszenz beim Betrachten im Mikroskop erkennen, und dadurch Rückschlüsse über die Lokalisation der Antigen-Antikörper Bindung im Gewebe erhalten.

Western Blot Analysen ergaben (Abb. 3.6), dass der gegen *SIMMP1* gerichtete Antikörper auch zur Detektion von *SIMMP2* eingesetzt werden kann. Eine Unterscheidung der Enzyme ist auf diesen Weg jedoch nicht möglich.

Da die Applikation des Antiserums (Abb. 3.11 **A**) zu unspezifischen Antigen-Antikörperbindungen führte, welche auch nach Applikation des Präimmunserums (Abb. 3.11 **B**) beobachtet wurden, wurde die IgG-Fraktion mittels Protein A-Sepharose aus dem Antiserum gereinigt, bevor diese zur Detektion von *SIMMP1/2* eingesetzt wurde (Abb. 3.11 **E, F, G, H**). Um sicherzustellen, dass mit der gereinigten IgG-Fraktion, spezifisch *SIMMPs* detektiert werden, wurde aus einem IgG-Aliquot mittels einer HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) Säule, welche mit *SIMMP1*-Protein beladen wurde, spezifisch IgGs gerichtet gegen *SIMMP1* entfernt. Die von anti-*SIMMP1*-IgGs gereinigte IgG-Fraktion wurde bei Hypokotyl- (**C**) und Wurzel- (**D**) Querschnitte von Wildtyp-Pflanzen angewendet. Nach Anwendung der beschriebenen IgG-Fraktion konnten keine Signale detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass mit der unbehandelten IgG-Fraktion spezifisch *SIMMPs* detektiert werden. Die Resultate der Immunohistochemischen Untersuchungen von Hypokotylen vier Wochen alter Wildtyp-Pflanzen sind in Abbildung 3.11, **E, F**, dargestellt. Deutliche Fluoreszenzsignale sind in der Epidermis, in der subepidermalen Zellschicht und in Zellen des Kortex zu erkennen (Abb. 3.11 **E**). Bei stärkerer Vergrößerung kann man erkennen, dass die Signale in der Zellwand der erwähnten Zellbereiche lokalisiert sind (Abb. 3.11 **F**). In Wurzelpräparaten wurden *SIMMP1* und *SIMMP2* ebenfalls in Zellwänden von Rhizodermiszellen und Zellen des Kortex detektiert (Abb. 3.11 **G, H**).

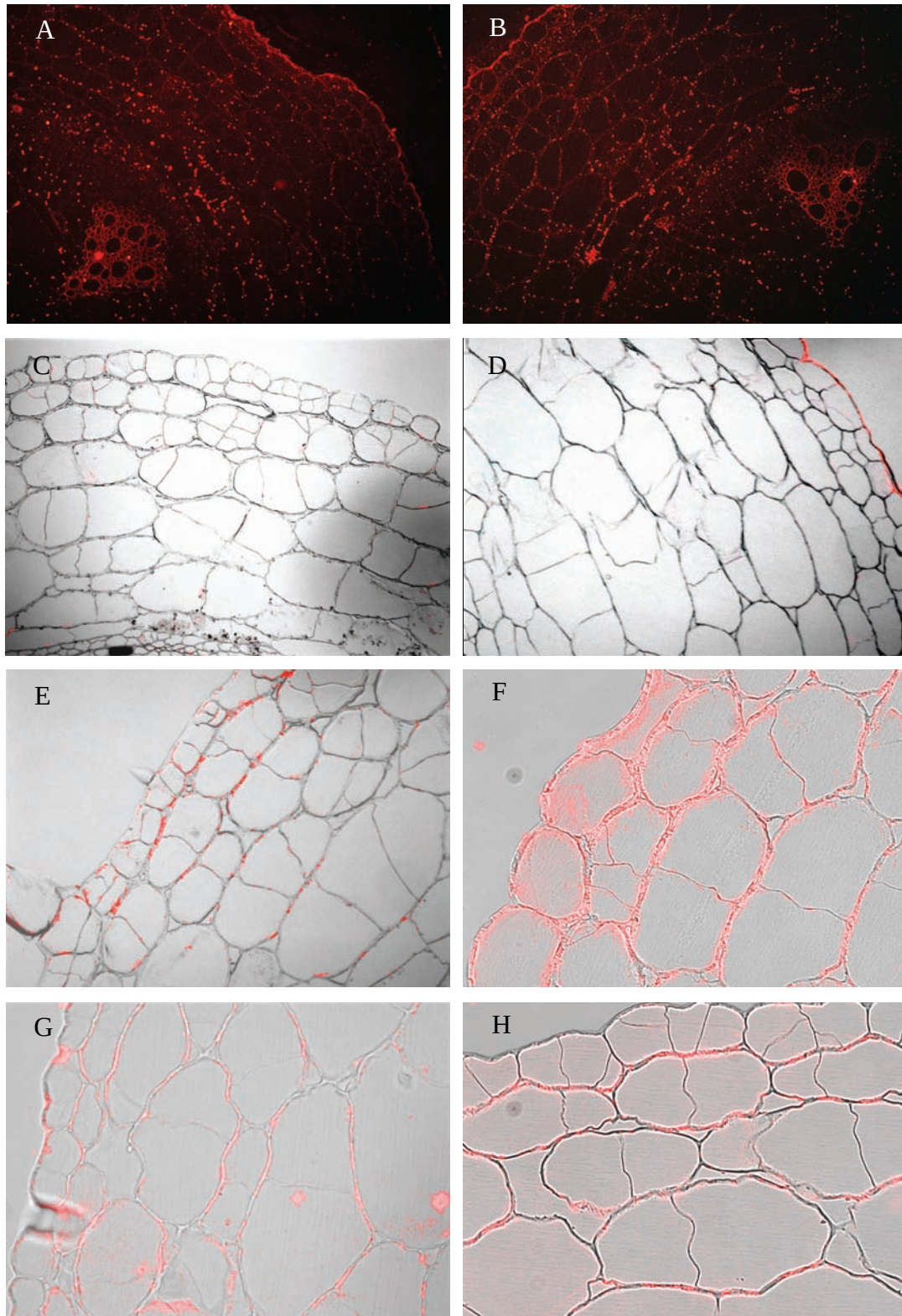


Abb. 3.11: Hypokotyl (A, B, C, E, F) und Wurzel-Querschnitte (D, G, H) in Kunstharz eingebetteter vier Wochen alter Tomatenpflanzen, nach Applikation von anti-S/MMP1-Serum(A), Präimmunsrum (B), IgG-Fraktion nach Entfernung von anti-S/MMP1-IgGs (C & D), nach der Immunodetektion von S/MMP1 und S/MMP2 mit Aufgereinigter IgG-Fraktion aus anti-S/MMP1-Serum (E, F, G, H). Die Querschnitte (5 μ m) wurden im Lichtmikroskop im Hellfeld betrachtet und im Fluoreszenzmikroskop nach Anregung mit UV-Licht (λ_{ex} = 550/25 nm, λ_{em} = 605/70 nm). Die dargestellten Bilder entstanden durch Überlagerung der Hellfeld- und Fluoreszenz-Bilder. Bilder A, B, C, D, E wurden mit einer 100 X Vergrößerung erstellt. Bilder F, G, H, wurden bei einer 200 X Vergrößerung erstellt. Aufnahme A und B wurden mit Axioskop 2 plus (Zeiss) erstellt. Bilder C-D mit Axio Imager Z.1 (Zeiss).

3.6 Charakterisierung von *SIMMP1*-RNA-Interferenz- (RNAi) Pflanzen

Zur funktionellen Charakterisierung von *SIMMP1* in *Solanum lycopersicum* wurden im Vorfeld dieser Arbeit von Elke Sieferer transgene Pflanzen erzeugt, welche ein Hairpin-Konstrukt zur Unterdrückung der *SIMMP1* Expression durch RNA-Interferenz (RNAi) (Wesley et al, 2001) tragen (Abb. 3.12).



Abb. 3.12: Schematische Darstellung des *SIMMP1*-RNAi-Konstrukts zur Herunterregulierung der *SIMMP1* Expression auf Transkriptebene. Das Konstrukt steht unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors aus dem Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV). Dem Promotor folgt die *SIMMP1* cDNA-Sequenz (450 bp) in sense und antisense Orientierung, welche durch ein Intron getrennt sind. Die Sequenz des Octopin-Synthase-Terminators (OCS) signalisiert das Ende der Transkription. Zusätzlich enthält das Konstrukt das *NPT II* Gen unter der Kontrolle des konstitutiven Nopalinsynthase (NOS)-Promotors und des NOS-Terminators.

Es stehen fünf transgene Linien zur Verfügung, die in der T₀-Generation mit HP1, HP2, HP3, HP4, HP5 bezeichnet wurden. Individuen der T₁-Generation wurden mit HP1 (2, 3, 4, 5) .x, und Individuen der T₂-Generation mit HP1 (2, 3, 4, 5) .xy, bezeichnet.

3.6.1 Identifizierung unabhängiger Transformanten mittels Southern Blot Analyse

Die *SIMMP1*-RNAi-Linien der T₁-Generation wurden mittels Southern Blot Analyse untersucht, um unabhängig transformierte Linien, sowie die Anzahl der T-DNA-Insertionen in den einzelnen Linien zu bestimmen. Dazu wurde die genomische DNA der einzelnen Linien mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut, elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Als Sonde wurde ein PCR-Fragment der *SIMMP1*-cDNA radioaktiv markiert. Als Kontrolle wurde genomische DNA des UC82b Wildtyps verwendet.

Abbildung 3.13 zeigt das Resultat der Southern Blot Analyse für die *SIMMP1*-RNAi-Linien. Für die Linien HP 2.9 und HP 5.4 zeigte sich ein ähnliches Integrationsmuster, was darauf hindeutet, dass diese Linien aus dem gleichen Transformationsereignis

hervorgegangen sind. Linie HP 4.5 konnte aufgrund des unterschiedlichen Bandenmusters als unabhängige Linie identifiziert werden. Die Linien 2.9 und 5.4 scheinen eine Kopie, die Linie 4.5 mindestens zwei Kopien des Konstruktes zu tragen. Southern Blot Analysen welche von Elke Sieferer durchgeführt wurden führten zu der Erkenntnis, dass die Linie HP 1 ebenfalls unabhängig ist (unveröffentlichte Daten).

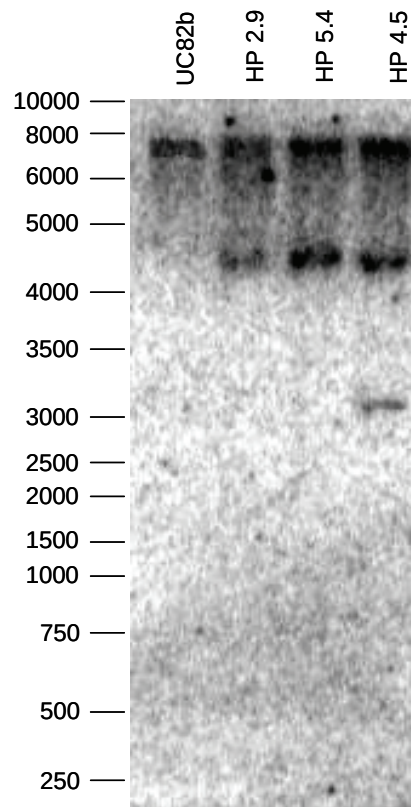


Abb. 3.13: Southern Blot Analyse der *SIMMP1*-RNAi-Linien. Je 10 µg genomischer DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten *SIMMP1*-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde genomische DNA von Wildtyp-Pflanzen (UC82b) verwendet. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas verwendet. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

3.6.2 RT-PCR-Analyse von *SIMMP1*-RNAi-Pflanzen

Die *SIMMP1*-RNAi-Linien, welche in Southern Blot Analysen als unabhängig identifiziert wurden, wurden dahingehend untersucht, ob die Transkriptmenge an *SIMMP1* durch das RNAi-Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Es wurde weiterhin untersucht, ob auch die Expression von *SIMMP2* betroffen ist, was aufgrund des hohen Maßes an Sequenzähnlichkeit (81 %) zu *SIMMP1* zu erwarten war. Hierfür wurde RNA aus

Hypokotyl und Blättern von 24 Tage alten Keimlingen der Linien HP 1.6, HP 2.9, HP 4.5 und UC82b (Wildtyp-Kontrolle) für eine RT-PCR-Analyse verwendet.

Die für die PCR verwendeten Primerpaare wurden so gewählt, dass sie spezifisch cDNA Fragmente von *SIMMP1* oder *SIMMP2* amplifizieren (siehe Anhang). Zur Abschätzung der Templatmenge und um zu überprüfen, ob die gewählte Zahl der PCR Zyklen noch im Bereich der exponentiellen Amplifikation lag, wurde eine PCR auf Aktin durchgeführt (Abb. 3.14). Man erkennt, dass die Konzentration des Aktintranskriptes in den acht untersuchten Proben ähnlich hoch ist. Der Vergleich mit der Kontrollreaktion (gDNA) zeigt, dass die untersuchten Proben frei von Kontaminationen mit genomischer DNA waren. Des Weiteren erkennt man in Abbildung 3.14, dass die Transkripte von *SIMMP1* und *SIMMP2* in Hypokotylen transgener Pflanzen nicht mehr detektierbar sind. In Blättern transgener Pflanzen zeigte sich eine deutliche Reduktion an *SIMMP1* und *SIMMP2* Transkripten im Vergleich zum Wildtyp. *SIMMP1* war jedoch in den RNAi-Linien HP 1.6 und HP 4.5 noch nachweisbar. Das erzielte Resultat verdeutlicht, dass aufgrund der Homologie von *SIMMP1* und *SIMMP2* ein vollständiges Silencing beider MMPs in Hypokotylen transgener Pflanzen, und ein partielles Silencing in Blättern erreicht wurde.

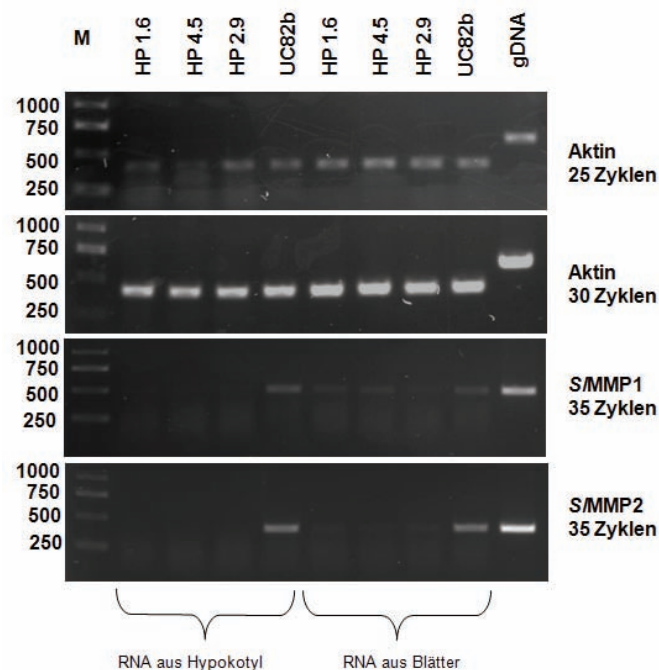


Abb. 3.14: Nachweis der Transkripte von *SIMMP1* und *SIMMP2* durch RT-PCR in Hypokotylen und Blättern von 24 Tage alten *SIMMP1*-RNAi- und Wildtyp Pflanzen. PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch im exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle der PCR, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) wurde die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas verwendet. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

3.6.3 cDNA-Mikroarray Expressionsanalyse in Hypokotylen von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Nachdem beobachtet wurde, dass die Transformation von Wildtyp-Tomatenpflanzen mit dem *S/MMP1*-RNAi-Konstrukt zu einer vollständigen Herunterregulierung von *S/MMP1/2* auf Transkriptebene in Hypokotylen führt (Abb. 3.14), und dies in einem sichtbaren Phänotyp resultiert (Kapitel 3.6.4), sollte nun unter Anwendung von Mikroarray Analysen untersucht werden, wie sich der Verlust von *S/MMP1/2* auf die Genexpression in Hypokotylen von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auswirkt. Für diesen Versuch wurden Pflanzen von drei unabhängigen (Kapitel 3.6.1) *S/MMP1/2*-RNAi-Linien (HP 2.9, HP 4.5, HP 1.6) verwendet, und mit UC82b-Pflanzen als Wildtyp-Kontrolle verglichen. Die Untersuchungen wurden an drei Wochen alten Hypokotylen durchgeführt.

Das verwendete cDNA-Mikroarray Tom1 wurde von der Tomato Functional Genomics Datenbank (<http://ted.bti.cornell.edu/>) bezogen und enthielt 13440 cDNA-Fragmente (expressed sequence tags, ESTs). Die verwendeten ESTs repräsentieren Gene die in verschiedenen pflanzlichen Organen, Geweben, Entwicklungsstadien usw., exprimiert werden. Dies erlaubt die Untersuchung eines großen Spektrums an Genexpressionsänderungen.

Zur Analyse wurde RNA aus 30-40 Hypokotylen von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen verwendet, welche revers transkribiert und mit Cy3-dCTP und Cy5-dCTP fluoreszenz-markiert wurde. Die markierten cDNA-Sonden wurden vereinigt und anschließend mit dem Mikroarray hybridisiert.

Insgesamt wurden sechs Mikroarrays hybridisiert, wobei in drei Fällen die RNA aus RNAi-Pflanzen mit Cy3-dCTP und die Wildtyp RNA mit Cy5-dCTP markiert wurde. Bei drei Mikroarrays wurde die RNA aus RNAi-Pflanzen mit Cy5-dCTP und die Wildtyp RNA mit Cy3-dCTP markiert (dye swap).

Die Auswertung der Mikroarrays erfolgte wie in (Kapitel 2.11) beschrieben. Als statistisch signifikant differentiell exprimiert wurden solche Gene betrachtet, die in mindestens drei Mikroarrays im Cy3 oder Cy5 Kanal eine mindestens zweifache erhöhte Signalintensität aufwiesen, und nach Durchführung eines one-sample t-test ein Signifikanzwert unter 0,05 ($p < 0,05$) aufwiesen.

Um die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse zu validieren, wurde die Expression einzelner differentiell exprimierter Gene durch semiquantitative RT-PCR überprüft. Eine in RNAi-

Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp induzierte Expression konnte für die Gene, Hin1 (Harpin inducible-like protein), ACS (1-Aminocyclopropan 1-Carboxylat Synthase), SBT3 (subtilisin-like protease), PR10 (Pathogenesis-related protein 10) und PR3a (Acidic 26 kDa endochitinase precursor) bestätigt werden (Abb. 3.15 A und B). Eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Expression konnte für das Gen PPI (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) durch RT-PCR bestätigt werden. Die Diskrepanz im Expressionsunterschied von Hin 1, der während der Mikroarrayanalysen viel kleiner war als in der RT-PCR, kommt vermutlich dadurch zustande, dass die dargestellten Werte für die Expressionsunterschiede den Mittelwert aus sechs Mikroarrays entspricht, während für die RT-PCR Analysen nur eine RNA-Probe verwendet wurde.

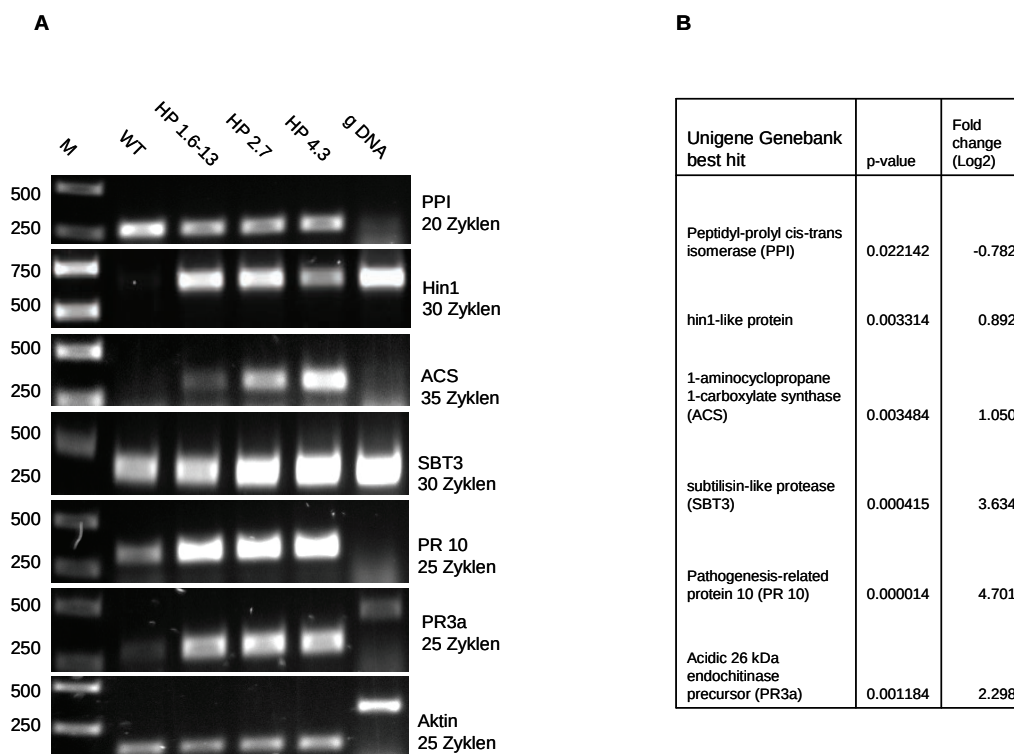


Abb. 3.15: RT-PCR Nachweis der Transkripte ausgewählter Gene, welche nach Mikroarray-Analysen, als signifikant differentiell reguliert identifiziert wurden (A). (B) Tabellarische Darstellung der untersuchten Gene, mit Angabe der statistischen Relevanz ($p < 0,05$) und der ermittelten Expressionsdifferenz (als Dyadischer Logarithmus). PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zykluszahl noch im exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle der PCR und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Länge der Fragmente ist in bp angegeben.

Des Weiteren wurden 522 Gene identifiziert, welche in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen differentiell reguliert sind. Davon waren 332 Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen stärker exprimiert, und 190 Gene waren schwächer exprimiert als in Wildtyp-Pflanzen (vollständige Liste im Anhang). Die Einteilung der identifizierten Gene nach ihrer Funktion in biologischen Prozessen erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben in 14 Gruppen, welche in Abbildung 3.16 dargestellt sind.

	A	B	C
other cellular processes	21,8	22,4	24,5
other metabolic processes	20,2	20,9	21,3
unknown biological processes	18,7	6	8,1
protein Metabolism	7,8	5,9	8,4
developmental processes	4,7	7,9	6,1
response to stress	4,6	9,4	7,1
response to abiotic or biotic stimulus	4,4	9	8,4
transport	4	2,3	1,9
other biological processes	3,7	5,4	3,2
transcription	3,4	3	3,2
cell organisation and biogenesis	2,7	2,8	3,2
signal transduction	2,1	2,7	2,9
electron transport or energy pathways	1,1	2	0,3
DNA or RNA metabolism	0,8	0,2	1,3

Abb. 3.16: Tabellarische Auflistung der in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen als differentiell reguliert identifizierten Gene, und deren Einteilung nach ihrer biologischen Funktion. **(A)** Anteil der Gene im *Arabidopsis thaliana* Genom in den verschiedenen Funktionsgruppen in % des Gesamtgenoms. **(B)** Anteile an differentiell hochregulierten Genen in %, von *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen. **(C)** Anteil an differentiell herunterregulierten Genen in %, von *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle

Spalte **A** zeigt den prozentualen Anteil an Genen im *Arabidopsis thaliana* Genom welche der jeweiligen Funktion zugeordnet werden. Spalte **B** zeigt den prozentualen Anteil an Genen dieser Funktionsgruppe, welche in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen stärker exprimiert sind als im Wildtyp. Spalte **C** zeigt den prozentualen Anteil an Genen dieser Funktionsgruppe, welche in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen schwächer exprimiert sind als im Wildtyp.

Auffällig erhöht war in den RNAi-Pflanzen der Anteil an Genen, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen, bei Stressreaktionen, bei Reaktionen auf abiotische und biotische Reize spielen und Gene die bei noch unbekannten biologischen Prozessen beteiligt sind. Der Anteil an Genen mit einer Funktion bei Transportvorgängen ist in RNAi-Pflanzen

deutlich erniedrigt (Abb. 3.16). Diese Beobachtung kann jedoch nur als Trend angesehen werden, da keine statistisch signifikante Überrepräsentation dieser Gene im Vergleich zur Verteilung im Genom vorliegt.

Der Anteil an Genen deren Rolle bei biologischen Prozessen noch unbekannt ist, liegt in *Arabidopsis thaliana* bei 18,7 %. Demgegenüber machten die unbekannten Gene, die in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen stärker exprimiert waren nur 6 %, die schwächer exprimierten Gene 8,1 % aus. Gene welche bei Entwicklungsprozessen in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind liegen bei ca. 4,7 %. Demgegenüber machten die in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen stärker exprimierten Gene 7,9 %, die schwächer exprimierten Gene 6,1 % aus. Der Anteil an Genen welche eine Rolle bei der pflanzlichen Stressantwort, und als Reaktion auf biotische und abiotische Reize spielen ist in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen weitaus größer als im *Arabidopsis thaliana* Genom. In *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen beträgt der Anteil an stärker exprimierten Genen 9,4 %, und der der schwächer exprimierten Gene 7,1 %. Demgegenüber liegt der prozentuale Anteil im *Arabidopsis thaliana* Genom bei 4,7 %. Gene die in Reaktion auf biotische und abiotische Reize eine Rolle spielen sind mit einem Anteil von 9 % als stärker exprimiert und mit 8,4 % als schwächer exprimiert identifiziert worden, wobei diese im *Arabidopsis thaliana* Genom diese nur mit 4,4 % vertreten sind. Gene welche eine Rolle bei Transportvorgängen eine Rolle spielen sind im *Arabidopsis thaliana* Genom mit einem Anteil von 4 % vertreten. In *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen liegt der Anteil an stärker exprimierten Genen bei nur 2,3 % und der der schwächer exprimierten Gene bei nur 1,9 % (Abb 3.16). In den folgenden Tabellen, sind die als signifikant differentiell reguliert identifizierten Gene der erwähnten Gruppen aufgelistet.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A).	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
embryo defective 1075	AT1G43710	SGN-U212595	0.016509	0.837
ATNUC-L1	AT1G48920	SGN-U213956	0.000461	2.898
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
Encodes a phosphatidylinositol 3-kinase	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
AGAMOUS-LIKE 7	AT1G69120	SGN-U227986	0.000392	1.546
ARABIDOPSIS NAC DOMAIN PROTEIN 029	AT1G69490	SGN-U213218	0.000664	1.131

ERGEBNISSE

Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein.	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
GLABRA 2	AT1G79840	SGN-U222383	0.000056	4.978
Encodes a novel Myc-related bHLH transcription factor	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2	AT3G15510	SGN-U214595	0.000041	3.220
EMBRYO DEFECTIVE 2736	AT3G19980	SGN-U214117	0.003584	1.061
rcd1-like cell differentiation protein	AT3G20800	SGN-U213952	0.000268	1.390
GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
Arabidopsis thaliana GRF1-interacting factor 3	AT4G00850	SGN-U218846	0.000002	4.370
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
embryo sac development arrest 9 (EDA9);	AT4G34200	SGN-U224282	0.000075	1.166
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
chalcone and stilbene synthase family protein	AT4G34850	SGN-U219061	0.004019	1.004
Member of Actin gene family	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
DELTA(3,5),DELTA(2,4)-DIENOYL-COA ISOMERASE 1	AT5G43280	SGN-U217048	0.000010	7.438
CLP PROTEASE P4	AT5G45390	SGN-U215977	0.002820	1.781
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
EMBRYO DEFECTIVE 2755	AT5G56680	SGN-U215530	0.000900	1.266
AGL62 encodes a Type I MADS domain protein	AT5G60440	SGN-U230865	0.000346	3.636
EMBRYO DEFECTIVE 2759	AT5G63050	SGN-U220964	0.000026	3.494
SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8	AT1G02065	SGN-U222319	0.016281	-0.982
embryo defective 2004 (emb2004);	AT1G10510	SGN-U218268	0.017255	-0.902
ACTIN-RELATED PROTEIN 3	AT1G13180	SGN-U221039	0.020812	-1.005
Encodes a sterol-C24-methyltransferases involved in sterol biosynthesis	AT1G20330	SGN-U215017	0.007538	-1.078
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.17	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
encodes a RING-type E3 ubiquitin ligase implicated in gametogenesis	AT5G22000	SGN-U223542	0.028022	-0.673

ERGEBNISSE

ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
MADS box gene negatively regulated by APETALA1	AT5G60910	SGN-U213659	0.000270	-0.979

Tabelle 1:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit einer Funktion während Entwicklungsprozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene. Rot markiert sind Gene, welche eine Rolle während Zelltod Ereignissen zugesprochen wird, oder die zumindest damit assoziiert sind.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3- PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
Encodes a homolog of the potato p24 protein.	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699
major latex protein-related / MLP-related/ PR-10 (Solanum virrinianum)	AT1G14930	SGN-U212989	0.000014	4.701
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
VACUOLAR PROTEIN SORTING 34/ PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
binding / catalytic/ coenzyme binding;	AT2G20360	SGN-U215902	0.001405	2.676
ENOLASE 2	AT2G36530	SGN-U212825	0.000493	1.340
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
ARABIDOPSIS THALIANA REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1	AT3G02230	SGN-U219866	0.000001	7.510
ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE/ viroid-RNA binding Protein	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 13	AT3G46530	SGN-U223601	0.000118	1.786
disease resistance protein (CC-NBS class)	AT3G46730	SGN-U223030	0.000118	1.786
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)	AT3G50950	SGN-U216073	0.000217	4.648
SALT- AND DROUGHT-INDUCED RING FINGER1	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
ARABIDOPSIS ALLANTOINASE	AT4G04955	SGN-U214730	0.009670	0.764
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881

ERGEBNISSE

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
C-REPEAT BINDING FACTOR 3	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2	AT5G01220	SGN-U217927	0.035459	0.636
malate dehydrogenase / response to cadmium ion	AT1G04410	SGN-U212714	0.000646	-1.152
INVOLVED IN: response to oxidative stress; LOCATED IN: plasma membrane;	AT1G14870	SGN-U215423	0.001143	-1.453
ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
COLD REGULATED 314 THYLAKOID MEMBRANE 2	AT1G29390	SGN-U219974	0.000142	-1.353
molecular function has not been defined. Was shown involved in oxidative stress tolerance	AT1G49670	SGN-U215908	0.008697	-0.894
Encodes gene that is induced in response to dessication	AT2G21620	SGN-U214986	0.018209	-1.177
ferritin 2 (ATFER2);	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1	AT3G17510	SGN-U214714	0.002467	-1.168
DEAD-box protein required for efficient group II intron splicing in mitochondria.	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
PLANT U-BOX 22 involved in the response to water stress	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
ARABIDOPSIS THALIANA PHLOEM PROTEIN 2-A13	AT3G61060	SGN-U219433	0.049000	-1.142
osmotin-like protein	AT4G11650	SGN-U212928	0.005845	-2.208
ARABIDOPSIS THALIANA PLASMA-MEMBRANE ASSOCIATED CATION-BINDING PROTEIN 1	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
Encodes a plasma membrane protein with leucine-rich repeat / RGC2 resistance protein	AT4G26090	SGN-U218882	0.009125	-0.960
REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
Transcription factor of the B-ZIP family that has high affinity for C-box motifs / AHBP-1B	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990
ARABIDOPSIS THALIANA MEMBRANE-ASSOCIATED MANNITOL-INDUCED	AT5G54110	SGN-U219162	0.045396	-0.772
4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 2:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit einer Funktion während der pflanzlichen Stressantwort. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene. Rot markiert sind Gene, welchen eine Rolle während Zelltod Ereignissen zugesprochen wird, oder die zumindest damit assoziiert sind.

ERGEBNISSE

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
major latex protein-related / MLP-related/ PR-10 (Solanum virrinianum)	AT1G14930	SGN-U212989	0.000014	4.701
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
VACUOLAR PROTEIN SORTING 34/PHOSPATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
binding / catalytic/ coenzyme binding;	AT2G20360	SGN-U215902	0.001405	2.676
ENOLASE 2	AT2G36530	SGN-U212825	0.000493	1.340
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
ARABIDOPSIS THALIANA REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1	AT3G02230	SGN-U219866	0.000001	7.510
ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 13	AT3G46530	SGN-U223601	0.000118	1.786
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
SALT- AND DROUGHT-INDUCED RING FINGER1	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
ARABIDOPSIS THALIANA PURINE PERMEASE 10	AT4G18210	SGN-U213547	0.000004	6.535
C-REPEAT BINDING FACTOR 3	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
NDR1/HIN1-LIKE 3	AT5G06320	SGN-U213159	0.003314	0.892
ACTIN 2 / ACTIN 7	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor.	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN	AT5G20230	SGN-U213376	0.000038	2.722
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212618	0.019149	1.352
MBG8.3 / THIAMINE4 / THIAZOLE REQUIRING	AT5G54770	SGN-U212885	0.000011	2.601

ERGEBNISSE

a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
malate dehydrogenase / response to cadmium ion	AT1G04410	SGN-U212714	0.000646	-1.152
PHOTOLYASE 1 / UV RESISTANCE 2	AT1G12370	SGN-U225151	0.036946	-0.781
ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
Encodes gene that is induced in response to dessication	AT2G21620	SGN-U214986	0.018209	-1.177
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 3 / CIPK3	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836
ARABIDOPSIS THALIANA PHYTOCYSTATIN 6	AT3G12490	SGN-U213642	0.023298	-1.004
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1	AT3G17510	SGN-U214714	0.002467	-1.168
DEAD-box protein required for efficient group II intron splicing in mitochondria.	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
PLANT U-BOX 22 involved in the response to water stress	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5	AT4G10340	SGN-U212697	0.004804	-1.818
osmotin-like protein	AT4G11650	SGN-U212928	0.005845	-2.208
ARABIDOPSIS THALIANA PLASMA-MEMBRANE ASSOCIATED CATION-BINDING PROTEIN 1	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
Encodes a plasma membrane protein with leucine-rich repeat / RGC2 resistance protein	AT4G26090	SGN-U218882	0.009125	-0.960
REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
Transcription factor of the B-ZIP family that has high affinity for C-box motifs / AHBP-1B	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION 101	AT5G18070	SGN-U225989	0.013884	-1.110
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990
ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO	AT5G38410	SGN-U225521	0.000145	-1.169
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
MATE efflux protein-related; FUNCTIONS IN: antiporter activity, drug transporter	AT5G52450	SGN-U223514	0.024989	-0.691
ARABIDOPSIS THALIANA MEMBRANE-ASSOCIATED MANNITOL-INDUCED	AT5G54110	SGN-U219162	0.045396	-0.772
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 3:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit einer Funktion während der Reaktion auf biotische und abiotische Reize. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene. Rot markiert sind Gene, welchen eine Rolle während Zelltod Ereignissen zugesprochen wird, oder die zumindest damit assoziiert sind.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Ran-binding protein 1 domain-containing protein / RanBP1	AT1G52380	SGN-U217017	0.000038	5.419
Encodes a phosphatidylinositol 3-kinase	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	AT1G72160	SGN-U215321	0.008078	1.723
kinesin motor family protein; FUNCTIONS IN: microtubule motor activity	AT2G21300	SGN-U219620	0.022480	0.774
Subunit G of the vacuolar membrane ATPase complex	AT3G01390	SGN-U216066	0.000121	1.183
sugar transporter, putative;	AT3G05400	SGN-U215867	0.000224	0.998
cell wall-plasma membrane linker protein homolog (CWLP)	AT3G22120	SGN-U213316	0.007027	1.284
adaplin family protein	AT3G55480	SGN-U223942	0.000007	6.095
RMA1	AT4G03510	SGN-U217185	0.000319	1.294
ARABIDOPSIS THALIANA PURINE PERMEASE 10	AT4G18210	SGN-U213547	0.000004	6.535
bile acid:sodium symporter family protein	AT4G22840	SGN-U220184	0.030708	1.608
PRENYLATED RAB ACCEPTOR 1.H	AT4G27540	SGN-U219117	0.019843	1.840
Al-stress-induced gene	AT5G20230	SGN-U213376	0.000038	2.722
Encodes a tonoplast malate/fumarate transporter / ATSDAT	AT5G47560	SGN-U224652	0.000008	1.181
ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3 (Vacuole)	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
ras-related small GTPase	AT1G43890	SGN-U220375	0.018881	-1.194
endomembrane protein 70, putative; INVOLVED IN: transport;	AT2G01970	SGN-U234576	0.002267	-1.056
heavy-metal-associated domain-containing protein	AT3G07600	SGN-U217738	0.012576	-0.958
ferritin 2 (ATFER2);	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096
PEROXIN4 / UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21	AT5G25760	SGN-U216051	0.002541	-1.315

Tabelle 4:

In SIMMP1/2-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte mit einer Funktion während Transportvorgängen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene. Rot markiert sind Gene, welchen eine Rolle während Zelltod Ereignissen zugesprochen wird, oder zumindest damit assoziiert sind. Braun markiert sind Gene, welchen eine Rolle als Tonoplast-Transporter zugesprochen wird

ERGEBNISSE

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
unknown protein	AT1G02475	SGN-U215613	0.043491	1.674
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	AT1G04140	SGN-U219841	0.000646	1.195
glycinamide ribonucleotide synthetase (GAR synthetase)	AT1G09830	SGN-U222585	0.013468	0.993
armadillo/beta-catenin repeat family protein	AT1G23180	SGN-U222376	0.002791	0.909
zinc-binding protein, putative / protein kinase C inhibitor	AT1G31160	SGN-U217019	0.018815	0.844
defective chloroplasts and leaves protein-related / DCL protein-related	AT1G45230	SGN-U216326	0.012102	0.920
PLASTID-SPECIFIC RIBOSOMAL PROTEIN 4	AT2G38140	SGN-U217679	0.025239	2.324
encodes a chloroplast pyruvate kinase alpha subunit	AT3G22960	SGN-U218288	0.000023	3.252
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 KDA	AT3G63140	SGN-U214810	0.001157	1.330
Encodes the chloroplast ATPase delta-subunit.	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
DEAD/DEAH box helicase	AT4G09730	SGN-U224643	0.002261	0.818
CLP PROTEASE P4	AT5G45390	SGN-U215977	0.002820	1.781
aldo/keto reductase family protein; FUNCTIONS IN: oxidoreductase activity	At1g06690.1	SGN-U212944	0.002351	-1.374
PHOSPHORIBOSYLANTHRANILATE ISOMERASE 1	AT1G07780	SGN-U215559	0.026020	-0.772
Encodes a plastid-localized arogenate dehydratase involved in phenylalanine biosynthesis	AT1G08250	SGN-U215754	0.002007	-1.235
COLD REGULATED 314 THYLAKOID MEMBRANE 2	AT1G29390	SGN-U219974	0.000142	-1.353
membrane protein, putative; LOCATED IN: chloroplast	AT1G32080	SGN-U214105	0.038226	-0.781
defective chloroplasts and leaves protein-related / DCL	AT1G45230	SGN-U216326	0.000317	-1.205
Encodes subunit NDH-O of NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex	At1g74880	SGN-U218728	0.000870	-1.014
LOCATED IN: chloroplast	AT2G37240	SGN-U218930	0.000317	-1.068
PSBP-LIKE PROTEIN 2	AT2G39470	SGN-U216850	0.000307	-1.315
ribose-phosphate pyrophosphokinase	AT2G44530	SGN-U242882	0.000002	-2.125
ferritin 2 (ATFER2);	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096
PIGMENT DEFECTIVE 322	AT3G52380	SGN-U217513	0.002467	-1.140
LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5	AT4G10340	SGN-U212697	0.004804	-1.818
PHYTOENE DESATURASE	AT4G14210	SGN-U219813	0.000079	-1.356
enhancer of sos3-1 (ENH1);	AT5G17170	SGN-U217099	0.046633	-0.811

ERGEBNISSE

ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO small subunit 3B	AT5G38410	SGN-U225521	0.000145	-1.169
4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 5:

In *SMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit einer Funktion während der Photosynthese und/oder einer Lokalisation im Chloroplasten. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
unknown protein	AT1G02475	SGN-U215613	0.043491	1.674
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	AT1G04140	SGN-U219841	0.000646	1.195
eukaryotic translation initiation factor-related	AT1G11480	SGN-U219227	0.000547	1.615
biological_process unknown;	AT1G12450	SGN-U218106	0.000006	5.031
biological_process unknown	AT1G17400	SGN-U223449	0.004979	1.729
biological_process unknown	AT1G19990	SGN-U219789	0.000024	3.017
senescence-associated protein-related	AT1G22160	SGN-U215002	0.000673	1.630
armadillo/beta-catenin repeat family protein	AT1G23180	SGN-U222376	0.002791	0.909
zinc-binding protein, putative / protein kinase C inhibitor	AT1G31160	SGN-U217019	0.018815	0.844
defective chloroplasts and leaves protein-related / DCL	AT1G45230	SGN-U216326	0.012102	0.920
IQ-domain 29 (IQD29) / calmodulin binding	AT2G02790	SGN-U227058	0.000003	6.181
unknown protein;	AT2G18245	SGN-U220682	0.000000	3.445
zinc finger (CCCH-type) family protein	AT2G20280	SGN-U220746	0.002948	1.794
LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 3 (LSH3);	AT2G31160	SGN-U223319	0.007213	0.830
dehydration-responsive family protein	AT2G39750	SGN-U225319	0.042837	0.651
flavodoxin family protein	AT3G02280	SGN-U223144	0.000024	4.402
unknown protein	AT3G11760	SGN-U216544	0.000134	1.607
transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein	AT3G20810	SGN-U218045	0.005874	1.043
unknown protein	AT3G25805	SGN-U223537	0.000433	1.295
putative cytochrome P450	AT3G26320	SGN-U217910	0.000055	2.002
enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectinesterase inhibitor	AT3G47670	SGN-U223698	0.031804	0.795
thioesterase family protein	AT3G61200	SGN-U214231	0.000069	2.932
unknown protein	AT4G09830	SGN-U218285	0.000071	4.470

ERGEBNISSE

PHD finger protein-related	AT4G23860	SGN-U224223	0.000084	1.352
pectate lyase family protein	AT4G24780	SGN-U212774	0.000053	4.092
integral membrane family protein	AT4G27870	SGN-U217403	0.000441	2.911
unknown protein	AT4G39630	SGN-U216813	0.024364	3.241
PURPLE ACID PHOSPHATASE 26	AT5G34850	SGN-U217205	0.002169	1.152
unknown protein	AT5G39890	SGN-U215475	0.008968	1.631
F-box family protein	AT5G49610	SGN-U224878	0.003869	1.306
SKIP1 (INTERACTING PARTNER 1)	AT5G57900	SGN-U222097	0.021978	1.146
dehydration-responsive protein-related	AT5G64030	SGN-U226939	0.013226	1.193
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	AT5G65660	SGN-U217499	0.000377	3.082
lesion inducing protein-related	AT1G04340	SGN-U218940	0.012857	-0.802
calcium-binding EF hand family pro	AT1G05150	SGN-U220523	0.025425	-0.896
unknown protein	AT1G15860	SGN-U221100	0.000472	-1.568
trypsin and protease inhibitor family protein	AT1G17860	SGN-U214645	0.022474	-0.791
JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8	AT1G30135	SGN-U220299	0.049161	-0.697
permease-related	AT1G34470	SGN-U222726	0.008584	-1.528
defective chloroplasts and leaves protein-related	AT1G45230	SGN-U216326	0.000317	-1.205
unknown protein	AT1G71940	SGN-U220874	0.000297	-1.624
unknown protein	AT1G73130	SGN-U217579	0.003653	-0.806
dienelactone hydrolase family protein	AT2G32520	SGN-U215917	0.034020	-0.909
unknown protein	AT2G33390	SGN-U218508	0.026312	-0.789
unknown protein	AT2G37240	SGN-U218930	0.000317	-1.068
unknown protein	AT2G42760	SGN-U221474	0.000933	-2.454
pathogenesis-related protein, putative	AT3G19690	SGN-U214259	0.004779	-1.191
OTU-like cysteine protease family protein	AT3G22260	SGN-U217039	0.021378	-1.164
unknown protein	AT3G50370	SGN-U217710	0.000002	-1.361
unknown protein	AT4G02550	SGN-U229966	0.018881	-1.194
unknown protein	AT4G24310	SGN-U219115	0.010954	-1.424
unknown protein	AT5G28910	SGN-U214855	0.012100	-1.181
unknown protein;	AT5G28960	SGN-U214854	0.012100	-1.181

unknown protein	AT5G53220	SGN-U222258	0.049216	-0.869
-----------------	---------------------------	-----------------------------	----------	--------

Tabelle 6:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen Differenziell regulierte Gene mit einer unbekannten biologischen Funktion. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

Es konnten in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen eine Reihe an Genen als herunterreguliert identifiziert werden, welchen eine Rolle während der Photosynthese zugesprochen wird, oder in Chloroplasten lokalisiert sind (Tabelle 5). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Photosyntheseaktivität in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen beeinträchtigt sein könnte.

Es wurden auch eine Reihe an Genen identifiziert, welchen eine Rolle bei Transportvorgängen zugesprochen wird (Tabelle 4). Darunter befanden sich auch Gene, welche für Tonoplast-Transporter kodieren (Tabelle 4, Braun). Eine Vielzahl an Genen welche differenziell reguliert in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen sind, wird eine Rolle während Zelltod Ereignissen zugesprochen, oder sind mit diesen assoziiert (Tabelle 2-6, Rot).

3.6.4 Phänotypische Charakterisierung von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen

Samen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigen keine Defekte in der Keimung im Vergleich zum Wildtyp. Ebenso entwickeln sich *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen bis zwei Wochen nach der Keimung ohne besondere Merkmale. Zwei Wochen nach der Keimung, zeigen *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen einen starken Phänotyp, der durch die Ausbildung dunkler, nekrotisch aussehender Flecken am Hypokotyl gekennzeichnet ist (Abb.3.17).



Abb. 3.17: Zwei Wochen alte Keimlinge. Am Hypokotyl von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (**B**) sind deutlich dunkle, nekrotisch aussehende Flecken zu erkennen, im Vergleich zum Wildtyp (**A**).

Diese „Flecken“ überziehen mit fortschreitendem Alter und Entwicklungszustand das gesamte Hypokotyl und den Stängel, und breiten sich über die Blattstiele bis auf die Blätter aus. Einhergehend kommt es zum Verlust der Trichome an Hypokotyl und Stängel.

Ebenso kommt es zum vorzeitigen Absterben und schließlich zum Abwurf der Kotyledonen (Abb. 3.17, B) und in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen, die älter als acht Wochen sind auch der ältesten Fiederblätter (Abb. 3.18, B).

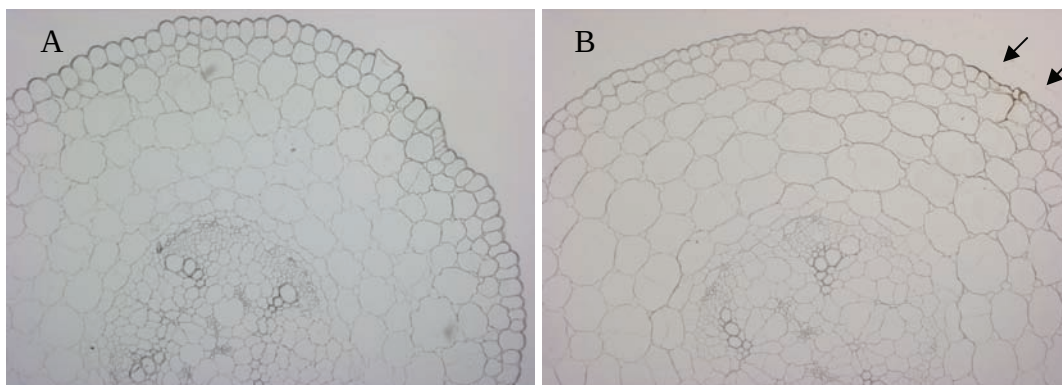


Abb. 3.18: Stängel von acht Wochen alten Pflanzen. **A:** Wildtyp, **B:** *SIMMP1/2*-RNAi. Der gesamte Stängel von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen ist von Nekrosen betroffen. Es kommt zum Verlust der Blätter und zum Austreiben der Seitenknospen.

3.6.5 Histologische Analyse von Hypokotylen zwei Wochen alter *S/MMP1/2-RNAi*-und Wildtyp-Pflanzen

Wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben, entwickeln *S/MMP1/2-RNAi*-Pflanze einen sehr ausgeprägten Phänotyp im Hypokotyl, der bereits in frühen Entwicklungsstadien erkennbar ist. Zur genaueren Untersuchung des sichtbaren Phänotyps, wurden Hypokotyl Segmente nach der in Material und Methoden beschriebenen Methode in Technovit 7100 eingebettet, am Rotationsmikrotom geschnitten, und mikroskopisch untersucht.

Abbildung 3.19 **A** zeigt den Querschnitt durch das Hypokotyl einer zwei Wochen alten Tomatenpflanze des Wildtyps (UC82b). Gut zu erkennen ist der radiale Aufbau des Hypokotyls, bestehend aus einer einschichtigen Epidermis, mit aufgelagerter Kutikula, einer einzelligen subepidermalen Zellschicht, und dem kortikalen Gewebe. Das sekundäre Xylem bildet noch keinen geschlossenen Zylinder, und die Leitbündel bilden einen konzentrischen Ring um den Sprossmittelpunkt. Zwei Wochen alte *S/MMP1/2-RNAi*-Pflanzen (Abb. 3.19 **B**) sind anatomisch identisch aufgebaut wie der Wildtyp. Unterschiede zum Wildtyp sind in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht zu erkennen. Die Epidermis von *S/MMP1/2-RNAi*-Pflanzen scheint stellenweise zu degenerieren, und es erfolgt die Einlagerung von Sekundärmetaboliten in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht (Abb. 3.19 **B**, **C**, **D**). Färben der Präparate mit Toluidin Blau (Abb. 3.19 **E**, **F**) und Anilinblau (Abb. 3.19 **G**, **H**) ergab, dass *S/MMP1/2-RNAi*-Pflanzen, phenolische Substanzen und Kallose in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht akkumulieren (Abb. 3.19 **F**, **H**).



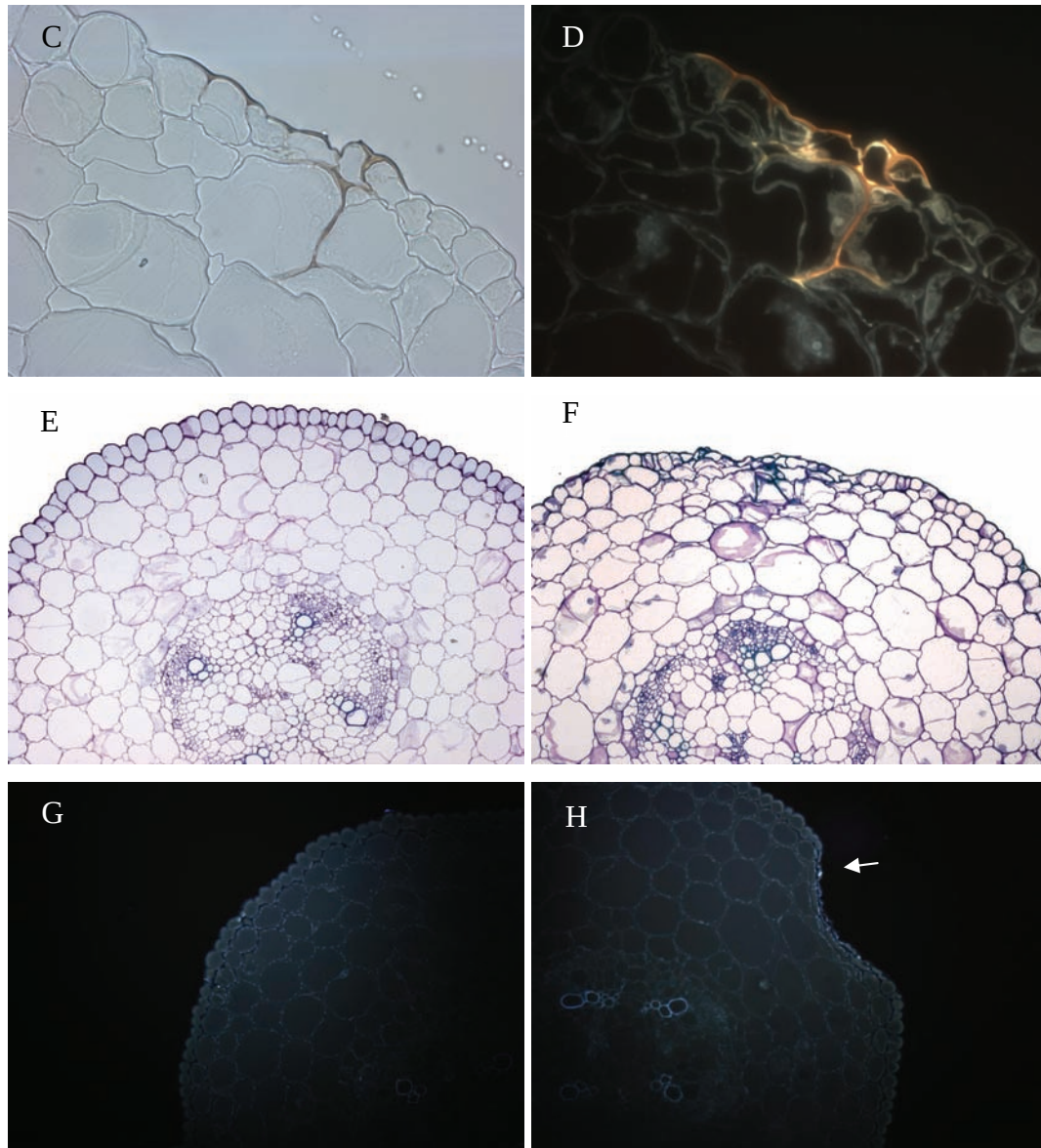


Abb. 3.19: Querschnitte von zwei Wochen alten, in Kunstharz eingebetteten Hypokotylsegmenten (ca. 0,5 cm oberhalb des Wurzelansatzes). (A) UC82b im Hellfeld betrachtet (B) *S/MMP1/2-RNAi* in Hellfeld betrachtet. (C) *S/MMP1/2-RNAi* in Hellfeld. (D) *S/MMP1/2-RNAi* unter UV-Licht ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 395-420 \text{ nm}$). (E) UC82b Toluidin Blau gefärbt. (F) *S/MMP1/2-RNAi* Toluidin Blau gefärbt. (G) UC82b Anilinblau gefärbt, unter UV-Licht (Filterset 02). (H) *S/MMP1/2-RNAi* Anilinblau gefärbt, unter UV-Licht ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 395-420 \text{ nm}$). Alle Aufnahmen wurden mit dem Axioskop 2 plus (Zeiss) bei einer Vergrößerung von 100 x erstellt, abgesehen von C & D (400 x).

3.6.6 Histochemische Lokalisation von *S/MMP1* und *S/MMP2* in Hypokotylen von zwei Wochen alten UC82b-Pflanzen

Wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben, erscheinen die ersten Effekte verursacht durch die Herunterregulierung von *S/MMP1/2* in den Epidermiszellen des Hypokotyls. Durch

Anwendung immunohistochemischer Methoden sollte untersucht werden, ob das Auftreten der phänotypischen Veränderungen mit der Lokalisation von *SIMMP1/2* in den Epidermiszellen zwei Wochen alter Wildtyp-Pflanzen korreliert. Während dieses Entwicklungsstadiums konnte *SIMMP1/2* in den Zellwänden der Epidermiszellen und in den Zellwänden der subepidermalen Zellschicht nachgewiesen werden (Abb. 3.20).

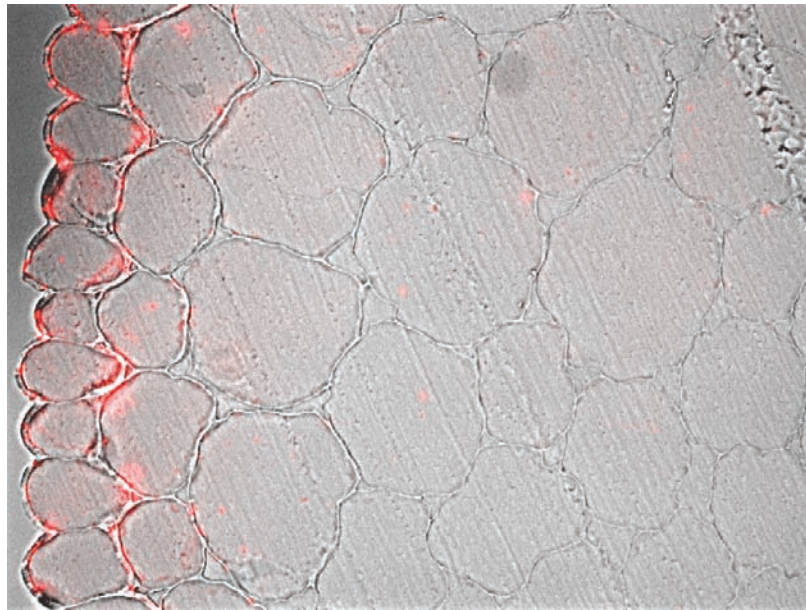


Abb. 3.20: Hypokotyl Querschnitt von in Kunstharz eingebetteten zwei Wochen alten Wildtyp-Pflanzen nach Applikation von anti-*SIMMP1*-IgGs. Der Querschnitt wurde im Mikroskop (Axio Imager Z.1, Zeiss) im Hellfeld betrachtet und nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda_{ex} = 550/25 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605/70 \text{ nm}$). Das dargestellte Bild entstand durch Überlagerung von Hellfeld und Fluoreszenz-Bild. Die Aufnahme wurde bei einer 100 X Vergrößerung erstellt.

3.6.7 Histologische Analyse von Hypokotylen und Stängeln vier Wochen alter *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp- Pflanzen

Mit fortschreitender Entwicklung von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigen sich immer massivere Veränderungen im pflanzlichen Gewebe. Vier Wochen nach der Keimung, haben sich die Veränderungen im Gewebe über den Stängel ausgebreitet, was mit dem Verlust ganzer Organe verbunden ist (Abb. 3.18).

Zur genaueren Untersuchung der sichtbaren Veränderungen in älteren Stängeln wurden Handschnitte angefertigt, und diese nach Anregung mit UV-Licht (Anregung bei 365 nm) auf Unterschiede in der Autofluoreszenz hin untersucht. In Abbildung 3.21 sind die Resultate dieser Untersuchungen zu sehen. Sehr deutlich zu erkennen sind massive

Veränderungen in der Epidermis und in den subepidermalen Zellschichten von *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen (Abb.3.21 **B**). Die Epidermis ist nicht mehr als eine einzelne Zellschicht zu erkennen und erscheint degeneriert. Deutlich ist ebenfalls die unphysiologische Akkumulation an phenolischen Substanzen in den subepidermalen Zellschichten zu erkennen, welche nach Anregung mit UV-Licht Hellblau erscheinen. Auffällig ist in Wildtyp-Hypokotylen die hohe Autofluoreszenz von Chloroplasten in der Epidermis und in den subepidermalen Zellschichten (Abb. 3.21 **A**). In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen scheint die Anzahl an Chloroplasten geringer als im Wildtyp, und die Chloroplasten scheinen nur im kortikalen Gewebe lokalisiert zu sein.

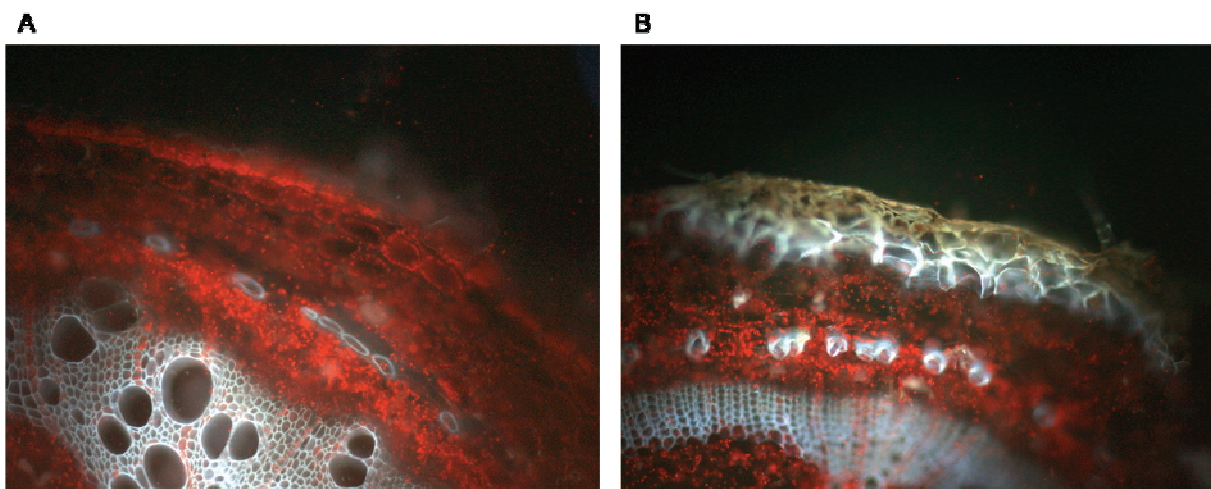


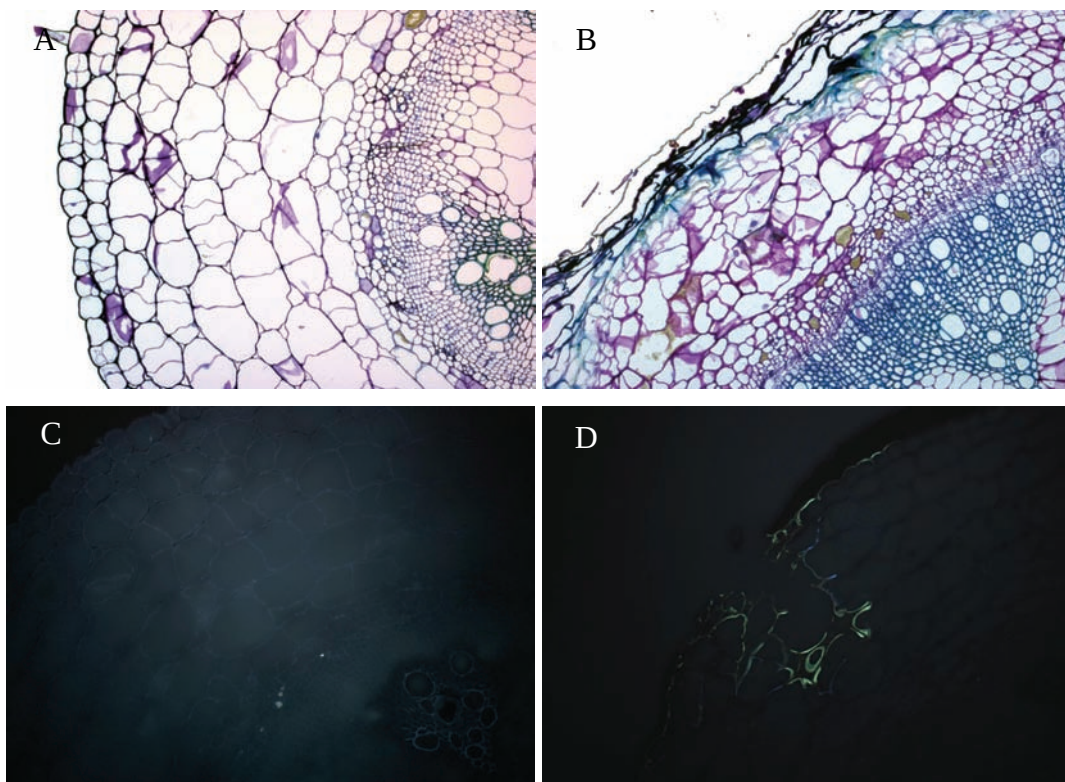
Abb. 3.21: Autofluoreszenz ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 395\text{-}420 \text{ nm}$) von vier Wochen alte Hypokotyl-Querschnitte aus (**A**) Wildtyp und (**B**) *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanze. Betrachtet im Axioskop 2 Plus, Zeiss bei 200x Vergrößerung.

Zur genaueren Charakterisierung des sichtbaren Phänotyps, wurden Querschnitte von vier Wochen alten *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Hypokotylen am Mikrotom angefertigt, und unter Anwendung verschiedener Färbemethoden untersucht.

Abbildung 3.22 zeigt Hypokotyl und Stängel- Querschnitte von vier Wochen alten Wildtyp und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. Während dieses Entwicklungsstadiums zeigen sich massive morphologische Veränderungen in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Abb. 3.22 **B, D, F**) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.22 **A, C, E**). Die Epidermis und die subepidermale Zellschicht in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen scheint teilweise abgestorben zu sein. Zusätzlich kommt es zur massiven, unphysiologischen Akkumulation an phenolischen Substanzen in peripheren Zellen des Kortex. Des Weiteren scheint die zelluläre Organisation des Gewebes aufgehoben zu sein. Der Kortex erscheint desorganisiert, und Kortexzellen in *SIMMP1/2*-

RNAi-Hypokotylen (Abb. 3.22 **B**) unterscheiden sich in Form und Größe von Wildtyp-Kortexzellen (Abb. 3.22 **A**). Außerdem kommt es in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen zur Akkumulation von Kallose in peripheren Zellschichten des Kortex (Abb. 3.22 **D**), während man im Wildtyp nur die Kallose der Siebplatten detektiert (Abb. 3.22 **C**). Des Weiteren konnte nach Anwendung von Sudan Black gezeigt werden, dass periphere Zellen des Kortex in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit Suberin/Cutin imprägniert sind (Abb. 3.22 **F**), während im Wildtyp nur die Kutikula gefärbt wurde (Abb. 3.22 **E**).

Abbildung 3.22 **G-J** zeigt Querschnitte von vier Wochen alten Stängeln von Wildtyp- (Abb. 3.22 **G**) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Abb. 3.22 **H-J**). Ein deutlicher Unterschied zwischen Stängeln von UC82b (Abb. 3.22 **G**) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Abb. 3.22 **H**), ist der teilweise Verlust an kollenchymatischer Zellwandverstärkung in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. Dieses Phänomen ist jedoch lokal begrenzt, wie in Abbildung 3.22 **I** sichtbar wird. Das Kortex in Stängel von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen erscheint wie das Hypokotyl stark desorganisiert zu sein, Kortexzellen bilden Strukturen aus welche einem sekundären Abschlussgewebe gleichen und unterscheiden sich ebenfalls in Form und Größe (Abb. 3.22 **H**). Es erfolgt ebenfalls eine unphysiologische Akkumulation an phenolischen Substanzen (Abb. 3.22 **H**), und Kallose in peripheren Zellbereichen (Abb. 3.22 **J**).



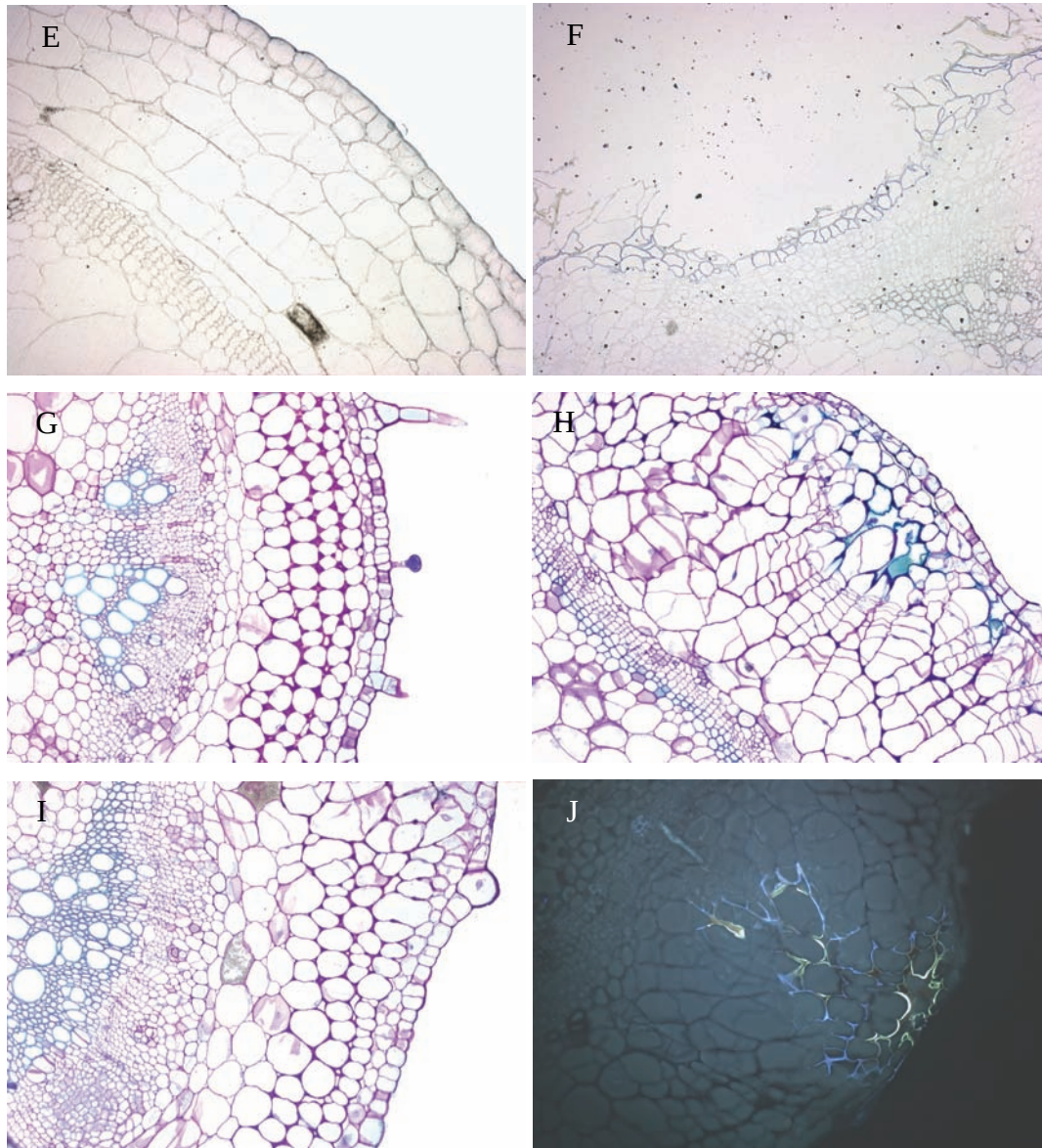


Abb. 3.22: Querschnitte von vier Wochen alten, in Kunstharz eingebetteten Hypokotylsegmenten (ca. 0,5 cm oberhalb des Wurzelansatzes **A-F** und ca. 0,5 cm oberhalb der Kotyledonen **G-J**). (**A**) UC82b Toluidinblau gefärbt (**B**) HP Pflanze Toluidinblau gefärbt. (**C**) UC82b Anillin Blau gefärbt. (**D**) HP Pflanze unter Anillin Blau gefärbt. (**E**) UC82b Sudan Black gefärbt. (**F**) HP Pflanze Sudan Black gefärbt. (**G**) UC82b Toluidinblau gefärbt. (**H&I**) HP Pflanze Toluidinblau gefärbt. (**J**) HP Pflanze Toluidinblau gefärbt. Betrachtet im Axioskop 2 Plus, Zeiss im Hellfeld und nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 395\text{-}420 \text{ nm}$) Alle Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung von 100 x erstellt.

Da in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen vermehrt Zelltod Ereignisse beobachtet wurden (Abb. 3.22), wurde mittels RT-PCR untersucht in wieweit es zur Expression von Genen in *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Hypokotylen kommt, welche spezifisch während des Zelltods induziert werden. Dies sollte zur Klärung beitragen, ob es sich bei diesen Ereignissen um Nekrosen oder um eine Form des programmierten Zelltods handelt. Untersucht wurde das Vorhandensein an Transkripten von *Hin1*, *hsr203J* und *topxC1*, die

spezifisch während der hypersensitiven Reaktion, nicht aber bei nekrotischem Zelltod exprimiert werden (Rivas et al, 2004).

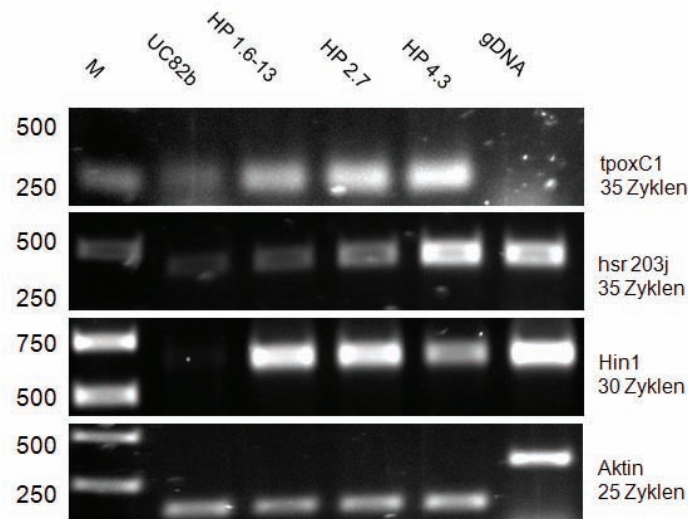


Abb. 3.23: Nachweis der Transkripte von top xC1, hsr 203 j und Hin 1 durch RT-PCR in vier Wochen alten Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen. PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch in exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle der PCR, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

In allen untersuchten *SIMMP1/2*-RNAi-Linien wurde eine stärkere Expression der untersuchten Gene beobachtet als im Wildtyp (Abb. 3.23). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass es sich bei der Degeneration der Epidermis um programmierten Zelltod handelt.

3.6.8 Quantifizierung des Gehalts löslicher und gebundener phenolischer Substanzen in *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen

Unter Anwendung histologischer Analyse- und Färbemethoden (Kapitel 3.6.7), konnte qualitativ gezeigt werden, dass es infolge der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* zur Akkumulation von phenolischen Substanzen in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen kommt. Im Folgenden sollte die Akkumulation löslicher und gebundener Phenole, in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp quantifiziert werden. Untersucht wurden Hypokotyle und Blattstiele von vier Wochen alten Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-

Pflanzen der Linie HP 1.3. Es wurde die Konzentration in jeweils fünf unabhängigen Extrakten aus Organen von Wildtyp und fünf HP 1.3 Pflanzen bestimmt, und die Mittelwerte wurden graphisch dargestellt (Abb. 3.24 und 3.25). Zur Bestimmung der Konzentration an löslichen und gebundenen phenolischen Verbindungen wurde der “Folin-Ciocalteu”-Test (Goldwasser et al, 1999) durchgeführt, und die Konzentration der phenolischen Verbindungen wurde bei einer Wellenlänge von 725 nm als *p*-Cumarsäure-Äquivalente im Photometer bestimmt.

Man beobachtete eine deutliche Erhöhung der Konzentration an löslichen und gebundenen phenolischen Verbindungen in Hypokotylen und Blattstielen von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen (HP 1.3). *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigten eine nahezu um das Doppelte erhöhte Konzentration an löslichen und gebundenen phenolischen Verbindungen (Abb. 3.24 B und 3.24 D) im HypoKotyl. Die Konzentration an löslichen und gebundenen phenolischen Verbindungen in Blattstielen von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen war ebenfalls deutlich erhöht (Abb. 3.24 A und 3.24 C).

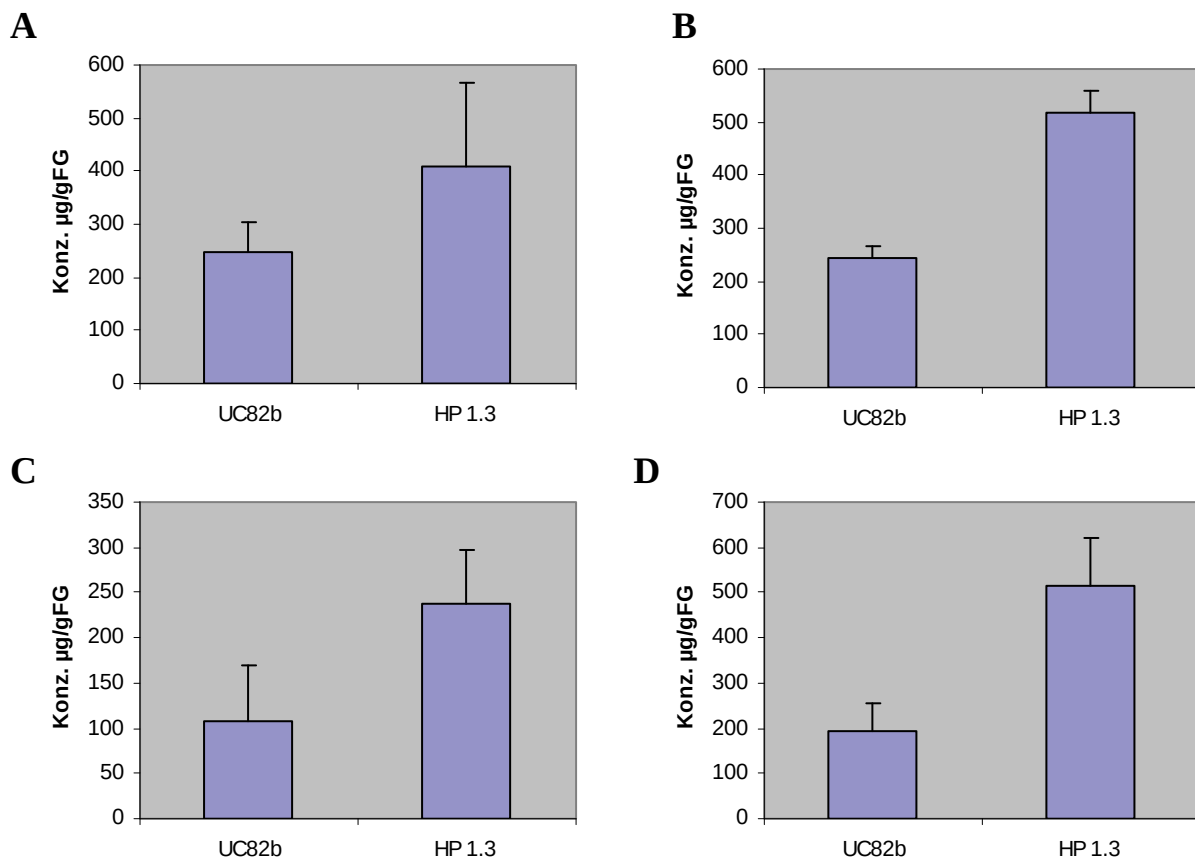
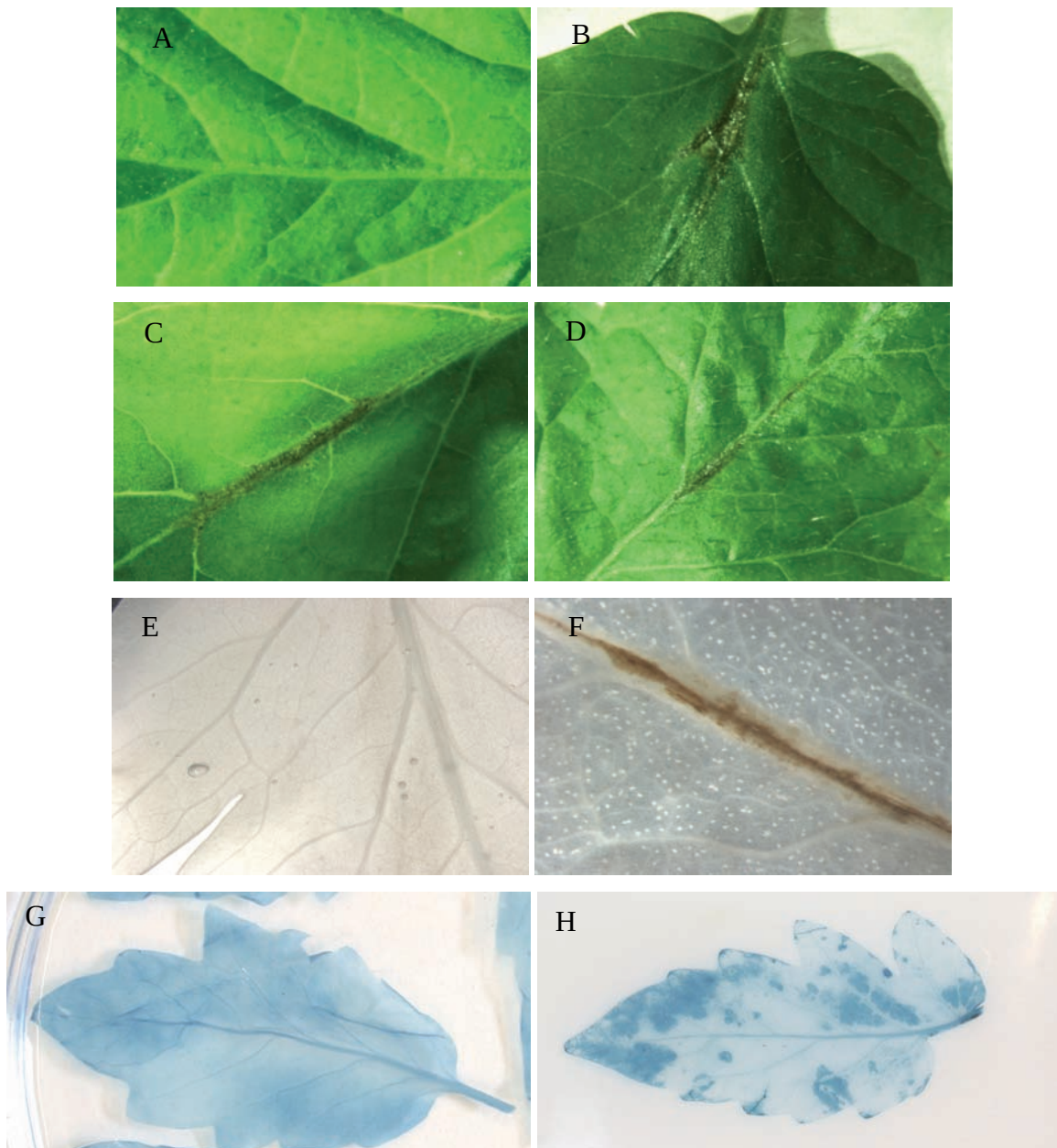


Abb. 3.24: Lösliche phenolische Substanzen im Blattstiel (A) und im Hypokotyl (B). Gebundene phenolische Substanzen im Blattstiel (C) und im Hypokotyl (D). Gezeigt ist der Mittelwert von fünf unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert. Die Konzentration phenolischer Substanzen wurde bestimmt als *p*-Cumarsäure-Äquivalente bei einer Wellenlänge von 725 nm.

3.6.9 Charakterisierung des Phänotyps in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen

In Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen ist ein Effekt der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* Transkripten erst in späteren Entwicklungsstadien nach 5-6 Wochen sichtbar. Man erkennt auf der Mittelrippe der älteren Blätter dunkle Flecken, ähnlich denen auf Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Abb. 3.25 **B, C, D, F**). In Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen scheinen ebenso wie in Hypokotylen vermehrt Zelltodereignisse stattzufinden (Abb. 3.25 **H, I, J**).



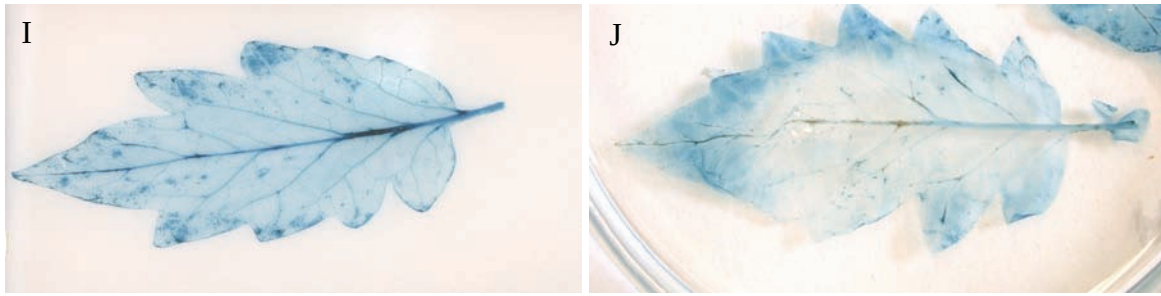


Abb. 3.25: Blätter von sechs Wochen alten Wildtyp- (A) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 5.2.6 (B), HP 4.3 (C), HP 1.6.13 (D). Wildtyp Blatt (E) entfärbt mit Ethanol und *SIMMP1/2*-RNAi-Blatt entfärbt mit Ethanol.
Blätter von sechs Wochen alten Wildtyp- (G) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 5.2.6 (H), HP 4.3 (I) und HP 1.6.13 (J), gefärbt mit Trypanblau zur Visualisierung von Zelltodereignissen.

3.7 Untersuchungen zur Wurzelentwicklung in *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp- Pflanzen

Wie in Kapitel 3.4 bereits beschrieben, wurde auch in der Wurzel eine starke Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* beobachtet, was auf eine mögliche Rolle der Enzyme während der Wurzelentwicklung hindeutet. Zur Überprüfung dieser Annahme, wurden Wildtyp und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 4.5, HP 1.6, HP 2.9 auf Filterpapier, unter Zugabe eines geeigneten Nährmediums aufgezogen (Kapitel 2.15). Gemessen wurden die Gesamtwurzellänge und die Anzahl primärer und sekundärer Seitenwurzeln. Alle Messungen wurden an Pflanzen durchgeführt, welche das Makrostadium 1 (Code 12, zweites Laubblatt voll entwickelt, Feller et al, 1995 b) erreicht hatten. Wie man in Abbildung 3.26 erkennen kann wirkt sich eine verminderte Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* deutlich negativ auf die Wurzelentwicklung aus. Wurzeln von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen entwickeln kleinere Wurzeln als Wildtyp-Pflanzen, was im Vergleich der Gesamtwurzellängen deutlich wird (Abb. 3.26 A). Die Gesamtwurzellänge von HP 4.5 beträgt 42,3%, von HP 1.6, 43,4% und von HP 2.9, 50,4% der Gesamtwurzellänge von Wildtyp-Pflanzen.

Die Ausbildung primärer und sekundärer Seitenwurzeln ist in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen ebenfalls beeinträchtigt (Abb. 3.26 B, C). Für HP 4.5 wurde eine Reduktion in der Anzahl an primären Seitenwurzeln von 54,3%, für HP 1.6 um 40,7% und für HP 2.9 um 43,6% im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Bei der Anzahl sekundärer Seitenwurzeln zeigt sich ein

dramatischeres Bild. HP 4.5 entwickelt um 85,1%, HP 1.6 um 77%, und HP 2.9 um 82,8% weniger sekundäre Seitenwurzeln als der Wildtyp.

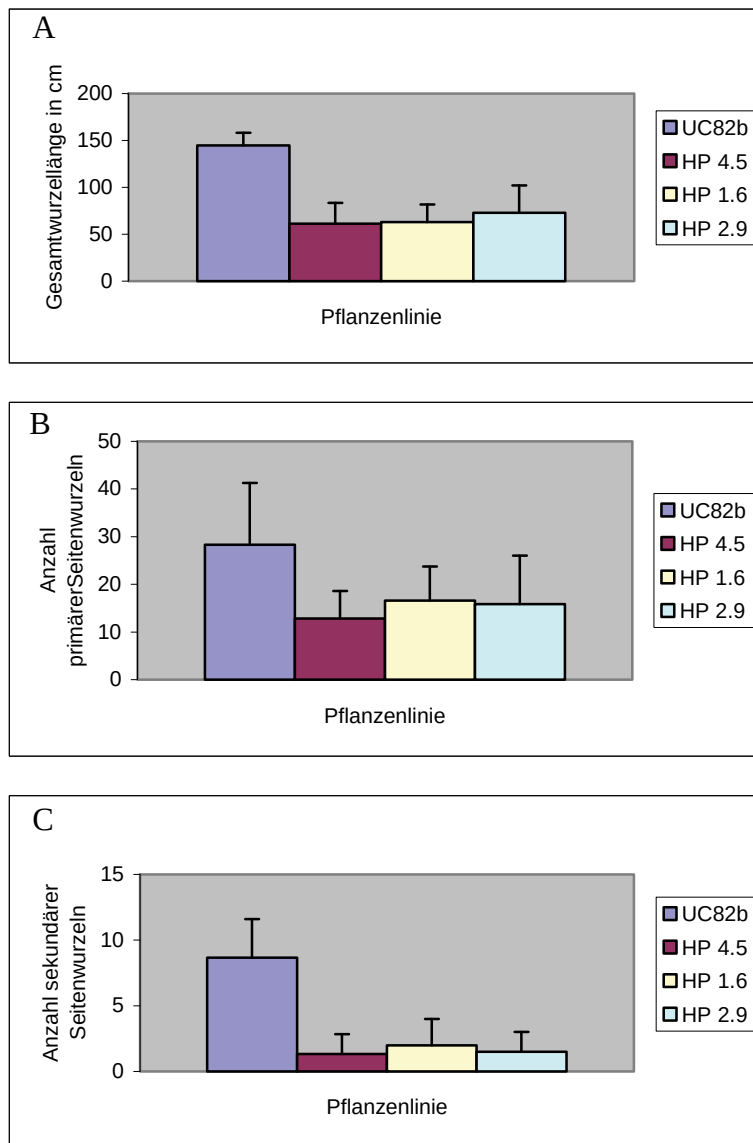


Abb. 3.26: Graphische Darstellung der Resultate zur Wurzelentwicklung in Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 4.5, HP 1.6, HP 2.9 gewachsen auf Filterpapier **(A)** Gesamtwurzellänge in cm von Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. **(B)** Anzahl an primären Seitenwurzeln in Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. **(C)** Anzahl sekundärer Seitenwurzeln in Wildtyp und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt auf die Wurzelentwicklung nicht durch das Wachstum der Versuchspflanzen auf Filterpapier, oder auf das Nährmedium zurückzuführen ist, wurde die Wurzelentwicklung nach Wachstum auf Erde untersucht. Hierfür wurden Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 2.9, HP 4.5 und HP 1.6 im Gewächshaus in Rhizoboxen unter kontrollierten Bedingungen kultiviert

(Kapitel 2.15). Gemessen wurden die Gesamtwurzellänge und die Anzahl primärer und sekundärer Seitenwurzeln. Die Messungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung durchgeführt. Abbildung 3.27 zeigt die Resultate zur Wurzelentwicklung in Rhizoboxen.

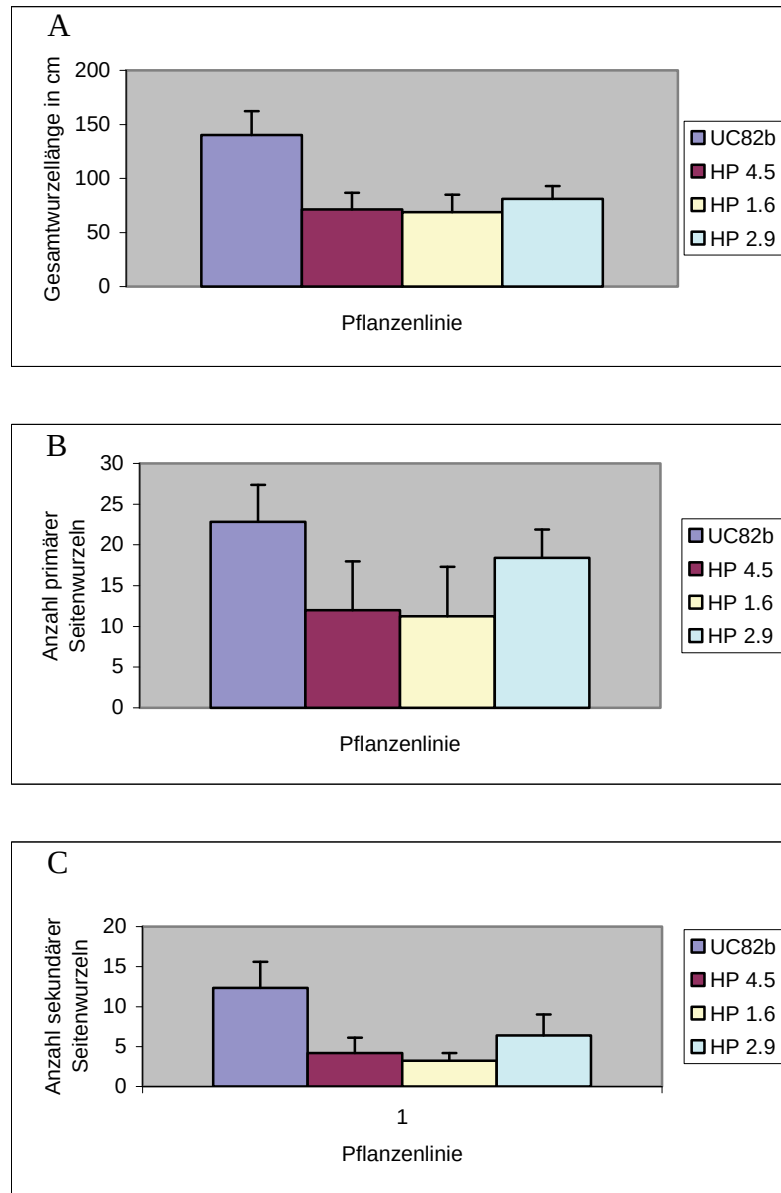


Abb. 3.27: Graphische Darstellung der Resultate zur Wurzelentwicklung in Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linien HP 4.5, HP 1.6, HP 2.9 gewachsen in Rhizoboxen **(A)** Gesamtwurzellänge in cm von Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. **(B)** Anzahl an primären Seitenwurzeln in Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. **(C)** Anzahl sekundärer Seitenwurzeln in Wildtyp und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen.

Die Beobachtung, dass *SIMMP*-RNAi-Pflanzen auf Filterpapieren eine Reduktion in der Wurzelentwicklung aufweisen, konnte auch während des Rhizoboxenexperiments bestätigt werden. Die Gesamtwurzellänge (Abb. 3.27 A) von HP 4.5 beträgt 49,2%, von HP 1.6, 50,9% und von HP 2.9, 42,1% der Gesamtwurzellänge von Wildtyp-Pflanzen.

Die Ausbildung primärer und sekundärer Seitenwurzeln ist in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen ebenfalls beeinträchtigt (Abb. 3.27 B, C). Für HP 4.5 wurde eine Reduktion in der Anzahl an primären Seitenwurzeln von 54,8%, für HP 1.6 um 50,7% und für HP 2.9 um 19,4% im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Bei der Anzahl sekundärer Seitenwurzeln zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied. HP 4.5 entwickelt um 65,9%, HP 1.6 um 73,6%, und HP 2.9 um 48,1% weniger sekundäre Seitenwurzeln als der Wildtyp.

Um Hinweise auf mögliche molekulare Ursachen für die in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen veränderte Wurzelentwicklung zu erhalten, wurde die Expression einiger Gene, die an der Wurzelentwicklung beteiligt sind mittels RT-PCR untersucht. Es wurden die Transkripte der 1-Aminocyclopropan-carbonsäure Synthase (ACS), 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-oxidase (ACO) und der Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase (PPI), quantifiziert (Abb. 3.28). ACS und ACO kodieren für essentielle Enzyme des Ethylen-Biosyntheseweges. Für Ethylen konnte gezeigt werden, dass es abhängig von der Dosis einen positiven Effekt auf die Wurzelentwicklung ausübt. Höhere Ethylen Konzentrationen, wirken sich jedoch negativ auf die Wurzelentwicklung aus (Ivanchenko et al, 2008). Für das Gen, welches für die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (PPI) kodiert, konnte gezeigt werden, dass ein Knockout in Tomate mit massiven Defekten in der Wurzelentwicklung verbunden ist (Oh KwangChul et al, 2006). Die beschriebenen Gene wurden auch in Mikroarray Analysen (Kapitel 3.6.3) als differentiell reguliert identifiziert.

Die RT-PCR Analysen zeigten, dass Transkripte, welche für Enzyme der Ethylenbiosynthese kodieren, in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen abundanter vorhanden sind als in Wildtyp-Pflanzen. Transkripte für die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase scheinen in Wildtyp-Pflanzen zahlreicher vorhanden zu sein als in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Abb. 3.28). Die beobachteten Tendenzen korrelieren mit den diesen Genen zugeschriebenen Wirkungen auf die Wurzelentwicklung.

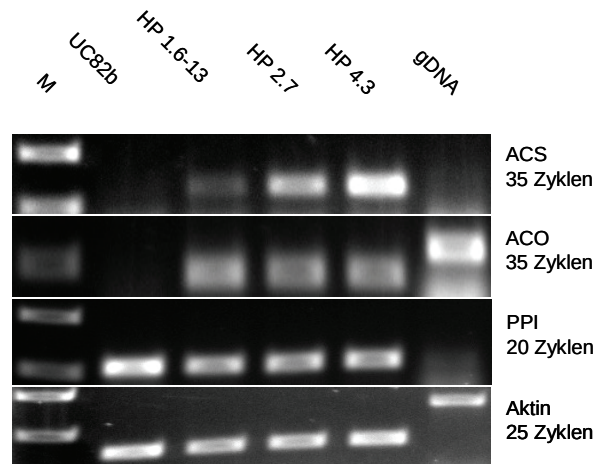


Abb. 3.28: RT-PCR zum Nachweis von Transkripten der ACC-Synthase, ACC-Oxidase und der Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase in Wildtyp- und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen. PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatemenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch in exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle der PCR, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

3.8 Quantifizierung des Gehalts an Ethylen in Hypokotylen und Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen

Es ist bekannt, dass Ethylen bei Prozessen wie Zelltod, Seneszenz, Abszission, Wurzelentwicklung und bei der Pathogenabwehr im pflanzlichen Organismus beteiligt ist (He et al, 1996, Grbic and Bleeker, 1995, Burg 1968, Lorenzo et al, 2003, Ecker et al, 1987, Ruzicka et al, 2007). Viele der beobachteten Effekte in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen lassen vermuten, dass Ethylen bei diesen Ereignissen involviert ist und dass es möglicherweise zu einer gesteigerten Ethylenproduktion in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen kommt. Um den Gehalt an Ethylen zu erfassen und zu quantifizieren wurden fünf Hypokotyle und von fünf Pflanzen je drei Blattscheiben (je 1 cm²) von drei Blattnerven des dritt ältesten Fiederblatts von drei Wochen alten Wildtyp- (UC82b) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (HP 5.2.6, HP 1.6.13, HP 4.3) auf ihre Ethylenproduktion untersucht. Dazu wurde das Pflanzenmaterial in Glasbehältern für drei Stunden bei 26 °C inkubiert, welche mit Schraubverschlüssen gasdicht verschlossen waren. Nach drei Stunden wurde mit einer Spritze 1 ml Gasvolumen entnommen und der Ethylengehalt photoakustisch bestimmt. Die Resultate der Quantifizierung sind in Abbildung 3.29 und 3.30 dargestellt.

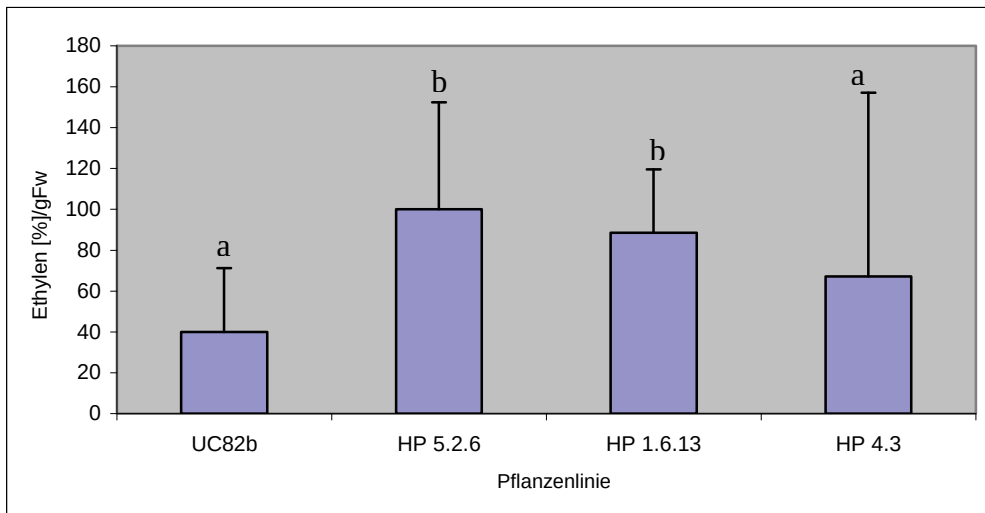


Abb. 3.29: Graphische Darstellung der ermittelten Ethylenemissionen in Hypokotylen von Wildtyp- (UC82b) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (HP 5.2.6, HP 1.6.13, HP 4.3) nach drei Stunden Inkubation. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen $\pm$ Standardabweichung dar.

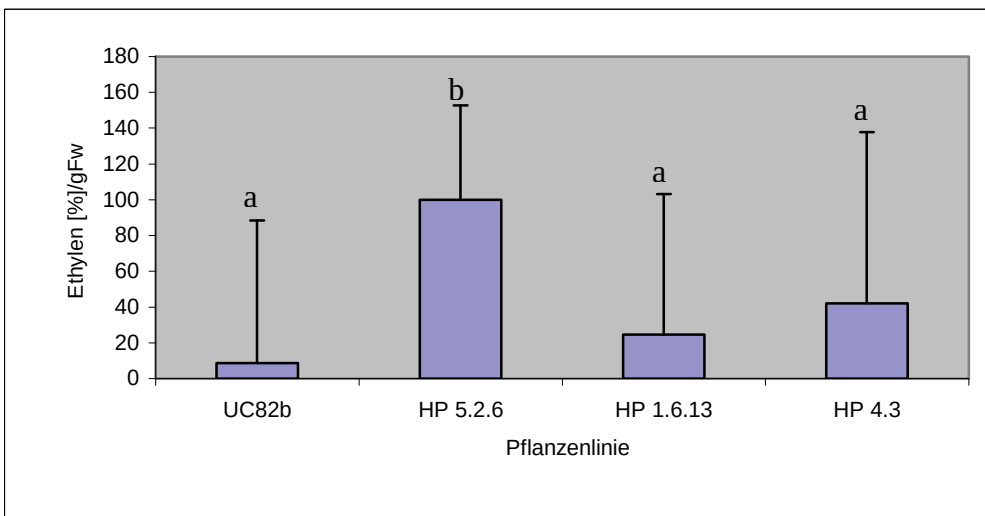


Abb. 3.30: Graphische Darstellung der ermittelten Ethylenkonzentrationen in Blättern von Wildtyp- (UC82b) und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (HP 5.2.6, HP 1.6.13, HP 4.3) nach drei Stunden Inkubation. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen $\pm$ Standardabweichung dar.

Die Quantifizierung des Ethylengehalts in Hypokotylen (Abb. 3.29) ergab, dass die Produktion von Ethylen in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. So zeigt HP 5.2.6 eine um 60 %, HP 1.6.13 um 48,5 % und HP 4.3 um 27,2 % erhöhte Ethylenproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test ($p < 0.05$) durchgeführt. Dieser ergab, dass die

ermittelten Unterschiede zwischen HP 5.2.6, HP 1.6.13 und Wildtyp-Pflanzen signifikant sind.

In Blättern von *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen konnte ebenfalls eine erhöhte Ethylenproduktion im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden (Abb. 3.30). HP 5.2.6 zeigte eine um 91,3 %, HP 1.6.13 eine um 15,8 % und HP 4.3 eine um 33,4 % erhöhte Ethylenproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde ebenfalls ein t-Test ($p < 0.05$) durchgeführt. Dieser ergab, dass nur der Unterschied zwischen HP 5.2.6 und Wildtyp-Pflanzen statistisch signifikant ist.

3.9 Expression von *S/MMP1* und *S/MMP2* in Reaktion auf verschiedene Stimuli

3.9.1 Expression von *S/MMP1* und *S/MMP2* nach Fusicoccin Behandlung

Für die *GmMMP2* aus der Sojabohne (*Glycine max*) konnte gezeigt werden, dass sie nach Pathogenbefall induziert wird (Liu et al, 2001). Durch Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass Fusicoccin, ein Toxin, welches vom Pilz *Fusicoccum amygdali* produziert wird und verschiedene Gene der pflanzlichen Pathogenabwehr so genannte PR-Gene induziert, auch zu einer Induktion von MMPs in Tomate führt, wobei allerdings nicht zwischen *S/MMP1* und *S/MMP2* unterschieden wurde (Frick & Schaller 2002, Singh & Roberts 2004).

Um eine mögliche Rolle von *S/MMP1* und *S/MMP2* bei der Pathogenabwehr zu analysieren, sollte zunächst die Expression von *S/MMP1* und *S/MMP2* nach Behandlung von Pflanzen mit Fusicoccin untersucht werden. Hierfür wurden zwei Wochen alte Tomatenpflanzen wie in Kapitel 2.14.1 beschrieben mit Fusicoccin behandelt, und nach definierter Behandlungsdauer wurde Blattmaterial geerntet, RNA extrahiert und eine Reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt. Zur Ermittlung der Expressionsprofile von *S/MMP1* und *S/MMP2* wurden Oligonukleotide (Primer) spezifisch für *S/MMP1* und *S/MMP2* während einer PCR-Reaktion verwendet.

Eine deutliche Induktion von *S/MMP1* und *S/MMP2* ist bereits eine Stunde nach Behandlung mit Fusicoccin erkennbar und konnte auch noch nach drei und sechs Stunden nachgewiesen werden. Das Maximum der *S/MMP1* und *S/MMP2* Expression wurde jedoch

bereits nach einer Stunde erreicht. Der Induktionsfaktor scheint für *SIMMP2* größer zu sein als für *SIMMP1*, was auch an der geringeren konstitutiven Expression liegt (Abb. 3.31).

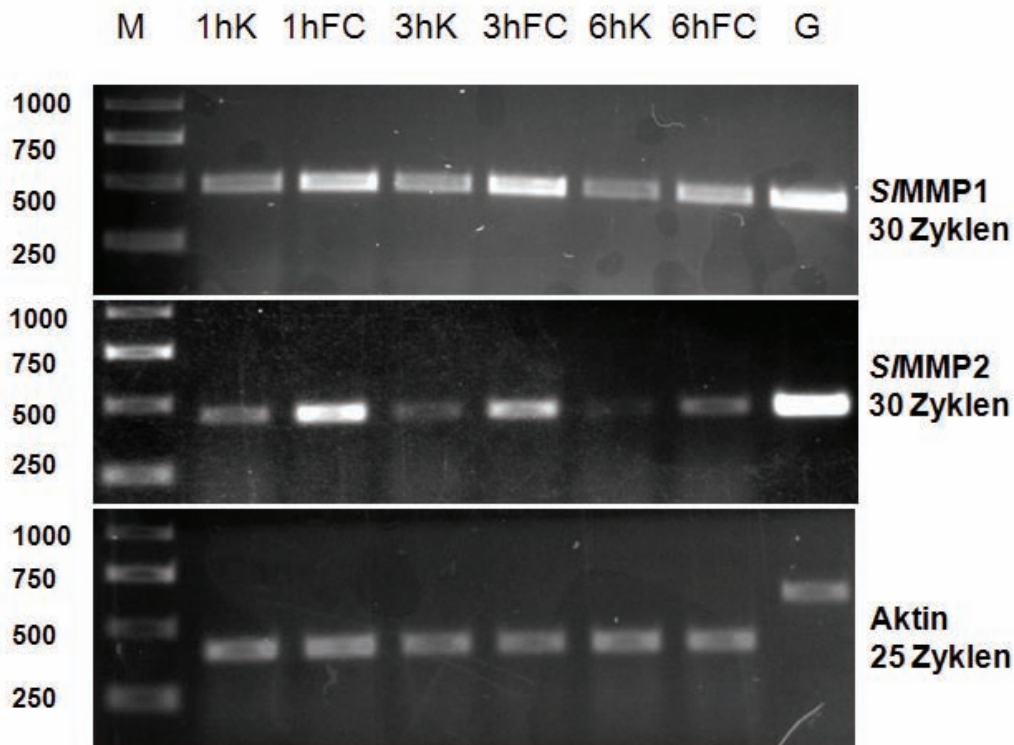


Abb. 3.31: RT-PCR zum Nachweis der *SIMMP1* und *SIMMP2* Transkripte in Wildtyp-Tomatenpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten (1h, 3h, 6h) nach Applikation von Fusicoccin (FC) und in unbehandelten Kontrollpflanzen (K). PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch in exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

3.9.2 Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* in Tomatenblättern nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*

In Kapitel 3.9.1, konnte eine Induktion von *SIMMP1* und *SIMMP2* nach Applikation des Pilztoxins Fusicoccin beobachtet werden.

Dieser Befund deutet wie auch die in der Mikroarray-Analyse beobachtete Induktion einiger PR-Gene (Kapitel 3.6.3) auf eine mögliche Rolle der *SIMMP1/2* in der Tomaten-Pathogeninteraktion. Da es sich bei den Fusicoccin produzierenden Pilz *Fusicoccum*

amygdali nicht um ein Pathogen der Tomate handelt, wurde hier die Expression nach Infektion durch *Sclerotinia sclerotiorum* untersucht. Bei *S. sclerotiorum* handelt es sich wie bei *F. amygdali* um einen Ascomyceten mit breitem Wirtsspektrum. *S. sclerotiorum* wird stellvertretend für nicht sporulierende eukaryotische Phytopathogene mit nekrotropher Lebensweise eingesetzt (Bolton et al, 2006).

Die Inokulation erfolgte wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben durch Aufsetzen von mit Myzel bewachsenen Agarstücken auf die Blattoberfläche. Die Probenentnahme erfolgte nach einer ersten erfolgreichen Besiedlung des Blattgewebes durch den Pilz nach 17 Stunden und darauf folgend 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation. Eine weitere Probenentnahme wurde nicht durchgeführt, da 72 h nach Inokulation ca. 2/3 der Blattflächen nekrotisch waren und daher für die RNA-Analyse ungeeignet. Pro Zeitpunkt wurden drei gleich alte Blätter vereinigt und für die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene mit semiquantitativer RT-PCR verwendet.

Zur qualitativen Erfassung der Infektion durch *S. sclerotiorum* wurde auf der Blattoberseite von UC82b und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der Linie HP 5.2.6 ein mit Myzel bewachsener Agarblock aufgelegt, und die Entwicklung der Infektion wurde zu den Zeitpunkten 0, 17, 24, 48, und 72 Stunden im Bild festgehalten. Nach 17 Stunden sind die ersten Nekrosen zu erkennen. 24 und 48 Stunden nach der Infektion breiten sich die Nekrosen radial vom Agarblock in das Blattgewebe aus. Nach 72 Stunden sind fast 2/3 des Blattes von UC82b und *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen nekrotisch. Unterschiede im Wachstumsverhalten von *S. sclerotiorum* auf den untersuchten Genotypen waren jedoch nicht feststellbar (Abb 3.32). Leichte Unterschiede in der Reaktion der Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp wurden 72 Stunden nach der Infektion festgestellt. Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigen Seneszenz-ähnliche Symptome. Sie zeigen Anzeichen von Chlorosen und sehen stärker verwelkt aus als Wildtyp-Blätter (Abb. 3.32).

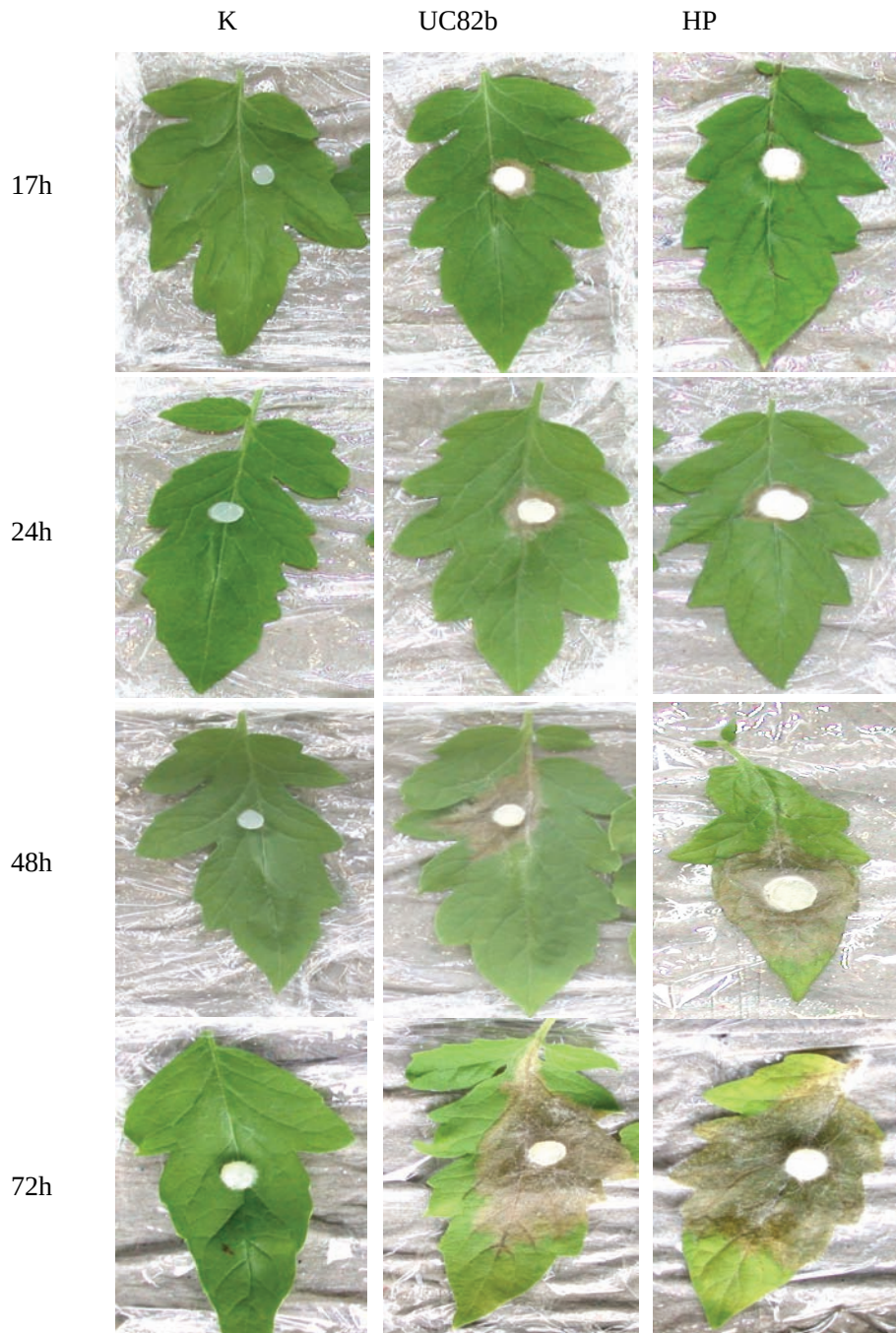


Abb. 3.32: Krankheitssymptome verursacht durch *Sclerotinia sclerotiorum* in Wildtyp (UC82b)- und S/MMP1/2-RNAi-Pflanzen der Linie HP 5.2.6 zu verschiedenen Zeitpunkten (17h, 24h, 48h und 72h) nach Applikation. Die Kontrolle (K) zeigt ein Wildtyp (UC82b)-Blatt bestückt mit einem pilzfreen Agarblock.

In Abbildung 3.33 sind die Resultate aus der RT-PCR zu sehen. Man erkennt deutlich eine starke Induktion von *S/MMP1* und *S/MMP2* 17 Stunden nach Applikation des Phytopathogens auf Wildtyp-Blätter. Nach 24 Stunden erscheint die Expression der untersuchten Gene schwächer zu werden, gefolgt von einem erneuten Anstieg der Expression nach 48 Stunden.

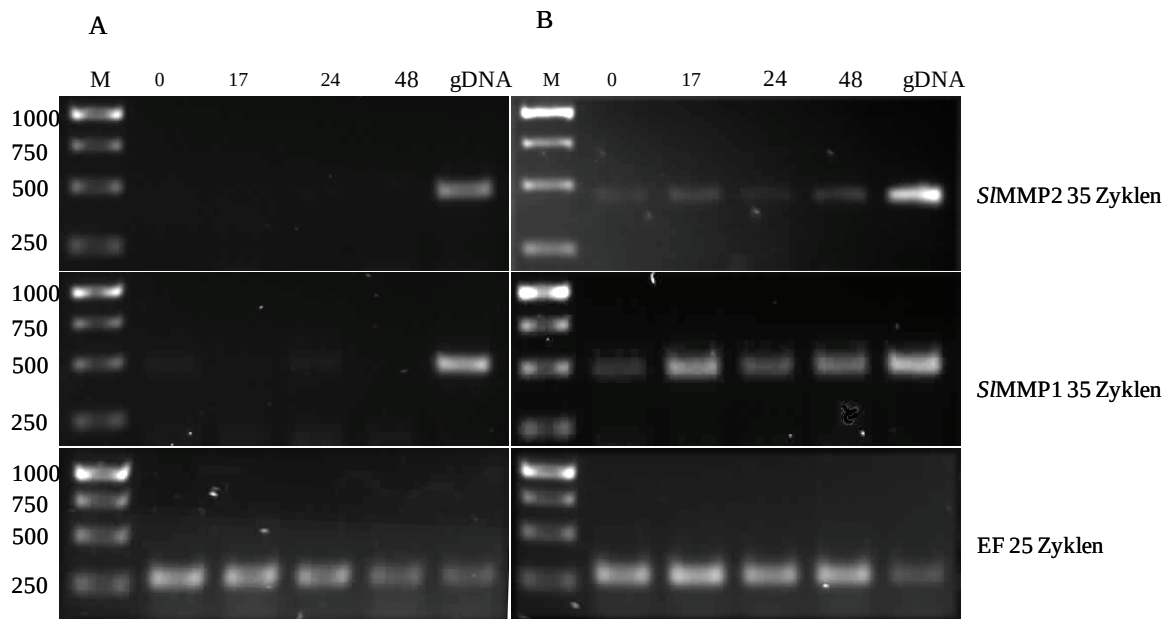


Abb. 3.33: RT-PCR zum Nachweis der *SIMMP1* und *SIMMP2* Transkripte in Wildtyp-Tomatenpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 17h, 24h, 48h und 72h) nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum* (**B**), und unbehandelte Wildtyp-Tomatenpflanzen (**A**). PCR zum Nachweis von Elongations-Faktor (EF)-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch in exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

3.9.3 Wachstumsverhalten von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) in *SIMMP1/2*-RNAi, *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen

Nachdem die Induzierbarkeit von *SIMMP1* und *SIMMP2* durch Fusicoccin und *S. sclerotiorum* nachgewiesen worden war, sollte nun eine mögliche Rolle von *SIMMP1* und *SIMMP2* bei Infektion mit biotrophen, prokaryontischen Pathogenen untersucht werden. Die eingesetzten Stämme von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) waren mit Ausnahme der Gene, die für die Pathogenizität verantwortlich sind, isogen. Es wurden ein virulenter (*Xcv* 85-10), ein avirulenter (*AvrBs3*) und ein *hrp*-defizienter (*hrp*⁻) Stamm eingesetzt, der durch Mutation der *hrp*-Gene A bis G des Typ-III Sekretionsapparats nicht pathogen ist (Schornack, Inst. Pflanzengenetik Universität Halle, pers. Mitteilung).

Die Entwicklung der drei *Xcv* Stämme wurde in Wildtyp (UC82b), drei unabhängigen *SIMMP1/2*-RNAi-Linien (HP 1.6.13, HP 5.2.6, HP 4.3) und in zwei unabhängigen *SIMMP1*-überexpressions-Linien (Nat. 7.1, Nat. 8.3) getestet. Für den Versuch wurden

sechs Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden mit einer Bakteriendichte von 10^4 koloniebildenden Einheiten (cfu)/ml infiltriert. Bei dieser niedrigen Inokulationsdichte kommt es zu keiner lokalen Symptombildung, und die exponentielle Phase des Bakterienwachstums konnte im Blattgewebe untersucht werden. Die Größe der Bakterienpopulation wurde in Abhängigkeit von der Infektionsdauer als Zahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) pro Blattfläche bestimmt.

Die abgebildeten Wachstumskurven zeigen das Wachstum der drei isogenen Stämme von *Xcv* über einen Zeitraum von acht Tagen nach Infiltration. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, mit vergleichbarem Resultat.

3.9.3.1 Wachstum des virulenten Stamms *Xcv* 85-10

Der für diesen Versuch verwendete *Xcv* 85-10 Stamm ist auf Wildtyp-Pflanzen virulent (Thieme et al, 2005). Dieser Stamm löst in Wirtspflanzen Krankheitssymptome aus und führt zu einer kompatiblen Interaktion.

Wie in Abbildung 3.34 zu erkennen ist, kam es in Wildtyp- und *SIMMP1*-Überexpressions Pflanzen zu einem vergleichbaren Wachstum des Pathogens. Die Überexpression von *SIMMP1* führt also nicht zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Pathogen. Ein verringertes Wachstum des verwendeten *Xcv* 85-10 Stamms war in allen drei *SIMMP1/2*-RNAi-Linien zu beobachten, was möglicherweise auf eine erhöhte Resistenz der *SIMMP1/2* RNAi-Linien hindeutet. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz dieser Beobachtung, wurde ein One-Way-Anova Test nach der Methode von Holm-Sidak durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums auf den untersuchten Linien, konnte zwei Tage nach Infiltration zwischen der *SIMMP1*-Überexpressionslinie Nat 7.1 und den *SIMMP1/2*-RNAi-Linien HP 5.2.6 und HP 4.3 und zwischen Nat 8.3 und HP 5.2.6 festgestellt werden. Acht Tage nach Infiltration konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Nat 7.1 und HP 1.6.13, HP 5.2.6 und HP 4.3 festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten vier und sechs Tage nach der Infiltration konnte kein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums festgestellt werden.

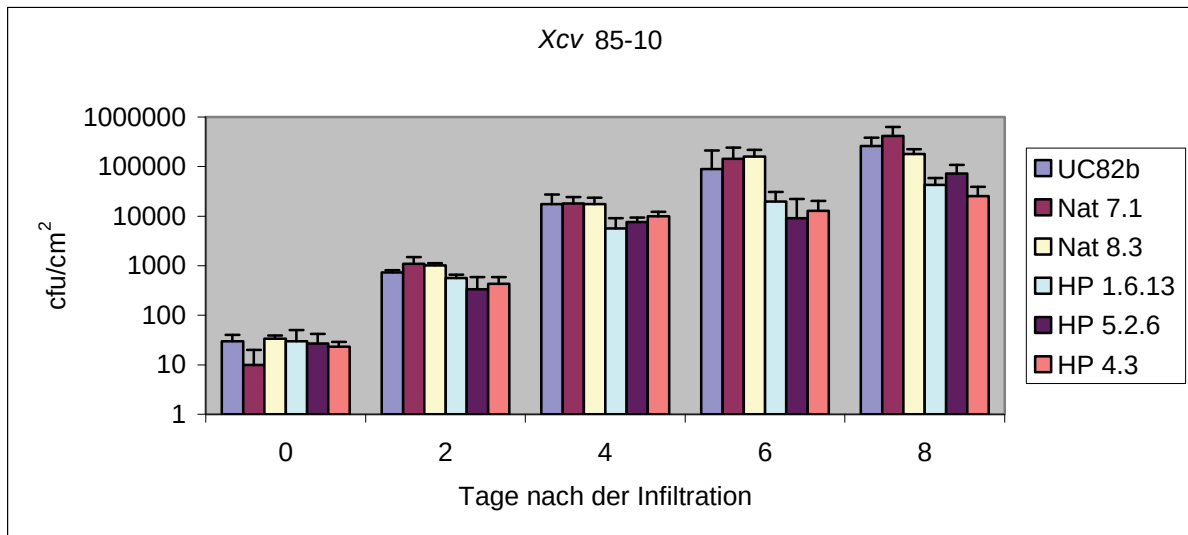


Abb. 3.34: Wachstum eines virulenten Stamms von *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 in *SIMMP1/2*-RNAi-, *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyppflanzen. Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden mit 10^4 cfu/ml inokuliert. Die Reisolierung erfolgte aus ausgestanzten Blattscheiben (1 cm^2) der infiltrierten Bereiche. Das Wachstum der Bakterienpopulation ist angegeben als koloniebildende Einheiten (cfu)/ cm^2 . Die Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Infiltrationsereignissen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.9.3.2 Wachstum des avirulenten Stamms *Xcv* 85-10 pDsK 200

Beim Stamm *Xcv* 85-10 pDsK 200 handelt es sich um einen durch Transformation eines AvrBs3 tragenden Plasmids erzeugten avirulenten Stamm (Schornack, Inst. für Pflanzengenetik, Universität Halle, pers. Mitteilung). Dieser Stamm führt in Wirtspflanzen zu einer inkompatiblen Interaktion und löst eine hypersensitive Reaktion aus (Ballvora et al. 2001).

Der *Xcv* pDsK 200 Stamm zeigt im Vergleich zum *Xcv* 85-10 Stamm, stark vermindertes Wachstum. Nach 6 bzw. 8 Tagen wird nur etwa ein Zehntel der Populationsdichte erreicht. Wie der *Xcv* 85-10 Stamm, zeigt auch der *Xcv* pDsK 20 Stamm ein ähnliches Wachstumsverhalten auf Wildtyp- und *SIMMP1*-Überexpressionspflanzen. Eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch die Überexpression der *SIMMP1* war ebenfalls nicht zu beobachten. Ein verringertes Wachstum ist auch hier auf allen drei untersuchten *SIMMP1/2*-RNAi-Linien zu beobachten (Abb.3.35).

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz dieser Beobachtung, wurde ebenfalls ein One-Way-Anova Test nach Holm-Sidak durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums auf den untersuchten Linien konnte zwei Tage nach Infiltration zwischen der *SIMMP1*-Überexpressionslinie Nat 7.1 und den *SIMMP1/2*-RNAi-Linien HP

1.6.13, HP 5.2.6, HP 4.3 festgestellt werden. Acht Tage nach Infiltration konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen UC82b und HP 5.2.6 festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten vier und sechs Tage nach der Infiltration konnte kein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums festgestellt werden.

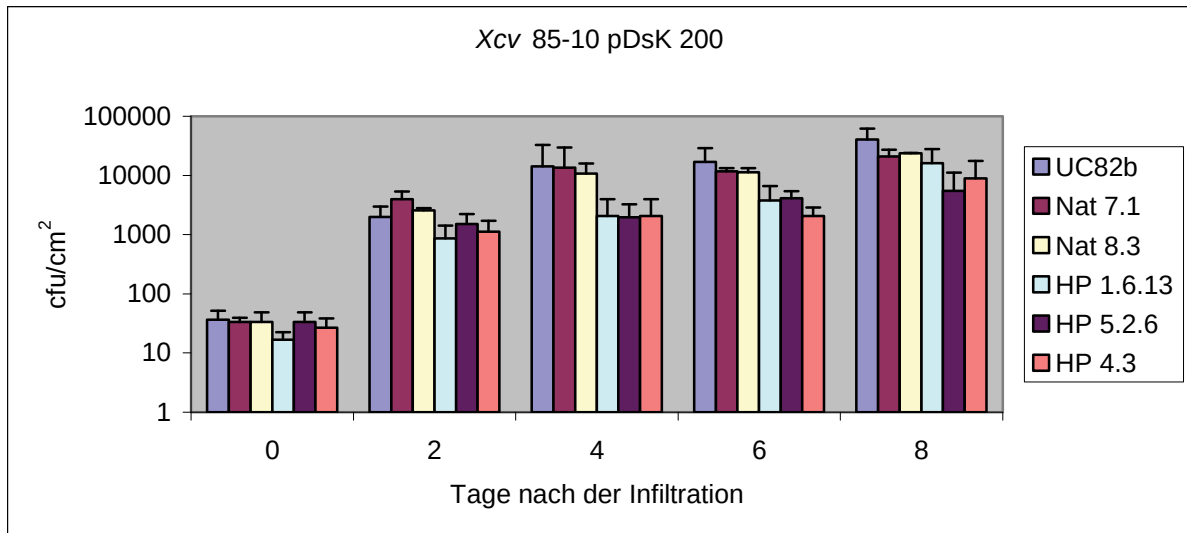


Abb. 3.35: Wachstum des avirulenten Stamms von *X. campestris* pv. *vesicatoria* in SIMMP1/2-RNAi, -SIMMP1-Überexpressions- und Wildtyppflanzen. Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden mit 10^4 cfu/ml inokuliert. Die Reisolierung erfolgte aus ausgestanzten Blattscheiben der infiltrierten Bereiche. Das Wachstum der Bakterienpopulation ist angegeben als koloniebildende Einheiten (cfu)/cm². Die Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Infiltrationsereignissen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.9.3.3 Wachstum des hrp-defizienten Stamms Xcv 85-10 hrpA-G

Der *Xcv* hrp⁻ (hypersensitive Reaktion und Pathogenität)-defiziente Stamm ist im Genom in den Genen hrpA, B, C, D, E, F und G deletiert. Diese Deletion hat zur Folge, dass dieser Stamm kein funktionsfähiges Typ III-Sekretionssystem mehr ausbilden kann. Dadurch ist die Sekretion von Effektorproteinen über die pflanzliche Plasmamembran in das Cytosol unterbunden (Rossier et al, 1999, Büttner und Bonas, 2002). Dieser Stamm ist in Wirtspflanzen nicht pathogen, und nicht mehr in der Lage, den pflanzlichen Stoffwechsel durch die durch das Typ III Sekretionssystem sekretierten Effektorproteine zu seinem Vorteil zu modulieren.

Der *Xcv* hrp⁻ Stamm zeigte auf alle untersuchten Genotypen ein ähnlich schwaches Wachstum (Abb. 3.36), was auf die Unfähigkeit zurückzuführen ist, die für ein Wachstum

und Überleben notwendige Umgebung zu schaffen. Nach 6 bzw. 8 Tagen wird nur etwa ein Zehntel der Populationsdichte des *Xcv* pDsK 200 Stamms und ein Hundertstel der Populationsdichte des *Xcv* 85-10 Stamms erreicht. Der *Xcv* hrp⁻ Stamm zeigt auf allen untersuchten Genotypen ein ähnliches Wachstumsverhalten, nur zwei bzw. acht Tagen nach der Infiltration ist auf den RNAi-Pflanzen ein verringertes Wachstum zu beobachten (Abb. 3.36). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz dieser Beobachtung, wurde ebenfalls ein One-Way-Anova Test nach Holm-Sidak durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums auf den untersuchten Linien, konnte zwei Tage nach Infiltration zwischen Wildtyp-, *SIMMP1*-Überexpressionslinie Nat 7.1 und Nat 8.3 gegenüber den untersuchten *SIMMP1/2*-RNAi-Linien (HP 1.6.13, HP 5.2.6, HP 4.3) festgestellt werden. Acht Tage nach Infiltration konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und den untersuchten *SIMMP1*-überexpression und *SIMMP1/2*-RNAi-Linien (HP 1.6.13, HP 5.2.6, HP 4.3) festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten vier und sechs Tage nach der Infiltration konnte kein signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums zwischen den Genotypen festgestellt werden.

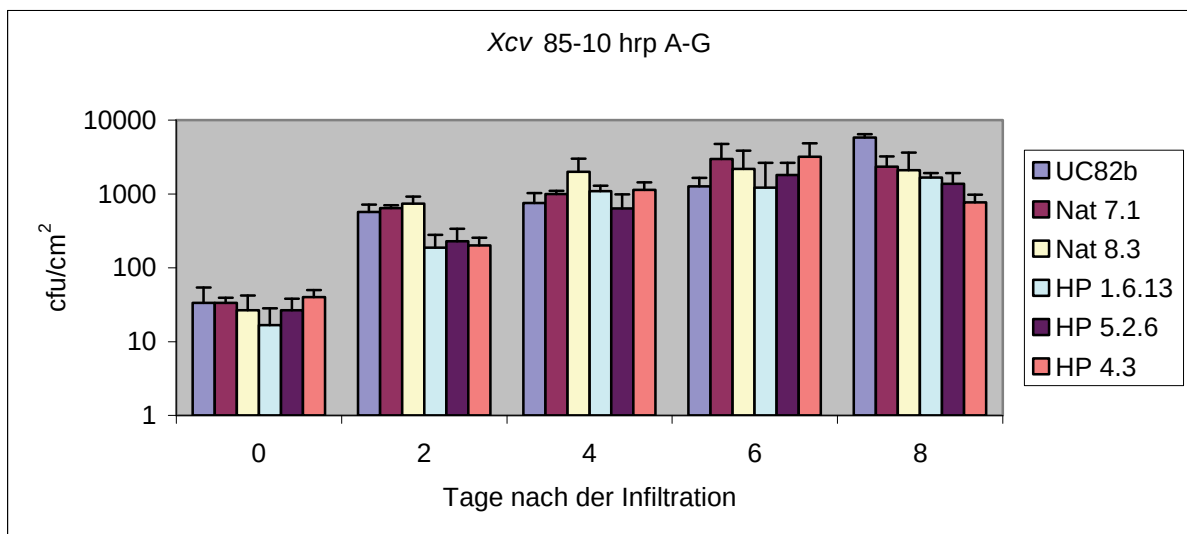


Abb. 3.36: Wachstum des hrp A-G Stamms von *X. campestris* pv. *vesicatoria* in *SIMMP1/2*-RNAi-, *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyppflanzen. Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden mit 10^4 cfu/ml inokuliert. Die Reisolierung erfolgte aus ausgestanzten Blattscheiben der infiltrierten Bereiche. Das Wachstum der Bakterienpopulation ist angegeben als koloniebildende Einheiten (cfu)/cm². Die Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Infiltrationsereignissen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Statistisch signifikante Unterschiede des bakteriellen Wachstums wurden in allen untersuchten Genotypen, und verwendeten Stämmen von *Xcv* nur zu den Zeitpunkten zwei- und acht Tage nach der Infiltration festgestellt. Während den Zeitpunkten vier- und sechs

Tagen nach der Infiltration konnte kein statistisch signifikanter Unterschied des bakteriellen Wachstums in den verschiedenen experimentellen Ansätzen festgestellt werden. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Infiltration von *Xcv* (zweit- und drittältestes Fiderblatt) von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen bereits nach zwei Tagen zu starken Reaktionen führt, welche zum vollständigen Organtod führen. Dieser Effekt machte es unmöglich, dass bakterielle Wachstum in Blättern eines Entwicklungsstadiums zu beobachten. Es musste während des Experiments auf die viertältesten Fiderblätter zurückgegriffen werden. Die hier dargestellten Daten, können deshalb nur als ein Trend betrachtet werden.

3.9.4 Untersuchung der Symptome in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi, *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen nach Infiltration von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatorias* und *E. coli* DH10b

Es wurde beobachtet, dass Infiltration von *Xcv* (10^4 cfu/ml) in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zu massiven Reaktionen führt, was mit dem Absterben ganzer Organe verbunden ist. Dieser Effekt ist am deutlichsten in den ältesten, zweitältesten und drittältesten Fiderblättern, ausgeprägt. Um die auftretenden Effekte über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurden Blätter von sechs Wochen alten *SIMMP1/2*-RNAi (HP)-, *SIMMP1*-Überexpressions (Nat)- und Wildtyp (UC82b)-Pflanzen mit verschiedenen *Xcv* Stämmen infiltriert (10^4 cfu/ml). Da die beobachteten Reaktionen in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen unabhängig des verwendeten *Xcv* Stamms immer die gleichen waren, wurde auch ein *E. coli* Stamm (DH10b) als ein nicht Pflanzenpathogen als Kontrolle infiltriert (10^4 cfu/ml). Abbildung 3.37 zeigt die Effekte hervorgerufen durch Infiltration von *Xcv* 85-10 zum Zeitpunkt 0, 5, 10 und 15 Tagen nach Applikation des Pathogens. Zeitpunkt 0 zeigt den Zustand der Blätter zum Zeitpunkt der Infiltration. Die Blätter der untersuchten Genotypen sahen grün und vital aus und zeigten keine Anzeichen einer Schädigung. Fünf Tage nach der Infiltration sind in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen bereits deutliche Effekte zu erkennen. Die Blattspitze ist nekrotisch und deutliche Chlorosen sind zu erkennen. Zehn Tage nach Infiltration erscheint der ganze infiltrierte Bereich in *SIMMP1/2*-RNAi-Blättern nekrotisch. Blätter von Wildtyp- und *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen zeigen ebenfalls Reaktionen, jedoch weitaus schwächer als *SIMMP1/2*-RNAi-Blätter. Es zeigen sich nekrotische Bereiche um die Infiltrationsstelle

und leichte Chlorosen. Nach 15 Tagen sind Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen nahezu zur Hälfte nekrotisch, und stark verformt. In Blättern von Wildtyp-Pflanzen ist nun eine deutliche Ausbreitung der chlorotischen Bereiche zu erkennen. In *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen erscheint nur die Infiltrationsstelle nekrotisch und chlorotisch. Die beobachteten Effekte, scheinen also in *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen am schwächsten ausgeprägt zu sein.

Nach Infiltration von *Xcv* pDsK 200 zeigten sich in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-, *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.38) ähnliche Symptome wie zuvor für *Xcv* 85-10 beschrieben. Während die Symptomentwicklung in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen der gleichen Kinetik und Ausprägung folgt wie nach Anwendung von *Xcv* 85-10, scheinen die Symptome in Blättern von *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen milder auszufallen. Auffällig ist erneut die Tatsache, dass Blätter von *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen die schwächsten Symptome zeigen. Der *Xcv* hrp A-G Stamm, verursacht in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen die gleichen Symptome, und diese folgen der gleichen Kinetik wie für die Stämme 85-10 und pDsK 200 beschrieben. In Blättern von *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen sind kleine chlorotische Bereiche um die Infiltrationsstellen zu erkennen (Abb. 3.39). Auch in diesem Fall entwickeln *SIMMP1*-Überexpressionspflanzen die mildesten Symptome.

Die Infiltration von *E. coli* DH10b als nicht Pflanzenpathogen, führte zu einer interessanten Beobachtung. Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen infiltrierte mit diesem Bakterium, zeigten starke Symptome (Abb. 3.40), wie zuvor für die Anwendung der *Xcv* Stämme beschrieben. Die Symptome unterschieden sich nur in der Kinetik. Zum Zeitpunkt fünf und zehn Tage nach Infiltration, zeigen Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen starke Chlorosen. Nach 15 Tagen, ist jedoch auch in diesem Fall der gesamte infiltrierte Bereich nekrotisch. Blätter von *SIMMP1*-Überexpressions- und Wildtyp-Pflanzen zeigen nahezu keine Symptome. Leichte Chlorosen sind nach 15 Tagen im Bereich der Infiltrationsstelle zu erkennen. Sonstige Effekte waren nicht zu beobachten.

Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte auf das Infiltrationsereignis zurückzuführen sind, wurden Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-, *SIMMP1*-Überexpressions-, und Wildtyp-Pflanzen mit 1 mM MgCl₂ infiltrierte, welches als Diluent für die Bakterien verwendet wurde. Wie in Abb. 3.41 zu erkennen ist, verursachte die Infiltration von 1 mM MgCl₂ in keinem der zu untersuchenden Genotypen Effekte, die durch Infiltration von *Xcv* Stämmen oder *E. coli* DH10b verursacht wurden.

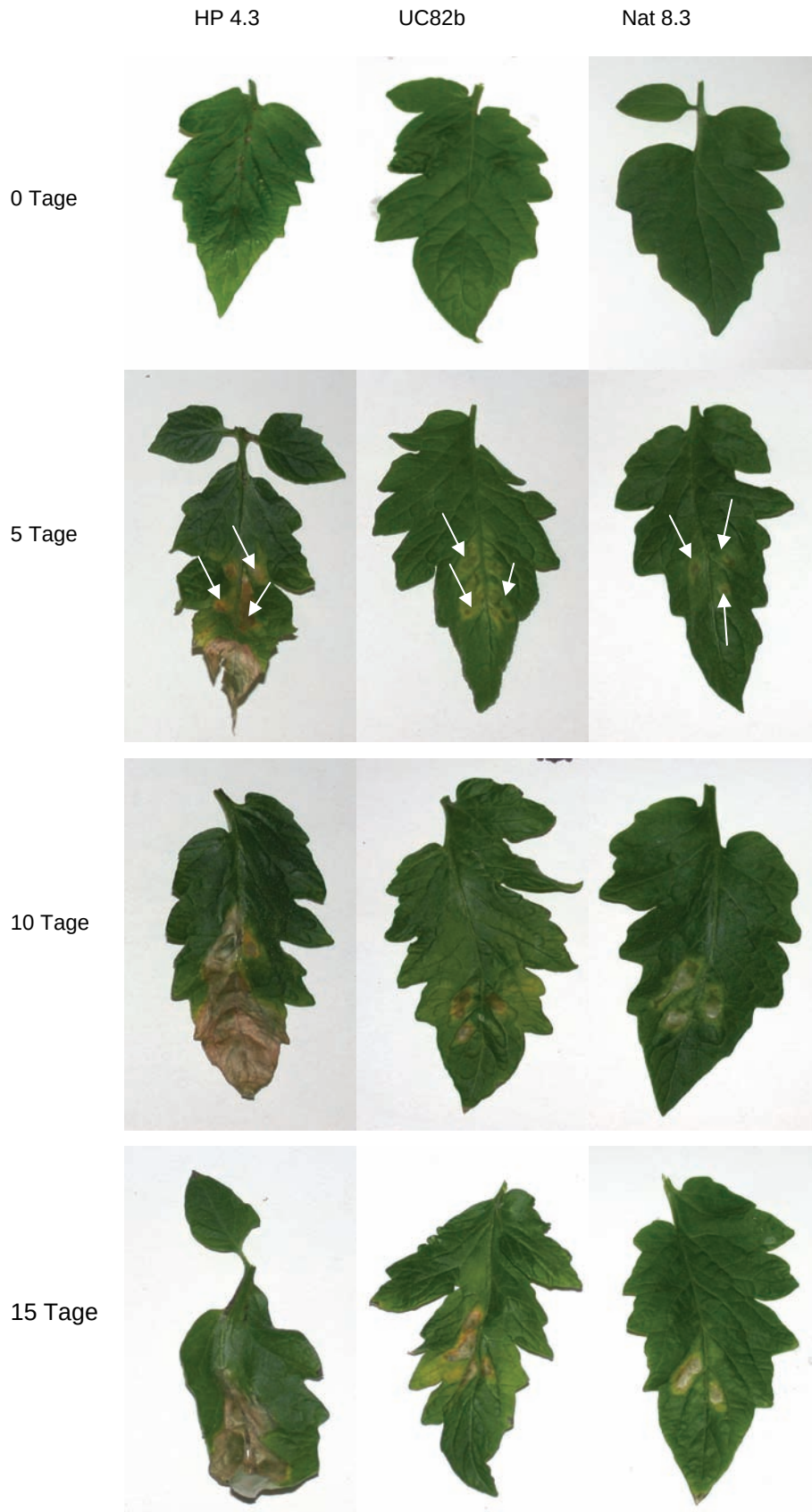


Abb. 3.37: Krankheitssymptome verursacht durch *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 in *SIMMP1/2*-RNAi (HP 4.3)-, Überexpressions (Nat 8.3)- und Wildtyppflanzen (UC82b). Gezeigt ist die Oberseite von Blättern sechs Wochen alter Pflanzen 0, 5, 10 und 15 Tage nach Inokulation mit einer Bakteriendichte von 10^4 cfu/ml. Die Infiltrationsstellen sind exemplarisch fünf Tage nach Infiltration durch Pfeile gekennzeichnet.

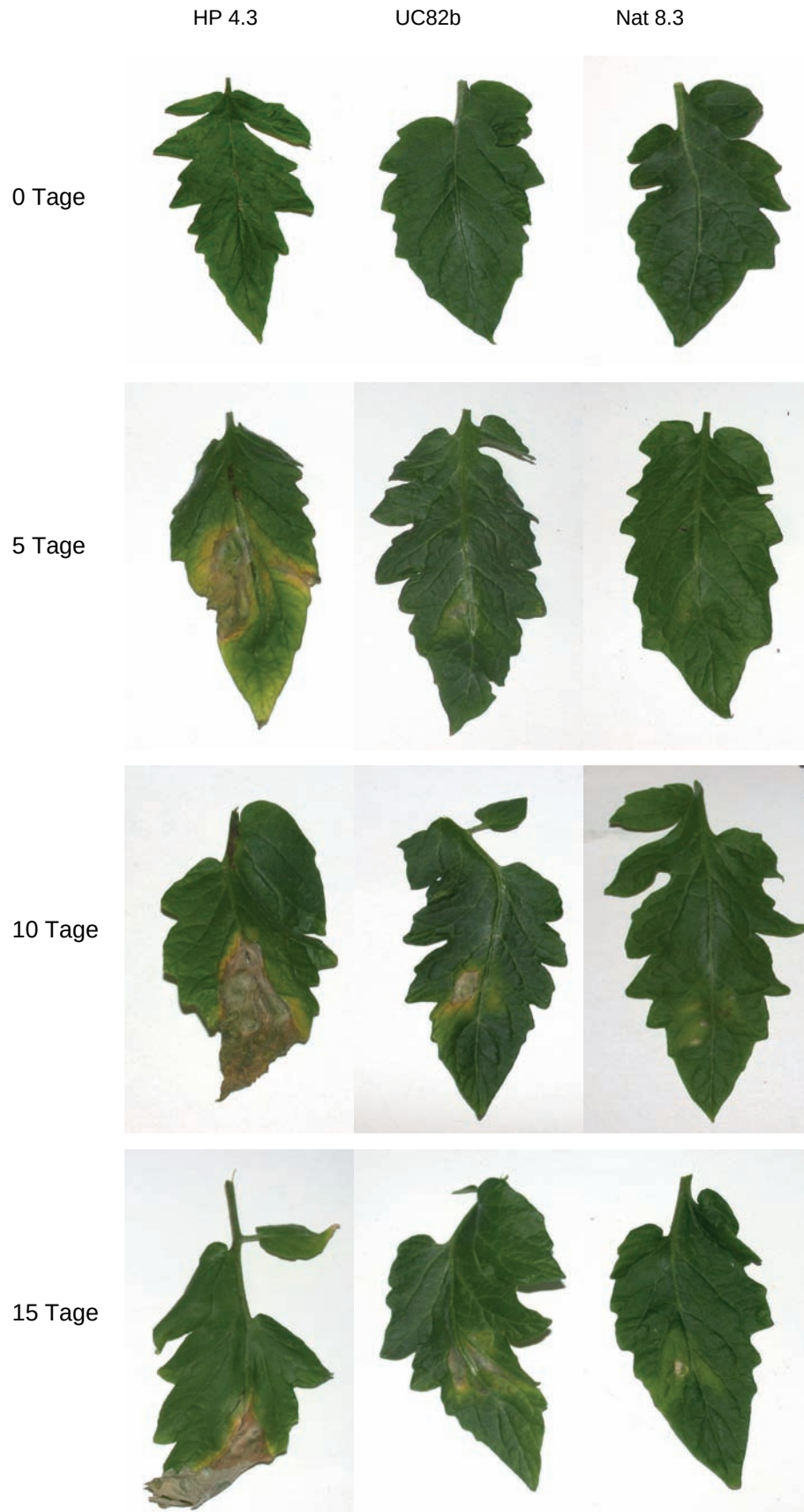


Abb. 3.38: Krankheitssymptome verursacht durch *X. campestris* pv. *vesicatoria* pDsK 200 in in *S/MMP1/2-RNAi* (HP 4.3)-, Überexpressions (Nat 8.3)- und Wildtyppflanzen (UC82b). Gezeigt ist die Oberseite von Blättern sechs Wochen alter Pflanzen 0, 5, 10 und 15 Tage nach Inokulation mit einer Bakteriendichte von 10^4 cfu/ml.

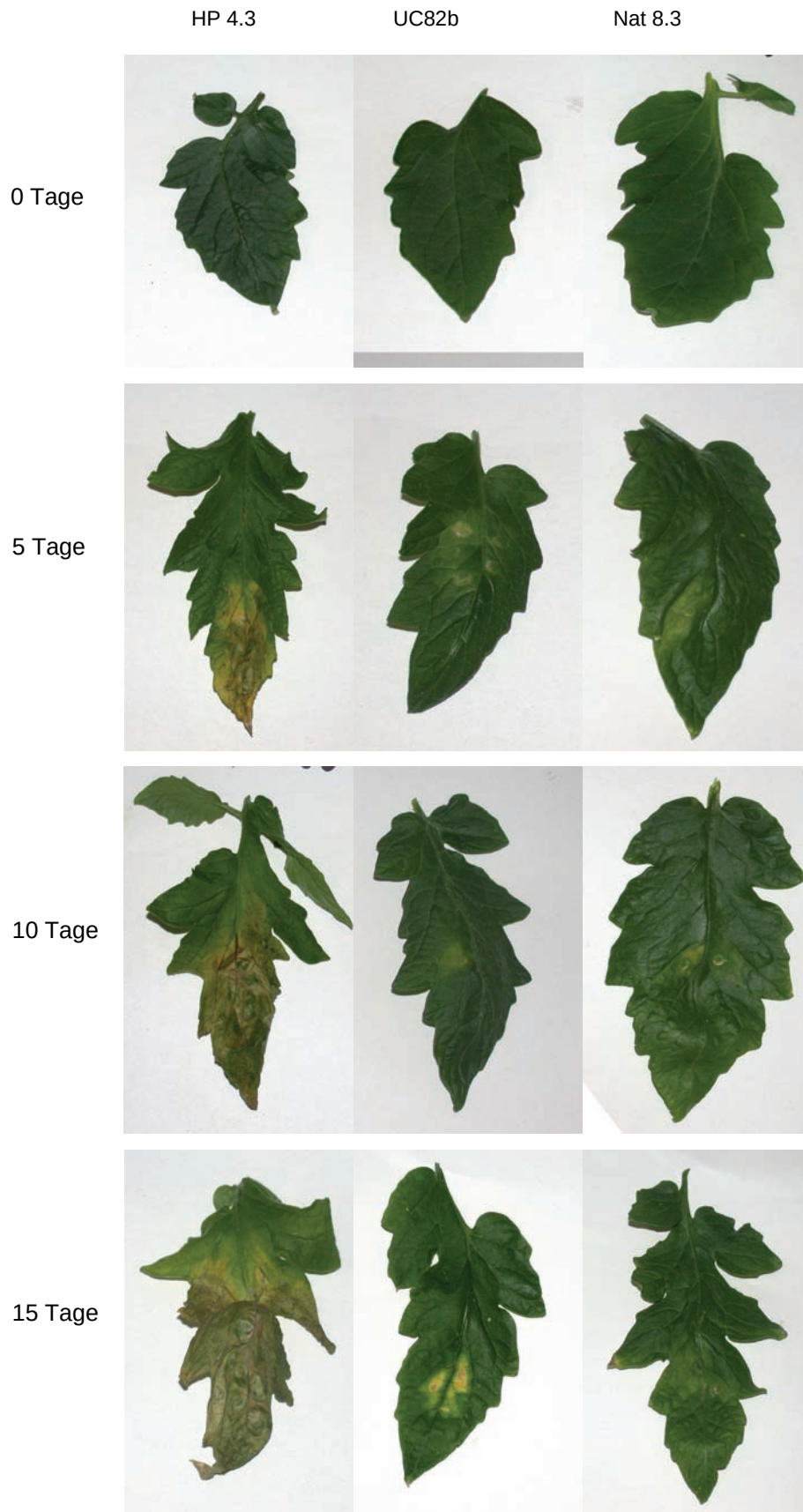


Abb. 3.39: Krankheitssymptome verursacht durch *X. campestris* pv. *vesicatoria* hrp A-G in in *SIMMP1/2*-RNAi (HP 4.3)-, Überexpressions (Nat 8.3)- und Wildtyppflanzen (UC82b). Gezeigt ist die Oberseite von Blättern sechs Wochen alter Pflanzen 0, 5, 10 und 15 Tage nach Inokulation mit einer Bakteriendichte von 10^4 cfu/ml.

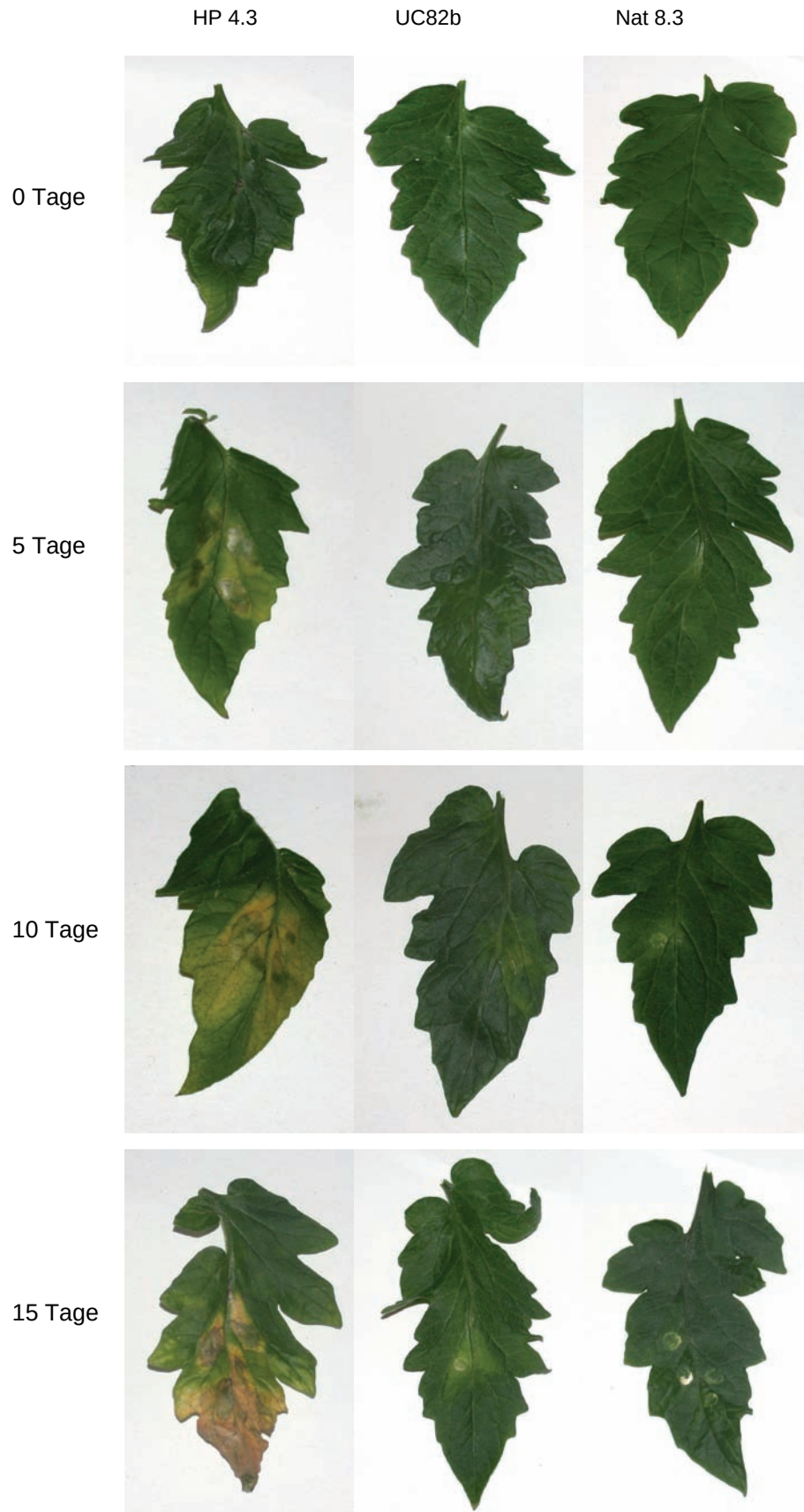


Abb. 3.40: Krankheitssymptome verursacht durch *E. coli* DH10b in in *SIMMP1/2*-RNAi (HP 4.3)-, Überexpressions (Nat 8.3)- und Wildtyppflanzen (UC82b). Gezeigt ist die Oberseite von Blättern sechs Wochen alter Pflanzen 0, 5, 10 und 15 Tage nach Inokulation mit einer Bakteriendichte von 10^4 cfu/ml.

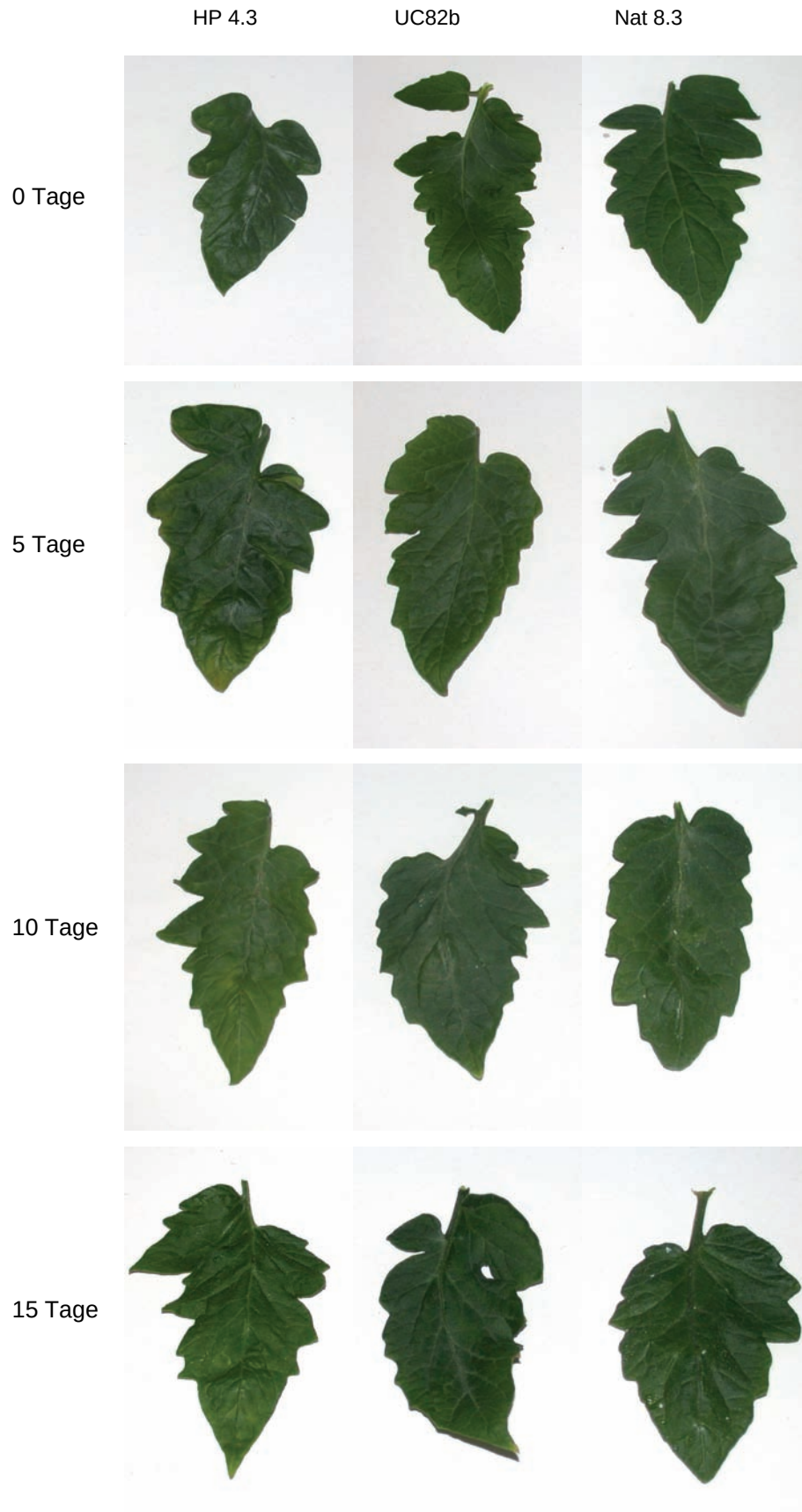


Abb. 3.41: Infiltrationskontrolle mit 1 mM MgCl_2 in in *S/MMP1/2*-RNAi (HP 4.3)-, Überexpressions (Nat 8.3)- und Wildtyppflanzen (UC82b). Gezeigt ist die Oberseite von Blättern sechs Wochen alter Pflanzen 0, 5, 10 und 15 Tage nach Inokulation mit einer Bakteriendichte von 10^4 cfu/ml.

3.9.5 Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* in Tomatenblätter nach Infiltration von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Nachdem beobachtet wurde, dass die drei verwendeten *Xcv* Stämme in *SIMMP1/2* RNAi-Pflanzen ein geringeres Wachstum aufweisen als in Wildtyp- und Überexpressionspflanzen und zusätzlich massive Reaktionen in Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen auslösen, sollte nun mittels RT-PCR, überprüft werden, ob es infolge der Infektion zu einer Induktion von *SIMMP1* und *SIMMP2* kommt.

Für den Versuch wurden sechs Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden mit einer Bateriaendichte von 10^4 koloniebildenden Einheiten (cfu)/ml infiltriert. Die Infiltration der Kontrollpflanzen erfolgte mit 1mM $MgCl_2$. Es wurden drei Pflanzen pro Genotyp infiltriert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8, Tage nach Infiltration), wurden Blätter geerntet (drei je Genotyp) und für die RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels RT-PCR verwendet.

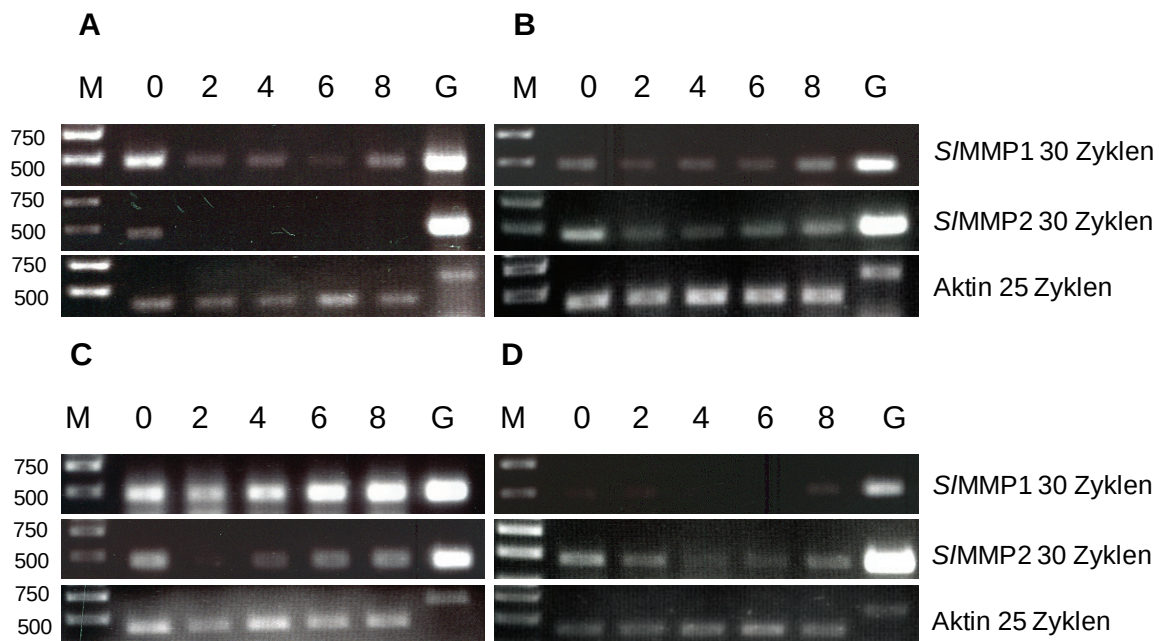


Abb. 3.42: RT-PCR zum Nachweis von *SIMMP1* und *SIMMP2* Transkripten in 6 Wochen alten Blättern von Wildtyp-Tomatenpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten (0 Tage, 2 Tage, 4 Tage, 6 Tage und 8 Tage) nach Inokulation mit 10^4 cfu/ml. **(A)** 1 mM $MgCl_2$, **(B)** Inokulation mit *Xcv* 85-10, **(C)** Inokulation mit *Xcv* pDsK 200, **(D)** Inokulation mit *Xcv* hrp A-G. PCR zum Nachweis von Aktin-Transkripten diente zur Abschätzung der Templatmenge und zur Überprüfung, ob die gewählte PCR-Zyklenzahl noch in exponentiellen Amplifikationsbereich liegt. Eine PCR mit genomischer Tomaten DNA (gDNA) diente als technische Kontrolle, und um Kontaminationen mit genomischer Tomaten DNA ausschließen zu können. Als Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas. Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

Abbildung 3.42 zeigt die Ergebnisse zur Überprüfung der Indizierbarkeit von *SIMMP1* und *SIMMP2* nach Infektion mit den verschiedenen *Xcv* Stämmen. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.42 **A**) ist eine Induktion der Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* nach Infektion mit dem avirulenten *Xcv* 85-10 pDsK 200-Stamm zu beobachten (Abb. 3.42 **C**). Im Gegensatz dazu war nach Infektion mit dem virulenten (*Xcv* 85-10) (Abb. 3.42 **B**) und dem *hrp*⁻defizienten Stamm (*Xcv* 85-10 *hrpA-G*) (Abb. 3.42 **D**) zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Induktion zu beobachten. Allerdings wurde *SIMMP2* nach Infektion mit diesen Stämmen konstant auf einen relativ niedrigen Spiegel exprimiert. Das ist insofern bemerkenswert, da *SIMMP2* keine konstitutive Expression in Blättern zeigt (Abb. 3.42 **A** und 3.10).

Auffällig ist auch die relativ starke Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* zum Zeitpunkt 0. Dies kann keine Reaktion auf die bakterielle Infektion darstellen, ist aber möglicherweise eine Reaktion auf die mit der Infiltration einhergehender mechanischer Belastung des Blattes.

4. Diskussion

Die Funktion von MMPs in Pflanzen ist bisher ungeklärt, wenngleich einzelne Informationen über eine mögliche Rolle beim Ab- und Umbau des Apoplasten, der pflanzlichen Entwicklung, Pflanze-Pathogen Interaktionen und Apoptose vorhanden sind (Pak et al, 1997, Maidment et al, 1999, Liu et al, 2001, Delorme et al, 2000, Combier et al, 2007).

Auch die Funktion von *SiMMP1* aus Tomate ist noch unklar, obwohl eine Induktion des Enzyms nach Fusicoccin (FC) Behandlung von Tomatenpflanzen während Analysen des Transkriptoms mittels Mikroarray beobachtet wurde (Frick und Schaller, 2002). *SiMMP1* wurde nach FC-Behandlung koordiniert zusammen mit einer NADPH-Oxidase induziert. Da die NADPH-Oxidase einen möglichen Auslöser der Hypersensitiven-Reaktion (HR) darstellt (Levin et al, 1994), wurde für die *SiMMP1* eine mögliche Rolle während der HR postuliert. Weiterhin wurde das Enzym zur Ermittlung der katalytischen Eigenschaften biochemisch charakterisiert (Frick, 2002). Hier konnte eine zweite MMP (*SiMMP2*) in Tomate identifiziert werden, mit noch unbekannten strukturellen, katalytischen und physiologischen Eigenschaften. Die Aufklärung der Funktion von *SiMMP1/2* stand im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Zur Aufklärung der Funktionen von *SiMMP1/2* im lebenden System sollte die Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von *SiMMP1/2* erfolgen, eine Expressionsanalyse in Tomatenpflanzen, die phänotypische und molekulare Analyse von *SiMMP1/2*-RNAi-Pflanzen sowie die Untersuchung der postulierten Funktion in der Pathogenantwort.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern wichtige Hinweise auf mögliche Funktionen von *SiMMP1/2* im Rahmen der pflanzlichen Entwicklung, sowie bei der Interaktion zwischen Tomatenpflanze und phytopathogenen Mikroorganismen, die in den folgenden Abschnitten im wissenschaftlichen Kontext diskutiert werden.

4.1 Identifizierung einer zweiten Tomaten-MMP (*SIMMP2*) und Ermittlung der cDNA Sequenz von *SIMMP2*

Ein Abgleich der *SIMMP1* cDNA mit einer Solanaceen-Datenbank (<http://solgenomics.net/>) führte zur Identifizierung eines EST-Klons (cLHT22F10) welcher auf Nukleinsäureebene eine 84%ige Sequenzähnlichkeit zur *SIMMP1* cDNA aufweist (Abb. 3.1). Unter Anwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) und anschließender Sequenzanalysen wurde die gesamte cDNA Sequenz von *SIMMP2* ermittelt. Im Vergleich zu *SIMMP1* ist die *SIMMP2* auf Aminosäureebene zu 77% (Abb. 3.7) identisch.

4.2 Strukturanalyse und Aufreinigung von *SIMMP2*

Die cDNA von *SIMMP2* scheint für ein Prä-Pro-Protein zu kodieren. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist am N-Terminus einen hydrophoben Bereich auf (Abb. 3.4), der typisch für Signalpeptide ist, die zur Einschleusung von Proteinen in das sekretorische System führen (Martoglio und Dobberstein, 1998). An das Signalpeptid schließt sich eine für MMPs typische Aminosäuresequenz, die Prodomäne, an. Diese beinhaltet das Motif PRCG(V/N)(P/A)D, den so genannten „Cysteine Switch“, welcher mit dem Zinkion in der katalytischen Domäne interagiert und dadurch das Enzym in einer inaktiven Form, dem so genannten Zymogen hält (Abb. 3.3).

Der Prodomäne werden zum einen die Funktion eines essentiellen, intramolekularen Chaperons (Baker et al, 1993, Volkov und Jordan, 1996), und zum anderen die Funktion eines regulativen, intramolekularen Inhibitors der enzymatischen Aktivität zugesprochen (Anderson et al, 1997, Boudreault et al, 1998 a). Weiterhin konnte für die *SIMMP2* das Zink-bindende-Motif HEXGHXXGXXH und ein den „Met-turn“ bildendes Methionin in der katalytischen Domäne identifiziert werden, welche charakteristisch für die Superfamilie der Metzinkine sind (Abb. 3.3) (Bode et al, 1993). Der katalytischen Domäne folgt am C-Terminus erneut ein hydrophober Bereich, bei dem es sich um einen Membrananker handelt, wobei an der Position 339 eine ω -site zur Verankerung des Proteins in der Plasmamembran mittels eines GPI-Ankers prognostiziert wird (<http://www.expasy.ch> big-PI Predictor). Alle abgeleiteten Strukturen von *SIMMP2* sind charakteristisch für die Proteinfamilie der Metzinkine (Stöcker et al, 1995). Ein gemeinsames Merkmal pflanzlicher MMPs ist das Fehlen der Hemopexin-

Domäne, das sie mit *C.elegans* teilen (Massova *et al.*, 1998; Maidment *et al.*, 1999). *SIMMP2* beinhaltet ebenfalls keine Hemopexin-Domäne.

Frühere biochemische Charakterisierungen von Metalloproteinasen oder Matrixmetalloproteinasen wurden an Enzymen durchgeführt, die in großen Mengen *in vivo* exprimiert werden und daher relativ leicht aus der Pflanze gereinigt werden konnten (Belozersky *et al.*, 1990, McGeehan *et al.*, 1992). Dieser Ansatz schien hier ungeeignet, da *SIMMP1* und *SIMMP2* nur in geringen Mengen gebildet werden, und in Tomate mindestens zwei MMPs existieren, die unter Umständen schwer voneinander trennbar sind und eine Unterscheidung der Enzyme aufgrund fehlender spezifischer Identifizierungssysteme schwer fallen sollte. Da jedoch zu Beginn dieser Arbeit bereits die cDNA und das Gen von *SIMMP1* vorlag und das von *SIMMP2* hier ermittelt wurde, erschien es sinnvoll, die Enzyme in heterologen Systemen zu exprimieren und anschließend die rekombinanten Enzyme zu reinigen und zu charakterisieren.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Expression einer MMP in einem heterologen System, deren anschließende Aufreinigung und biochemische Charakterisierung, ist die *SIMMP1* (Frick, 2002). Die gleiche Strategie wurde hier für *SIMMP2* verfolgt. Für die heterologe Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* wurde ein Konstrukt zur Expression der katalytischen Domäne im Vektor pET-21d(+) erstellt, wobei die C-terminale Transmembrandomäne durch einen His₆-Tag zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Agarose) ersetzt wurde. Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde das Konstrukt in den *E. coli* Stamm (BL 21 RIL) transformiert und die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Dies ermöglichte eine Ausbeute von 1 mg reines *SIMMP1* und *SIMMP2* aus 200 ml *E. coli*-Kultur, was ausreichend ist für die biochemische Charakterisierung. Ein weiteres Beispiel für die gelungene Aufreinigung und biochemische Charakterisierung einer MMP aus *E. coli* (BL 21 RIL) ist die *Pta1*-MMP aus der Weihrauch-Kiefer (*Pinus taeda*) (Ratnaparkhe *et al.*, 2009).

4.3 Biochemische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung zeigte für *SIMMP2* eine maximale Aktivität im neutralen Bereich um pH 7 während für *SIMMP1* eine maximale Aktivität bei pH 6,5 ermittelt wurde. Vergleicht man die ermittelten pH-Werte für die maximale Aktivität für *SIMMP1* und *SIMMP2* mit anderen pflanzlichen MMPs, so bestätigt sich diese Beobachtung. Nahezu alle

beschriebenen biochemischen Charakterisierungen erfolgten in einem pH-Bereich von 6,5 bis 7,5 (Frick, 2002, Maidment et al, 1999, Liu et al, 2001, Ratnaparkhe et al, 2009).

Dies ist hinsichtlich der Tatsache, dass für *S/MMP1* und *S/MMP2* eine Sezernierung in den Apoplasten prognostiziert wird, der unter normalen Bedingungen einen pH-Wert von 5,5 aufweist, erstaunlich.

Der pH-Wert in der Zellwand kann unter Einwirkung abiotischer oder biotischer Faktoren starken Schwankungen unterliegen. So führt Lichtstress oder Auxin vermitteltes Wachstum und Expansion zur Ansäuerung des Apoplasten. Zur Alkalisierung des Apoplasten kann es unter Einwirkung von Stress wie Trockenheit, Pathogenbefall oder Verwundung kommen (Hartung et al, 1988, Pfan, 1987, Schaller und Oecking, 1999). Des Weiteren ist bekannt, dass Einflüsse wie Trockenheit und Pathogenbefall einhergehen mit der Bildung von Reaktiven-Sauerstoff-Spezies (ROS) (Hasegawa et al, 2000, Lamb and Dixon, 1997, Klessig et al, 2000). Die Bildung von ROS im Apoplasten infolge von Pathogenbefall, führt zur Veränderung der Zellwandmorphologie durch Quervernetzung von Glykoproteinen (Torres et al, 2006).

Unter diesen zuvor beschriebenen Aspekten betrachtet, und im Hinblick auf die von Frick (2002) beobachtete Co-Expression von *S/MMP1* mit einer NADPH-Oxidase nach FC-Behandlung, kann aufgrund des pH-Optimums für *S/MMP1* und *S/MMP2* eine Rolle während dieser besonderen Ereignisse im Apoplasten suggeriert werden.

Betrachtet man die Resultate zur Ca^{2+} -Abhängigkeit von *S/MMP2* so fällt auf, dass eine Zugabe von Ca^{2+} -Ionen zu einer Steigerung der Enzymaktivität führte (Abb. 3.8). Eine Aktivitätssteigerung wurde auch von Frick (2002) für *S/MMP1* nach Zugabe von Ca^{2+} beobachtet. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da für MMPs die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen charakteristisch ist (Massova et al, 1998, Stöcker et al, 1995).

Calcium führt zur Ausbildung und Stabilisierung von Strukturen in MMPs, die für die Substratbindung verantwortlich sind, während Zinkionen essentiell für die katalytische Aktivität von MMPs ist (Dhanaraj et al, 1996). Eine sukzessive Aktivitätssteigerung in Abhängigkeit der Ca^{2+} Konzentration ist für MMPs zu erwarten.

4.4 Enzymkinetik

Die kinetischen Parameter von *SIMMP1* und *SIMMP2* wurden anhand eines synthetischen fluorogenen Peptids als Substrat unter steady-state Bedingungen bestimmt. *SIMMP1* und *SIMMP2* wiesen eine Michaelis-Menten-Kinetik auf und zeigten bei pH 6,5 bzw. 7 einen K_m -Wert von 19,5 μM bzw. 19,9 μM , eine Wechselzahl von 0,102 s^{-1} bzw. 0,460 s^{-1} und eine katalytische Effizienz von 0,010 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ bzw. 0,024 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. *SIMMP1* und *SIMMP2* zeigten nahezu identische katalytische Eigenschaften gegenüber dem verwendeten Peptidsubstrat. Dieses Resultat war zu erwarten, da aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung (Abb. 3.1 und 3.7) von *SIMMP1* und *SIMMP2* auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene es sich höchstwahrscheinlich um Enzyme mit redundanten Eigenschaften handelt. Die Tatsache, dass für MMPs redundante Eigenschaften angenommen werden folgt aus den Beobachtungen heraus, dass sie vergleichbare biochemische Eigenschaften aufweisen, was sich in eine hohe Überlappung der Substratspezifität bei *in vitro* Analysen zeigt. Ebenso konnte oft beobachtet werden, dass das Ausschalten einer einzelnen MMP zu keinem erkennbaren Effekt im zu untersuchenden Organismus führt, was darauf hindeutet, dass andere MMPs die Funktion übernehmen (Greenlee et al, 2007). So wurde z.B. für MMP2 und MMP9 aus der Maus redundante Funktionen während der Entwicklung der Langerhanszellen des Pankreas postuliert (Perez et al, 2004).

4.5 RT-PCR Analyse der Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* in verschiedenen Organen von *Solanum lycopersicum*

Neben der biochemischen Charakterisierung wurde die entwicklungsabhängige und gewebespezifische Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* durch semi-quantitative RT-PCR-Analysen überprüft. *SIMMP1* wurde in allen untersuchten Organen und Entwicklungsstadien exprimiert (Abb. 3.10), wobei die stärkste Expression in acht Tage alten Keimlingen und in Stängeln von sechs Wochen alten Pflanzen zu beobachten war. *SIMMP2* wurde im Gegensatz zur *SIMMP1* nicht in allen untersuchten Organen und Entwicklungsstadien exprimiert. In acht Tage alten Keimlingen, ist die Expression von *SIMMP2* in Wurzel und Hypokotyl deutlich stärker als in Kotyledonen. *SIMMP2* ist in sechs Wochen alten Pflanzen relativ stark im oberen Stängel und nur sehr schwach im unteren Stängel und Blüten in Stadium 1 (S1)

exprimiert. Eine konstitutive Expression von *SIMMP2* konnte in Blättern nicht beobachtet werden (Abb.3.10).

Die Tatsache dass *SIMMP1* und *SIMMP2* relativ hoch in allen untersuchten Organen von Keimlingen exprimiert werden, lässt auf eine Funktion der Enzyme während des Ab- und Umbaus der extrazellulären Matrix (ECM) im wachsendem Organismus vermuten. Die pflanzliche Zellwand formt ein Netzwerk vergleichbar einem Korsett, welches der Zelle Form und Stabilität verleiht. Wenn Pflanzenzellen wachsen und sich vergrößern, muss auch die Zellwand im gleichem Maße mitwachsen. Das Wachstum der Zellwand ist ein langsamer, sensibler Prozess, der genauestens reguliert werden muss, da Zellwände wachsender Zellen einem gewaltigen Innendruck ausgesetzt sind, vergleichbar mit 100-1000 Atmosphären. Eine höchsteffiziente Regulierung des Wachstums und Ab- und Umbau der Zellwand ist somit essentiell (Cosgrove, 2005).

Des Weiteren könnte die Expression von *SIMMP1* und *SIMMP2* in Wurzeln, zusätzlich zu den regulatorischen Funktionen in der Zellwand, auch auf eine Rolle in der Pathogenabwehr hindeuten. Wachsende Wurzeln sind im sie umgebenden Boden einer Vielzahl an Mikroorganismen und Phytopathogenen ausgesetzt (Bowen und Rovira, 1976). Das Wurzelwachstum im Boden kann zu Verletzungen führen, welche physikalische Öffnungen zu ihrer Umwelt darstellen, die von Phytopathogenen genutzt werden können um Pflanzen zu kolonisieren (Jackson und Taylor, 1996). Es ist bekannt dass während der Keimung hauptsächlich im Bereich des micropylaren Endosperms β -1,3-Glucanasen und Chitinasen (Morohashi und Matsushima, 2000, Wu et al, 2000) sowie Polyphenoloxidasen (Morohashi, 2002) exprimiert werden. Vielfach belegt ist, dass diese Enzyme, entweder allein oder in Kombination mit anderen, in die Pathogenabwehr involviert sind (Simmons 1994, Jach et al. 1995, Jongedijk et al, 1995, Lozovaya et al, 1998, Gomez et al, 2002). Ein hocheffektives Abwehrsystem in diesem sensiblen und exponierten Gewebe ist demzufolge unerlässlich.

Des Weiteren konnten Unterschiede im Expressionsmuster zwischen *SIMMP1* und *SIMMP2* in sechs Wochen alten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3.10). *SIMMP1* und *SIMMP2* wurden beide im unteren und oberen Stängel und in Blüten des Stadiums S1 exprimiert. In Blättern konnte keine konstitutive Expression von *SIMMP2* festgestellt werden und ebenso keine Expression in Blüten des Stadiums S2 und S3 (Abb. 3.10). Auch wenn für *SIMMP1* und *SIMMP2* redundante Eigenschaften prognostiziert werden, scheinen sie in adulten Pflanzen gewebespezifisch exprimiert zu werden, was darauf hinweisen könnte, dass sie spezifische Substrate und Funktionen in den jeweiligen Geweben aufweisen.

4.6 Histochemische Lokalisation von *S/MMP1* und *S/MMP2* in Hypokotyl und Wurzel von *Solanum lycopersicum* (UC82b)

Aufgrund der Strukturanalyse von *S/MMP1* und *S/MMP2* wird für die Enzyme eine Lokalisation in der ECM prognostiziert (Frick 2002, Kapitel 3.5). Dies sollte unter Anwendung immunohistochemischer Methoden *in vivo* bei Hypokotylen und Wurzeln untersucht werden. Zur Detektion von *S/MMP1* und *S/MMP2* kam eine Antiserum (anti-*S/MMP1*-IgGs) zur Anwendung, welches gegen die katalytische Domäne von *S/MMP1* gerichtet ist (Frick, 2002). Western Blot-Analysen zeigten, dass aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit zwischen den Enzymen eine Unterscheidung mittels anti-*S/MMP1* nicht möglich ist (Kapitel 3.6). Ebenso zeigte sich dass anti-*S/MMP1* auch eine MMP (*NtMMP1*) aus Tabak detektiert (Schiermeyer et al, 2009). Alle nun diskutierten Resultate beziehen sich auf die Lokalisation von *S/MMP1/2*, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere, bisher nicht identifizierte MMPs in der Tomate vorhanden sind, die mit dem Antiserum kreuzreagieren.

In Menschen und Tieren ist von einer Vielzahl an MMPs bekannt, dass diese in der Plasmamembran lokalisiert sind (Sato et al, 1994, Cao et al, 1995). Diese werden der Klasse der „membrane-type“ Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) zugeordnet (Nagase und Woessner, 1999, Seiki, 1999). Für *S/MMP1* konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran nach transienter Expression der nativen MMP in Zwiebelepidermiszellen gezeigt werden (Zimmermann, 2004). Schiermeyer konnte 2009 ebenfalls eine Lokalisation von *NtMMP1* in der Plasmamembran von Tabak-BY-2 Zellen beobachten.

Für *S/MMP1/2* konnte die prognostizierte Lokalisation in der Zellwand von Hypokotylen und Wurzeln bestätigt werden, und dadurch die Annahme, dass es sich um MT-MMPs handelt (Abb. 3.11). Besonders abundant scheint *S/MMP1/2* in Zellwänden der Epidermis bzw. Rhizodermis und in Zellwänden des kortikalen Gewebes vorzukommen. Ob *S/MMP1/2* Zellwandstrukturen in Hypokotylen und Wurzeln verändert, indem es mit Strukturproteinen des Kortex bzw. der Epidermis interagiert, und so bei der Entstehung von Seitentrieben im Hypokotylen und lateraler Seitenwurzeln in Wurzeln eine Rolle spielen, soll an späterer Stelle in dieser Arbeit diskutiert werden.

4.7 Phänotypische Charakterisierung von *SIMMP1/2*-RNA-Interferenz-Pflanzen (RNAi)

Zur funktionellen Charakterisierung von *SIMMP1* in Tomate wurden in dieser Arbeit transgene Pflanzen eingesetzt, in denen die Expression von *SIMMP1* durch RNA-Interferenz unterdrückt sein sollte. Es galt zunächst zu überprüfen, ob das *SIMMP1* "Silencingkonstrukt" in den Tomatenpflanzen tatsächlich zur Unterdrückung der *SIMMP1*-Expression auf Transkriptebene führt. Ebenso sollte überprüft werden, ob aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen *SIMMP1* und *SIMMP2* auch die Expression von *SIMMP2* beeinträchtigt ist. RT-PCR Analysen zeigten, dass in Hypokotylen von RNAi-Pflanzen eine vollständige Herunterregulierung von *SIMMP1* und *SIMMP2* auf Transkriptebene erzielt wurde. In Blättern wurde eine deutliche Reduktion von *SIMMP1* Transkripten erreicht. *SIMMP2* Transkripte konnten in Blättern von RNAi-Pflanzen nicht detektiert werden (Abb. 3.14), was nicht verwunderlich ist, da bereits beobachtet wurde, dass *SIMMP2* nicht konstitutiv in Blättern exprimiert wird (Abb. 3.10).

Zur phänotypischen und molekularen Charakterisierung von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen wurden unabhängig transformierte Linien verwendet, welche mittels der Southern-Blot-Methode identifiziert wurden (Kapitel 3.6.1). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf Positionseffekte der Insertion zurückzuführen sind.

Von einer Vielzahl an MMPs wird eine Funktion während der Embryogenese in Tieren berichtet. Die Inhibierung der MMP-Aktivität durch TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases) verursacht dosisabhängig in 9 Tage alten Embryonen von Ratten eine Inhibierung des Wachstums und der Entwicklung des Embryos, und reduziert massiv dessen Überlebensfähigkeit. Im japanischen Feuersalamander (*Cynops phyrrogaster*) wurde eine MMP identifiziert, welche zeitlich und gewebespezifisch während den Phasen der Gastrulation exprimiert wird (Bigio und Seyoum, 1999, Suzuki et al, 2001). Bei Pflanzen konnte noch kein direkter Zusammenhang zwischen MMP-Aktivität und Embryonalentwicklung hergestellt werden, obwohl die Expression von *Pta1*-MMP in Embryonen der Weihrauchkiefer (*Pinus taeda*) gezeigt werden konnte (Ratnaparkhe et al, 2009). Es ist auch bekannt, dass MMPs in Pflanzensamen während der Keimung eine Funktion in der Bereitstellung von Speicherproteinen einnehmen (Belozersky et al, 1990). Die Befunde dieser Arbeit zeigen, dass *SIMMP1/2* keine unersetzbare Funktion während der Embryogenese oder Keimung zu haben scheinen, da Samen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen keine Defekte in der Keimungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp aufzeigen. Ebenso

entwickeln sich *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen bis zwei Wochen nach der Keimung ohne besondere Auffälligkeiten.

Zwei Wochen nach der Keimung zeigen *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen einen starken Phänotyp, der durch die Ausbildung dunkler, nekrotisch aussehender Flecken am Hypokotyl gekennzeichnet ist (Abb.3.17). Histologische Untersuchungen bei zwei und vier Wochen alten *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen zeigten, dass die Epidermis stellenweise zu degenerieren scheint, und es erfolgt die Einlagerung von Sekundärmetaboliten (phenolische Substanzen, Suberin/Cutin, Kallose) in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht (Kapitel 3.6.5, 3.6.7). Die Quantifizierung des Gehalts an gebundenen und löslichen phenolischen Substanzen zeigte, dass diese in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen massiv akkumulieren (Kapitel 3.6.9).

Des Weiteren konnte mittels RT-PCR-Analysen in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine stärkere Expression von Genen gezeigt werden, welchen eine Rolle während der Apoptose zugesprochen wird (Kapitel 3.6.8) (Kim et al, 2003, Vailleau et al, 2002).

Die Begrenzung des in RNAi-Pflanzen beobachteten Zelltods auf die Epidermis und die Einlagerung von Phenolen in subepidermalen Zellschicht korreliert mit der im Wildtyp beobachteten Lokalisation von *SIMMP1/2*. *SIMMP1*- und *2* befinden sich in zwei Wochen alten Hypokotylen nur in Zellwänden der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht (Abb. 3.20). Bei Hypokotylen von vier Wochen alten Pflanzen konnte eine Lokalisation von *SIMMP1/2* in Zellwänden von Epidermiszellen, Zellen der subepidermalen Zellschicht und im Kortex beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass die beobachteten Effekte direkt auf die Herunterregulierung von *SIMMP1/2* zurückzuführen sind.

Dirk Zimmermann konnte das *in vivo* Substrat von *SIMMP1* identifizieren (persönliche Mitteilung). Es stellte sich heraus, dass es sich dabei um eine subtilisinähnliche Serinprotease (P69B) handelt, die auch durch *SIMMP1* und *SIMMP2* gespalten und inaktiviert zu werden scheint. Ebenso gibt es erste Hinweise die dafür sprechen, dass Überexpression von P69B in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) zu vermehrten Zelltodereignissen und ROS Bildung führt (persönliche Mitteilung von Dirk Zimmermann). Diese Beobachtung korreliert mit den beobachteten Effekten in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Kapitel 3.6.5, 3.6.7, 3.6.9).

Das *in vivo*-Substrat von P69B ist bekannt. Das Tomatenprotein LRP, welches in der Zellwand lokalisiert ist, wird in Viroid-infizierten Pflanzen von der pathogen-induzierbaren-Subtilase P69B prozessiert (Tornerio et al, 1996). LRP gehört zur Familie der „leucine rich repeat“- (LRR) Proteinen, welche an der Erkennung und Initiierung verschiedenster

Signalprozesse in der ECM eukaryotischer Zellen beteiligt sind (Kobe und Deisenhofer, 2002). Die exakte Funktion des Tomatenproteins LRP ist jedoch bisher unbekannt.

Die Aktivität von LRRs führt zu Zelltodereignissen im pflanzlichem Organismus, welche unter dem Begriff „Hypersensitive Reaktion“ (HR) bekannt sind (Belkhadir et al, 2004). Die HR ist charakterisiert durch einen raschen Calcium- und Ionenfluß, die Bildung von ROS in der ECM, sowie die Akkumulation und Oxidation von phenolischen Substanzen, was zur Veränderung der ECM-Morphologie führt, die Expression von Abwehrgenen am Ort der Infektion und im umgebenden Gewebe, und Zelltodereignisse, die dem biotrophen Pathogen die Lebensgrundlage entziehen und dadurch dessen Ausbreitung verhindern (Nicholson und Hammerschmidt 1992, Greeberg et al, 2003, Nimchuk et al, 2003, Park 2005).

Für *SIMMP1* konnte eine Co-Expression mit dem Enzym NADPH-Oxidase nach FC-Behandlung gezeigt werden, was eine direkte Rolle des Enzyms während der HR vermuten lässt (Frick, 2002). Die NADPH-Oxidase ist ein membrangebundener Enzymkomplex welcher die Bildung von Sauerstoff zum Superoxidanionradikal (O_2^-) in der ECM katalysiert (Torres et al, 2006). O_2^- alleine ist nicht in der Lage Zelltod auszulösen, stellt aber ein wichtiges Signalmolekül dar, welches zu Zelltodereignissen führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Proteasen im Zusammenwirken mit Pflanzenhormonen wie der Salicylsäure und Ethylen an der Initiation von Zelltodereignissen beteiligt sind (Mazel und Levine, 2000, Chae und Lee, 2001). Die vermehrt beobachteten Zelltodereignisse in *SIMMP1/2-RNAi*-Pflanzen könnten darauf zurückzuführen sein, das die regulatorische Wirkung von *SIMMP1/2* auf die P69B Funktion nicht mehr gegeben ist, und es dadurch zu konstitutiven Zelltodereignissen in *SIMMP1/2-RNAi*-Pflanzen kommt. Es konnte auch gezeigt werden dass *SIMMP1/2-RNAi*-Pflanzen eine erhöhte Ethylenproduktion aufweisen (Kapitel 3.8). Ethylen ist involviert in den Zelltod als Reaktion auf biotische und abiotische Faktoren, während der Seneszenz, in der durch Hypoxie induzierten Luftwurzelsbildung und während der Apoptose bei der Bildung des Endosperms in Mais (Orzaez und Granell, 1997, He et al, 1996, Young et al, 1997). Ethylen scheint aber nicht essentiell für die Auslösung der HR zu sein; seine Aktivität fördert Zelltodereignisse und trägt zur Ausbildung von HR Symptomen während der pathogeninduzierten HR bei (Bent et al, 1992, Lund et al, 1998).

Die beobachtete Akkumulation von Suberin und Cutin in peripheren Zellen des Kortex kann auf die vermehrt auftretenden Zelltodereignisse in der Epidermis und in der subepidermalen Zellschicht zurückzuführen sein. Suberin und Cutin dienen als Matrix für Wachse, und bilden durch ihren hydrophoben Charakter wasserundurchlässige Schichten. Derart ausgerüstete Zellen finden sich häufig in inneren (Caspary-Streifen) und äußeren Abschlussgeweben

(Rhizodermis), mit der Funktion den Wasserdurchtritt zu kontrollieren oder zu verhindern. Bei Verletzungen bilden sie eine physikalische Barriere zwischen Pflanze und Umwelt, was auch den Eintritt von Phytopathogenen in den pflanzlichen Organismus unterbindet (Kolattukudy, 1980, 1985). Die Akkumulation von Kallose in peripheren Zellen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen kann ebenso wie die Akkumulation von Suberin und Cutin als eine Reaktion auf Zelltodereignisse in der Epidermis und subepidermalen Zellschicht angesehen werden. Sie stellt eine physikalische Barriere für eindringende Pathogene dar, welche die Ausbreitung dieser verhindern soll, und verhindert Wasserverluste (Jacobs et al, 2003).

Phenolische Substanzen mit antimikrobieller Wirkung wurden in allen untersuchten Pflanzenarten gefunden. Manche scheinen konstitutiv gebildet zu werden, manche spezifisch als Reaktion auf eindringende Pathogene. Ein gemeinsames Merkmal vieler Pflanzen auf eindringende Pathogene ist die Veresterung von Ferulasäure mit der Zellwand. Ebenso kommt es zur Bildung von Benzoessäure und Phenylpropanoiden, zur Lignifizierung und Ausbildung von Papillen als Reaktion auf die Invasion. Diese Vorgänge dienen dem Ziel, die Ausbreitung der Pathogene zu verhindern, bis sekundäre Abwehrmaßnahmen zum Wirken kommen (Nicholson und Hammerschmidt, 1992). Geht man von einer konstitutiven HR infolge der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* aus, könnte die erhöhte Akkumulation an phenolischen Substanzen Teil dieser Reaktion sein. Da phenolische Substanzen auch zytotoxisch wirken kann man nicht mit Gewissheit ausschließen, dass der beobachtete Zelltod auf diese Wirkung zurückzuführen ist.

Des Weiteren waren in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen Veränderungen zu beobachten, die gemeinhin mit Seneszenz in Verbindung gebracht werden. So kam es zum vorzeitigen Absterben und schließlich zum Abwurf der Kotyledonen (Abb. 3.17, B) und in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen, die älter als acht Wochen sind, auch der ältesten Fiederblätter (Abb. 3.18, B). Weiterhin zeigte sich bei Betrachtung von Hypokotyl-Querschnitten von *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen (Kapitel 3.6.7), eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Chlorophyll Autofluoreszenz in der Epidermis und in den subepidermalen Zellschichten. In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen scheint die Anzahl an Chloroplasten geringer als im Wildtyp und die Chloroplasten scheinen nur im kortikalen Gewebe lokalisiert zu sein. Als Phytohormon an der Auslösung von Seneszenzprozessen beteiligt ist das Ethylen, für das in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen erhöhte Konzentrationen gemessen wurden. Eine weitere Reaktion auf Ethylen ist die Epinastie, die auch in RNAi-Pflanzen auftrat. Initiale Symptome der Ethylen-induzierten Seneszenz sind das Welken und die Abszission von Blütenblättern oder Blättern. und die

Abszission dieser. Während der Seneszenz werden aus älteren Blättern Reservestoffe mobilisiert und in jüngere Blättern oder Samen transportiert (Nooden, 1988). Die Seneszenz geht auch einher mit einer farblichen Veränderung der Blätter von grün zu gelb. Dies erfolgt durch Abbau von Chlorophyll und Synthese von Anthocyanen und phenolischen Substanzen (Matile et al, 1999). Es konnte beobachtet werden, dass exogene Applikation von Ethylen bei vielen Dikotyledonen zur Initiation der Seneszenz in Blütenblättern führt (Woltering und Doorn, 1988, Reid und Wu, 1992). In *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana sylvestris* konnte gezeigt werden, dass Ethylen einen regulatorischen Einfluss auf die Blattseneszenz ausübt (Jing et al, 2002, Yang et al, 2008).

Ethylen führt zur Reduzierung der endogenen Indol-3-Essigsäure (IAA) Konzentration, einem Inhibitor der Abszission in der Lamina und Petiole und beeinflusst negativ dessen Transport. In der Abszissionszone stimuliert Ethylen die *de novo*-Synthese und Sekretion von Zellwand-hydrolysierende Enzymen (Suttle et al, 1991). In *Arabidopsis thaliana* konnte Ethylen als essentiell für die Abszission von Blütenblättern identifiziert werden (Butenko et al, 2003, Patterson und Bleeker, 2004). Ebenso kommt es während der Seneszenz und Abszission im pflanzlichen Gewebe zu massiven zellulären und morphologischen Veränderungen, bei denen neben pflanzlichen Hormonen auch Proteasen involviert sind (Bleeker und Patterson, 1997). Die Tatsache dass die Herunterregulierung von *SIMMP1/2* zu massiven zellulären und morphologischen Veränderungen führt (Kapitel 3.6), und die beobachtete stärkere Induktion von Genen welche für Enzyme des Ethylenbiosyntheseweges kodieren, die erhöhte Ethylenproduktion (Abb. 3.29 und Kapitel 3.8) und der Einfluss von *SIMMP1/2* auf die ECM und ihr proteolytischer Charakter sprechen für die Involvierung von *SIMMP1/2* bei Vorgängen wie Seneszenz und bei indirekte Effekte welche durch Stress verursacht werden, wie Abszission.

4.8 Untersuchungen zur Wurzelentwicklung in *SIMMP1/2*-RNAi- und Wildtyp-Pflanzen

Wie in Kapitel 3.7 beschrieben, wirkt sich die Herunterregulierung von *SIMMP1/2* deutlich negativ auf die Wurzelentwicklung aus. *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen entwickeln kleinere Wurzeln als Wildtyp-Pflanzen, was im Vergleich der Gesamtwurzellängen und der Anzahl an lateralen Seitenwurzeln deutlich wird.

Für *At1-At5MMPs* wurde ebenfalls über RT-PCR-Analysen die Expression in Wurzeln gezeigt (Maidment et al, 1999). Ihre genaue Funktion in der Wurzelentwicklung ist jedoch ungeklärt. Für P69B, welche als ein *in vivo*-Substrat von *S/MMP1/2* identifiziert wurde, konnte nur eine schwache Expression in der Wurzel nachgewiesen werden. Auch nach Applikation eines Pathogens wurde keine nennenswerte Expressionssteigerung beobachtet (Tornerio et al, 1997). Dies lässt vermuten, dass P69B in der Wurzel nicht das *in vivo*-Substrat von *S/MMP1/2* darstellt.

Die beeinträchtigung der Wurzelentwicklung in *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen lässt sich möglicherweise durch die bekannten Wirkungen von Ethylen auf die Wurzel- und Seitenwurzelbildung erklären (Feldman, 1984). Für Ethylen wird eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Zelltodereignissen während der Adventivwurzelbildung postuliert (Mergemann und Sauter, 2000). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ethylen sich dosisabhängig negativ auf die Wurzellänge und auf die Seitenwurzelentwicklung auswirken kann (Goodlass und Smith, 1978, Ivanchenko et al, 2008).

Während Mikroarray-Analysen (Kapitel 3.6.3) wurde beobachtet, dass in *S/MMP1/2*-RNAi-Pflanzen das für Seitenwurzelbildung erforderliche *diageotropica* Gen (*dgt*), welches für ein Cyclophilin (*S/CYP*, gi: 170439) mit einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität kodiert, herunterreguliert ist. Das *dgt* Gen spielt eine Rolle bei Auxin-vermittelten Wachstums- und Entwicklungsvorgängen sowie bei Reaktion auf Umwelteinflüsse (Oh et al, 2006). Ein Ausschalten des *dgt*-Gens in Tomate führt zur Unfähigkeit, Seitenwurzeln zu bilden (Ivanchenko et al, 2006).

Bei der Entstehung lateraler Seitenwurzeln, die sich aus den Perizykelzellen der Hauptwurzel entwickeln, müssen die Seitenwurzeln während des Wachstums die Endodermis, die Wurzelrinde und die Rhizodermis durchbrechen. Ob *S/MMP1/2* Zellwandstrukturen in der Wurzel verändert, indem es mit Strukturproteinen des Kortex bzw. der Epidermis interagiert, und so bei der Entstehung lateraler Seitenwurzeln eine Rolle spielt, ist momentan noch ungeklärt. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Funktionsstudien über die *S/MMP1/2* berücksichtigt werden.

4.9 cDNA-Mikroarray Expressionsanalyse in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp

Nachdem beobachtet wurde, dass die Transformation von Wildtyp-Tomatenpflanzen mit dem *SIMMP1*-RNAi-Konstrukt zu einer vollständigen Herunterregulierung von *SIMMP1/2* auf Transkriptebene in Hypokotylen führt (Abb. 3.14), und dies in einem sichtbaren Phänotyp resultiert (Kapitel 3.6.4), wurde mittels Mikroarray-Analysen untersucht, wie sich der Verlust von *SIMMP1/2* auf die Genexpression in Hypokotylen von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auswirkt, und ob diese mit den phänotypischen Veränderungen korreliert. Für diesen Versuch wurden Pflanzen von drei unabhängigen (Kapitel 3.6.1) *SIMMP1/2*-RNAi-Linien (HP 2.9, HP 4.5, HP 1.6) verwendet, und mit UC82b-Pflanzen als Wildtyp-Kontrolle verglichen. Auffällig erhöht war in den RNAi-Pflanzen der Anteil an Genen, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen, bei Stressreaktionen, bei Reaktionen auf abiotische und biotische Reize, bei Transportvorgängen spielen, und Gene die an noch unbekannten biologischen Prozessen beteiligt sind (Abb. 3.16).

In diesem Abschnitt sollen nun die Resultate der Mikroarray-Analyse im wissenschaftlichen Kontext und im Bezug auf die phänotypischen Beobachtungen diskutiert werden.

Während der Mikroarray-Analysen wurden einige in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen stärker exprimierten Gene identifiziert, denen eine mögliche Funktion in der Zellwand zukommt. Dies beinhaltet Gene, welche für UDP-Glucuronat-Decarboxylase-3 (SGN-U215820), Pectat-Lyase (SGN-U212774), Pektinesterase (SGN-U213559), eine extrazelluläre Subtilisin-ähnlichen Protease (*SISBT3*) (SGN-U212604), eine Ascorbat Oxidase (SGN-U214702) und für Prolin-reiche Proteine (SGN-U213316) kodieren. UDP-Glucuronat-Decarboxylase-3 ist ein Enzym welches bei der Synthese von Hemicellulose beteiligt ist (Bindschedler et al, 2005). Pectat-Lyasen spalten nicht-veresterte Pektine, welche einen wesentlichen Bestandteil der Primärwand darstellen (Marin-Rodriguez, 2002). Pektinesterasen können die Esterbindungen zwischen den Galakturonsäureresten von Pektinen aufbrechen, und dadurch Pektine degradieren (Tucker und Zhang, 1996). Prolin-reiche-Proteine sind wesentliche Bestandteile der Zellwände und nehmen eine Funktion als Strukturproteine ein (Showalter, 1993). Die genaue Funktion von *SISBT3* ist noch nicht bekannt, da es sich jedoch um eine extrazelluläre Protease handelt, kann man nicht ausschließen, dass sie möglicherweise an der Strukturgestaltung in der Zellwand beteiligt ist (Ottmann et al, 2009, Cedzich et al, 2009). Ascorbat-Oxidasen stellen das wichtigste und möglicherweise einzige Antioxidantsystem in der Zellwand dar. Ihre Aktivität ist essentiell für die pH-Homöostase in der Zellwand

(Pignocchi et al, 2003). Diese soeben beschriebenen Gene üben alle eine Funktion in der Zellwand bei der Strukturgestaltung oder während Signalprozessen aus. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit den zuvor beschriebenen phänotypischen Veränderungen der Zellwandmorphologie (Kapitel 3.6.5, 3.6.7).

In Kapitel 3, Tabelle 5 sind Gene aufgelistet, welche eine Funktion in der Photosynthese einnehmen, oder mit dieser assoziiert sind. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass deutlich mehr dieser Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen im Vergleich zum Wildty-Hypokotylen herunterreguliert sind. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen eine geringere Autofluoreszenz von Chloroplasten detektiert wurde (Kapitel 3.6.7). Dies kann auch ein möglicher Hinweis auf vermehrt auftretende Seneszenz in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen sein.

Eine Vielzahl von Genen, welche an Transportvorgängen beteiligt sind, wurden in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen als differentiell reguliert identifiziert (Kapitel 3, Tabelle 4). Besonders interessant sind solche, welche für Vakuolar-Transporter kodieren. Vakuolen nehmen essentielle Funktionen im pflanzlichen Organismus ein. Sie können 40-90 % des Zellvolumens einnehmen, sorgen für den Turgor und verleihen der Pflanze Stabilität. Sie sind zudem wichtige Speicherorgane für sekundäre Metabolite und dienen auch der Entgiftung der Zellen (Yazaki, 2005). Das Gen welches für die Untereinheit G des vakuolären ATPase-Komplexes kodiert (SGN-U216066) wird in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen stärker exprimiert. H^+ -ATPasen generieren einen elektrochemischen Protonen-Gradienten welcher die treibende Kraft für Transportvorgänge darstellt (Sze et al, 1999). Der Transport von Glucoside phenolischer Substanzen durch ABC-Transporter wie p-Hydroxyzimtsäure oder p-Hydroxybezoessäure in die Vakuole wird unter Ausnutzung eines elektrochemischen Protonen-Gradienten bewerkstelligt (Yazaki, 2005). Ebenso konnte ein Gen welches für eine vakuolaren Malat/Fumarat Transporter (SGN-U224652) kodiert identifiziert werden. Diesem wird eine Funktion bei der Regulierung der pH-Homöostase im Cytosol zugeschrieben (Hurth et al, 2005). Die Aktivität von Vakuolentransportern ist essentiell für die zelluläre Funktionalität bei Pflanzen, und die beobachteten Genexpressionsänderungen könnten auf die vermehrte Bildung phenolischer Substanzen und ihren Transport in die Vakuole zurückzuführen sein.

Des Weiteren wurden viele Gene als signifikant differentiell reguliert identifiziert, welche eine Funktion in der pflanzlichen Stressantwort und der Reaktion auf biotische und abiotische Reize zugesprochen wird (Kapitel 3.6.3, Tabelle 2 und 3). Darunter fallen Gene welche beim Zucker- (SGN-U212862, SGN-U225515, SGN-U212825, SGN-U219866, SGN-U212714,

SGN-U225539, SGN-U225521) beim Aminosäuren- (SGN-U225512, SGN-U213123, SGN-U216928) und beim Lipidmetabolismus (SGN-U223668, SGN-U217927) eine Rolle spielen. Des Weiteren sind Gene in ihrer Expression verändert, die für "Pathogenesis-Related" (PR) Proteine kodieren (SGN-U212989, SGN-U218758, SGN-U213790), für Gene des Wundsignalweges (SGN-U212777), der Ethylenbiosynthese (SGN-U213523) und Gene welche für Abwehrproteine kodieren oder für solche die mit diesen Vorgängen assoziiert sind (SGN-U223601, SGN-U223030, SGN-U216073, SGN-U215423, SGN-U219974, SGN-U218882, SGN-U213159, SGN-U212639). Dies deutet darauf hin, dass es aufgrund der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* zu massiven Veränderungen des pflanzlichen Metabolismus sowie zur Induktion von Abwehrgenen kommt. Welche der beobachteten Effekte direkt aus dem Verlust der *SIMMP1/2* Aktivität resultieren und welche möglicherweise sekundärer Natur sind, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen.

4.10 Expression von *SIMMP1/2* in Reaktion auf verschiedene Stimuli

Für die *SIMMP1/2* konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur entwicklungsabhängig exprimiert werden, sondern auch in Reaktion auf verschiedene Stimuli. Für *SIMMP1* konnte eine starke Induktion nach Fusiccocin-Behandlung (FC) mittels Mikroarray-Analysen gezeigt werden (Frick und Schaller, 2002). Dieses Resultat konnte in dieser Arbeit mittels RT-PCR-Analysen bestätigt werden (Kapitel 3.9.1). Die Induktion von *SIMMP1* nach FC-Behandlung war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen gering. Der Induktionsfaktor für *SIMMP2* scheint größer zu sein als für *SIMMP1*, was auch an der geringeren konstitutiven Expression liegt.

FC bindet an einen Rezeptor in der Plasmamembran, welcher zu der 14-3-3 Protein-Familie gehört (Kourthout und Boer, 1994, Marra et al, 1994, Oecking et al, 1994). Dies bewirkt eine Hyperpolarisierung der Membran, was Auswirkungen auf den Ionenfluss hat. Dies hat Einfluss auf Prozesse wie Zellexpansion, Samenkeimung, Stomataöffnungsverhalten und Nährstoffaufnahme der Pflanze (Marre, 1979). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass FC die Expression von Wund-induzierbaren-Genen, die Systemin-induzierte Depolarisierung der Plasmamembran, die Expression von Abwehrgenen und die Bildung von ROS durch Alkalisierung der ECM inhibiert (Doherty und Bowles, 1990, O'Donnel, 1994, Moyon und Johannes, 1996, Messiaen und van Cutsem, 1994, Simon-Plas et al, 1997, Schaller und Oecking, 1999).

Die rasche und transiente Expression von *SIMMP1* und NADPH-Oxidase deutet auf eine Funktion dieser Proteine in der FC-vermittelten Reaktion hin (Frick und Schaller, 2002). NADPH-Oxidase ist ein Enzym, welches an der Bildung von Superoxid-Anionen beteiligt ist. Diese gehören zu den ROS und können Auslöser der HR sein. ROS sind in diesem Zusammenhang auch an der Verstärkung der Zellwände beteiligt, indem durch ihre oxidative Wirkung prolinreiche Zellwandproteine vernetzt werden. ROS können anhand ihrer toxischen Wirkung direkt auf Pathogene einwirken und diese abtöten (Mur et al, 2008). Die Funktion von *SIMMP1/2* könnte eine Beteiligung an der Verstärkung der Zellwand sein, die Freisetzung von Zellwandbestandteilen, welche als Elicitoren wirken und weitere Signalwege aktivieren oder eine an der Regulierung der HR durch ihren Einfluss auf die P69B.

Die Untersuchungen zur Induzierbarkeit von *SIMMP1/2* in Blättern von Tomatenpflanzen mittels RT-PCR nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*, einem Pilz mit nekrotropher Lebensweise, zeigten dass *SIMMP1* und *SIMMP2* bereits 17 Stunden nach der Infektion induziert wurden. Nach 24 Stunden scheint die Expression der untersuchten Gene schwächer zu werden, gefolgt von einem erneuten Anstieg der Expression nach 48 Stunden (Kapitel. 3.9.2). Unterschiede in der Quantität der nekrotischen Flächen in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Blättern scheint es aber nicht zu geben, und es konnte auch kein Unterschied in der Wachstumskinetik des Pilzes aus *SIMMP1/2*-RNAi-Blättern im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. (Abb. 3.33). Da eine erhöhte Expression von *SIMMP1/2* auch mit dem Wachstum eines nekrotrophen Pilzes, *S. sclerotiorum*, im Blattgewebe beobachtet werden kann, ist eine Abhängigkeit der Induktion von *SIMMP1/2* in diesem Fall von einer R-Gen-vermittelten Abwehr auszuschliessen. Die R-Gen-vermittelte Abwehr führt in diesem Fall nicht zu einer erfolgreichen Eingrenzung des Pathogens, da durch den eingeleiteten programmierten Zelltod in Form einer HR dem Pathogen nicht die Lebensgrundlage entzogen wird (Mur et al, 2008, Govrin und Levine, 2000, Jones und Dangl, 2006).

Die Besiedlung von Wirtspflanzen durch nekrotrophe Pathogene erfolgt durch Abtötung des Gewebes sowohl durch Elicitoren, als auch durch wirtsspezifische oder wirtsunspezifische Toxine (Govrin und Levin, 2000, Mayer et al, 2001, Cotton et al, 2003). Ein essentielles, wirtsunspezifisches Toxin aus *S. sclerotiorum* ist die Oxalsäure. Oxalsäure wird vom Pilz in das pflanzliche Gewebe sekretiert und säuert dadurch den Apoplasten bis auf pH 4 bzw. 2 an (Rollins und Dickman 2001). Dies kann direkt einen toxischen Effekt auf das pflanzliche Gewebe ausüben, verhindert aber auf jeden Fall durch die Verschiebung des pH-Wertes in der Zellwand die Aktivität pflanzlicher Enzyme. Des Weiteren wird durch Oxalsäure die für die

Aktivität vom Pilz sekretierten zellwandabbauender Enzyme notwendige Umgebung geschaffen. Die Fähigkeit zur Chelatbildung mit Ca^{2+} -Ionen destabilisiert ebenfalls die Zellwandstruktur von Pflanzen (Hegedus und Rimmer, 2005).

Denkbar wäre im Falle einer Infektion mit *S. sclerotiorum*, dass durch die Ansäuerung der ECM, die Aktivität von *SlMMP1/2* unterbunden wird. Dadurch bleibt P69B aktiv und es kommt zur konstitutiven HR, wovon der Pilz profitieren würde. Wahrscheinlicher ist jedoch dass die Ansäuerung der Zellwand sämtliche Abwehrsysteme der Pflanze in der Zellwand unterbinden soll. Da PR-Proteine der P69-Familie ein pH-Optimum von 8,5-9 haben (Vera und Conejero, 1988), ist davon auszugehen dass P69B bei Infektion mit *S. sclerotiorum* nicht mehr aktiv ist und somit nicht an der direkten Abwehr beteiligt.

Nachdem die Induzierbarkeit von *SlMMP1* und *SlMMP2* durch Fusicoccin und *S. sclerotiorum* nachgewiesen worden war, sollte nun eine mögliche Rolle von *SlMMP1* und *SlMMP2* bei Infektion mit biotrophen, prokaryontischen Pathogenen untersucht werden. Bei dem hierfür verwendeten Pathogen (*Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*)) handelt es sich um aerobe, gram-negative Stäbchen mit einem einzelnen polaren Flagellum. *Xcv* verursacht charakteristische Symptome (bacterial spot disease) in Paprika und Tomate (Data Sheets on Quarantine Pests, 90/399003). Die Pathogenität von *Xcv* gegenüber Wirtspflanzen und die Auslösung der HR in resistenten Pflanzen wird durch Gene vermittelt welche in einem chromosomalen 23-kb großen Cluster dem, *hrp*-Cluster (hypersensitive reaction and pathogenicity), zusammengefasst sind. Neun *hrp*-Gene kodieren für ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS), welches der Sekretion von bakteriellen Virulenzfaktoren in die Wirtszelle zur Etablierung einer Infektion (kompatiblen Interaktion) dient und der Sekretion von Avirulenzfaktoren (*avr*) was zur Auslösung einer HR führt (inkompatiblen Interaktion). Die Erkennung des Pathogens durch den Wirt setzt voraus, dass im Wirt ein R-Gen z. B. *Bs3* für *AvrBs3* vorhanden ist, und dass das Pathogen das entsprechende Avirulenz-Gen (z.B. *AvrBs3*) besitzt (Bonas et al, 1989, Bonas et al, 1991, Bonas et al, 2000, Mudgett et al, 2000, Minsavage et al, 1990).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Stämme von *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) waren mit Ausnahme der Gene, die für die Pathogenizität verantwortlich sind, isogen. Es wurden ein virulenter (*Xcv* 85-10), ein avirulenter (*AvrBs3*) und ein *hrp*-defizienter (*hrp*⁻) Stamm eingesetzt, von denen letzterer durch Mutation der *hrp*-Gene A bis G des Typ-III Sekretionsapparats nicht pathogen ist (Schornack, Inst. Pflanzengenetik Universität Halle, pers. Mitteilung).

Im Falle einer Funktion von *SIMMP1/2* in der Pathogenabwehr sollte der Expressionsspiegel von *SIMMP1/2* in Überexpressions-Linien und RNAi-Linien einen Einfluss auf das Wachstum und die Ausbreitung der Pathogene haben.

Xcv 85-10 *hrp*⁻ zeigte in allen untersuchten Genotypen ein ähnliches Wachstumsverhalten, was auf die Unfähigkeit des verwendeten Stamms zurückzuführen ist, die für ein Wachstum und Überleben notwendige Umgebung zu schaffen. Dieser Stamm erreicht eine Populationsgröße die nur etwa einen Zehntel der Populationsdichte des *Xcv* 85-10 pDsk 200- und einen Hundertstel der Populationsdichte des *Xcv* 85-10- Stamms entsprach (Abb. 3.37).

Die Stämme *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 pDsk 200 zeigten in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu Wildtyp- und *SIMMP1*-Überexpressions-Pflanzen, wobei *Xcv* 85-10 pDsk 200 im Vergleich zu *Xcv* 85-10 ein um des 10fache reduziertes Wachstum aufzeigte, was auf eine spezifische Erkennung von AvrBs3 zurückzuführen ist (Abb. 3.35 und 3.36). Im Falle der Infektion mit *Xcv* 85-10 pDsk 200 konnte eine Induktion von *SIMMP1/2* beobachtet werden (Abb. 3.43 C). Im Falle der Infektion mit *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 *hrp*⁻ konnte keine Induktion von *SIMMP1/2* festgestellt werden, allerdings wurde *SIMMP2* nach Infektion mit diesen Stämmen konstant auf einen relativ niedrigen Spiegel exprimiert. Das ist insofern bemerkenswert, da *SIMMP2* keine konstitutive Expression in Blättern zeigt (Abb. 3.43 B und D).

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Induktion von *SIMMP1/2* einerseits von TTSS sekretierten Effektoren abhängig ist, andererseits müssen bislang unbekannte Faktoren für die konstante Expression von *SIMMP2* im Blattgewebe verantwortlich sein, die jedoch mit der bakteriellen Infektion korrelieren und nicht TTSS abhängig sind, da eine Expression auch bei Verwendung von *Xcv* 85-10 *hrp*⁻ zu beobachten war (Abb. 3.43 D). Zusätzlich konnte in der Kontrolle keine Expression von *SIMMP2* beobachtet werden außer zum Zeitpunkt Null, was auf die mechanische Belastung des Blattes infolge der Infiltration zurückzuführen ist (Abb. 3.43 A).

Die Beobachtung dass *SIMMP1/2* nach Infektion mit *Xcv* 85-10 pDsk 200 induziert wird korreliert mit der Tatsache dass *SIMMP1/2* einen regulatorischen Einfluss auf P69B ausübt, welches möglicherweise an der R-Gen-Vermittelten-Abwehr von *Xcv* beteiligt ist (Minsavage et al, 1990, Tornero et al, 1997). Ebenso deuten diese Resultate darauf hin, dass *SIMMP1/2* keinen direkten Einfluss auf die Bakterien ausüben, da die Überexpression von *SIMMP1* keinen negativen Effekt auf das bakterielle Wachstum hat.

Die Annahme, dass es infolge der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* zur konstitutiven HR kommt, könnte das geringere Wachstum von *Xcv* auf *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen erklären.

Der erhöhte Gehalt an gebundenen und löslichen phenolischen Substanzen in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen (Kapitel 3.6.8) könnte sich ebenfalls negativ auf das bakterielle Wachstum auswirken, da bekannt ist, dass phenolische Substanzen von Pflanzen in Reaktion auf eindringende Pathogene gebildet werden. Phenolische Substanzen finden während der Pathogen-Antwort eine Funktion als Phytoanticipine, Phytoalexine, physikalische Barrieren und als Elicitoren zur Induktion von Abwehrgenen (Hammerschmidt, 2005). Für phenolische Substanzen welche zur Gruppe der Flavonoide gehören wurde beobachtet dass sie nach Applikation von Elicitoren in Gurke akkumulieren und eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (Fawe et al, 1998). Ebenso konnten mittels Mikroarray-Analysen Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen als stärker exprimiert identifiziert werden welche für Enzyme kodieren (Hydroxyzimtsäuren-Transferasen SGN-U215516, Chalcon Synthase SGN-U219061), die an der Bildung phenolischer Sekundärmetabolite beteiligt sind. Des weiteren wurden Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen stärker exprimiert identifiziert, welche für Proteine mit antimikrobieller Wirkung kodieren. Dazu gehören Proteine, die zur Lyse der Zellwand von Pathogenen beitragen, wie Chitinasen (SGN-U213790) oder β -1-3 Glucanasen (SGN-U214527) (Selitrennikoff, 2001). Ebenso sind mit Vorgängen der Apoptose assoziierte Gene stärker exprimiert (Hin1-like-Protein SGN-U213159, Abb. 3.23). Alle diese beobachteten Effekte tragen möglicherweise zu einem negativen Einfluss auf das bakterielle Wachstum bei.

Die Infiltration von von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (10^4 cfu/ml) verursacht in Blättern von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen massive Reaktionen, was mit dem Absterben ganzer Organe verbunden ist. Dieser Effekt ist am deutlichsten in den ältesten, zweitältesten und drittältesten Blättern ausgeprägt. Um die auftretenden Effekte über einen längeren Zeitraum beobachten zu können wurden die viertältesten Blätter, von sechs Wochen alten *SIMMP1/2*-RNAi (HP)-, *SIMMP1*-Überexpressions (Nat)- und Wildtyp (UC82b)-Pflanzen mit verschiedenen *Xcv* Stämmen infiltriert (10^4 cfu/ml). Da die Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen unabhängig des verwendeten Stamms immer die gleiche Reaktion aufzeigten, wurde auch ein *E. coli* Stamm (DH10b) als ein Nicht-Pflanzenpathogen als Kontrolle infiltriert (10^4 cfu/ml) (Abb. 3.38-3.42). Bereits fünf Tage nach Infiltration zeigten Blätter von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen großflächige nekrotische und chlorotische Bereiche, die sich nach zehn und 15 Tagen immer weiter ausbreiteten, bis ca. 2/3 der Blattfläche nekrotisch waren. Da die Reaktion ungeachtet des verwendeten *Xcv*-Stamms immer die gleiche Ausprägung hatte, und dieselben Effekte auch bei Infiltration von *E. coli* auftraten, kann man davon ausgehen dass die beobachtete Reaktion nicht TTSS-abhängig und auch nicht spezifisch gegen das Pathogen

gerichtet ist. Vielmehr deuten die Effekte auf eine Überreaktion infolge der Applizierung eines biotischen Stressfaktors. Die Erkennung von Pathogenen in der Nicht-Wirtsresistenz von Pflanzen erfolgt durch Rezeptoren (pattern recognition receptors (PRRs)) welche charakteristische molekulare Strukturen potentieller Pathogene erkennen (pathogen associated molecular patterns (PAMPs)) (Zipfel et al, 2006). PAMPs dienen in Pflanzen als Elicitoren, welche eine Abwehrreaktion hervorrufen. Die Erkennung von PAMPs führt in der Pflanze zur Restrukturierung der Zellwand, Bildung von ROS und zur Induktion von Abwehrgenen.

Strukturen wie Chitin und Ergosterol können bei Pilzen PAMPs darstellen und Liposacharide (LPS), cold-shock-Protein (CSP), Flagellin und EF-Tu bei Bakterien (Nürnberger et al, 2004, Zipfel et al, 2004). Die Erkennung einiger PAMPs ist auf wenige Spezies beschränkt, wie CSP und EF-Tu bei *Solanales* und *Brassicales*. Flagellin scheint ein sehr universelles PAMP darzustellen, da es von vielen Spezies erkannt wird (Zipfel et al, 2006). Die Tatsache, dass Infolge der Herunterregulierung von *SIMMP1/2* identische Reaktionen nach Infiltration von verschiedenen *Xcv*-Stämmen und *E. coli* auftreten, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Erkennung von PAMPs wie Flagellin in *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen in eine massive Abwehrreaktion mündet, welche zum Absterben ganzer Organe führen kann. Für *SIMMP1/2* kann aufgrund der hier erzielten Resultate eine direkte Beteiligung an der Pathogenabwehr ausgeschlossen werden. Vielmehr deuten alle Resultate auf einen regulatorischen Einfluss von *SIMMP1/2* auf die Pathogenerkennung und die daraus resultierenden Reaktionen bis hin zu einer Regulierung von Zelltodereignissen während der HR, hin.

4.11 Fazit und Ausblick

Die Resultate dieser Arbeit liefern wichtige Grundlagen für eine weitere zielgerichtete Suche nach den Funktionen von *SIMMP1/2* in Tomatenpflanzen. Die Identifizierung und Ermittlung der katalytischen Eigenschaften von *SIMMP2* führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei *SIMMP1/2* um Enzyme mit redundanten Eigenschaften handelt. Ein Fokus der vorliegenden Studie lag in der phänotypischen und molekularen Charakterisierung von *SIMMP1/2*-RNAi-Pflanzen, welche auch Voraussetzung für die Aufklärung der Funktion von *SIMMP1/2* war. Für *SIMMP1/2* konnte eindeutig eine Funktion während der pflanzlichen Entwicklung gezeigt werden. Dies beinhaltet die Beteiligung an der Strukturgestaltung und Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwand. Des Weiteren scheint für *SIMMP1/2* eine regulatorische Funktion in

der Apoptose während Wachstums- und Entwicklungsprozessen gegeben. Eine Funktion während der pflanzlichen Abwehrreaktion auf eindringende Pathogene ist ebenfalls gegeben. Ob *SIMMP1/2* einen direkten Einfluss auf die Pathogene ausübt, oder ob sie eine regulatorische Rolle spielen, konnte noch nicht endgültig geklärt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Anderson, E. D., VanSlyke, J. K., Thulin, C. D., Jean, F., and Thomas, G., (1997): Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: Requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO Journal*, 16: 1508–1518.
- Baker, D., Shiav, A. K., and Agard, D. A., (1993): *Current Opinions in Cell Biology*, 5: 966-970.
- Balvora, A., Schornack, S., Backer, B. J., Ganai, M., Bonas, U., Lahaye, T., (2001): Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. *Molecular Genetics and Genomics*, 266: 639-645.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J. L., (2004): Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:391-399.
- Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., and Voskoboynikova, N. E., (1990): Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Biochemical Journal*, 272: 677-682.
- Bent, A. R., Ecker, I. J., and Staskawicz, B., (1992): Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 5:372–378.
- Bindschedler, L. V., Wheatley, E., Gay, E., Cole, J., Cottage, A., and Bolwell, G. P., (2005): Characterisation and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. *Plant Molecular Biology*, 57: 285-301.
- Birnboim, H. C., and Doly, J., (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1523.

- Bleecker, A. B., and Patterson, S. E., (1997): Last Exit: Senescence, Abscission, and Meristem Arrest in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 9: 1169-1 179.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., and Maskos, K., (1998): Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cellular and Molecular Life Science*, 55: 639-652.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. W., and Stöckler, W., (1993): Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Letters*, 331: 134-140.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., and Nelson, B. D., (2006). “*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen.” *Molecular Plant Pathology*, 7: 1-16.
- Bonas, U., Stall, R. E., und B. Staskawicz, B. J., (1989): Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Molecular and General Genetics*, 218: 127–136.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., and Stall, R. E., (1991): Isolation of a Gene Cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that Determines Pathogenicity and the Hypersensitive Response on Pepper and Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(1): 81-88.
- Bonas, U., van den Ackerveken, G., Büttner, D., Hahn, K., Marois, E., Nennstiel, D., Noel, L., Rossier, O., and Szurek, B., (2000): How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Molecular Plant Pathology*, 1(1): 73-76.
- Bond, H. M., and Bowles, D. J., (1983): Characterisation of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates. *Plant Physiology*, 72: 345-350.

- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Afitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerre-Tugaye, M. T., Pont-Lezica, R., (2005): Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 5: 212-221.
- Boudreault, A., Gauthier, D., and Lazure, C., (1998): Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 31574–31580.
- Bowen G. D., und Rovira, A. D., (1976): Microbial conolisation of plant roots. *Annual Reviews of Phytopathology*, 14: 121-144.
- Bradford, M. M., (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Burg, S. P., (1968): Ethylene, plant senescence and abscission. *Plant Physiology*, 43: 1503-1511.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G., Amundsen, S. S., Mandal, A., Aalen, R. B., (2003): Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell*, 15:2296-2307.
- Büttner, D., Bonas, U., (2002): Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO Journal*, 21: 5313-5322.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X., (1998): Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America* 95: 6531-6536.

- Cao, J. H., Sato, T., Takino, and Seiki, M., (1995): The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 801–805.
- Cassab, G. I., (1998): Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 281-309.
- Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, M. B., Pfannstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A., and Schaller, A., (2009): The Protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the pathway, and activity of tomato subtilase 3 (*SISBT3*). *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21): 14068-14078.
- Chae, H. S., Lee, W. S., (2001): Ethylene- and enzyme-mediated superoxide production and cell death in carrot cells grown under carbon starvation. *Plant Cell Reports*, 20: 256-261.
- Combier, J. P., Vernie, T., de Billy, F., El Yahyaoui, F., Mathis, R., and Gamas, P., (2007) : The MtMMPL1 Early Nodulin is a novel member of the matrix metalloendoproteinase family with a role in *Medicago truncatula* infection by *Sinorhizobium melilotii*. *Plant Physiology*, 144(2): 703-716.
- Cosgrove, D. J., (2005): Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, 6: 850-861.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C., and Fevre, M., (2003): Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiological Letters*, 227: 163–169.
- Dalkin, K., Marcus, S., and Bowles, D. J., (1983): Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on Concanavalin A. *Planta* 157: 531-535.
- Data Sheets on Quarantine Pests *Xanthomonas vesicatoria* Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.

- Del Bigio, M. R., Seyoum, G., (1999): Effect of matrix metalloproteinase mnhibitors on rat embryo development in vitro. *Cell Tissue Organs*, 165: 67-73.
- Delorme, V. G. R., McCabe, P. F., Kim, D. J., and Leaver, C. J., (2000): A Matrix Metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell Death in cucumber. *Plant Physiology*, 123: 917-927.
- Doherty, H. M and Bowles, D. J., (1990): The role of pH and ion transport in oligosaccharide-induced proteinase inhibitor accumulation in tomato plants. *Plant Cell and Environment*, 13: 851–855.
- Dhanaraj, V., Ye, Q.Z., Johnson, L.L., Hupe, D.J., Ortwine, D.F., Dunbar, J.B., Jr., Rubin, J.R., Pavlowsky, A., Humblet, C. und Blundell, T.L. (1996): X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure* 4: 375-386.
- Ecker, J. R., and Davis, R. W., (1987): Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 84: 5202-5206.
- Fawe, A., Abou-Zaid, M., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R., (1998): Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Biochemistry and Cell Biology*, 88: 396-401.
- Feldman, L. J., (1984): Regulation of root development. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 35:223-242.
- Frick, U. B., (2002): Le1-MMP, eine Matrix Metalloproteinase von *Lycopersicon esculentum*: cDNA-Mikroarray Expressionsanalyse, molekulare und biochemische Charakterisierung. Diplomarbeit Universität Bern.
- Frick, U. B., and Schaller, A., (2002): cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants. *Planta* 216: 83-94.

- Gleave, A. P., (1992): A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20: 1203-1207.
- Goldwasser, Y., Hershenhorn, J., Plakhine, D., Kleifeld, Y., Rubin, B., (1999): Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 87-96.
- Golldack, D., Popova, O. V., and Dietz, K. J., (2002): Mutation of the Matrix Metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 5541-5547.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P., (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology*, 74: 111-122.
- Gomez, L., Allona, I., Casado, R., and Aragoncillo, C., (2002): Seed chitinases. *Seed Science Research*, 12: 217 - 230.
- Goodlass, G., and Smith K. A., (1979): Effects of ethylene on root extension and nodulation of pea (*PISUM SATIVUM* L.) and white clover (*TRIFOLIUM REPENS* L.). *Plant and Soil*, 51: 387-395.
- Goodwin, T. W., and Mercer, E. I., (1983): The plant cell wall. Introduction to Plant Biochemistry, *Pergamon Press*, New York, NY , pp. 55-91.
- Govrin, E. M., Levine, A., (2000): The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10: 751–757.
- Graham, J. S., Xiong, J., and Gillikin, J. W., (1991): Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the Leaves of *Glycine max*. *Plant Physiology*, 97: 786-792.

- Grbic, V., and Bleecker, A. B., (1995): Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 8(4): 595-602.
- Greenberg, J. T., Vinatzer, B. A., (2003): Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinions in Microbiology*, 6: 20-28.
- Greenlee, K. J., Werb, Z., and Kheradmand, F., (2007): Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiological Reviews*, 87: 69-98.
- Hammerschmidt, R., (2005): Phenols and plant-pathogen interactions: The saga continues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(3): 77-78.
- Hara, J., and Matsubara, H., (1980): Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin VI. Proteolytic activities appearing in germinating cotyledons. *Plant Cell Physiology*, 21: 219-232.
- Hartung, W., Radin, J. W., and Hendrix, D. L., (1988): Absciscic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. *Plant Physiology*, 86: 908-913.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., and Bohnert, H. J., (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, 51: 463-499.
- He, C. J., Morgan, P. W., und Drew, M. C., (1996): Transduction of an ethylene eignal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology*, 112: 463-472.
- Hegedus, D. D., and Rimmer, S. R., (2005): *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, 251: 177-184.
- Huangpu, J., Pak, J. H., Graham, M. C., Rickle, S. A., and Graham, J. S., (1996): Purification and Molecular Analysis of an Extracellular γ -Glutamyl Hydrolase Present in

Young Tissues of the Soybean Plant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228: 1-6.

Hurth, M. A., Suh, S. J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., and Neuhaus, H. E., (2005): Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology*, 137: 901-910.

Ivanchenko, G. M., Munday, K. G., Dudrovsky, G. J., (2008): Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55: 335-347.

Ivanchenko, M. G., Coffeen, W. C., Lomax, T. L., and Dubrovsky, J. G., (2006): Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant Journal*, 46: 436–447.

Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Maas, C., (1995): Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8: 97-109.

Jackson, A. O., and Taylor, C. T., (1996): Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *The Plant Cell*, 8: 1651-1668.

Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G. B., (2003): An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell*, 15, 2503–2513.

Jing, H. C., Sturre, J. G. M., Hille, J., and Dijkwe, P. P., (2006): *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *The Plant Journal*, 32: 51-63.

Jones, J. D. G., and Dangl, J. L., (2006): The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.

- Jongedijk, E., Tigelaar, H., Roekel, J. S. C., Bres-Vlosmans, S. A., Dekker, I., Elzen, P. J. M., Cornelissen, B. J. C., and Melchers, L. S., (1995): Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85: 173-180.
- Kim, M., Ahn, J. W., Jin, U. H., Choi, D., Paek, K. H., and Pai, H. S., (2003): Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 19406-19415.
- Klessig, D. F., (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 97: 8849–8855.
- Kramer, S., Piotrowski, M., Kuehnemann, F., und Edelmann, H.G. (2003): Physiological and biochemical characterization of ethylene-generated gravicompetence in primary shoots of coleoptile-less gravi-incompetent rye seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2723–2732.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J., (1994): The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochemical Science*, 19: 415–421.
- Koiattukudy, P. E., (1985): Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology*, 23:223-250.
- Kolattukudy, P. E., (1980): Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science*, 208: 990-1000.
- Korthout, H. A. A. J., and de Boer, A. H., (1994): A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *The Plant Cell*, 6: 1681-1692.
- Laemmli, U. K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lamb, C., and Dixon, R. A., (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, 48: 251–275.
- Leontovich, A. A., Zhang, J., Shimokawa, K. I., Nagase, H., and Sarras, M. P. jr., (2000): A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* 127: 907-920.
- Lepage, T., and Gache, C., (1989): Purification and characterization of the sea urchin embryo hatching enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 4787-4793.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, S. R., and Lamb, C., (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4): 583-593.
- Levy, S., Maclachlan, G., Stachelin, L. A., (1997): Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *The Plant Journal*, 11: 373-386.
- Liu, Y., Dammann, C., and Bhattacharyya, M. K., (2001): The Matrix metalloproteinase Gene *GmMMP2* is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiology*, 127: 1788-1797.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., and Solano, R., (2003): Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15: 165-178.
- Lozovaya, V. V., Waranyuwat, A., and Widholm, J. M., (1998): β -1,3-glucanase and resistance of *Aspergillus flavus* infection in maize. *Crop Science*, 38: 1255 - 1260.
- Lund, S. T., Stall, R. E., and Klee, H. J., (1998): Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell*, 10: 371–382.

- Maidment, J. M., Moore, D., Murphy, G. P., Murphy, G., and Clark, I. M., (1999): Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 34706-34710.
- Marin-Rodriguez, M. C., Orchard, J., and Seymour G. B., (2002): Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2115-2119.
- Marra, M., Fullone, M. R., Fogliano, V., Pen, J., Mattei, M., Masi, S., and Aducci, P., (1994): The 30-Kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiology*, 106: 1497-1501.
- Marre, E., (1979): Fusicoccin: A tool in plant physiology. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 30: 273-288.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B., (1998): Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology*, 8: 410-415.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., and Mobashery, S., (1998): Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB Journal*, 12: 1075-1095.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., and Thomas, H., (1999): Chlorophyll degradation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 67-95.
- Mayer, A. M., Staples, R. C., Gil-ad, N. L., (2001): Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58: 33-41.
- Mazel, A., and Levine, A., (2001): Induction of cell death in *Arabidopsis* by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 98-106.
- McCawley, L. J., and Matrisian, L. M., (2001): Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current. Opinions in Cell Biology*, 13: 534-540.

- McGeehan, G., Burkhart, W., Anderegg, R., Becherer, J. D., Gillikin, J. W., and Graham, J. S., (1992): Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase1. *Plant Physiology*, 99: 1179-1183.
- Meier, U., (2001): Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen. *Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*.
- Mergemann, H., and Sauter, M., (2000): Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiology*, 124: 609-614.
- Messiaen, J., van Cutsem, P., (1993): Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant Cell Physiology*, 34: 1117-1123.
- Messiaen, J., van Cutsem, P., (1994): Pectic signal transduction in carrot cells: membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant Cell Physiology*, 35: 677-689.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., and Stall, R. E., (1990): Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3: 41-47.
- Morohashi, Y., (2002): Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1643-1650.
- Morohashi, Y., and Matsushima, H., (2000): Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1381-1387.
- Moyen, C., Johannes, E., (1996): Systemin transiently depolarises the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusaric acid induced extracellular acidification of mesophyll tissue. *Plant Cell Environment*, 19: 464-470.
- Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. D., Rossier, O., Bonas, U., and Staskawicz, B. J., (2000): Molecular signals required for type III secretion and

translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 97: 13324-13329.

Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., and Prats, E., (2008): The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59: 501-520.

Nagase, H., (1997): Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry*, 378: 151-160.

Nagase, H., and Woessner, J., F., Jr., (1999): Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 21491–21494.

Nicholson, R. L., and Hammerschmidt, R., (1992): Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Reviews of Phytopathology*, 30: 369-389.

Nicholson, T., (2007): Charakterisierung der Matrix Metalloproteinase SLMP2 aus Tomate. Masterarbeit Universität Hohenheim.

Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., Dangl, J. L., (2003): Recognition and response in the plant immune system. *Annual Reviews in Genetics*, 37: 579-609.

Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R. T., Katagiri, F., Dangl, J. L., (2000): Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell*, 101:353–363.

Nooden, L. D., (1988): The phenomena of senescence and aging. In Senescence and aging in Plants, *Academic Press Inc., New York*, 1-50.

Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., (2004): Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Review*, 198: 249-266.

- O'Donnell P. J., (1994): Wound-induced gene expression in the tomato. PhD thesis. University of Leeds, UK.
- Oecking, C., Eckerskornb, C., Weiler, E. W., (1994): The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Letters*, 352: 163-166.
- Oh, K-C., Ivanchenko, M. G., White, T. J., and Lomax, T. L., (2006): The Diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin, a novel player in auxin signaling. *Planta*, 224: 133-144.
- Orzae, D., Granell, D., (1997): DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant Journal*, 11: 137-144.
- Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., and Schaller, A., (2009): Structural basis for Ca^{2+} -independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 106: 17223-17228.
- Overall, M. C., (2002): Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. *Molecular Biotechnology*, 22: 51-86.
- Page-McCaw, P. A., Ewald, A. J., and Werb, Z., (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews of Molecular and Cell Biology*, 8: 221–233.
- Pak, J. H., Liu, C. Y., Huangpu, J., and Graham, J. S., (1997): Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. *FEBS Letters*, 404: 283-288.
- Park, J. M., (2005): The hypersensitive response. A cell death during disease resistance. *The Plant Pathology Journal*, 21(2): 99-101.

- Patterson, S. E., Bleecker, A. B., (2004): Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134:194-203.
- Perez, S. E., Cano, D. A., Dao-Pick, T., Rougier, J. P., Werb, Z., and Hebrok, M., (2004): Matrix metalloproteinases 2 and 9 are dispensable for pancreatic islet formation and function in vivo. *Diabetes*, 54: 694-701.
- Pfanz, H., (1987): Aufnahme Verteilung and Wirkung saurer Luftschadstoffe und schwacher Säuren in pflanzlichen Zellen and Organellen. PhD Dissertation, Universität Würzburg.
- Pignocchi, C., Fletcher, J., Wilkinson, J. E., Barnes, J. D., and Foyer, C. H., (2003): The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*, 132: 1631-1641.
- Ratnaparkhe, S. M., Egertsdotter, E. M. U., Flinn, S. B., (2009): Identification and characterization of a matrix metalloproteinase (*Pta1-MMP*) expressed during Loblolly pine (*Pinus taeda*) seed development, germination completion, and early seedling establishment. *Planta*, 230: 339-354.
- Reid, M. S., and Wu, M., (1992): Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regulation*, 11: 37-43 .
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schausser, L., Yoshioka, H., Jones, D. G. J., (2004): CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO Journal*, 23: 2156-2165.
- Rollins, J. A., and Dickman, M. B., (2001): pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 75-81.
- Rossier O., Wengelnik, K., Hahn, K., Bonas, U., (1999): The *Xanthomonas* hrp type-III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 96: 9368-9373.

- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., and Benkova, E., (2007): Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19: 2197-2212.
- Sakurai, N., (1991): Cell wall functions in growth and development, a physical and a chemical point view. *The Botanical Magazine*, 104: 235-251.
- Sato, H. T., Takino, Y., Okada, J., Cao, A., Shinagawa, E., Yamamoto, and Seiki, M., (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 370: 61–65.
- Schaller, A., (2004): A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183-197.
- Schaller, A., und Oecking, C., (1999): Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, 11: 263-272.
- Schiermeyer, A., Hartenstein, H., Mandal, M. K., Otte, B., Wahner, V., and Schillberg, S., (2009): A membrane-bound matrix-metalloproteinase from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 is induced by bacterial pathogens. *BMC Plant Biology*, 9:83.
- Seiki, M., (1999): Membrane-type matrix metalloproteinases. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 107:137–143.
- Selitrennikoff, C. P., (2001): Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2883-2894.
- Showalter, A. M., (1993): Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5: 9-23.
- Simmons, C. R., (1994): The physiology and molecular biology of plant 1,3-β-glucanases and 1,4-β-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13: 325-387.

- Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M. L., Humbert, C., Montillet, J. L., Blein, J. P., (1997): Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environment*, 20: 1573–1579.
- Singh, J., and Roberts, M. R., (2004): Fusicoccin activates pathogen-responsive gene expression independently of common resistance signalling pathways, but increases disease symptoms in *Pseudomonas syringae*-infected tomato plants. *Planta*, 219: 261 - 269.
- Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J., and Wohldman, P., (1994): 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature*, 368: 32–38.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., McKay, D. B., and Bode, W., (1995): The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zincpeptidases. *Protein Science*, 4: 823-840.
- Suttle, J. C., and Hultstrand, J. F., (1991): Ethylene-induced leaf abscission in cotton seedlings. *Plant Physiology*, 95: 29-33.
- Suzuki, A. S., Tadano, Y., Yamamoto, T., Abe, S. I., and Tajima, T., (2001) : Expression of a novel matrix metalloproteinase gene during *Cynops* early embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288: 380-384.
- Sze, H., Li, X., and Palmgren, M. G., (1999): Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11: 677-689.
- Tesche, M., Hock, B., Elstner, E. E., (1995): Stress bei Pflanzen: Allgemeine und historische Aspekte. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag*, 418-426.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer,

- F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klösken, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorhölter, F. J., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O., (2005): Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology*, 187: 7254-7266.
- Tornero, P., Conejero, V., and Vera, P., (1997): Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 14412-14419.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., and Dangl, J. L., (2006): Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373-378.
- Tucker G. A., Zhang, J., (1996): Expression of polygalacturonase and pectinesterase in normal and transgenic tomatoes. *Progress in Biotechnology*, 14: 347–354.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J. L., Triantaphylide, C., and Roby, D., (2002): A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 99: 10179-10184.
- Vera, P., and Conejero, V., (1988): Pathogenesis-related proteins of tomato, P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology*, 87: 58-63.
- Visse, R., and Nagase, H., (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circulation. Research*, 92: 827-839.
- Volkov, A., Jordan, F., (1996): Evidence for intramolecular processing of prosubtilisin sequestered on a solid support. *Journal of Molecular Biology*, 262: 595-599.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P.,

- Green, A. G., and Waterhouse P. M., (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27: 581-590.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Roopra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Sims, M., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonnhammer, E., Woltering, E. J., and van Doorn, W. G., (1988): Role of ethylene in senescence of petals – Morphological and taxonomical relationships. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1605-1616.
- Wu, C. T., Metzger, L. G., Meins, F., and Bradford, K. J., (2000): Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology*, 126: 1299-1313.
- Yang, T. F., Gonzalez-Carranza, Z. H., Maunders J. M., and Roberts, J. A., (2008): Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Annals of Botany*, 101: 301-310.
- Yazaki, K., (2005): Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 301-307.
- Young, T. E., Gallie, D. R., DeMason, D. A., (1997): Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wildtype and shrunken2 genotypes. *Plant Physiology*, 115: 737–751.
- Zimmermann, D., (2004): Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Metalloprotease LeMMP1 aus Tomate. Diplomarbeit Universität Hohenheim.

- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., Felix, G., (2006): Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125:749–760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T., (2004): Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764–767.

6. Anhang

6.1: cDNA Sequenz der *S/MMP1* und vom *S/MMP2*-EST-Klon (cLHT22F10). Gezeigt sind die Ansatzstellen der verwendeten Primer für die *S/MMP1* (Rot) und *S/MMP2* (Grün) die zur Überprüfung des “Silencing” benutzt wurden. Sternchen (*) markieren identische Nukleotide zwischen der *S/MMP1* und *S/MMP2*.

```

S/MMP1      ATATATATATAATAAAGAGCAGAGAGAAGTTGCAAGTAAGCAAATTAGAACAATTTAGCA
cLHT        -----

                                MMP 15
                                ----->

S/MMP1      AGCAAGTTTCTGATGAGGATTCTTTATTCATCGCCATACTTTTGTTCCTTAGTGTTCCA
cLHT        ---AA-----TGAGGAGGATTCATCTATACATGGCATTGGCTTATGTTG-AATATTGCA
                **      *** ***** * **** * * * * * * * * * * * * * * * *

                                MMP 25
                                ----->

S/MMP1      TTTCCATC-TTCAGCTCATTTCCTCCCAAATATTTCTTCAATTCCTCCTAATTTATTGAA
cLHT        AACTAGTTGTTTCAGCTCATTTCCTCCCAAATATTTTCATCAATCCCTTCTTCTTACTCAA
                *      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      ACCAAATGCCACTGCCTGGGATGCTTTTAACAAGTTATTAGGATGCCATTCCGGTCAGAC
cLHT        ACCTAATGCCACTGCTTGGACTTCTTTTCAAAAGTTGTTAGGATGTCAACCTGCTCAGAA
                *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      GGTGACGGCTTAGCGAAAATCAAAAATATTTTCACTACTTTGGATACATTAATAATTC
cLHT        AGTCGACGGCATTGCTAAAATCAAAAATATTTTCAACATTTTGGTTACATTAATAATTT
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      TTCCA--CTAACTTCACTGATGATTTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACCTA
cLHT        GAGTAGTTTTAATTTCACTGATGAATTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACGTA
                *      *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      CCAGCTTAACTTCAACCTCAACACCACCGGTGTGCTCGACGCGAACACCATTCAAGCATCT
cLHT        TCAGAGAAATTTCAACCTCAAGCCACCGGTGTGCTCGATGCGCCCACCATTCAAGCATCT
                ***  ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      CATAAAACCCAGATGTGGAACGCTGATGTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACTCCGG
cLHT        CATAAAACCCAGATGTGGAATGCCGATCTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACTCCGG
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

S/MMP1      TAAGCCACCGGCAGGTTCTCCGACGATGCACACCGTAGCTCACTACTCCTTCTTTCCGGG
cLHT        AAAGCC-----GCACACGGNGGCTCACTACTCCTTCTTTCTCTG
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                MMP 13
                                <-----
S/MMP1      AAGTCCACGGTGGCGGCGAACAAGAGAGATCTGACATATGCTTTTGCACCGCAGAATGG
cLHT        AAGACCAAGTGGCGGAGGGTAAGACTGATTTGACTTATGCCTTTCTACCGGCAAAACA
                *** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                MMP 23
                                <-----

```

S lMMP1	ACTGACGGATGATATTAAGATTGTGTTACACGAGCGTTTGATAGGTGGTCGGAGGTGAC
cLHT	TTTGACGGATGATATTAAGAGTGTCTTCTCACGTGCGTTTGATCGGTGGTCGGAGGTAAC

S lMMP1	TCCATTGACGTTTACTGAAATAGCATCGTACCAATCGGCTGATATTAAGATCGGGTTTTT
cLHT	CCCGTTGA-----GCT-----
	** ****
S lMMP1	CAGCGGAGATCACAACGATGGAGAGCCGTTTGATGGTCCTATGGGGACATTAGCACACGC
cLHT	-----TCACGG-----

S lMMP1	GTTTTCCCCACCGGCGGGGCATTTTCACTTGGACGGCGAGGAGAACTGGGTGATCGACGG
S lMMP1	TGCGCCGATAGTTGATGGGAATTTCTTTTCTATATTGTCGGCGGTGGACCTTGAATCGGT
S lMMP1	TGCGGTTTCATGAAATCGGGCATTATTGGGTTTGGGTCATTCATCCGTAGAAGATGCTAT
S lMMP1	TATGTACCCGACTTTAGGAGCGGGTACCCGAAGAGTCGAGCTTAGAAATGATGATATATT
S lMMP1	GGGAGTCCAGGAGTTATACGGGTCTAACCCGAATTATACTGGGCCAAACCCAAATTTGAC
S lMMP1	TCCGAGCCAAGAGAGTGACACAAATGGAGCCCCGATATTTGAGTTATCATGGTTTCATGG
S lMMP1	GTTTCTTGGTTTATTCTTTGCTTTGTTTCATTCAACTGTAGTTGATGGCATGATGTGATTA
S lMMP1	TTTTTTAATACTATATACTTGATTCATCTTTTTAAAAAAAAAAAAA

6.2: Tabellarische Auflistung der als differentiell reguliert identifizierten Gene in *SIMMP1/2-RNAi*-Hypokotylen, gesondert nach ihrer Funktion während verschiedener biologischer Prozesse (zelluläre Prozesse in Tabelle 7, metabolische Prozesse in Tabelle 8, unbekannte biologische Funktion in Tabelle 9, Proteinmetabolismus in Tabelle 10, Entwicklungsprozesse in Tabelle 11, Stressantwort in Tabelle 12, Reaktion auf biotische und abiotische Reize in Tabelle 13, Transportvorgängen in Tabelle 14, verschiedene biologische Prozesse in Tabelle 15, Transkription in Tabelle 16, Zell-Organisation und Biogenese in Tabelle 17, Signaltransduktion in Tabelle 18, Elektronentransport und Energieprozesse in Tabelle 19, DNA und RNA Metabolismus in Tabelle 20).

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT1G01480	SGN-U216896	0.003484	1.050
60S ribosomal protein L23 (RPL23A)	AT1G04480	SGN-U213170	0.000718	1.235
60S ribosomal protein L10A (RPL10aA);	AT1G08360	SGN-U212967	0.000059	2.087
glycinamide ribonucleotide synthetase (GAR synthetase)	AT1G09830	SGN-U222585	0.013468	0.993
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A)	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
Encodes a homolog of the potato p24 protein	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699
60S ribosomal protein L6 (RPL6A);	AT1G18540	SGN-U213998	0.000010	3.133
armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing family protein	AT1G24330	SGN-U220674	0.000872	1.189
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
CONSTITUTIVELY ACTIVATED CELL DEATH 1	AT1G29690	SGN-U227156	0.003447	1.150
UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 11 (UBP11)	AT1G32850	SGN-U219177	0.000276	3.384
embryo defective 1075 (emb1075)	AT1G43710	SGN-U212595	0.016509	0.837
E4/E8 binding protein-1	AT1G43770	SGN-U216046	0.000686	1.109
NUCLEOLIN LIKE 1	AT1G48920	SGN-U213956	0.000461	2.898
Ubiquitin-specific protease 6 (UBP6)	AT1G51710	SGN-U214827	0.015336	1.763
Ran-binding protein 1 domain-containing protein / RanBP1	AT1G52380	SGN-U217017	0.000038	5.419
LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT1G56300	SGN-U216926	0.000857	4.661

TCP family transcription factor	AT1G58100	SGN-U219466	0.008200	1.011
PHOSPATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
similar to senescence-associated protein-related,	AT1G61000	SGN-U215002	0.000673	1.630
MADS-box transcription factor FBP29	AT1G69120	SGN-U227986	0.000392	1.546
Encodes a putative serine/threonine kinase (SIK1).	AT1G69220	SGN-U218755	0.000007	3.464
Encodes a member of the NAC transcription factor gene family	AT1G69490	SGN-U213218	0.000664	1.131
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
Encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2	AT1G78080	SGN-U213279	0.000088	2.138
homeodomain protein GhHOX1	AT1G79840	SGN-U222383	0.000056	4.978
GLUTAMATE DECARBOXYLASE 3	AT2G02000	SGN-U212549	0.000065	1.428
subtilase family protein	AT2G05920	SGN-U212604	0.000415	3.634
phosphorylation-specific peptidyl prolyl cis/trans isomerase (PPIase)	AT2G18040	SGN-U215175	0.000006	3.433
PHY-INTERACTING FACTOR 1	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S2 1A	AT2G20580	SGN-U217058	0.000092	2.033
kinesin motor family protein	AT2G21300	SGN-U219620	0.022480	0.774
Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs.	AT2G29420	SGN-U217830	0.012949	1.065
PLASTID-SPECIFIC RIBOSOMAL PROTEIN 4	AT2G38140	SGN-U217679	0.025239	2.324
radical SAM domain-containing protein	AT2G39670	SGN-U220720	0.047682	1.509
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
Ethylene receptor, subfamily 1	AT2G40940	SGN-U214004	0.009248	1.591
ribosomal protein L1	AT2G42710	SGN-U220194	0.040966	0.818
LIPID PHOSPHATE PHOSPHATASE 3	AT3G02600	SGN-U215815	0.000785	2.198
Encodes a putative DegP protease	AT3G03380	SGN-U214757	0.000782	1.621
sugar transporter	AT3G05400	SGN-U215867	0.000224	0.998
RabGAP/TBC domain-containing protein	AT3G07890	SGN-U221619	0.000020	2.821
UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 11 (UBC11)	AT3G08690	SGN-U227058	0.000003	6.181
NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN	AT3G15510	SGN-U214595	0.000041	3.220
Encodes a thioredoxin-like disulfide reductase	AT3G17880	SGN-U213835	0.000028	2.511
cysteine proteinase	AT3G19390	SGN-U213770	0.010215	1.939

GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
member of Heat Stress Transcription Factor (Hsf) family	AT3G22830	SGN-U223372	0.000020	5.486
encodes a chloroplast pyruvate kinase alpha subunit	AT3G22960	SGN-U218288	0.000023	3.252
PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A2	AT3G25800	SGN-U213418	0.000181	1.824
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
putative disease resistance protein	AT3G46530	SGN-U223601	0.000118	1.786
disease resistance protein (CC-NBS class)	AT3G46730	SGN-U223030	0.000118	1.786
Encodes a member of the WNK family	AT3G48260	SGN-U222742	0.017083	1.440
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class),	AT3G50950	SGN-U216073	0.000217	4.648
STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 1	AT3G54670	SGN-U222369	0.000512	0.931
adaplin family protein	AT3G55480	SGN-U223942	0.000007	6.095
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
ARF-like small GTPase-like protein	AT3G62290	SGN-U212773	0.011084	1.080
UDP-GLUCURONIC ACID DECARBOXYLASE 2	AT3G62830	SGN-U215820	0.000071	5.782
CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 KDA	AT3G63140	SGN-U214810	0.001157	1.330
GRF1-INTERACTING FACTOR 3	AT4G00850	SGN-U218846	0.000002	4.370
ring domain containing protein	AT4G03510	SGN-U217185	0.000319	1.294
ARABIDOPSIS ALLANTOINASE	AT4G04955	SGN-U214730	0.009670	0.764
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine	AT4G19110	SGN-U214843	0.000009	5.877
Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase	AT4G23160	SGN-U229939	0.000986	2.074
ARABIDOPSIS THALIANA CELLULOSE SYNTHASE LIKE G1	AT4G24010	SGN-U214840	0.015825	1.021
encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF3)	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
PRENYLATED RAB ACCEPTOR 1.H (PRA1.H)	AT4G27540	SGN-U219117	0.019843	1.840
3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE	AT4G33510	SGN-U241555	0.003117	1.765

encodes a arginine decarboxylase (ADC),	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
chalcone synthase family protein	AT4G34850	SGN-U219061	0.004019	1.004
protein phosphatase 2C family protein	AT4G38520	SGN-U222725	0.010161	0.933
3-DEOXY-D-ARABINO- HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2	AT5G01220	SGN-U217927	0.035459	0.636
phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) reductase family protein; similar to Os01g0259600 [Oryza sativa]	AT5G03430	SGN-U219856	0.000003	7.245
CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE 1	AT5G04870	SGN-U217205	0.002169	1.152
putative laccase, a member of laccase family of genes (17 members in Arabidopsis).	AT5G09360	SGN-U214421	0.000024	3.677
Member of Actin gene family	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
THY5 protein	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
putative transcripction factor(auxin response factor)	AT5G18000	SGN-U219533	0.023415	1.281
zinc finger (C2H2 type) family protein	AT5G22890	SGN-U227696	0.000633	2.885
bZIP transcription factor	AT5G28770	SGN-U214344	0.000000	7.177
similar to ATHB34 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 34	AT5G39760	SGN-U229573	0.004044	2.949
catalytic/ enoyl-CoA hydratase	AT5G43280	SGN-U217048	0.000010	7.438
ARF GTPase-activating domain-containing protein	AT5G46750	SGN-U213469	0.008777	1.654
TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER/ATSDAT	AT5G47560	SGN-U224652	0.000008	1.181
FAD binding / oxidoreductase	AT5G47970	SGN-U216341	0.000269	1.641
HYDROXYCINNAMOYL-COA SHIKIMATE/QUINATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE	AT5G48930	SGN-U215516	0.005730	2.237
PREFOLDIN 3	AT5G49510	SGN-U217276	0.000243	2.305
Encodes a thiamine biosynthetic gene that has a dual function in thiamine biosynthesis and mitochondrial DNA damage tolerance	AT5G54770	SGN-U212885	0.000011	2.601
translation initiation factor	AT5G54940	SGN-U215499	0.000014	6.330
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family.	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
ZINC FINGER PROTEIN 2	AT5G57520	SGN-U220042	0.000844	1.164
Encodes a CBL-interacting protein kinase with similarity to SOS protein kinase	AT5G58380	SGN-U213441	0.016649	4.522
GDP-D-mannose 4,6-dehydratase	AT5G66280	SGN-U219161	0.003258	1.135
squamosa promoter binding protein- homologue 3	AT1G02065	SGN-U222319	0.016281	-0.982

1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	AT1G05010	SGN-U212786	0.008967	-1.261
phosphoribosylanthranilate isomerase	AT1G07780	SGN-U215559	0.026020	-0.772
protein kinase 1	AT1G07870	SGN-U216705	0.026148	-0.848
prephenate dehydratase	AT1G08250	SGN-U215754	0.002007	-1.235
actin-related protein strong similarity to gb U29610 Actin-like protein	AT1G13180	SGN-U221039	0.020812	-1.005
SRG1 (SENESCENCE-RELATED GENE 1)	AT1G17020	SGN-U223434	0.000626	-0.948
unknown protein [Oryza sativa]	AT1G19530	SGN-U213689	0.046305	-0.811
S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase	AT1G20330	SGN-U215017	0.007538	-1.078
unknown protein	AT1G21010	SGN-U218849	0.047701	-0.860
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	AT1G56720	SGN-U220590	0.014281	-1.212
glycosyl hydrolase family 1 similar to beta-glucosidase	AT1G61820	SGN-U233511	0.007751	-2.412
WRKY6; transcription factor	AT1G62300	SGN-U215122	0.017952	-0.922
NRS/ER (NUCLEOTIDE-RHAMNOSE SYNTHASE/EPIMERASE-REDUCTASE)	AT1G63000	SGN-U215290	0.041681	-0.855
gamma-tocopherol methyltransferase	AT1G64970	SGN-U216662	0.046633	-0.811
homeobox-leucine zipper protein ATHB-13	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
NAD(P)H:PLASTOQUINONE DEHYDROGENASE COMPLEX SUBUNIT O	AT1G74880	SGN-U218728	0.000870	-1.014
putative ribophorin I homologue	AT1G76400	SGN-U233362	0.003651	-0.887
GT-related trihelix DNA-binding protein similar to GT2	AT1G76880	SGN-U214842	0.000166	-1.946
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin) (Cyclosporin A-binding protein), cytosolic cyclophilin ROC3	AT2G16600	SGN-U212746	0.022142	-0.782
photosystem I psaH protein	AT2G19740	SGN-U212569	0.021713	-0.815
40S ribosomal protein S12 (RPS12C);	AT2G32060	SGN-U214277	0.024903	-1.015
oxygen-evolving complex 25.6 kD protein, chloroplast precursor	AT2G39470	SGN-U216850	0.000307	-1.315
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase - related	AT2G44530	SGN-U215972	0.000002	-2.125
3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1	AT3G10540	SGN-U215762	0.003994	-1.141
ferritin 2	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096

gonidia forming protein GlsA	AT3G11450	SGN-U213709	0.039786	-1.653
DEAD/DEAH box helicase, putative	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
Phytosulfokine 3 precursor	AT3G44735	SGN-U214504	0.003403	-1.261
aldose 1-epimerase family similar to ALDOSE 1-EPIMERASE PRECURSOR	AT3G47800	SGN-U215936	0.008582	-1.111
XH/XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein	AT3G48670	SGN-U215656	0.004077	-1.227
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
U-box protein	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
transcription factor bZIP61 (BZIP61),	AT3G58120	SGN-U220645	0.002341	-1.518
ATPP2-A13	AT3G61060	SGN-U219433	0.049000	-1.142
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT3G62570	SGN-U229304	0.038527	-0.789
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT4G02100	SGN-U220004	0.038527	-0.789
Type I (26 kD) CP29 polypeptide	AT4G10340	SGN-U212697	0.004804	-1.818
phytoene desaturase	AT4G14210	SGN-U219813	0.000079	-1.356
acylaminoacyl-peptidase-related	AT4G14570	SGN-U226164	0.001127	-1.380
plasma membrane polypeptide	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
dfr1	AT4G24380	SGN-U218888	0.007351	-1.230
disease resistance protein RPS2 (CC-NBS-LRR class	AT4G26090	SGN-U218882	0.009125	-0.960
ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27290	SGN-U225299	0.005267	-1.072
ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27300	SGN-U215168	0.005267	-1.072
putative receptor serine/threonine kinase	AT4G32300	SGN-U226435	0.012541	-1.168
nPAP; nucleic acid binding / nucleotidyltransferase/ polynucleotide adenylyltransferase	AT4G32850	SGN-U217520	0.012240	-1.034
40S ribosomal protein S29 (RPS29C);	AT4G33865	SGN-U213323	0.007956	-0.782
AP2 domain transcription factor, putative ethylene-responsive element binding	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
invertase - like protein mRNA, Lilium longiflorum	AT4G34860	SGN-U214570	0.005880	-0.917
G-box-binding factor 1	AT4G36730	SGN-U216671	0.003393	-1.171

histone H2A	AT5G02560	SGN-U214809	0.017733	-0.901
3-hydroxyacyl-[acyl-carrier protein] dehydratase/ catalytic	AT5G10160	SGN-U219066	0.012054	-0.922
Rad21/Rec8-like protein	AT5G16270	SGN-U218203	0.013813	-0.975
oxidoreductase	AT5G18900	SGN-U215883	0.034644	-0.819
putative RING-H2 zinc finger protein	AT5G22000	SGN-U223542	0.028022	-0.673
putative ubiquitin-conjugating enzyme E2	AT5G25760	SGN-U216051	0.002541	-1.315
transcriptional factor B3 family protein	AT5G42700	SGN-U222838	0.001050	-1.933
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
SOS3-INTERACTING PROTEIN 1, SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.8	AT5G58380	SGN-U213441	0.022785	-0.753
GcpE protein; nuclear gene for chloroplast product	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 189	AT5G67250	SGN-U218766	0.000778	-1.862

Tabelle 7:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen bei verschiedenen Zellulären prozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte xpressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT1G01480	SGN-U216896	0.003484	1.050
60S ribosomal protein L23 (RPL23A)	AT1G04480	SGN-U213170	0.000718	1.235
60S ribosomal protein L10A (RPL10aA);	AT1G08360	SGN-U212967	0.000059	2.087
glycinamide ribonucleotide synthetase (GAR synthetase)	AT1G09830	SGN-U222585	0.013468	0.993
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A)	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
Encodes a homolog of the potato p24 protein	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699
60S ribosomal protein L6 (RPL6A);	AT1G18540	SGN-U213998	0.000010	3.133
armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing family protein	AT1G24330	SGN-U220674	0.000872	1.189
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
WRKY71; transcription factor	AT1G29860	SGN-U218504	0.004601	1.282
UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 11 (UBP11)	AT1G32850	SGN-U219177	0.000276	3.384

embryo defective 1075 (emb1075)	AT1G43710	SGN-U212595	0.016509	0.837
E4/E8 binding protein-1	AT1G43770	SGN-U216046	0.000686	1.109
NUCLEOLIN LIKE 1	AT1G48920	SGN-U213956	0.000461	2.898
Ubiquitin-specific protease 6 (UBP6)	AT1G51710	SGN-U214827	0.015336	1.763
LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT1G56300	SGN-U216926	0.000857	4.661
TCP family transcription factor	AT1G58100	SGN-U219466	0.008200	1.011
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
MADS-box transcription factor FBP29	AT1G69120	SGN-U227986	0.000392	1.546
Encodes a putative serine/threonine kinase (SIK1).	AT1G69220	SGN-U218755	0.000007	3.464
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
Encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2	AT1G78080	SGN-U213279	0.000088	2.138
homeodomain protein GhHOX1	AT1G79840	SGN-U222383	0.000056	4.978
GLUTAMATE DECARBOXYLASE 3	AT2G02000	SGN-U212549	0.000065	1.428
subtilase family protein	AT2G05920	SGN-U212604	0.000415	3.634
PHY-INTERACTING FACTOR 1	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S2 1A	AT2G20580	SGN-U217058	0.000092	2.033
Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs.	AT2G29420	SGN-U217830	0.012949	1.065
PLASTID-SPECIFIC RIBOSOMAL PROTEIN 4	AT2G38140	SGN-U217679	0.025239	2.324
radical SAM domain-containing protein	AT2G39670	SGN-U220720	0.047682	1.509
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
ribosomal protein L1	AT2G42710	SGN-U220194	0.040966	0.818
transferase activity, transferring glycosyl groups, polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase activity (Arabidopsis)	AT3G01040	SGN-U229032	0.000188	3.353
LIPID PHOSPHATE PHOSPHATASE 3	AT3G02600	SGN-U215815	0.000785	2.198
Encodes a putative DegP protease	AT3G03380	SGN-U214757	0.000782	1.621
UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 11 (UBC11)	AT3G08690	SGN-U227058	0.000003	6.181
NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN	AT3G15510	SGN-U214595	0.000041	3.220
cysteine proteinase	AT3G19390	SGN-U213770	0.010215	1.939

GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
member of Heat Stress Transcription Factor (Hsf) family	AT3G22830	SGN-U223372	0.000020	5.486
encodes a chloroplast pyruvate kinase alpha subunit	AT3G22960	SGN-U218288	0.000023	3.252
PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A2	AT3G25800	SGN-U213418	0.000181	1.824
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
Encodes a member of the WNK family	AT3G48260	SGN-U222742	0.017083	1.440
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
similar to saposin B domain-containing protein	AT3G51730	SGN-U216444	0.012193	2.014
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
BETA-1,3-GLUCANASE 1	AT3G57270	SGN-U214527	0.003317	1.264
ARF-like small GTPase-like protein	AT3G62290	SGN-U212773	0.011084	1.080
UDP-GLUCURONIC ACID DECARBOXYLASE 2	AT3G62830	SGN-U215820	0.000071	5.782
CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 KDA	AT3G63140	SGN-U214810	0.001157	1.330
ring domain containing protein	AT4G03510	SGN-U217185	0.000319	1.294
ARABIDOPSIS ALLANTOINASE	AT4G04955	SGN-U214730	0.009670	0.764
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
oxidoreductase family protein	AT4G09670	SGN-U216843	0.014812	2.424
1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
cold-induced glucosyl transferase	AT4G14090	SGN-U213190	0.000044	3.735
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
putative GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein	AT4G18970	SGN-U216377	0.002410	1.049
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine	AT4G19110	SGN-U214843	0.000009	5.877
Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase	AT4G23160	SGN-U229939	0.000986	2.074
ARABIDOPSIS THALIANA CELLULOSE SYNTHASE LIKE G1	AT4G24010	SGN-U214840	0.015825	1.021
encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF3)	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE	AT4G33510	SGN-U241555	0.003117	1.765
encodes a arginine decarboxylase (ADC),	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
chalcone synthase family protein	AT4G34850	SGN-U219061	0.004019	1.004
protein phosphatase 2C family protein	AT4G38520	SGN-U222725	0.010161	0.933

3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2	AT5G01220	SGN-U217927	0.035459	0.636
phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) reductase family protein; similar to Os01g0259600 [Oryza sativa]	AT5G03430	SGN-U219856	0.000003	7.245
CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE 1	AT5G04870	SGN-U217205	0.002169	1.152
putative laccase, a member of laccase family of genes (17 members in Arabidopsis).	AT5G09360	SGN-U214421	0.000024	3.677
THY5 protein	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
putative transcription factor(auxin response factor)	AT5G18000	SGN-U219533	0.023415	1.281
zinc finger (C2H2 type) family protein	AT5G22890	SGN-U227696	0.000633	2.885
bZIP transcription factor	AT5G28770	SGN-U214344	0.000000	7.177
similar to ATHB34 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 34	AT5G39760	SGN-U229573	0.004044	2.949
catalytic/ enoyl-CoA hydratase	AT5G43280	SGN-U217048	0.000010	7.438
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein; similar to ARAB-1	AT5G45910	SGN-U222495	0.000340	3.839
FAD binding / oxidoreductase	AT5G47970	SGN-U216341	0.000269	1.641
HYDROXYCINNAMOYL-COA SHIKIMATE/QUINATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE	AT5G48930	SGN-U215516	0.005730	2.237
PREFOLDIN 3	AT5G49510	SGN-U217276	0.000243	2.305
Encodes a thiamine biosynthetic gene that has a dual function in thiamine biosynthesis and mitochondrial DNA damage tolerance	AT5G54770	SGN-U212885	0.000011	2.601
translation initiation factor	AT5G54940	SGN-U215499	0.000014	6.330
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family.	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
ZINC FINGER PROTEIN 2	AT5G57520	SGN-U220042	0.000844	1.164
Encodes a CBL-interacting protein kinase with similarity to SOS protein kinase	AT5G58380	SGN-U213441	0.016649	4.522
GDP-D-mannose 4,6-dehydratase	AT5G66280	SGN-U219161	0.003258	1.135
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	AT1G05010	SGN-U212786	0.008967	-1.261
aldo-keto reductase/ oxidoreductase	AT1G06690	SGN-U212944	0.002351	-1.374
phosphoribosylanthranilate isomerase	AT1G07780	SGN-U215559	0.026020	-0.772
protein kinase 1	AT1G07870	SGN-U216705	0.026148	-0.848
prephenate dehydratase	AT1G08250	SGN-U215754	0.002007	-1.235
SRG1 (SENESCENCE-RELATED GENE 1)	AT1G17020	SGN-U223434	0.000626	-0.948

unknown protein [<i>Oryza sativa</i>]	AT1G19530	SGN-U213689	0.046305	-0.811
S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase	AT1G20330	SGN-U215017	0.007538	-1.078
unknown protein	AT1G21010	SGN-U218849	0.047701	-0.860
ARP protein (REF); similar to oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	AT1G49670	SGN-U215908	0.008697	-0.894
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	AT1G56720	SGN-U220590	0.014281	-1.212
glycosyl hydrolase family 1 similar to beta-glucosidase	AT1G61820	SGN-U233511	0.007751	-2.412
WRKY6; transcription factor	AT1G62300	SGN-U215122	0.017952	-0.922
NRS/ER (NUCLEOTIDE-RHAMNOSE SYNTHASE/EPIMERASE-REDUCTASE)	AT1G63000	SGN-U215290	0.041681	-0.855
gamma-tocopherol methyltransferase	AT1G64970	SGN-U216662	0.046633	-0.811
homeobox-leucine zipper protein ATHB-13	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
aldo/keto reductase family	AT1G60690	SGN-U221679	0.000104	-1.189
putative ribophorin I homologue	AT1G76400	SGN-U233362	0.003651	-0.887
GT-related trihelix DNA-binding protein similar to GT2	AT1G76880	SGN-U214842	0.000166	-1.946
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin) (Cyclosporin A-binding protein), cytosolic cyclophilin ROC3	AT2G16600	SGN-U212746	0.022142	-0.782
photosystem I psaH protein	AT2G19740	SGN-U212569	0.021713	-0.815
40S ribosomal protein S12 (RPS12C);	AT2G32060	SGN-U214277	0.024903	-1.015
glycosyl hydrolase family 9 similar to endo-beta-1,4-glucanase	AT2G32990	SGN-U220005	0.004997	-1.777
oxygen-evolving complex 25.6 kD protein, chloroplast precursor	AT2G39470	SGN-U216850	0.000307	-1.315
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase - related	AT2G44530	SGN-U215972	0.000002	-2.125
3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1	AT3G10540	SGN-U215762	0.003994	-1.141
gonidia forming protein GlsA	AT3G11450	SGN-U213709	0.039786	-1.653
omega-6 fatty acid desaturase	AT3G12120	SGN-U214193	0.000617	-0.870
DEAD/DEAH box helicase, putative	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
aldose 1-epimerase family similar to ALDOSE 1-EPIMERASE PRECURSOR	AT3G47800	SGN-U215936	0.008582	-1.111
XH/XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein	AT3G48670	SGN-U215656	0.004077	-1.227
U-box protein	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443

transcription factor bZIP61 (BZIP61),	AT3G58120	SGN-U220645	0.002341	-1.518
ATPP2-A13	AT3G61060	SGN-U219433	0.049000	-1.142
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT3G62570	SGN-U229304	0.038527	-0.789
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT4G02100	SGN-U220004	0.038527	-0.789
Type I (26 kD) CP29 polypeptide	AT4G10340	SGN-U212697	0.004804	-1.818
phytoene desaturase	AT4G14210	SGN-U219813	0.000079	-1.356
acylaminoacyl-peptidase-related	AT4G14570	SGN-U226164	0.001127	-1.380
plasma membrane polypeptide	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
glycosyl hydrolase family 1 beta-glucosidase	AT4G21760	SGN-U216335	0.007751	-2.412
dfr1	AT4G24380	SGN-U218888	0.007351	-1.230
ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27290	SGN-U225299	0.005267	-1.072
ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27300	SGN-U215168	0.005267	-1.072
putative receptor serine/threonine kinase	AT4G32300	SGN-U226435	0.012541	-1.168
nPAP; nucleic acid binding / nucleotidyltransferase/ polynucleotide adenylyltransferase	AT4G32850	SGN-U217520	0.012240	-1.034
40S ribosomal protein S29 (RPS29C);	AT4G33865	SGN-U213323	0.007956	-0.782
AP2 domain transcription factor, putative ethylene-responsive element binding	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
invertase - like protein mRNA, Lilium longiflorum	AT4G34860	SGN-U214570	0.005880	-0.917
G-box-binding factor 1	AT4G36730	SGN-U216671	0.003393	-1.171
3-hydroxyacyl-[acyl-carrier protein] dehydratase/ catalytic	AT5G10160	SGN-U219066	0.012054	-0.922
oxidoreductase	AT5G18900	SGN-U215883	0.034644	-0.819
putative RING-H2 zinc finger protein	AT5G22000	SGN-U223542	0.028022	-0.673
putative ubiquitin-conjugating enzyme E2	AT5G25760	SGN-U216051	0.002541	-1.315
transcriptional factor B3 family protein	AT5G42700	SGN-U222838	0.001050	-1.933
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
SOS3-INTERACTING PROTEIN 1, SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.8	AT5G58380	SGN-U213441	0.022785	-0.753

GcpE protein; nuclear gene for chloroplast product	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 189	AT5G67250	SGN-U218766	0.000778	-1.862
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	AT5G38410	SGN-U225521	0.000145	-1.169
phosphoinositide-specific phospholipase C	AT5G58700	SGN-U220392	0.018693	-1.785

Tabelle 8:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen bei verschiedenen metabolischen Prozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
unknown protein	AT1G02475	SGN-U215613	0.043491	1.674
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	AT1G04140	SGN-U219841	0.000646	1.195
eukaryotic translation initiation factor-related	AT1G11480	SGN-U219227	0.000547	1.615
biological_process unknown;	AT1G12450	SGN-U218106	0.000006	5.031
biological_process unknown	AT1G17400	SGN-U223449	0.004979	1.729
biological_process unknown	AT1G19990	SGN-U219789	0.000024	3.017
senescence-associated protein-related	AT1G22160	SGN-U215002	0.000673	1.630
armadillo/beta-catenin repeat family protein	AT1G23180	SGN-U222376	0.002791	0.909
zinc-binding protein, putative / protein kinase C inhibitor	AT1G31160	SGN-U217019	0.018815	0.844
defective chloroplasts and leaves protein-related / DCL	AT1G45230	SGN-U216326	0.012102	0.920
IQ-domain 29 (IQD29) / calmodulin binding	AT2G02790	SGN-U227058	0.000003	6.181
unknown protein;	AT2G18245	SGN-U220682	0.000000	3.445
zinc finger (CCCH-type) family protein	AT2G20280	SGN-U220746	0.002948	1.794
LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 3 (LSH3);	AT2G31160	SGN-U223319	0.007213	0.830
dehydration-responsive family protein	AT2G39750	SGN-U225319	0.042837	0.651
flavodoxin family protein	AT3G02280	SGN-U223144	0.000024	4.402
unknown protein	AT3G11760	SGN-U216544	0.000134	1.607
transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein	AT3G20810	SGN-U218045	0.005874	1.043
unknown protein	AT3G25805	SGN-U223537	0.000433	1.295
putative cytochrome P450	AT3G26320	SGN-U217910	0.000055	2.002

enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectinesterase inhibitor	AT3G47670	SGN-U223698	0.031804	0.795
thioesterase family protein	AT3G61200	SGN-U214231	0.000069	2.932
unknown protein	AT4G09830	SGN-U218285	0.000071	4.470
PHD finger protein-related	AT4G23860	SGN-U224223	0.000084	1.352
pectate lyase family protein	AT4G24780	SGN-U212774	0.000053	4.092
integral membrane family protein	AT4G27870	SGN-U217403	0.000441	2.911
unknown protein	AT4G39630	SGN-U216813	0.024364	3.241
PURPLE ACID PHOSPHATASE 26	AT5G34850	SGN-U217205	0.002169	1.152
unknown protein	AT5G39890	SGN-U215475	0.008968	1.631
F-box family protein	AT5G49610	SGN-U224878	0.003869	1.306
SKIP1 (INTERACTING PARTNER 1)	AT5G57900	SGN-U222097	0.021978	1.146
dehydration-responsive protein-related	AT5G64030	SGN-U226939	0.013226	1.193
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	AT5G65660	SGN-U217499	0.000377	3.082
lesion inducing protein-related	AT1G04340	SGN-U218940	0.012857	-0.802
calcium-binding EF hand family pro	AT1G05150	SGN-U220523	0.025425	-0.896
unknown protein	AT1G15860	SGN-U221100	0.000472	-1.568
trypsin and protease inhibitor family protein	AT1G17860	SGN-U214645	0.022474	-0.791
JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8	AT1G30135	SGN-U220299	0.049161	-0.697
permease-related	AT1G34470	SGN-U222726	0.008584	-1.528
defective chloroplasts and leaves protein- related	AT1G45230	SGN-U216326	0.000317	-1.205
unknown protein	AT1G71940	SGN-U220874	0.000297	-1.624
unknown protein	AT1G73130	SGN-U217579	0.003653	-0.806
dienelactone hydrolase family protein	AT2G32520	SGN-U215917	0.034020	-0.909
unknown protein	AT2G33390	SGN-U218508	0.026312	-0.789
unknown protein	AT2G37240	SGN-U218930	0.000317	-1.068
unknown protein	AT2G42760	SGN-U221474	0.000933	-2.454
pathogenesis-related protein, putative	AT3G19690	SGN-U214259	0.004779	-1.191
OTU-like cysteine protease family protein	AT3G22260	SGN-U217039	0.021378	-1.164
unknown protein	AT3G50370	SGN-U217710	0.000002	-1.361
unknown protein	AT4G02550	SGN-U229966	0.018881	-1.194

unknown protein	AT4G24310	SGN-U219115	0.010954	-1.424
unknown protein	AT5G28910	SGN-U214855	0.012100	-1.181
unknown protein;	AT5G28960	SGN-U214854	0.012100	-1.181
unknown protein	AT5G53220	SGN-U222258	0.049216	-0.869

Tabelle 9:

Differentiell regulierte Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit einer unbekannten biologischen Funktion. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
60S ribosomal protein L23 (RPL23A)	AT1G04480	SGN-U213170	0.000718	1.235
60S ribosomal protein L10A (RPL10aA);	AT1G08360	SGN-U212967	0.000059	2.087
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A)	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
60S ribosomal protein L6 (RPL6A);	AT1G18540	SGN-U213998	0.000010	3.133
armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing family protein	AT1G24330	SGN-U220674	0.000872	1.189
UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 11 (UBP11)	AT1G32850	SGN-U219177	0.000276	3.384
Ubiquitin-specific protease 6 (UBP6)	AT1G51710	SGN-U214827	0.015336	1.763
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT1G56300	SGN-U216926	0.000857	4.661
PHOSPATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
Encodes a putative serine/threonine kinase (SIK1).	AT1G69220	SGN-U218755	0.000007	3.464
subtilase family protein	AT2G05920	SGN-U212604	0.000415	3.634
26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S2 1A	AT2G20580	SGN-U217058	0.000092	2.033
PLASTID-SPECIFIC RIBOSOMAL PROTEIN 4	AT2G38140	SGN-U217679	0.025239	2.324
ribosomal protein L1	AT2G42710	SGN-U220194	0.040966	0.818
Encodes a putative DegP protease	AT3G03380	SGN-U214757	0.000782	1.621
UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 11 (UBC11)	AT3G08690	SGN-U227058	0.000003	6.181
cysteine proteinase	AT3G19390	SGN-U213770	0.010215	1.939
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
Encodes a member of the WNK family	AT3G48260	SGN-U222742	0.017083	1.440
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
ARF-like small GTPase-like protein	AT3G62290	SGN-U212773	0.011084	1.080

ring domain containing protein	AT4G03510	SGN-U217185	0.000319	1.294
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine	AT4G19110	SGN-U214843	0.000009	5.877
Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase	AT4G23160	SGN-U229939	0.000986	2.074
26S proteasome subunit RPN1b	AT4G28470	SGN-U216121	0.000092	2.033
protein phosphatase 2C family protein	AT4G38520	SGN-U222725	0.010161	0.933
CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE 1	AT5G04870	SGN-U217205	0.002169	1.152
PREFOLDIN 3	AT5G49510	SGN-U217276	0.000243	2.305
translation initiation factor	AT5G54940	SGN-U215499	0.000014	6.330
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family.	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
Encodes a CBL-interacting protein kinase with similarity to SOS protein kinase	AT5G58380	SGN-U213441	0.016649	4.522
protein kinase 1	AT1G07870	SGN-U216705	0.026148	-0.848
unknown protein [Oryza sativa]	AT1G19530	SGN-U213689	0.046305	-0.811
unknown protein	AT1G21010	SGN-U218849	0.047701	-0.860
26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a-like	AT1G45000	SGN-U214643	0.000004	-1.102
ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	AT1G56720	SGN-U220590	0.014281	-1.212
putative ribophorin I homologue	AT1G76400	SGN-U233362	0.003651	-0.887
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin) (Cyclosporin A-binding protein), cytosolic cyclophilin ROC3	AT2G16600	SGN-U212746	0.022142	-0.782
photosystem I psaH protein	AT2G19740	SGN-U212569	0.021713	-0.815
40S ribosomal protein S12 (RPS12C);	AT2G32060	SGN-U214277	0.024903	-1.015
3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1	AT3G10540	SGN-U215762	0.003994	-1.141
U-box protein	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
ATPP2-A13	AT3G61060	SGN-U219433	0.049000	-1.142
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT3G62570	SGN-U229304	0.038527	-0.789
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT4G02100	SGN-U220004	0.038527	-0.789
acylaminoacyl-peptidase-related	AT4G14570	SGN-U226164	0.001127	-1.380
plasma membrane polypeptide	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954

ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27290	SGN-U225299	0.005267	-1.072
ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	AT4G27300	SGN-U215168	0.005267	-1.072
putative receptor serine/threonine kinase	AT4G32300	SGN-U226435	0.012541	-1.168
40S ribosomal protein S29 (RPS29C);	AT4G33865	SGN-U213323	0.007956	-0.782
oxidoreductase	AT5G18900	SGN-U215883	0.034644	-0.819
putative RING-H2 zinc finger protein	AT5G22000	SGN-U223542	0.028022	-0.673
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
SOS3-INTERACTING PROTEIN 1, SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.8	AT5G58380	SGN-U213441	0.022785	-0.753
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 189	AT5G67250	SGN-U218766	0.000778	-1.862

Tabelle 10:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen im Proteinmetabolismus. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A).	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
embryo defective 1075	AT1G43710	SGN-U212595	0.016509	0.837
ATNUC-L1	AT1G48920	SGN-U213956	0.000461	2.898
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
Encodes a phosphatidylinositol 3-kinase	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
AGAMOUS-LIKE 7	AT1G69120	SGN-U227986	0.000392	1.546
ARABIDOPSIS NAC DOMAIN PROTEIN 029	AT1G69490	SGN-U213218	0.000664	1.131
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein.	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
GLABRA 2	AT1G79840	SGN-U222383	0.000056	4.978
Encodes a novel Myc-related bHLH transcription factor	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2	AT3G15510	SGN-U214595	0.000041	3.220
EMBRYO DEFECTIVE 2736	AT3G19980	SGN-U214117	0.003584	1.061

rcd1-like cell differentiation protein	AT3G20800	SGN-U213952	0.000268	1.390
GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
Arabidopsis thaliana GRF1-interacting factor 3	AT4G00850	SGN-U218846	0.000002	4.370
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
embryo sac development arrest 9 (EDA9);	AT4G34200	SGN-U224282	0.000075	1.166
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
chalcone and stilbene synthase family protein	AT4G34850	SGN-U219061	0.004019	1.004
Member of Actin gene family	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
DELTA(3,5),DELTA(2,4)-DIENOYL-COA ISOMERASE 1	AT5G43280	SGN-U217048	0.000010	7.438
CLP PROTEASE P4	AT5G45390	SGN-U215977	0.002820	1.781
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
EMBRYO DEFECTIVE 2755	AT5G56680	SGN-U215530	0.000900	1.266
AGL62 encodes a Type I MADS domain protein	AT5G60440	SGN-U230865	0.000346	3.636
EMBRYO DEFECTIVE 2759	AT5G63050	SGN-U220964	0.000026	3.494
SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8	AT1G02065	SGN-U222319	0.016281	-0.982
embryo defective 2004 (emb2004);	AT1G10510	SGN-U218268	0.017255	-0.902
ACTIN-RELATED PROTEIN 3	AT1G13180	SGN-U221039	0.020812	-1.005
Encodes a sterol-C24-methyltransferases involved in sterol biosynthesis	AT1G20330	SGN-U215017	0.007538	-1.078
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.17	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
encodes a RING-type E3 ubiquitin ligase implicated in gametogenesis	AT5G22000	SGN-U223542	0.028022	-0.673
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
MADS box gene negatively regulated by APETALA1	AT5G60910	SGN-U213659	0.000270	-0.979

Tabelle 11:

Differentiell regulierte Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit einer Funktion während Entwicklungsprozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
Encodes a homolog of the potato p24 protein.	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699
major latex protein-related / MLP-related/ PR-10 (Solanum virrinianum)	AT1G14930	SGN-U212989	0.000014	4.701
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
VACUOLAR PROTEIN SORTING 34/ PHOSPATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
binding / catalytic/ coenzyme binding;	AT2G20360	SGN-U215902	0.001405	2.676
ENOLASE 2	AT2G36530	SGN-U212825	0.000493	1.340
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
ARABIDOPSIS THALIANA REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1	AT3G02230	SGN-U219866	0.000001	7.510
ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE/ viroid-RNA binding Protein	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 13	AT3G46530	SGN-U223601	0.000118	1.786
disease resistance protein (CC-NBS class)	AT3G46730	SGN-U223030	0.000118	1.786
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)	AT3G50950	SGN-U216073	0.000217	4.648
SALT- AND DROUGHT-INDUCED RING FINGER1	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
ARABIDOPSIS ALLANTOINASE	AT4G04955	SGN-U214730	0.009670	0.764
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
C-REPEAT BINDING FACTOR 3	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2	AT5G01220	SGN-U217927	0.035459	0.636
malate dehydrogenase / response to cadmium ion	AT1G04410	SGN-U212714	0.000646	-1.152
INVOLVED IN: response to oxidative stress; LOCATED IN: plasma membrane;	AT1G14870	SGN-U215423	0.001143	-1.453

ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
COLD REGULATED 314 THYLAKOID MEMBRANE 2	AT1G29390	SGN-U219974	0.000142	-1.353
molecular function has not been defined. Was shown involved in oxidative stress tolerance	AT1G49670	SGN-U215908	0.008697	-0.894
Encodes gene that is induced in response to desiccation	AT2G21620	SGN-U214986	0.018209	-1.177
ferritin 2 (ATFER2);	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1	AT3G17510	SGN-U214714	0.002467	-1.168
DEAD-box protein required for efficient group II intron splicing in mitochondria.	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
PLANT U-BOX 22 involved in the response to water stress	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
ARABIDOPSIS THALIANA PHLOEM PROTEIN 2-A13	AT3G61060	SGN-U219433	0.049000	-1.142
osmotin-like protein	AT4G11650	SGN-U212928	0.005845	-2.208
ARABIDOPSIS THALIANA PLASMA-MEMBRANE ASSOCIATED CATION-BINDING PROTEIN 1	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
Encodes a plasma membrane protein with leucine-rich repeat / RGC2 resistance protein	AT4G26090	SGN-U218882	0.009125	-0.960
REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
Transcription factor of the B-ZIP family that has high affinity for C-box motifs / AHBP-1B	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990
ARABIDOPSIS THALIANA MEMBRANE-ASSOCIATED MANNITOL-INDUCED	AT5G54110	SGN-U219162	0.045396	-0.772
4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 12:

Differentiell regulierte Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit einer Funktion während der pflanzlichen Stressantwort. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
major latex protein-related / MLP-related/ PR-10 (<i>Solanum virrinianum</i>)	AT1G14930	SGN-U212989	0.000014	4.701
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
VACUOLAR PROTEIN SORTING 34/PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034

binding / catalytic/ coenzyme binding;	AT2G20360	SGN-U215902	0.001405	2.676
ENOLASE 2	AT2G36530	SGN-U212825	0.000493	1.340
SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1	AT2G40690	SGN-U223668	0.003311	0.881
ARABIDOPSIS THALIANA REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1	AT3G02230	SGN-U219866	0.000001	7.510
ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 13	AT3G46530	SGN-U223601	0.000118	1.786
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
SALT- AND DROUGHT-INDUCED RING FINGER1	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5- CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881
1-AMINOCYCLOPROPANE-1- CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
ARABIDOPSIS THALIANA PURINE PERMEASE 10	AT4G18210	SGN-U213547	0.000004	6.535
C-REPEAT BINDING FACTOR 3	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
ARGININE DECARBOXYLASE 2	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
3-DEOXY-D-ARABINO- HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1	AT4G39980	SGN-U225512	0.000011	2.601
NDR1/HIN1-LIKE 3	AT5G06320	SGN-U213159	0.003314	0.892
ACTIN 2 / ACTIN 7	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor.	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN	AT5G20230	SGN-U213376	0.000038	2.722
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212618	0.019149	1.352
MBG8.3 / THIAMINE4 / THIAZOLE REQUIRING	AT5G54770	SGN-U212885	0.000011	2.601
a member of heat shock protein 90 (HSP90) gene family	AT5G56030	SGN-U212639	0.000033	6.301
malate dehydrogenase / response to cadmium ion	AT1G04410	SGN-U212714	0.000646	-1.152
PHOTOLYASE 1 / UV RESISTANCE 2	AT1G12370	SGN-U225151	0.036946	-0.781
ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
Encodes gene that is induced in response to dessication	AT2G21620	SGN-U214986	0.018209	-1.177
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 3 / CIPK3	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836

ARABIDOPSIS THALIANA PHYTOCYSTATIN 6	AT3G12490	SGN-U213642	0.023298	-1.004
CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1	AT3G17510	SGN-U214714	0.002467	-1.168
DEAD-box protein required for efficient group II intron splicing in mitochondria.	AT3G22330	SGN-U219774	0.010378	-1.764
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
PLANT U-BOX 22 involved in the response to water stress	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5	AT4G10340	SGN-U212697	0.004804	-1.818
osmotin-like protein	AT4G11650	SGN-U212928	0.005845	-2.208
ARABIDOPSIS THALIANA PLASMA- MEMBRANE ASSOCIATED CATION- BINDING PROTEIN 1	AT4G20260	SGN-U213704	0.029631	-0.954
Encodes a plasma membrane protein with leucine-rich repeat / RGC2 resistance protein	AT4G26090	SGN-U218882	0.009125	-0.960
REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
Transcription factor of the B-ZIP family that has high affinity for C-box motifs / AHBP- 1B	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION 101	AT5G18070	SGN-U225989	0.013884	-1.110
TUBULIN BETA 8	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990
ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO	AT5G38410	SGN-U225521	0.000145	-1.169
ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1	AT5G48300	SGN-U225539	0.024989	-0.691
MATE efflux protein-related; FUNCTIONS IN: antiporter activity, drug transporter	AT5G52450	SGN-U223514	0.024989	-0.691
ARABIDOPSIS THALIANA MEMBRANE-ASSOCIATED MANNITOL-INDUCED	AT5G54110	SGN-U219162	0.045396	-0.772
COP9 SIGNALOSOME SUBUNIT 6A	AT5G56280	SGN-U216486	0.018373	-0.814
4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 13:

Differentiell regulierte Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit einer Funktion während der Reaktion auf biotische und abiotische Reize. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Unigene	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Ran-binding protein 1 domain-containing protein / RanBP1	AT1G52380	SGN-U217017	0.000038	5.419
Encodes a phosphatidylinositol 3-kinase	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	AT1G72160	SGN-U215321	0.008078	1.723
kinesin motor family protein; FUNCTIONS IN: microtubule motor activity	AT2G21300	SGN-U219620	0.022480	0.774

Subunit G of the vacuolar membrane ATPase complex	AT3G01390	SGN-U216066	0.000121	1.183
sugar transporter, putative;	AT3G05400	SGN-U215867	0.000224	0.998
cell wall-plasma membrane linker protein homolog (CWLP)	AT3G22120	SGN-U213316	0.007027	1.284
adaplin family protein	AT3G55480	SGN-U223942	0.000007	6.095
RMA1	AT4G03510	SGN-U217185	0.000319	1.294
ARABIDOPSIS THALIANA PURINE PERMEASE 10	AT4G18210	SGN-U213547	0.000004	6.535
bile acid:sodium symporter family protein	AT4G22840	SGN-U220184	0.030708	1.608
PRENYLATED RAB ACCEPTOR 1.H	AT4G27540	SGN-U219117	0.019843	1.840
Al-stress-induced gene	AT5G20230	SGN-U213376	0.000038	2.722
Encodes a tonoplast malate/fumarate transporter / ATSDAT	AT5G47560	SGN-U224652	0.000008	1.181
ARABIDOPSIS THALIANA V-PPASE 3 (Vacuole)	AT1G15690	SGN-U213604	0.009454	-0.891
ras-related small GTPase	AT1G43890	SGN-U220375	0.018881	-1.194
endomembrane protein 70, putative; INVOLVED IN: transport;	AT2G01970	SGN-U234576	0.002267	-1.056
heavy-metal-associated domain-containing protein	AT3G07600	SGN-U217738	0.012576	-0.958
ferritin 2 (ATFER2);	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096
PEROXIN4 / UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21	AT5G25760	SGN-U216051	0.002541	-1.315

Tabelle 14:

Differentiell regulierte Gene in *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotyle mit einer Funktion während Transportvorgängen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
CONSTITUTIVELY ACTIVATED CELL DEATH 1	AT1G29690	SGN-U227156	0.003447	1.150
LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
Encodes a member of the NAC transcription factor gene family	AT1G69490	SGN-U213218	0.000664	1.131
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
GEK1 (GEKO1)	AT2G03800	SGN-U219182	0.000859	2.090
subtilisin-like protease	AT2G05920	SGN-U212604	0.000415	3.634
putative glutathione S-transferase T3	AT2G29420	SGN-U217830	0.012949	1.065

enolase	AT2G36530	SGN-U212825	0.000493	1.340
embryo-abundant protein EMB	AT2G41380	SGN-U213285	0.000771	3.139
Acidic 26 kDa endochitinase precursor	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE	AT3G22200	SGN-U213220	0.000493	0.945
encodes a chloroplast pyruvate kinase alpha subunit	AT3G22960	SGN-U218288	0.000023	3.252
PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A2	AT3G25800	SGN-U213418	0.000181	1.824
GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2	AT3G55610	SGN-U216928	0.000597	1.412
1-AMINOCYCLOPROPANE-1- CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280	SGN-U213523	0.000065	1.792
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
encodes a arginine decarboxylase (ADC),	AT4G34710	SGN-U213123	0.000575	2.883
Member of Actin gene family	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
THY5 protein	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
glutamate decarboxylase isozyme 1	AT5G17330	SGN-U212561	0.025239	2.324
zinc finger (C2H2 type) family protein	AT5G22890	SGN-U227696	0.000633	2.885
Putative beta tubulin	AT5G23860	SGN-U212618	0.019149	1.352
VPS13 - like protein	AT5G24740	SGN-U220055	0.002301	0.917
EMB2755; ATP binding / asparagine-tRNA ligase/ aspartate-tRNA ligase/ nucleic acid binding / tRNA ligase	AT5G56680	SGN-U215530	0.000900	1.266
malate dehydrogenase-like protein	AT1G04410	SGN-U212714	0.000646	-1.152
SRG1 (SENESCENCE-RELATED GENE 1)	AT1G17020	SGN-U223434	0.000626	-0.948
WRKY6; transcription factor	AT1G62300	SGN-U215122	0.017952	-0.922
type 2 peroxiredoxin -related	AT1G65980	SGN-U214598	0.038560	-0.673
homeobox-leucine zipper protein ATHB-13	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
auxin and ethylene responsive GH3-like protein	AT2G14960	SGN-U228025	0.002477	-1.436
Ser/Thr protein kinase	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836
carboxymethylenebutenolidase -related	AT2G32520	SGN-U215917	0.034020	-0.909
RNase NGR2]	AT2G39780	SGN-U220195	0.000011	-1.365
ferritin 2	AT3G11050	SGN-U213608	0.000820	-1.096

CIPK1 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1)	AT3G17510	SGN-U214714	0.002467	-1.168
XH/XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein	AT3G48670	SGN-U215656	0.004077	-1.227
U-box protein	AT3G52450	SGN-U232823	0.007226	-1.443
AP2 domain transcription factor, putative ethylene-responsive element binding	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
bZIP transcription factor HBP-1b homolog	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
Beta tubulin	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990

Tabelle 15:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen während verschiedener biologischer Prozesse. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
WRKY71; transcription factor	AT1G29860	SGN-U218504	0.004601	1.282
E4/E8 binding protein-1	AT1G43770	SGN-U216046	0.000686	1.109
TCP family transcription factor	AT1G58100	SGN-U219466	0.008200	1.011
MADS-box transcription factor FBP29	AT1G69120	SGN-U227986	0.000392	1.546
Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein	AT1G69780	SGN-U216815	0.000007	6.463
Encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2	AT1G78080	SGN-U213279	0.000088	2.138
homeodomain protein GhHOX1	AT1G79840	SGN-U222383	0.000056	4.978
PHY-INTERACTING FACTOR 1	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN	AT3G15510	SGN-U214595	0.000041	3.220
member of Heat Stress Transcription Factor (Hsf) family	AT3G22830	SGN-U223372	0.000020	5.486
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF3)	AT4G25480	SGN-U216204	0.000685	1.481
THY5 protein	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337
putative transcrption factor(auxin response factor)	AT5G18000	SGN-U219533	0.023415	1.281
zinc finger (C2H2 type) family protein	AT5G22890	SGN-U227696	0.000633	2.885
bZIP transcription factor	AT5G28770	SGN-U214344	0.000000	7.177

similar to ATHB34 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 34)	AT5G39760	SGN-U229573	0.004044	2.949
ZINC FINGER PROTEIN 2	AT5G57520	SGN-U220042	0.000844	1.164
WRKY6; transcription factor	AT1G62300	SGN-U215122	0.017952	-0.922
homeobox-leucine zipper protein ATHB-13	AT1G69780	SGN-U216815	0.030079	-0.783
GT-related trihelix DNA-binding protein similar to GT2	AT1G76880	SGN-U214842	0.000166	-1.946
transcription factor bZIP61 (BZIP61),	AT3G58120	SGN-U220645	0.002341	-1.518
AP2 domain transcription factor, putative ethylene-responsive element binding	AT4G34410	SGN-U216297	0.000118	-1.384
G-box-binding factor 1	AT4G36730	SGN-U216671	0.003393	-1.171
transcriptional factor B3 family protein	AT5G42700	SGN-U222838	0.001050	-1.933

Tabelle 16:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen während der Transkription. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Encodes eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF-5A)	AT1G13950	SGN-U214373	0.000006	6.375
Encodes a homolog of the potato p24 protein	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699
NUCLEOLIN LIKE 1	AT1G48920	SGN-U213956	0.000461	2.898
LIPOXYGENASE 1	AT1G55020	SGN-U212777	0.001161	1.054
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE	AT1G60490	SGN-U229859	0.000153	0.864
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
kinesin motor family protein	AT2G21300	SGN-U219620	0.022480	0.774
putative vacuolar protein sorting protein	AT2G38020	SGN-U222400	0.049863	1.610
radical SAM domain-containing protein	AT2G39670	SGN-U220720	0.047682	1.509
reversibly glycosylated polypeptide possibly involved in plant cell wall synthesis	AT3G02230	SGN-U219866	0.000001	7.510
STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 1	AT3G54670	SGN-U222369	0.000512	0.931
adaptin family protein	AT3G55480	SGN-U223942	0.000007	6.095
PREDICTED: similar to Tetratricopeptide repeat protein 11 (TPR repeat protein 11) (Fis1 homolog)	AT3G57090	SGN-U215770	0.000044	4.672
CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 KDA	AT3G63140	SGN-U214810	0.001157	1.330

chalcone synthase family protein	AT4G34850	SGN-U219061	0.004019	1.004
Member of Actin gene family	AT5G09810	SGN-U213130	0.000241	1.556
Putative beta tubulin	AT5G23860	SGN-U212618	0.019149	1.352
CLP PROTEASE P4	AT5G45390	SGN-U215977	0.002820	1.781
translation initiation factor	AT5G54940	SGN-U215499	0.000014	6.330
formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein	AT5G67470	SGN-U219139	0.006222	1.047
actin-related protein strong similarity to gb U29610 Actin-like protein	AT1G13180	SGN-U221039	0.020812	-1.005
photosystem I psaH protein	AT2G19740	SGN-U212569	0.021713	-0.815
enzyme inhibitor/ pectinesterase	AT3G49220	SGN-U219777	0.019166	-1.726
histone H2A	AT5G02560	SGN-U214809	0.017733	-0.901
Rad21/Rec8-like protein	AT5G16270	SGN-U218203	0.013813	-0.975
Beta tubulin	AT5G23860	SGN-U212622	0.023762	-0.990
putative ubiquitin-conjugating enzyme E2	AT5G25760	SGN-U216051	0.002541	-1.315

Tabelle 17:

In *S/MMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen während der Zell-Organisation und Biogenese. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3	AT1G27320	SGN-U214512	0.004670	2.000
Encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2	AT1G78080	SGN-U213279	0.000088	2.138
PHY-INTERACTING FACTOR 1	AT2G20180	SGN-U231769	0.005006	1.034
ARABIDOPSIS GOLDEN2-LIKE 1	AT2G20570	SGN-U226143	0.000006	6.165
Ethylene receptor, subfamily 1	AT2G40940	SGN-U214004	0.009248	1.591
RabGAP/TBC domain-containing protein	AT3G07890	SGN-U221619	0.000020	2.821
Acidic 26 kDa endochitinase precursor	AT3G12500	SGN-U213790	0.001184	2.298
1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase/ ATP binding / protein binding / zinc ion binding	AT3G14270	SGN-U219689	0.000111	2.733
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	AT3G55530	SGN-U218541	0.004044	2.949
PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1	AT4G15900	SGN-U218496	0.008444	1.108
THY5 protein	AT5G11260	SGN-U221674	0.030493	1.337

ARF GTPase-activating domain-containing protein	AT5G46750	SGN-U213469	0.008777	1.654
Encodes a CBL-interacting protein kinase with similarity to SOS protein kinase	AT5G58380	SGN-U213441	0.016649	4.522
leucine-rich repeat resistance protein-like protein	AT5G61240	SGN-U214103	0.027233	1.297
RAB1Y	AT1G43890	SGN-U220375	0.018881	-1.194
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin) (Cyclosporin A-binding protein), cytosolic cyclophilin ROC3	AT2G16600	SGN-U212746	0.022142	-0.782
Ser/Thr protein kinase	AT2G26980	SGN-U213274	0.023006	-0.836
bZIP transcription factor HBP-1b homolog	AT5G06950	SGN-U216042	0.002651	-1.399
SOS3-INTERACTING PROTEIN 1, SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.8	AT5G58380	SGN-U213441	0.022785	-0.753
phosphoinositide-specific phospholipase C	AT5G58700	SGN-U220392	0.018693	-1.785
GcpE protein; nuclear gene for chloroplast product	AT5G60600	SGN-U214196	0.008318	-1.259

Tabelle 18:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit einer Funktion während Signaltransduktionsprozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2)	AT1G13440	SGN-U212862	0.000005	5.445
encodes a chloroplast pyruvate kinase alpha subunit	AT3G22960	SGN-U218288	0.000023	3.252
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydophosphate dehydrogenase subunit A)	AT3G26650	SGN-U225515	0.000035	1.441
OXYGEN EVOLVING COMPLEX SUBUNIT 33 KDA	AT3G50820	SGN-U212743	0.000007	6.054
ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE	AT4G09650	SGN-U215141	0.022512	1.881

Tabelle 19:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen beim Elektronentransport und während Energieprozessen. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des At Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

The Arabidopsis Information Resource Homolog	At Gene ID	SOL Genomics Network Unigene	p-wert	Fold change
Encodes a homolog of the potato p24 protein	AT1G14410	SGN-U218758	0.000050	6.699

type II CPD photolyase PHR1 (PHR1)	AT1G12370	SGN-U226674	0.036946	-0.781
S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase	AT1G20330	SGN-U215017	0.007538	-1.078
XH/XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein	AT3G48670	SGN-U215656	0.004077	-1.227
A-type cyclin-dependent kinase	AT3G48750	SGN-U215180	0.010674	-0.951
DRT101 (DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION 101)	AT5G18070	SGN-U225989	0.013884	-1.110

Tabelle 20:

In *SIMMP1/2*-RNAi-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit Funktionen im DNA und RNA Metabolismus. Gezeigt sind der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz, und die ermittelte Expressionsdifferenz (Induktion-, bzw. Repression) (als Dyadischer Logarithmus) aus sechs Mikroarrays. Ebenso gezeigt sind die Gene-ID des *At* Homolog und die Unigene-Nummer (SOL genomics network) der Gene.

6.3: Identifizierung von im Tom1 Array nicht annotierten EST-Klonen.

Probe ID	Unigene	5' Best Hit	e Wert	Unigene	3' Best Hit	e Wert
1-1-3.3.12.15	SGN-U318879	homeobox-leucine zipper protein 13 (HB-13)	1,00E-140	SGN-U313185	similar to guanylate kinase 1 (GK-1)	1,00E-135
1-1-4.2.1.2	SGN-U313813	NADPH-cytochrome p450 reductase	2,00E-51	SGN-U313813	NADPH-cytochrome p450 reductase	2,00E-51
1-1-2.4.3.7	SGN-U315194	RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 4	3,00E-13	SGN-U315194	RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 4	3,00E-13
1-1-6.2.12.16	SGN-U328367	unknown protein	3,00E-69	SGN-U328367	unknown protein	3,00E-69
1-1-1.1.7.6	SGN-U318107	calmodulin-binding family protein	8,00E-42	SGN-U318107	calmodulin-binding family protein	8,00E-42
1-1-1.4.7.14	No Hits	No Hits		No Hits	No Hits	
1-1-3.3.7.11	SGN-U312505	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	3,00E-37	SGN-U312505	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	3,00E-37
1-1-2.1.17.20	SGN-U341775	unknown protein	3,00E-29	SGN-U313185	guanylate kinase 1 (GK-1)	1,00E-169
1-1-5.2.15.20	SGN-U315672	phytosulfokines-related	1,00E-175	SGN-U315672	phytosulfokines-related	1,00E-175
1-1-5.2.12.10	SGN-U315896	PHD finger family protein	2,00E-14	SGN-U315896	PHD finger family protein	2,00E-14
1-1-5.2.8.20	No Hits	No Hits		SGN-U315896	PHD finger family protein	2,00E-14
1-1-5.2.8.20	SGN-U312533	expressed protein	6,00E-123	No Hits	No Hits	
1-1-5.3.6.19		No Hits		SGN-U373520	RuBisCO small subunit 1A	6,00E-34
1-1-2.2.5.3	SGN-U277955	subtilisin-like serine protease	1,00E-45	SGN-U317566	calcineurin-like phosphoesterase	6,00E-101
1-1-2.4.5.3	SGN-U321393	expressed protein	1,00E-93	SGN-U321393	expressed protein	1,00E-93
1-1-1.3.20.20	SGN-U356462	unknown protein	2,00E-20	SGN-U312428	unknown protein	1,00E-170
1-1-1.1.2.10	SGN-U314441	cytochrome b5	1,00E-39	SGN-U314441	cytochrome b5	1,00E-39
1-1-2.1.7.20	SGN-U352749	unknown protein	1,00E-152	SGN-U352749	unknown protein	1,00E-152
1-1-6.1.13.17	SGN-U375337	unknown protein	4,00E-24	SGN-U373463	unknown protein	1,00E-26

1-1-2.3.15.13	SGN-U362713	unknown protein	2,00E-40	No Hits	No Hits	
1-1-5.1.15.13	SGN-U319574	lipin family protein	4,00E-62	SGN-U315673	phytosulfokines-related	3,00E-08
1-1-5.2.18.18	SGN-U324453	protein kinase family protein	7,00E-36	SGN-U328377	putative protein kinase	9,00E-11
1-1-1.2.18.14	SGN-U318895	unknown protein	2,00E-07	SGN-U318895	unknown protein	2,00E-07
1-1-2.1.2.15	No Hits	No Hits		SGN-U319638	nicotinate phosphoribosyltransferase	0
1-1-5.3.2.2	SGN-U316274	oxidoreductase NAD-binding	2,00E-97	SGN-U315448	Chloroplast-localized Thylakoid formation1	5,00E-94
1-1-3.3.2.4	SGN-U314706	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0	SGN-U314706	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0
1-1-1.1.4.12	SGN-U317651	ankyrin repeat family protein	7,00E-50	SGN-U317651	ankyrin repeat family protein	7,00E-50
1-1-8.1.6.12	SGN-U318890	cellulose synthase family protein	1,00E-180	SGN-U318890	cellulose synthase family protein	1,00E-180
1-1-8.1.6.12	SGN-U313808	glycosyltransferase family protein	3,00E-88	SGN-U323855	C2 domain-containing protein	1,00E-49

Tabelle 21:

In *S/MMP1/2-RNAi*-Hypokotylen differentiell regulierte Gene mit unbekannten Sequenzen. cDNA-Klone wurden unter <http://ted.bti.cornell.edu/> bezogen, und die cDNA Sequenz wurde ermittelt (Macrogen, Korea). Gezeigt sind die Spot ID vom Tom1-Array, die Unigene-Nummer (SOL genomics network) mit der höchsten Sequenzähnlichkeit in 5→ und in 3→ Orientierung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Stuttgart-Hohenheim, den

Christian Pasule

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Christian Pasule
geb. am 21.10.1976 in Biled/Rumänien
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG

1983-1986	Gesamtschule in Biled/Rumänien
1986-1987	Grundschule in Philippsburg
1987-1988	Hauptschule in Mannheim
1988-1994	Realschule in Ellwangen Abschluss: Mittlere Reife
1994-1995	Kaufmännische Berufskolleg in Ellwangen
1995-1997	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Aalen
1997-1998	Zivildienst an der Kindertagesstätte Graf in Bopfingen
1998-2000	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Aalen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2000-01/2006	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Schwerpunkte: Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Zelluläre Mikrobiologie und Virologie
04/2005-01/2006	Diplomarbeit am Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Prof. Dr. A. Schaller Thema: „Loss of function“ Analyse der Matrix Metalloproteinase 1 (Le-MMP 1) in Tomate
18/01/2006	Abschluss: Diplom-Biologe (Note sehr gut)
Seit 04/2006	Promotion am Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen an der Universität Hohenheim zum Thema „Molekulare und phänotypische Charakterisierung der Matrix Metalloproteinasen 1 und 2 in Tomate

Danksagung

Einen besonderen Dank geht an,

Professor Dr. Andreas Schaller dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, am Insitut 260 zu promovieren. Für die Betreuung und seine stetige Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanke ich mich ganz herzlich.

Professor Dr. Artur Pfitzner für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Professor Dr. Otmar Spring für sein Wirken als weiterer Prüfer während des Kolloquium.

Renate Frei, für die vielen RNA-Präparationen, RT-PCRs und ihre Freundschaft.

Dem Gewächshausteam, Monika Baum, Dagmar Heisler, Anette Reif und Stefan Rühle ein herzliches Dankeschön für die Aufzucht und Pflege der Tomatenpflanzen.

Meinen Kollegen Dirk Zimmermann, und Jutta Babo und den ehemaligen Kollegen, Dr. Yoann Huet, Dr. Anja Cedzich, Mathias Knappenberger und Saeid Abu-Romman fürs Fachsimpeln, ihre große Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

An allen Mitarbeiter des Instituts, für die praktische und theoretische Unterstützung und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein abschließender ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für einfach alles was sie all die Jahre für mich und meine kleine Familie getan haben.