



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

**„Charakterisierung und funktionelle Analyse
eines *ABC*-Promotors aus
Solanum tuberosum“**

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science
(B.Sc.)

von: Paul Runge
geboren am 12.05.1990

Studiengang: Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr. S. Rosahl
Prof. Dr. habil. H.-J. Mägert

Köthen, den 30.09.2013

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Studiengangs **molekulare Biotechnologie** (BA) an der **Hochschule Anhalt** durchgeführt. Die praktischen Tätigkeiten wurden am **Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie** (IPB) in Halle/Saale in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie durchgeführt. Ich möchte mich bei **Prof. Dr. Dierk Scheel**, sowie bei **Prof. Dr. Sabine Rosahl** für die Möglichkeiten in der **AG induzierte Pathogenabwehr** recht herzlich bedanken. Weiterhin danke ich **Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderen Dank gilt weiterhin ...

Prof. Dr. Sabine Rosahl für die hervorragende Betreuung in praktische und theoretische Fragenstellungen, sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Ihre optimistische und allzeit vorhandene Bereitschaft halfen mir sehr, mich in das Thema einzufinden.

Dipl.-Biolog. Ramona Landgraf für die hervorragende Unterstützung in Theorie und Praxis. Dabei möchte ich mich neben vielen anderen Methoden, besonders für die Einführung in die *real-time* qPCR und die kooperative Zusammenarbeit am *Laser Scanning Microscope* bedanken.

Dipl.-Biolog. Ulrike Smolka für die Einführung in zahlreiche Methoden und die gute Orientierung innerhalb des Großraumlabor, was in so machen Situationen ein schnelles Arbeiten ermöglichte. Des Weiteren möchte ich mich auch für die Übernahme radioaktiver Hybridisierungen der Southern- & Northern-Blots bedanken.

Dipl.-Biochem. Andreas Matern für die gute Zusammenarbeit im Labor und die Bereitschaft zur Korrektur der vorliegenden Arbeit.

meine Arbeitsgruppe für die Allzeit gute Arbeitsatmosphäre und die großartige Bereitschaft zur Problemlösung. Ein Zusammenwirken innerhalb der AG ermöglichte einem die Verwirklichung eigener Ideen, wofür ich sehr dankbar bin.

Dr. Lennart Eschen-Lippold für die ebenfalls ständige Bereitschaft zur Problemlösung.

Dr. M. Trujillo für die Bereitstellung der binären Vektoren pGWB404 und pGWB433.

Weiterhin danke ich **meinen Eltern** für die Motivation und Unterstützung in meinem Vorhaben.

Wieder einen Schritt ...

I.	INHALTSVERZEICHNIS	
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Immunsystem der Pflanzen.....	1
1.2	<i>Phytophthora infestans</i>	3
1.3	Interaktionen von <i>Solanum tuberosum</i> und <i>Phytophthora infestans</i>	4
1.4	<i>Microarray</i> -Analysen	4
1.5	ABC-Transporter	5
1.6	Promotoren	7
1.7	Ziel der Arbeit.....	7
2.	MATERIAL & METHODEN	8
2.1	Material	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Synthetische Oligonukleotide.....	8
2.2	Organismen	8
2.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen	8
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen.....	9
2.2.3	Kultivierung von <i>S. tuberosum</i>	9
2.3	Molekularbiologische Arbeiten	9
2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	9
2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	11
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	11
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	12
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	13
2.3.6	DNA-Sequenzierung	13
2.3.7	Analyse von Sequenzdaten.....	14
2.3.8	Klonierung von PCR-Fragmenten	15
2.3.9	Transformation.....	16
2.3.10	Restriktionsspaltungen	17
2.3.11	Southern-Hybridisierung	17
2.3.12	Northern-Hybridisierung	18
2.3.13	Mikroskopische Untersuchungen.....	18

2.3.14	Verwundung von Kartoffelpflanzen	18
2.3.15	GUS-Färbungen	19
3.	ERGEBNISSE	20
3.1	Sequenzanalyse des <i>SpABC</i> -Promotors	20
3.2	Charakterisierung der <i>StpABC</i> -Region	20
3.2.1	Klonierung und Sequenzierung der <i>StpABC</i> - Sequenz	20
3.2.2	Klonierung der <i>StpABC</i> -Sequenz in pGWB404 & pGWB433	22
3.2.3	Herstellung der <i>StpABC-GFP</i> & <i>StpABC-GUS</i> -Pflanzen	23
3.2.4	Transgen-Nachweis der <i>StpABC-GFP</i> Linien	24
3.2.5	Wund-induzierte Expression des <i>StpABC-GFP</i> in Blätter und Wurzeln	25
3.2.6	Mikroskopische Untersuchungen der <i>StpABC-GFP</i> Linien	25
3.2.7	GUS-Färbung der <i>StpABC-GUS</i> Linien	28
3.2.8	Promotoranalyse	29
4.	DISKUSSION	31
4.1	Klonierung der <i>StpABC</i> -Sequenz	31
4.2	Promotoranalyse	31
4.3	Funktionelle Analyse der <i>StpABC</i> -Region	33
4.3.1	Zelluläre <i>StpABC</i> -Aktivität anhand <i>GFP</i> - und <i>GUS</i> -Genexpression	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	35
6.	ANHANG	37
6.1	EST, Oligonukleotid, POCl Array	37
6.2	Standard-PCR	37
6.3	ABC-Promotorsequenz aus <i>Solanum phureja</i>	38
6.4	ABC-Promotorsequenz aus <i>Solanum tuberosum</i>	39
6.5	Multi-Sequenz-Alignment der <i>StpABC</i> - Sequenz und der <i>in silico SppABC</i> -Sequenz	40
6.6	<i>in silico</i> Promotoranalyse	43
7.	Literaturverzeichnis	XLV
8.	Selbstständigkeitserklärung	LI

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
as	engl. <i>antisense</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Avr-	Avirulenz-
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
NB-LRR-Protein	<i>nucleotid-binding leucin-rich repeat</i> Protein
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
NBD	Nukleotid-Binde Domäne
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PDR	<i>pleiotropic drug resistance</i>
Pep-13	13 AS-langes Peptid des GP42 von <i>P. sojae</i> (aktives PAMP)
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>P. inf</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
PTS	<i>PAMP-triggered susceptibility</i>
R-Gene	Resistenz-Gene
RNA	Ribonucleic acid
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

s	<i>sense</i>
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T _A	Hybridisierungstemperatur (engl. <i>Annealing</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris, Acetat, EDTA
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembran-Domain
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TSS	Transkriptionsstart-Stelle
üN	über Nacht
WBC	<i>white/brown complex</i>
WT	Wildtyp

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: ZickZack-Modell (modifiziert, Jones & Dangl 2006) [3] Die erste Phase basiert auf der Erkennung von PAMPs/MAMPs durch PRRs, was eine PTI auslöst. Phase zwei besteht in der Ausbildung einer pathogenen Virulenz durch Effektoren. Die Unterdrückung der PTI wird als ETS (engl. *effector-triggered susceptibility*) bezeichnet. In der dritten Phase werden diese Avr-Faktoren von NB-LRR Proteinen erkannt, was zu einer ETI über R-Gene (Resistenz-Gene) führt. In der vierten Phase kommt es, durch natürliche Selektion in den unterdrückten Avr-Genen erneut zur ETS. Ähnlich entwickeln sich neue R-Gene und führen wiederholt zur ETI. . 1
- Abb. 2: *StABC* Genexpression in WT-Kartoffeln, sowie JA-defizienten *StAOC*-RNAi (Linie F1), *StOPR3*-RNAi (Linie A3) und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen (Line X5) nach Pep-13- (blau) und W2A- (rot) Behandlung (8 hpi, 100 µM). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die einfaktorielle ANOVA zeigt eine Signifikanz im WT zwischen Pep-13- und W2A-Behandlung (n=3; P<0,05*). 5
- Abb. 3 Graphische Darstellung eines ABCG-Transporters (Tarr et al. 2009) [31]. Diese sind in Membranen (gelb) verankert und bestehen aus bis zu zwei Monomeren. Ein Monomer setzt sich aus einer Transmembran-Domäne und Nukleotid-bindende Domäne zusammen. 6
- Abb. 4: DNA-Größen-marker λ-PST 12
- Abb. 5: Schematische Darstellung der binären Vektoren pGWB404 & pGWB433 (Nakagawa et al. 2007) [54]. (A) Übersicht des allgemeinen Aufbaus der pGWB-Vektoren. Gateway: Rekombination durch LR-Reaktion; Km^r (Pnos/NPTII/Tnos): Kanamycin-Resistenz; LB: linker Border; RB: rechter Border; aadA: Spectinomycin-Resistenz. (B) Bei der Rekombination wird das abgebildete Konstrukt integriert. attR1/R2: Rekombinationsstellen; Cm^r: Chloramphenicol-Resistenz ;ccdB: negativer Selektionsmarker für Bakterien. Bei der Rekombination wird dieses Gen, gegen die *StpABC*-Sequenz ausgetauscht. (C) Die binären Vektoren werden je nach Reporter gen als pGWB404 (sGFP) und pGWB (GUS) bezeichnet... 15
- Abb. 6 Verlauf einer Agrobakterien-vermittelten Pflanzentransformation. Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation bilden sich einigen Wochen später, an den verwundeten Stellen (A) undifferenzierte, totipotente Zellwucherungen (B), welche als Kalli bezeichnet werden (76K/75K -Medium). Die Zugabe von Cytokinen im 75K-Medium fördert fortan das Streckungswachstum, wodurch sich erste Sprosse aus den Kalli bilden (C). Diese können anschließend auf 2CK od. 2C-Medium überführt werden (D). Das vorhanden sein von Meristemen führt durch die Ausschüttung von Auxinen zur Wurzelbildung (E). Die stabilen rekombinant erstellten Pflanzen werden anschließend in Erde-Sand-Gemisch (1:1) ausgetopft (F)..... 16
- Abb. 7: Verwundung von Kartoffelblättern, (A) durch Quetschung mittels Pinzette und (B) durch Einschnitte mittels Skalpell auf der Blattoberfläche..... 18
- Abb. 8 Graphische Darstellung der ABC-Transporter Genstruktur. Nach der Promotorregion mit einer Länge von 2012 Bp folgt die kodierende Sequenz des ABC-Transporters (2350 Bp), bestehend aus Exon 1-Intron-Exon 2 (744 Bp-95 Bp-1511 Bp). Maßstab: 100 Bp..... 20
- Abb. 9: *StpABC* Fragmente aus genomischer DNA amplifiziert. (A) Unter Verwendung der Oligonukleotide *StABC_P5-5* (s); *StABC_P8_3* (as) erfolgte die Amplifikation der ~2 kb *StpABC*-Sequenz. Dabei wurden mehrere Standard-PCR Ansätze (Pos.1-9) elektrophoretisch aufgetrennt. (B) Nach dem Ausschneiden der 2 Kbp-Fragmente wurden diese in einer Gelelektion aufgereinigt (Pos.1)..... 21
- Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung von Spaltprodukte des pENTR-*StpABC* Konstrukts (4593 Bp) nach enzymatischen Verdau (1%iges Agarosegel, λPST-DNA Größenmarker). Es wurden 6 Klone (Nr.1-6) untersucht..... 22

- Abb. 11: Gelelektrophoretische Auftrennung von Restriktionsfragmenten der klonierten binären Vektoren pGWB404 (A) und pGWB433 (B) mit der *StpABC*-Sequenz. Der Restriktionsverdau wurde mit den Enzymen *EcoRV* (1), *EcoRI* (2) und *PstI* (3) durchgeführt. (1%iges Agarosegel, λ PST-DNA-Marker). 23
- Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung (1%iges Agarosegel, λ PST-DNA-Marker). Überprüfung der AGL0-Plasmide durch Amplifikation der *StpABC*-Sequenz mittels PCR (A) und durch Restriktionsverdau (B,C). (A) Die Amplifikation von *StpABC*-Fragmenten fand mit den Primern StubABC_P9_5 (s) und StubABC_P_3 (as) (Pos. 1,2; 2012 Bp) oder StubABC_P7_3 (Pos. 3,4; 785 Bp) statt. Probenauftrag: pGWB404-*StpABC* (Pos. 1,3), pGWB433-*StpABC* (Pos. 2,4). (B, C) Mit pGWB-*StpABC* transformierte AGL0-Bakterien wurden nach Plasmid-Isolierung enzymatisch mit *EcoRV* gespalten. Dabei wurden je Konstrukt acht Klone (Pos. 1-8) untersucht. (B) pGWB404-*StpABC* Klone. (C) pGWB433-*StpABC* Klone..... 23
- Abb. 13: *StpABC-GFP* Southern-Hybridisierungen. Dazu wurde die genomische DNA nach der PCI-Methode, von unbehandelten Blättern, der *StpABC-GFP* Linien und WT-Kontrollen isoliert und mit den Restriktionsenzymen *HindIII/SacI* gespalten. Die Hybridisierung erfolgte mit der kodierenden Sequenz des *sGFP* aus dem binären Vektor pGWB404 (amplifiziert, Primer *sGFP-F*, *sGFP-R*, 0,7 Kbp). (A) Eine Hybridisierung der *sGFP*-Sonde, konnte bei den *StpABC-GFP* Linien A1, A3, A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1 detektiert werden. Bei den Kontrollen Wildtyp (WT) und pGPTV wurden keine Banden entdeckt. (B) Bei den *StpABC-GFP* Linien B1, B2 C3, E2, und F1 wurde eine Bande detektiert. Es fand ebenfalls eine schwache Hybridisierung bei den Linien A1, A2, C1, C2, D1, D2 und E1 statt. Keine Hybridisierungen erfolgten bei den Kontrollen WT und pGPTV. 24
- Abb. 14 Northern-Hybridisierung zur Wund-induzierten Transkriptakkumulation von *GFP* in Blätter und Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1 und WT-Pflanzen, 1. Experiment. (A,B) Blätter, (C,D) Wurzeln. Kartoffelpflanzen der Linien *StpABC-GFP* A1 und WT Kontrollen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit einer Pinzette auf Blatt- und Wurzelgewebe verwundet. Nachfolgend wurden zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h, 16h und 24h jeweils Proben entnommen. Pro Zeitpunkt und Linie wurden Doppelproben geerntet. Anschließend wurde die RNA nach der Trizol-Methode isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran gebロットet und mit der Sonde *sGFP* aus pGWB404 (Primer: *sGFP_F*, *sGFP_R*) hybridisiert. 25
- Abb. 15: Mikroskopische Betrachtung unverwundeter Wurzeln der WT-Kontrollen (A,B), *StpABC-GFP* Linie A1 (C,D) und A2 (E,F). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Nikon-Mikroskop mit GFP-Filter gemacht. (A-F) Fluoreszierende Zellwand-Regionen. (C-F). Verstärkt fluoreszierende Zellkerne. (F) Vereinzelt stärker fluoreszierende Zellen (s. Pfeil) erkennbar. 26
- Abb. 16: Mikroskopische LSM-Aufnahmen unverwundeter Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1 (A-D), sowie Wurzelquerschnitte der *StpABC-GFP* Linie A1, B1 und WT-Kontrolle (E-H). (A-D) Partiiell stark fluoreszierende Zellen. (E-F) Fluoreszenzsignale in der Exodermis. (E, s. Pfeil) schwaches Fluoreszenzsignal der Endodermis. Maßstab 100 μ m..... 27
- Abb. 17: Mikroskopische (LSM) Aufnahmen verwundeter Wurzeln (A-D) und Blätter (E-H). Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1, nach 6 hpw (A) und 18 hpw (B), sowie Wurzeln der WT-Kontrolle, nach 6 hpw (C) und 18 hpw (D). Die Verwundung von Blättern erfolgte mittels Skalpell (E, G, H) oder mittels Pinsette (H). Verwundung der *StpABC-GFP* Linie A1 6 hpw (E) und 18 hpw (F), sowie verwundete WT-Kontrollen nach 6 hpw (G) und 18 hpw (H). 27
- Abb. 18: Mikroskopische Untersuchungen der *StpABC-GUS* Linien C1, C2, C3, D1, D2, E1 nach GUS-Färbung (ohne Fixierung). (A) Blätter nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [200 μ m] C1, E1, D1, D2; [2000 μ m] C3. (B) Wurzeln nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [100 μ m] C1, [200 μ m] E1, D1, D2; [2000 μ m] C3. (C) Wurzeln nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [100 μ m] C1, [200 μ m] D1, D2; [2000 μ m] C2, C3. 28

- Abb. 19: Verteilung von möglichen cis-regulatorischer Elemente innerhalb der *StpABC*-Region. Diese Motive (TFBS) wurden durch eine *in silico* Promotoranalyse identifiziert. Es wurden neben TATA-Boxen, an der Licht-Reaktion (I-Box), Samenbildung (P-Box), Pflanzenentwicklung und Stressreaktion (G-Box) beteiligte TFBS entdeckt. Weitere Motive sind W-Boxen, welche an der Expression Wund-& Pathogen-induzierter Gene beteiligt sind. 29

IV. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Tabellarische Auflistung verwendeter synthetische Oligonukleotide.....	8
Tab. 2: Übersicht der Online-Datenbanken zur <i>in silico</i> Analyse cis-regulatorischer Elemente.	15
Tab. 3 Exemplarische Darstellung möglicher cis-regulatorischer Elemente in der <i>StpABC</i> -Region.....	30
Tab. 4 Standard-PCR Programm.....	37
Tab. 5 Optimierte Annealing-Temperatur (T_A).....	37

1. EINLEITUNG

1.1 Immunsystem der Pflanzen

Pflanzen haben im Laufe der Evolution aufgrund ihrer sessilen Lebensweise, zahlreiche aktive und passive Abwehrmechanismen gegen abiotische Einflussfaktoren wie Temperatur, UV-Licht, sowie Trockenheit und biotischen Stress durch Mikroorganismen und Insekten etabliert. Zu den passiven Abwehrmechanismen zählen chemische und strukturelle Barrieren. Dabei kann es sich beispielsweise um die konstitutive Bildung von Toxinen oder epidermale Wachsauflagerungen handeln [1, 2]. Die aktiven Abwehrmechanismen werden durch Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogen ausgelöst und lassen sich durch das Zick-Zack-Modell (s. Abb. 1) beschreiben.

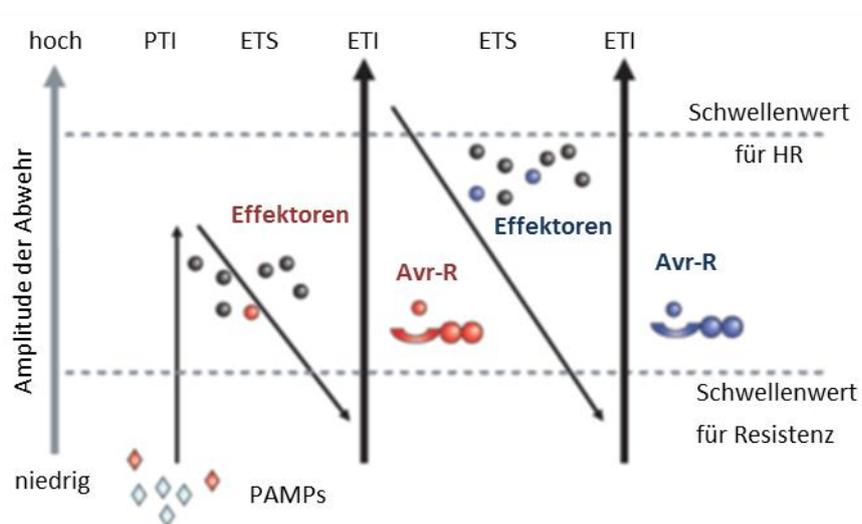


Abb. 1: ZickZack-Modell (modifiziert, Jones & Dangl 2006) [3] Die erste Phase basiert auf der Erkennung von PAMPs/MAMPs durch PRRs, was eine PTI auslöst. Phase zwei besteht in der Ausbildung einer pathogenen Virulenz durch Effektoren. Die Unterdrückung der PTI wird als ETS (engl. *effector-triggered susceptibility*) bezeichnet. In der dritten Phase werden diese Avr-Faktoren von NB-LRR Proteinen erkannt, was zu einer ETI über R-Gene (Resistenz-Gene) führt. In der vierten Phase kommt es, durch natürliche Selektion in den unterdrückten Avr-Genen erneut zur ETS. Ähnlich entwickeln sich neue R-Gene und führen wiederholt zur ETI.

Pathogene besitzen konservierte molekulare Muster, welche für das mikrobielle Leben charakteristisch sind, jedoch nicht in potentiellen Wirtspflanzen vorkommen. Diese allgemein als Elicitoren bezeichneten Strukturen sind PAMPs oder MAMPs (engl. *pathogen or microbes associated molecular pattern*) und als Kohlenhydrate, Lipide, Proteine, sowie Peptide vertreten [4, 3]. Hierbei handelt es sich beispielweise um Chitin bei Pilzen oder Flagellin bei Bakterien [2]. Die pflanzliche Erkennung dieser Strukturen durch membranständige Rezeptor-Moleküle führt zur Aktivierung von

Abwehrmechanismen. Diese Rezeptoren, zu denen auch die TLRs (engl. *toll-like receptors*) in Vertebraten zählen, gehören zu den PRRs (engl. *pattern recognition receptors*) [5]. Diese Art der Erkennung ist besonders in der Nichtwirtsresistenz von Bedeutung und wird als PTI (engl. *PAMP-triggered immunity*) bezeichnet. Beispielsweise führt die Erkennung des flg22, einem 22-AS-langen Motivs des bakteriellen Flagellins, durch Bindung an die Leuzin-reiche LRR-Rezeptorkinase FLS2 in *Arabidopsis* und Tomate zur induzierten Pathogenabwehr [6]. Ein weiteres gut untersuchtes PAMP ist das NPP1 (engl. *necrosis-inducing Phytophthora Protein 1*) aus *Phytophthora parasitica*, welches von *Arabidopsis* und Petersilie erkannt wird [7].

Die co-evolutionäre Entwicklung von Pathogenen und Pflanzen führte zur Bildung von Virulenzfaktoren. Diese werden auch als Effektoren bezeichnet und unterdrücken pflanzliche Abwehrmechanismen, wodurch es zur ETS (engl. *effector-triggered susceptibility*) kommt. Es wurde gezeigt, dass der Effektor HopAl1 des Pathogens *P. syringae* durch Dephosphorylierung der MPK3 und MPK6, zur Inaktivierung der PTI in *A. thaliana* führt [8]. Weiterhin wurde gezeigt dass die Effektoren AvrPto und AvrPtoB aus *P. syringae* an die Rezeptor-ähnliche Kinase BAK1 binden und die Signaltransduktion zu den PAMP-Rezeptoren FLS2 und BRI1 unterdrücken [9]. Pathogene wie *P. syringae* nutzen als Effektoren Coronatin, welche die Wirkung von Jasmonsäure (JA) imitieren und Salizylsäure- (SA-) induzierte Abwehrmechanismen innerhalb der Pflanze reduzieren. Weiterhin kann Coronatin das Öffnen der Spaltöffnungen verursachen, wodurch das Eindringen der Pathogene erleichtert wird [3].

Die direkte oder indirekte Erkennung von Effektoren durch Bindung an R-Proteine (Rezeptoren) führt zur ETI (engl. *effector-triggered immunity*). Effektoren werden nach der pflanzlichen Erkennung als Avirulenzfaktoren (Avr-Faktoren) bezeichnet. Die Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogen kann durch die Gen-für-Gen Hypothese beschrieben werden [10]. Dabei enthalten Pathogene mehrere Avirulenz-Gene (Avr-Gene) zu denen Pflanzen komplementär R-Gene entwickelt haben. Bei der direkten Ligand/Rezeptor Interaktion binden Avr-Faktoren an NB-LRR- (engl. *nucleotide binding leucine-rich repeat*) Proteine, welche von R-Genen kodiert werden [11]. Die indirekte Erkennung der Avr-Faktoren erfolgt nach der Guard-Hypothese in drei Schritten [3]. Dabei binden zunächst Avr-Faktoren an R-Proteine, welche Abwehrmechanismen der Wirtspflanze unterdrücken. Dieser Ligand/Rezeptor-Komplex wird von der Pflanze als spezifischer Elicitor erkannt und führt mittels Signaltransduktion zu heftigen Abwehrreaktionen. Die Erkennung dieser Avr-Faktoren ist Bestandteil der Wirtsresistenz.

Die induzierte Regulation des zytoplasmatischen Kalziumspiegels, durch Änderung der Ionenpermeabilität der Plasmamembran, zählt neben der Bildung von ROS (engl. *reactive oxygen species*) und der posttranskriptionelle Aktivierung von MAPKs (engl. *mitogen-activated protein*

kinases) zu den ersten Immunantworten [12]. Diese führen zur Aktivierung von PR-Genen (engl. *pathogenesis related*). In Petersilie führt die PAMP-induzierte Signaltransduktion mit Pep-13 (s. 1.3) zu einer rezeptorvermittelten Aktivierung eines Ca^{2+} -Ionenkanals. Die Erhöhung der zyttoplasmatischen Kalziumkonzentration aktiviert die Phytoalexin-Biosynthese und Bildung von ROS in Petersilie [12, 13]. ROS-Bildung kann dabei zu einer hypersensitiven Reaktion (HR) in Form von Zelltod (Apoptose) führen [14, 15]. MAPKs sind an der negativen Regulation von Abwehrmechanismen beteiligt, was durch eine Mutation in der AtMPK4 gezeigt werden konnte. Dabei zeigten die Mutanten einen veränderten Phänotyp, sowie einen konstitutiv erhöhten SA-Gehalt und PR-Genexpression [16]. Weiterhin werden zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Stabilisierung der Zellwand aktiviert. Dabei kann es zu Appositionen von Kallose und phenolischer Substanzen, sowie Einlagerungen von Lignin kommen [17]. Der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) kommt einer besonderen Bedeutung in der Bildung phenolischer Sekundärmetabolite, wie Hydroxizimtsäuren zu [1]. Diese sind Bestandteil des Biopolymers Suberin, welches in Zellwänden lokalisiert ist und an aktiven Abwehrmechanismen durch biotische und abiotische Stressfaktoren induziert wird [18]. Die Biosynthese von SA und JA induzieren die pflanzliche Abwehr. Das führt in *Arabidopsis* zu einer SAR (engl. *systemic acquired resistance*). Diese Resistenz ist nicht lokal begrenzt und wirkt sich auf die gesamte Pflanze aus. SA ist an der Aktivierung von Abwehrmechanismen gegen biotrophe, JA und Ethylen gegen nekrotrophe Pathogene in *Arabidopsis* beteiligt [19, 20]. Eine antagonistische Interaktion der beiden Phytohormone SA und JA wird diskutiert [3].

1.2 *Phytophthora infestans*

Die Herkunft *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- & Knollenfäule bei Kartoffel, sowie Kraut- & Braunfäule bei Tomate konnte bis in die Anden Südamerikas zurückverfolgt werden. Der erste Befall der Kartoffel *Solanum tuberosum* wurde im Jahre 1843 in Philadelphia und New York dokumentiert [1,2]. Nach Europa kam das Pathogen mit der Einfuhr einer Schiffsladung infizierter Saatkartoffeln, welche dadurch zunächst Belgien erreichten. Der starke Anbau von Kartoffeln in Irland, die sich schnell als Grundnahrungsmittel etablierte, führte nach einer epidemischen Ausbreitung des *P. infestans* im Lande zur weltbekannten Hungersnot von Irland [21]. Die Nahrungsmittelknappheit um 1847 machte sich auch in Deutschland bemerkbar, so ging die Kartoffelrevolution von Berlin in die Geschichte ein. Die Verbreitung des Oomyceten führt seit dem 20. Jahrhundert zum weltweiten Befall und Zerstörung von Kartoffel und Tomatenernten. Der weltweite Verlust durch Ernteeinbußen wird jährlich auf 6,7 Milliarden US-Dollar [21] geschätzt.

Im Jahre 2009 wurde das Genom von *P. infestans* mit etwa 240 Mbp analysiert. Die Größe des Genoms wird mit der schnellen Entwicklung von Effektorgenen begründet [22]. Diese sind in repeatreichen Regionen lokalisiert und führen zur schnellen Adaption an wechselnde

Umgebungsbedingungen. Durch die schnelle Anpassungsfähigkeit des Erregers ist er seither von wirtschaftlicher Bedeutung, weshalb ein großes Interesse an den Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogen besteht.

1.3 Interaktionen von *Solanum tuberosum* und *Phytophthora infestans*

In *Phytophthora Species* wurde ein hochkonserviertes 13-AS-langes Peptid (VWNQPVRGFKVYE) einer Ca^{2+} -abhängigen Zellwand-assoziierten Transglutaminase (GP42) identifiziert [23, 24]. Die Applikation dieses PAMPs führt zu einer Aktivierung von Abwehrmechanismen in Kartoffel und Petersilie [24]. Im Gegensatz dazu scheint die Applikation von Pep-13 inaktiv in Karotte, Arabidopsis, Soja und Tabak zu sein [25]. Die Behandlung anfälliger Kartoffeln der Sorte Désirée mit dem Phytophthora-spezifischen PAMP Pep-13 führte zu einer erhöhten Resistenz, weshalb es als Modell für die Aufklärung der Interaktionen zwischen Kartoffel und *P. infestans* dient. [26]

Die PAMP-induzierte Abwehr kann in Form von SAR in der ganzen Pflanze, oder lokal begrenzt durch eine hypersensitive Reaktion (HR), in Form von Zelltod auftreten. Die Biosynthese der Phytohormone JA und SA führen zu einer induzierten Resistenz, deren Signalwege im Detail noch nicht bekannt sind [12]. Die Anreicherung von SA induziert die Bildung von ROS, wie H_2O_2 und NO, welche an dem induzierten Zelltod (HR) beteiligt sind [27]. Die Untersuchungen von Halim et al. (2007) postulierten in der *P. infestans*-anfälligen Sorte Désirée SA-abhängige Expression von PR-Genen und die Apposition von Kallose [20]. Weiterhin ist SA an der Produktion von Phytoalexinen beteiligt.

An der JA-Biosynthese sind die Allenoxidcyclase (AOC) und die OPDA-Reduktase (OPR3) beteiligt. Die JA-defizienten bzw. JA-insensitiven *StCOI1*-, *StAOC* und *StOPR3*-RNAi Pflanzen zeigen nach Pep-13 Behandlung eine deutlich reduzierte ROS-Bildung (H_2O_2), was zu einer verringerten HR in Form von Zelltod führte. Bei der Behandlung mit dem inaktiven Analogon W2A (VANQPVRGFKVYE), kommt es hingegen zu keiner H_2O_2 -Bildung [27].

1.4 *Microarray*-Analysen

Die Untersuchungen von Frau Altmann (2009) zur Pep-13 regulierten Genexpression durch *Microarray*-Hybridisierungen führten zu einer Reihe von etwa 700 induzierten Genen. Eines der am stärksten exprimierten Gene ist das von Frau Altmann (2009) bezeichnete *StABC*. Die Basis dazu stellt der 791 Bp Expressed Sequence Tag (EST) aus *S. tuberosum* (cPRO31A18TH) dar. Die Sequenz entstammt der EST-Datenbank der *Potato Oligo Chip Initiative* und ist in der POCI-Datenbank des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) als ABC-Transporter Gen (NtWBC1) aus *N. tabacum* (AY341251) bekannt. Der POCI-Array basiert auf 60-mer Oligonukleotide, welche aus der EST-Datenbank für Kartoffel hervorgehen [28].

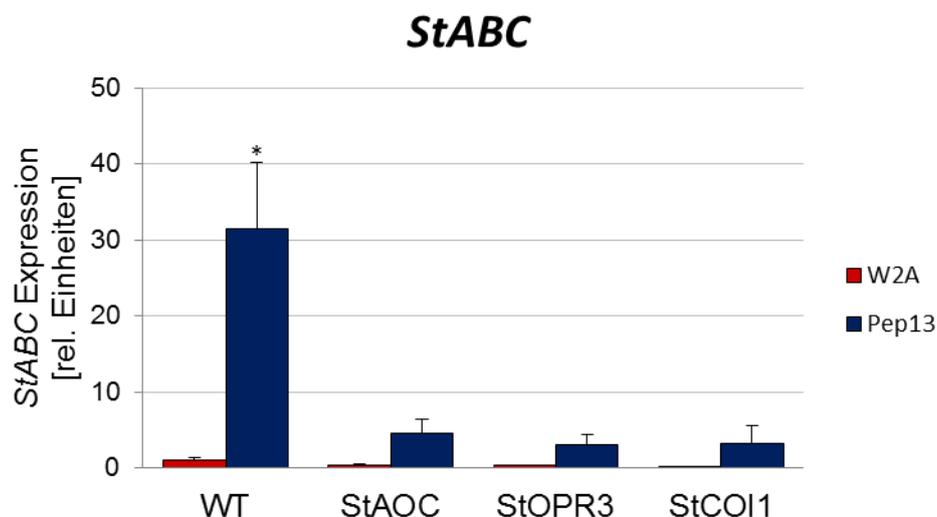


Abb. 2: *StABC* Genexpression in WT-Kartoffeln, sowie JA-defizienten *StAOC*-RNAi (Linie F1), *StOPR3*-RNAi (Linie A3) und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen (Line X5) nach Pep-13- (blau) und W2A- (rot) Behandlung (8 hpi, 100 μ M). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die einfaktorielle ANOVA zeigt eine Signifikanz im WT zwischen Pep-13- und W2A-Behandlung (n=3; $P < 0,05^*$).

Es wurde von Frau Altmann (2009) ein signifikant erhöhtes *StABC*-Expressionslevel nach Pep-13 Behandlung in Wildtyp-Kartoffeln (WT), im Vergleich zum inaktiven Analogon W2A gezeigt. Die Transkriptakkumulation des *StABC* war in den JA-defizienten *StAOC*-RNAi, *StOPR3*-RNAi und *StCOI1*-RNAi Linien im Vergleich zum WT signifikant reduziert. Diese Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem ABC-Transportergen und der Pep-13-induzierten Pathogenabwehr hin.

1.5 ABC-Transporter

Die durch ATP-Hydrolyse angetriebenen ABC-Transporter stellen eine der größten Proteinfamilien in lebenden Organismen dar, wobei eine Vielzahl in Pflanzen zu finden ist. ABC-Transporter sind in den meisten Membranen von Tono- und Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert und wirken als aktive Import- oder Exporteure, welche an der Pflanzenentwicklung, Reaktionen auf abiotischen Stress, sowie an der Pathogenabwehr beteiligt sind [29]. Grundlegend sind ABC Transporter aus Monomeren aufgebaut, welche aus einer hydrophoben Transmembran-Domäne (TMD) und einer hydrophilen ATP-bindenden Kasette (NBD) bestehen. Die NBD enthält die Motive Walker-A-Box, Walker-B-Box, sowie eine Konsensus-Sequenz, welche für die meisten ABC-Transporter charakteristisch sind [29, 30].

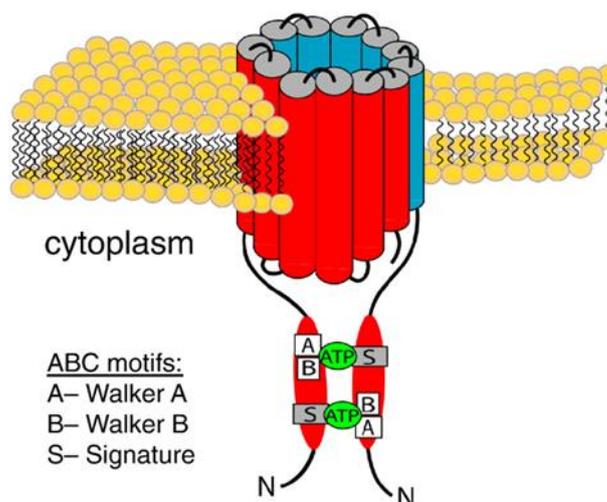


Abb. 3 Graphische Darstellung eines ABCG-Transporters (Tarr et al. 2009) [31]. Diese sind in Membranen (gelb) verankert und bestehen aus bis zu zwei Monomeren. Ein Monomer setzt sich aus einer Transmembran-Domäne und Nukleotid-bindende Domäne zusammen.

ABC Transporter lassen sich in die Unterfamilien ABCA bis ABCI einteilen, wobei im Rahmen dieser Arbeit auf die ABCG-Transporter eingegangen wird. Die ABCG-Transporter werden in PDRs (engl. *pleiotropic drug resistance*) und WBCs (engl. *white/brown complex*) unterteilt. Die PDR-Proteine folgen dem allgemeinen Aufbau von ABC-Transportern und bestehen aus zwei Monomeren (*full-size*), wohingegen WBC-Proteine aus einem Monomer (*half-size*) bestehen. Die Reihenfolge der Untereinheiten (NBD-TMD) ist charakteristisch für die ABCG-Transporter.

Der ABCG/WBC-Transporter *AtABCG19* führt beispielweise zu einer Kanamycin-Resistenz in *Arabidopsis* Überexpressionslinien und wurde im Tonoplast lokalisiert [32]. Die Bedeutung des *AtABCG25* für den Transport von biologisch aktiver Abscisinsäure weist auf den aktiven Transport von Phytohormonen hin. Dieser ist neben dem *AtABCG22* an der stomatären Regulation beteiligt [33]. Weiterhin wurden ABCG-Transporter an der Deposition von Lipiden auf der Zellwand zur Ausbildung der Kutikula nachgewiesen. Die aus Cutin und Wachs bestehende hydrophobe Schicht dient zur Abwehr abiotischer und biotischer Stress. Die Mutation des *AtABCG12*, welche in der Exodermis lokalisiert ist, führt zu einer verringerten Deposition von Wachsen. Die Repression der Homologe *AtABCG11* führt zudem zu einer reduzierten Apposition von Cutin. Die Bestandteile des Cutins, wurden ebenfalls in dem Biopolymer Suberin entdeckt, weshalb dieser eine ähnliche Bedeutung zukommt. Weiterhin sind ABCG/WBC-Transporter JA- und zum Teil SA-induziert, wodurch eine Bedeutung in der Pathogenabwehr oder Pathogen-Interaktion vermutet wird [29]. Die Pathogen-induzierte Transkriptakkumulation von ABCG-Transportergenen wie *NpPDR1* und *AtABCG36* [29, 34].

1.6 Promotoren

Die konstitutive und regulatorische Genexpression wird durch zahlreiche transkriptionelle und translationelle Mechanismen beeinflusst. Die Steuerung der Transkription durch DNA-Protein-Interaktionen zählt zu den ersten Regulationen [35]. Diese DNA-Regionen werden als Promotoren bezeichnet und befinden sich in der 5'-untranslatierten Region, vor der Transkriptionsstart-Stelle (TSS) kodierender Gensequenzen. Diese enthalten konservierte cis-regulatorische Elemente und bestehen meist aus einer Kernpromotor-Region. Diese regulatorischen Elemente werden als Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen bezeichnet (TFBS) und können mit Proteinen, den sogenannten Transkriptionsfaktoren (TF) interagieren. Der Kernpromotor enthält konstitutive Promotorelemente wie beispielsweise die TATA-Box, CAAT-Box, sowie PolyA-Sequenz-Motive. Neben der Kernpromotor-Region befinden sich weitere cis-regulatorische Elemente stromab- und -aufwärts. Die Bindung von TF an die cis-regulatorischen DNA-Motive führt zur gezielten Repression oder Initialisierung der Transkription von Genen [36]. Die enthaltenen TFBS in einem Promotor können für Gene oder deren zelluläre Expression charakteristisch sein. Zusätzliche Interaktion der TF untereinander führen zu einer komplexen Regulation, welche eine sensitive Genregulation ermöglicht [37].

Die Anwendung neuer Methoden und die sequenzielle Erschließung von ganzen Genomen, sowie deren bioinformatische Auswertung ermöglichen die Identifikation weiterer cis-regulatorischen Elemente [38].

1.7 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der *StABC*-Promotor (*StpABC*) kloniert und auf seine Aktivität hin untersucht werden. Dazu sollten GFP- und GUS-Reporter-Konstrukte mit dem *StpABC* erstellt und durch eine Agrobakterien-vermittelte Transformation, rekombinante Kartoffelpflanzen generiert werden. Die Promotor-Aktivität sollte an verwundeten und unverwundeten Blatt- und Wurzelgewebe untersucht werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen. Die Chemikalien und Zusätze wie Antibiotika für die sterilen Pflanzenkulturen liefert Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, NL).

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Tab. 1: Tabellarische Auflistung verwendeter synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→ 3')
StABC_P5_5	TTTTATGTGGGGCATGACGGATC
StABC_P6_5	CAATTCACACATGCCTTACTCTCC
StABC_P7_5	CAACTCCATTCCTCACCACAC
StABC_P7_3	GTGTGGTGAGGGGAATGGAGTTG
StABC_P8_3	GACAACGGATGTCAAGGATAGTAG
StubABC_P_3	CCGTTGTCACACTGACAGTATAAAG
StubABC_P9_5	CACCGGGGCATGACGGATCAAAAATAC
StubABC_P7_5	CAACTCTATTCCTCACCACAC
StubABC_P7_3	GTGTGGTGAGGGGAATAGAGTTG
sGFP_F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
sGFP_R	CTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
pJET1.2 forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 reverse	AAGAACATCGATTTCCATGGCAG

2.2 Organismen

2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Die Anzucht von Bakterien, wie *E. coli* und *A. tumefaciens*, erfolgte in flüssigem oder festem LB-Medium (1 % Bacto Trypton, 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt, 0,5 % Natriumchlorid, 1,5 % Agar). Die Selektion transformierter prokaryotischer Organismen wurde durch die Zugabe von 50 bzw. 100 µg/ml Kanamycin, Spectinomycin oder Ampicillin erzielt. Dabei richtete sich der Einsatz der jeweiligen Antibiotika dabei nach dem Selektionsmarker des Plasmid-Vektors. Die Inkubation von *E. coli* erfolgte bei 37 °C, die von *A. tumefaciens* bei 28 °C, wobei Flüssigkulturen zusätzlich bei 150 rpm belüftet wurden.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von positiven Transformanten erfolgte in 2 ml Schraubdeckelröhrchen (Cryo.s™, Greiner Bio-One). Dazu wurde frische üN-Kultur mit sterilem Glycerol (3v/v) gemischt und bei -80°C gelagert. Zur Anzucht wurde etwas Material von der Oberfläche der gefrorenen Glycerinstocks in flüssiges LB-Medium gegeben.

2.2.3 Kultivierung von *S. tuberosum*

Für sämtliche Untersuchungen wurde die Kartoffelsorte *S. tuberosum* L. cv. Désirée verwendet. Die Vektorkontrolllinien, mit den internen Bezeichnungen pGPTV B2 und pGPTB E4 wurden mit dem „leeren“ Vektor pGPTV transformiert. Aufgrund fehlender Resistenzgene gegen den Erreger der Kraut- & Knollenfäule wurde diese Sorte als Modellpflanze für den Wirtsbefall mit *Phytophthora indestans* gewählt [39].

Die Vermehrung der Pflanzen erfolgte unter sterilen Bedingungen, über Spross-Stecklinge auf 2 MS-Medium (2 % (w/v) Saccharose; 0,441 % (w/v) MS-Salze inkl. Vitamine und 0,05 % (w/v) MES; 0,6 % (w/v) Plant Agar; pH 5,8, nach Murashige & Skoog [40]). Unbehandeltes Blattmaterial wurde von Frau Smolka aus Sterilkulturen zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Spross-Stecklinge in Sterilkultur fand unter konstanten Bedingungen in einer Phytokammer (16 h Licht [20 °C, 160 µMol/m²s], 8 h Dunkel [18 °C] Umluft 0,5 m/s) statt. Die Kartoffelpflanzen wurden in gedämpftem Erde/Sand-Gemisch (1:1) oder Quarz-Sand kultiviert und unter kontrollierten Bedingungen, in Phytokammern oder zur Knollenreife im Gewächshaus, angezogen.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Nukleinsäuren wurde mit Kit-Systemen, sowie nach *Step-by-Step*-Protokollen durchgeführt. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte mittels UV-Spektroskopie, wobei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Verwendet wurde dazu der NanoDrop8 (Thermo Scientific).

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit dem Precellys® von der Fa. PeqLab (2x 20 s, bei 6000 rpm). Frisches Blatt- oder Wurzelgewebe wurde dazu in 2 ml Schraubdeckelröhrchen, welche etwa 5 mm mit Keramikkügelchen (Ø 1,25-1,6 mm, Saint-Gobain ZirPro) gefüllt waren, geerntet und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Nach dem Homogenisieren wurden die Nukleinsäuren nach den folgenden Methoden isoliert.

2.3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus frischem Blatt- und Wurzelmaterial erfolgte zum einen mit Trizol, nach der „*single step*“ Methode von Chomczynski & Sacchi (2006) [41, 42]. Zur RNA-Präparation für qRT-PCR-Analysen wurde die zuvor präparierte RNA mit dem RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Aufgrund vielseitiger Möglichkeiten der Aufarbeitung wurde die angewendete Methode im Folgenden detailliert beschrieben.

Die zuvor mittels „*single step*“ Methode aufgearbeitete RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen eingestellt. Es folgte die Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (1 ml RLT-Puffer, 10 µl β-Mercaptoethanol). Nach dem Mischen des Ansatzes wurden 250 µl 96-100 % Ethanol hinzugegeben, auf eine RNeasy Mini Säule überführt und für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte der DNaseI Verdau (Qiagen).

Dazu wurde 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Mini Säule gegeben und für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 80 µl DNaseI-Mix (10 µl DNaseI-Stammlösung; 70 µl RDD-Puffer) auf die Silica-Gel-Membran wurde diese für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erneut 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Mini Säule gegeben und wie zuvor beschrieben zentrifugiert, Überstand dekantiert.

Nach dem DNase-Verdau wurde die RNeasy Mini Säule in ein neues 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 500 µl RPE-Puffer (20 % (v/v) RPE-Puffer, 80 % (v/v) 96-100 % Ethanol) hinzugegeben. Nach dem Zentifugieren (1 min; 6000 rpm) und Dekantieren wurde dieser Schritt wiederholt. Es folgte, zum Trocknen der Säule, eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 6000 rpm.

Abschließend wurde die RNeasy Mini Säule in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Elution der RNA von der Silica-Gel-Membran wurde 30 µl RNase-freies Wasser (opt. 65 °C) verwendet und für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert.

2.3.1.2 Präparation genomischer DNA aus Blattmaterial

Die Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde zum einen nach der Phenol-Chlorophorm-Isopropanol (PCI)-Methode von Chomczynski & Sacchi (2006), zum anderen nach einer Quick-Prep-Methode durchgeführt. Des Weiteren fand das GenElute™ Plant Genomic DNA Mini Prep Kit (Sigma-Aldrich) Anwendung. Die Durchführung orientiert sich dabei an den Angaben des Herstellers, lediglich die Elution wurde mit 50 µl Puffer durchgeführt.

2.3.1.2.1 Quick-Prep-DNA-Isolierung

Nach dem Homogenisieren des Pflanzenmaterials wurden 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM EDTA; 250mM NaCl, 0.5 % (v/v) SDS) zugegeben und der Ansatz durch vortexen gemischt. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 15000 rpm und 4 °C wurden 300 µl des Überstands in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nach der Zugabe von 300 µl Isopropanol vorsichtig invertiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das verbliebene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren wurde das Pellet in 100 µl tridest. Wasser resuspendiert.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-Präparationen wurden nach einer modifizierten Methode nach Birnboim & Doly (1979) oder je nach Größe des Ansatzes mit dem QIAprepSpin Miniprep Kit oder QIAfilter™ Plasmid MIDI Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt [43]. Diese wurden je nach Maßstab mit 2 ml oder 50 ml üN-Kultur durchgeführt.

Die üN-Kulturen wurden dazu in 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Lysispuffer (15 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA) resuspendiert. Es folgten 200 µl alkalische SDS-Lösung (1 % (v/v) SDS, 0,2 M NaOH), sowie das vorsichtige Mischen des Ansatzes. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde dem Ansatz 150 µl Kaliumacetat-Lösung (3 M, pH 4.8) hinzugefügt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei max. Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 270 µl Isopropanol durch Vortexen gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min, bei RT unter Schwenken. Nach erneutem Zentrifugieren, unter bekannten Bedingungen wurde der Überstand dekantiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 500 µl 70 % Ethanol wurde, nach dem Zentrifugieren, der Überstand restlos entfernt und das Pellet in 20 µl tridest. Wasser resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20 °C.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Die Plasmid-DNA Isolierung aus *A. tumefaciens* wurde mit dem QIAprepSpin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt. Zur Optimierung wurde die Durchführung modifiziert. Nach der Zugabe des Puffers P2 wurde eine Inkubation von 5 min bei RT hinzugefügt. Des Weiteren wurde nach der Zugabe des Puffers N3 die Zentrifugationszeit verdoppelt. Die Elution erfolgte mit 20 µl 70 °C EB-Puffer.

2.3.3.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA wurde mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei wurde die nach Chomczynski & Sacchi (2006) isolierte RNA zusätzlich mit dem RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), wie in Kapitel 2.3.1.1 für die cDNA-Synthese vorbereitet. Die Durchführung orientierte sich dabei an den Herstellerangaben. Zuletzt folgte die Inaktivierung der Enzyme für 5 min bei 70 °C.

2.3.3.2 Extraktion von PCR-Fragmenten aus der Gelmatrix

Die Isolierung von PCR-Fragmenten aus der Gelmatrix wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Durch Ausstechen der Banden aus dem Gel unter UV-Licht, Auflösen der Agarose und Entfernen der Salze, wurde das entsprechende PCR-Produkt isoliert.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur masseabhängigen Auftrennung von elektrisch geladenen Molekülen, in einem elektrisch geladenen Feld, wurden horizontale Elektrophorese-Kammern verwendet. Die Gelmatrices und Pufferlösungen richteten sich dabei nach den Nukleinsäuren.

2.3.4.1 DNA-Gele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus PCRs oder Restriktionsspaltungen fand in 1-2 % Agarosegelen unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA), bei einer Spannung von 60-100 V statt. Vor dem Auftragen der Probe folgte die Zugabe von etwa 0,2 % (v/v) 5 x DNA-Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerol, 120 mM EDTA pH 8,0, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 % Bromphenolblau). Aufgrund der Dichteänderung der Probe, verbleibt diese in den Geltaschen. Der enthaltene Farbstoff diente zur Beobachtung des Laufverhaltens. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurden 5 µl des DNA-Markers (s. Abb. 4) λ-PST (Thermo Scientific) verwendet. Die Färbung der DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte durch eine Ethidiumbromid-Lösung (80 µl 1 % EtBr, ad. 500 ml Wasser) für ca. 5-10 min, sowie die Visualisierung und Dokumentation mittels UV-/Weißlicht-Transilluminators.

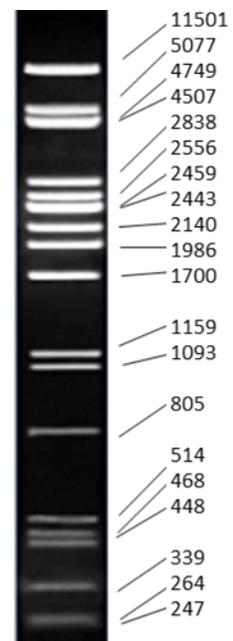


Abb. 4: DNA-Größenmarker λ-PST

2.3.4.2 RNA-Gele

Die RNA-Proben wurden zunächst bei RT aufgetaut und sofort auf Eis überführt. Die Konzentrationen wurden spektralphotometrisch am NanoDrop8 (Thermo Scientific) ermittelt. Je nach Anwendung folgte das Aliquotieren der RNA-Proben zu 10-20 µg/20µl dest. Wasser. Die Proben wurden anschließend mit 5 µl RNA-Probenpuffer (4,5 µl [52,8 % (v/v) Formamid, 10,6 % (v/v) 10 x MOPS, 16,90 % (v/v) Formalehyd, 7,0 % (v/v) Glycerol, 5,6 % (v/v) 10 % Bromphenolblau, ad. 100 % dest. Wasser] inkl. 0,5 µl 100 µg/ml EtBr) versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden anschließend sofort auf das RNA-Gel (1 % (w/v) Agarosegel, 5 % (v/v) Formaledehyd) unter Verwendung des 1 x MEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.0) aufgetragen und bei 60-80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*) wird zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet [44]. Die Amplifikation der klonierten PCR-Fragmente erfolgte nach einer optimierten Standard-PCR in einem 20 µl Ansatz (0,32 U Phusion Hot Start-Flex DNA Polymerase, 0,2 mM dNTPs, 1 x HF Puffer, 0,1 pmol Primer s, as, 2 µl Template)

Die Annealing-Temperatur T_A wurde unter Angabe der verwendeten Polymerase, deren Puffer und der Primerkonfiguration mit dem *Online-Tool* NEB TM Calculator (New England Biolabs) ermittelt. Bei der Verwendung der Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase unter den beschriebenen Bedingungen, betrug die $T_A \geq T_M$. Die Amplifikation der Fragmente erfolgte im Thermocycler TPersonal (Biometra).

Für erste Überprüfungen von Plasmid-Insertionen aus transformierten Zellen diente die im Folgenden beschriebene Kolonie-PCR. Dabei wurde zunächst der Standard PCR-Ansatz, ohne Template vorbereitet. Anschließend wurden Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze, auf einer Master-Platte separiert. Folglich wurden die Zellen, welche sich noch an der Pipettenspitze befanden, in den vorbereiteten PCR-Ansatz durch schnelles Drehen resuspendiert. Die Zerstörung der Zellmembranen wurde durch eine verlängerte erste Denaturierung von 10 min bei 98 °C begünstigt. Für die Amplifikation wurde folglich das Standard-PCR Programm verwendet.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten oder Plasmiden wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Diese erfolgte unter Verwendung der jeweiligen Sequenzierprimer der verwendeten Vektoren pJet1.2 und pENTR (s. 2.1.2). Die bei der Firma MWG Operon angewendete *Single-Read*-Sequenzierung ermöglicht eine fehlerfreie Sequenz von bis zu 900 Bp. Für die Sequenzierung eines größeren Fragment (> 1800 Bp) wurde der Sense-Primer StubABC_P7_5 (10 pmol/µl) verwendet Die Ansätze wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet

2.3.7 Analyse von Sequenzdaten

Die Analyse der Sequenzdaten wurde mit Online-, sowie Software Tools durchgeführt. Ein Sequenzvergleich weltweit ermittelter Daten ermöglichte das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), welches auf der Website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zur Verfügung steht.

Das Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) stellt Daten des Solanaceae Genomics Resource (SGR) vom nicht-annotierten Kartoffelgenom *S. phureja* zur Verfügung. Weiterhin ermöglicht das Sol Genomic Network (SGN) mit dem Tool BlastN (solgenomics.net/tools/blast/) ein Alignment mit dem nicht-annotierten Kartoffelgenom. Im Rahmen der Arbeit wurde der Datensatz PGSC DM v3 superscaffolds verwendet. Ein Sequenzalignment wurde mit den Tools ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) vom European Bioinformatics Institute (EBI), welches Teil des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ist, sowie dem Sequence Editor (<http://www.fr33.net/seqedit.php>) durchgeführt.

Des Weiteren ermöglichte die Software Vector NTI Advance (Life Technologies) unter anderem in silico Klonierungen, Sequenzvergleiche und Restriktionsanalysen. Zur Auswertung der Chromatogramme diente neben dem Vector NTI Advance auch die Freeware Chromas Lite 2.1.1.

Die in silico Analysen zu cis-regulatorischen Elementen erfolgte in verschiedenen Online-Datenbanken. In der folgenden Tab. 2 wurden die verwendeten Tools aufgelistet. Die Datenbank PLACE (engl. *plant cis-acting regulatory DNA elements*) ist eine Sammlung cis-regulatorischer Elemente. Dabei werden Varianten innerhalb der Motive mit Homologer unterschiedlicher Gene und Pflanzen Species verglichen. JASPER ist eine frei verfügbare Sammlung von Datenbanken mit TFBS, ähnlich der kommerziellen Datenbank TRANSFAC [45]. Darin ist die Datenbank JASPERCore von besonderer Bedeutung. Diese enthält kuratierte, nicht-redundante, experimentell ermittelten Daten eukaryotischer Organismen [46]. Das P-Match 1.0 ist ein Programm zur Vorhersage von TFBS in DNA-Sequenzen, welches durch ein Alignment mit den TRANSFAC® Public 6.0 verbunden ist. Das Tool COMET (engl. *cluster of motifs e-value tool*) findet statistisch abgesicherte Motive in DNA-Sequenzen. Dabei ähnelt es sehr dem Tool Cister, jedoch werden hier nur die wahrscheinlichsten Varianten der Motive angegeben. Das Tool NSite-PL wird für die Suche von statistisch abgesicherten Konsensus-Motiven regulatorischer-Sequenzen in pflanzlichen Promotoren verwendet. Das Programm TSSP (SoftBerry) basiert auf der PlantProm DB, welche annotierte, nicht-redundante Sequenzen von RNA-Polymerase II und Transkriptionsstart-Stellen (TSS) verschiedener Pflanzen Species bestehen.

Tab. 2: Übersicht der Online-Datenbanken zur *in silico* Analyse cis-regulatorischer Elemente.

Tool	Website	Ref.
PLACE	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	[47]
JASPER	http://jaspar.genereg.net	[48]
P-Match 1.0	http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi	[49]
Comet	http://zlab.bu.edu/~mfrith/comet/form.html	[50]
Cister	http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml	[51]
Nsite-PL	http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=nsitep&group=programs&subgroup=promoter	[52]
TSSP	http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter	[53]

2.3.8 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung der *StpABC*-Sequenz erfolgte zunächst in einem bakteriellen Vektor zur Erzeugung derer rekombinanter DNA. Dazu wurde das in einer Standard-PCR (s. 2.3.5) amplifizierte PCR-Produkt in den Vektor pJET1.2 (Thermo Scientific), nach dem Blunt End-Protokoll des Herstellers ligiert.

Für die Transformation von *S. tuberosum* folgte zunächst die gerichtete TOPO®-Klonierung der *StpABC*-Sequenz in den pENTR™ (Life Technologies). Aufgrund der immobilisierten Topoisomerase I, an den offenen Enden des Vektors, kann auf eine DNA-Ligase verzichtet werden. Eine directionale Integration des Inserts ermöglicht ein CACC-Anhang, welcher am 5'-Ende des Sense-Primer lokalisiert ist. Ein komplementäres *Überhang* am 3'-Ende des Vektors führt zu einer gerichtete Klonierung unter Verwendung einer „blunt-end“ generierenden Polymerase.

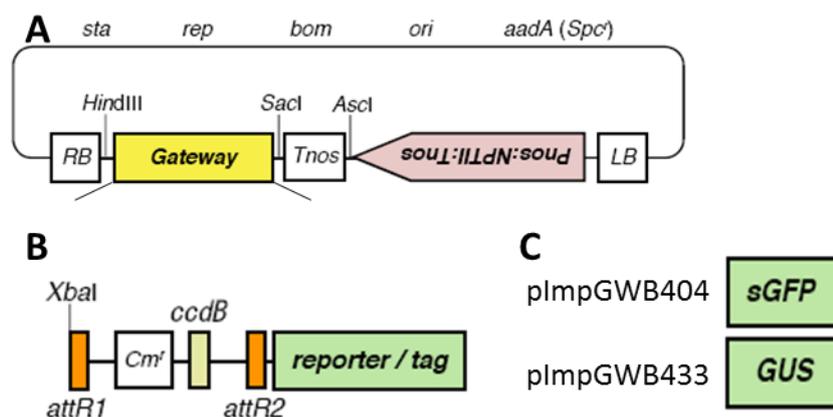


Abb. 5: Schematische Darstellung der binären Vektoren pGWB404 & pGWB433 (Nakagawa et al. 2007) [54]. (A) Übersicht des allgemeinen Aufbaus der pGWB-Vektoren. Gateway: Rekombination durch LR-Reaktion; Km^r (Pnos/NPTII/Tnos): Kanamycin-Resistenz; LB: linker Border; RB: rechter Border; aadA: Spectinomycin-Resistenz. (B) Bei der Rekombination wird das abgebildete Konstrukt integriert. attR1/R2: Rekombinationsstellen; Cm^r: Chloramphenicol-Resistenz ;ccdB: negativer Selektionsmarker für Bakterien. Bei der Rekombination wird dieses Gen, gegen die *StpABC*-Sequenz ausgetauscht. (C) Die binären Vektoren werden je nach Reportergen als pGWB404 (sGFP) und pGWB (GUS) bezeichnet

Die *Rekombinationsstellen* des pENTR™ Vektors ermöglichten folglich die *Gateway*-Klonierungen in die binären Vektoren pGWB404 und pGWB433. Die binären Vektoren wurden von Dr. M. Trujillo zur Verfügung gestellt. Die Insertion der *StpABC*-Sequenz durch Rekombination der *Rekombinationsstellen* attL1 und attL2 des pENTR und attR1 und attR2 der binären Vektoren erfolgte durch das Enzym LR-*Clonase* (Life Technologies). Die Durchführungen des TOPO®-*Cloning Kits* und der *Gateway*-Klonierung orientierten sich an den Herstellerangaben.

2.3.9 Transformation

2.3.9.1 Transformation prokaryotischer Organismen

Die Transformation von Plasmiden mit chemokompetenten One Shot® MACH1™ *E. coli*-Zellen erfolgte nach den Angaben von Life Technologies (Karlsruhe) oder mit DH5α-Zellen nach dem Protokoll von Hiroaki Inoue *et al.* [55]. Die Transformation von binären Vektoren wurde nach dem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988) durchgeführt [56]. Dabei wurde der *A. tumefaciens* Stamm AGLO mit den binären Vektoren pGWB404 und pGWB433 transformiert.

2.3.9.2 Regeneration & Kultivierung stabiler transgener *S. tuberosum* nach *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation

Die Agrobakterium-vermittelte Pflanzentransformation von *S. tuberosum* ermöglicht eine stabile Integration von Konstrukten in das Zielgenom. Dabei wurden 3-4 Wochen alte Blätter von unbehandelten *S. tuberosum* L. cv. Désirée aus Sterilkultur entnommen. Die transformierten Agrobakterien wurden üN in 15 ml LB-Medium, unter Zugabe von Antibiotika (pGWB404/433 - 100 µg/ml Spectinomycin) kultiviert.

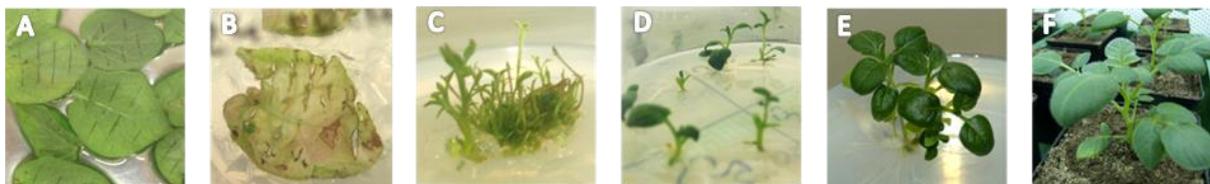


Abb. 6 Verlauf einer Agrobakterien-vermittelten Pflanzentransformation. Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation bilden sich einigen Wochen später, an den verwundeten Stellen (A) undifferenzierte, totipotente Zellwucherungen (B), welche als Kalli bezeichnet werden (76K/75K -Medium). Die Zugabe von Cytokinen im 75K-Medium fördert fortan das Streckungswachstum, wodurch sich erste Sprosse aus den Kalli bilden (C). Diese können anschließend auf 2CK od. 2C-Medium überführt werden (D). Das Vorhandensein von Meristemen führt durch die Ausschüttung von Auxinen zur Wurzelbildung (E). Die stabilen rekombinant erstellten Pflanzen werden anschließend in Erde-Sand-Gemisch (1:1) ausgetopft (F).

Nach dem Pelletieren der Kulturen für 10 min, bei 6000 rpm und 4 °C wurden die Zellen steril in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen in 10 ml 3 MS-Medium (3 % (w/v) Saccharose; 0,441 % (w/v) MS-Salze inkl. Vitamine und 0,05 % (w/v) MES, pH 5.8

(Murashige & Skoog, 1962)) resuspendiert. Anschließend wurden 10-15 Blätter aus Sterilkultur entnommen, vorsichtig auf der Unterseite mit einem Skalpell verwundet und mit der Oberseite nach Unten in eine Petrischale mit 10 ml 3 MS Medium gelegt. Es folgte die Zugabe von 100 µl der vorbereiteten Agrobakterien-Kultur. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Petrischalen für 2 Tage in Dunkelheit (lichtgeschützt durch Alufolie) in der Phytokammer inkubiert. Anschließend wurden die Blätter auf Kallus-induzierendes GS-76-Medium (GMS [1,6 % (w/v) Glucose; 0,441 % (w/v) MS-Salze inkl. Vitamine und 0,05 % (w/v) MES, pH 5.8], 250 µg/ml Carbenicillin, 0,1 µg/ml BAP, 5 µg/ml NAA, 100 µg/ml Kanamycin) gelegt. Nach einer Woche wurden die Blätter auf Spross-induzierendes GS-75-Medium (GMS [1,6 % (w/v) Glucose; 0,441 % (w/v) MS-Salze inkl. Vitamine und 0,05 % (w/v) MES, pH 5.8], 250 µg/ml Carbenicillin, 2 µg/ml Zeatinriboside, 0,2 µg/ml NAA und GA₃, 100 µg/ml Kanamycin) überführt und im 2-Wochen-Rhythmus auf neues Medium umgesetzt [39].

Nach etwa 8 Wochen kann sich erstes undifferenziertes Gewebe auf den Blättern bilden. Nach weiteren Wochen wachsen anschließend erste Sprosse aus den Kalli. Diese wurden mit einem Skalpell abgeschnitten und auf 2C-Medium (2MS [2 % (w/v) Saccharose, 0,441 % (w/v) MS-Salze inkl. Vitamine und 0,05 % (w/v) MES, pH 5.8], 250 µg/ml Carbenicillin oder Cefotaxin) umgesetzt.

Die Vermehrung in Sterilkultur erfolgte durch Spross-Stecklinge auf 2C-Medium. Die Kultivierung in Sterilkultur wurde in transparenten in-vitro-Kulturgefäßen (Vol. 565 ml) unter konstanten Bedingungen (s. 2.2.3) durchgeführt.

2.3.10 Restriktionsspaltungen

Die Restriktionsspaltungen von genomischer oder plasmidärer DNA wurde mit Enzymen der Firmen Thermo Fisher Scientific (St Leon-Rot), Life Technologies (Karslsruhe) oder Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Pufferung, Enzymkonzentration sowie Inkubationszeit und Temperatur richteten sich dabei nach Herstellerangaben oder wurde mit dem *Online-Tool DoubleDigest* (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>) von Thermo Fisher Scientific ermittelt.

2.3.11 Southern-Hybridisierung

Zur Southern-Analyse wurde genomische DNA aus Blattmaterial isoliert (s. 2.3.1.2) und üN mit entsprechenden Restriktionsenzymen (s. 2.3.10) gespalten. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Das Gel wurde nun für 45 min in 250 ml Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) bei RT inkubiert und 2 x mit Wasser gewaschen, erneut für 45 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,0) inkubiert und 2x mit Wasser gewaschen.

Es folgte das Blotting der Nylonmembran. Auf einem Stapel Papierhandtücher wurde ein, in 20 x SSC-Puffer getränktes, Blottingpapier (VWR) gelegt. Anschließend folgte die luftblasenfreie Auflage einer Nylonmembran (Roche), welche zunächst in Wasser und dann in 20 x SSC getränkt wurde. Nun wurde das Gel und ebenfalls 2 x Blottingpapier (ebenfalls in 20 x SSC getränkt) aufgelegt. Abschließend wurde ein zweilagiges Filterpapier über die *Blotting*-Apparatur gelegt, wobei die Enden jeweils in einen Tank mit 20 x SSC ragten.

Die Hybridisierung und radioaktive Detektion wurde von Frau Dipl. Biolog. Ulrike Smolka durchgeführt. Für die Amplifikation der sGFP-Sonde (720 Bp), aus dem binären Vektor pGWB404, wurden die Primer sGFP_F und sGFP_R (s. 2.1.2) verwendet.

2.3.12 Northern-Hybridisierung

Für Northern-Analysen wurden RNA-Gele (s. 2.3.4.2), analog zur Southern-Hybridisierung, geblottet, hybridisiert und ausgewertet (s. 2.3.11).

2.3.13 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Fluoreszenzdetektion durch LSM (engl. *laser-scanning-mikroscope*) LSM710 (Zeiss) mit Zwei-Photonen-Laser (Coherent) und Fluoreszenz-Life-Time-Imaging (FLIM, Becker&Hickl) wurden in Zusammenarbeit von Frau Landgraf erstellt. Die Anregung des sGFP findet dabei unter fluoreszierendem Licht der Wellenlänge 395 nm und 475 nm statt, wobei die Emissionswellenlänge bei 509 nm liegt.

2.3.14 Verwundung von Kartoffelpflanzen

Die Verwundung der Kartoffelpflanzen wurde durch Einschnitte auf den Blattflächen, links und rechts der Mittelrippe, oder durch Quetschung der Blattflächen über die Mittelrippe, sowie der Wurzeln erreicht. Dazu wurden etwa 8 Schnitte pro Blatt mit Hilfe eines Skalpell durchgeführt. Blätter wurden mit der Pinzette 8-mal gequetscht. Die Verwundung der Wurzeln erfolgte vereinzelt.

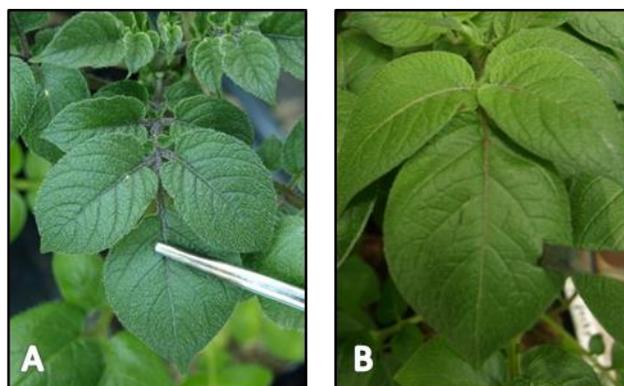


Abb. 7: Verwundung von Kartoffelblättern, (A) durch Quetschung mittels Pinzette und (B) durch Einschnitte mittels Skalpell auf der Blattfläche.

2.3.15 GUS-Färbungen

Die GUS-Färbung wurde mit und ohne Fixierung durchgeführt und basiert auf einer Methode von Blume & Grierson [57, 58]. Zur Fixierung wurden die Pflanzenteile nach Behandlung in eine Fixierlösung (0,3 % (v/v) Formaldehyd, 10 mM MES pH 5.6, 0,3 M Mannitol) getränkt, für 5 min unter Vakuum entlüftet und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2-3 x in einem Phosphatpuffer (50 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Ortho-85 % Phosphorsäure, pH 7.0) gewaschen. Die Aktivierung des GUS-Reportergens erfolgte durch Verwunden von Blatt- und Wurzelmaterial (s. 2.3.14). Die Blätter und Wurzelteile wurden nach der Behandlung in die GUS-Färbelösung (100 mM Na_2HPO_4 , 10 mM EDTA, 0,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 % Triton X-100, 2 mM X-Glucuronid) getränkt und unter Vakuum für 5 min im Exsikkator behandelt. Anschließend wurden die Proben dunkel, üN bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol für 10 min bei RT, sowie mit 96 % (v/v) Ethanol für etwa 4 Stunden. Der Ethanol sollte dabei mehrmals gewechselt werden, bis die Pflanzenteile komplett entfärbt sind. Sichtbar bleibt dabei die bläuliche GUS-Färbung.

3. ERGEBNISSE

3.1 Sequenzanalyse des *SpABC*-Promotors

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Promotor-Region eines ABC-Transporter Gens aus *S. tuberosum* charakterisiert und auf dessen Aktivität hin untersucht werden. Ein Sequenzvergleich des *Expressed Sequence Tag* (EST) gegen die NCBI-Datenbanken mit dem *Tool* BLASTX (NCBI) zeigte Homologien zur ABC-Transporter-Superfamilie, wobei die höchste Sequenzhomologie von 93 % zu einem ABCG-Transporter aus *S. lycopersicum* (ACC: XP_004239760) bestand.

Ein Alignment mit dem *Tool* BLASTN (SGL) des ESTs (ID: cPRO31A18TH) aus *S. tuberosum* (s. 1.4) und dem nicht-annotierten Genom von aus *S. phurejia* (s. 2.3.7), speziell dem *Sequence Set PGSC DM V3 Superscaffolds* führte zu einer Sequenzhomologie von 98% (747/757) mit der ID: PGSC0003DMB00000072. Durch die wiederholte Eingabe der erhaltenen Sequenzen wurde ein Bereich von insgesamt 4600 Bp, stromauf- und stromabwärts des ESTs gewählt. Die kodierende Sequenz des *StABC*-Gens, mit einer Länge von 2350 Bp wurde durch den Transkriptions-Start und – Ende definiert. Für die Charakterisierung der ABC-Promotor Region wurden etwa 2 Kbp der 5'-untranslatierten Region, ausgehend vom *Start-Codon* des ABC-Transportergens ausgewählt (s.6.2). Anhand dieser *in silico* ABC-Promotor-Region wurden Oligonukleotide für eine nachfolgende Amplifikation der ABC-Promotor-Region aus *S. tuberosum* (*StpABC*) designt.

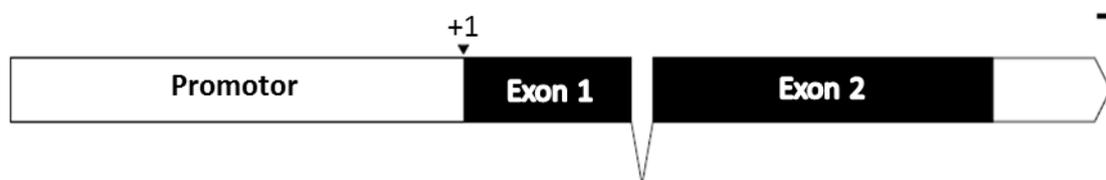


Abb. 8 Graphische Darstellung der ABC-Transporter Genstruktur. Nach der Promotorregion mit einer Länge von 2012 Bp folgt die kodierende Sequenz des ABC-Transporters (2350 Bp), bestehend aus Exon 1-Intron-Exon 2 (744 Bp-95 Bp-1511 Bp). Maßstab: 100 Bp

3.2 Charakterisierung der *StpABC*-Region

3.2.1 Klonierung und Sequenzierung der *StpABC*- Sequenz

Für die Charakterisierung der *StpABC*-Region wurde zunächst ein 2 Kbp- Fragment aus genomischer DNA, mit den Primern (s. 2.1.2) *StABC_P5-5* (s) und *StABC_P8_3* (as) amplifiziert (s.6.2). Der Antisense-Primer führte zur Amplifikation von 16 Nukleotide der kodierenden *StABC*-Gensequenz.

Zur rekombinanten Vervielfältigung der *StpABC*-Sequenz in einem bakteriellen Klonierungsvektor wurde der pJET1.2 Vektor (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zur Selektion der transformierten *E. coli*-Zellen wurde eine Kolonie-PCR (s. 2.3.5) mit den Primern *StABC-P6-5* (s) und *StABC-P7-3* (as)

durchgeführt (s. 6.2). Die Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *PvuII*, *BglIII* und *EcoRV/HindIII* gespalten. Die Sequenzierung der DNA (s. 2.3.6) von vier Transformanten führte zu einer Mastersequenz der *StpABC*-Region mit einer Länge von 2012 Bp.

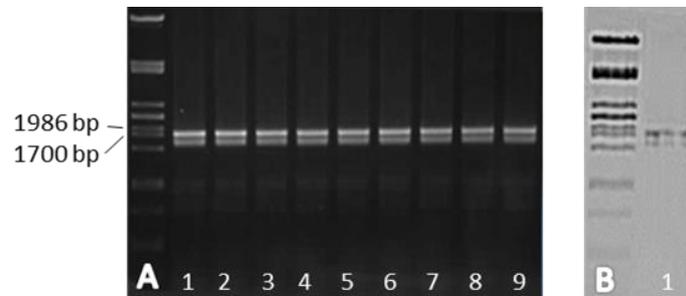


Abb. 9: *StpABC* Fragmente aus genomischer DNA amplifiziert. (A) Unter Verwendung der Oligonukleotide StABC_P5-5 (s); StABC_P8_3 (as) erfolgte die Amplifikation der ~2 kb *StpABC*-Sequenz. Dabei wurden mehrere Standard-PCR Ansätze (Pos.1-9) elektrophoretisch aufgetrennt. (B) Nach dem Ausschneiden der 2 Kbp-Fragmente wurden diese in einer Gelelektion aufgereinigt (Pos.1).

Die erhaltene *StpABC*-Mastersequenz ermöglichte das Designen der spezifischen Primer StubABC_P9_5 (s) und StubABC_P_3 (as). Das Anfügen eines CACC-Überhang, an das 5'-Ende des Sense-Primers, ermöglichte eine direktionale Klonierung des Fragments in den pENTR™ Vektor (Life Technologies). Der Antisense-Primer wurde direkt vor der Transkriptionsstart-Stelle (TSS) positioniert. Nach der Plasmid-Isolierung wurden sechs Klone mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten (s. Abb. 10). Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente nach Restriktionsspaltung mit *PvuII* bestätigte das erwartete Spaltungsmuster (2650 Bp; 1942 Bp), mit den sichtbaren Fragmenten ~2,7 Kbp und ~1,95 Kbp. Die Fragmente der enzymatischen Spaltungen mit den Restriktionsenzymen *PvuI/XbaI* (2442 Bp; 2150 Bp) wurden nicht identifiziert. Es wurde ein Fragment mit einer Größe von ~4,6 Kbp detektiert, welches etwa der Größe des pENTR-*StpABC* Konstrukts entspricht. Weiterhin wurden die Klone mit *EcoRV* gespalten, wobei das erwartete Spaltungsmuster (3944 Bp; 648 Bp) mit ~4 Kbp und ~0,7 Kbp ersichtlich war. Die Übereinstimmung der Spaltungsmuster von *PvuII* und *EcoRV*, sowie die Fragmente bei *PvuI/XbaI* (~4,6 Kbp) deuten auf positive Transformanten, weshalb zwei Klone anschließend sequenziert (s. 2.3.6) wurden. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab eine exakte Übereinstimmung zur *StpABC* Mastersequenz (2012 Bp). Spezifische Sequenzmotive im pENTR, die sogenannten Rekombinationsstellen ermöglichten die folgende Gateway-Klonierung.

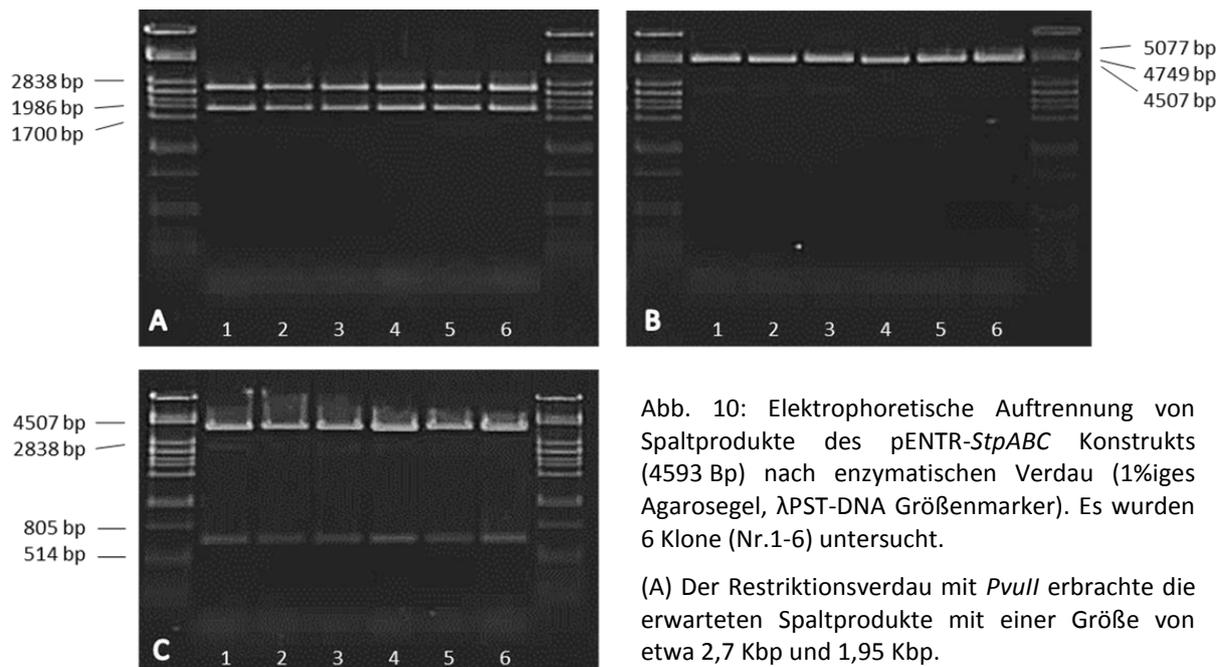


Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung von Spaltprodukte des pENTR-*StpABC* Konstrukts (4593 Bp) nach enzymatischen Verdau (1%iges Agarosegel, λPST-DNA Größenmarker). Es wurden 6 Klone (Nr.1-6) untersucht.

(A) Der Restriktionsverdau mit *PvuII* erbrachte die erwarteten Spaltprodukte mit einer Größe von etwa 2,7 Kbp und 1,95 Kbp.

(B) Der Doppelverdau mit *PvuI/XbaI* führte nicht zum erwarteten Spaltungsmuster (2442 Bp; 2150 Bp). Die Fragmente haben eine Größe von etwa 4,6 Kbp. (C) Die elektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte des *EcoRV* (3944 Bp; 648 Bp)erfolgte mit einer Größe von ~4 Kbp und ~0,7 Kbp.

3.2.2 Klonierung der *StpABC*-Sequenz in pGWB404 & pGWB433

Für die Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Promotorsequenz wurden Fusionskonstrukte der *StpABC*-Region mit den Reportergenen *sGFP* (synthetisches grün fluoreszierendes Protein) und GUS (β-Glucuronidase) durchgeführt. Daher folgte die Gateway-Klonierung in die binäre Vektoren pGWB404 (*sGFP*) und pGWB433 (*GUS*). Nach der Klonierung durch Rekombination der *Attachment-Sites* des pENTR™ Topo® Vektors und der binären Vektoren durch die LR Clonase (Life Technologies) folgten zur Überprüfung Restriktionsspaltungen mit *EcoRV*, *EcoRI* und *PstI* (s. Abb. 11). Die Restriktionsspaltung des pGWB404-*StpABC* Konstrukts mit *EcoRV* führte zu den erwarteten Fragmenten (9754 Bp, 2052 Bp), wobei das kleinste-Fragment (126 Bp) nicht sichtbar war. Die Spaltung mit den Enzymen *EcoRI* und *PstI* führte neben den erwarteten Fragmenten (10169 Bp, 1763 Bp und 7383 Bp, 4549 Bp) zu je einem unspezifischen Spaltprodukt. Die Spaltung des pGWB433-*StpABC* Konstrukts mit *EcoRV* erbrachte entsprechende Fragmente (9764 Bp; 1788 Bp; 1128 Bp), wobei hier analog zum pGWB404, kleine Fragmente (231 Bp; 126 Bp) nicht sichtbar waren. Neben den spezifischen Spaltprodukten bei *EcoRI* (11274 Bp, 1763 Bp) wurde bei dem Enzym *PstI* spezifische Fragmente (7383 Bp; 5654 Bp), sowie ein zusätzliches, unspezifisches Spaltprodukt mit einer Größe von ~4,5 Kbp visualisiert. Aufgrund der unspezifischen Spaltprodukte wurden die „leeren“ binären Vektoren mit drei unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten, wobei die Vektoren anhand der Spaltungsmuster zugeordnet werden konnten. Dies war der Grund für eine anschließende Agrobakterien-Transformation (s. 2.3.9.1) mit den erstellten pGWB-*StpABC* Konstrukten.

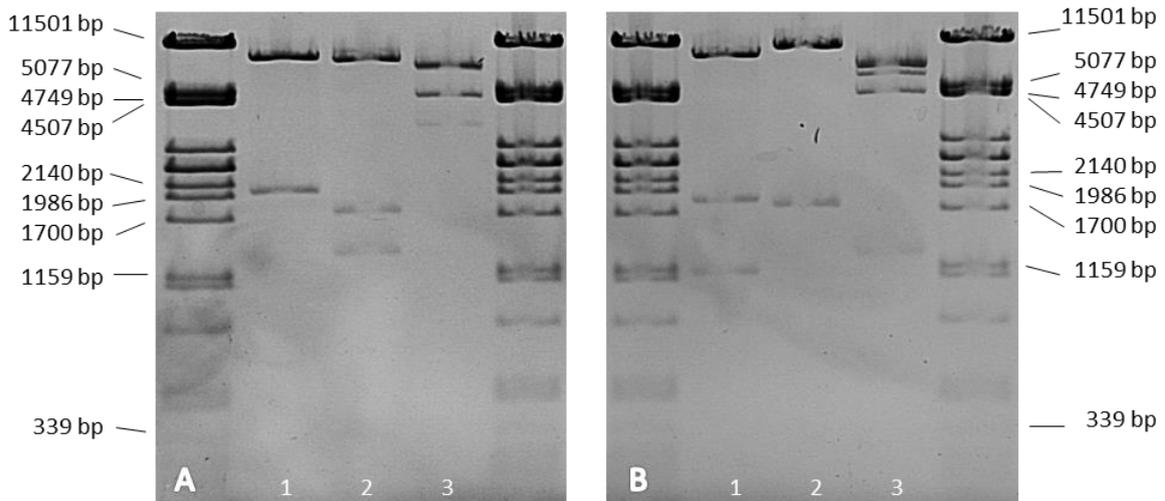


Abb. 11: Gelelektrophoretische Auftrennung von Restriktionsfragmenten der klonierten binären Vektoren pGWB404 (A) und pGWB433 (B) mit der *StpABC*-Sequenz. Der Restriktionsverdau wurde mit den Enzymen *EcoRV* (1), *EcoRI* (2) und *PstI* (3) durchgeführt. (1%iges Agarosegel, λPST-DNA-Marker).

3.2.3 Herstellung der *StpABC-GFP* & *StpABC-GUS*-Pflanzen

Die Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen erfolgte durch eine *A.tumefaciens*-vermittelte Transformation (s. 2.3.9.2). Dazu wurden *A. tumefaciens*-Zellen mit den Reportergenkonstrukten transformiert. Die Überprüfung von jeweils acht Klonen erfolgte nach Plasmid-Isolierung durch PCR, sowie Restriktionsspaltung mit *EcoRV* und wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei dem pGWB404-*StpABC* Konstrukten wurden die Spaltprodukte (9754 Bp; 2052 Bp, 126 Bp) ~10 Kbp und ~2 Kbp bei allen acht Klonen erhalten. Das kleine Fragment, mit 126 Bp wurde nicht identifiziert. Die spezifischen Spaltprodukte der pGWB433-*StpABC* Konstrukte (9764 Bp; 1788 Bp; 1128 Bp; 231 Bp; 126 Bp) konnten bei den Klonen 2,3,4, 7 und 8 mit den Fragmenten ~10 Kbp, 1,8 Kbp und 1,15 Kbp nachgewiesen werden. Fragmente < 300 Bp wurden nicht detektiert.

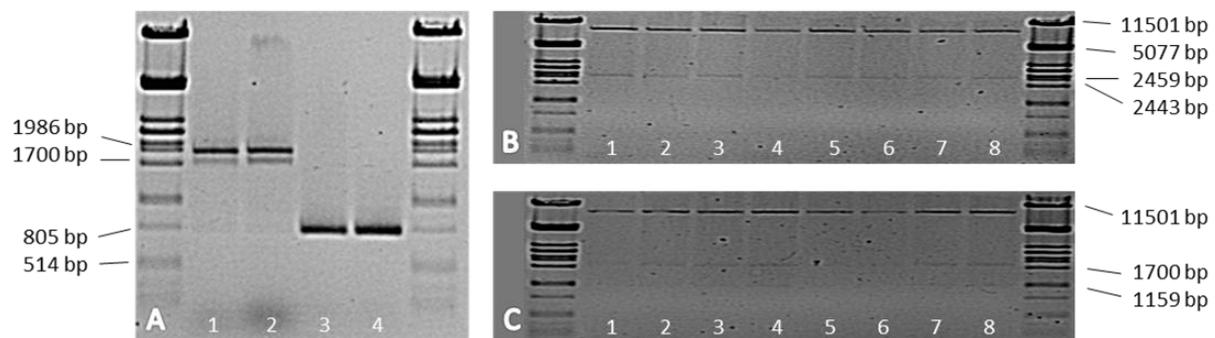


Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung (1%iges Agarosegel, λPST-DNA-Marker). Überprüfung der AGLO-Plasmide durch Amplifikation der *StpABC*-Sequenz mittels PCR (A) und durch Restriktionsverdau (B,C). (A) Die Amplifikation von *StpABC*-Fragmenten fand mit den Primern *StubABC_P9_5* (s) und *StubABC_P_3* (as) (Pos. 1,2; 2012 Bp) oder *StubABC_P7_3* (Pos. 3,4; 785 Bp) statt. Probenauftrag: pGWB404-*StpABC* (Pos. 1,3), pGWB433-*StpABC* (Pos. 2,4). (B, C) Mit pGWB-*StpABC* transformierte AGLO-Bakterien wurden nach Plasmid-Isolierung enzymatisch mit *EcoRV* gespalten. Dabei wurden je Konstrukt acht Klone (Pos. 1-8) untersucht. (B) pGWB404-*StpABC* Klone. (C) pGWB433-*StpABC* Klone.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Pflanzenlinien wurden entsprechend der binären Vektoren pGWB404 und pGWB433 als *StpABC-GFP* und *StpABC-GUS* bezeichnet. Dabei konnten für *StpABC-GFP* die Linien A1 – A13, B1, B2, C1-C3, D1, D2, E1, E2, F1 und für *StpABC-GUS* die Linien C1- C4, D1, D2 und E1 generiert werden.

3.2.4 Transgen-Nachweis der *StpABC-GFP* Linien

Der Transgen-Nachweis erfolgte, nach enzymatischer Spaltung der genomischen DNA, mit den Restriktionsenzymen *HindIII/SacI*, durch Southern-Hybridisierungen mit dem *sGFP*-Fragment aus dem pGWB404 Vektor. Die Restriktionsspaltstellen von *HindIII* und *SacI* flankieren das *StpABC*-Reporter-gen-Konstrukt, wodurch die Hybridisierung der *sGFP*-Sonde, an ein etwa 2,8 Kbp-großes Fragment als Transgen-Nachweis dient. Es wurde gezeigt, dass eine Hybridisierung bei den *StpABC-GFP* Linien A1, A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, C3, E2, F1 stattfand (s. Abb. 13). Die *StpABC-GFP* Linie A2, C1, C2, D1, D2 und E1 wiesen eine schwache Bande auf, weshalb diese Linien erneut untersucht werden sollten. In einer zweiten Southern-Hybridisierung konnte im Gegensatz zur ersten Analyse eine schwache Hybridisierung bei der Linie A2 detektiert werden. Dies könnte aus einer geringen DNA-Konzentration. Bei den Kontrollen Wildtyp (WT) und pGPTV fand keine Hybridisierung statt.

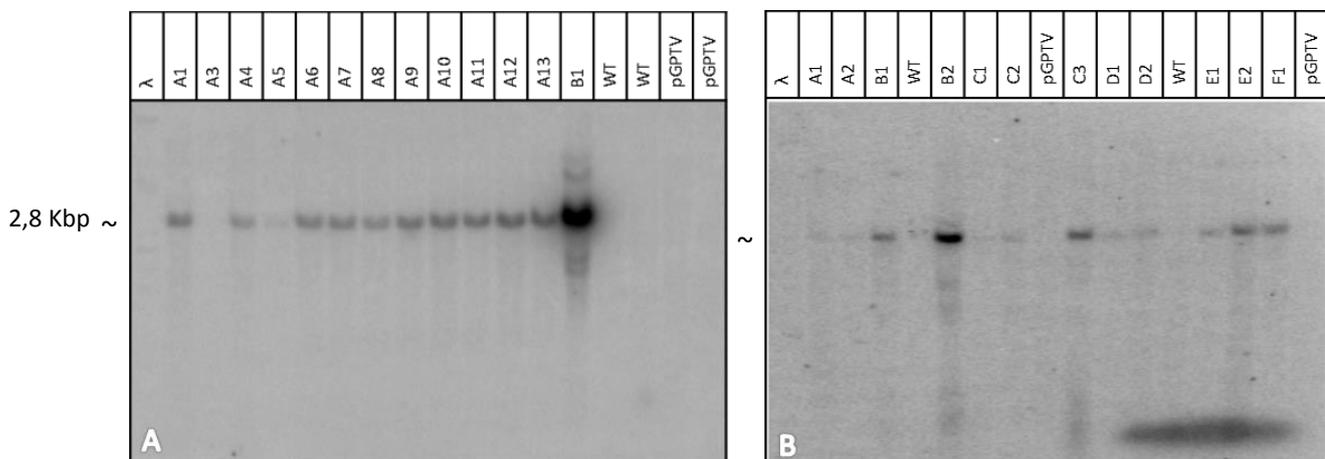


Abb. 13: *StpABC-GFP* Southern-Hybridisierungen. Dazu wurde die genomische DNA nach der PCI-Methode, von unbehandelten Blättern, der *StpABC-GFP* Linien und WT-Kontrollen isoliert und mit den Restriktionsenzymen *HindIII/SacI* gespalten. Die Hybridisierung erfolgte mit der kodierenden Sequenz des *sGFP* aus dem binären Vektor pGWB404 (amplifiziert, Primer *sGFP-F*, *sGFP-R*, 0,7 Kbp). (A) Eine Hybridisierung der *sGFP*-Sonde, konnte bei den *StpABC-GFP* Linien A1, A3, A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1 detektiert werden. Bei den Kontrollen Wildtyp (WT) und pGPTV wurden keine Banden entdeckt. (B) Bei den *StpABC-GFP* Linien B1, B2, C3, E2, und F1 wurde eine Bande detektiert. Es fand ebenfalls eine schwache Hybridisierung bei den Linien A1, A2, C1, C2, D1, D2 und E1 statt. Keine Hybridisierungen erfolgten bei den Kontrollen WT und pGPTV.

3.2.5 Wund-induzierte Expression des *StpABC-GFP* in Blätter und Wurzeln

Die Untersuchung der Induzierbarkeit der *sGFP*-Expression erfolgte in einem Experiment mit der Pflanzenlinie *StpABC-GFP* A1 im Vergleich zur WT Kartoffel Désirée mittels Northern-Hybridisierung (s. 2.3.12) durch Hybridisierung mit der *sGFP*-Sonde. Hierfür wurde jeweils verwundetes Blatt- und Wurzelmaterial der generierten Pflanzenlinie *StpABC-GFP* A1 und der WT Kartoffel nach 0-, 4-, 8-, 12-, 16- und 24-Stunden geerntet.

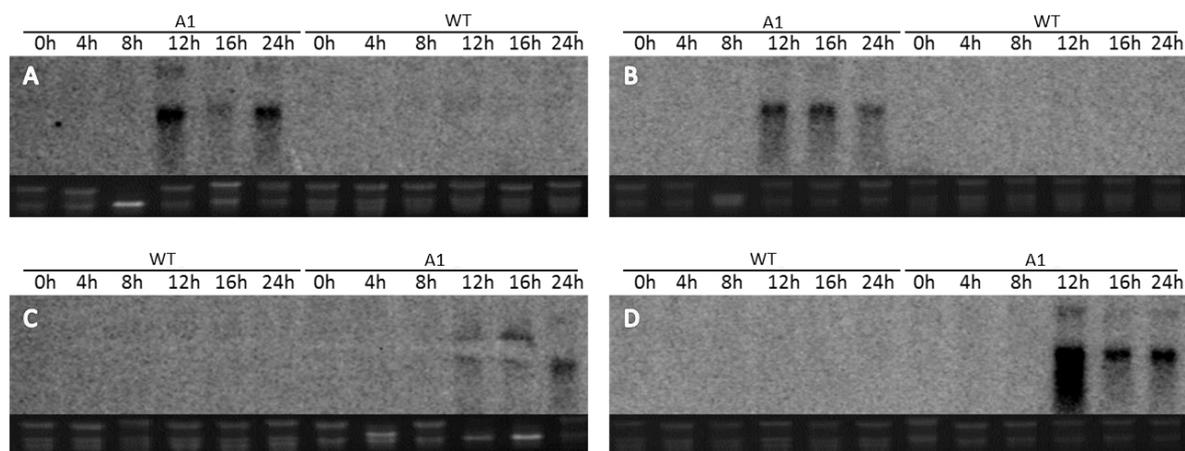


Abb. 14 Northern-Hybridisierung zur Wund-induzierten Transkriptakkumulation von *GFP* in Blätter und Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1 und WT-Pflanzen, 1. Experiment. (A,B) Blätter, (C,D) Wurzeln. Kartoffelpflanzen der Linien *StpABC-GFP* A1 und WT Kontrollen wurden zum Zeitpunkt 0 h mit einer Pinzette auf Blatt- und Wurzelgewebe verwundet. Nachfolgend wurden zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h, 16h und 24h jeweils Proben entnommen. Pro Zeitpunkt und Linie wurden Doppelproben geerntet. Anschließend wurde die RNA nach der Trizol-Methode isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran geblottet und mit der Sonde *sGFP* aus pGWB404 (Primer: *sGFP_F*, *sGFP_R*) hybridisiert.

Dabei fand bei der *StpABC-GFP* Linie A1 eine Transkriptakkumulation des *sGFPs* statt, wobei ein besonders starkes Signal 12 h nach Verwundung in Blätter und Wurzeln detektiert wurde. Weiterhin wurden Signale 16- und 24 h nach Verwundung detektiert. Die Wund-induzierte *sGFP*-Expression durch den *StABC*-Promotor in Blätter und Wurzeln wurde in einem Experiment mit Doppelwerten gezeigt. Zur Verifizierung sollten zwei weitere Experimente durchgeführt werden.

3.2.6 Mikroskopische Untersuchungen der *StpABC-GFP* Linien

Die mikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation der *StpABC*-Promotoraktivität wurden mittels synthetischen GFP (grünfluoreszierende Protein) in den transgenen Linien *StpABC-GFP* A1, A2, B1 und zur Kontrolle in WT Kartoffelpflanzen durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte an unverwundeten Blättern und Wurzeln von Pflanzen, die in Sand kultiviert und nach 4 bis 6 Wochen geerntet wurden. Es konnten dabei keine Unterschiede in der Fluoreszenz der Zellwand-Region zu Wurzeln der WT-Kontrollen festgestellt werden. Die Anregung durch kurzwelliges Licht führt zu einer stark roten Autofluoreszenz des Chlorophylls, die in Wurzeln (aus Sterilkultur) und in Blättern der

WT-Kontrollen und *StpABC-GFP* Linien deutlich erkennbar war [59]. Die transgenen *StpABC-GFP* Linien A1, A2 und B1 zeigten, im Unterschied zu den WT-Kontrollen, ein deutliches Fluoreszenzsignal der Zellkerne. Des Weiteren wurden bei Wurzeln der transgenen Linien neben den fluoreszierenden Zellkernen, vereinzelt stärker fluoreszierende Zellen festgestellt (s. Abb. 15).

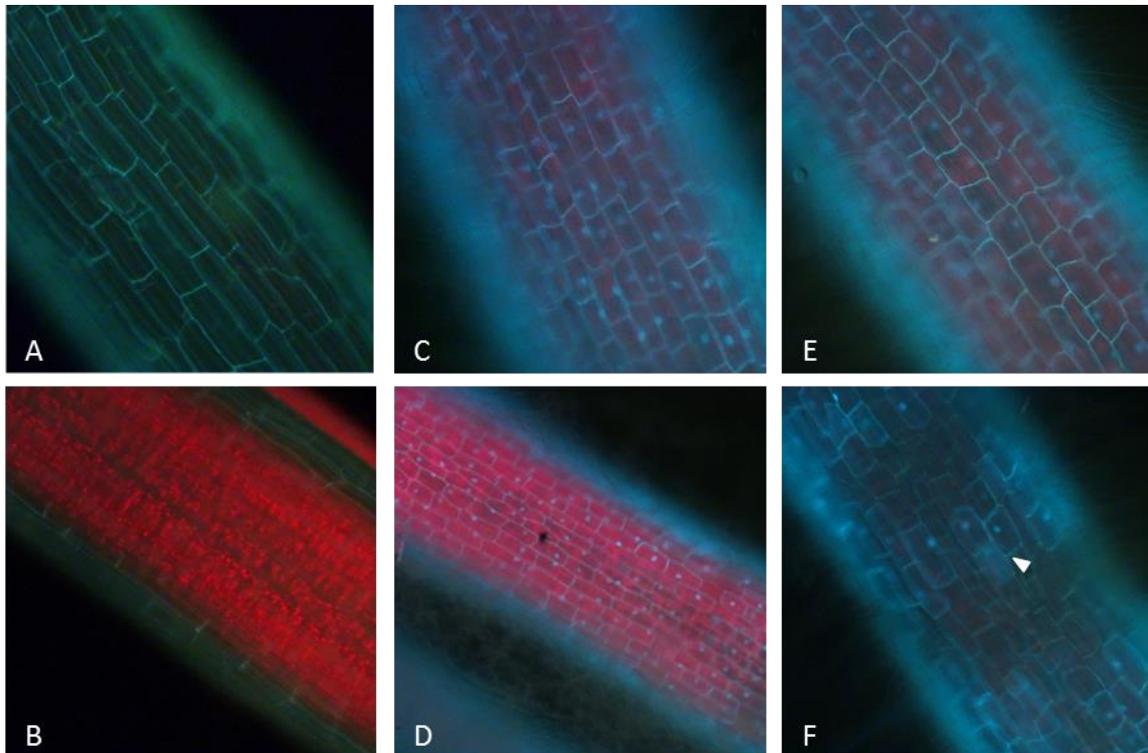


Abb. 15: Mikroskopische Betrachtung unverwundeter Wurzeln der WT-Kontrollen (A,B), *StpABC-GFP* Linie A1 (C,D) und A2 (E,F). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Nikon-Mikroskop mit GFP-Filter gemacht. (A-F) Fluoreszierende Zellwand-Regionen. (C-F). Verstärkt fluoreszierende Zellkerne. (F) Vereinzelt stärker fluoreszierende Zellen (s. Pfeil) erkennbar.

Zur näheren Untersuchung der Fluoreszenz wurden mikroskopische Aufnahmen mit einem LSM (engl. *laser-scanning-mikroscope*) erstellt. Dabei wurden in unverwundeten Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1, vereinzelt stark fluoreszierende Zellen visualisiert. Diese Fluoreszenz trat dabei in der Zellwand-Region und im Zellkern auf (s. Abb. 16). Um die fluoreszierenden Zellen näher zu untersuchen, wurden Wurzelquerschnitte der *StpABC-GFP* Linien A1 und B1, sowie WT-Kartoffel hergestellt. Bei den mikroskopischen Betrachtung der *StpABC-GFP* Linien und der Kontrolle wurden starke Fluoreszenzsignale der Exodermis entdeckt. Des Weiteren ist vor allem bei der Linie A1 die Endodermis erkennbar. Ein schwaches Signal geht bei allen analysierten Linien zudem von den Gefäßwänden der Zentralzylinder aus.

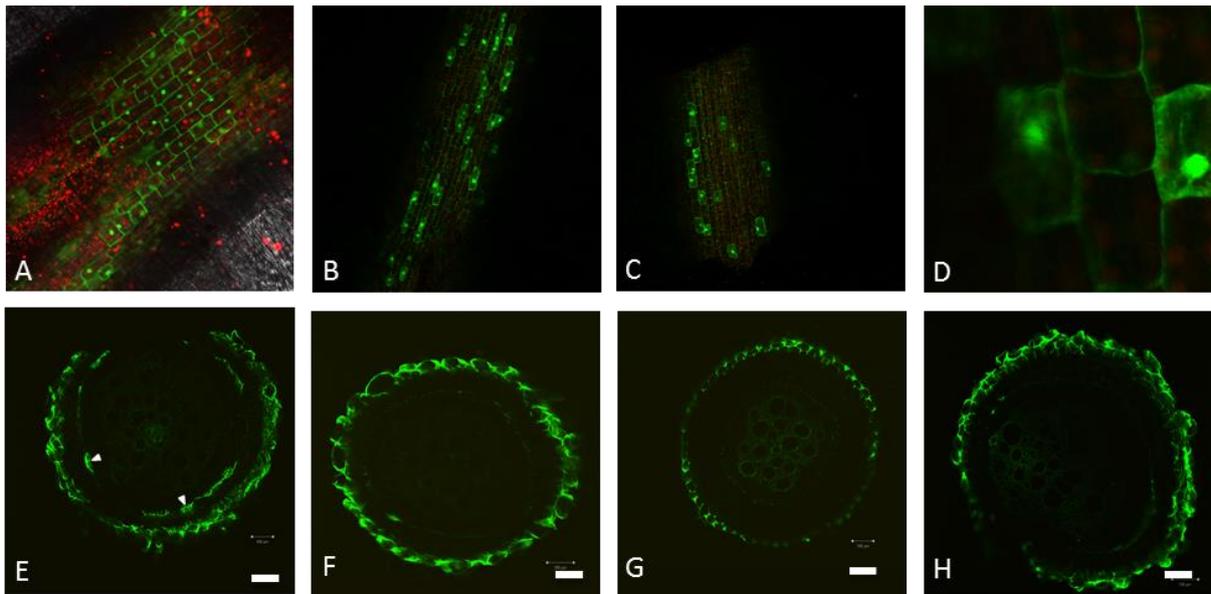


Abb. 16: Mikroskopische LSM-Aufnahmen unverwundeter Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1 (A-D), sowie Wurzelquerschnitte der *StpABC-GFP* Linie A1, B1 und WT-Kontrolle (E-H). (A-D) Partiiell stark fluoreszierende Zellen. (E-F) Fluoreszenzsignale in der Exodermis. (E, s. Pfeil) schwaches Fluoreszenzsignal der Endodermis. Maßstab 100 μ m.

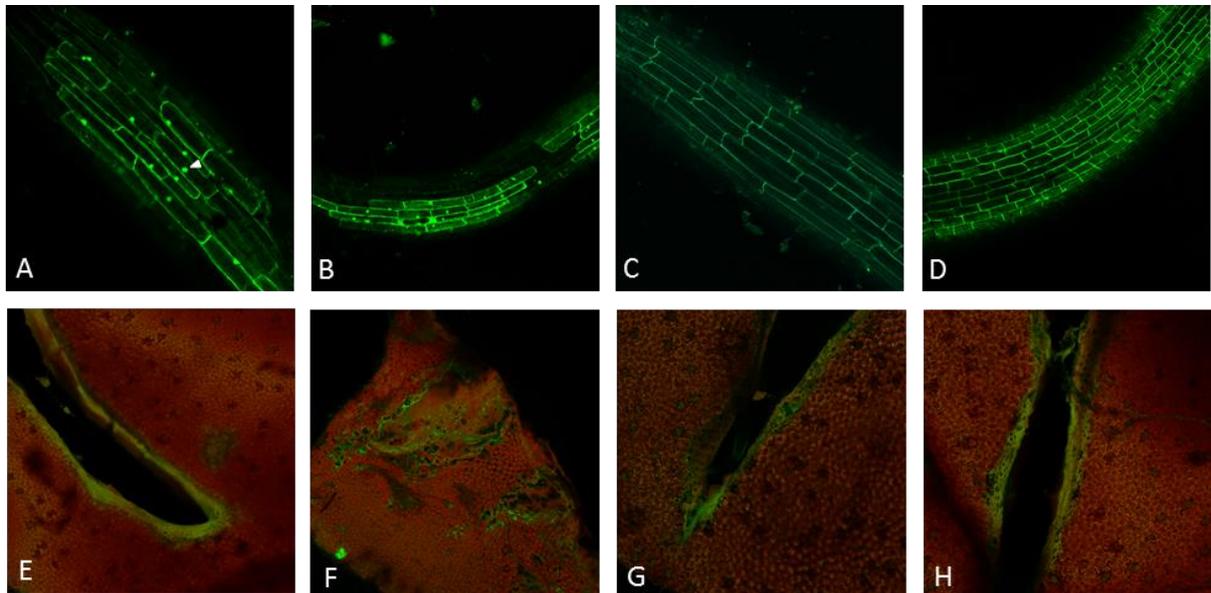


Abb. 17: Mikroskopische (LSM) Aufnahmen verwundeter Wurzeln (A-D) und Blätter (E-H). Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1, nach 6 hpw (A) und 18 hpw (B), sowie Wurzeln der WT-Kontrolle, nach 6 hpw (C) und 18 hpw (D). Die Verwundung von Blättern erfolgte mittels Skalpell (E, G, H) oder mittels Pinsette (H). Verwundung der *StpABC-GFP* Linie A1 6 hpw (E) und 18 hpw (F), sowie verwundete WT-Kontrollen nach 6 hpw (G) und 18 hpw (H).

Um zu untersuchen, ob die Promotoraktivität durch Verwundung induziert wird, wurden Wurzeln und Blättern der *StpABC-GFP* Linie A1, 6 und 18 Stunden nach Verwundung (6 u. 18 hpw) geerntet und mikroskopisch betrachtet. Die Wurzeln der *StpABC-GFP* Linie A1 zeigten vereinzelt stärker fluoreszierende Zellen. Bei untersuchten Blättern der *StpABC-GFP* Linie A1 und WT-Kontrolle wurde, neben einer starken Autofluoreszenz des Chlorophylls im gesamten Blattgewebe, ein verstärktes Fluoreszenzsignal in der Peripherie der Verwundungen ermittelt. Aufgrund ähnlicher Beobachtungen in der *StpABC-GFP*-Linie und WT-Kontrollen, konnte keine Unterscheidung dieser Signale erfolgen. (s. Abb. 17, E-H).

3.2.7 GUS-Färbung der *StpABC-GUS* Linien

Die weitere zelluläre Untersuchung der *StpABC*-Aktivität wurden GUS-Reportergerne Konstrukte, welches für die β -Glukuronidase kodiert, generiert. Die Verwendung des spezifischen, farblosen Substrats X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -Glucuronsäure) durch das Enzym führt zu einer tiefblauen Farbbildung (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo). Diese Färbung wird Indikativ für die visuelle Bestimmung der *StpABC*-Aktivität verwendet

Zur Untersuchung der *StpABC*-Aktivität wurden unverwundete Wurzeln und verwundete Blätter (3 hpw) ohne Fixierung gefärbt (s. 2.3.15). Bei den *StpABC*-GUS Linien C1 und C3 zeigte sich eine periphere Blaufärbung, einige Millimeter vom Rand der Verwundungsstelle. Bei der Linie E1 zeigte sich eine Blaufärbung im Leitgewebe des Blattes, wobei die Verwundungen auf den Blattflächen keine Färbungen aufwiesen. Des Weiteren wurden in den Linien D1 und D2 keinerlei Färbungen in den Blättern nach Verwundung gezeigt.

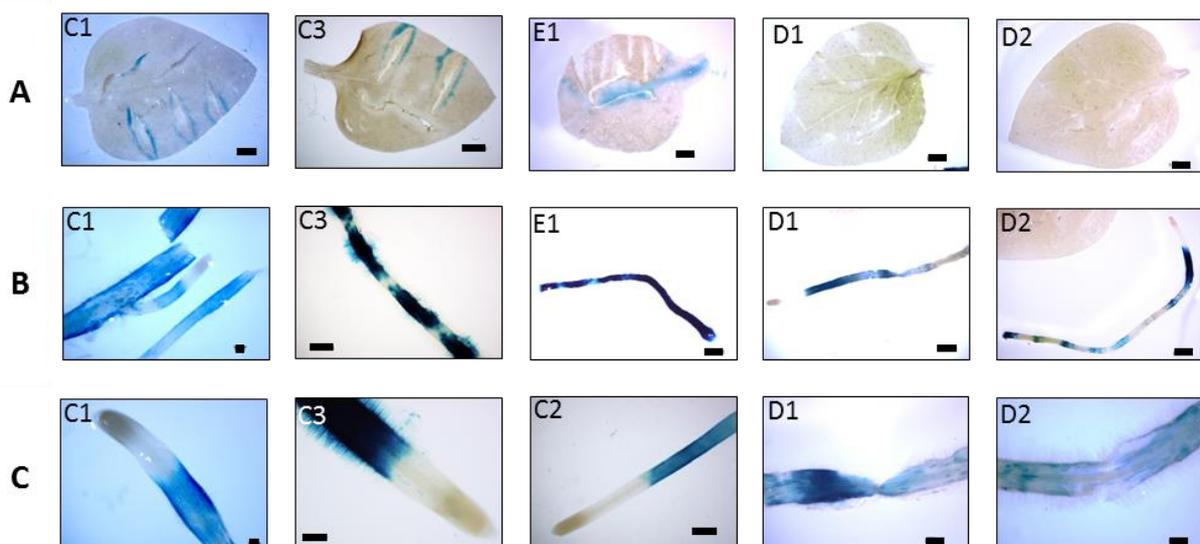


Abb. 18: Mikroskopische Untersuchungen der *StpABC-GUS* Linien C1, C2, C3, D1, D2, E1 nach GUS-Färbung (ohne Fixierung). (A) Blätter nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [200 μ m] C1, E1, D1, D2; [2000 μ m] C3. (B) Wurzeln nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [100 μ m] C1, [200 μ m] E1, D1, D2; [2000 μ m] C3. (C) Wurzeln nach Verwundung (3 hpw). Maßstab: [100 μ m] C1, [200 μ m] D1, D2; [2000 μ m] C2, C3.

In den Wurzeln der untersuchten *StpABC-GUS* Linien C1, C2, C3, D1, D2 und E1 wurden *StpABC*-Aktivitäten durch die Indikative Blaufärbungen erkannt. Bei einigen Wurzeln traten segmentartige Färbungen auf, welche von ungefärbten Bereichen unterbrochen waren. Erkennbar waren zudem, dass sich keine Färbungen im Bereich der Wurzelspitze befanden. Diese war stark von den gefärbten Bereichen abgegrenzt. Nach Verwundung der *StpABC-GUS* Linien D1 und D2 (3 hpw) ist in Abb. 18, C eine fleckige Blaufärbung der Exodermis erkennbar. Dies weist auf eine *StpABC*-Aktivität in den äußeren Zellschichten der Wurzel hin.

Die mikroskopischen Untersuchungen der *StpABC-GFP* und *StpABC-GUS* Linien weisen auf eine konstitutive *StpABC*-Aktivität in der Exodermis von Wurzeln, wobei Wurzelspitzen stark abgegrenzt sind und keine Aktivität aufweisen. Die Wund-induzierte *StpABC*-Aktivität konnte in der Peripherie von Verwundungen beobachtet werden. Zur Verifizierung dieser Beobachtungen sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

3.2.8 Promotoranalyse

Ein *Multi-Sequenz-Alignment* der *StpABC*-Mastersequenz aus *S. tuberosum* mit der *SppABC*- Sequenz des nicht annotierten Kartoffelgenoms von *S. phureja* ergab eine Korrelation von 94 % (s. 6.5). Homologien der *StpABC*-Mastersequenz zu anderen Organismen wurde mit dem *Online-Tool* BLASTN, in den NCBI-Datenbanken (Nicht-Mensch, Nicht-Maus) erstellt. Die *StpABC*-Sequenz ähnelt einem Abschnitt auf dem Chromosom 5 von *S. lycopersicum* (AC235732.3). Die max. Identität liegt bei 85% (Identities 974/1142).



Abb. 19: Verteilung von möglichen cis-regulatorischer Elemente innerhalb der *StpABC*-Region. Diese Motive (TFBS) wurden durch eine *in silico* Promotoranalyse identifiziert. Es wurden neben TATA-Boxen, an der Licht-Reaktion (I-Box), Samenbildung (P-Box), Pflanzenentwicklung und Stressreaktion (G-Box) beteiligte TFBS entdeckt. Weitere Motive sind W-Boxen, welche an der Expression Wund- & Pathogen-induzierter Gene beteiligt sind.

Die *in silico* Analysen zu möglichen Tanskriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) innerhalb der *StpABC*-Region wurde mit *Online-Tools* (s. 2.3.7) durchgeführt. Dabei wurde ein Schwellenwert von mind. 80 % zur Konsensus-Sequenz vorausgesetzt. Die möglichen cis-regulatorischen Elemente wurden in Gruppen eingeteilt, wovon einige exemplarisch in Tab. 3 dargestellt sind. Eine ausführliche Auflistung befindet sich im Anhang, unter 6.6.

Die Kernsequenz des eukaryotischen Promotors besteht aus TATA-, GATA- und CAAT-Boxen, sowie PolyA-Signal-Motive, welche sich auf der gesamten *StpABC*-Sequenz befinden. Die G-Boxen konzentrieren sich im Bereich um -1450 Bp vom Start-Codon. W-Boxen sind ebenfalls von -8 Bp bis -2005 Bp verteilt. Weitere cis-regulatorischen Motive sind über die gesamten Sequenz verteilt, weshalb sich der aktive Promotor anhand der *in silico* Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht eingrenzen lässt.

Tab. 3 Exemplarische Darstellung möglicher cis-regulatorischer Elemente in der *StpABC*-Region.

Promotor (spez.)	TATA Box CAAT Box GATA Box POLASIG	Stimulus	TFBS
Licht-Reaktion	I-Box T-Box GT1-Box	Stress	G Box bZIP
Samen	P-Box	Pathogen-Abwehr	W Box Zf-Box MYC
Entwicklung	G-Box CarG-Box	Verwundung	W-Box
sonstige	SPF-1	Repressor	SEBF ASF1

4. DISKUSSION

4.1 Klonierung der *StpABC*-Sequenz

Die Amplifikation der *StpABC*-Region aus genomischer DNA erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotide StABC_P5-5 (s) und StABC_P8_3 (as), wodurch das Fragment einen Überhang von 16 Nukleotiden in die kodierende Region enthielt. Diese Oligonukleotide wurden gewählt, nachdem eine flankierende Amplifikation zum Start-Condon (Pos. -1) nicht erfolgreich war. Dies konnte nach der Sequenzierung mit der Diversität der *StpABC*-Sequenz, zur *in silico* Sequenz des *SppABC* begründet werden.

Die Klonierung der *StpABC*-Region in den bakteriellen pJET1.2 Vektor diente zur ersten rekombinanten Vervielfältigung, wobei die anschließende Sequenzierung der Plasmid-DNA von vier Transformanten zu einer Mastersequenz führte. Aufgrund des Nukleotid-Überhangs wurde die *StpABC*-Region mit neu generierten Primern StubABC_P9_5 (s) und StubABC_P_3 (as) aus dem pJET1.2 Vektor *blunt-end* amplifiziert. Eine gerichtete Klonierung in den Vektor pENTR ermöglichte die gezielte Rekombination in den binären Zielvektoren pGBW404 und pGWB433. Die Sequenzierung der DNA von pENTR Transformanten bestätigte die *StpABC* Mastersequenz, wodurch diese im Folgenden näher charakterisiert werden konnte.

4.2 Promotoranalyse

Die *StpABC*-Region weist eine Reihe möglicher *cis*-regulatorischer Elemente auf, wobei sich an Position -18 von der Transkriptionsstart-Stelle (TSS) eine TATA-Box befindet, welche neben CAAT-Box, GATA-Box, P-Box, sowie PolyA-Signal-Motiv zu den Elementen einer Promotor-Kernsequenz eukaryotischer Organismen gehören [37]. Weiterhin wurden Motive entdeckt, welche an der Pathogen-, Stress- und Wund-induzierten Genexpression beteiligt sind. Die bedeutendsten Transkriptionsfaktoren (TF) in Abwehrmechanismen sind dabei die bZIP-, MYB-, MYC-, ERF- und WRKY-Proteinfamilien [60]. Die meisten bZIP- und WRKY-TF sind an der Salizylsäure-Signaltransduktion involviert, wohingegen ERF-Proteine vermehrt an der Jasmonsäure- und Ethylen Signaltransduktion beteiligt sind [61]. Weiterhin sind ERF-Proteine an der Wund- und Elicitor-induzierten Genexpression beteiligt.

Die WKRY-Proteine (TF) binden an W-Boxen und führen zu einer positiven oder negativen Regulation von Pathogen-induzierten Genen. Die W-Boxen, mit der minimalen Konsensus-Sequenz TGAC des WRKY18 in *Arabidopsis* sind negative *cis*-regulatorische Elemente. Die Repression der WRKY18-Genexpression in *Arabidopsis* führt zu einer erhöhten PR- (engl. *pathogenesis-related*-) Genexpression und damit zu einer erhöhten Resistenz gegen das Pathogen *P. syringae*. Zum anderen

treten phänotypische Veränderungen in Form von Wachstumsstörungen auf [60, 62]. Die PAMP-induzierte Repression der Transkriptionsfaktoren WRKY1-3 konnte in Verbindung mit der Aktivierung der Expression des Abwehrgens PR-1 in Petersilie gebracht werden [63, 64]

Die TFBS PALBOXPPC ist eine von drei putativen Elicitor-, Wund- und Licht-induzierten cis-regulatorischen Elementen der PAL- (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-) Genfamilie. Zudem wurde gezeigt, dass MYB-Proteine an der positiven Regulation der Phenylpropanoid-Biosynthese (darunter auch PAL) beteiligt sind. Eine Überexpression des AtMYB75 und AtMYB90 führte unter anderem zur Akkumulation von Hydroxyzimtsäuren [65]. Diese sind als Sekundärmetabolite in Abwehrreaktionen von Bedeutung und in der erhöhten Expression von Stress-relevanten Genen, sowie an der Immunität beteiligt [66]. Zudem sind Hydroxyzimtsäuren Bestandteile des Biopolymers Suberin [67].

Die Promotoranalyse des StABC-Gens ergaben mögliche cis-regulatorische Elemente innerhalb der putativen Promotorregion, welche an der (abiotischen und biotischen) Stress-induzierten Genexpression beteiligt sind. Die bioinformatische Auswertung der cis-regulatorischen-Elemente verschiedener eukaryotischer Organismen erfolgte mit *Online-Tools* welche auf Sequenzhomologien der Motive basieren. Ein wählbarer Schwellenwert in der Übereinstimmung zu den Konsensus-Sequenzen (hier 80%) kann dabei zu falsch-positiven oder –negativen führen. Des Weiteren werden die Motive unabhängig voneinander betrachtet, wodurch eine *in silico* Untersuchung der Interaktionen zwischen TF in der Regel nicht möglich ist [37].

Eine weitere Eingrenzung des aktiven StABC-Promotors (< 2012 Bp) war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. *In silico* Promotoranalysen haben gezeigt, dass cis-regulatorische Elemente, mit einer Länge von 4 bis 10 Bp, in eukaryotischen Zellen, in einem Bereich von 500 bis 5000 Bp für ein Gen enthalten sein können [68]. Zur Eingrenzung der aktiven Promotor-Region könnten GUS-Farbintensitäten oder GFP-Transkriptakkumulationen mittels *real-time* qRT-PCR durch Deletionsanalysen mit kürzeren StpABC-Sequenzen untersucht werden. Weiterhin wäre eine funktionelle Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) durch Punktmutationen, oder durch das *DNA Footprinting* möglich [69]. Letztere Methode basiert auf Protein-DNA-Interaktionen, welche den enzymatischen DNase Verdau verhindern und durch Markierung der DNA detektiert werden können [70]. Einen weiteren Ansatz stellt der EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*) dar. Dabei werden bekannte DNA-Fragmente wie Promotor-Regionen eines Gens mit Proteinen inkubiert, wobei es zu DNA-Protein-Interaktionen kommen kann. Wurde das bekannte DNA-Fragment mit einem Radionukleotid, Digoxiginin oder Fluoreszenzfarbstoff markiert, lassen sich diese Interaktionen nach elektrophoretischer Auftrennung detektieren. Die Bindung der Proteine (TF) an die DNA verändert das Laufverhalten der Fragmente. Die Detektion erfolgt abhängig von der Markierung durch Autoradiographie, sowie über Digoxiginin- oder Fluoreszenzsignale [71].

4.3 Funktionelle Analyse der *StpABC*-Region

Die funktionelle Analyse der *StABC*-Promotor-Region wurde an transgenen Kartoffelpflanzen, welche ein *sGFP*- oder *GUS*-Reporter-Gen-Konstrukt mit der *StpABC*-Region enthielten, durchgeführt. Dabei konnte der Transgen-Nachweis für die *StpABC*-GFP Linien A1, A4, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, B1, B2, C3, E1, E2 und F1 durch Southern-Hybridisierungen mit der *sGFP*-Sonde bestätigt werden. Der Transgen-Nachweis für generierte *StpABC*-*GUS* Linien konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Aufgrund der Untersuchungen von Frau Altmann (2009) zur Wund-induzierten *StABC*-Genexpression wurde an der *StpABC*-GFP Linie A1 die Transkriptakkumulation des *sGFP* nach Verwundung untersucht. Die GFP-Genexpression konnte dabei in einem Experiment nach 12 hpw in Blättern und Wurzeln detektiert werden. Diese Untersuchungen wiesen durch die Wund-induzierte Transkriptakkumulation des *sGFPs*, auf einen aktiven Promotorbereich hin. Zur Verifizierung sollten weitere Experimente folgen. Die Micro-Array Analysen von Frau Altmann (2009) zeigten eine Pep-13 induzierte *StABC*-Genexpression. Daher könnten weitere Untersuchungen zur *StpABC*-Aktivität nach Pep-13 oder *P. infestans*-Behandlung mit den *StpABC*-GFP und *-StpABC*-*GUS* Linien folgen.

4.3.1 Zelluläre *StpABC*-Aktivität anhand *GFP*- und *GUS*-Genexpression

Die zelluläre Lokalisierung der PAMP-induzierten *StABC*-Genexpression wurde anhand von Reporter-Gen-Konstrukten mit der *StpABC*-Region untersucht. Das Vorhandensein von Chloroplasten, in Blättern und Wurzeln führte zu einer roten Autofluoreszenz des Chlorophylls, wodurch eine qualitative Auswertung des GFP-Signals deutlich erschwert wurde. [72]. Die rot fluoreszierenden Wurzeln aus Sterilkulturen waren dem Licht ausgesetzt, wodurch womöglich die Umwandlung von farblosen Leucoplasten in grünen Chloroplasten stattfand. Die mikroskopischen Untersuchungen der *StpABC*-GFP Linien A1, A2 und B1 sowie WT Kontrollen zeigten zudem ein starkes Fluoreszenzsignal der Zellwandregionen. Die Fluoreszenz der Zellwand-Region unter UV-Licht wurde von Donaldson & Radotic (2013) durch Lignin, Phenolsäuren (z.B. Hydroxyzimtsäuren) wie Ferulasäure, Suberin und Cutin in Holz, sowie von Fang & Spector (2010) durch phenolische Substanzen der Vakuole beschrieben [73, 74]. Die Unterscheidung der *StpABC*-GFP Linien zu den WT Kontrollen lag in der Detektion eines Fluoreszenzsignals im Nukleus der *GFP*-Linien, sowie der partiell verstärkten Fluoreszenz einzelner Zellen in den äußeren Zellschichten der Wurzel. Ähnliche Beobachtungen wurden von Boher et al. (2013) bei Untersuchungen zur Aktivität einer Promotor-Region der Suberin Feryltransferase (*StpFHT*) mittels *GFP*- und *GUS*-Fusionsprodukten gemacht [75].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *StABC*-Promotoraktivität wurde durch Blaufärbung in der Exodermis und durch Fluoreszenz im Fall der *StpABC*-GFP Linie A1 in der Endodermis beobachtet. Boher et al. (2013) beschreiben für den *StFHT*-Promotor eine Aktivität in der Exo- und Exodermis.

Bei mikroskopischen Untersuchungen von Wurzelquerschnitten der *StpABC-GFP* Linien A1, B1 und WT-Kontrollen konnten ebenfalls Fluoreszenzsignale der äußeren Zellschicht detektiert werden. Dabei wurde ein verstärktes Fluoreszenzsignal in der Endodermis der *StpABC-GFP* Linie A1 festgestellt. Die Anwesenheit von suberinisierten Zellen in verwundeten Knollen konnte durch Autofluoreszenz phenolischer Substanzen unter dem Mikroskop detektiert werden [76]. Die Verwundung von Knollen könnte dahingegen an den *StpABC-GUS*-Linien untersucht werden. Untersuchungen von Serra (2010) an *FHT-RNAi*-Linien haben zudem die Bedeutung von Suberin für die strukturelle Ausbildung des Periderms in Knollen der WT-Kartoffel Désirée gezeigt [77, 78].

Die Untersuchung der heterologen Reportergenexpression in Blättern war bei den *StpABC-GFP* Linien aufgrund der genannten Chlorophyll-Fluoreszenz nicht eindeutig. Daher wurde eine erste Lokalisation in Blättern nach Verwundung an den *StpABC-GUS* Linien durchgeführt. Dabei wurde bei den Linien C1 und C2 eine *GUS*-Aktivität um die Wundläsionen lokalisiert werden. Dies wurde für *StpFHT-GUS*-Pflanzen ebenfalls bei den Untersuchungen von Boher et al. (2013) gezeigt [75]. Die *StpABC-GUS* Linie E1 wies hingegen eine *GUS*-Aktivität im Leitgewebe auf, wohingegen bei den Linien D1 und D2 keine Aktivität des Reportergens in den Blättern nach Verwundung zu verzeichnen war. Aus diesem Grund sollte zur Verifizierung der ersten *GUS*-Aktivitäten ein Transgen-Nachweis durch Southern-Hybridisierung erfolgen und weitere *GUS*-Färbungen untersucht werden. Für eine korrekte Analyse der *StpABC*-Aktivität müssten zudem weitere unabhängig generierte Pflanzenlinien etabliert und analysiert werden. Die mikroskopische Analyse unverwundeter Wurzeln von *in vitro* kultivierten *StpABC-GUS* Linien C1, C2 und C3 zeigten nach Induktion des Reportergens deutlich abgegrenzte, ungefärbte Wurzelspitzen. Hingegen wiesen die restlichen Wurzelpartien flächige oder segmentartige *GUS*-Aktivitäten über den gesamten Wurzelquerschnitt auf. Diese zelluläre Abgrenzung wurde von Ranathunge et al. (2011) in Hinblick auf die Bedeutung von Suberin gezeigt. Untersuchungen von Boher et al. (2013), sowie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung und erste funktionelle Analysen des *StABC*-Promotors lassen eine Korrelation zwischen der Expression des *StABC*-Gens und der Suberinbildung vermuten. Ein Zusammenhang zwischen den Stress- und Wund-induzierten ABC-Transportern *AtABCG11*, *AtABCG12*, *AtABCG13* und dem Transport von Suberinvorstufen durch die Plasmamembran wurde von Franke & Schreiber (2007) und Panikashvili et al. (2010) publiziert [79, 80]. Dabei wird Suberin als apoplastisches Biopolymer beschrieben, welches durch gewebsspezifische Ablagerungen in Endo- und Exodermis in Wurzeln von Bedeutung ist [81]. Zudem ist die Biosynthese durch Verwundung induziert und führt in Wurzeln zur verminderten Bewegung von Wasser und Nährstoffen, sowie das Eindringen von Pathogenen und die Bildung von ROS [67, 82].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen können Pathogene anhand von PAMPs (engl. *pathogen associated molecular patterns*) erkennen und komplexe Abwehrmechanismen aktivieren, die zur Ausprägung der PTI (engl. *PAMP-triggered immunity*) führen. In der vorliegenden Arbeit wurden PAMP-induzierte Abwehrreaktionen zwischen *Solanum tuberosum* und *Phytophthora infestans* untersucht. Der Oomycet *P. infestans* ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule, der wichtigsten und wirtschaftlich bedeutendsten Krankheit der Kartoffel. Die Behandlung der anfälligen Sorte Désirée mit dem *Phytophthora*-spezifischen PAMP Pep-13 führt zu einer starken lokalen Abwehrantwort, die zu einer systemischen Resistenz führt. In Microarray-Analysen wurden mehr als 700 Gene identifiziert, die durch Pep-13 aktiviert werden. Der Promotor eines dieser Gene, das für einen ABCG-Halb-Transporter kodiert, sollte im Rahmen der Arbeit charakterisiert und auf seine Aktivität untersucht werden.

Zunächst wurde eine ~2 kb große Promotor-Region des ABC-Transporters aus *S. tuberosum* (*StpABC*) kloniert und mehrere Klone sequenziert. Dabei konnte eine Sequenzhomologie von 94% zum nicht annotierten Kartoffelgenom von *Solanum phureja* festgestellt werden. Zur weiteren Charakterisierung der *StpABC*-Region wurde eine *in silico* Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei wurden zahlreiche mögliche cis-regulatorische Elemente einer Kernpromotor-Sequenz, sowie TFBS zur Regulation von Stress-, Licht- und Pathogen-induzierten Genen lokalisiert. Eine Eingrenzung der aktiven Promotor-Region (< 2012 Bp) konnte damit nicht erzielt werden. Die Erstellung von *sGFP*- und *GUS*-Reportergen-Konstrukten mit der *StpABC*-Region und die Generierung transgener Pflanzen ermöglichte eine funktionelle Analyse. In Analogie zu Voruntersuchungen von Frau Altmann (2009) wurde nach einem Transgen-Nachweis der *StpABC-GFP* Linien die Wund-Induzierung in einer Zeitkinetik, an einer Linie untersucht. Dabei konnte durch Northern-Hybridisierungen eine starke Transkriptakkumulation des *GFPs* 12 Stunden nach Verwundung in einem Experiment festgestellt werden. Für die zelluläre Lokalisation der *StpABC*-Region wurden mikroskopische Untersuchungen der *StpABC-GFP* und *StpABC-GUS*-Linien durchgeführt.

Die heterologe Expression des *GFPs* war bei den untersuchten *StpABC-GFP* Linien A1, A2 und B1 aufgrund von Autofluoreszenz des Chlorophylls nicht eindeutig möglich. In Wurzeln konnten, im Unterschied zu den WT Kontrollen, verstärkte Fluoreszenzsignale in den Zellkernen und in vereinzelt Zellen der epidermalen Region detektiert werden. Wurzelquerschnitte zeigten dabei stark fluoreszierende Bereiche der Endo- und Exodermis, wobei dies ebenfalls bei WT-Kontrollpflanzen detektiert wurde. Diese wurden als Fluoreszenz phenolischer Substanzen, wie Suberin beschrieben [81]. Bei mikroskopischen Betrachtungen der *StpABC-GUS* Linien C1 und C3 wurde nach Verwundung eine lokale Blaufärbung in der Peripherie der Verwundungsstellen beobachtet. Die Aktivität in Wurzeln zeigte in den untersuchten Linien C1, C2 und C3 eine

segmentartige Färbung, wobei deutlich abgegrenzte, ungefärbte Wurzelspitzen beobachtet werden konnten. Dies wurde von Ranathunge et al. (2011) in Verbindung mit Suberin gebracht. Die Bedeutung von ABCG- WBC Transporter und der Transport von Suberin durch die Plasmamembran wurde in *Arabidopsis* diskutiert [79, 80].

Zur Eingrenzung der aktiven *StABC*-Promotor-Region könnten Deletionsanalysen, sowie zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren und deren TFBS, DNA-Protein Interaktionen mittels DNA-Footprinting oder der EMSA untersucht werden. Die Wund-Induktion sollte durch weitere Experimente bestätigt werden. Für weitere Untersuchungen der *StpABC*-Aktivität sollte zunächst ein Transgen-Nachweis der *StpABC-GUS* Linien und weitere Färbungen durchgeführt werden. Des Weiteren könnten PAMP- oder *P. infestans*-Behandlungen an *StpABC-GUS* Linien erfolgen.

6. ANHANG

6.1 EST, Oligonukleotid, POCI Array

Im folgenden Abschnitt ist ein *Expressed Sequence Tag* (EST) aus *S. tuberosum* dargestellt, aus dem ein 60-mer Oligonukleotide (s. in nachfolgender Sequenz, fett & unterstrichen), des POCI Array hervorgeht. Der EST und das Oligonukleotid mit der Unigene ID: cPRO31A18TH, sind in der POCI-Datenbank (pgrc.ipk-gatersleben.de/poci) hinterlegt.

```

1      GCGAACTAGA AGGGTCCCCT CGAGGGACAA AAAGTTTGGT TGAGTTCAAC AAAACATGGG
61     AAAATACTAA AAGGAGTAAT GAAAATCCTG AAATCCAAAC ACCTACTCAT GGATTGTCAT
121    TGAAAGAAGC AATTAGCGCG AGTATTTCAA GAGGGAAGTT GGTTTCAGGG ACAACGAGTG
181    ATATTCATAC TAGTCCAGCA TCAATGGTTC CAACTTACGC GAATCCATTT TGGATTGAAA
241    TGCTTGTGTT GTCCAAGAGA TCATTTACGA ATTCTTGGAG GGTGCCAGAG TTATTTGGTA
301    TTCGTCTAGG GGCAATCGTG GTCACGGGGT TCATCCTAGC TACCATGTTT TGGCAACTTG
361    ATGATTCCCC TAAAGGGGTT CAAGAAAGGC TTGGTTTCTT TGCATTTGCT ATGTCAACAA
421    CTTTCTATAC TTGCGCGGAC GCGTTGCCTG TGTTTCTCCA AGAGAGGTAC ATTTTCATGA
481    GGGAGACTGC TTATAATGCT TATAGGAGAT CTTTCTATTG TCTATCTCAT GCTATAGTTT
541    CTTTGCCAGC ATTGATCTTT CTTAGCTTTG CATTTGCTGC TATAACTTTT TGGGCTGTAG
601    GCCTTGTAGG TGGATTTTCG GGCTTTTTGT TCTATTTTCG GATAATACTA GCCTCCTTCT
661    GGGCCGGGAA TTCATTTGTC ACGTTCCTCT CCGGTGTAG TCCTAGTGTC ATGGTAGGTT
721    ACACCATAGT GGTCGCGATC CTAGCCTATT TCCTCCCTCT CTCAGGGATC TTTCATCATC
781    GCGATAGGAT T

```

60-mer Oligo

6.2 Standard-PCR

Tab. 4 Standard-PCR Programm

<u>Erste Denaturierung</u>	95 °C	560s	x 40
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing	T _A	30 s	
<u>Elongation</u>	72 °C	120 s	
Finale Elongation	72 °C	180 s	

Tab. 5 Optimierte Annealing-Temperatur (T_A)

Sense-Primer	Antisense-Primer	T _A
StABC_P5_5	StABC_P8_3	66 °C
StABC_P6_5	StABC_P7_3	69 °C
StubABC_P9_5	StubABC_P_3	69 °C
StubABC_P9_5	StubABC_P7_3	69 °C
SGFP_F	sGFP_R	67 °C

6.3 ABC-Promotorsequenz aus *Solanum phureja*

1	ATAAATGCTA	AGAGCAAATT	ATTAGTTAAT	CAACTTCTAA	TCAAGTATTA	TGACTTATTT	
61	CTTTATATTC	ATATAGTAAT	ATGAACAATT	AAAACCTCAA	TTTTTCTTTA	AAACTTGGCA	
121	ACATTTTTCAT	TCTCTAAAAT	AAGTAATTTT	CAAAGAAAA	GAAAATGAAA	GTATGTTTAA	
181	TTTTTTTTAGA	AAATTGGTTA	AACATACTAT	TATTTCCAAG	TAAACACATC	TTTTAAAAC	
241	CGTATTTTGG	AAAATTAGGC	CCAATTTTTT	ATGTGGGGCA	TGACGGATCA	AAAATACTTA	StABC_P5_5
301	TTTTTTAATA	ATATTGTCTT	TAAAAAAGTA	AAAGCAAGTA	TTTTTTTTTAT	TTTTTTTAA	
361	GAACTACTTT	ATTTCTCCTT	CTACTTAAAA	ATACAAAAAA	CTATGTTTAT	TACTAAACGA	
421	AAATACTTAT	TTTTTATTAC	CAAATAATG	ATCACAATTC	ACACATGCCT	TTACTCTCCA	StABC_P6_5
481	AAATAATAAT	TTTCTTAAAT	CACTTTTTAA	CTTTTTAAAA	ACTTAACTAC	ACAGGTTGTA	
541	TATAAATCAT	GGTAGATCTA	GATAGTATTT	ATCTAATACT	TGTATTGATA	TGAAAGAAGC	
601	AAATATAGAA	TTGAAATAAT	AGTTAGATGC	GTATAAACTG	ATAGGACACA	TCGTCATAAA	
661	TATTTATAAA	AAACTAGCTT	CATGCATCAA	TTTTGGCCTT	ATTTTATATA	GTAATTTAAA	
721	GCAAAGATTT	CATATGAGTA	ATTGATTATC	CAAATATTA	ATTATATGGT	AGCTTATAGT	
781	ATGAGATCAT	CTTCATTAAT	TCATGCCTCA	TTTTTCCACC	AATAACTATT	TTTTGGCAAA	
841	ACAGTAGATA	ACCATCCATA	CCTACTTCTA	CAAAGTATT	CTTCTGGCCA	AACTTCTCCT	
901	AATCACATCC	TTCCACGTGT	CCTCTCCCCA	CCCCACTCC	ACAACCCCTT	AGGGGTGAAA	
961	AAGAAAACCA	AATGTGTAGA	TGTAAAGAAT	TAGGAGATTT	AGGTCACCTT	ACTACTTATC	StABC_P7_5
1021	TCAACTCCAT	TCCCCTCACC	ACACAATTCA	ATTATAAACA	AATTTTAGTA	TTACCCCCAC	StABC_P7_3
1081	CCCCACCCC	AAAGAATTTG	ATATGACTTA	ATTATATACA	TGTATAATCA	TTATTAGTAA	
1141	TATTTATATA	TAGTTATATT	TTAACAAATA	GTATAAATAT	ACTATTAATG	TGAATTGATT	
1201	TTATTTATATG	AACATAAATA	TAATATTTAT	GTTCTTAATA	TTAATCGTTA	TGACGACTTA	
1261	ATAAATATAT	ATCATGTTTA	ATTAGTGTA	CGGTAATCAA	ATGAGATGTT	TTAATAAGAG	
1321	ATAAAAGATA	GCTAATTTAG	ACAAAATATA	TACTTTTATA	ATTATAATTA	GGATTATTAA	
1381	GTATTTTTCT	TAAAGAACAC	AAAAAATTT	AGAAAGAGAA	CGTAATCAAA	TGAGATCTTT	
1441	TAATAATAAG	AGATAAAAGA	TAAGCTAATT	TAGACAAATA	TATATTTTTA	TGATTAAGAA	
1501	TATTAAGTAT	TTTTCTTAAA	GAACACAAAA	ATCTTAAAAA	AGGAAAACAT	ATAATATAGA	
1561	ACAGTAATCA	AATGAGATCT	TTTAATAGGA	TAGCTAATTT	AGACAAATAT	ATATTATTAT	
1621	GATTAAGATT	CTTAAATATT	TTTCTTAAAA	GAGCACAAAA	AAATTTAAAA	AGTAAATAT	
1681	ATAATATGGA	CAAATATAG	TCAAATTTG	AGATATCCTT	CTTTTAAAAG	CTAACCCCTA	
1741	CCCCACCCTG	ACCTATAAGA	ATTTAATATG	TATTATGAGC	ATTAATTTAA	TTATATATCA	
1801	AGATCATAAA	TCTTGGTCTC	TATATATAGC	AACACATCAA	GAAACCAATC	AATATCCCAA	
1861	CTCTTTTAA	TTACTTTTCT	TGAAGAGAAA	TACAAAGAGT	AATTTAATAG	TTGTGGGGGC	
1921	TTTGAAAT	GTTTTAGACA	ATCTATTGAG	TCTCTTTTAC	ACACACAATT	TGCTAACCTA	
1981	CTTCAATCT	ACTACATAAC	TCTCAAAAAA	AAAAAAAAT	ATATATCAAT	CACACTACCA	
2041	TAAATCCCA	CAAATTCAT	CTCATTTCTT	GCCAATTGTT	CTAATGTTTT	CTCTATAAAC	
2101	ATACACCAA	ACCTCGAATT	ATTATATAAT	TCGTCATTTA	ACCAAACATC	TCATCTCAGT	
2161	ACCAGAATTG	AATATTTCAA	TCAAGTTCTT	TCGATAAAAT	TCTTTTACT	ATCAGTGTGT	
2221	GACAACGGAT	GTC AAGGATA	GTAGCGGAAA	ATATGTTACA	AGGGGGAGAA	AATGTACAAT	StABC_P8_3
2281	TTTATGATCA	AAGAGTACAA					

6.4 ABC-Promotorsequenz aus *Solanum tuberosum*

1	GGGGCATGAC	GGATCAAAAA	TACTTATTTT	TTAATAATAT	TGTCTTTAAA	AAAGTAAAAG	StubABC_P9_5
61	CATGTATTTT	TATTTTTTTT	GAAGGAACTA	CTTTATTTCT	CCTTCTACTT	AAAAATACAA	
121	AAAACATTTT	TTATTACTAA	ACGAAAATAC	TTATTTTTTTA	TTACCAAAAT	AATGATCACA	
181	ATTCACACAT	GCCTTTACTC	TCCAAAATAA	TAATTTTCTT	AAATCACTTT	TAAACCTTTT	
241	AAAACTTAA	CTACACAGGT	TGTATATAAA	TCATGGTAGA	TCTAGATAGT	ATTTATCTGA	
301	TACTTGTATT	GATATGAAAG	AAGCAAATAT	AGAATTGAAA	TAATAGTTAA	ATGCGTATAC	
361	ACTGATACGA	CACATCGTCA	TAAATATTTA	TAAAAAACTA	GCTTCATGCA	TCAATTTTGG	
421	CCTTATTTTA	TATAGTAAAT	TAAAGCAAAG	ATTTTCATATG	AGTAATTGAT	TATCCAAAAT	
481	ATTAATTATA	TAGTAAGTAG	CTTATAGTAT	GAGATCATCT	TCATTAATTC	ATGCCTCATT	
541	TTTCCACCAA	TAACTATTTT	TTGGCAAAC	AGTAGATAAC	CATCCATACC	TACTTCCATA	
601	TACTTTCATA	CAAAAGTATT	CTTCTGGCCA	AACTTCCTCC	AATCACATCC	TTCCACGTGT	
661	CCTCTCCCCA	CCCCCACCC	CACAACCCCC	TAGGGGTGAA	AAAGAAAACC	AAATGTGTAG	
721	ATGTAAAGAA	TTAGGAGATT	TAGGTCACCT	TACTACTTAT	CTCAACTCTA	TTCCCCCTCAC	StubABC_P7_5
781	CACACAATTC	AATTATAAAC	AAATTTTAGT	ATTACCCCCA	CCCCCACCC	AAAGAATTTG	StubABC_P7_3
841	ATATGACTTA	ATTATATACA	TGTATAATCA	TTATTAGTAA	TATTTATATA	TAGTTATATT	
901	TTAACAAATA	GTATAAATAT	ACTATTAATG	TGAATTGATT	TTATTATATT	AAATATCAAA	
961	ATTTTAGTTA	GATACTTTGA	TATATATATA	TATATAATAT	CACTCTTTTA	TGTTCTTAAT	
1021	ATTAATCGTT	ATGACGAGCT	AATAAATATA	TATCATGTTT	AATTAGTGTA	ACGGTAATCA	
1081	AATGAGATGT	TTTAATAAGA	GATAAAAGAT	AGCTAATTCA	GACAAATATA	TAATTTTATA	
1141	ATTATAATTA	GGATTATTA	GTATTTTTCT	TAAAGAACAC	AAAAAACTTT	AGAAAGAGAA	
1201	CGTAATCAAA	TGAGATCTTT	TAATAATAAG	AGATAAAAAGA	TAGCTAATTT	AGACAAATAT	
1261	ATATTTTTAT	GATTAAGAAC	ATTAAGTATT	TTTCTTAAAG	AACACAAAAA	TCTTAAAAAA	
1321	GAAAAACATA	TAATATAGAA	CGGTAATCAA	ATGAGATCTT	TTAATAGGAT	AGCTAATGTA	
1381	GACAAATATA	TATTATTATG	ATTAAGATTC	TTAAATATTT	TTCTTAAAGA	ACACAAAAGA	
1441	AACTTTAAAA	AGAAAAAATA	TAATATGGAC	CAAACATAGT	CAAAAATTGA	GATATCCTTC	
1501	CTTTAAAAGC	TAACCCCTAC	CCCACCATGA	CCTATAAGAA	TTTAATATGT	ATTATGAACA	
1561	TTAATTAAAT	TATATATCAA	GATCATAAAT	GATCATAAAT	CTTGCTCTAT	ATATATAGCA	
1621	ACACATCAAG	AAACCAATCA	ATATCCCAAC	TCTTTTAATT	TGCTTTTCTT	GAAGAGAAAT	
1681	ACAAAGAGTT	ATTTAATAGT	TGTGGGGGCT	TTGGAAATTG	TTTTAGACAA	TCTATTGAGT	
1741	CTCTTTTTCA	CACACAATTT	GCTAACCTAC	TTTCAATCTA	CTACATAAGT	CTCAAAAAAA	
1801	AACTATATA	TCAATCACAC	TACCATAAAT	TCCCACAAAA	TTCATCTCAT	TTCTTGCCAA	
1861	TTGTTCTAAT	GTTTTCTCTA	TAAACATACA	CCAAAACCTC	GAATTATTAT	ATAATTGCTC	
1921	GTTTAACCAA	ACATCTCATC	TCAGTACCAA	AATTGAATAT	TTCAATCGAG	TTCTTTTCGA	
1981	TAAAATTCTT	TATACTGTCA	GTGTGACAAC	GGATG			StubABC_P_3

6.5 Multi-Sequenz-Alignment der *StpABC*- Sequenz und der *in silico SppABC*-Sequenz

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Online-Tool CLUSTAL 2.1 durchgeführt. Dies wurde im Folgenden dargestellt. Am 3'-Ende der Sequenzen befindet sich jeweils das Startcodon eines ABC-Transportergens.

```

StpABC      GGGGCATGACGGATCAAAAATACTTATTTTTTAATAATATTGTCTTTAAAAAAGTAAAAG 60
SppABC      GGGGCATGACGGATCAAAAATACTTATTTTTTAATAATATTGTCTTTAAAAAAGTAAAAG 60
*****
StpABC      CATGTATTTTTAT--TTTTTTTGAAGGAAGTACTTTATTTCTCCTTCTACTTAAAAATAC 118
SppABC      CAAGTATTTTTTTTATTTTTTTTTAAGGAAGTACTTTATTTCTCCTTCTACTTAAAAATAC 120
**:******:* ***** *****
StpABC      AAAAACTATTTTTATTACTAAACGAAAATACTTATTTTTTATTACCAAATAATGATCA 178
SppABC      AAAAACTATGTTTATTACTAAACGAAAATACTTATTTTTTATTACCAAATAATGATCA 180
*****
StpABC      CAATTCACACATGCCTTTACTCTCCAAAATAATAATTTTCTTAAATCACTTTTTAACCTT 238
SppABC      CAATTCACACATGCCTTTACTCTCCAAAATAATAATTTTCTTAAATCACTTTTTAACCTT 240
*****
StpABC      TAAAAACTTAACTACACAGGTTGTATATAAATCATGGTAGATCTAGATAGTATTTATCT 298
SppABC      TAAAAACTTAACTACACAGGTTGTATATAAATCATGGTAGATCTAGATAGTATTTATCT 300
*****
StpABC      GATACTTGATTGATATGAAAGAAGCAAATATAGAATTGAAATAATAGTTAAATGCGTAT 358
SppABC      AATACTTGATTGATATGAAAGAAGCAAATATAGAATTGAAATAATAGTTAGATGCGTAT 360
.*****.*****
StpABC      AACTGATACGACACATCGTCATAAATATTTATAAAAACTAGCTTCATGCATCAATTTT 418
SppABC      AACTGATAGGACACATCGTCATAAATATTTATAAAAACTAGCTTCATGCATCAATTTT 420
* .***** *****
StpABC      GGCCTATTTTATATAGTAAATTAAGCAAAGATTCATATGAGTAATTGATTATCCAAA 478
SppABC      GGCCTATTTTATATAGTAAATTAAGCAAAGATTCATATGAGTAATTGATTATCCAAA 480
*****
StpABC      ATATTAATTATATAGTAAGTAGCTTATAGTATGAGATCATCTTCATTAATTCATGCCTCA 538
SppABC      ATATTAATTATATG---GTAGCTTATAGTATGAGATCATCTTCATTAATTCATGCCTCA 536
***** . *****
StpABC      TTTTCCACCAATAACTATTTTTTGGCAAACAGTAGATAACCATCCATACCTACTTCCA 598
SppABC      TTTTCCACCAATAACTATTTTTTGGCAAACAGTAGATAACCATCCATACCTACTTCC-- 594
*****
StpABC      TATACTTTCATACAAAAGTATTCTTCTGGCCAAACTTCCTCCAATCACATCCTTCCACGT 658
SppABC      -----TACAAAAGTATTCTTCTGGCCAAACTTCCTCCAATCACATCCTTCCACGT 644
*****
StpABC      GTCCTCTCCCCACCCCAACCCCTAGGGGTGAAAAGAAAACCAATGTGT 718
SppABC      GTCCTCTCCCCACCCCACTCCACAACCCCTAGGGGTGAAAAGAAAACCAATGTGT 703
***** ** *****

```

StpABC AGATGTAAAGAATTAGGAGATTTAGGTCACCTTACTACTTATCTCAACTCTATTCCCCTC 778
 SppABC AGATGTAAAGAATTAGGAGATTTAGGTCACCTTACTACTTATCTCAACTCCATTCCCCTC 763

StpABC ACCACACAATTCAATTATAAACAAATTTTAGTATTACCCCCACCCCC-ACCCCAAAGAAT 837
 SppABC ACCACACAATTCAATTATAAACAAATTTTAGTATTACCCCCACCCCCACCCCAAAGAAT 823

StpABC TTGATATGACTTAATTATATACATGTATAATCATTATTAGTAATATTATATATAGTTAT 897
 SppABC TTGATATGACTTAATTATATACATGTATAATCATTATTAGTAATATTATATATAGTTAT 883

StpABC ATTTTAACAAATAGTATAAATATACTATTAATGTGAATTGATTTTATATATTAATATC 957
 SppABC ATTTTAACAAATAGTATAAATATACTATTAATGTGAATTGATTTTATATATGAAC---- 939
 ***** *

StpABC AAAATTTTAGTTAGTACTTTGATATATATATATATAAATATCACTCTTTTATGTTCTT 1017
 SppABC -----ATAAATATAATAT-----TTATGTTCTT 962
 :** *****

StpABC AATATTAATCGTTATGACGAGCTAATAAATATATATCATGTTAATTAGTGTAAACGGTAA 1077
 SppABC AATATTAATCGTTATGACGAGCTAATAAATATATATCATGTTAATTAGTGTAAACGGTAA 1022

StpABC TCAAATGAGATGTTTTAATAAGAGATAAAAGATAGCTAATTCAGACAAAAT-ATATAATTT 1136
 SppABC TCAAATGAGATGTTTTAATAAGAGATAAAAGATAGCTAATTTAGACAAAATATATACTTT 1082
 *****: ***** *

StpABC TATAATTATAATTAGGATTATTAAGTATTTTTCTTAAAGAACACAAAAAAGTTAGAAAG 1196
 SppABC TATAATTATAATTAGGATTATTAAGTATTTTTCTTAAAGAACACAAAAAAGTTAGAAAG 1142

StpABC AGAACGTAATCAAATGAGATCTTTTAAATAAAGAGATAAAAGATAG-CTAATTTAGACA 1255
 SppABC AGAACGTAATCAAATGAGATCTTTTAAATAAAGAGATAAAAGATAAGCTAATTTAGACA 1202
 ***** *

StpABC AATATATATTTTTTATGATTAAGAACATTAAGTATTTTTCTTAAAGAACACAAAAATCTTA 1315
 SppABC AATATATATTTTTTATGATTAAGAATATTAAGTATTTTTCTTAAAGAACACAAAAATCTTA 1262

StpABC AAAAAGAAAACATATAATATAGAACGGTAATCAAATGAGATCTTTTAAATAGGATAGCTA 1375
 SppABC AAAAAGAAAACATATAATATAGAACAGTAATCAAATGAGATCTTTTAAATAGGATAGCTA 1322

StpABC ATGTAGACAAATATATATTATTATGATTAAGATTCTTAAATATTTTTCTTAAAGAACACA 1435
 SppABC ATTTAGACAAATATATATTATTATGATTAAGATTCTTAAATATTTTTCTTAAAGAGCAC 1382
 ** ***** *

StpABC AAAGAACTTTAAAAAGAAAAATATAATATGGACCAAACATAGTCAAAAATTGAGATAT 1495
 SppABC AAAAAATTTAAAAAGTAAATATATAATATGGACCAAATATAGTCAAAAATTGAGATAT 1442
 *** ** *:***. ****:***** *****:*****

StpABC CCTTCCTTTAAAGCTAACCCCTACCCACCATGACCTATAAGAATTTAATATGTATTAT 1555
 SppABC CCTTCCTTTAAAGCTAACCCCTACCCACCCCTGACCTATAAGAATTTAATATGTATTAT 1502

StpABC GAACATTAATTAAAATTATATATCAAGATCATAAATGATCATAAATCTTGCTCTATATATA 1615
 SppABC GAGCATTAATTAAAATTATATATCAAGATCATAAAT-----CTTGGTCTCTATATA 1552
 ** .***** **** *.*****

StpABC TAGCAACACATCAAGAAACCAATCAATATCCCAACTCTTTTAATTTGCTTTTCTTGAAGA 1675
 SppABC TAGCAACACATCAAGAAACCAATCAATATCCCAACTCTTTTAATTTACTTTTCTTGAAGA 1612
 *****.*****

StpABC GAAATACAAAGAGTTATTTAATAGTTGTGGGGCTTTGGAAATTGTTTGTAGACAATCTAT 1735
 SppABC GAAATACAAAGAGTAATTTAATAGTTGTGGGGCTTTGGAAATTGTTTGTAGACAATCTAT 1672
 *****.*****

StpABC TGAGTCTCTTTTTCACACACAATTTGCTAACCTACTTCAATCTACTACATAAGTCTCAA 1795
 SppABC TGAGTCTCTTTTACACACACAATTTGCTAACCTACTTCAATCTACTACATAACTCTCAA 1732
 *****.*****

StpABC AAAAAAA---CTATATATCAATCACACTACCATAAATCCACAAAATTCATCTCATT 1851
 SppABC AAAAAAAAAAATATATATCAATCACACTACCATAAATCCACAAAATTCATCTCATT 1792
 ***** *****

StpABC TCTTGCCAATTGTTCTAATGTTTTCTCTATAAACATACACAAAACCTCGAATTATTATA 1911
 SppABC TCTTGCCAATTGTTCTAATGTTTTCTCTATAAACATACACAAAACCTCGAATTATTATA 1852

StpABC TAATTCGTCGTTTAAACCAACATCTCATCTCAGTACCAAAATTGAATATTTCAATCGAGT 1971
 SppABC TAATTCGTCATTTAAACCAACATCTCATCTCAGTACCAGAATTGAATATTTCAATCAAGT 1912
 *****.*****.*****.***

StpABC TCTTTCGATAAAAATCTTTTATACTGTCAGTGTG--ACAACGGATG 2015
 SppABC TCTTT-CGATAAAAATCTTTTATACTATCAGTGTGTGACAACGGATG 1957
 *****.***** *****

6.6 *in silico* Promotoranalyse

In Folgenden sind mögliche cis-regulatorische Elemente der *StpABC*-Region tabellarisch aufgelistet

Stimulus	TFBS	Name	Sequenz	PMID	Organismus
Promotor (spez.)	TATA-Box	TATABOX2	TATAAAT	14660650	<i>N. tabacum</i>
		TATABOX3	TATTAAT		<i>I. batatas</i>
		TATABOX4	TATATAA	14660650	<i>I. batatas</i>
		TATABOX5	TTATTT	7630938	<i>P. sativum</i>
		TATABOXOSPAL	TATTTAA	11971135	<i>O. sativa</i>
		TATAPVTRNALEU	TTTATATA	11690643	<i>Z. mays</i>
	CAAT-Box	CAATBOX1	CAAT	2710102	<i>P. sativum</i>
	GATA-Box	GATABOX	GATA	2535536	<i>A. thaliana</i>
	P-Box	300CORE	TGTAAAG	4059057	<i>N. tabacum</i>
		POLASIG1,2	AATWAA(A)	2370848	<i>A. thaliana</i>
		POLASIG3	AATAAT	3697078	<i>Z. mays</i>
		10PEHVPSBD	TATTCT	11587507	<i>H. vulgare</i>
		POLASIG2	AATTTAA	2370848	<i>O. sativa</i>
		RAV1AAT	CAACA	9862967	<i>A. thaliana</i>
		TAAAGSTKST1	TAAAG	11737782	<i>S. tuberosum</i>
		Dof3	AAAGAC	10074718	<i>Z. mays</i>
	Stress	G-Box	SGBF-1; SGBF-2;	TCCACGTGT	7670504
EmBP-1			ACACGTGG	7800488	<i>T. aestivum</i>
DPBF-1, DPBF-2			CACGTG	9225465	<i>D. carota</i>
GBF			TCCACGTGTC	7948916	<i>S. tuberosum</i>
CACGTGMOTIF			CACGTG	10380815	<i>N. tabacum</i>
G-Box			cACGTG	11352466	<i>C. roseus</i>
HMG-Box		HMG-1	CTTTACTT	9161031	<i>P. sativum</i>
		CGACGOSAMY3	CGACG	9484474	<i>O. sativa</i>
		Gamyb	GATAACCATC	10069063	<i>H. vulgare</i>
		MYBCORE	CNGTTR	2279697	<i>A. thaliana</i>
		MYBST1	GGATA	7957104	<i>S. tuberosum</i>
		MYCATERD1	CATGTG	12535340	<i>A. thaliana</i>
		ABRELATERD1	ACGTG	12535340	<i>A. thaliana</i>
		OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	14714869	<i>V. faba</i>
		DOFCOREZM	AAAG	10074718	<i>Z. mays</i>
		SPA	GTGTGAC	15284875	<i>T. aestivum</i>
		AtbZIP1	CCACGTGtCC	21938515	<i>A. thaliana</i>
		bZIP28	GACACGTG	20207753	<i>A. thaliana</i>
		HsfA2	TCTCTCAAGAAAAGC	20089772	<i>A. thaliana</i>
		OBP1, OBP2, OBP3	AAGG	10758484	<i>A. thaliana</i>

Stimulus	TFBS	Name	Sequenz	PMID	Organismus
Pathogen-Abwehr	G-Box	G/HBF-1	CACGTG	9049302	<i>P. vulgaris</i>
	W-Box	WRKY1, 2, 3	(T)(T)TGAC(C)	8896462	<i>P. crispum</i>
		WRKY4	GGTCA	12031488	<i>N. tabacum</i>
		WRKY18	TTGAC	11449049	<i>A. thaliana</i>
	Zf-Box	Zf-Box	TTGACT	14693376	<i>A. thaliana</i>
		PALBOXPPC	YTYMMCMAMCMMC	7597051	<i>P. crispum</i>
		ASF1MOTIFCAMV	TGACG	12953119	<i>N. tabacum</i>
		OBFS BS	TGACG	9011080	<i>A. thaliana</i>
Myc		cacacatgcc	21082893	<i>A. thaliana</i>	
Licht-Reaktion	I-Box	IBOX	GATAAG	2902624	<i>L. esculentum</i>
		IBOXCORE	GATAA	2651885	<i>P. patagonica</i>
	T-Box	TBOXATGAPB	ACTTTG	11442054	<i>A. thaliana</i>
	GT1-Box	GT1GMSCAM4	GAAAAA	15310827	<i>G. max</i>
		GT1MOTIFPSRBCS	KWGTGRWAAWRW	3243271	<i>P. sativum</i>
		GT1CONSENSUS	GRWAAW	8955086	<i>P. sativum</i>
	SORLREP4AT	SORLREP4AT	CTCCTAATT	14681527	<i>A. thaliana</i>
		CPRF-1, -2, -3, -4	ACGT	8757392	<i>P. crispum</i>
Verwund.	W-Box	WBOXNTERF3	TGACY	15509567	<i>N. tabacum</i>
		WBOXPCWRKY1	TTTGACY	10785665	<i>I. batatas</i> u.a.
		WBOXATNPR1	TTGAC	11449049	<i>A. thaliana</i>
		WBOXHVISO1	TGACT	12953112	<i>H. vulgare</i>
Repressor-Elemente	W-Box	WRKY71OS	TGAC	15047897	<i>O. sativa</i>
		ASF1	GGACaCGTGGa	17925233	<i>T. aestivum</i>
		SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	11701886	<i>S. tuberosum</i>
		SREATMSD	TTATCC	15908603	<i>A. thaliana</i>
		SURECOREATSULTR11	GAGAC	15842617	<i>A. thaliana</i>
Samen	P-Box	PBF	TGTAAAG	9207153	<i>Z. mays</i>
		ABI3	CATGCA	16463099	<i>B. napus</i>
		ABI5	TG	16361514	<i>A. thaliana</i>
		ATMYC BS	CACATG	9368419	<i>A. thaliana</i>
		DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	9225465	<i>D. carota</i>
		SGBFGMGMAUX28	TCCACGTGTC	7670504	<i>G. max</i>
		RYREPEATBNNAPA	CATGCA	10480393	<i>B. napus</i>
		MYBGAHV	TAACAAA	16905658	<i>H. vulgare</i>
Pollen		POLLEN1LELAT52	AGAAA	14976239	<i>L. esculentum</i>
		QELEMENTZMZM13	AGGTCA	9747811	<i>Z. mays</i>
Entwicklung	G-Box	NtbZIP	CCACGTGTC	19270069	<i>N. tabacum</i>
	CarG-Box	CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG	16616581	<i>A. thaliana</i>
		Alfin1	GTGGGGG	10750899	<i>M. sativa</i>
		ARF1	TGTCAC	10318972	<i>P. sativum</i>
		PEND	AATACTTATT	9596643	<i>P. sativum</i>

7. Literaturverzeichnis

- [1] U. Fischer, „Funktionelle Analyse von ERF-Transkriptionsfaktoren aus und *A. thaliana* im Rahmen der Pathogenresistenz, Göttingen: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen, 2003.
- [2] S. Pavan, E. Jacobsen, R. Visser und Y. Bai, „Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance,“ *Mol Breed*, Bd. 25, Nr. 1, p. 1–12, 2010.
- [3] J. D. J. Jones, „The plant immune system,“ Bd. 444, Nr. 16, pp. 323-329, 2006.
- [4] J. Ebel und A. Mithöfer, „Early events in the elicitation of plant defence,“ *Planta*, Nr. 206, pp. 335-348, 1998.
- [5] D. Kosik-Bogacka, A. Wojtkowiak-Giera, A. Kolasa, D. Czernomysz-Furowicz, N. Lanocha, E. Wandurska-Nowak, R. Salamatin und P. Jagodzinski, „Hymenolepis diminuta: Analysis of the expression of Toll-like receptor genes (TLR2 and TLR4) in the small and large intestines of rats. Part II,“ *Exp Parasitol.*, Bd. 135, Nr. 2, pp. 437 - 445, 2013.
- [6] D. Chinchilla, Z. Bauer, M. Regenass, T. Boller und G. Felix, „The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception,“ *The Plant Cell*, Bd. 18, pp. 465 - 470, 2006.
- [7] G. Fellbrich, A. Romanski, A. Varet, B. Blume, F. Brunner, S. Engelhardt, G. Felix, B. Kemmerling, M. Krzymowska und T. Nürnberger, „NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis,“ *Plant Journal*, Bd. 32, Nr. 3, pp. 375 - 390, 2002.
- [8] J. Zhang, F. Shao, Y. Li, H. Cui, L. Chen, H. Li, Y. Zou, C. Long, L. Lan, J. Chai, S. Chen, X. Tang und J. Zhou, „A Pseudomonas syringae effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants,“ *Cell Host Microbe*, Bd. 1, Nr. 3, pp. 175-185, 2007.
- [9] L. Shan, P. He, J. Li, A. Heese, S. Peck, T. Nürnberger, G. Martin und J. Sheen, „Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity,“ *Cell Host & Microbe*, Bd. 4, Nr. 1, pp. 17 - 27, 2008.
- [10] C. Zipfel und S. Robatzek, „Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi...?,“ *Plant Physiology October*, Bd. 154, Nr. 2, pp. 551 -554, 2010.
- [11] F. Takken, M. Albrecht und W. Tameling, „Resistance proteins: molecular switches of plant defence,“ *Curr Opin Plant Biol.*, Bd. 9, Nr. 4, pp. 383 - 390, 2006.
- [12] D. Scheel und T. Nürnberger, „Signal transmission in the plant immune response,“ *Trends in plant science*, Bd. 6, Nr. 8, p. 372–379, 2001.
- [13] B. Blume, T. Nürnberger, N. Nass und D. Scheel, „Receptor-Mediated Increase in Cytoplasmic Free Calcium Required for Activation of Pathogen Defense in Parsley,“ *Plant Cell. August*, Bd. 12, Nr. 8, p. 1425–1440, 2000.
- [14] B. Wang, X. Yang, H. Zeng, H. Liu, T. Zhou, B. Tan, J. Yuan, L. Guo und D. Qiu, „The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco,“ *Appl Microbiol Biotechnol*, Nr. 93, p. 191–201, 2012.
- [15] D. Scheel, „Resistance response physiology and signal transduction,“ *Current Opinion in Plant Biology*, Nr. 1, pp. 305 - 310, 1998.
- [16] A. Bent, „Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 98, Nr. 3, p. 784–786, 2001.
- [17] D. Kim und e. al., „Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses,“ 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.023>. [Zugriff am 09 09 2013].

- [18] J. Graça und S. Santos, „Suberin: A Biopolyester of Plants' Skin,“ *Macromol Biosci.*, Bd. 7, Nr. 2, pp. 128 - 135, 2007.
- [19] W. Durrant und X. Dong, „Systemic acquired resistance,“ *Annu Rev Phytopathol.*, Nr. 42, pp. 185-209, 2004.
- [20] V. Halim, L. Eschen-Lippold, S. Altmann, M. Birschwilks, D. Scheel und S. Rosahl, „Salicylic Acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*,“ *APS Journals*, Bd. 20, Nr. 11, pp. 1346-1352, 2007.
- [21] M. Nowicki, M. R. Foolad, M. Nowakowska und E. U. Kozik, „Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding,“ *Plant Disease*, Bd. 96, Nr. 1, pp. 4-17, 2012.
- [22] B. J. Haas und S. e. a. Kamoun, „Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*,“ *Nature*, Bd. 461, Nr. 17, pp. 393-398, 2009.
- [23] N. D. J. T. S. W. R. H. K. S. D. Nürnberger T., „High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses.,“ *Cell*, Nr. 78, pp. 449-460, 1994.
- [24] F. Brunner, S. Rosahl, J. Lee, J. Rudd, C. Geiler, S. Kauppinen, G. Rasmussen, D. Scheel und T. Nürnberger, „Pep-13, a plant defense-inducing pathogen associated pattern from *Phytophthora transglutaminases*,“ *The EMBO Journal*, Bd. 21, Nr. 24, pp. 6681-6688, 2002.
- [25] V. Halim, A. Hunger, V. Macioszek, P. Landgraf, T. Nürnberger, D. Scheel und S. Rosahl, „The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato.,“ *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Nr. 64, pp. 311 - 318, 2004.
- [26] V. A. Halim, S. Altmann, D. Ellinger, L. Eschen-Lippold, O. Miersch, D. Scheel und I. S. Rosahl, „PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid,“ *Plant Journal*, Bd. 57, Nr. 2, pp. 230 - 242, 2009.
- [27] S. Altmann, Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenaseabgeleiteten abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L., Halle-Wittenberg: Martin-Luther Universität, 2009.
- [28] B. Kloosterman, D. Koeyer, R. Griffiths, B. Flinn, B. Steuernagel, U. Scholz, S. Sonnewald, U. Sonnewald, G. Bryan, S. Prat, Z. Bánfalvi, J. Hammond, P. Geigenberger, K. Nielsen und R. & B. C. Visser, „Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCL array,“ *Functional & Integrative Genomics*, Bd. 8, Nr. 4, pp. 329 - 340, 2008.
- [29] K. Kang, J. Park, H. Choi, B. Burla, T. Kretschmar, Y. Lee und E. Martinoia, „Plant ABC Transporters,“ *American Society of Plant Biologists*, Bd. doi: 10.1199/tab.0153, pp. 1 - 25, 2011.
- [30] M. Kaneda, M. Schuetz, B. Lin, C. Chanis, B. Hamberger, T. Western, J. Ehling und A. Samuels, „ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport,“ *J Exp Bot.*, Bd. 62, Nr. 6, pp. 2063 - 2077, 2011.
- [31] P. Tarr, E. Tarling, D. Bojanic, P. Edwards und A. Baldán, „Emerging new paradigms for ABCG transporters.,“ *Biochim Biophys Acta.*, Bd. 1791, Nr. 7, pp. 584 - 593, 2009.
- [32] B. Kang, X. Ye, L. Osburn und C. J. C. Z. Stewart, „Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP-binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics.,“ *Plant Cell Rep.*, Nr. 29, p. 643 – 650, 2010.
- [33] T. Kuromori, T. Miyaji, H. Yabuuchi, H. Shimizu, E. Sugimoto, A. Kamiya, Y. Moriyama und K. Shinozaki, „ABC transporter *AtABCG25* is involved in abscisic acid transport and responses.,“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Bd. 107, Nr. 5, pp. 2361 - 2366, 2010.
- [34] J. Crouzet, J. Roland, E. Peeters, T. Trombik, E. Ducos, J. Nader und M. Boutry, „*NtPDR1*, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport.,“ *Plant Mol Biol.*, Bd. 82, Nr. 1-2, pp. 181 - 192, 2013.
- [35] V. Vedel und I. Scotti, „Promoting the promoter,“ *Plant Science*, Bd. 180, Nr. 2, p. 182 – 189,

- 2011.
- [36] T. Sauer, Dissertation: Evaluierung des polygenetischen Footprintings und dessen Anwendung zur verbesserten Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen., Göttingen, 2006.
- [37] V. Vedel und I. Scotti, „Promoting the promoter,“ *Plant Science*, Bd. 180, Nr. 2, pp. 182 - 189, 2011.
- [38] H. Priest, S. Filichkin und T. Mockler, „Cis-regulatory elements in plant cell signaling,“ *Curr Opin Plant Biol.*, Bd. 12, Nr. 05, pp. 643 - 649, 2009 .
- [39] S. Altmann, Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenaseabgeleiteten abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L., Halle-Wittenberg: Martin-Luther Universität , 2009.
- [40] S. F. Murashige T., „A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures,“ *Physiologia Plantarum*, Bd. 15, Nr. 3, p. 473–497, 1962.
- [41] S. N. Chomczynski P., „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,“ *Analytical Biochemistry* , Bd. 162, Nr. 1, pp. 156-159, 1987 .
- [42] P. & S. N. Chomczynski, „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on,“ *Nature Protocols*, Nr. 1, p. 581–585, 2006.
- [43] H. C. Birnboim und D. J., „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,“ *Nucleic Acids Research*, Bd. 7, Nr. 6, pp. 1513 -1524, 1979.
- [44] M. K. und e. al., „Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction,“ *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Bd. 51, Nr. 1, pp. 263 - 273, 1986.
- [45] R. Hehl und E. Wingender, „Database-assisted promoter analysis,“ *Trends in Plant Science* , Bd. 6, Nr. 6, p. 251 – 255, 2001.
- [46] V. Nain, S. Sahi und P. Kumar, „In Silico Identification of Regulatory Elements in Promoters,“ in *Computational Biology and Applied Bioinformatics*, Prof. Heitor Lopes (Ed.), In tech, 2011.
- [47] K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto und T. Korenaga, „Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999,“ *Nucleic Acids Res.* , Bd. 27, Nr. 1, p. 297 – 300, 1999.
- [48] E. Portales-Casamar, S. Thongjuea, A. Kwon, D. Arenillas, X. Zhao, E. Valen, D. Yusuf, B. Lenhard, W. W. und A. Sandelin, „JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles,“ *Nucleic Acids Res.*, Nr. 38, p. D105–D110, 2010.
- [49] Y. Fu und Z. Weng, „Improvement of TRANSFAC matrices using multiple local alignment of transcription factor binding site sequences,“ *Genome Inform.*, Bd. 16, Nr. 1, pp. 68 - 72, 2005.
- [50] S. J. H. U. W. Z. Frith MC, „Statistical significance of clusters of motifs represented by position specific scoring matrices in nucleotide sequences,“ *Nucleic Acids Res* , Bd. 30, Nr. 14, pp. 3214 - 3224, 2002 .
- [51] M. Frith, U. Hansen und Z. Weng, „Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA,“ *Bioinformatics*, Bd. 17, Nr. 10, pp. 878 - 890, 2001.
- [52] K. Shahmuradov, N. Kolchanov, V. Solovyev und V. Ratner, „Enhancer-like structures in middle repetitive sequences of the eukaryotic genomes,“ *Genetics (Russ)*, Nr. 22, pp. 357-368, 1986.
- [53] I. Shahmuradov, A. Gammerman, J. Hancock und B. P.M., „PlantProm: a database of plant promoter sequences,“ *Nucleic Acids Research*, Bd. 31, Nr. 1, p. 114–117, 2003.
- [54] T. Nakagawa, T. Suzuki, S. Murata, S. Nakamura, T. Hino, K. Maeo, R. Tabata, T. Kawai, K. Tanaka, Y. Niwa, Y. Watanabe, K. Nakamura, T. Kimura und S. Ishiguro, „Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants,“ *Biosci Biotechnol Biochem.*, Bd. 71, Nr. 8, pp. 2095 - 2100, 2007 .
- [55] H. Inoue, N. Hiroshi und O. Hiroto, „High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids,“ *Gene*, Nr. 96, pp. 23 - 28, 1990.
- [56] R. Höfgen und W. L., „Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation,“ *Nucleic*

- Acids Research*, Bd. 16, Nr. 20, p. 9877, 1988.
- [57] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh und M. W. Bevan, „GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.“ *The EMBO Journal*, Bd. 6, Nr. 13, pp. 3901 - 3907, 1987.
- [58] B. Blume und G. D., „Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana glauca* regulated by developmental and environmental stimuli.“ *The Plant Journal*, Bd. 12, Nr. 4, pp. 731 - 746, 1997.
- [59] J. Sheen und e. al., „Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells.“ *The Plant Journal*, Bd. 8, Nr. 5, p. 777 – 784, 1995.
- [60] K. Singh, R. Foley und L. Oñate-Sánchez, „Transcription factors in plant defense and stress responses.“ *Curr Opin Plant Biol.* , Bd. 5, Nr. 5, pp. 430 - 436, 2002 .
- [61] A. Verk, C. Gatz und H. Linthorst, „Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses.“ *Adv. Bot. Res.*, Nr. 51, pp. 397 - 438, 2009.
- [62] S. Yamamoto, T. Nakano, K. Suzuki und H. Shinshi, „Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, Nr. 1679, p. 279– 287, 2004.
- [63] P. Rushton, J. Torres, M. Parniske, P. Wernert, K. Hahlbrock und I. Somssich, „Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes.“ *EMBO J.*, Bd. 15, Nr. 20, pp. 5690 - 5700, 1996.
- [64] T. Eulgem und I. Somssich, „Networks of WRKY transcription factors in defense signaling.“ *Eulgem T, Somssich IE.*, Bd. 10, Nr. 4, pp. 366 - 371, 2007.
- [65] I. Zimmermann, Systematische Untersuchungen von Proteininteraktionen der MYB und bHLH Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*, Universität Köln: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 2003.
- [66] M. Alon, M. Elbaz, M. Ben-Zvi, E. Feldmesser, A. Vainstein und S. Morin, „Insights into the transcriptomics of polyphagy: *Bemisia tabaci* adaptability to phenylpropanoids involves coordinated expression of defense and metabolic genes.“ *Insect Biochem Mol Biol.* , Bd. 42, Nr. 41, pp. 251 - 263, 2012.
- [67] K. Ranathunge, L. Schreiber und R. Franke, „Suberin research in the genomics era--new interest for an old polymer.“ *Plant Science*, Bd. 180, Nr. 3, pp. 399 - 413, 2011 .
- [68] M. Venter, „Synthetic promoters: genetic control through cis engineering.“ *Trends in Plant Science*, Bd. 12, Nr. 3, p. 118 – 124, 2007.
- [69] T. Whitfield, J. Wang, P. Collins, E. Partridge, S. Aldred, N. Trinklein, R. Myers und Z. Weng, „Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters.“ *Genome Biol.*, Bd. 13, Nr. 9, pp. 1-16, 2012.
- [70] K. Yamaguchi-Shinozaki und K. Shinozaki, „Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters.“ *Trends in Plant Science*, Bd. 10, Nr. 2, pp. 88 - 94, 2005.
- [71] L. Hellman und M. Fried, „Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions.“ *Nat Protoc.*, Bd. 2, Nr. 8, pp. 1849 -1861, 2007.
- [72] X. Zhou, R. Carranco, S. Vitha und T. Hall, „The dark side of green fluorescent protein.“ *New Phytol.*, Bd. 168, Nr. 2, pp. 313 - 322, 2005 .
- [73] L. Donaldson und K. Radotic, „Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood.“ *J Microsc.*, Bd. 251, Nr. 2, pp. 178 - 187, 2013.
- [74] Y. Fang und D. Spector, „Live-Cell Imaging of GFP in Plants.“ *Cold Spring Harb Protoc*; , p. doi: 10.1101/pdb.top68, 2010.
- [75] P. Boher, O. Serra, M. Soler, M. Molinas und M. Figueras, „The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by

- abscisic and salicylic acids.," *J Exp Bot.* , Bd. 64, Nr. 11, pp. 3225-3236, 2013.
- [76] J. Neubauer, E. Lulai, A. Thompson, J. Suttle und M. Bolton, „Wounding coordinately induces cell wall protein, cell cycle and pectin methyl esterase genes involved in tuber closing layer and wound periderm development.," *J Plant Physiol.* , Bd. 169, Nr. 6, pp. 586 - 595, 2012 .
- [77] O. Serra, C. Hohn, R. Franke, S. Prat, M. Molinas und M. Figueras, „A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm.," *Plant Journal*, Bd. 62, Nr. 2, pp. 277 - 290, 2010.
- [78] O. Serra, M. Figueras, R. Franke, S. Prat und M. Molinas, „Unraveling ferulate role in suberin and periderm biology by reverse genetics," *Plant Signal Behav.*, Bd. 5, Nr. 8, p. 953 – 958 , 2010 .
- [79] R. S. L. Franke, „Suberin — a biopolyester forming apoplastic plant interfaces," *Curr Opin Plant Biol.*, Bd. 10, Nr. 3, pp. 252 - 259, 2007 .
- [80] D. Panikashvili, J. Shi, S. Bocobza, R. Franke, L. Schreiber und A. Aharoni, „The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots.," *Mol Plant.*, Bd. 3, Nr. 3, pp. 563 - 575, 2010.
- [81] L. Schreiber, „Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes.," *Trends Plant Sci.*, Bd. 15, Nr. 10, pp. 530 - 546, 2010.
- [82] I. Baxter, P. Hosmani, A. Rus, B. Lahner, J. Borevitz, B. Muthukumar, M. Mickelbart, L. Schreiber, R. Franke und D. Salt, „Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in Arabidopsis," *PLoS Genet.*, Bd. 5, Nr. 5, pp. 1 -12, 2009 .
- [83] J. Reader, „The fungus that conquered Europe.," *The New York Times, London.*, 2008.
- [84] M. Nowicki, M. Foolad, M. Nowakowska und E. Kozik, „Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding.," *Plant Disease*, Bd. 96, Nr. 1, pp. 4 - 17, 2012.
- [85] L. Colon, „Resistance to potato late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) in *Solanum nigrum*, *S. villosum* and their sexual hybrids with *S. tuberosum* and *S. demissum*;" *Euphytica*, Nr. 66, pp. 55 - 64, 1992.
- [86] B. e. a. Haas, „Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*," *Nature* , Nr. 461 , pp. 393 - 398, 2009.
- [87] M. Mejia-Guerra, M. Pomeranz, M. Morohashib und E. Grotewolda, „From plant gene regulatory grids to network dynamics," *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 1819, Nr. 5, p. 454 – 465, 2012.
- [88] J. Comstock und e. al., „Climate change and potato late blight suppression. [Abstract]," *Phytopathology*, Nr. 100, p. 26, 2010.
- [89] T. Nürnberger, F. Brunner, B. Kemmerling und L. Piater, „Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences," *Immunological Reviews*, Nr. 198, p. 249–266, 2004.
- [90] G. Armijo, P. Salinas, M. Monteoliva, C. García, A. Seguel, E. Villarroel-Candia, W. Song, A. van der Krol, M. Alvarez und L. Holuigue, „A Salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1.[Abstract]," *Mol Plant Microbe Interact.* , 2013 Sep 5..
- [91] D. Marino, C. Dunand, A. Puppo und N. Pauly, „A burst of plant NADPH oxidases," *Trends Plant Sci*, Nr. 17, pp. 9 - 15, 2012.
- [92] C. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes und S. Van Wees, „Hormonal modulation of plant immunity. [Abstract]," *Annu Rev Cell Dev Biol.*, Nr. 28, pp. 489 - 521, 2012.
- [93] S. Franz, „Dissertation. Charakterisierung der CDPKs CPK21 & CPK23 aus *Arabidopsis thaliana*," Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin, Berlin, 2008.
- [94] F. Jupe, K. Witek, W. Verweij, J. Sliwka, L. Pritchard, G. Etherington, D. Maclean, P. Cock, R. Leggett, G. Bryan, L. Milne, I. Hein und J. Jones, „Resistance gene enrichment sequencing

- (RenSeq) enables re-annotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. [Abstract],“ *Plant Journal*, p. doi: 10.1111/tpj.12307, 2013, 13. August.
- [95] G. Sánchez, N. Gerhardt, F. Siciliano, A. Vojnov, I. Malcuit und M. Marano, „Salicylic acid is involved in the Nb-mediated defense responses to Potato virus X in *Solanum tuberosum*.“, *Mol Plant Microbe Interact*, Bd. 23, Nr. 4, pp. 394-405, 2010 .
- [96] D. Yu, Y. Liu, B. Fan, D. Klessig und Z. Chen, „Is the High Basal Level of Salicylic Acid Important for Disease Resistance in Potato?“, *Plant Physiol*, Bd. 115, Nr. 2, pp. 343-349, 1997 .
- [97] J. Turner, C. Ellis und A. Devoto, „The Jasmonate Signal Pathway“, *The Plant Cell*, Bd. 14, Nr. 1, pp. 153-164, 2002 .
- [98] J. Yan, H. Li, S. Li, R. Yao, H. Deng, Q. Xie und D. Xie, „The Arabidopsis F-Box Protein CORONATINE INSENSITIVE1 Is Stabilized by SCFCOI1 and Degraded via the 26S Proteasome Pathway [Abstract]“, *The Plant Cell*, Bd. 25, Nr. 2, pp. 486-498 , 2013 .
- [99] A. Devoto, M. Nieto-Rostro, D. Xie, C. Ellis, R. Harmston, E. Patrick, J. Davis, L. Sherratt, M. Coleman und J. Turner, „COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis.“ *Plant Journal*, Bd. 32, Nr. 4, pp. 457 - 466, 2002.

8. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und in keinerlei Fassung als Prüfungsvorleistung anderer Studiengänge vorgelegt habe. Des Weiteren habe ich keine anderen, als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich aus anderen Arbeiten entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle/Saale, den 30.09. 2013

Ort

Datum

Unterschrift des Verfassers