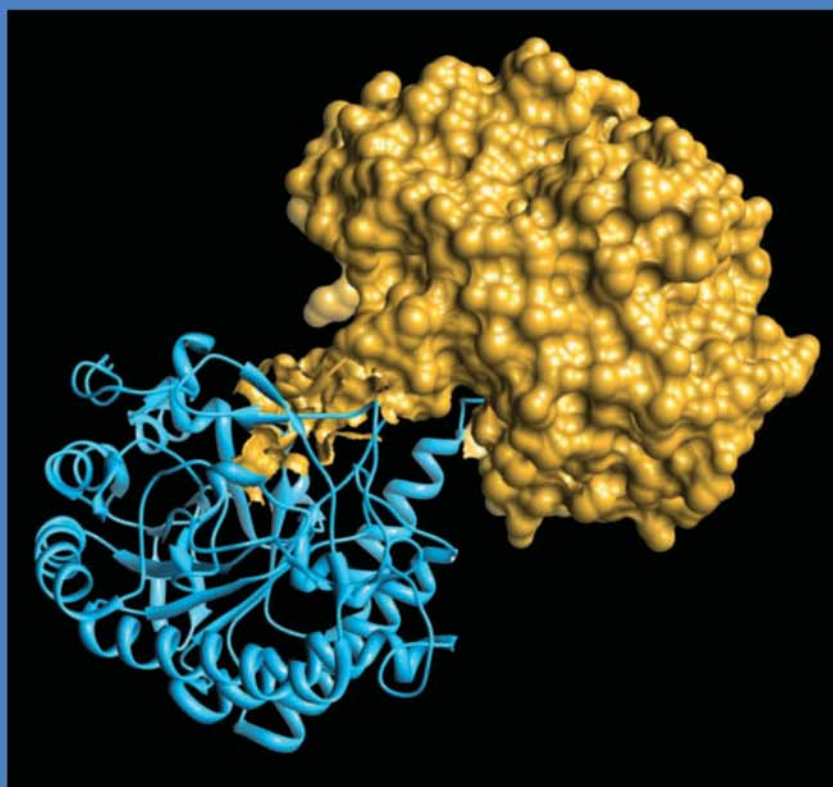
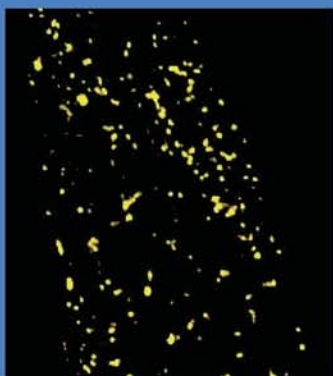
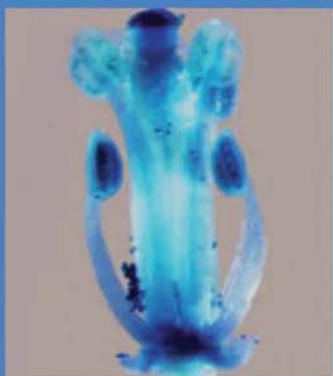


Nadja Sperling

Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch reversible Dimerisierung der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3)

A. Schaller (Herausgeber) - Band 1





Schriftenreihe zur Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen

Herausgeber: Prof. Dr. A. Schaller

Band 1/2012

Nadja Sperling

Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch reversible Dimerisierung der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3)

D 100 (Diss. Universität Hohenheim)





Nadja Sperling

Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch reversible Dimerisierung der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen

vorgelegt von
Nadja Sperling

aus Ludwigsburg
2012

Cuvillier Verlag Göttingen



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2012

Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss., 2012

978-3-95404-162-6

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Andreas Schaller
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Dr. Bettina Hause
Eingereicht am:	06.07.2012
Mündliche Prüfung am:	28.09.2012

Die vorliegende Arbeit wurde am 04.09.2012 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2012

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-162-6



Für Jürgen





Inhaltsverzeichnis

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS vii

II. ZUSAMMENFASSUNG xi

III. SUMMARY xii

1 EINLEITUNG 1

1.1 Abwehrmechanismen der Pflanzen 1

1.2 Bedeutung und Wirkung der Jasmonate 1

1.3 Jasmonat-Biosynthese 3

1.4 JA-Metabolite und Signaltransduktion 5

1.5 Regulation der Blütenentwicklung in *A. thaliana* und Bedeutung der *opr3* (*oxophytodiensäurereduktase 3*)-Mutante 6

1.6 Wie erfolgt die Regulation der Jasmonat-Biosynthese? 8

1.7 OPR3 als Kontrollpunkt der Jasmonat-Synthese in der Wundantwort 10

1.8 Proteinkinasen und deren Rolle bei der Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen 13

1.9 Proteinimport peroxisomaler Matrixproteine 15

1.10 Organ- und gewebespezifische Lokalisation der JA-Biosynthesenzyme und der Jasmonsäure 16

1.11 Zielsetzung der Arbeit 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 Material 19

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien 19

2.1.2 Antikörper 19

2.1.3 Enzyme 19

2.1.4 Oligonukleotide 19

2.1.5 Plasmide 22

2.2 Organismen 24

2.2.1 *Escherichia coli* 24

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* 25

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* 25

2.2.4 *Arabidopsis thaliana* 25

2.3 Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* 26

2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae* 27

2.5 Anzucht und Kreuzung von *A. thaliana* 29



INHALTSVERZEICHNIS

2.5.1	Anzucht der Pflanzen in Gewächshaus und Anzuchtraum	29
2.5.2	Anzucht der Pflanzen auf Agarplatten.....	29
2.5.3	Kreuzung der Pflanzen.....	29
2.6	Molekularbiologische Methoden	29
2.6.1	Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	29
2.6.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	30
2.6.2.1	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i>	30
2.6.2.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	30
2.6.3	Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels „Floral Dip“	31
2.6.4	DNA-Extraktion	32
2.6.4.1	Plasmidisolierung (Minipräparation) aus <i>E. coli</i>	32
2.6.4.2	Extraktion genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	33
2.6.5	RNA-Extraktion aus <i>A. thaliana</i>	33
2.6.6	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion	34
2.6.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	35
2.6.7.1	Standard-PCR.....	35
2.6.7.2	Kolonie-PCR	36
2.6.7.3	Mutagenese-PCR.....	36
2.6.8	Agarosegelelektrophorese	37
2.6.9	DNA-Klonierung	38
2.6.9.1	DNA-Elution aus einem Agarosegel	38
2.6.9.2	Restriktionsverdau der DNA.....	38
2.6.9.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	38
2.6.9.4	Ligation	39
2.6.9.5	TOPO-Ligation.....	39
2.6.9.6	Klonierungsvorgehen bei in der Arbeit erstellten DNA-Konstrukten.....	40
2.6.10	DNA-Sequenzierung.....	46
2.7	Transiente Expression von Fusionsproteinen in Zwiebelepidermiszellen nach Beschuss mit Goldpartikeln.....	47
2.8	Propidiumjodid-Färbung	48
2.9	Histochemischer GUS-Test	48
2.10	Untersuchung von Pflanzengewebe am Stereomikroskop	48
2.11	Proteinanalytische Methoden.....	48
2.11.1	Antikörper-Aufreinigung aus Serum	48



2.11.2	Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i>	49
2.11.3	Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	50
2.11.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	50
2.11.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	50
2.11.6	Ponceau-Färbung	51
2.11.7	Western-Blot und Immunodetektion	51
2.11.8	Quantifizierung der Signalintensität immunodetektierter Banden	52
2.12	Mikroarray Analyse.....	52
2.12.1	RNA-Isolierung	52
2.12.2	Fluoreszenzmarkierung der Proben	52
2.12.3	Rehydrierung, Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays	53
2.12.4	Scannen und Auswerten der Microarrays	54
2.13	Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	54
2.13.1	Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-System und Hefe-Drei-Hybrid (H3H)-System.....	54
2.13.2	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)/split-YFP	55
2.13.3	Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	61
2.14	Statistische Analysen.....	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	63
3.1.1	OPR3-YFP-Fusionskonstrukte für die BiFC.....	63
3.1.2	Interaktionsverhalten der OPR3 und verschiedener OPR3-Mutanten in Zwiebelepidermiszellen	65
3.1.3	Interaktionsverhalten der OPR3 und verschiedener OPR3-Mutanten in unterschiedlichen Geweben von <i>A. thaliana</i>	68
3.1.4	Dimerisierungszustand der OPR3 während der Blütenentwicklung von <i>A. thaliana</i>	75
3.2	Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 mit Hilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).....	81
3.2.1	Fusionskonstrukte und Erstellung transgener Pflanzen für die FRET-Analysen	81
3.2.2	Untersuchung des Interaktionsverhalten der OPR3 und der OPR3-Mutanten mittels FRET-Analyse in <i>A. thaliana</i>	82
3.2.3	Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 in <i>A. thaliana</i> nach Verwundung	85



3.3	„Huckepack“-Experiment zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der OPR3-Phosphorylierung	92
3.3.1	Das Prinzip des „Huckepack“-Experimentes	92
3.3.2	Das „Huckepack“-Experiment in Zwiebelepidermiszellen	93
3.3.3	Das „Huckepack“-Experiment in <i>A. thaliana</i>	96
3.3.4	Untersuchung des Dimerisierungspotentials von OPR3 Δ SRL mittels BiFC in Zwiebelepidermiszellen.....	101
3.4	Untersuchung zweier potentieller Proteinkinasen für die Phosphorylierung von OPR3	103
3.4.1	Auswahlkriterien für die potentiellen OPR3-Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950	103
3.4.2	Subzelluläre Lokalisation der Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 in Zwiebelepidermiszellen.....	104
3.4.3	Analyse der „loss-of-function“-Mutanten der Gene <i>At3g08720</i> bzw. <i>At4g18950</i> und Untersuchung von deren Einfluss auf die JA-Synthese	105
3.4.4	Mikroarray Expressionsanalyse in Blättern der „loss-of-function“-Mutante der Kinase At4g18950 im Vergleich zum Wildtyp.....	110
3.5	Untersuchung der OPR3-Dimerisierung mittels Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-System und Hefe-Drei-Hybrid (H3H)-System.....	115
3.5.1	Erstellung der Fusionskonstrukte für die H2H-Analyse	115
3.5.2	Analyse der Proteinexpression in transformierten Hefezellen	115
3.5.3	OPR3-Interaktionsverhalten im H2H-System.....	117
3.5.4	Untersuchung des Einflusses der Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 auf die OPR3-Dimerisierung mit Hilfe des H3H-Systems	117
4	DISKUSSION.....	119
4.1	Dimerisierungsverhalten der OPR3 <i>in vivo</i>	120
4.1.1	Dynamik der OPR3-Interaktion	122
4.1.2	Rolle der gewebespezifischen Lokalisation der OPR3	124
4.2	Regulation der OPR3-Dimerisierung durch posttranslationale Protein-Modifizierung	126
4.2.1	OPR3-Dimerisierung durch eine Proteinkinase vermittelte Phosphorylierung	126
4.2.2	Subzelluläre Lokalisation einer potentiellen OPR3-regulierenden Proteinkinase	129
4.2.3	Ausschlusskriterien für die untersuchten Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 von der Kandidatenliste OPR3-regulierender Kinasen	131



INHALTSVERZEICHNIS

4.3	Alternative Modifikationen und Mechanismen zur Regulation der OPR3-Interaktion	132
4.4	Ausblick.....	134
4.5	Regulation des Jasmonat-Signalweges durch verschiedene Ebenen der Kontrolle .	135
5	LITERATURVERZEICHNIS	137
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	151
7	TABELLENVERZEICHNIS	153
A	ANHANG	155
B	LEBENS LAUF.....	169
C	ERKLÄRUNG	171
D	DANKSAGUNG	173





I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

12,13-EOT	12,13(<i>S</i>)-Epoxy-Octadecatriensäure
13-HPOT	13-Hydroperoxylinolensäure
Abb.	Abbildung
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
ACH	Acyl-Thioesterase
ACX	Acyl-CoA-Oxidase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AG	Agamous
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
APS	Ammonium
ARF	ADP-Ribosylation Factor
AS	Aminosäuren
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bar	bialaphos resistance
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BIWe	Blau-Weiß-Selektion
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cortex
cam	Chloramphenicol
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CAP	Chloramphenicol
CCCP	Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre DNA
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CoA	Coenzym A
COI1	Coronat-in-sensitiv 1
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
CTS1	COMATOSE 1
Cy	Cyanin
DAD1	Defective in Anther Dehiscence 1
Dam	DNA Adenin Methylase
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEX	DNA-Extraktionspuffer
DMEY	Doppelmutante OPR3 ^{E292K; Y365F}
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease



dnOPDA	dinor OPDA
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
dsPTK	dualspezifische PTK
DTT	1,4-Dithiothreitol
E292K	OPR3 _{E292K}
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL3	Enhancer of Glabra 3
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EIL1	Ethylene-Insensitive-Like 1
EIN3	Ethylene-Insensitive 3
<i>eq</i>	<i>Entacmaea quadricolor</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GAL	Galactose
gDNA	genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein
GL3	Glabra3
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
Gm	Gentamycin
GO	Gene Ontology
GUS	β-Glucuronidase
H2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System
H3H	Hefe-Drei-Hybrid-System
ho	homozygot
HRP	Horseradish Peroxidase
he	hemizygot
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	JA-Isoleucin
JAME	Jasmonsäuremethylester
JAR1	JA-Aminoacyl Synthetase 1
JAZ	Jasmonat ZIM-Domäne
Kan	Kanamycin
KAT	Ketoacyl-CoA-Thiolase
KAT2	2-Ketoacyl-CoA-Thiolase 2
kb	Kilobase
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LOX	Lipoxygenase
LUC	Luciferase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase



MCS	Multiple Cloning Site
med	Median
MeJA	Methyljasmonsäure
MFP	Multifunctional Protein
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Murashige-Skoog
MYB	Myb Domain Protein
NaAc	Natriumacetat
NLS	Nuclear Localization Signal
NPR1	Nonexpresser of PR gene
OBP	OBF Binding Protein
ocs	Oktopin-Synthase
OGT	O-GlcNAc Transferase
OPC-6:0	3-Oxo-2-(2'-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Hexansäure
OPC-8:0	3-Oxo-2-(2'-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Oktansäure
OPCL1	OPC-8:CoA Ligase 1
OPDA	Oxophytodiensäure
OPR	Oxophytodiensäurereduktase
ORF	offenes Leseraster
OYE	Old Yellow Enzyme
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDF	Plant Defensin
PEX	Peroxin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGK	Phosphoglyceratkinase
PTK	Tyr-phosphorylierende Proteinkinase
PTS	Peroxisomal Targeting Signal
RFP	Red Fluorescent Protein
Rif	Rifampicin
RING	Really Interesting New Gene
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
s. o.	siehe oben
SA	Salicylsäure
SCF	Skp/Cullin/Fbox
SD	Synthetic Defined
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SNK	Student-Newman-Keuls
SNR	Signal-to-noise Ratio
Spec	Spectinomycin



SSC	Saline Sodium Citrat
T	Terminator
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris Borate Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCP	TCP Family Transcription Factor
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPL	Topless
TPR	TPL-Related Protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TT8	Transparent Testa 8
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Ub	Ubiquitin
ÜN	über Nacht
unv.	unverwundet
UV	ultraviolett
verw.	verwundet
Vis	Visible
VSP	Vegetative Storage Protein
<i>Ws</i>	<i>Wassilewskija</i>
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure
Y365F	OPR3 _{Y365F}
YFP	Yellow Fluorescent Protein
YFP _C	C-terminale Hälfte des YFP
YFP _N	N-terminale Hälfte des YFP
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPDA	Yeast Peptone Dextrose Adenine
ZEN	Zeiss Enhanced Navigation
ZZ	Zentralzylinder



II. ZUSAMMENFASSUNG

Jasmonsäure (JA) ist ein Phytohormon, welches sowohl bei der Regulation abiotischer und biotischer Stressantworten, als auch bei verschiedenen Entwicklungsprozessen der Pflanzen eine wichtige Rolle einnimmt. Die Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3) ist maßgeblich an der Biosynthese der JA beteiligt und katalysiert dabei einen entscheidenden Schritt in den Peroxisomen: die Umsetzung des JA-Vorläufers 12-Oxophytodiensäure (OPDA) zu OPC-8:0. Nach Verwundung oder Herbivorie akkumulieren innerhalb weniger Minuten JA und ihre bioaktive Form JA-Ile. Diese schnelle und transiente Zunahme könnte durch posttranslationale Aktivierung der JA-Biosyntheseenzyme erklärt werden. Die Beobachtung, dass OPR3 als sich selbst-inhibierendes Dimer kristallisiert, führte zu der Hypothese, dass der rasche JA-Anstieg durch reversible Dimerisierung der OPR3 ermöglicht wird und die Regulation durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung erfolgen könnte. Es wird davon ausgegangen, dass die inaktive Form von OPR3 ein Homodimer darstellt, das durch Phosphorylierung stabilisiert wird. Weiterhin wird angenommen, dass in Antwort auf einen Stimulus dieses Dimer durch posttranslationale Modifikation (z. B. Dephosphorylierung an Position Y365) in ein aktives Monomer übergeht und anschließend, wenn es nicht mehr benötigt wird, durch Phosphorylierung erneut dimerisiert.

In dieser Arbeit konnte mittels zweier Fluorophor-basierender Methoden (BiFC und FRET) die Dimerisierung der OPR3 aus *Arabidopsis thaliana* sowohl in Zwiebelepidermiszellen als auch in unterschiedlichen Organen von *Arabidopsis* beobachtet werden. OPR3-Varianten (*AtOPR3*_{E292K} und *AtOPR3*_{Y365F}) zeigten ein verringertes Dimerisierungspotential. Damit wurden zum ersten Mal die Homodimerisierung der OPR3 *in vivo* und die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Dimerisierung nachgewiesen. Die Hypothese einer reversiblen OPR3-Dimerisierung und Aktivierung der JA-Synthese durch Bildung des OPR3-Monomers konnte durch zwei entscheidende Beobachtungen erhärtet werden. Sowohl nach Verwundung, als auch während der frühen Phasen der Antherenentwicklung, in denen Pflanzen JA benötigen, verschob sich das Monomer/Dimer Gleichgewicht von OPR3 in Richtung des Monomers. Dass eine posttranslationale Modifikation für die OPR3-Dimerisierung notwendig ist, steht in Einklang mit der Beobachtung, dass OPR3 bei Expression in *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist zu dimerisieren. Offenbar erfordert die Dimerisierung weitere Faktoren, die in Hefezellen nicht vorliegen. Eine Proteinkinase, welche für diese posttranslationale Modifikation der OPR3 verantwortlich ist, wurde in dieser Arbeit nicht identifiziert. Doch der Nachweis einer OPR3-Dimerisierung im Cytosol führte zu der Schlussfolgerung, dass die Kinase nicht notwendigerweise peroxisomal lokalisiert sein muss und dass die Suche auf cytosolisch lokalisierte Proteinkinasen ausgeweitet werden kann.



III. SUMMARY

Jasmonic acid (JA) is a phytohormone which plays an important regulatory role in abiotic and biotic stress responses as well as in several plant developmental processes. 12-oxophytodienoic acid reductase 3 (OPR3) contributes to jasmonic acid biosynthesis and catalyzes a critical step in peroxisomes: the conversion of the jasmonic acid precursor 12-oxophytodienoic acid (OPDA) to OPC-8:0.

After wounding or herbivory JA and its bioactive form JA-Ile accumulate within a few minutes. This fast and transient increase can be explained by posttranslational activation of biosynthetic enzymes. The observation that OPR3 crystallizes as a self-inhibited dimer led to the hypothesis that the rapid JA burst is mediated by reversible dimerization of OPR3, which may be regulated by phosphorylation and dephosphorylation of the enzyme. It is postulated that the inactive form of OPR3 represents a homodimer, stabilized by phosphorylation. Furthermore it is assumed that in response to a stimulus this dimer dissociates into active monomers by posttranslational modification (e. g. dephosphorylation at position Y365) and, when not needed anymore, dimerizes again after re-phosphorylation.

In this work dimerization of OPR3 from *Arabidopsis thaliana* could be observed *in vivo* in onion epidermal cells as well as in different organs of *Arabidopsis* by means of two fluorophor-based methods (BiFC and FRET). OPR3 variants (AtOPR3_{E292K} and AtOPR3_{Y365F}) showed a reduced dimerization potential *in vivo*, demonstrating the importance of these two residues. Thus, for the first time homodimerization of OPR3 and the importance of specific amino acids for dimerization were demonstrated *in vivo*. The hypothesis of reversible OPR3 dimerization, and activation of JA biosynthesis via formation of the OPR3 monomer, could be confirmed by two crucial observations. Both after wounding and during early phases of anther development, when plants need JA, the monomer/dimer equilibrium of OPR3 shifted toward the monomer.

The assumption that OPR3 dimerization requires posttranslational modification was strengthened by the inability of OPR3 to dimerize when expressed in *S. cerevisiae*. Apparently, additional factors are needed for dimerization that are absent from yeast. A protein kinase responsible for posttranslational OPR3 modification, could not be identified in this thesis. However, detection OPR3 dimerization in the cytosol, led to the conclusion that the kinase is not necessarily localized in peroxisomes and that the search needs to be extended to include cytosolic protein kinases.



1 EINLEITUNG

1.1 Abwehrmechanismen der Pflanzen

Pflanzen sind ständig den unterschiedlichsten Einflüssen ausgesetzt und müssen in der Lage sein, rasch auf wechselnde Bedingungen zu reagieren. Biotischer Stress, den Herbivore und Pathogene herbeiführen, gehört zu den äußeren Faktoren, auf die Pflanzen sich einstellen müssen. Pflanzenschädlinge stellen für das Überleben der Pflanzen eine sehr ernste Bedrohung dar und sind die Ursache dafür, dass im Laufe der Evolution in Pflanzen effektive Abwehrmechanismen entstanden sind (Howe & Jander 2008).

Konstitutive Abwehrmechanismen zu denen physische Barrieren wie die Cuticula, Dornen und Trichome der Pflanzen sowie toxische Metabolite gehören (Howe & Schaller 2008, Böttcher & Pollmann 2009), besitzen den Nachteil, dass sie eine ständige Belastung im Sinne einer metabolischen Investition für die Pflanzen darstellen (Steppuhn & Baldwin 2008). Bei der induzierten Abwehr muss zwar eine Verzögerung in Kauf genommen werden, bis sich ein Schutz aufgebaut hat. Sie hat aber den Vorteil, dass sie nur Ressourcen beansprucht, wenn die Pflanze sich tatsächlich gegen Schädlinge zur Wehr setzen muss (Gatehouse 2002, Steppuhn & Baldwin 2008).

Als wichtige Signalmoleküle bei der induzierten Abwehrreaktion gegen herbivore Insekten und nekrothrophe Pathogene konnten Phytohormone aus der Klasse der Jasmonate identifiziert werden (Farmer et al. 1991, Farmer & Ryan 1992, Farmer et al. 2003).

1.2 Bedeutung und Wirkung der Jasmonate

Jasmonsäure (JA) und ihre Derivate werden unter dem Begriff Jasmonate zusammengefasst. Sie besitzen eine pentazyklische Ringstruktur und werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren synthetisiert (Schaller et al. 2005). Jasmonate sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet, sie treten in Algen, Moosen, Pilzen, Gymnospermen und Angiospermen auf (Wasternack 2007) und besitzen wie andere Phytohormone ein sehr weites Wirkungsspektrum.

Neben ihrer wichtigen Rolle in der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen sind Jasmonate an der Stressantwort auf abiotische Umwelteinflüsse wie UV-Licht (Conconi et al. 1996) oder osmotischen Stress (Kramell et al. 1995) beteiligt und zudem bei verschiedenen Entwicklungsprozessen der Pflanzen von entscheidender Bedeutung (Wasternack 2007, Browse 2009a, b, Avanci et al. 2010).

Indem Jasmonate drastische Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, nehmen sie Einfluss auf den Metabolismus der Pflanzen (De Geyter et al. 2012). Mittlerweile konnten



hunderte durch Jasmonat-regulierte und -koregulierte Gene identifiziert werden (Reymond et al. 2004, Mandaokar et al. 2006).

Verwundungsstress, welcher durch Herbivorie oder mechanische Verletzung verursacht wird, führt in Pflanzen innerhalb kürzester Zeit sowohl lokal als auch systemisch zu einem Anstieg der Jasmonat-Konzentration (Chung et al. 2008, Glauser et al. 2008, Suza & Staswick 2008, Koo et al. 2009). Dies löst direkte und indirekte Abwehrmechanismen aus (Kessler & Baldwin 2002) und bereitet die Pflanze vor auf zukünftigen Insektenfraß zu reagieren (Karban & Baldwin 1997). Beispielsweise werden toxisch wirkende Sekundärmetabolite wie Nikotin in Tabakpflanzen (Baldwin et al. 1994, Baldwin et al. 1997) oder Abwehrproteine wie Proteinase-Inhibitoren in Tomate gebildet (Farmer & Ryan 1990, Farmer & Ryan 1992). Proteinase-Inhibitoren hemmen im Verdauungstrakt der Insekten die Verdauungsenzyme, wodurch Wachstum und Entwicklung des Insektes beeinträchtigt werden (Fan & Wu 2005, Howe & Schaller 2008). Proteine, die ebenfalls als Reaktion auf Verwundung exprimiert werden, sind beispielsweise vegetative Speicherproteine (VSP), Thionine und Defensine (PDF) und Enzyme für die Jasmonat-Biosynthese (Devoto & Turner 2005).

In unverwundeten, gesunden Pflanzen sind Jasmonate an den unterschiedlichsten entwicklungsphysiologischen Prozessen beteiligt. Schon früh wurde die hemmende Wirkung der Jasmonsäure auf das Wurzelwachstum (Dathe et al. 1981, Staswick et al. 1992) und die Samenkeimung entdeckt (Corbineau et al. 1988) sowie die fördernde Eigenschaft der Jasmonate auf die Blattseneszenz festgestellt (Ueda & Kato 1980). Jasmonate beeinflussen weiterhin beispielsweise die Rankenkrümmung (Falkenstein et al. 1991) und Knollenbildung bei Kartoffel-Pflanzen (Yoshihara et al. 1989).

Eine äußerst wichtige Rolle spielen Jasmonate zudem bei der Fortpflanzung (Browse 2009a,b, Avanci et al. 2010). JA-Biosynthese- und JA-Signaltransduktions-Mutanten von *Arabidopsis* zeichnen sich durch männliche Sterilität der Blüte aus (Schaller & Stintzi 2008, Avanci et al. 2010). Auch für Tomate konnte die Bedeutung der Jasmonate bei der Fortpflanzung gezeigt werden. Die *jail*-Mutante der Tomate ist wegen eines Defektes in der mütterlichen Kontrolle der Samenreifung steril (Li et al. 2004).

Jasmonat-Biosynthese-Mutanten und Jasmonat-Signaltransduktions-Mutanten zeigen nicht nur eine Beeinträchtigung in Wachstum und Entwicklung, sondern fallen auch durch eine stark beeinträchtigte Resistenz gegenüber herbivoren Insekten und Pathogenen auf (Browse & Howe 2008, Browse 2009a, b).



1.3 Jasmonat-Biosynthese

Die Biosynthese der Jasmonate erfolgt durch den Oktadekanoidweg (Abb. 1.1) und wurde erstmals von Vick und Zimmerman beschrieben (Vick & Zimmerman 1984).

Als erste Substrate dienen α -Linolensäure (18:3) bzw. Hexadecatriensäure (16:3), mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche durch Lipasen aus der Chloroplastenmembran freigesetzt werden. Durch die Lipoxygenase (LOX) wird α -Linolensäure zu 13-Hydroperoxylinolensäure (13-HPOT) oxidiert. Der erste spezifische Schritt für die JA-Biosynthese wird durch die Allenoxidsynthase (AOS) katalysiert. Durch die AOS wird 13-HPOT dehydratisiert und ein instabiles Epoxid, die 12,13(*S*)-Epoxy-Octadecatriensäure (12,13-EOT), gebildet (Schaller et al. 2005, Schaller & Stintzi 2009, Wasternack & Kombrink 2010). *In vitro* kann dieses instabile Epoxid zu α - und γ -Ketolen zerfallen oder durch spontane Ringbildung ein Racemat der 12-Oxophytodiensäure (OPDA) entstehen (Brash et al. 1988). Das Enzym Allenoxidcyclase (AOC) sorgt für die Bildung eines Pentenonringes zwischen Position 9 und 13, so dass *in vivo* optisch reines cis-(+)-OPDA ((9*S*,13*S*)-OPDA) entsteht (Hamberg & Fahlstadius 1990, Schaller et al. 2005).

In einem parallelen Weg wird aus 16:3 Hexadecatriensäure mit den gleichen Enzymen dinor-OPDA (7*S*,11*S*)-dnOPDA) gebildet (Weber et al. 1997). Cis-(+)-OPDA und dnOPDA sind die Endprodukte des im Chloroplasten stattfindenden Teils der JA-Biosynthese. Die weiteren Schritte der Biosynthese finden in Peroxisomen statt. Unbekannt bleibt dabei, wie OPDA bzw. dnOPDA aus den Chloroplasten transportiert wird (Schaller & Stintzi 2009, Wasternack & Kombrink 2010). Für den Import von OPDA in Peroxisomen gibt es dagegen Belege. Dieser wird durch den peroxisomalen ABC-Transporter COMATOSE (CTS1) (Footitt et al. 2002) auch bekannt als PXA1 (Zolman et al. 2001) oder PED3 (Hayashi et al. 2002) bzw. im Falle von dnOPDA möglicherweise durch das Ionenfallenprinzip vermittelt (Theodoulou et al. 2005).

In den Peroxisomen werden cis-(+)-OPDA und dnOPDA zu 3-Oxo-2-(2'-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Octansäure (OPC-8:0) bzw. 3-Oxo-2-(2'-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Hexansäure (OPC-6:0) reduziert (Schaller & Stintzi 2009). Für diese Reaktionen ist die 12-Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3) verantwortlich (Schaller et al. 2000, Stintzi & Browse 2000). OPR3 ist ein in Peroxisomen lokalisiertes Flavoprotein, welches NADPH-abhängig die Reduktion von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen katalysiert (Schaller et al. 2000, Strassner et al. 2002). Dabei wird zunächst der FMN Kofaktor von OPR3 durch NADPH reduziert, bevor das Substrat gebunden und die Übertragung eines Hydrids auf das C β des Substrates und die anschließende Protonierung des C α erfolgen kann (Schaller et al. 2005, Schal-



ler & Stintzi 2009). Schließlich werden für die Bildung der Jasmonsäure die Alkanoat-Seitenketten von OPC-6:0 und OPC-8:0 durch das Durchlaufen von zwei bzw. drei Zyklen der β -Oxidation in den Peroxisomen verkürzt. Vor der β -Oxidation erfolgt die Aktivierung der JA-Vorläufer zu den entsprechenden CoA Estern mittels Acyl-CoA Synthetasen (Schaller & Stintzi 2009). Für die Acyl-CoA Synthetase OPCL1 aus *Arabidopsis* konnte die physiologische Rolle in der JA-Biosynthese eindeutig bestätigt werden (Koo et al. 2006). Die OPCL1 „loss-of-function“-Mutante zeigt in Antwort auf Verwundung einen reduzierten JA-Gehalt (50 % des Wildtyps) und akkumuliert OPC-8:0 (Koo et al. 2006), OPC-6:0 und OPC-4:0 (Kienow et al. 2008).

Die Zyklen der β -Oxidation katalysieren die drei Core-Enzyme Acyl-CoA-Oxidase (ACX), „multifunctional protein“ (MFP) und Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) (Schaller und Stintzi 2009). Es entsteht Jasmonoyl-CoA, welche in einem letzten Schritt durch eine noch unbekannt Thioesterase zu (+)-7-iso-JA ((3*R*,7*S*)-JA) umgesetzt wird, die wiederum zur thermodynamisch stabileren (-)-JA isomerisiert. Die gebildete Jasmonsäure wird auf noch unbekanntem Wege ins Cytosol transportiert (Wasternack & Kombrink 2010). In Abbildung 1.1 sind die Schritte der Jasmonat-Biosynthese schematisch zusammengefasst.

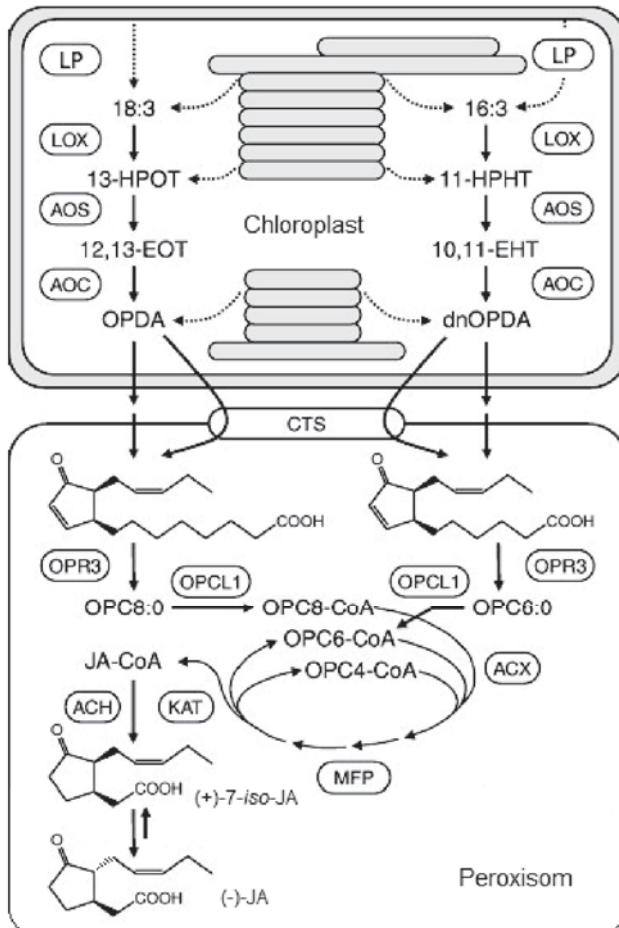


Abb. 1.1: Jasmonat-Biosynthese

Nach der Freisetzung der α -Linolensäure (18:3) durch Lipasen (LP) wird diese durch die Lipoxygenase (LOX) zu 13-HPOT oxidiert. 12,13-EOT wird durch die Allenoxidsynthase (AOS) gebildet und durch die Allenoxidcyclase (AOC) zu (9*S*,13*S*)-OPDA umgesetzt. Auf gleichem Wege kann aus Hexadecatriensäure (16:3) dinor-OPDA (dnOPDA) entstehen. Der Import in Peroxisomen erfolgt durch den ABC-Transporter COMATOSE (CTS). OPDA wird durch OPR3 zu OPC-8:0 reduziert. Nach der Aktivierung der Substrate zu den entsprechenden CoA Estern durch die OPC8:CoA Ligase 1 (OPCL1, At1g20510) erfolgen drei bzw. im Falle von dnOPDA zwei Zyklen der β -Oxidation durch die Enzyme ACX, MBF und KAT. Das Endprodukt Jasmonoyl-CoA (JA-CoA) wird durch eine noch unbekannt Acyl-Thioesterase (ACH) zu (+)-7-iso-JA umgesetzt, welche wiederum zur thermodynamisch stabileren (-)-JA isomerisiert (verändert nach Schaller & Stintzi 2009).



1.4 JA-Metabolite und Signaltransduktion

JA ist nicht das Endprodukt des Biosyntheseweges. Derivate der JA entstehen durch: Methylierung (MeJA), Konjugation mit Aminosäuren (z. B. JA-Ile) oder ACC – der Vorstufe von Ethylen – (JA-ACC), Decarboxylierung (cis-Jasmon), Reduktion der Ketogruppe (Cucurbin-säure) und Glykosylierung (JA-Glycosyl-Ester) sowie durch Hydroxylierung an C-11 oder C-12 (11- bzw. 12-OH-JA) und anschließende Glukosylierung bzw. Sulfatierung (Wasternack & Kombrink 2010). Nicht nur den Metaboliten der JA werden biologische Aktivität und unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben (Wasternack 2007, Wasternack & Kombrink 2010), sondern auch ihren biosynthetischen Vorläufern. Die Behandlung von *opr3*-Pflanzen mit OPDA zeigt, dass OPDA in der Lage ist, Gene der Wundantwort zu induzieren (Stintzi et al. 2001) und weitere durch OPDA regulierte Gene wurden in Transkriptionsanalysen identifiziert (Taki et al. 2005).

Als bedeutendes biologisch aktives Hormon des JA-Signalwegs wird allgemein JA-Ile anerkannt. JA-Ile ist das einzige Jasmonat, für das eine Aktivität auf molekularer Ebene nachgewiesen wurde (Browse 2009a). Die Konjugation der Aminosäure erfolgt mit Hilfe der JA-Aminoacyl Synthetase JAR1 (Staswick & Tiryaki 2004). Für JA-Ile konnte gezeigt werden, dass es eine wesentliche Rolle in der JA-Signaltransduktion einnimmt, indem es den Abbau von JAZ-Proteinen, Repressoren des Jasmonat-Signalwegs, steuert (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Yan et al. 2009).

Die JAZ-Proteine (JAZ1-12) werden von zwölf unterschiedlichen Genen in *Arabidopsis* codiert und hemmen Transkriptionsfaktoren (z. B. MYC2), welche für die Aktivierung der JA-abhängigen Gene verantwortlich sind (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von JA-Ile an den Rezeptor COI1, der Abbau der JAZ-Proteine vermittelt wird (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Katsir et al. 2008, Yan et al. 2009, Sheard et al. 2010). COI1 ist ein F-Box Protein (Xie et al. 1998) und Teil des Skp/Cullin/Fbox (SCF)^{COI1}-Komplexes, welcher als E3 Ubiquitin Ligase agiert und Ubiquitin auf die JAZ-Proteine überträgt. Durch Ubiquitinierung werden die JAZ-Proteine durch das 26S Proteasom abgebaut (Chini et al. 2007). Kürzlich wurde ein Modell veröffentlicht, das zusätzlich negative Regulatoren des Jasmonat-Signalwegs einbezieht: das Adaptorprotein NINJA sowie die Korepressoren TOPLESS (TPL) und seine Homologe TPR2 und TPR3. Die Repression der JA-abhängigen Gene erfolgt dabei nur indirekt über die JAZ-Proteine. TPL Korepressoren, welche die Expression JA-abhängiger Gene hemmen, werden über das Adaptorprotein NINJA rekrutiert, welches nicht nur mit den Korepressoren, sondern auch mit den JAZ-Proteinen interagiert (Pauwels et al. 2010). Der Abbau der JAZ-Proteine führt zur Frei-



setzung der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, woraufhin JA-abhängige Gene exprimiert werden (Wager & Browse 2012).

Der erste Transkriptionsfaktor, für den eine Interaktion mit der JAZ-Protein Familie nachgewiesen wurde, ist MYC2 (Thines et al. 2007). Mittlerweile sind weitere JAZ-regulierte Transkriptionsfaktoren bekannt: die MYC2 Homologe MYC3 und MYC4 (Cheng et al. 2011, Fernández-Calvo et al. 2011, Niu et al. 2011), Transkriptionsfaktoren der MYB-Familie MYB21, MYB24, MYB75 und GL1, der bHLH Familie GL3, EGL3 und TT8 (Song et al. 2011, Qi et al. 2011) sowie des Ethylen-Signalwegs EIN3 und EIL1 (Zhu et al. 2011). Den Transkriptionsfaktoren werden dabei unterschiedliche Rollen in der Jasmonat-vermittelten Signalantwort zugeschrieben (Wager & Browse 2012), wie beispielsweise die Regulation der Fertilität im Falle von MYB21 und MYB24 (Mandaokar et al. 2006, Mandaokar & Browse 2009).

1.5 Regulation der Blütenentwicklung in *A. thaliana* und Bedeutung der *opr3* (oxo-phytodiensäurereduktase 3)-Mutante

Jasmonsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Fortpflanzung und der Staminaentwicklung (Schaller & Stintzi 2008, Avanci et al. 2010). Die Stamina werden wie die drei anderen Blütenorgane (Sepale, Petale, Carpel) durch ein Zusammenspiel regulatorischer Gene spezifiziert. Die Staminaentwicklung steht unter der Kontrolle der Gene *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA1-3* und *AGAMOUS* (AG) (Sablowski 2010). Dem homeotischen Protein *AGAMOUS* kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. In den Blütenständen *ag* mutanter Pflanzen werden über tausend Gene differentiell exprimiert (Wellmer et al. 2004). Dabei ist AG nicht nur für die Spezifizierung der Stamina wichtig, sondern steuert die weitere Entwicklung der Stamina durch die Aktivierung der JA-Biosynthese, indem es direkt die Expression des Gens *DADI* (*Defective in Anther Dehiscence*) reguliert (Ito et al. 2007). Das Gen *DADI* codiert für die in den Chloroplasten lokalisierte Lipase A1, welche den ersten Schritt der JA-Biosynthese katalysiert. Die *Arabidopsis* Mutante *dad1* ist männlich steril und zeigt Defekte in der Dehiscenz der Antheren, in der Pollenreifung und der Entwicklung der Blütenknospe (Ishiguro et al. 2001).

Die Bedeutung der Jasmonate für die Fertilität konnte auch anhand anderer Jasmonat-Mutanten gezeigt werden. In *Arabidopsis* sind Jasmonat-Biosynthese-Mutanten wie *fad3 fad7 fad8* (McConn & Browse 1996), *aos* (Park et al. 2002, von Malek et al. 2002) und *opr3* (Sanders et al. 2000, Stintzi & Browse 2000) und Jasmonat-Signaltransduktions-Mutanten wie *coil* (Feys et al. 1994) gleichfalls männlich steril.



In *Arabidopsis* ist Jasmonsäure für die Pollenentwicklung, die Elongation der Antherenfilamente und das Öffnen des Stomiums für die Freisetzung der Pollen erforderlich (Abb. 1.2). Die Blütenorgane entwickeln sich zwar in der geschlossenen Blüte normal, aber die Längenzunahme der Antherenfilamente läuft nicht erfolgreich ab. Dies hat zur Folge, dass die Pollensäcke sich nicht zum richtigen Zeitpunkt – wenn die Blüte sich geöffnet hat – über der Narbe befinden. Die Antheren brechen entlang des Stomiums nicht rechtzeitig auf (teilweise tritt eine verspätete Dehiszenz ein), wodurch der Pollen nicht freigesetzt wird (McConn & Browse 1996, Stintzi & Browse 2000). Zudem sind die Pollen der *opr3*-Mutante überwiegend nicht keimungs- und lebensfähig (Abb. 1.2). Es keimen weniger als 4 % (Stintzi & Browse 2000).

Die Applikation von Jasmonsäure führt bei Jasmonsäure-Synthese-Mutanten wie *fad3 fad7 fad8*, *aos* und *opr3* zur Aufhebung der Defekte und zur Fertilität (McConn & Browse 1996, Stintzi & Browse 2000, Park et al. 2002). Die Fähigkeit der Jasmonsäure die Fertilität wiederherzustellen, ist jedoch vom Stadium der Blütenentwicklung abhängig. Nur Blütenknospen im Stadium 12 reagieren auf die Jasmonsäure-Behandlung (Stintzi & Browse 2000).

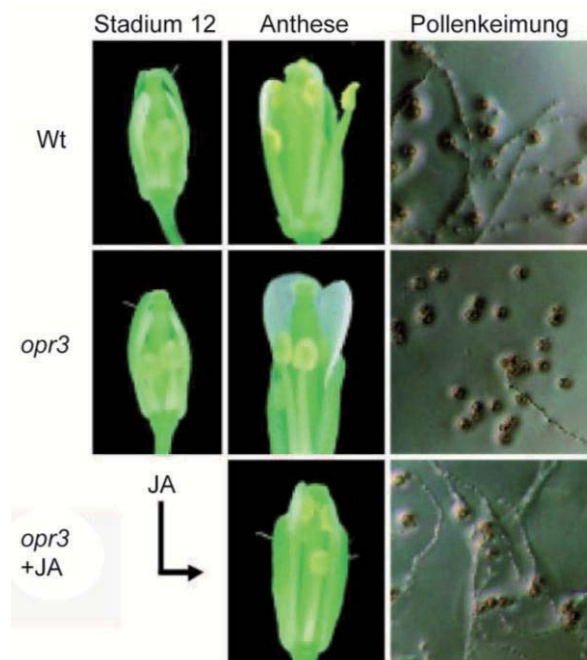


Abb. 1.2: Phänotyp wildtypischer und OPR3 mutanter Pflanzen bei der Blüten- und Pollenentwicklung von *A. thaliana*

Die *opr3*-Mutante ist aufgrund pleiotroper Effekte männlich steril: Die Antherfilamente sind verkürzt, der Pollen wird nicht freigesetzt und zeigt verminderte Keim- bzw. Lebensfähigkeit. Durch die Applikation von MeJA im Stadium 12 der Blütenentwicklung - vor dem Öffnen der Blüte - kann die Fertilität wiederhergestellt werden (verändert nach Stintzi & Browse 2000).

Mikroarray-Analysen, in welchen Jasmonsäure-behandelte Stamina von *opr3*-Pflanzen (Stadium 12) untersucht wurden, führten zu der Identifizierung von 13 Transkriptionsfaktoren, denen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Jasmonsäure gesteuerten Blütenentwicklung zugeschrieben wird. Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren wird nach Jasmonsäure-Behandlung in den Stamina der *opr3*-Pflanzen stark induziert. Unter den Jasmonsäure indu-



zierten Transkriptionsfaktoren befinden sich Mitglieder der MYB-Familie. MYB21 und MYB24 zeigen eine überlappende Funktion bei der Regulation der Staminaentwicklung. Die Doppelmutante *myb21-1 myb24-1* ist männlich steril (Mandaokar et al. 2006). Die Fertilität kann in diesem Fall durch JA-Applikation nicht wiederhergestellt werden. Dies beweist, dass die regulatorische Rolle der MYB-Proteine bei der Staminaentwicklung erst nach der JA-Biosynthese stattfindet (Mandaokar et al. 2006). Auch für ein weiteres Mitglied der MYB-Familie konnte gezeigt werden, dass es bei der Staminaentwicklung von Bedeutung ist. MYB108, dessen Expression möglicherweise durch MYB21 reguliert wird, ist für den richtigen Zeitpunkt der Antherendehiszenz verantwortlich und steuert zusammen mit MYB24 die männliche Fertilität (Mandaokar & Browse 2009).

1.6 Wie erfolgt die Regulation der Jasmonat-Biosynthese?

Die Jasmonsäure-Synthese wird sowohl durch positive, als auch negative Rückkopplung reguliert (Farmer 2007). Eine positive Rückkopplung erfährt der Syntheseweg nach Verwundung oder JA-Behandlung durch die JA-abhängige Induktion der Biosyntheseenzyme (Wasternack 2007, Browse 2009a). Jasmonsäure aktiviert dadurch seine eigene Synthese (Farmer 2007).

Chini und Mitarbeiter (2007) postulieren, dass die Jasmonsäure-Antwort durch eine negative Rückkopplung beendet wird. Durch JA-Behandlung wird die Transkription der *JAZ*-Gene eingeleitet, wodurch es zu einer schnellen Repression der JA-Genexpression kommt. Die Synthese neuer JAZ-Proteine führt zu einer erneuten Inhibierung des Transkriptionsfaktors MYC2 (Chini et al. 2007).

Positive und negative Rückkopplung können erst stattfinden, wenn Jasmonsäure vorhanden ist. Doch wie ist es möglich, dass Pflanzen in Folge auf Verwundung oder Herbivorie so rasch mit der Akkumulation der Jasmonsäure reagieren können? In kürzester Zeit kommt es in den betroffenen wie auch in systemisch unverwundeten Blättern zu einem schnellen und transienten Anstieg der Jasmonsäure-Konzentration. Innerhalb von fünf Minuten steigt in Blättern die JA-Konzentration von 30-130 pmol/g auf etwa 800 pmol/g bzw. die JA-Ile Konzentration von 5-30 pmol/g auf 50-110 pmol/g. Nach etwa einer Stunde ist das Maximum der JA und JA-Ile Konzentration erreicht. In mechanisch verwundeten Blättern werden Werte von 4000-6000 pmol/g bzw. 300-1000 pmol/g gemessen (Chung et al. 2008, Suza & Staswick 2008, Koo et al. 2009).

Nach Verwundung werden die Gene für die Enzyme der Jasmonat-Biosynthese induziert und entsprechende Transkripte akkumulieren (Reymond et al. 2000, Howe et al. 2000, Strassner et



al. 2002, Ralph et al. 2006). Die *de novo* Synthese der Enzyme kann den raschen Anstieg der JA-Konzentration aber nicht erklären, da die Zunahme der JA vor der Expression der Biosynthese gene erfolgt (Howe et al. 2000, Ziegler et al. 2001, Strassner et al. 2002, Stenzel et al. 2003a, b).

Dass es eine andere Erklärung für den sprunghaften Anstieg der Jasmonsäure geben muss und diese nicht durch Menge und Verfügbarkeit der JA-Biosyntheseenzyme erklärt werden kann, wird durch zwei weitere Beobachtungen unterstützt. Zum einen ist in unverwundeten Pflanzen, der Gehalt an JA nur gering – trotz konstitutiver Expression der JA-Biosynthese gene (Schaller & Stintzi 2009). Zum anderen weisen Pflanzen, welche JA-Biosynthese gene konstitutiv überexprimieren ohne Verwundung oder einen anderen Stimulus keine erhöhte JA-Konzentration auf (Wasternack 2007).

Es müssen also zusätzliche Regulationsmechanismen existieren, die den sprunghaften Anstieg der Jasmonate nach Verwundung erklären.

Nach einer Hypothese von Wasternack (2007) ist die JA-Synthese von der Verfügbarkeit ihrer Substrate abhängig (Wasternack 2007). Danach werden die Substrate des Oktadekanoidweges, sobald sie verfügbar sind, von konstitutiv vorliegenden Enzymen des Oktadekanoidweges zu JA umgesetzt. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Freisetzung von JA-Vorläufern aus den Membranlipiden der limitierende Schritt der Jasmonat-Biosynthese sein könnte (Stenzel 2003a, b). Gegen diese Hypothese steht jedoch, dass in unverwundeten Blättern der Vorläufer OPDA bereits in hoher Konzentration vorliegt. Im Vergleich zu der relativ geringen Konzentration der JA (30-100 pmol/g FW) sind hohe Mengen an OPDA (300-1000 pmol/g FW) im unverwundeten Pflanzengewebe vorhanden (Stintzi et al. 2001, Stenzel et al. 2003a, Delker et al. 2007).

Diese konstitutiv hohe Konzentration an OPDA in unverwundeten Blättern spricht dafür Regulationsmechanismen an diesem Punkt der Synthese anzunehmen und OPDA als direkte Quelle für die schnelle Bildung des bioaktiven Hormons JA-Ile in Betracht zu ziehen (Schaller et al. 2005, Browse 2009a). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Verwundung in *Arabidopsis* eine rasche Abnahme der OPDA-Konzentration mit der raschen Akkumulation von JA und JA-Ile in den systemischen Blättern der Pflanzen einhergeht (Koo et al. 2009). Demzufolge könnte der sprunghafte Anstieg der JA-Konzentration nach Verwundung durch die Aktivierung der konstitutiv exprimierten Biosyntheseenzyme im Anschluss an OPDA erklärt werden, die in unverwundeten gesunden Pflanzen in einem inaktiven Zustand vorliegen. Durch posttranslationale Modifizierung könnten



die Enzyme rasch aktiviert werden und damit die Jasmonat-Synthese anstoßen (Schaller & Stintzi 2009, Bonaventure & Baldwin 2010).

1.7 OPR3 als Kontrollpunkt der Jasmonat-Synthese in der Wundantwort

Die Kontrolle der Jasmonat-Biosynthese und der sprunghafte Anstieg der Jasmonate lassen sich möglicherweise durch die Regulation des Enzyms OPR3 erklären. Wie oben bereits erwähnt, katalysiert OPR3 die Umsetzung von (9*S*,13*S*)-OPDA und dnOPDA zu OPC-8:0 bzw. OPC-6:0 (Schaller et al. 2000, Stintzi & Browse 2000) und stellt damit einen wichtigen Kontrollpunkt in der JA-Biosynthese dar (Stintzi et al. 2001). Da OPDA bereits in hoher Konzentration in unverwundeten Blättern vorliegt, erscheint die Hypothese, dass eine Regulation der Jasmonat-Biosynthese durch das Enzym OPR3 erfolgen könnte, folgerichtig.

OPR3 gehört zu einer kleinen Familie von Flavin-enthaltenden Oxidoreduktasen. In *Arabidopsis* wurden sechs *OPR* Gene identifiziert. OPR3 ist jedoch das einzige Mitglied dieser Familie, welches das (9*S*,13*S*)-Enantiomer der OPDA (eines von vier möglichen Stereoisomeren), die Vorläuferform der JA als Substrat akzeptiert (Schaller & Stintzi 2009). OPR3 weist eine hohe Ähnlichkeit in der Struktur zu der Familie der OYE (Old Yellow Enzyme) auf, was durch Aufklärung der Kristallstruktur der OPR3 aus Tomate mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte (Breithaupt et al. 2006). OYE gilt als das erste identifizierte Flavoprotein und wurde aus *S. cerevisiae* isoliert (Warburg & Christian 1932).

OYE und seine Homologe besitzen eine (β/α)₈-Fass-Struktur, in welcher acht parallele β -Stränge in zylindrischer Anordnung von acht α -Helices umgeben sind. Der FMN Kofaktor wird nicht-kovalent gebunden. Die charakteristische, enzymatische Eigenschaft des OYE und seiner Homologen besteht darin die C=C Doppelbindung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen zu reduzieren (Oberdorfer et al. 2011).

Eine Besonderheit der OPR3 ist der „Loop“ L6 des Enzyms. Im Gegensatz zu OYE und OPR1 (Breithaupt et al. 2001), in welchen der Loop L6 das aktive Zentrum begrenzt, ragt dieser bei OPR3 wie ein Finger aus der Struktur heraus (Abb. 1.3 und 1.4, A). Ansonsten zeigen OPR1 und OYE weitgehende Übereinstimmung zu OPR3. Der L6-Loop der OPR3 Unterfamilie enthält im Vergleich zu der OPR1 Unterfamilie sieben zusätzliche Aminosäuren. Ein weiterer Unterschied zwischen OPR1 und OPR3 besteht in dem Loop L3 (Abb. 1.3). Dieser ragt bei OPR1 weit in die Substrat-Bindetasche des Enzyms und ist mit dafür verantwortlich, dass diese im Vergleich zur Substrat-Bindetasche der OPR3 verengt wird (Breithaupt et al. 2006). Die strukturellen Unterschiede sind für die Substratselektivität der beiden Enzyme verantwortlich. OPR1 akzeptiert nur (9*R*,13*R*)-OPDA als Substrat (Schaller et al. 1998,



Breithaupt et al. 2009). Dagegen reduziert OPR3 *in vitro* alle vier OPDA Enantiomere (Schaller et al. 1998).

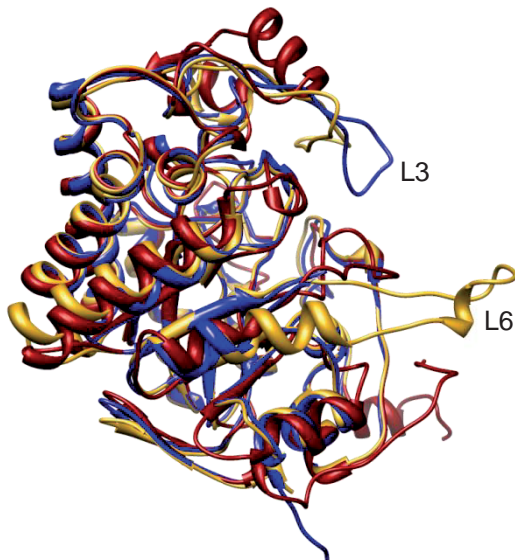


Abb. 1.3: Darstellung der überlagerten Strukturen von OPR3 (gelb), OPR1 (blau) und OYE (rot)

OPR3, OPR1 und OYE bilden eine $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Struktur, in welcher acht parallele β -Stränge in zylindrischer Anordnung von acht α -Helices umgeben sind. Der L6-Loop der OPR3 ragt wie ein Finger aus der Struktur heraus, wodurch sich OPR3 von OPR1 und OYE unterscheidet. OPR1 besitzt dagegen eine erweiterten L3-Loop, was zu einer Verengung der Substrat-Bindetasche führt (Breithaupt et al. 2006).

(OPR3: 2HSA.pdb (Breithaupt et al. 2006); OPR1: 1ICS.pdb (Breithaupt et al. 2001); OYE: 1OYC.pdb (Fox & Karplus 1994); Darstellung mittels Chimera (Pettersen et al. 2004))

Im Gegensatz zu OPR1 kristallisiert OPR3 als Dimer, wobei die fingerähnliche Struktur des L6-Loops eine wichtige Rolle spielt. Der Finger der einen Untereinheit ragt jeweils in das aktive Zentrum der anderen Untereinheit und blockiert es dadurch (Abb. 1.4). Auf diese Weise entsteht ein sich selbst-inhibierendes Dimer. Zwischen dem Finger des einen Protomers und dem aktiven Zentrums des anderen Protomers entstehen zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen, welche das Dimer stabilisieren (Breithaupt et al. 2006) (Abb. 1.4).

Die Aminosäuren an der Spitze des L6-Loops sind in der Unterfamilie der OPR3-Proteine hochkonserviert, was darauf hinweist, dass hier ein allgemeiner Mechanismus zur Inhibierung des Enzyms vorliegt (Breithaupt et al. 2006).

Bei der Analyse der OPR3 aus *Solanum lycopersicum* hat sich gezeigt, dass das Glutamat an Position 291 (E291), welches sich an der Spitze des L6-Loops befindet, eine für die Dimerisierung wichtige Aminosäure darstellt. Dieses Glutamat bildet H-Brücken mit His185 und His188, welche sich direkt oberhalb des FMN Kofaktors in der Substrat-Bindetasche der anderen OPR3-Untereinheit befinden und blockiert so das aktive Zentrum (Abb. 1.4, B). Durch zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass bei Austausch von E291 durch Lysin, die Bildung des OPR3-Dimers gestört wird. Keine der Bindungen, die beim wildtypischen OPR3 zwischen den Dimeren bestehen, bleibt in der Mutante erhalten. Die Mutante E291K kristallisiert ausschließlich als Monomer. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Dimerisierung der



OPR3 mit einem Verlust der Aktivität einhergeht. Die Mutante E291K weist einen sechsmal schnelleren Substratumsatz als wildtypisches OPR3 auf (Breithaupt et al. 2006).

Folglich könnte das Dimer die *in vivo* inaktive Form der OPR3 darstellen und die Aktivität der OPR3 und damit die JA-Biosynthese durch das Monomer/Dimer Gleichgewicht der OPR3 reguliert werden (Schaller & Stintzi 2009).

Basierend auf der Anwesenheit eines Sulfat-Iones in der Kristallstruktur des OPR3-Dimers, welches sich in unmittelbarer Nähe der Hydroxylgruppe des Tyrosins an Position 364 (Y364) befindet, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der OPR3-Aktivität durch reversible Phosphorylierung stattfinden könnte. Das Sulfat-Ion bildet im Kristall zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Untereinheiten aus und stabilisiert auf diese Weise die Interaktion (Abb. 1.4, B). Es ist so positioniert, dass es perfekt die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Tyrosins (Y364) imitiert.

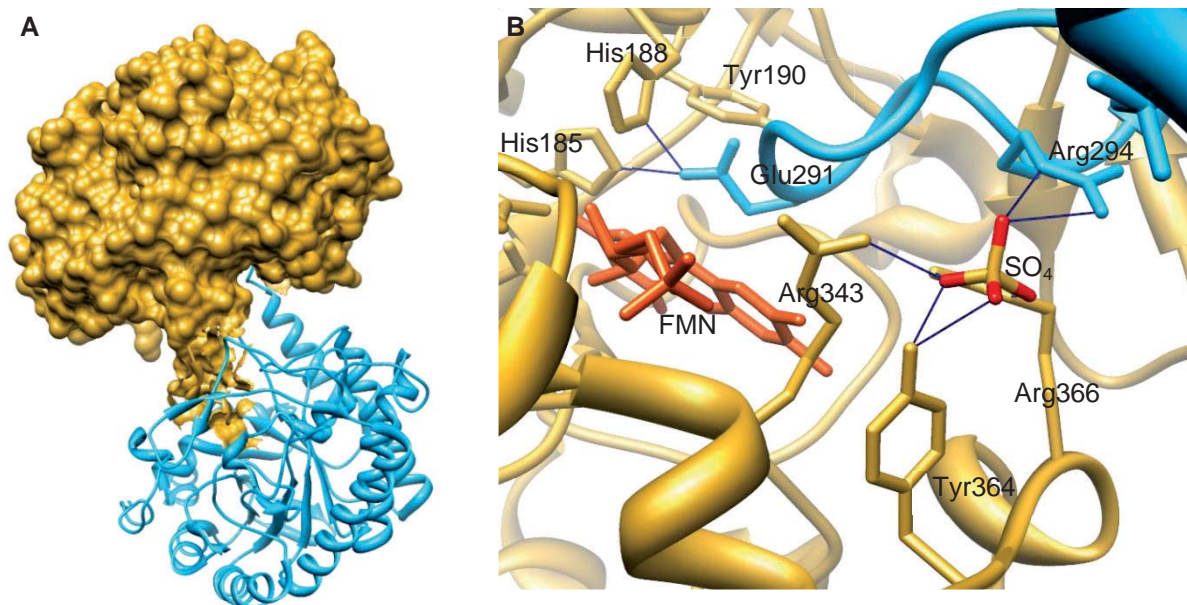


Abb. 1.4: Strukturmodell der OPR3 aus *S. lycopersicum*

A OPR3 kristallisiert als Homodimer. Dabei blockiert die fingerartige Struktur des einen Protomers das aktive Zentrum des anderen. **B** Wichtige Aminosäuren bei der Stabilisierung des Dimers sind das Glutamat in Position 291 und das Tyrosin in Position 364. Das E291 der einen Untereinheit (blau) interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen (blaue Linien) mit den Histidinen 185 und 188 der anderen Untereinheit (gelb). In der Nähe des Y364 befindet sich ein Sulfat-Ion (SO_4), welches die Phosphatgruppe eines Phosphotyrosins imitieren könnte und welches zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Untereinheiten ausbildet (Breithaupt et al. 2006, 2HSA.pdb; Darstellung mittels Chimera (Pettersen et al. 2004)).

Durch zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass eine OPR3-Mutante, in welcher das Tyrosin an Position 364 gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde (Y364F), als Monomer



kristallisiert (Breithaupt et al. 2006). Dies unterstützt die Bedeutung des Sulfat-Ions und die These einer möglichen Phosphorylierung für die Dimerisierung.

Eine Regulation der OPR3-Aktivität durch reversible Phosphorylierung könnte die rasche und transiente Akkumulation von JA nach Verwundung erklären. In unverwundeten Pflanzen könnte OPR3 durch die Aktivität einer Proteinkinase phosphoryliert und damit als inaktives Dimer vorliegen. Nach Verwundung wird die Phosphorylierung durch eine Phosphatase entfernt, wodurch die Dimerisierung der OPR3 aufgehoben wird und das aktive Monomer entsteht, welches bereits vorhandenes OPDA reduziert (Schaller & Stintzi 2009). Auf diese Weise könnte der sprunghafte Anstieg der Jasmonate – nur wenige Minuten nach Verwundung – ermöglicht werden. Eine erneute Phosphorylierung, welche die Inaktivierung der OPR3 zur Folge hätte, könnte zu der beobachteten Abnahme der Jasmonat-Konzentration nach etwa einer Stunde führen, obwohl das OPR3 Enzym noch gegenwärtig ist.

1.8 Proteinkinasen und deren Rolle bei der Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen

Falls die Dimerisierung und damit die Regulation der OPR3 über reversible Phosphorylierung erfolgt, müssten eine Proteinkinase und eine Phosphatase existieren, welche in der Lage sind, OPR3 zu phosphorylieren bzw. zu dephosphorylieren. Proteinkinasen katalysieren den Transfer einer Phosphatgruppe auf die Hydroxyl-(OH)-Gruppe einer Aminosäure, dagegen kehren Phosphatasen diesen Prozess um. Für *A. thaliana* wurden mehr als 800 Proteinkinasen und 150 Proteinphosphatasen identifiziert (Ghelis 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Identifizierung einer OPR3-phosphorylierenden Kinase gelegt.

Am häufigsten werden die Aminosäuren Serin und Threonin und in einem geringeren Ausmaß Tyrosin phosphoryliert (Ghelis 2011). Es konnten jedoch auch Phosphorylierungen an den Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin, Cystein, Glutamat und Aspartat nachgewiesen werden (Cieśła et al. 2011).

Traditionell wurden Proteinkinasen in zwei getrennte Familien eingeteilt, in Tyrosin-spezifische und in Serin/Threonin-spezifische Kinasen (Hanks et al. 1988, Hanks & Quinn 1991). Später wurden jedoch Proteinkinasen identifiziert, die alle drei Aminosäuren phosphorylieren können, die sogenannten dualspezifischen STY (Serin/Threonin/Tyrosin) Kinasen (Lindberg et al. 1992, Rudrabhatla et al. 2006). Heute erfolgt die Einteilung daher in ausnahmslos Ser/Thr bzw. Tyr-phosphorylierende Kinasen (PTKs) und in dualspezifische PTKs (dsPTKs) (Ghelis 2011). Beide Proteinkinase-Klassen besitzen eine katalytische Domäne aus



etwa 250-300 AS, innerhalb derer sich elf konservierte Subdomänen befinden. Consensussequenzen in den Subdomänen VI, VIII und XI sind Indikatoren für die Spezifität der Kinasen. 2006 wurden in einer genomischen Studie 57 potentielle Tyr-Kinasen für *Arabidopsis* identifiziert, die alle sowohl Motive für eine Ser/Thr-Spezifität (Subdomäne VI) als auch eine Tyr-Spezifität (Subdomäne XI) aufweisen. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass Pflanzen keine klassischen Tyrosin-Kinasen besitzen und dualspezifische Kinasen die Tyrosin-Phosphorylierung vollständig übernehmen könnten (Rudrabhatla et al. 2006). Zwischenzeitlich wurde für verschiedenen Pflanzenspezies PTKs mit einer Tyr-Spezifität vorhergesagt. Der Nachweis ihrer katalytischen Aktivität wurde jedoch noch nicht erbracht (Ghelis 2011).

Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger posttranslatonaler Mechanismus für die Regulation zellulärer Prozesse. Durch Phosphorylierung können Zielproteine, wie Enzyme, Rezeptoren und Regulatoren aktiviert oder inhibiert, die subzelluläre Lokalisation bestimmt oder Proteininteraktionen reguliert werden (Manning 2005). Tyr-Phosphorylierungen nehmen in Pflanzen nur einen geringen prozentualen Anteil ein. Bei einer Phosphoproteomanalyse in *A. thaliana* wurde für Phosphoserine, Phosphothreonine bzw. Phosphotyrosine eine Verteilung von 82,7 %, 13,1 % bzw. 4,2 % angegeben (Nakagami et al. 2010). Über die Rolle der Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Hauptsächlich anhand von Genexpressionsanalysen, pharmakologischen Studien und Analysen mit „loss-of-function“-Mutanten wurde gezeigt, dass Tyr-Phosphorylierungen von entscheidender Bedeutung bei Entwicklungsprozessen (Gametophytenentwicklung, Samenkeimung, Embryoentwicklung), abiotischen Stressantworten (Trockenheit, Kälte, Hitze, Salz), der Abwehr von Pathogenen sowie Hormonantworten sind. Die genaue Funktion der Tyr-Phosphorylierung in diesen Prozessen ist jedoch noch ungeklärt (Ghelis 2011). Bekannt ist bisher, dass verschiedene dsPTKs spezifisch während früher und später Stadien der Blütenentwicklung sowie während der Keim- und frühen Wachstumsphase exprimiert werden. Neun der 57 von Rudrabhatla und Mitarbeitern (2006) identifizierten dsPTKs werden ausschließlich in den Stamina exprimiert. Spezifische Stressoren wie Kälte, Hitze, Salze oder Hormonbehandlung führen ebenfalls zur Hochregulation verschiedener dsPTKs. Ethylen und MeJA induzieren die Hochregulation von bis zu sieben STY Kinase Genen (Rudrabhatla et al. 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Phosphoproteom-Studie konnten 152 Phosphopeptide identifiziert werden, die nach einer Phytohormonbehandlung mit Abscisinsäure, Indol-3-essigsäure, Gibberellinsäure, Kinetin oder JA differentiell phosphoryliert waren. JA-Behandlung führte zu der Identifizierung von



67 differentiell phosphorylierten Peptiden, darunter auch das Peptid einer Kinase (BSK2) (Chen et al. 2010).

Aufgrund des rudimentären Wissens über die Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen wurde bisher noch keine Studie veröffentlicht, in welcher die Tyr-Phosphorylierung eines Proteins zu dessen Homodimerisierung führt und eine Selbstinhibierung des Proteins zur Folge hat. Dass Homodimerisierung mit der Selbstinhibierung eines Proteins einhergehen kann, belegen zahlreiche Studien (Wickner et al. 1991, Bilwes et al. 1996, Merz et al. 1997, Takeda et al. 2004). Beispielsweise konnte für das Protein CD45 – ein membranständiger Rezeptor von Leukozyten mit Tyrosin Phosphatase Aktivität – gezeigt werden, dass die Aktivität im dimeren Zustand herabgesetzt ist (Takeda et al. 2004).

1.9 Proteinimport peroxisomaler Matrixproteine

OPR3 ist im Peroxisom lokalisiert und enthält C-terminal eine Signalsequenz (SRL) (Stintzi & Browse 2000), welche dafür sorgt, dass OPR3 ins Peroxisom importiert wird (Strassner et al. 2002).

Peroxisomen besitzen weder eigene DNA noch eine Translationsmaschinerie. Daher müssen alle peroxisomalen Matrixproteine zunächst an freien Polyribosomen synthetisiert und post-translationell in die Peroxisomen importiert werden (Lazarow & Fujiki 1985). Für den Transport in Peroxisomen benötigen Proteine ein peroxisomales „targeting“-Signal (PTS).

Es gibt zwei verschiedene PTS-Sequenzen, PTS1 und PTS2. Das PTS1-Motiv, welches auch OPR3 besitzt, findet sich in der Mehrheit der peroxisomalen Matrixproteine (Rucktäschel et al. 2011). Es besteht aus einem Tripeptid, für das die Consensussequenz (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) ermittelt wurde (Lametschwandtner et al. 1998) und befindet sich am C-Terminus (Gould et al. 1987). Die Sequenz wird von dem peroxisomalen Rezeptor-Peroxin Pex5p erkannt und gebunden (Brocard et al. 1994, Terlecky et al. 1995).

Ein Drittel der peroxisomalen Proteine in Pflanzen besitzen eine PTS2-Sequenz (Reumann et al. 2009), die aus einem konservierten Nonapeptid besteht und sich im N-Terminus der Proteine befindet (Osumi et al. 1991, Swinkels et al. 1991, Rehling et al. 1996). Für die Erkennung der PTS2-Sequenz ist das Rezeptorprotein Pex7p zuständig (Rehling et al. 1996), welches zusätzlich Korezeptoren benötigt (Rucktäschel et al. 2011). Die Bindung der peroxisomalen Proteine an die Rezeptoren erfolgt im Cytosol. Die PTS-Rezeptoren leiten die gebundenen Kargoproteine zur Membran der Peroxisomen, wo sie an einen Docking-Komplex binden, dessen zentrale Bestandteile die Peroxine Pex13p, Pex14p und Pex17p sind (Brown &



Baker 2008, Rucktäschel et al. 2011). Im nächsten Schritt werden die Rezeptorproteine in die Membran integriert und die Translokation des Kargoproteins durch die Membran erfolgt. Nach der Freisetzung des Kargoproteins werden die Rezeptorproteine entweder durch Monoubiquitinierung rezykliert und stehen damit für eine neue Runde des Matrixproteinimportes zur Verfügung, oder sie werden nach einer Polyubiquitinierung abgebaut (Ma et al. 2011). Für die Translokation der Matrixproteine ist das Importomer zuständig (Rucktäschel et al. 2011), das aus zahlreichen Peroxinen besteht, zu denen der Docking-Komplex und ein „RING-Finger“ („Really Interesting New Gene“-Komplex gehören (Agne et al. 2003).

Peroxisomen sind in der Lage native und oligomerisierte Proteine über ihre Lipiddoppelschicht aufzunehmen (Glover et al. 1994, McNew & Goodman 1994, Häusler et al. 1996). Sogar Goldpartikel, die mit einer peroxisomalen Zielsequenz ausgestattet wurden und einen Durchmesser von 9 nm aufweisen, können die Membran durchqueren (Walton et al. 1995). Wie die Matrixprotein-Translokation genau erfolgt, war lange Zeit unklar. Neue Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Rezeptor Pex5p zusammen mit dem Peroxin Pex14p des Docking-Komplexes eine transiente Pore bilden (Meinecke et al. 2010), welche den Import der Matrixproteine – auch großer Komplexe – ermöglichen könnte (Erdmann & Schliebs 2005). Ob OPR3 ebenso in komplexer Form als Oligomer in Peroxisomen importiert werden könnte, bleibt zu beantworten.

1.10 Organ- und gewebespezifische Lokalisation der JA-Biosyntheseenzyme und der Jasmonsäure

Die subzelluläre Lokalisation der OPR3 in Peroxisomen ist bekannt (Strassner et al. 2002). Über die gewebespezifische Lokalisation von OPR3 gibt es bisher jedoch nicht viele Daten. Die Transkriptmenge der OPR3 ist in Blättern geringer als in Blüten, Antheren oder Wurzeln (Stintzi & Browse 2000, Strassner et al. 2002). OPR3-Transkripte akkumulieren jedoch sehr rasch in Blättern nach Verwundung oder JA-Behandlung (Costa et al. 2000, Müssig et al. 2000, Stintzi & Browse 2000, Strassner et al. 2002, Chung et al. 2008, Díaz et al. 2012). In unverwundeten Pflanzen sind außer in Blüten, Blättern und Wurzeln geringe Mengen der *OPR3* mRNA in Keimlingen und Schoten vorhanden (Costa et al. 2000).

Die höchste Konzentration an JA weisen Blüten, reproduzierendes Gewebe und seneszierende Blätter auf (Creelman & Mullet 1995, Hause et al. 2003a). Wurzeln zeigen eine geringere JA-Konzentration, obwohl die Wurzelspitzen signifikante Mengen des Hormons enthalten



(Creelmann & Mullet 1995). Der Gehalt an Jasmonsäure in Wurzeln ist niedriger als in Blättern und Blüten (Hause et al. 2003a). Deswegen wird angenommen, dass Zellen mit Chloroplasten den größten Anteil an OPDA und JA synthetisieren (Acosta & Farmer 2010). Es bleibt aber offen, ob nicht auch Zellen ohne Chloroplasten (wie die meisten Wurzelzellen) in der Lage sind, JA zu produzieren (Acosta & Farmer 2010), da das *LOX2*-Gen in der Elongationszone der Wurzeln exprimiert wird (Birnbaum et al. 2003).

Vieles spricht dafür, dass die gewebespezifische Biosynthese und der Transport der JA in den Leitbündeln stattfinden könnte: Für Tomate konnte gezeigt werden, dass JA und OPDA in den Hauptadern der Blätter nach Verwundung akkumulieren (Stenzel et al. 2003b). Reporter-gen-Analysen mit dem AOS-Promotor zeigen eine Expression des Gens in den Blattadern nach Verwundung (Kubigsteltig et al. 1999). Zudem findet die Expression der AOC aus Tomate in den Leitbündeln von Wurzeln, Stängeln und Blättern statt und Blütenstiele zeigen eine besonders hohe Jasmonat-Konzentration (Hause et al. 2000). In den Leitbündeln akkumuliert AOC in den Siebelementen und Geleitzellen. Ebenso können LOX und AOS in den Siebelementen von Blütenstielen detektiert werden (Hause et al. 2003b).

Die Akkumulation von JA und die Anwesenheit von Enzymen des Oktadekanoidweges in den Leitbündeln sprechen dafür, dass Jasmonsäure oder ein JA-Derivat, das Phloem-mobile Signal sein könnte, welches die systemische Antwort und die Aktivierung der Abwehrgene nach Verwundung vermittelt (Schaller & Stintzi 2008).



1.11 Zielsetzung der Arbeit

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Aktivität der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3) von deren Dimerisierungszustand abhängig und möglicherweise durch reversible Phosphorylierung reguliert wird. Eine Tyrosin-spezifische Proteinkinase könnte durch Phosphorylierung der OPR3 an Position Y364 (Tomate) bzw. Y365 (*Arabidopsis*) die Ausbildung eines inaktiven Homodimers bewirken. Die Aminosäure Y364 erscheint für eine Phosphorylierung prädestiniert, da sich in der Kristallstruktur des OPR3 aus Tomate in der Nähe dieser Aminosäure ein Sulfat-Ion befindet, welches die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Tyrosins imitieren könnte. Durch bestimmte Umweltbedingungen – wie beispielsweise Verwundung oder entwicklungsphysiologische Prozesse – könnte der inaktive phosphorylierte Zustand durch eine Phosphatase aufgehoben und OPR3 aktiviert werden, wodurch die rasche Synthese der Jasmonsäure ermöglicht werden würde. *In vitro* konnte bereits die Dimerisierung der OPR3 nachgewiesen werden (Breithaupt et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Dimerisierung der OPR3 *in vivo* untersucht werden. Der Dimerisierungszustand der OPR3 sollte dabei sowohl in unterschiedlichen Organismen und Pflanzenorganen untersucht, als auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und nach mechanischer Verwundung der Pflanzen getestet werden.

Außerdem sollte *in vivo* analysiert werden, ob durch die Veränderung spezifischer Aminosäuren der OPR3 Einfluss auf deren Dimerisierungspotential genommen werden kann. Dabei sollten Varianten der OPR3 untersucht werden, für die *in vitro* eine verminderte Fähigkeit zur Dimerisierung nachgewiesen wurde (Breithaupt et al. 2006).

Da peroxisomale Matrixproteine auch als Dimer importiert werden können (Brown & Baker 2008), sollte mittels eines Huckepack-Experimentes überprüft werden, ob dies auch für OPR3 möglich ist. Auf diese Weise sollte sich klären lassen, ob eine Dimerisierung der OPR3 schon im Cytosol oder erst in Peroxisomen stattfindet und ob cytosolisch lokalisierte Kinasen in die Kandidatensuche für eine OPR3-Phosphorylierung miteinbezogen werden müssen.

Zudem sollte für zwei potentiell OPR3-regulierende Proteinkinasen untersucht werden, ob diese einen Einfluss auf die Interaktion der OPR3 nehmen. In einem solchen Falle wäre zu erwarten, dass „loss-of-function“-Mutanten der ausgewählten Kinasen durch Zunahme der Jasmonsäure-Konzentration einen erhöhten Transkriptspiegel JA-abhängiger Gene aufweisen, was im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.



2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Plastikverbrauchsartikel wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Kulturröhrchen und Petrischalen wurden von SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht) bezogen. Nicht-sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor der Verwendung autoklaviert.

Sofern nicht abweichend angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Fluka und Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Merck KGaA (Darmstadt). Die verwendeten Antibiotika, Kulturmedien sowie die Agarose stammten von Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande).

2.1.2 Antikörper

Als primäre Antikörper wurden die Antikörper „anti-GFP, IgG, Anti-Green Fluorescent Protein Rabbit IgG Fraction“ von Invitrogen (Darmstadt) und „Monoclonal anti-Aktin (Plant) Clone 10-B3 Purified Mouse Immunoglobulin“ von Sigma verwendet. Außerdem wurde ein gegen das denaturierte OPR3 Protein aus *Arabidopsis thaliana* gerichtetes Antiserum aus Kaninchen antiAtOPR3 verwendet, welches um die Spezifität zu erhöhen, gegen in *E. coli* exprimierte S/OPR3 aufgereinigt wurde (siehe 2.11.1). Das Antiserum wurde von Florian Schaller (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt, beziehungsweise Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

Als sekundäre Antikörper wurden die Antikörper "Anti-Rabbit IgG, Heavy and Light Chain (Goat), Peroxidase Conjugate" und „Anti-Mouse IgG HRP Conjugate“ von Calbiochem (Darmstadt) verwendet.

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme, die alkalische Phosphatase (CIAP), die T4-DNA-Ligase und die *Pfu*-DNA-Polymerase stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und wurden nach Herstellerangaben in den vorgesehenen Puffern eingesetzt.

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2.1) wurden von Operon Biotechnologies (Köln) bezogen. Die Primer wurden in einem entsprechenden Volumen Tris/EDTA (TE)-Puffer



MATERIAL UND METHODEN

(10 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM EDTA) gelöst (Endkonzentration: 100 mM) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Matrize
5'S/OPR3ATG_SalI	CAC <u>GTCGACT</u> AATGGCGTCTTCAGCTC	S/OPR3
3'S/OPR3ΔSRL_PsI	CCG <u>CTGCAGT</u> CATAACGGTCCATTGCTT	S/OPR3
5'LeOPR1_XhoI	AACCTCGAGATGGAAAATAAAGTCGTTGA AGAGAAACAA	S/OPR1
3'LeOPR1ΔTGA_ClaI	TGA <u>ATCGAT</u> TGTCATGGTTTCTAGAAATGG ATAATCAGT	S/OPR1
5'AtOPR3_XhoI	GGG <u>CTCGAG</u> ATGACGGCGGCACAAGGG	AtOPR3 (At2g06050)
3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI	TGC <u>ATCGAT</u> AGAAGGAGCCAAGAAAGGAT AATCCGT	AtOPR3 (At2g06050)
5'OPR3_SpeI	AAG <u>ACTAGT</u> ATGACGGCGGCACAAGGGAA	AtOPR3 (At2g06050)
3'Y191F_XbaI	GAG <u>TCTAGAG</u> TCAGAGGCGGGAAGAAGGA G	AtOPR3 (At2g06050)
3'OPR3ΔSRL_XbaI	CTA <u>TCTAGAG</u> TCAAGAAGGAGCCAAGAAA GGATAATC	AtOPR3 (At2g06050)
5'OPR3ΔATG_XbaI	GAG <u>TCTAGA</u> ACGGCGGCACAAGGGAAGTTC	AtOPR3 (At2g06050)
5'OPR3 1126F (ocsTerm.)	TCAAGATCCAGTTGTTGGCTACACGG	AtOPR3 (At2g06050)
5'AtOPR3E292K Mut	GCTACCACGCCTACGGGCAAACA <u>AGT</u> CG GGAAGGCAAGGGAGTG	AtOPR3 (At2g06050)
3'AtOPR3E292K Mut	CACTCCCTTGCCTTCCC <u>GACTT</u> TGTTTGCCC GTAGGCGTGGTAGC	AtOPR3 (At2g06050)
5'AtOPR3Y365F Mut	CGCGGTTCAAGATTGATGGAAAGTTGAAT AAAT <u>TTA</u> ATCGGAAGACG	AtOPR3 (At2g06050)
3'AtOPR3Y365F Mut	CGTCTTCCGATTA <u>AA</u> TTTATTCAACTTTCCA TCAATCTTGAACCGCG	AtOPR3 (At2g06050)
5'AtOPR3Y191F Mut	CACGGGGCGCATGGT <u>TT</u> CCTCATTGATCAG TTT	AtOPR3 (At2g06050)
3'AtOPR3Y191F Mut	AAACTGATCAATGAGG <u>AA</u> ACCATGCGCCC CGTG	AtOPR3 (At2g06050)
5' YFPΔATG_ClaI	CGA <u>ATCGAT</u> GTGAGCAAGGGCGAGGAGC	YFP/CFP
3'YFP+SRL+TGA_XbaI	AGCT <u>TCTAGAT</u> CAGAGGCGGGACTTGTACA GCTCGTCCATGCCGA	YFP/CFP
3'YFP_XbaI	AGCT <u>TCTAGAT</u> CACTTGTACAGCTCGTCCAT GCCGA	YFP
5'cYFP_ClaI	TGGAT <u>CGAT</u> GACAAGCAGAAGAACGGCAT CAAGGT	YFP



MATERIAL UND METHODEN

3'nYFP+SRL+TGA_ <i>Xba</i> I	TCGTCTAGATCAGAGGCGGGAGGCCATGA TATAGACGTTGTGGCT	YFP
3'nYFP_ <i>Xba</i> I	TCGTCTAGATCAGGCCATGATATAGACGTT GTGGCT	YFP
5'YFP_ <i>Xho</i> I	AAACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG	YFP
3'YFPΔTAA_ <i>Bam</i> HI	CGTGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC	YFP
5'At3gATG_ <i>Not</i> I	GTTGCGGCCGCAATGGTTTCTTCTCAGTG	At3g08720
3'At3g_ <i>Not</i> I	TGAGCGGCCGCCTATGTGGTCCGATGAAG G	At3g08720
5'At3gΔATG_ <i>Bam</i> HI	TGTGGATCCGTTTCTTCTCAGTGTTCTGT	At3g08720
3'At3g_ <i>Xba</i> I	CCCTCTAGACTACAAGTTGGATGTGGTCC	At3g08720
At3g08720-662F	AGAGGCCTGTGATGTTGCTTACGA	At3g08720
At3g08720-2278R	AGTTGGATGTGGTCCGATGAAGGA	At3g08720
5'At4gATG_ <i>Not</i> I	ACTGCGGCCGCGATGGAAGAGGATTATCA	At4g18950
3'At4g_ <i>Not</i> I	CGTGCGGCCGCTCAACCGGATGATGAGC	At4g18950
5'At4gΔATG_ <i>Bam</i> HI	CCGGGATCCGAAGAGGATTATCAACAGCC	At4g18950
3'At4g_ <i>Xba</i> I	GCCTCTAGATCACAAATGTGAACCGGATG	At4g18950
At4g18950-1476F	ATGAGCTTGCATTGCTCCAAAGG	At4g18950
At4g18950-1476F	ATGAGCTTGCATTGCTCCAAAGGC	At4g18950
At4g18950-2491R	GAATAATGGCCGATGTTTGCCAGC	At4g18950
pDS-LB	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	T-DNA in At4g18950-Mutante
Salk-LBa1	TTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA	T-DNA in At3g08720-Mutante
334- <i>SIA</i> rOPR3	CGTGCATCTCATGCAGTGTATCAACC	AtOPR3 (At2g06050)
609- <i>SIA</i> rOPR3R	CCGGTCATTGATCCCATCTTTCAAGAAC	AtOPR3 (At2g06050)
0801-VSP1	TGGAACCTCGGGATTGAACCCATCA	VSP1 (At5g24780)
1025-VSP1R	TTGCGTCAACTTCGATCCGTTTGG	VSP1 (At5g24780)
83(83)-PDF1.2	TCGCTGCTCTTGTCTCTTTGCTG	PDF1.2a (At5g44420)



MATERIAL UND METHODEN

376(284)-PDF1.2R	GGGACGTAACAGATACACTTGTGTGTGC	PDF1.2a (At5g44420)
OPR1-121RT-F	TTCCTCAGCCTCACGCTGCCATA	S/OPR1
OPR1-408RT-R	TTGAGGCATCAATGGCTTATCCGA	S/OPR1
AtActin2-865	GTGGATATCAGGAAGGATCTGTACGGT	Actin2 (At3g18780)
AtActin2-1123R	TTCTGTGAACGATTCTGGACCTGC	Actin2 (At3g18780)
oligo(T) ₁₈	zu gleichen Anteilen TTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	PolyA-Schwanz der mRNA

Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

Gal4-BD-Cfor5	TCATCGGAAGAGAGTAG	pBridge (MCSI), pGBT9
pGAL4-BDrv3	AATCATAAGAAATTCGCC	pBridge (MCSI), pGBT9
GAL4-ADCfor5	TACCACTACAATGGATGATG	pGAD424
pGAL4-ADrv3	GAAGTTGCGGGGTTTTTC	pGAD424
pBridgeMCSIIfor5	CTTATGACGTGCCTGACTATGCCA	pBridge (MCSII)
pBridgeMCSIIrv3	AATTCCAAAGAAGCACCACCACCC	pBridge (MCSII)
pART7ocsrev.5	TATCATGCGATCATAGGCGTCTCG	Oktopin-Synthase (ocs)-Terminator
p35S-353	GGATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV 35S Promotor
OPR3PR-1612	GCTAATGACCTATCAATGTAC	AtOPR3 (At2g06050) Promotor
At3g08720-1628R	AGTCGGCAGCCTTATCATGTCCTT	At3g08720

Tab. 2.1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Restriktionsschnittstellen in den Primern sind unterstrichen. In Primern, die für die zielgerichtete Mutagenese verwendet wurden, ist das von der Punktmutation betroffene Codon grau hervorgehoben und die für die Mutation verantwortliche Base unterstrichen.

2.1.5 Plasmide

Um Protein-Protein Interaktionen *in vivo* in Hefe zu untersuchen, wurde das MATCHMAKER GAL4 „Two-Hybrid“ System von Clontech (Heidelberg) eingesetzt. Für die Proteinexpression in Hefen wurden die Vektoren pGAD424, pGBT9 und pBridge verwendet. Um die



Funktionalität des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zu überprüfen, wurden die Kontrollvektoren pVA3 (Iwabuchi et al. 1993), pTD1 (Li & Fields 1993, Chien et al. 1991) und pC11 (Fields & Song 1989) eingesetzt.

Zur beliebigen Amplifikation der DNA in Bakterien wurde der pCR®2.1 Topo® Vektor (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

Die Proteinexpression in Pflanzenzellen erfolgte mit dem binären Vektorsystem pART7 (Gleave 1992) und pBART (Derivat des pART27 (Gleave 1992), *NptII*-Gen für Kan-Resistenz wurde in pBART ersetzt durch *Bar*-Gen für Basta-Resistenz).

Als Matrizen für die Erstellung von DNA-Konstrukten (Tab. 2.11) dienten die Vektoren pEXSG-YFP (Feys et al. 2005), pECFP (Clontech, Heidelberg), pUNI-At3g08720 und pUNI-At4g18950 („Arabidopsis Resource Center“ (ABRC), Ohio State University), pET21a-S/OPR3 (Stintzi & Schaller, unveröffentlicht) und pSH11-EGFP-S/OPR1 (Strassner et al. 2002) (Tab. 2.2).

Bei der Transformation von Zwiebelepidermiszellen dienten die Vektoren pKAT2-eqFP611 (Forner & Binder 2007) und pCI60 mit der Insertion OPR2-eqRFP (Liebig & Stintzi, unveröffentlicht) als Transformations- und Lokalisationskontrollen. Der Vektor pKAT2-eqFP611 codiert für ein peroxisomal lokalisiertes Fusionsprotein aus der N-terminalen Hälfte der 2-Keto-acyl-CoA-Thiolase2 aus *Arabidopsis thaliana* (At2g33150) und eqRFP („Red Fluorescent Protein“) aus *Entacmaea quadricolor*. Das Fusionsprotein OPR2-eqRFP im Vektor pCI60 ist cytosolisch lokalisiert.

Plasmid	Kurzbeschreibung	Hersteller/Literatur
pGAD424	GAL4AD ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ , LEU2, amp ^r	Clontech/Bartel et al. 1993
pGBT9	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, amp ^r	Clontech/Bartel et al. 1993
pBridge	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, amp ^r	Clontech/Tirode et al. 1997
pVA3	murines p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ in pGBT9, TRP1, amp ^r	Clontech/Iwabuchi et al. 1993
pTD1	SV40 großes T-Antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pGAD3F, LEU2, amp ^r	Clontech/Chien et al. 1991, Li & Fields 1993
pC11	Vollständiger GAL4-Transkriptionsfaktor in YCp50 Derivat, LEU2, amp ^r	Clontech/Fields and Song 1989
pCR®2.1 Topo®	amp ^r , kan ^r , BIWe	Invitrogen
pART7	amp ^r	Gleave 1992
pBART	spec ^r , BASTA® ^r , BIWe	Derivat des pART27 (Gleave 1992)
pEXSG-YFP	YFP, amp ^r	Feys et al. 2005
pECFP	CFP, amp ^r	Clontech



MATERIAL UND METHODEN

pUNI51-At3g08720 pUNI51-At4g18950	At3g08720 bzw. At4g18950 cDNA in pUNI51, kan ^r	Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), Ohio State University
pART7-AtOPR3	cDNA der OPR3 (<i>A. thaliana</i>) in Vektor pART7, amp ^r	Stintzi & Browse 2000
pET21a-S/OPR3	cDNA der OPR3 (<i>S. lycopersicum</i>) in Vektor pET21a(+) (Novagen), amp ^r	Stintzi & Schaller (unveröffentlicht)
pSH11-EGFP-S/OPR1	ORF des GFP fusioniert mit ORF der OPR1 (<i>S. lycopersicum</i>) in pSH11 (Derivat des pBluescript pSK (Stratagene))	Strassner et al. 2002
pKAT2-eqFP611	nKAT2 (2-Keto-Acyl-CoA-Thiolase2) fusioniert mit eqRFP in pUC19, amp ^r	Förner & Binder 2007
pCI60-OPR2-eqRFP	ORF der OPR2 (<i>A. thaliana</i>) fusioniert mit ORF des eqRFP in pCI60 (Derivat des pBluescript (Stratagene), amp ^r	Liebig & Stintzi (unveröffentlicht)

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

BlWe: Blau-Weiß-Selektion, amp^r: Ampicillin-Resistenz, kan^r: Kanamycin-Resistenz, spec^r: Spectinomycin-Resistenz

2.2 Organismen

2.2.1 *Escherichia coli*

Um Plasmide zu vervielfältigen, wurden diese in den *E. coli*-Stamm DH10BTM (Invitrogen) bzw. ER2925 (New England Biolabs, Frankfurt) transformiert. Die *E. coli*-Stämme wurden bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Stamm	Genotyp	Resistenz
DH10B TM	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ⁻</i>	-
ER2925	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	cam ^r

Tab. 2.3: Verwendete *E. coli*-Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps sowie der Resistenzeigenschaft

cam^r: Chloramphenicol-Resistenz



2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Transformation von *A. thaliana* wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (pMP90; Clough & Bent 1998) verwendet.

Stamm	Genotyp	Resistenz
GV3101 (pMP90)	<i>rpoH⁺ hrcA⁺</i>	Rif ^r , Gm ^r

Tab. 2.4: Verwendeter *A. tumefaciens*-Stamm unter Angabe des Genotyps sowie der Resistenzeigenschaft
Rif^r: Rifampicin-Resistenz, Gm^r: Gentamycin-Resistenz

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Proteinexpression im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* HF7c (Clontech, Heidelberg) verwendet.

Stamm	Genotyp
HF7c	<i>MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS 2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3::(GAL17mers) 3-Cyc1_{TATA}-lacZ</i>

Tab. 2.5: Verwendeter *S. cerevisiae*-Stamm unter Angabe des Genotyps

2.2.4 *Arabidopsis thaliana*

Für die Transformation und Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana* wurde der Ökotyp *Was-silewskija* (*Ws*) und die T-DNA-Insertionslinie *opr3* (CS 2338, Stintzi & Browse 2000) verwendet.

Für die Analyse der Gene *At3g08720* bzw. *At4g18950* wurden die T-DNA-Insertionslinien SALK_013334, SALK_039937 und SALK_083811 bzw. WiscDsLox345-348B17 (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) ausgewählt und die Samen vom „Nottingham Arabidopsis Stock Centre“ (NASC) bezogen.

Promotor:GUS-Pflanzen

Die Promotor:GUS-Pflanzen *AOS:GUS*, *LOX2:GUS-LUC*, *OPR3:GUS-GFP* und *VSP2:GUS-GFP* wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt. Genfusionskonstrukte wurden erstellt und unter Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation in *A. thaliana* eingebracht.



AOS:GUS

Das Konstrukt *AtAOS*-Promotor:GUS wurde von Ines Kubigsteltig zur Verfügung gestellt (Kubigsteltig et al. 1999).

LOX2:GUS-LUC

Das Konstrukt *AtLOX2*-Promotor:GUS-LUC wurde von John Mundy zur Verfügung gestellt (NASC „Stock Number“ N57953).

OPR3:GUS-GFP

Für das Konstrukt *AtOPR3*-Promotor:GUS-GFP wurde ein 2 kb großes Promotorfragment des *OPR3*-Gens aus *Arabidopsis* in die NotI Stelle des Vektors pGreen 0229 eingebracht, welcher bereits das GUS (*uidA*)-GFP Fusionsgen enthielt (Stintzi & Schaller, unveröffentlicht).

VSP2:GUS-GFP

Für das Konstrukt *AtVSP2*-Promotor:GUS-GFP wurde ein 1,5 kb großes Promotorfragment des *VSP2*-Gens aus *Arabidopsis* in den Vektor Green 0229 eingebracht, welcher bereits das GUS (*uidA*)-GFP Fusionsgen enthielt (Vogelmann 2005).

2.3 Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C für einen Tag und der verwendete *Agrobacterium*-Stamm bei 28 °C für zwei Tage in sterilem Luria-Bertani (LB)-Medium (20 g/l LB broth low salt, 5 g/l NaCl (Duchefa Biochemie B.V.)) kultiviert. Im Fall flüssiger Kulturen erfolgte die Anzucht unter Schütteln (ca. 230 rpm). Stämme mit Resistenzeigenschaften wurden stets in Medium mit den entsprechenden Antibiotika gezüchtet. Art und Konzentration der verwendeten Antibiotika können Tab. 2.6 entnommen werden. Von jedem Antibiotikum wurden Stammlösungen hergestellt, die sterilfiltriert (Porengröße: 2 µm), aliquotiert und bei -20° C aufbewahrt wurden.

Für die Herstellung von festem Medium wurden vor dem Autoklavieren 12 g/l Agar zugegeben. Das Versetzen mit Antibiotika erfolgte nach Abkühlung des Mediums auf ca. 50 °C. Anschließend wurde das Medium steril in Platten gegossen. Über Nacht (ÜN)-Kulturen von Einzelkolonien besaßen ein Volumen von ca. 3 ml und wurden mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft.

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden 800 µl einer frischen ÜN-Kultur mit 200 µl sterilen 80 % v/v Glycerin vermischt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.



Zur Reaktivierung eines Stammes wurde ein Aliquot der Glycerinkultur auf entsprechendem Medium ausgestrichen.

Antibiotika	Stammlösung (mg/ml) in ddH ₂ O	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	100	100
Kanamycin	50	50
Spectinomycin	100	100
Gentamycin	50	50

Tab. 2.6: Verwendete Antibiotika unter Angabe der Stammlösung und Endkonzentration im Medium

2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung der Hefezellen wurde nach dem Hefe-Protokoll-Handbuch von Clontech (Heidelberg) durchgeführt. Für die Kultivierung wurde je nach Anforderung steriles YPDA-Medium, SD-Medium oder SD/X-Gal-Medium verwendet.

Alle Medien wurden nach dem Autoklavieren auf 55 °C abgekühlt und mit 50 ml/l einer sterilen 40 %-igen Glucose-Lösung (D-(+)-Glucose, Endkonzentration 2 % (v/v)) versetzt. Die Glucose wurde nach und nach in erwärmten ddH₂O gelöst und anschließend sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 µm). Das Endvolumen der Medien wurde mit ddH₂O auf 1 Liter eingestellt. Für Festmedium wurden 15-20 g/l Agar vor dem Autoklavieren ins jeweilige Medium gegeben. Die Hefezellen wurden bei 30 °C für zwei Tage kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei ca. 230-270 rpm geschüttelt. ÜN-Kulturen von Einzelkolonien (Durchmesser 2-3 mm) besaßen ein Volumen von ca. 5 ml und wurden mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft.

YPDA-Medium

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte in YPDA Medium (20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 40 mg/l Adenin-Hemisulfat, pH 6,5 mit H₂SO₄). Das YPDA-Medium wurde zunächst mit ddH₂O auf ein Volumen von 950 ml eingestellt, der pH-Wert geprüft, das Medium autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 40 %-iger Glucose (s. o.) versetzt.

SD-Medium

Für die Selektion transformierter Hefezellen wurde ein Minimalmedium verwendet. Der verwendete Hefestamm HF7c kann aufgrund von Auxotrophie auf Minimalmedium ohne Adenin, Histidin, Lysin, Leucin, Tryptophan und Uracil normalerweise nicht wachsen. Durch die Transformation von Plasmiden, welche Gene enthalten, die die Auxotrophie komplemen-



tieren und der Kultivierung auf SD-Minimalmedium können transgene Hefezellen selektiert werden.

Das SD-Minimalmedium (1,7 g/l Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Aminosäuren (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich), 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,8 mit NaOH) wurde zunächst mit ddH₂O auf ein Volumen von 850 ml eingestellt, das Medium autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 40 %-iger Glucose (s. o.) versetzt. Anschließend wurden dem Medium zusätzliche Nährstoffe beigefügt, die für ein Wachstum der Hefen benötigt wurden (Tab. 2.7), wenn sie nicht durch die Aufnahme eines transformierten Plasmids komplementiert werden konnten. Es wurden Stammlösungen („100 x Dropout supplement“) erstellt und diese vor Verwendung sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 μm). Dem Medium wurden jeweils 10 ml/l der Stammlösungen zugegeben. Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert (bis zu einem Jahr möglich).

Nährstoffe	100 x Stammlösung
L-Adenin Hemisulfat Salz	2000 mg/l
L-Histidin/HCl Monohydrat	2000 mg/l
L-Leucin	10000 mg/l
L-Lysin/HCl	3000 mg/l
L-Tryptophan	2000 mg/l
L-Uracil	2000 mg/l

Tab. 2.7: Verwendete Zusätze („Dropout Supplement“) für das SD-Medium

SD/X-Gal-Medium

Für das Hefe-Zwei-Hybrid Experiment (siehe 2.13.1) wurden die Hefezellen auf SD/X-Gal Medium kultiviert. Als Grundlage für dieses Medium wurde SD-Minimalmedium (s. o.) verwendet. Das Ausgangsvolumen lag hier jedoch bei 750 ml und der pH-Wert wurde über die Zugabe (100 ml/l) der Lösung 10 x BU-Salze (70 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l NaH_2PO_4 , pH 7,0, autoklaviert) eingestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 55 °C wurden zusätzlich zu 40 % Glucose und den 100 x Nährstoff-Stammlösungen 4 ml/l X-Gal-Lösung (20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid in Dimethylformamid) zugegeben.



2.5 Anzucht und Kreuzung von *A. thaliana*

2.5.1 Anzucht der Pflanzen in Gewächshaus und Anzuchttraum

Trockene *Arabidopsis*-Samen wurden zur Vorbeugung einer Thrips-Infektion ÜN bei -70 °C eingefroren, um Thripseier abzutöten, danach in 0,1 % (w/v) Agar ein bis drei Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert. Ersatzweise wurden nichtstratifizierte Samen auf Erde ausgesät und zwei bis drei Tage im Kühllabor gelagert. Die stratifizierten Samen wurden je nach Versuch in Töpfe oder Schalen ausgelegt und mit Plastikhauben abgedeckt. Sobald die Keimlinge vier Blätter hatten, wurde diese Abdeckung wieder entfernt.

Die Kultur erfolgte bei 22 °C und einer Photoperiode von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit mit einer Lichteinstrahlung von 80-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

2.5.2 Anzucht der Pflanzen auf Agarplatten

Für die Anzucht von Pflanzen auf Agarplatten, wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie 5 min in 70 % (v/v) Ethanol, dann 10 min in 6 % (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung mit 0,1 % (v/v) Triton x-100 geschwenkt und anschließend mindestens fünfmal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden in 0,1 % Agar aufgenommen, auf ½ MS-Platten (2,2 g/l MS Salt, 0,5 % (w/v) Saccharose, pH 5,8, 1 % (w/v) Agar) ausgelegt und vor der Kultivierung (siehe 2.5.1.) für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert.

2.5.3 Kreuzung der Pflanzen

Für eine Kreuzung wurden von einer Pflanze der Stempel einer Blüte und von einer anderen Pflanze die Staubblätter einer oder mehrerer Blüten verwendet. Für die Präparation des Stempels wurden von einer Blüte im Stadium 12 die Blüten- und Kelchblätter sowie die Staubblätter vorsichtig mit einer feinen Pinzette entfernt. Für die Präparation der Staubblätter wurden von Blüten, die sich in Stadium 13 oder 14 befanden, die Blüten- und Kelchblätter, sowie der Stempel entfernt. Anschließend wurde mit den Staubblättern vorsichtig mehrmals über die Narbe des präparierten Stempels gestrichen. Der bestäubte Stempel der Blüte wurde gegen Austrocknung und Fremdbestäubung vorsichtig mit Frischhaltefolie umhüllt. Nach drei bis fünf Tagen wurde diese wieder entfernt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Elektroporation von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Elektrokompetente Zellen (40 μl) wurden auf Eis langsam aufgetaut. Es wurde 1 μl Plasmid-DNA zugegeben, 1 min auf Eis inkubiert und die Zellen wurden in eine gekühlte Elektropora-



tionsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation wurde bei 2500 V, 15 μ F und 335 Ω durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml SOC-Medium (2 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % Bacto (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 6,8-7,0 mit NaOH) aufgenommen und *E. coli* 1 h bei 37°C und 230 rpm, *A. tumefaciens* 2-3 h bei 28 °C und 230 rpm im Orbital-schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die verbleibende Flüssigkeit wurde 1 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 μ l verworfen, das Zellsediment in der verbleibenden Flüssigkeit suspendiert und ebenfalls ausplattiert.

Sofern eine Blau-Weiß-Selektion möglich war (bei Transformation mit pBART und pCR®2.1 Topo®), wurden auf die Platten zuvor 40 μ l IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, Stammlösung 100 mM in ddH₂O) zur Aktivierung des *Lac*-Promotors und 40 μ l X-Gal (20 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid in Dimethylformamid), das durch die β -Galaktosidase in einen blauen Farbstoff gespalten wird, gegeben. *A. tumefaciens* wurde zwei Tage bei 28 °C und *E. coli* einen Tag bei 37 °C inkubiert. Die resistenten Kolonien konnten anschließend mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in flüssiges LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt werden.

2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

2.6.2.1 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 5 ml Übernachtskultur in YPDA-Medium (siehe 2.4) herangezogen. Die Kultur wurde bei 3000 x g für 10 min abzentrifugiert und der Zelniederschlag in 500 μ l des Überstandes resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde eine 100 ml YPDA-Kultur inokuliert und bei 30 °C und 230-270 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 x g geerntet und in 20 ml Lösung A (10 mM Bicine, 1 M Sorbitol, 3 % (v/v) Ethylenglykol, pH 8,35 mit KOH) gewaschen (Lösung A wurde bei -20 °C gelagert). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml Lösung A resuspendiert und in 100 μ l Aliquots bei -70 °C in einem Styroporbehälter eingefroren und gelagert.

2.6.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Um Plasmide in Hefezellen zu transformieren, wurde nach dem Protokoll von (Dohmen et al. 1991) vorgegangen. Zur Transformation der kompetenten Hefezellen (siehe 2.6.2.1) wurde 0,1-1 μ g Plasmid-DNA zu 50 μ g Lachsspermien-Träger-DNA (10 mg/ml in TE, 10 mM



Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) gegeben und auf ein Aliquot der gefrorenen, kompetenten Hefezellen pipettiert. Die Träger-DNA wurde vor der Verwendung mit Ultraschall behandelt, 10 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und danach 10 min auf Eis abgeschreckt. Dieser Denaturierungsschritt musste jedoch nicht vor jeder Transformation wiederholt werden.

Nach dem Auftauen der Hefezellen bei 37 °C für 3 min wurde 1 ml Lösung B (200 mM Bicine, 40 % (w/v) Polyethylenglycol 1000, pH 8,35 mit KOH) zugegeben, gemischt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 16000 x g für 20 sec geerntet und in 800 µl Lösung C (10 mM Bicine, 150 mM NaCl, pH 8,35) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 100 µl Lösung C resuspendiert und auf einer geeigneten SD/Drop-in Platte (siehe 2.4) ausplattiert. Nach etwa zwei Tagen konnte man die ersten Kolonien erkennen und nach drei Tagen konnten diese Kolonien für weitere Versuche verwendet werden.

2.6.3 Transformation von *A. thaliana* mittels „Floral Dip“

Vorbereitung der Pflanzen

Die primäre Infloreszenz von ca. vier Wochen alten Pflanzen wurde abgeschnitten, um die Bildung von Sekundärinfloreszenzen zu fördern. Waren diese ca. 2-10 cm lang, waren die Pflanzen optimal geeignet für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation mittels „Floral Dip“ (Clough & Bent 1998). Einige Stunden vor der Transformation wurden die Pflanzen gut gewässert.

Animpfen der *Agrobacterium tumefaciens*-Kultur

2 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden mit einer Kolonie der transformierten *A. tumefaciens* GV3101 angeimpft und für zwei Tage bei 28 °C und 230 rpm inkubiert. 150 ml frisches LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 100-200 µl dieser Vorkultur angeimpft und wiederum bei 28 °C und 230 rpm geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Die Kultur wurde bei 3400 x g 30 min abzentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Bakterien wurden in 300 ml 5 %-iger (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,03 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) resuspendiert.

Transformation der Pflanzen

Die Blüten-Knospen der zu transformierenden Pflanzen wurden in die *A. tumefaciens*-Suspension eingetunkt. Mit Hilfe einer Plastikpipette wurde etwas Bakteriensuspension in die



Mitte der Blattrosette getropft, um auch nachwachsende Blütenprosse mit den Bakterien zu benetzen. Die Pflanzen wurden anschließend mit einer Plastikhaube abgedeckt, welche dicht verschlossen wurde, um durch eine hohe Luftfeuchtigkeit die Transformationsrate zu erhöhen. Nach zwei Tagen, in denen die Pflanzen vor direkter Lichteinstrahlung geschützt wurden, wurde die Haube abgenommen.

Um Samen von männlich sterilen *opr3* Pflanzen zu erhalten, wurden diese jeden zweiten Tag mit Methyljasmonat (0,03 % (v/v) Methyljasmonat-Lösung mit 0,01 % (v/v) Tween-20) besprüht.

Selektion

Da die Transformationsrate meist unter 0,1 % (für *opr3*) liegt, war es nötig mindestens 10000-15000 Samen auszubringen, um eine ausreichende Zahl an transformierten Pflanzen zu erhalten. Enthielt das Transformationskonstrukt das *bar*-Gen, welches zur Resistenz gegen das Herbizid BASTA® führt, wurden die Samen in eine Kiste (28 cm x 45 cm) mit Erde ausgelegt, die mit 35 mg BASTA® (BAYER CropScience, Monheim) pro Liter Wasser angefeuchtet worden war. Für die Aussaat wurden die Samen in ca. 50 ml 0,1 % Agar aufgenommen und mit einer Spritzflasche gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde die Kiste mit einer Plastikhaube verschlossen. Nichttransformierte Pflanzen kamen nicht über das Kotyledonenstadium hinaus und starben ab, während transformierte Pflanzen kaum Wachstumseinschränkungen zeigten.

Die erfolgreiche Insertion der transformierten Konstrukte und deren Expression wurden mittels PCR (siehe 2.6.7.1) und Western-Blot-Analyse (siehe 2.11.7) und/oder Fluoreszenzmikroskopie (Konstrukte mit YFP) anschließend nochmals überprüft.

2.6.4 DNA-Extraktion

2.6.4.1 Plasmidisolierung (Minipräparation) aus *E. coli*

Eine Bakterienkolonie wurde ÜN in 2 ml LB-Medium mit einer entsprechenden Antibiotikakonzentration bei 37 °C und 230 rpm im Orbitalschüttler angezogen. Am nächsten Tag wurden von dieser Kultur 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen 2 min bei 16000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl Lösung I (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Es folgte die Lyse der Zellen, indem 150 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)) hinzugefügt, der Ansatz gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Die Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure), kurzes Invertieren und eine weitere Inkuba-



tionszeit von 5 min auf Eis führte zur Fällung von SDS und SDS-Proteinkomplexen sowie zur Bildung eines unlöslichen Komplexes der chromosomalen DNA. Diese wurden anschließend für 10 min bei 4 °C und 16000 x g sedimentiert und der erhaltene Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit dem zweifachen Volumen an 99 % Ethanol und 15 min Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA gefällt und bei 4 °C und 16000 x g sedimentiert. Der Niederschlag wurde in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) gelöst. Um die RNA zu entfernen, folgte die Zugabe von 1 µl pankreatischer RNase (10 mg/ml), mit welcher die Proben 30 min bei 37 °C inkubiert wurden.

Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, 2 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt, in welchem das gleiche Volumen Chloroform vorgelegt worden war. Der Ansatz wurde erneut ausgeschüttelt und zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Gefällt wurden die Plasmide für 30 min bei -20 °C mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumen an 99 % (v/v) Ethanol. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4 °C und 16000 x g. Der Niederschlag wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl TE-Puffer gelöst. Die so isolierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.4.2 Extraktion genomischer DNA aus *A. thaliana*

In Stickstoff geerntete Blattproben wurden mit einem Pistill zügig zerrieben, 100 µl DEX-Puffer (0,14 M Sorbitol, 0,22 M Tris/HCl pH 8, 0,222 M EDTA pH 8) mit 0,8 M NaCl, 0,8 % (w/v) Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 1 % (w/v) Sarcosin, und frisch zugeetzten 20 µl β-Mercaptoethanol/ml) wurden dazugegeben und weiterzerrieben bis das Material aufgetaut war. Es wurde 100 µl Chloroform zugegeben, 10 sec gemischt und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 100 µl Isopropanol gefällt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (Bedingungen s. o.). Der Niederschlag wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.6.5 RNA-Extraktion aus *A. thaliana*

In flüssigen Stickstoff geerntetes Pflanzenmaterial wurde ebenfalls in Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Das 2,5-fache Volumen Extraktionspuffer (0,2 M Natriumtetraborat,



30 mM Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), pH 9, 1 % (w/v) SDS, vor Gebrauch sterilfiltriertes (Porengröße: 0,2 µm) Dithiothreitol (DTT) (Endkonzentration 10 mM) wurde in einem Reaktionsgefäß auf 50 °C erwärmt und das noch gefrorene zerriebene Pflanzenmaterial in dieses überführt. Um Zelltrümmer zu beseitigen wurde bei 4 °C und 16000 x g 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) 5 min ausgeschüttelt. Es wurde erneut für 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein zweites Mal 5 min mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und wiederholt für 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 5 min mit Chloroform ausgeschüttelt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen, nach welchem der Überstand mit dem gleichen Volumen an 4 M LiCl mit 10 mM EDTA pH 8 versetzt, vorsichtig invertiert und ÜN auf Eis bei 4 °C im Kühllabor gefällt wurde.

Am darauffolgenden Tag wurde zunächst 30 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 400 µl ddH₂O resuspendiert und mit dem 2,5-fachen Volumen kaltem 95 % (v/v) Ethanol und 1/50 Volumen 5 M NaCl 30 min bei -20 °C gefällt. Nach der darauffolgenden Zentrifugation von 20 min bei 16000 x g und 4 °C wurde der Niederschlag mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet, in 30-40 µl ddH₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Um die Qualität der RNA zu testen, wurde zunächst die Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen, die Lösungen wurden auf 1 µg/µl verdünnt und pro Probe 2 µl mit 16 µl ddH₂O und 2 µl RNA-Ladepuffer (50 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 2 % EtBr 10 mg/ml) über ein Agarosegel aufgetrennt.

2.6.6 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Zunächst erfolgte ein DNase-Verdau. Hierbei wurden 4 µg RNA in 15 µl ddH₂O mit 2 µl 10 x Puffer (MBI Fermentas) und 1 µl DNase I (entspricht 1 Unit; MBI Fermentas) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA pH 8 und einer Inkubation für 15 min bei 65 °C gestoppt.

Für die RT-Reaktion wurden 2 µl oligo(dT)₁₈ (0,5 µg/µl) zugegeben, das Gemisch für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 8 µl 5 x Puffer (Buffer M-MuLV RT, MBI Fermentas) 4 µl dNTP-Mix (10 mM, Bioline, Luckenwalde) und 4 µl ddH₂O dazupipettiert, für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 37 °C 2 µl (entspricht



400 Units) RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) hinzugefügt. Die Reaktion lief 1 h bei 42 °C und wurde durch Erhitzung auf 70 °C für 15 min gestoppt.

2.6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.6.7.1 Standard-PCR

Eine normale Standard-PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit 5 µl 5 x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 0,08 % (v/v) Triton X-100, 20 % (v/v) DMSO, 250 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,3), 0,5 µl dNTPMix (10 mM, Bioline), 0,5 µl thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase und je 0,5 µl der 10 µM "Forward"- und "Reverse"-Primer durchgeführt. Als Arbeitslösung der Primer diente eine 10-fache Verdünnung der Stammlösung (Endkonzentration 10 mM, siehe 2.1.4). Die Menge an DNA-Matrize variierte zw. 10 und 100 ng je nach Ausgangsmaterial (Plasmid-DNA, genomische DNA, cDNA). Das Endvolumen von 25 µl wurde durch Zugabe von sterilen ddH₂O erreicht. Für Klonierungen wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonucleasaktivität eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit möglicher Replikationsfehler zu verringern. Hierbei wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl erhöht, die eingesetzte Menge an Primern, DNA-Polymerase und dNTPs verdoppelt und ein spezifischer 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM MgSO₄) für die *Pfu*-Polymerase eingesetzt.

PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler MyCycler™ (BioRad, München) unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur des 40-sekündigen Primer-Anlagerungsprozesses wurde so gewählt, dass sie 1-3 °C unter der Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur lag. Eine Ausnahme von den in der Tab. 2.8 angegebenen Reaktionsbedingungen erfolgte nur, wenn die Schmelztemperatur eines Primers unter 55 °C lag. In diesem Fall wurden zunächst 3 volle Zyklen (Denaturierung 30 sec, Anlagerung 40 sec, Elongation x sec) bei einer geringeren Anlagerungstemperatur als 55 °C und anschließend 25-27 volle Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C durchgeführt (Tab. 2.8).



Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	20 sec	24-35
Anlagerung	55-61°C (je nach Primer)	40 sec	24-35
Elongation	72 °C	x sec (1 min pro 1 kb)	24-35
Elongation	72 °C	10 min	1
Endtemperatur	10 °C	∞ min	1

Tab. 2.8: Verwendete Bedingungen für Standard-PCR-Reaktionen

2.6.7.2 Kolonie-PCR

Es wurden 3,5 µl ddH₂O in einem 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers ein Teil einer Bakterienkolonie (*E. coli* oder *A. tumefaciens*) von einer Platte abgestrichen und in das vorgelegte Wasser überführt. Durch einen Inkubationsschritt von 5 min bei 95 °C im Thermocycler wurden die Bakterien lysiert und die enthaltene DNA freigesetzt. Danach wurde das PCR-Reaktionsgemisch (siehe 2.6.7.1) zugesetzt und eine Standard-PCR durchgeführt.

2.6.7.3 Mutagenese-PCR

Die ortsspezifische Mutagenese dient der gezielten Mutation, Deletion oder Insertion einzelner Basen eines DNA-Konstruktes. Dies erfolgt während einer PCR-Reaktion mit Hilfe spezifischer Primer, welche an die Matrize binden, jedoch die einzuführenden Mutation durch geänderte Basenabfolge enthalten.

Für die Mutagenese verwendete Primer erfüllten folgende Parameter:

- Länge: 25-45 Basen, mit einer Schmelztemperatur über 70 °C
- Die gewünschte Mutation befand sich in der Mitte der Primer, so dass noch mindestens 10-15 Basen beider Seiten des Primers an die Matrize binden konnten.
- Beide Primer beinhalteten die gewünschte Mutation und überlagerten sich über ihre gesamte Länge.

Als DNA Matrize diente 50 ng zirkuläre Plasmid-DNA, welche das zu mutierende Konstrukt enthielt (*A_tOPR3* in Vektor pART7). Die Mutagenese-PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Veränderungen zu den unter 2.6.7.1 angegebenen Reaktionsbedingungen waren der Einsatz von nur 0,9 µl "Forward"- und "Reverse"-Primer (10 µM), eine geringere Elongationstemperatur von 68 °C und eine verminderte Zyklenzahl von 15-17 Zyklen. Um die Wahrscheinlichkeit möglicher Replikationsfehler gering zu halten,



wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. In der Reaktion wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des Plasmides gewählt. Als Matrize wurde Plasmid-DNA des *dam+* *E. coli*-Stammes DH10B verwendet, welcher GATC-Abschnitte der DNA methyliert. Amplifizierte Plasmid-DNA enthält keine methylierte DNA. Auf diese Weise wurde nach der PCR-Reaktion durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym *Dpn* I (10 Units/µl), welches methylierte DNA erkennt, nur die Matrizen Plasmid-DNA gespalten. Der Spaltungsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. 1 µl der nach der Spaltung noch verbleibenden Plasmide wurden mittels Elektroporation (siehe 2.6.1) in kompetente *E. coli* DH10B transformiert. Zur Überprüfung, ob die Mutagenese erfolgreich war, wurden die Plasmide sequenziert (siehe 2.6.10). Die durch PCR-Mutagenese erstellten Konstrukte können Tab. 2.9 entnommen werden.

Ausgangs-Plasmid (Matrize)	Primer	Erstelltes Konstrukt
<i>At</i> OPR3 in Vektor pART7	5' <i>At</i> OPR3E292K Mut, 3' <i>At</i> OPR3E292K Mut	<i>At</i> OPR3 _{E292K} (E292K)
<i>At</i> OPR3 in Vektor pART7	5' <i>At</i> OPR3Y365F Mut, 3' <i>At</i> OPR3Y365F Mut	<i>At</i> OPR3 _{Y365F} (Y365F)
<i>At</i> OPR3 in Vektor pART7	5' <i>At</i> OPR3E292K Mut, 3' <i>At</i> OPR3E292K Mut 5' <i>At</i> OPR3Y365F Mut, 3' <i>At</i> OPR3Y365F Mut Konstrukt DMEY wurde aus E292K und Y365F erstellt (Tab. 2.6.9.6)	<i>At</i> OPR3 _{E292K; Y365F} (DMEY)
<i>At</i> OPR3 in Vektor pART7	5' <i>At</i> OPR3Y191F Mut, 3' <i>At</i> OPR3Y191F Mut	<i>At</i> OPR3 _{Y191F} (Y191F)

Tab. 2.9: Durch Mutagenese-PCR erstellte Konstrukte

2.6.8 Agarosegelelektrophorese

Vor der Auftrennung wurde die zu analysierenden Proben mit einer entsprechenden Menge an 10 x DNA-Ladepuffer (50 % v/v Glycerin, 1mM EDTA, 0,03 % w/v Bromphenolblau) versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte mit Hilfe von 1 bzw. 3 %-igen (w/v) Tris-Acetat-EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA pH 8)-gepufferten Agarosegelen mit 1 µl 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung/100 ml Gelvolumen. Als Größenstandard wurden 300 ng (in 3 µl) GeneRuler™ 1 kb bzw. 100 bp DNA Ladder (MBI-Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Laufspannung von 80-120 Volt. Die Auftrennung der DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (254 nm, Eagle Eye-System von Stratagene (Erlangen)).



2.6.9 DNA-Klonierung

2.6.9.1 DNA-Elution aus einem Agarosegel

Um DNA-Fragmente zu isolieren, wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt, die benötigte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „DNA Elution Kit“ (Qiagen) nach Gebrauchsanleitung eluiert. Um die DNA anschließend zu fällen wurden 2,5 Volumen 99 % (v/v) Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben und mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde der Niederschlag in 2,5 Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vollständig verworfen. Nach dem Trocknen des Niederschlags wurde er in einem kleinen Volumen (10-30 µl) ddH₂O aufgenommen.

2.6.9.2 Restriktionsverdau der DNA

Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Verdau von DNA erfolgte in einem Volumen von 20 µl für mindestens 2 h bei 37 °C. Der Verdau wurde mit 2 µl DNA (0,1-1 µg), 0,3 µl Restriktionsenzym (ca. 10 U), 2 µl des entsprechenden 10 x Puffers und sterilem ddH₂O angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.6.8).

Präparativer Restriktionsverdau

Für präparative Zwecke wurden Ansätze in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 10 µl DNA (ca. 1 µg/µl), 10 µl 10 x Puffer, 2,5 µl (25 U) je Restriktionsenzym und die entsprechende Menge an ddH₂O. Der Spaltansatz wurde für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.6.8).

2.6.9.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Um Religationen einfach restriktiv gespaltener Vektoren zu vermeiden, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden der Schnittstellen mit alkalischer Phosphatase (CIAP) entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Puffer des Restriktionsverdaus unter Zugabe von 1 µl CIAP (1 U/µl) je µg Vektor-DNA). Der Ansatz wurde für 1,5-3 h bei 37 °C inkubiert. Um die CIAP zu inaktivieren, wurde 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben und der Ansatz bei einem Hitzeschritt von 75 °C und 10 min inkubiert. Anschließend wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, 2 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 1 Volumen Chloroform vorgelegt worden war. Der



Ansatz wurde erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 99 % (v/v) Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) gefällt. Der Niederschlag wurde in 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.6.9.4 Ligation

Für die Ligation der DNA-Fragmente wurde angestrebt, dass das Insert gegenüber dem Vektor im 5:1 Überschuss vorliegt. Abgeschätzt wurden die Mengen anhand der Bandenintensität auf einem Agarosegel. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, das je entsprechende Mengen an Insert und Vektor, sowie 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10 x Puffer (400 mM Tris/HCl (pH 7,8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (Fermentas)) enthielt. Die Ligation wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
16 °C	8 h	1
30 °C	1 h	1
65 °C	10 min	1
10 °C	∞	1

Tab. 2.10: Reaktionsbedingungen für die Ligation

2.6.9.5 TOPO-Ligation

Um ein PCR-Produkt (siehe 2.6.7.1) für die weitere Klonierung unbegrenzt verfügbar zu machen, wurden sie mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Merck KgAG; Darmstadt) in den pCR®2.1 TOPO® ligiert und anschließend in *E. coli* amplifiziert. Hierzu wurde 1 µl des aufgereinigten PCR-Fragments mit 1,5 µl 1:4 verdünnter Salzlösung und 0,5 µl TOPO-Lösung versetzt und 30 min bei RT inkubiert.



2.6.9.6 Klonierungsvorgehen bei in der Arbeit erstellten DNA-Konstrukten

Die Klonierung der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte wurde nach folgendem Schema ausgeführt: Zunächst wurde der ORF des gewünschten Gens mittels PCR (siehe 2.6.7.1) amplifiziert. Als Matrize diente durch Plasmidisolierung gewonnene Plasmid-DNA (siehe 2.6.4.1). Durch die PCR wurden Restriktionsschnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme eingefügt, wenn nötig Start- oder Stoppcodons entfernt und das peroxisomale Zielsignal SRL entfernt oder angefügt. Das PCR Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.8), aus dem Gel eluiert und mit Ethanol gefällt (siehe 2.6.9.1). Anschließend wurde ein präparativer Restriktionsverdau des eluierten PCR-Produktes und der Vektor-DNA (aus Plasmidisolierung) mit anschließender Dephosphorylierung der Vektor-DNA (siehe 2.6.9.3) durchgeführt. Sowohl das PCR-Produkt als auch die Vektor-DNA wurden mit Phenol/Chloroform und Ethanol gefällt wie unter 2.6.9.3 beschrieben. Vektor-DNA und PCR-Insert wurden ligiert (siehe 2.6.9.4) und in durch Elektroporation (siehe 2.6.1) in *E. coli* DH10B oder ER2925 transformiert. Bei der Erstellung von Fusionskonstrukten (z. B. OPR3-YFP) wurde der gesamte Vorgang nochmals wiederholt um den ORF des Fusionspartners einzufügen. Sollte das Konstrukt in *A. thaliana* transformiert werden, wurde das binäre Vektorsystem aus pART7 und pBART verwendet. Das Konstrukt wurde zunächst in den Vektor pART7 kloniert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzym *NotI* (präparativer Restriktionsverdau) in den Vektor pBART umklont. Der Vektor pBART wurde mittels Elektroporation in *A. tumefaciens* (siehe 2.6.1) transformiert und im Anschluss daran die Transformation von *A. thaliana* mittels Floral Dip (siehe 2.6.3) durchgeführt. Die verwendeten Primer, die DNA-Matrize, sowie das genaue Klonierungsvorgehen der in der Arbeit erstellten Konstrukte sind Tab. 2.11 zu entnehmen.



Experiment	Konstruktname	Schematische Darstellung, Klonierungsvorgehen			
BiFC	a) 35S:OPR3-YFP _N -SRL		OPR3ΔSRL (1-1164 bp)		YFP _N (4-465 bp)
BiFC	b) 35S:OPR3-YFP _C -SRL		OPR3ΔSRL (1-1164 bp)		YFP _C (466-717 bp)
BiFC/FRET	c) 35S:OPR3-YFP-SRL		OPR3ΔSRL (1-1164 bp)		YFP (4-717 bp)
FRET	d) 35S:OPR3-CFP-SRL		OPR3ΔSRL (1-1164 bp)		CFP (4-717 bp)
BiFC	e) 35S:E292K-YFP _N -SRL		E292KΔSRL (1-1164 bp)		YFP _N (4-465 bp)
BiFC	f) 35S:E292K-YFP _C -SRL		E292KΔSRL (1-1164 bp)		YFP _C (466-717 bp)
BiFC/FRET	g) 35S:E292K-YFP-SRL		E292KΔSRL (1-1164 bp)		YFP (4-717 bp)
FRET	h) 35S:E292K-CFP-SRL		E292KΔSRL (1-1164 bp)		CFP (4-717 bp)
BiFC	i) 35S:Y365F-YFP _N -SRL		Y365FΔSRL (1-1164 bp)		YFP _N (4-465 bp)
BiFC	j) 35S:Y365F-YFP _C -SRL		Y365FΔSRL (1-1164 bp)		YFP _C (466-717 bp)
BiFC/FRET	k) 35S:Y365F-YFP-SRL		Y365FΔSRL (1-1164 bp)		YFP (4-717 bp)
FRET	l) 35S:Y365F-CFP-SRL		Y365FΔSRL (1-1164 bp)		CFP (4-717 bp)
BiFC	m) 35S:DMEY-YFP _N -SRL		DMEYΔSRL (1-1164 bp)		YFP _N (4-465 bp)
BiFC	n) 35S:DMEY-YFP _C -SRL		DMEYΔSRL (1-1164 bp)		YFP _C (466-717 bp)
BiFC/FRET	o) 35S:DMEY-YFP-SRL		DMEYΔSRL (1-1164 bp)		YFP (4-717 bp)
FRET	p) 35S:DMEY-CFP-SRL		DMEYΔSRL (1-1164 bp)		CFP (4-717 bp)
BiFC	q) 35S:OPR1-YFP _N -SRL		OPR1 (1-1281 bp)		YFP _N (4-465 bp)
BiFC	r) 35S:OPR1-YFP _C -SRL		OPR1 (1-1281 bp)		YFP _C (466-717 bp)

Konstrukte in Vektor

pART7, pBART

Primer

a), e), i), m) 5'AtOPR3_XhoI, 3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'YFPΔATG_ClaI, 3'nYFP+SRL+TGA_XbaI

b), f), j), n) 5'AtOPR3_XhoI, 3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'cYFP_ClaI, 3'YFP+SRL+TGA_XbaI

c), d), g), h), k), l), o), p) 5'AtOPR3_XhoI,
3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'YFPΔATG_ClaI,
3'YFP+SRL+TGA_XbaI

q) 5'LeOPR1_XhoI, 3' LeOPR1ΔTGA_ClaI
5'YFPΔATG_ClaI, 3'nYFP+SRL+TGA_XbaI

r) 5'LeOPR1_XhoI, 3' LeOPR1ΔTGA_ClaI
5'cYFP_ClaI, 3'YFP+SRL+TGA_XbaI



Matrize

Insert

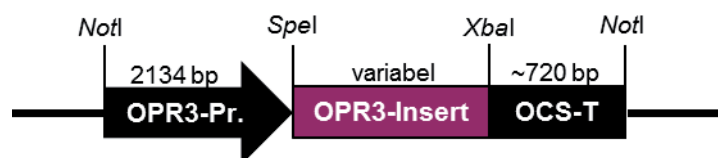
- a)-d) *At*OPR3 in pART7 (Stintzi & Browse 2000)
- e)-h) *At*OPR3_{E292K} in pART7 (siehe 2.6.7.3)
- i)-l) *At*OPR3_{Y365F} in pART7 (siehe 2.6.7.3)
- m)-o) *At*OPR3_{E292K} in pART7 und *At*OPR3_{Y365F} in pART7
(zielgerichtete Mutagenese-PCR (siehe 2.6.7.3) und
Zusammensetzen aus *At*OPR3_{E292K} und *At*OPR3_{Y365F})
- q), r) EGFP-*S/*OPR1 in pSH11 (Strassner et al. 2002)

Fluorophor

- a)-c), e)-g), i)-k), m)-o), q), r) YFP in pEXSG (Feys et al. 2005)
- d), h), l), p) CFP in pECFP (Clontech)

Klonierung

- ORF des Fluorophors wurden mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde SRL-Sequenz eingefügt und Startcodon entfernt, PCR-Produkt wurden mit *Clal/XbaI* geschnitten
- pART7 wurde mit *Clal/XbaI* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation Vektor und ORF des Fluorophors
- ORF der OPR3 wurde mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde SRL-Sequenz (wenn vorhanden) und Stoppcodon entfernt, PCR-Produkte wurden mit *XhoI/Clal* geschnitten
- pART7 mit ORF des Fluorophors wurde mit *XhoI/Clal* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor mit ORF des Fluorophors und ORF des Inserts
- Ausnahme: Für die Erstellung der Fusionskonstrukte mit CFP, wurde das YFP in den YFP-Fusionkonstrukten gegen CFP ausgetauscht (*Clal/XbaI*). Hierfür wurde der Bakterienstamm ER2925 benötigt (besitzt keine Dam-Methylase). Das Entfernen des ORF des YFP durch *XbaI* wäre hier ansonsten nicht möglich gewesen.
- Umklonierung in pBART mit *NotI*
- Die Fusionskonstrukte mit DMEY wurden durch Zusammenfügen der ORF aus E292K und Y365F erstellt. Dazu wurden jeweils, die schon mit dem Fluorophor fusionierten Konstrukte (z. B. E292K-YFP in pART7 und Y365F-YFP in pART7) mit *XhoI* und *NdeI* geschnitten. *NdeI* schneidet im ORF der OPR3 bei 1023 bp. Die gespaltenen Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente (z. B. E292K₁₋₁₀₂₃ und Y365F₁₀₂₃₋₁₁₆₄-YFP-pART7) aus dem Gel eluiert. Beide Fragmente wurden ligiert.



- Huckepack a) *OPR3:OPR3ΔSRL* *OPR3ΔSRL* (1-1164 bp)
- Huckepack b) *OPR3:OPR3_{Y191F}* *OPR3_{Y191F}* (1-1176 bp)



Konstrukte in Vektor

pART7, pBART

Primer

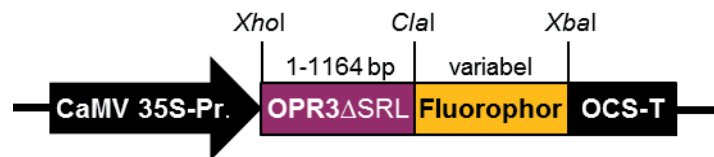
- a) 5'OPR3_SpeI, 3'Y191F_XbaI
- b) 5'OPR3_SpeI, 3'OPR3ΔSRL_XbaI

Matrize

- a) AtOPR3 in pART7 (Stintzi & Browse 2000)
- b) AtOPR3_{Y191F} in pART7 (siehe 2.6.7.3)

Klonierung

- OPR3-Promotor (2134 bp) (vorhanden in pCR®2.1 Topo®, Stintzi, unveröffentlicht) wurde mit NotI/SpeI aus Vektor geschnitten
- Amplifikation des ORF der OPR3, PCR-Produkt wurde anschließend mit SpeI/XbaI geschnitten
- ocs-Terminator (vorhanden in pART7) wurde mit XbaI/NotI aus Vektor geschnitten
- pART7 (ohne Insert) wurde mit NotI geschnitten, die beiden erhaltenen Fragmente mit etwa 2800 bp und 2100 bp gelelektrophoretisch aufgetrennt, und das Fragment mit 2800 bp (Vektor ohne CaMV 35S-Promotor, MCS und ocs-Terminator) aus dem Gel eluiert und dephosphoryliert.
- Gemeinsame Ligation der einzelnen Fragmente (OPR3-Promotor, ORF: OPR3ΔSRL bzw. OPR3_{Y191F}, ocs-Terminator) in modifizierten pART7
- Umklonierung in pBART mit NotI



- | | | | |
|-----------|----------------------------------|--|-------------------------------|
| Huckepack | a) 35S:OPR3ΔSRL-YFP _N | | YFP _N (4-465 bp) |
| Huckepack | b) 35S:OPR3ΔSRL-YFP _C | | YFP _C (466-720 bp) |
| Huckepack | c) 35S:OPR3ΔSRL-YFP | | YFP (3-720 bp) |

Konstrukte in Vektor

pART7

Primer

- a) 5'AtOPR3_XhoI, 3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'YFPΔATG_ClaI, 3'nYFP ClaI
- b) 5'AtOPR3_XhoI, 3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'cYFP_ClaI, 3'YFP_XbaI
- c) 5'AtOPR3_XhoI, 3'AtOPR3ΔSRLΔTGA_ClaI
5'YFPΔATG_ClaI, 3'YFP_XbaI



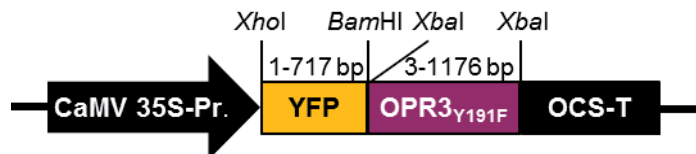
Matrize

a), b), c) *AtOPR3* in pART7 (Stintzi & Browse 2000)
 YFP in pEXSG (Feys et al. 2005)

Klonierung

Siehe split-YFP/FRET

Unterschied: kein SRL durch PCR an ORF des Fluorophors angefügt



Huckepack *35S:YFP-OPR3_{Y191F}*

Konstrukt in Vektor

pART7

Primer

5'YFP_*XhoI*, 3'YFPΔTAA_*BamHI*

5'OPR3ΔATG_*XbaI*, 3'Y191F_*XbaI*

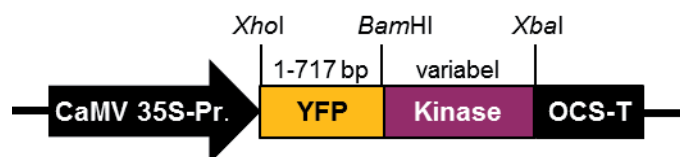
Matrize

YFP in pEXSG (Feys et al. 2005)

AtOPR3_{Y191F} in pART7 (siehe 2.6.7.3)

Klonierung

- ORF des YFP wurde mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde Stoppcodon entfernt, PCR-Produkt wurde mit *XhoI/BamHI* geschnitten
- pART7 wurden mit *XhoI/BamHI* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor und ORF des YFP
- ORF des *OPR3_{Y191F}* wurde mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde Startcodon entfernt, PCR-Produkt wurden mit *XbaI* geschnitten
- pART7 mit ORF des YFP wurde mit *XbaI* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor mit ORF des YFP und ORF des *OPR3_{Y191F}*
- Orientierung des ORF der *OPR3_{Y191F}* wurde geprüft (*XhoI/NdeI*)



Kinase	a) <i>35S:YFP-At3g08720</i>		<i>At3g08720</i> (3-1396 bp)
Kinase	b) <i>35S:YFP-At4g18950</i>		<i>At4g18950</i> (3-1380 bp)



Konstrukte in Vektor

pART7

Primer

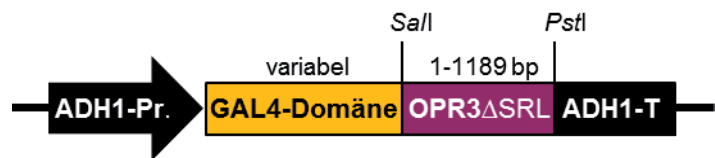
- a) 5'YFP_ *Xho*I, 3'YFPΔTAA_ *Bam*HI
 5'At3gΔATG_ *Bam*HI, 3'At3g_ *Xba*I
- b) 5'YFP_ *Xho*I, 3'YFPΔTAA_ *Bam*HI
 5'At4gΔATG_ *Bam*HI, 3'At4g_ *Xba*I

Matrize

- a) At3g08720 in pUNI51 (ABRC)
 YFP in pEXSG (Feys et al. 2005)
- b) At4g18950 in pUNI51 (ABRC)
 YFP in pEXSG (Feys et al. 2005)

Klonierung

- ORF des YFP wurden mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde Stoppcodon entfernt, PCR-Produkt wurde mit *Xho*I/*Bam*HI geschnitten
- pART7 wurde mit *Xho*I/*Bam*HI geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor und ORF des YFP
- ORF der Kinase wurden mittels PCR amplifiziert, über die PCR Startcodon entfernt, PCR-Produkt wurden mit *Bam*HI/*Xba*I geschnitten
- pART7 mit ORF des YFP wurde mit *Bam*HI/*Xba*I geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor mit ORF des YFP und ORF der Kinase



- H2H a) *ADH:GAL4AD-OPR3* *GAL4AD* in Vektor pGAD424
- H2H b) *ADH:GAL4BD-OPR3* *GAL4BD* in Vektor pGBT9 und pBridge

Konstrukte in Vektor

pGAD424, pGBT9, pBridge

Primer

- a), b) 5' *S*OPR3ATG_ *Sal*I, 3' *S*OPR3ΔSRL_ *Pst*I

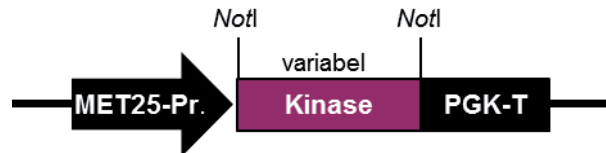
Matrize

*S*OPR3 in Vektor pET21a (Stintzi & Schaller, unveröffentlicht)



Klonierung

- ORF der OPR3 wurden mittels PCR amplifiziert, über die PCR wurde SRL-Sequenz entfernt, PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR@2.1 Topo® ligiert und mit *SalI/PstI* geschnitten
- pGAD424, pGBT9 bzw. pBridge wurden mit *SalI/PstI* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor und ORF der OPR3



H3H	a) <i>MET:At3g08720</i>	<i>At3g08720</i> (1-1396 bp)
H3H	b) <i>MET:At4g18950</i>	<i>At4g18950</i> (1-1380 bp)

Konstrukte in Vektor

pBridge

Primer

- a) 5'At3gATG_*NotI*, 3'At3g_*NotI*
- b) 5'At4gATG_*NotI*, 3'At4g_*NotI*

Matrize

- a) *At3g08720* cDNA in pUNI51 (ABRC)
- b) *At4g18950* cDNA in pUNI51 (ABRC)

Klonierung

- ORF der Kinase wurden mittels PCR amplifiziert, PCR-Produkt wurde mit *NotI* geschnitten
- pBridge wurde mit *NotI* geschnitten, dephosphoryliert
- Ligation: Vektor und ORF der Kinase
- Orientierung des ORF der Kinase wurde geprüft (*SpeI/Bg/III*)

Tab. 2.11: Schematische Darstellung der erstellten Konstrukte und Klonierungsvorgehen

Schwarzer Pfeil, verwendete Promotoren: OPR3-Pr.: *OPR3*-Promotor aus *A. thaliana*, CaMV 35S-Pr.: Cauliflower Mosaic Virus 35S-Promotor, MET25-Pr.: Methionin-Promotor aus *S. cerevisiae*, ADH1-Pr.: Alkoholdehydrogenase-Promotor *S. cerevisiae*, farbige Boxen: ORF spezifischer Gene, schwarze Box, verwendete Terminatoren: ocs-T: Oktopin-Synthase-Terminator, ADH1-T: Alkoholdehydrogenase-Terminator aus *S. cerevisiae*, PGK-T: Phosphoglyceratkinase-Terminator aus *S. cerevisiae*.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in Plasmiden erfolgte entweder durch die Firma StarSeq GmbH (Mainz) oder die Firma Macrogen (Korea). Für die Sequenzierung wurden 0,7-1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl ddH₂O mit 10 pmol für die Sequenzierung erforderlichen Oligo-



nukleotiden eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Webseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> analysiert.

2.7 Transiente Expression von Fusionsproteinen in Zwiebelepidermiszellen nach Beschuss mit Goldpartikeln

Um in Zwiebelepidermiszellen Fremd-DNA einzubringen, wurden diese mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschossen. Treffen diese Partikel in den Zellkern, kann die Information transkribiert und das resultierende Protein exprimiert werden.

Dafür wurden 25 μl Goldsuspension (\emptyset 1 μm , Biorad) zweimal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden 5 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) auf das Gold gegeben und 10 μl Spermidinlösung (0,1 M) und 25 μl CaCl₂ (2,5 M) in getrennten Tropfen an eine Seite des Reaktionsgefäßes transferiert. Die Lösungen wurden erst durch anschließendes 3-minütiges Mischen miteinander in Berührung gebracht. Anschließend wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und das beladene Gold in mindestens 144 μl 99 % (v/v) Ethanol aufgenommen.

Für den Beschuss mittels Genkanone (Modell PDS-1000, HE Biolistic® particle delivery system, Biorad) wurden je 24 μl beladene Goldsuspension auf die zuvor in Ethanol sterilisierten „Microcarrier“ gegeben, getrocknet und in den „Macrocarriern“ fixiert. Diese wurden zusammen mit dem Abstoppgitter in die Haltevorrichtung gelegt, die Berstscheibe (900 psi oder 1100 psi) davor montiert und in der Druckkammer fixiert. Zwiebeln wurden aufgeschnitten, die innersten zwei bis drei Zwiebelhäutchen entfernt und in einem Abstand von 9 cm mit den beladenen Goldpartikeln beschossen (Abb. 2.1). Anschließend wurde die Zwiebel wieder vollständig zusammengesetzt, mit feuchten Papieren und Frischhaltefolie umwickelt und für mindestens 24 h in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die beschossenen Zwiebelhäutchen abgelöst, auf einen Objektträger mit einem Tropfen ddH₂O gelegt, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Carl Zeiss AG, Jena) analysiert.

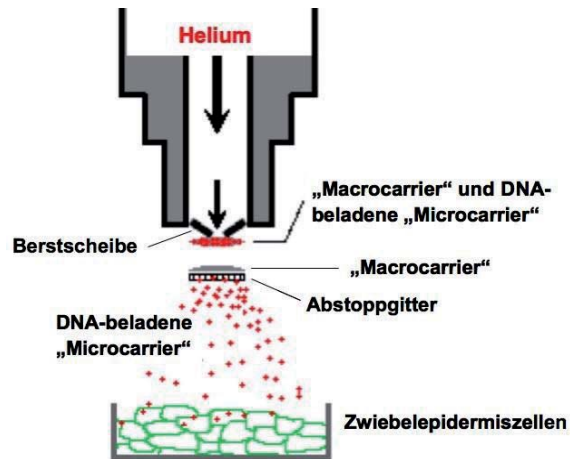


Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Beschusskanone

Plasmid-DNA wird an Goldpartikel („Microcarrier“) gebunden und auf den „Macrocarrier“ gegeben. Nach dem Druckaufbau mit Helium in der Kammer, zerbricht die Berstscheibe. Der „Macrocarrier“ wird durch den Heliumstrom beschleunigt und an dem Abstoppgitter gebremst, während die DNA-beladenen „Microcarrier“ ungebremst auf die Zwiebelepidermis treffen (verändert nach

<http://artsci.wustl.edu/~anthro/blurb/Backgrounder.html>)

2.8 Propidiumjodid-Färbung

Für die Propidiumjodid-Färbung von Wurzeln wurden diese 5 min in einer Propidiumjodid-Lösung (10 µg/ml) inkubiert und anschließend gründlich mit ddH₂O gewaschen.

2.9 Histochemischer GUS-Test

Das zu untersuchende unverwundete und verwundete Pflanzenmaterial wurde in X-Gluc-Färbelösung (100 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,2; 10 mM EDTA; 0,1 % Triton X 100; 2 mM K₃[FeIII(CN)₆]; 2 mM K₄[FeII(CN)₆]; 0,5-1 mg/ml X-Gluc) überführt und dreimal für 1 min im Vakuum (200 mbar) infiltriert. Anschließend wurde das Material ÜN bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag mit mehrfach gewechseltem 70 % (v/v) Ethanol im Trockenschrank bei 70 °C entfärbt.

2.10 Untersuchung von Pflanzengewebe am Stereomikroskop

Für die Aufnahme und Dokumentation von Pflanzenmaterial (GUS-gefärbte Keimlinge, Wurzeln und Blüten und ungefärbte Blüten) wurde das Stereomikroskop SV11 (Zeiss) mit der Kamera Spot RT, (Visitron Systems GmbH, Puchheim) und der SPOT RT Software v 3.5 (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA) verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde in 70 % (v/v) Ethanol oder ddH₂O bei 1,6 bis 5-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.11 Proteinanalytische Methoden

2.11.1 Antikörper-Aufreinigung aus Serum

Aus *E. coli* gereinigtes OPR3 Protein (100-200 µg, aus Laborbestand) wurde über ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.11.5) und anschließend auf eine WESTRAN-Membran geblottet (siehe 2.11.7), welche vorher mit Methanol angefeuchtet worden war.



Danach wurde ÜN mit Blockierungslösung (in 6 % (w/v) Milchpulver gelöst in TBS-Tween (6,85 mM NaCl, 0,13 μ M KCl, 1,24 mM Tris, pH 7,4 mit 0,1% (v/w) Tween-20) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in TBS-Tween gewaschen und mit dem Farbstoff Ponceau Red angefärbt (siehe 2.11.6). Die dadurch sichtbar gemachte Proteinbande wurden aus der Membran ausgeschnitten, zerkleinert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es folgte die Zugabe von 20 μ l Tris/HCl (1 M, pH 7,5) und 200 μ l antiAtOPR3 Serum (siehe 2.1.2) und eine Inkubation bei RT im Überkopfschüttler für 1,5 h. Anschließend wurde das Serum abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Membran wurde dreimal mit TBS-Tween und anschließend einmal mit ddH₂O gewaschen. Für die Elution wurden in neue Reaktionsgefäße 40 μ l Tris/HCl (1 M, pH 9) vorgelegt und mit E1 und E2 beschriftet. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper mit 200 μ l Glycin/HCl (100 mM, pH 2,8) bei 1-minütigem Mixen. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und in E1 überführt. Der darin vorgelegte Puffer diente zur Neutralisation. Es wurde anschließend ein weiteres Mal Glycin/HCl zugegeben, dieser Vorgang wiederholt und ebenfalls in E1 gegeben. Für die zweite Elution wurde erneut zweimal 200 μ l Glycin/HCl (100 mM, pH 2,8) zugegeben, 1 min gemischt und die Flüssigkeit in E2 überführt. Die beiden Eluate bzw. aufgereinigten Antikörper wurden durch Zugabe von BSA (Endkonzentration 1 mg/ml) und Timerosal (Endkonzentration 0,02 % (w/v)) stabilisiert.

2.11.2 Proteinextraktion aus *A. thaliana*

Ein Blatt pro Probe, bzw. 10-20 Pflanzenkeimlinge oder 20-50 Blüten (je nach Blütenstadium) wurden sofort nach dem Ernten in Stickstoff eingefroren, in noch gefrorenem Zustand mit einem Plastikpistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerrieben und in 100-150 μ l Proteinextraktionspuffer (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris/HCl pH 7,5, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 μ l/ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Serva)) aufgenommen. Unlösliches Material wurde bei 16000 x g und 4 °C 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Abzentrifugieren wurde bis zu dreimal wiederholt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 2.11.4) bestimmt.

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 30-50 μ g Protein mit 4 x SDS-Puffer (0,2 M Tris/HCl, 0,4 M DTT, 8 % (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin) für 10 min aufgekocht und anschließend auf Eis abgeschreckt.



2.11.3 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Für die Proteingewinnung aus Hefezellen (Hefeprotokoll Handbuch (Clontech) und Printen & Sprague 1994) wurde eine 5 ml *S. cerevisiae*-Kultur (in SD-Minimalmedium, siehe 2.4) bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von > 1,5 (ca. 16-18 h) im Orbitalschüttler (230-270 rpm) inkubiert und anschließend bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml kaltem ddH₂O gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Zum Aufschluss der Zellen wurde 95 µl 1 x SDS Ladepuffer (1:4 Verdünnung 4 x SDS Ladepuffer, siehe 2.11.2) und 5 µl 2 M DTT zugegeben, die Zellen darin suspendiert, anschließend für 5-10 min aufgekocht und auf Eis abgeschreckt. Der Ansatz wurde 5 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde direkt zur gelelektrophoretischen Analyse (siehe 2.11.5) verwendet (20-30 µl).

2.11.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford erfolgt unter Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250, der an aromatische und basische Aminosäurereste bindet (Bradford 1976). Die Bindung hat eine Farbveränderung zur Folge, die bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem UV/Vis-Spektrophotometer gemessen werden kann. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Roti®-Quant) zu einem Gesamtvolumen von 800 µl Proteinlösung und ddH₂O gegeben, 10 min inkubiert und am Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand einer BSA-Standardkurve (für einen Bereich 1-15 µg/ml Protein) ermittelt.

2.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von aufbereiteten Proteinproben unter denaturierenden Bedingungen erfolgte bei 120 V über diskontinuierliche Gelelektrophorese (Sammelgel: 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 11 % (v/v) Acrylamid (rotiphorese® Gel40), 0,03 % (w/v) APS, 0,18 % (v/v) TEMED; Trenngel: 375 mM Tris/HCl pH 8, 0,1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Acrylamid (rotiphorese® Gel40), 0,03 % (w/v) APS, 0,075 % (v/v) TEMED; Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Größenstandard wurden 3 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth) bzw. 6 µl ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs, Ipswich,



Großbritannien) aufgetragen. Für Western-Blot-Analysen wurden die Proteine im Anschluss auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (siehe 2.11.7).

2.11.6 Ponceau-Färbung

Mit der Ponceaufärbung konnten auf Nitrocellulose-Membranen immobilisierte Proteine (siehe 2.11.7), reversibel sichtbar gemacht werden. Da die Färbung sehr wenig sensitiv ist, sind nur Proteine in sehr hoher Konzentration nachzuweisen. In Proteinextrakten aus Pflanzen ist dies hauptsächlich RubisCO. Die Membran wurde 5 min in der Färbelösung ((10 x) 2 % (w/v Ponceau S), 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure, 30 % (w/v) TCA inkubiert und anschließend solange mit ddH₂O gewaschen, bis der Hintergrund wieder entfärbt und Proteinbanden erkennbar waren.

2.11.7 Western-Blot und Immunodetektion

Unter Verwendung des "Semi-Dry"-Verfahrens (Anodenlösung 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol; Anodenlösung 1: 0,3 M Tris/HCl, pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol; Kathodenlösung: 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol; Blotting-Papier von Schleicher und Schuell, Dassel) wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran® ClearSignal, Schleicher und Schuell; zuvor in ddH₂O angefeuchtet und 10 min in Anodenlösung I inkubiert) übertragen. Nach 90 min bei 100 mA pro 9 cm x 5,5 cm-Gel war der Transfer abgeschlossen.

Die Membran wurde ÜN in Blockierungslösung (6 % (w/v) Milchpulver in TBS-Tween inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Blockierungslösung mit dem ersten Antikörper (antiAtOPR3 1:650, anti-GFP 1:3.000, anti-Aktin 1:4.000) überführt und ÜN bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBS-Tween wurde der sekundäre Antikörper (anti-Rabbit IgG, Heavy and Light Chain (Goat), Peroxidase Conjugate, anti-Mouse IgG HRP Conjugate (Calbiochem)) in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockierungslösung auf die Membran gegeben und für mindestens 1 h inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut dreimal 5 min mit TBS-Tween und weitere 5 min mit TBS gewaschen. Die Membran wurde mit 300 µl ECL-Lösung (Pierce, Rockford) gleichmäßig benetzt und die Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm (Fuji Super RX; Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) detektiert. Röntgenfilme wurden mit dem RP X-Omat LO-System (Kodak S.A.; Paris, Frankreich) entwickelt, fixiert und zur Dokumentation eingescannt.

Sollte eine Membran sukzessiv mit verschiedenen Antiseren inkubiert werden, wurden die gebundenen Antikörper nach der ersten Immunodetektion entfernt („Strippen“). Hierzu wurde



die Membran 30 min mit 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7, 0,5 % (w/v) SDS und 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol bei 50 °C inkubiert, anschließend mit TBS-Tween gewaschen und von Neuem blockiert.

2.11.8 Quantifizierung der Signalintensität immunodetektierter Banden

Für die Quantifizierung der Signalintensität immunodetektierter Proteinbanden wurde die Chemilumineszenz der mit Antikörper und ECL-Lösung behandelten Nitrocellulose-Membran (siehe 2.11.7) nicht mittels Röntgenfilm detektiert, sondern durch einen Photomultiplier mit CCD-Kamera (Hamamatsu C4742, Hamamatsu Phytonics GmbH, Herrsching) aufgenommen. Mithilfe der Software Simple PCI (Hamamatsu Phytonics) wurde die Signalintensität der Proteinbanden analysiert, indem in einem definierten Bereich der „mittlere Grauwert“ (durchschnittliche Intensität aller Pixel in einer Region) bestimmt wurde.

2.12 Mikroarray Analyse

2.12.1 RNA-Isolierung

Für den Expressionsvergleich zwischen wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp *Ws*) und der „loss-of-function“-Mutante für At4g18950 wurde RNA aus Blättern von vier Wochen alten Pflanzen extrahiert (siehe 2.6.5). Für die Mikroarray-Analyse wurden jeweils 100 μ g RNA pro Probe eingesetzt.

2.12.2 Fluoreszenzmarkierung der Proben

Für die Synthese fluoreszenzmarkierter cDNAs wurde nach der auf der Webseite der Universität de Lausanne (http://www.unil.ch/dbmv/page19764_en.html) beschriebenen Methode (Reymond et al. 2000) vorgegangen. Jeweils 100 μ g RNA (Wildtyp und Mutante) und 2 μ g oligo-dT21mer in einem Volumen von 13,4 μ l wurden für 5 min bei 70 °C denaturiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Proben in einen Mix aus 6 μ l 5 x SuperScript II Puffer, 3 μ l 0,1 M DTT, 0,6 μ l dNTP-Mix, 2 μ l SuperScript II Reverse Transcriptase, 2 μ l RNase Inhibitor und 3 μ l Cy3 oder Cy5 (1 mM, Amersham Bioscience, Freiburg) gegeben, gemischt und für 2 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die zwei zu vergleichenden Proben vereinigt. Die reverse Transkription wurde durch 10-minütige Inkubation bei 65° C abgestoppt und die restliche RNA lysiert, indem 2,65 μ l 25 mM EDTA und 3,3 μ l 1 M NaOH zugegeben wurden. Durch 3,3 μ l 1M HCl und 5 μ l 1 M Tris-HCl, pH 6.8 wurde die Lösung neutralisiert. Die markierte cDNA wurde mit Hilfe des QIAGEN



MinElute PCR purification kit (#28004) nach Vorgaben des Herstellers gereinigt und in 20 μ l Elutionspuffer (Qiagen) aufgenommen.

Um die Qualität der Markierung zu überprüfen, wurden 2 μ l der cDNA mit 8 μ l ddH₂O auf einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.8) und mit dem Typhoon Trio™ Imager (GE Healthcare, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 532 nm (grün) für Cy3 und 635 nm (rot) für Cy5 angeregt und die resultierende Fluoreszenz aufgenommen.

2.12.3 Rehydrierung, Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays

Bei den verwendeten Mikroarrays handelte es sich um *Arabidopsis* Oligonukleotid Microarrays (3.2.2.Y, Version 1.0), welche von der Universität in Arizona (Galbraith Laboratory) bezogen wurden. Ein Mikroarray enthält 26000 Oligonukleotide des *Arabidopsis*-Genoms und zusätzliche Elemente als Kontrollen (<http://ag.arizona.edu/microarray/deconvolution>).

Vor der Verwendung wurden die Mikroarrays rehydriert. Hierfür wurde der Array für 10 sec in den Wasserdampf eines auf 50 C° erhitzten Wasserbades gehalten, für 5 sec bei 65° auf einem Heizblock getrocknet und 1 min abgekühlt. Diese Prozedur wurde viermal in Folge wiederholt. Zur Immobilisierung der Oligonukleotide auf dem Trägermaterial wurde der Array in einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker® 1800, Stratagene) mit 180 mJ für 30 sec bestrahlt. Anschließend wurde der Array in 1 % SDS für 5 min bei RT unter Schütteln gewaschen. Das SDS wurde durch wiederholtes (10-maliges) Eintauchen des Arrays in steriles ddH₂O entfernt. Der Array wurde sofort in 99 % (v/v) Ethanol überführt, dabei fünfmal eingetaucht und anschließend für 3 min unter Schütteln inkubiert. Der Array wurde durch Zentrifugation bei 200 x g für 2-4 min getrocknet und bis zur Verwendung lichtgeschützt bei geringer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Für die Hybridisierung wurde der Array in die VersArray™ Hybridization Chamber (Bio-Rad Laboratories, München)) transferiert und mit einem LifterSlip™-Deckglas (Erie Scientific Company, Portsmouth NH) bedeckt. Zusätzlich wurden 10 μ l 3 x SSC in jede Kerbe der Kammer gegeben. Desweiteren wurden 18 μ l markierter cDNA, 53,2 μ l ddH₂O, 15 μ l 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Tri-Na-Citrat-Dihydrat, pH 7,0) 10 μ l tRNA (2 μ g/ μ l) und 3,8 μ l 10 % SDS gemischt, für 1 min bei 95°C denaturiert und zügig nach kurzem Abzentrifugieren luftblasenfrei unter das Deckglas pipettiert. Nach Verschließen der Kammer wurde die Hybridisierungsreaktion ÜN bei 64° C im Wasserbad vollzogen. Am folgenden Tag wurde das Deckglas mit sterilfiltriertem ddH₂O abgespült und der Array jeweils zweimalig mit einer Lösung aus 2 x SSC und 0,1% SDS für 5 min, mit 0,2 x SSC für 1 min und mit 0,1 x SSC für 1 min



gewaschen. Abschließend wurde der Array durch 2-minütige Zentrifugation bei 1400 x g getrocknet und bis zum Einscannen bei 4 °C abgedunkelt gelagert.

2.12.4 Scannen und Auswerten der Microarrays

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

Im ersten Schritt wurden systematische Fehler durch eine Ratio-basierende Normalisierung mittels des Verhältnisses der Mediane (635/532), das nicht größer als 1,3 oder kleiner als 0,7 sein sollte, korrigiert. Im nächsten Schritt wurden unzuverlässige Daten der zu vergleichenden Mikroarrays („dye-swap“) entfernt. Es wurden alle Signale herausgefiltert, die eine SNR (Signal-to-noise Ratio) < 2 aufwiesen. Ebenso wurden schlechte, nicht gefundene Spots ausgeschlossen. Als differentiell exprimiert wurden solche Gene aufgenommen, welche eine mindestens zweifach erhöhte Signalintensität im Cy3 ($\lambda_{\text{ex}}=550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=570 \text{ nm}$) oder Cy5 ($\lambda_{\text{ex}}=649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=670 \text{ nm}$) Kanal in den drei durchgeführten Mikroarrays zeigten und in einem one-sample t-test nach Bonferroni ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ aufwiesen.

Mittels der TAIR-Webseite (<http://www.arabidopsis.org>) wurden die ermittelten Gene nach Funktion und Beteiligung an biologischen Prozessen klassifiziert (GO (Gene Ontology)). Um signifikante Unterschiede zwischen der Population differentiell exprimierter Gene und den Daten des *Arabidopsis* Gesamtgenoms zu ermitteln, wurde das „GO Term Enrichment“-Programm verwendet ($P < 0,001$, <http://amigo.geneontology.org>).

2.13 Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

2.13.1 Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-System und Hefe-Drei-Hybrid (H3H)-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System dient der Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. In dieser Arbeit wurde das MATCHMAKER Zwei-Hybrid-System von Clontech (Heidelberg) verwendet. Es beruht auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 von *S. cerevisiae*, dessen funktionelle Domänen von den Vektoren pGBT9 bzw. pBridge und pGAD424 codiert werden. Wie alle Transkriptionsfaktoren besteht GAL4 aus einer Aktivator-domäne und einer Bindedomäne. Bei der Untersuchung von Protein-Protein-



Interaktionen wird ein Protein an die DNA-Bindedomäne (GAL4BD, enthalten in pGBT9 und pBridge) des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert, während das andere Protein an die Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert wird (GAL4AD, enthalten in pGAD424). Beide Fusionskonstrukte werden in kompetente Hefezellen transformiert (siehe 2.6.2), die über kein funktionsfähiges GAL4-Protein verfügen. Interagieren die beiden eingebrachten Proteine miteinander, so kommen die Aktivierungsdomäne und die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander, der GAL4-Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und ein Reporter gen, das unter der Kontrolle eines durch GAL4 regulierbaren Promotors steht und im Hefestamm-Genom inseriert ist, wird exprimiert.

Das System von Clontech enthält zwei Reportergene, das *HIS3*-Gen und das *lacZ*-Gen. In dieser Arbeit wurde zur Kontrolle der Protein-Interaktion auf das Reportergen *lacZ* zurückgegriffen. Dafür wurden Platten mit SD-Minimalmedium und X-Gal (siehe 2.4) hergestellt. Bei einer Rekonstitution des GAL4-Proteins durch erfolgte Protein-Interaktion wird das *lacZ*-Reportergen aktiviert und die codierte β -Galactosidase codiert. Durch die β -Galactosidase wird das Substrat X-Gal im Medium umgesetzt. Dies führt zu einer allmählichen Blaufärbung der Hefekolonien.

Durch den Vektor pBridge wurde eine Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-Drei-Hybrid-System ermöglicht. Der Vektor pBridge enthält zusätzlich zur MCS I („multiple cloning site“) für die Fusion eines Proteins an die GAL4 DNA-Bindedomäne eine MCS II. „downstream“ der MCS II ein HA-Epitop und eine zweite NLS-Sequenz. Ein zusätzliches Gen kann hier eingebracht werden.

2.13.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)/split-YFP

Prinzip der BiFC

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) ist eine nichtinvasive auf Fluoreszenzbasierende Technik, welche es erlaubt Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu beobachten, ohne dass zusätzlich Reagenzien appliziert werden müssen. Die BiFC basiert auf der Rekonstitution eines funktionellen Fluorophors (hier: YFP, „Yellow Fluorescent Protein“ (240 AS)) aus zwei Fragmenten (hier: YFP_N, N-terminale Hälfte des YFP (AS 1-155) und YFP_C, C-terminale Hälfte des YFP (AS 156-240), welche jedes für sich nicht fluoreszieren. Zwei zu untersuchende Proteine werden jeweils mit einem der YFP-Fragmente fusioniert. Bei Interaktion der fusionierten Proteine werden die beiden YFP-Fragmente in unmittelbare Nähe gebracht und können irreversibel interagieren. Das funktionelle YFP wird so rekonstituiert und weist die gleichen spektralen Eigenschaften auf, wie das vollständige („unsplit“) YFP

(Abb. 2.2). Interagieren die an die Fluorophor-Fragmente fusionierten Proteine nicht miteinander, findet keine Rekonstitution des YFP statt und es kann keine Fluoreszenz detektiert werden (Ohad et al. 2007).

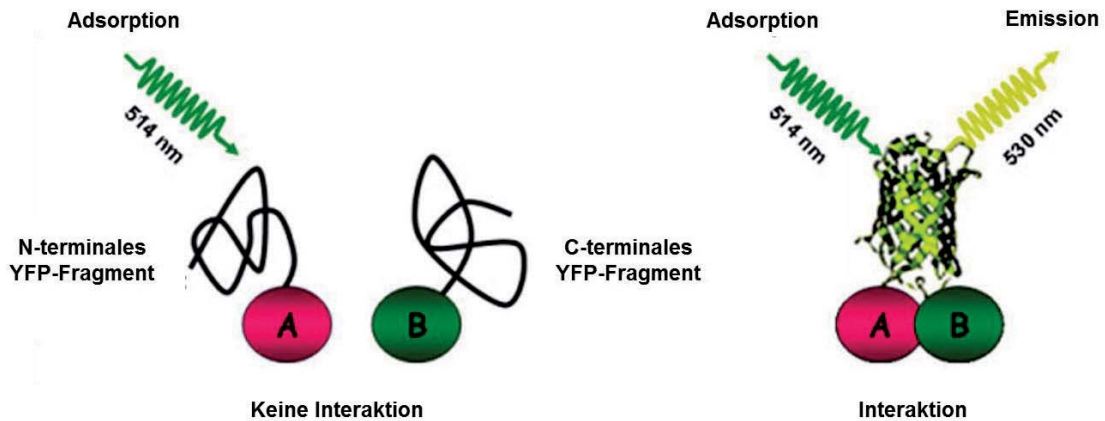


Abb. 2.2: Prinzip der BiFC

Eine Rekonstitution des Fluorophors YFP kann stattfinden, wenn zwei Proteine A und B, welche jeweils mit der N-terminalen und der C-terminalen Hälfte des Fluorophors fusioniert werden, interagieren. Die Rekonstitution von YFP und damit die Interaktion der beiden Fusionspartner kann anhand der gelben ($\lambda = 530$ nm) Fluoreszenz nach Anregung bei 514 nm beobachtet werden (verändert nach Bhat et al. 2006).

Für die Detektion der YFP-Fluoreszenz wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit der Mikroskop-Komponente ApoTome verwendet. Experimente mit dem split-YFP-System wurden in Zwiebelepidermiszellen und in verschiedenen Geweben (Blattepidermis, Kotyledonen, Leitbündel, Antheren) von *A. thaliana* durchgeführt. Die YFP-Fluoreszenz wurde in Zwiebelepidermiszellen und *A. thaliana* wie folgt quantifiziert:

Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in Zwiebelepidermiszellen

Für die Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in Zwiebelepidermiszellen wurde das Modul „Kokolokalisation“ der AxioVision Software 4.8.1 (Zeiss) verwendet, welches es ermöglicht, Fluoreszenzsignale bei Mehrkanalfluoreszenzbildern in zwei Kanälen quantitativ auszuwerten. Als Referenzsignal wurde die rote Fluoreszenz des koexprimierten RFP („red fluorescent protein“) verwendet. YFP-Fusionkonstrukte und das RFP-Referenzkonstrukt wurden wie unter 2.7 beschrieben in Zwiebelepidermiszellen eingeführt und transient exprimiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgte bei 200-facher Vergrößerung mit Hilfe des Moduls „Z-Stapel“ in zwei Kanälen (Filtersätze: 46 HE für YFP und 43 HE für RFP). Da die Fluoreszenzintensität durch Ausbleichen der Fluorophore nach Anregung sehr schnell nachlässt, wurde jede Zelle möglichst rasch in einer Ebene, in welcher möglichst viele Organellen zu erkennen waren, aufgenommen. Mit Hilfe des Moduls „Kokolokalisation“ konnte die mittlere



Grauwertintensität für beide Kanäle bestimmt werden. Der Grauwert stellt den Helligkeitswert eines einzelnen Bildpunktes (Pixel) dar. Bei einer s/w (schwarz/weiß)-Aufnahme hat jeder Bildpixel genau einen Grauwert (<http://www.zeiss.de>). Die mittlere Grauwertintensität gibt den durchschnittlichen Grauwert an, den alle Pixel eines Bildes aufweisen. Das Modul Kolokalisation zeigt die Grauwert-Pixelverteilung einer Aufnahme mithilfe eines Streudiagramms an, welches über eine Schwellwertsetzung in 4 Quadranten unterteilt werden kann: Kanal 1, Kanal 2, Kolokalisationsregion und Hintergrund. Als Schwellwerte bezeichnet man die Grauwerte, die die Grenze zwischen Objekt und Hintergrund festlegen (<http://www.zeiss.de>). Die Schwellwerte wurden in allen Aufnahmen auf 200 in Kanal 1 (RFP) und 4 in Kanal 2 (YFP) gesetzt (Ausnahme: Experiment 3.3.4, hier 100 in Kanal 1 und 2 in Kanal 2)). Sie wurden so gewählt, dass sich bei automatischer Ermittlung der mittleren Grauwertintensitäten für YFP und RFP eine größtmögliche Kolokalisationsregion ergab. Beim Zwiebelbeschuss ist die Menge an DNA-beladener Goldpartikel, die in den Zellkern treffen, nicht beeinflussbar. Dadurch kann die Proteinexpression zwischen den Zellen, in welche die gleichen Konstrukte eingebracht wurden, stark variieren. Um diesen Fehler möglichst gering zu halten, wurde für die Auswertung die YFP-Fluoreszenz ins Verhältnis zur RFP-Fluoreszenz gesetzt (YFP/RFP). Der erhaltene Wert wurde in % ($\times 100$) angegeben.

Quantifizierung der YFP-Fluoreszenz in *A. thaliana*

Für die Aufnahme verschiedener Pflanzengewebe wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit der Mikroskop-Komponente ApoTome (Zeiss) verwendet. Die Gewebe wurden bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Mikroskopie von Blättern wurde bei älteren Pflanzen (ab vier Wochen) mit einer Rasierklinge und einer Pinzette vorsichtig die Epidermis eines Blattes abgezogen und auf einen Objektträger mit einem Tropfen ddH₂O transferiert. Bei jüngeren Pflanzen wurden die Blätter bzw. Kotyledonen ohne Präparation vollständig verwendet. Antheren wurden mittels Stereomikroskop (SV11, Zeiss) freipräpariert und anschließend mikroskopiert.

Für die quantitative Auswertung der YFP-Fluoreszenz in *A. thaliana* wurde das AxioVision Modul AutMess (Zeiss) verwendet. Mit Hilfe des AutMess Assistenten wurde ein automatisches Messprogramm erstellt, welches für alle Aufnahmen eines Versuches verwendet werden konnte. Bei der Erstellung des Messprogramms wurde ein bestimmter Schwellwert (Definition siehe oben) festgelegt. Bildpixel-Grauwerte, die diesen Schwellwert unterschritten, wurden als Hintergrund definiert. Durch das Programm wurde auf diese Weise ermöglicht, Objekte mit einem bestimmten Mindest-Grauwert auszuwählen. Die Anzahl der ausgewählten Objek-



te, deren Größe, sowie deren mittlere Grauwertintensität wurden durch das Programm automatisch bestimmt. Der Schwellwert wurde mit 200 so gewählt, dass nur Peroxisomen als Objekte gezählt wurden, welche eine starke Intensität aufwiesen. Die Zahl der ausgewählten Objekte/Peroxisomen korreliert damit mit der Intensität der Fluoreszenz in der jeweiligen Aufnahme. Die Eignung dieser Methode zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität wurde anhand eines Kontrollexperimentes überprüft, in dem die für das Transgen segregierende F2-Population einer mit *35S:OPR3-YFP-SRL* stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanze untersucht wurde. In dieser Population sollten für das Transgen homozygote, hemizygoter und wildtypische Pflanzen in einem Verhältnis von 1:2:1 vertreten sein. Aufgrund des Gendosiseffektes wird daher erwartet, dass das OPR3-YFP-SRL Fusionsprotein in einem Viertel der Pflanzen einen im Vergleich zur Hälfte der Pflanzen doppelten Expressionsspiegel zeigt, während es im verbleibenden Viertel nicht exprimiert ist. Dementsprechend sollte sich auch die Intensität der Fluoreszenz wie 1:2:1 verteilen.

Es wurden 70 eine Woche alte Keimlinge der F2-Generation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Für jede Pflanze wurde ein Keimblatt analysiert (das verbleibende Gewebe wurde eingefroren) und die Fluoreszenzintensität über die Anzahl fluoreszierender Objekte (Peroxisomen) wie oben beschrieben bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Keimlinge anhand der Fluoreszenzintensität in drei Gruppen einteilen ließen. 11 von 70 zeigten starke Fluoreszenz (Peroxisomenanzahl > 170) mit einem Median von 225 fluoreszierenden Objekten bzw. Peroxisomen. Für 41 Keimlinge wurde mit 82 Objekten eine schwächere Fluoreszenz (Peroxisomenanzahl < 170) ermittelt, während 18 von 70 Keimlingen keine Fluoreszenz zeigten (Abb. 2.3, A und B). Das Verhältnis von 11:41:18 ist nicht signifikant verschieden von der erwarteten 1:2:1 Verteilung homozygoter, hemizygoter und wildtypischer Pflanzen (Chi² Test: Die Prüfgröße χ^2 der beobachteten Verteilung ist mit 3,45 kleiner als die nach der Chi²-Verteilung für 2 Freiheitsgrade und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ erwartete Quantile von 5.99).

Um zu überprüfen, ob die Anzahl fluoreszierender Objekte (Abb. 2.3, B) tatsächlich die aufgrund des Expressionsspiegels von OPR3-YFP-SRL erwartete Fluoreszenzintensität reflektiert, wurde das verbleibende Material der Keimlinge in den drei Gruppen vereinigt. Es wurden Proteinextrakte erstellt und diese mittels Western-Blot auf den Gehalt an OPR3-YFP-SRL überprüft (Abb. 2.3, C). Für die Western-Blot-Analyse wurde als primärer AK anti-GFP verwendet. Nach dem Strippen der Membran wurde zudem anti-Aktin eingesetzt, um die geladene Proteinmenge zu überprüfen. Es wurden jeweils 5, 10 und 15 μg Gesamtprotein auf



das Gel aufgetragen. Tatsächlich konnte durch die Western-Blot-Analyse bestätigt werden, dass in den 41 per Fluoreszenzanalyse als hemizygot eingestuften Keimlingen nur halb so viel YFP-Fusionsprotein vorhanden war, wie in den als homozygot klassifizierten Pflanzen (Abb. 2.3). Folglich lässt sich durch die Bestimmung der Peroxisomenanzahl über einen Schwellwert in fluoreszierenden Pflanzen, eine Quantifizierung der Fluoreszenz vornehmen.

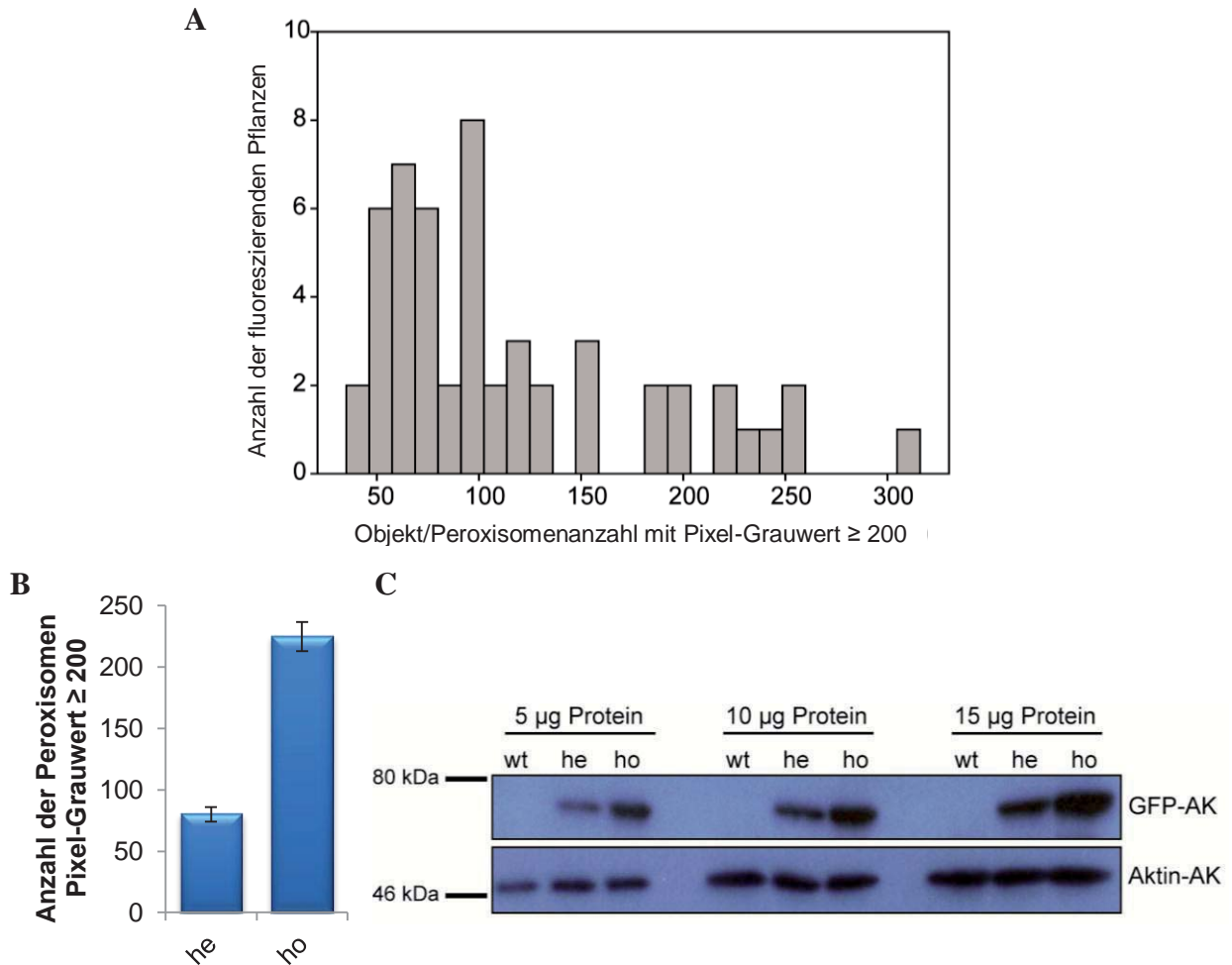


Abb. 2.3: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität transgener *A. thaliana* (*35S:OPR3-YFP-SRL*) in der F2-Generation durch die Bestimmung der Peroxisomenanzahl über einem definierten Pixel-Grauwert

Es wurden 70 eine Woche alte Keimlinge der F2-Generation einer mit *35S:OPR3-YFP-SRL* stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanze fluoreszenzmikroskopisch auf Intensität der YFP-Fluoreszenz (A und B) und mittels Western-Blot auf Expression des OPR3-YFP-SRL Fusionsproteins (C) untersucht. Für die mikroskopische Untersuchung wurde ein Keimblatt verwendet, das verbleibende Material wurde eingefroren und für die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

A und B Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe des Axio Vision Moduls AutMess (Zeiss) als Zahl von Objekten (hier Peroxisomen) bestimmt, deren mittlerer Pixel-Grauwert über einem Schwellwert von 200 lag. Für jeweils ein Keimblatt der 70 Keimlinge wurden drei unterschiedliche Stellen aufgenommen und analysiert.

A Verteilung aller fluoreszierenden Pflanzen nach der Objekt-/Peroxisomenanzahl (Mittelwert aus 3 Messungen)

B Median und Standardfehler (+/-) der Werte für die stark fluoreszierenden und damit potentiell homozygoten (ho) (Peroxisomenanzahl > 170) und die schwach fluoreszierenden potentiell hemizygoten (he) Pflanzen (Peroxisomenanzahl < 170)

C Das für die drei Gruppen der stark (ho), schwach (he) oder gar nicht (wt) fluoreszierenden Pflanzen verbleibende Material wurde vereinigt. Gesamtprotein wurde extrahiert, jeweils 5, 10 und 15 µg wurden in einem 12 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt. Der Western-Blot wurde zunächst mit einem anti-GFP-AK (1:3.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt, anschließend gestrippt und mit einem anti-Aktin-AK (1:4.000) und einem anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) inkubiert. Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

2.13.3 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Prinzip des FRET

Mithilfe der FRET-Methode können ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden (Bhat et al. 2006). Bei dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer, wird Energie von einem fluoreszierenden Donor-Molekül auf ein fluoreszierendes Akzeptor-Molekül übertragen. Für die FRET-Analysen wurden in dieser Arbeit als Donor-Molekül CFP („cyan fluorescent protein“) und als Akzeptor-Molekül YFP verwendet. Der Energietransfer tritt auf, wenn Donor- und Akzeptor-Molekül in räumliche Nähe zueinander geraten. Werden Fusionsproteine mit dem Donor- bzw. dem Akzeptor-Molekül erstellt und interagieren die Fusionspartner, kann durch den Energietransfer nach Anregung des Donor-Moleküls (Absorption CFP: 458 nm) die Fluoreszenz des Akzeptor-Moleküls (Emission YFP = 528 nm) gemessen werden. Gleichzeitig wird dabei die Emission des Donor-Moleküls reduziert (Abb. 2.4). Ein Energie-Transfer kann stattfinden, da sich das Emissionsmaximum des CFP (475-525 nm) mit dem Absorptionsmaximum des YFP (470-515 nm) überlappt.

„Acceptor photobleaching“

Die FRET-Messungen erfolgten mittels „acceptor photobleaching“ (Karpova et al. 2003). Das Akzeptor-Molekül (hier YFP) wird hierbei über einen längeren Zeitraum angeregt (514 nm) und dadurch ausgebleicht („photobleaching“). Die Energie des CFP wird nun nicht mehr länger auf das YFP übertragen. Dadurch steigt die CFP-Fluoreszenz gegenüber vor dem Bleichen an, was detektiert werden kann (Abb. 2.4).

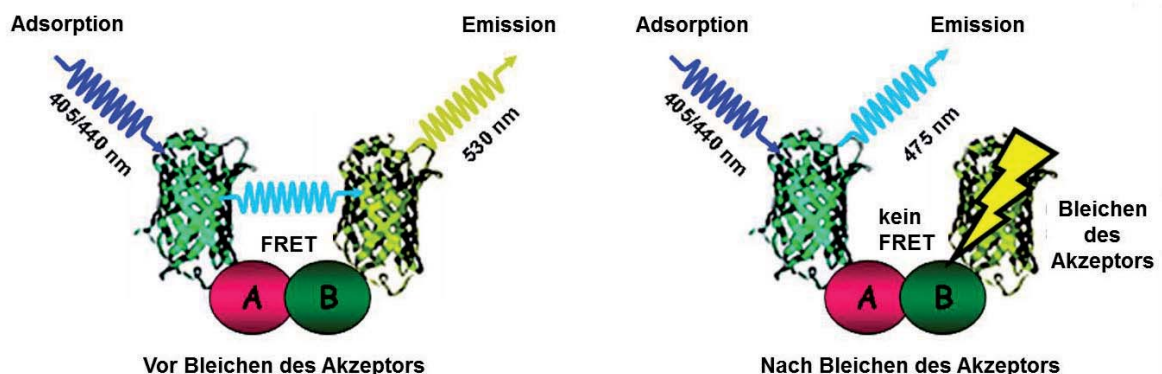


Abb. 2.4: Prinzip von FRET und des „Acceptor photobleaching“

Interagieren die Proteine A und B, welche mit dem Donormolekül CFP bzw. mit dem Akzeptormolekül YFP fusioniert wurden, findet FRET statt. Durch die photochemische Zerstörung (Bleichen) des Akzeptors erfolgt kein weiterer Energietransfer. Dies hat einen Anstieg der CFP-Emission zur Folge (verändert nach Bhat et al. 2006).



Durchführung und Auswertung der FRET-Messungen

Die FRET-Messungen wurden unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes LSM710 (Zeiss) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Dr. B. Hause (IPB, Halle) durchgeführt. Die zu untersuchenden Pflanzenproben wurden vor der Aufnahme mit Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon (CCCP) infiltriert, um die Bewegung der Zellorganellen zu inhibieren (Hollenbeck et al. 1985). Die Infiltration erfolgte unter leichtem Unterdruck in einer Spritze mit 200 μ M CCCP. Für die FRET-Messung wurde das Pflanzenmaterial einmal vor dem Bleichen und einmal nach dem Bleichen des YFP (Laserstärke 100 %, 514 nm, 10 Scans) mit einer Anregung von 458 nm gescannt und im λ -Modus (466-603 nm) aufgenommen. Für die Auswertung wurde für jede Aufnahme die Peak-Region des CFP (476-486 nm) extrahiert (Software ZEN (Zeiss Enhanced Navigation) 2009, Zeiss).

Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität (I) des CFP vor und nach dem Bleichen wurde mit Hilfe des AxioVision Moduls AutMess (siehe 2.13.2) durchgeführt. Hierbei wurde von zufällig ausgewählten Peroxisomen die mittlere Grauwertintensität vor und nach dem Bleichen bestimmt.

Die Quantifizierung der FRET-Messungen erfolgte durch die Berechnung der FRET-Effizienz (E) mit folgender Formel (Karpova et al. 2003):

$$E = (1 - I_{\text{vor Bleichen}}/I_{\text{nach Bleichen}}) \times 100$$

2.14 Statistische Analysen

Die Rohdaten wurden mit Microsoft Excel 2007/2010 erfasst und die Graphen erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat® 3.5 (Systat Software, Erkrath).

Zur Anwendung kamen als nicht parametrische Tests der Wilcoxon-Rangsummentest und der „Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“-Test. Für den Kruskal-Wallis Test wurden folgende Methoden verwendet: Student-Newman-Keuls (SNK) Methode, Tukey Methode und Dunn's Methode. Alle drei Methoden geben mit paarweisen Mittelwertvergleichen darüber Auskunft, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Dabei ist die Student-Newman-Keuls (SNK) Methode weniger konservativ als die Tukey Methode, was bedeutet, dass die Nullhypothese schneller abgelehnt wird. Die Dunn's Methode wurde angewendet, wenn die zu vergleichenden Gruppen eine unterschiedliche Stichprobengröße aufwiesen.



3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Es ist bekannt, dass in Reaktion auf Insektenbefall und Verwundung die Konzentration an JA-Ile in verwundeten Blättern bereits nach wenigen Minuten ansteigt (Chung et al. 2008, Glauser et al. 2008, Koo et al. 2009). Unklar ist bislang, auf welche Weise die Syntheserate der JA-Ile erhöht wird. Ein so schneller Anstieg ist nicht durch Regulation auf Ebene der Genexpression erklärbar. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch eine posttranslationale Modifizierung und Aktivierung der OPR3 der sprunghafte Anstieg der JA nach Verwundung erfolgt und eine Kontrolle der JA-Biosynthese ermöglicht wird.

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass *S/OPR3* ein sich selbst-inhibierendes Dimer bildet (Breithaupt et al. 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aktivität der OPR3 durch das Monomer/Dimer Gleichgewicht reguliert wird. Desweiteren wird vermutet, dass OPR3 an Tyr364 (Tomate) bzw. Tyr365 (*Arabidopsis*) reversibel phosphoryliert werden könnte und sich nach der Phosphorylierung das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Dimers verschiebt (Breithaupt et al. 2006).

Ein Ziel dieser Arbeit war, es zu klären, ob OPR3 auch *in vivo* in der Lage ist zu dimerisieren und ob einzelne Aminosäurereste (wie z. B. Tyr365) einen Einfluss auf das Interaktionsverhalten und damit die Stabilität des OPR3-Dimers nehmen.

3.1.1 OPR3-YFP-Fusionskonstrukte für die BiFC

Die Dimerisierung von OPR3 *in vivo* wurde mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) untersucht. Dazu wurde das klassische split-Y(ellow)F(luorescent)P(rotein)-System und OPR3 aus *A. thaliana* verwendet. Es wurden Fusionskonstrukte mit OPR3 und der N- bzw. C-terminalen Domäne des YFP (YFP_N bzw. YFP_C) erstellt, welche unter die Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors gestellt wurden (*35S:OPR3-YFP_N-SRL*, *35S:OPR3-YFP_C-SRL*, siehe 2.6.9.6). Beide YFP-Hälften für sich zeigen keine Fluoreszenz. Falls OPR3 in der Lage ist zu dimerisieren, können die beiden YFP-Domänen interagieren und funktionelles YFP-Protein rekonstituieren. Durch Anregung bei 514 nm ist es dann möglich die Emission des Fluorophors zu detektieren (siehe 2.13.2). Aufgrund der Kristallstruktur des *S/OPR3*-Dimers wurden die YFP-Hälften C-terminal an OPR3 fusioniert. In der Kristallstruktur des OPR3-Dimers zeigen die C-Termini der beiden Protomere in die gleiche Richtung (Breithaupt et al. 2006). Darüber hinaus scheint der C-



Terminus ziemlich flexibel zu sein, da die letzten Aminosäuren der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden konnten.

Die letzten drei Aminosäuren der OPR3 (SRL) stellen ein peroxisomales Zielsignal dar und sind für den Import des Proteins in Peroxisomen verantwortlich. Aus diesem Grund wurde das Tripeptid SRL zusätzlich C-terminal an die YFP-Hälften fusioniert. Das Stoppcodon der OPR3-Sequenz, ebenso wie die nun überflüssige SRL-Sequenz am C-Terminus der OPR3 wurden entfernt.

Die Fusionskonstrukte $35S:OPR3\text{-}YFP_N\text{-}SRL$, $35S:OPR3\text{-}YFP_C\text{-}SRL$ wurden zunächst in den Vektor pART7 kloniert. Um zu untersuchen, ob bestimmte Aminosäuren einen Einfluss auf die Dimerisierung nehmen, wurde eine zielgerichtete Mutagenese (siehe 2.6.7.3) der OPR3-Sequenz in pART7 durchgeführt.

In der OPR3-Mutanten E292K wurde in Position 292 die saure Aminosäure Glutamat gegen die basische Aminosäure Lysin ersetzt. Das E292 ist in einer wichtigen Position der fingerähnlichen Dimerisierungsdomäne der OPR3 exponiert und es wurde gezeigt, dass die entsprechende Aminosäure von OPR3 aus Tomate zumindest *in vitro* eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung einnimmt. Die entsprechende Mutante E291K aus Tomate verhielt sich während der Kristallisation und einer analytischen Ultrazentrifugation wie ein Monomer (Breithaupt et al. 2006). Um zu untersuchen, ob eine Veränderung des Dimerisierungsverhalten des mutierten E292K Proteins auch *in vivo* beobachtet werden kann, wurden die Fusionskonstrukte $35S:OPR3_{E292K}\text{-}YFP_N\text{-}SRL$ und $35S:OPR3_{E292K}\text{-}YFP_C\text{-}SRL$ generiert (siehe 2.6.9.6).

In der OPR3-Mutanten Y365F wurde das Tyrosin an Position 365 durch ein Phenylalanin substituiert. Phenylalanin unterscheidet sich von der Aminosäure Tyrosin durch das Fehlen einer Hydroxygruppe am Phenylring. Aus diesem Grund sollte die Mutante an Position 365 von einer potentiellen Proteinkinase nicht mehr phosphoryliert werden können. Falls die Dimerisierung der OPR3 phosphorylierungsabhängig ist, sollte diese Mutante keine oder zumindest eine geringere Fähigkeit zur Dimerisierung zeigen. Aus diesem Grund wurden die Fusionskonstrukte $35S:OPR3_{Y365F}\text{-}YFP_N\text{-}SRL$ und $35S:OPR3_{Y365F}\text{-}YFP_C\text{-}SRL$ erstellt (siehe 2.6.9.6).

Außerdem wurden Fusionskonstrukte der Doppelmutante (DMEY) generiert – $35S:OPR3_{E292K, Y365F}\text{-}YFP_N\text{-}SRL$ und $35S:OPR3_{E292K, Y365F}\text{-}YFP_C\text{-}SRL$ (siehe 2.6.9.6) – welche beide mutierten Aminosäuren der OPR3 enthielt.

Um einen Anhaltspunkt für die maximal erreichbare Fluoreszenz zu erhalten, wurde als Positivkontrolle das Konstrukt $35S:OPR3\text{-}YFP\text{-}SRL$ generiert (siehe 2.6.9.6), welches für OPR3 mit einer vollständigen YFP-Sequenz codiert. Als Negativkontrolle dienten split-YFP-



Fusionskonstrukte mit OPR1 aus *S. lycopersicum*. Die Proteinstrukturen der OPR3 und der OPR1 sind über weite Strecken gleich. Durch unterschiedliche Ausbildung des L6-Loops ist OPR1 – im Gegensatz zu OPR3 – jedoch nicht in der Lage zu dimerisieren (Breithaupt et al. 2001). Im BiFC-Experiment mit OPR1 wird daher keine Fluoreszenz erwartet.

3.1.2 Interaktionsverhalten der OPR3 und verschiedener OPR3-Mutanten in Zwiebel-epidermiszellen

Für die Untersuchung der Dimerisierung der OPR3 *in vivo* wurden die beiden Fusionskonstrukte *35S:OPR3-YFP_N-SRL* und *35S:OPR3-YFP_C-SRL* mit Hilfe einer Genkanone transient in Zwiebel-epidermiszellen eingebracht (siehe 2.7). Als Expressions- und Lokalisationskontrolle wurde der peroxisomale Marker pKAT2-eqFP611 (Forner & Binder 2007) koexprimiert, welcher für ein Fusionsprotein aus einer verkürzten Form der 2-Ketoacyl-CoA-Thiolase 2 aus *A. thaliana* und eqRFP (*Entacmaea quadricolor* RFP) codiert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde bei 200-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit der Mikroskop-Komponente ApoTome (Zeiss) durchgeführt.

Tatsächlich konnte in Zwiebel-epidermiszellen, welche OPR3-YFP_N-SRL und OPR3-YFP_C-SRL exprimierten, nach 24 Stunden eine starke Fluoreszenz in Peroxisomen beobachten werden (Abb. 3.1). Auf diese Weise konnte die Dimerisierung von OPR3 erstmalig auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurde das gleiche Experiment für die durch zielgerichtete Mutagenese veränderten OPR3-Proteine durchgeführt. Eine Rekonstitution des YFP im split-YFP-Experiment war auch für E292K, Y365F und DMEY zu beobachten. Die YFP-Fluoreszenzintensität schien hier allerdings um einiges schwächer, als es sich im split-YFP-Experiment für das wildtypische OPR3 gezeigt hatte (exemplarisch gezeigt für E292K in Abb. 3.1).

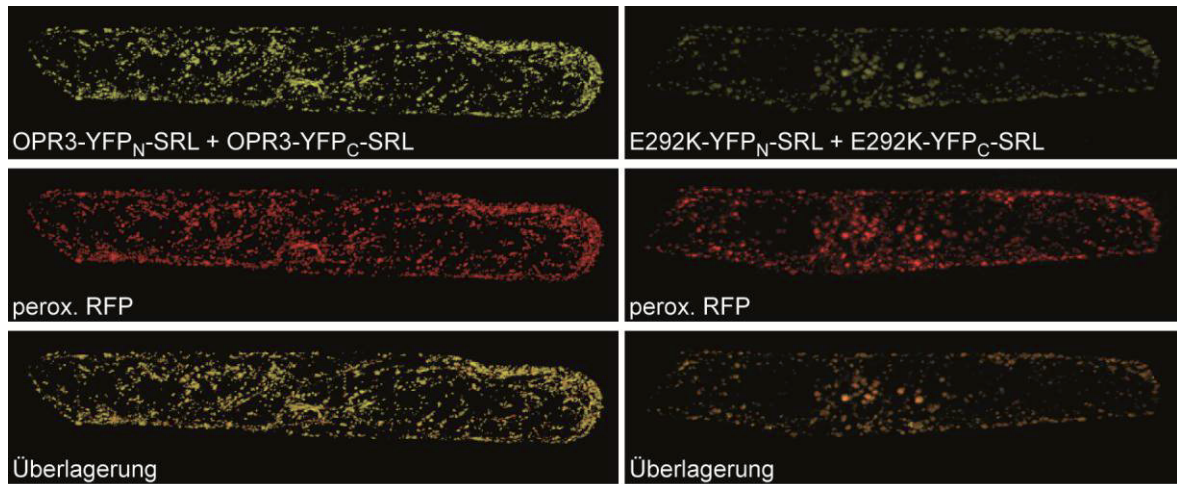


Abb. 3.1: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels BiFC in Zwiebelepidermiszellen

Die split-YFP-Fusionskonstrukte *35S:OPR3-YFP_N-SRL* und *35S:OPR3-YFP_C-SRL* bzw. *35S:E292K-YFP_N-SRL* und *35S:E292K-YFP_C-SRL* wurden transient in Zwiebelepidermiszellen koexprimiert. Der peroxisomale (perox. RFP) Marker pKAT2-eqFP611 (Forner and Binder, 2007), welcher für ein Fusionsprotein aus verkürzter 2-Ketoacyl-CoA-Thiolase 2 (*A. thaliana*) und eqRFP (*Entacmaea quadricolor* RFP) codiert, wurde als Lokalisationskontrolle verwendet. Positive Signale wurden nach 24 h bei 200-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Dargestellt sind der gelbe Fluoreszenzkanal (oben, Filtersatz für YFP: 46 HE), der rote Fluoreszenzkanal (mitte, Filtersatz für RFP: 43 HE) und eine Überlagerung der beiden Kanäle (unten).

Im Folgenden wurde die relative YFP-Fluoreszenzintensität aller OPR3-Varianten, der Negativ- und der Positivkontrolle von jeweils 30 Zellen bestimmt. Die Intensität der YFP-Fluoreszenz wurde in Bezug auf die Fluoreszenzintensität des eqRFP, welches in jedem einzelnen Experiment koexprimiert wurde, normalisiert (YFP/RFP*100). Die Fluoreszenzintensität des eqRFP war für alle analysierten Zellen (n = 210) relativ konstant ($\bar{x} = 470,9 \pm 199,9$, gesamte Datensätze für RFP und YFP im Anhang A1). Fluoreszierende Zellen wurden unter der Verwendung identischer Parameter aufgenommen (Belichtungszeit der Fluoreszenzaufnahme (200 ms), Bildausschnitt (1388 x 660 Pixel), Vergrößerung (200-fach)). Die Fluoreszenzintensität wurde wie unter 2.13.2 beschrieben über die mittlere Grauwertintensität für jeweils beide Kanäle (YFP und RFP) ermittelt. Auf diese Weise war ein Vergleich des Dimerisierungspotentials zwischen dem wildtypischen OPR3 mit den OPR3-Varianten und den Kontrollen möglich.

Im split-YFP-Experiment wurde für wildtypische OPR3 die höchste Fluoreszenz ermittelt (OPR3-YFP_{N+C}-SRL, med = 19,5, Abb. 3.2). Nur durch die Positivkontrolle mit OPR3-YFP-SRL wurde diese hohe Fluoreszenzintensität noch übertroffen (OPR3-YFP-SRL, med = 25,6, Abb. 3.2). Dies war zu erwarten, da die Fluoreszenzintensität vollständiger YFP-



Fusionsproteine gegenüber BiFC-fähigen Fusionsproteinen generell erhöht ist (Kerppola 2008).

Verglichen mit der Fluoreszenz wildtypischer OPR3 im split-YFP-Experiment fiel die Fluoreszenzintensität für die mutierten OPR3 Proteine E292K und DMEY signifikant niedriger (13- bzw. zehnmal) aus. (E292K-YFP_{N+C}-SRL, med = 1,5; DMEY-YFP_{N+C}-SRL, med = 1,8; Kruskal-Wallis Test, SNK Methode, P<0,05; Abb. 3.2). Damit war das Dimerisierungspotential dieser mutierten Proteine ähnlich gering, wie das der Negativkontrolle mit der monomeren *S/OPR1* (*S/OPR1*-YFP_{N+C}-SRL, med = 1,1; Abb. 3.2). Signifikante Unterschiede im Dimerisierungspotential bestanden auch zwischen Y365F und OPR3 (Kruskal-Wallis Test, SNK Methode, P<0,05). Für Y365F wurde nur ein Drittel der Fluoreszenzintensität für OPR3 ermittelt (Y365F-YFP_{N+C}-SRL, med = 6,7). Das Dimerisierungspotential zwischen E292K und DMEY war dagegen nicht signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis Test, SNK Methode, P<0,05) (Abb. 3.2). Um zu zeigen, dass die Fluoreszenzunterschiede nicht auf eine Instabilität der mutierten Proteine zurückzuführen war, wurde außerdem noch eine zusätzliche Positivkontrolle, *35S:DMEY-YFP-SRL*, erstellt, welche für ein Fusionsprotein aus der Doppelmутanten und dem vollständigen YFP codiert. Das Protein wurde stabil exprimiert, was sich in der gegenüber OPR3-YFP-SRL tendenziell erhöhten Fluoreszenzintensität äußert (DMEY-YFP-SRL, med = 44,6).

Die Fluoreszenzdaten zeigen deutlich, dass OPR3 auch *in vivo* in der Lage ist zu dimerisieren. Es scheint in Zwiebelepidermiszellen größtenteils als Dimer vorzuliegen, da vergleichbare Werte für OPR3-YFP-SRL und OPR3-YFP_{N+C}-SRL ermittelt werden konnten. Die Daten lassen außerdem darauf schließen, dass die Mutanten E292K und DMEY tatsächlich nicht mehr in der Lage sind zu dimerisieren oder zumindest nur noch eine sehr schwache Interaktion zwischen den beiden Protomeren stattfindet, da die Fluoreszenzintensitäten ähnlich gering ausfielen, wie für die Negativkontrolle mit *S/OPR1*. Dass auch für die Negativkontrolle noch eine schwache Fluoreszenz zu beobachten war, lässt sich durch das zufällige Aufeinandertreffen der beiden YFP-Hälften im Peroxisom und die dadurch bedingte Rekonstitution des YFP erklären. Die Fluoreszenzwerte der Y365F Mutanten zeigten, dass auch diese Mutante im Vergleich zu wildtypischer OPR3 eine verminderte Tendenz zur Dimerisierung hat.

Die split-YFP-Analyse in Zwiebelepidermiszellen zeigte deutlich, dass die Aminosäuren E292 und Y365 für das OPR3 aus *A. thaliana* eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung spielen.

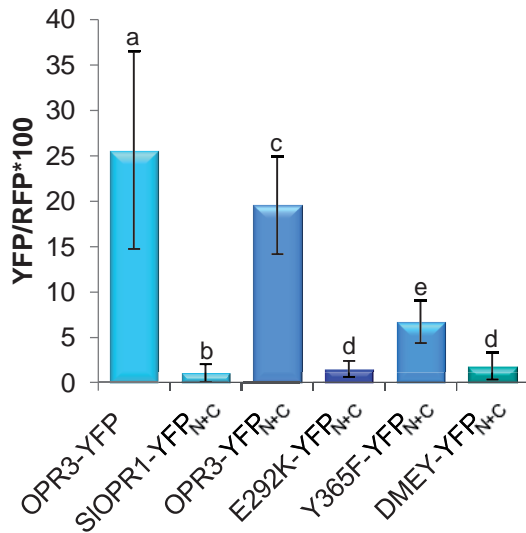


Abb. 3.2: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels BiFC nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen

Das split-YFP-System wurde verwendet, um das Dimerisierungspotential der wildtypischen OPR3 mit dem der Einzelmutanten E292K und Y365F und der Doppelmutanten OPR3_{E292K; Y365F} (DMEY) quantitativ zu vergleichen. Als Positivkontrolle für die Proteinexpression und die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität wurde das Fusionsprotein aus OPR3 und dem vollständigen YFP verwendet (OPR3-YFP). Als Negativkontrolle wurden split-YFP-Fusionsproteine mit S/OPR1 erstellt, welche nicht dimerisieren können (S/OPR1-YFP_{N+C}). Für die Quantifizierung wurde die

YFP-Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Fluoreszenzintensität des koexprimierten RFP-Proteins gemessen. Es wurden jeweils 30 Zellen für jede Konstruktkombination analysiert und für die ermittelten Daten Median und Standardfehler (+/-) angegeben. Die Buchstaben geben signifikante Unterschiede an, $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis Test, SNK Methode).

3.1.3 Interaktionsverhalten der OPR3 und verschiedener OPR3-Mutanten in unterschiedlichen Geweben von *A. thaliana*

Die Dimerisierung der OPR3 und der mutierten Formen sollte nicht nur nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen, sondern auch in stabil transformierten Pflanzen untersucht werden, um das Dimerisierungspotential der OPR3 in unterschiedlichen Geweben der Pflanze und während der Entwicklung beobachten zu können. Daher wurden im nächsten Schritt, die bereits für das split-YFP-Experiment in Zwiebelepidermiszellen verwendeten Fusionskonstrukte *35S:OPR3-YFP_N-SRL*, *35S:OPR3-YFP_C-SRL*, *35S:E292K-YFP_N-SRL*, *35S:E292K-YFP_C-SRL*, *35S:Y363F-YFP_N-SRL*, *35S:Y365F-YFP_C-SRL*, *35S:DMEY-YFP_N-SRL* und *35S:DMEY-YFP_C-SRL* in den Vektor pBART umkloniert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* stabil ins *Arabidopsis*-Genom eingebracht (siehe 2.6.3). Die Fusionskonstrukte mit YFP_N bzw. YFP_C wurden zunächst jeweils einzeln in *Arabidopsis* transformiert. Für die Transformation wurden *opr3*-Pflanzen verwendet, die durch eine T-DNA Insertion über kein funktionelles *OPR3*-Gen verfügen (Stintzi & Browse 2000). Durch das Fehlen der wildtypischen OPR3 wurde zum einen sichergestellt, dass die Dimerisierung nur zwischen den Fusionsproteinen erfolgen kann und zum anderen konnte die erfolgreiche Transformation und Funktionalität der eingebrachten OPR3-Fusionsproteine direkt durch Komplementation des männlich sterilen *opr3*-Phänotyps beobachtet werden. Transgene Pflanzen wurden durch die Basta-Resistenz selektiert (siehe 2.6.3) und mittels PCR (siehe 2.6.7.1) auf Insertion der



Konstrukte überprüft (nicht gezeigt). Die Expression der Fusionsproteine in den transgenen Pflanzen wurde mittels Western-Blot-Analyse (siehe 2.11.7) getestet (nicht gezeigt). Für die Konstrukte mit YFP_N bzw. YFP_C wurden jeweils zwei unabhängige transgene Linien gewählt. Linien, die eine ähnliche Expression der jeweiligen Fusionsproteine zeigten, wurden anschließend miteinander gekreuzt (siehe 2.5.3). Blattepidermis, der daraus hervorgegangenen Pflanzen der F1-Generation wurde präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 3.3).

¼ der Pflanzen exprimierten die beiden Fusionsproteine OPR3-YFP_N-SRL und OPR3-YFP_C-SRL. Dies entsprach den Erwartungen, da beide Elterpflanzen hemizygot für die YFP-Fusionskonstrukte waren. Wiederum konnte eine starke Fluoreszenz in den Peroxisomen beobachtet werden (Abb. 3.3). So konnte gezeigt werden, dass OPR3 auch in *A. thaliana* in der Lage ist zu dimerisieren. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzintensität des rekonstituierten YFP für E292K und DMEY nur sehr schwach ausfiel (exemplarisch gezeigt für E292K; Abb. 3.3). Um diese Fluoreszenzunterschiede in *Arabidopsis* quantitativ zu bestimmen, wurde das AxioVision Modul AutMess (Zeiss) verwendet (siehe 2.13.2).

Zunächst wurde für alle transgene Pflanzenlinien (F1-Generation der Kreuzung), welche beide split-YFP-Konstrukte exprimierten, die YFP-Fluoreszenz von Kotyledonen sieben Tage alter Pflanzen untersucht. Dafür wurden von jeder Linie zwölf Pflanzen verwendet und von jeder Pflanze drei Aufnahmen erstellt. Mit Hilfe des AutMess Assistenten (Zeiss) wurde anschließend ein Schwellwert (Pixel-Grauwert 200) festgelegt, welcher die Grenze zwischen Objekt und Hintergrund definiert (siehe 2.13.2). Dadurch wurden in jeder Aufnahme nur Peroxisomen erfasst, deren Grauwert den Schwellwert überschritt (Abb. 3.3, unten). Die Zahl der so ermittelten Peroxisomen korreliert mit der Fluoreszenzintensität (siehe 2.13.2) und erlaubte damit einen Vergleich des Dimerisierungspotentials zwischen wildtypischer OPR3 und den OPR3-Mutanten.

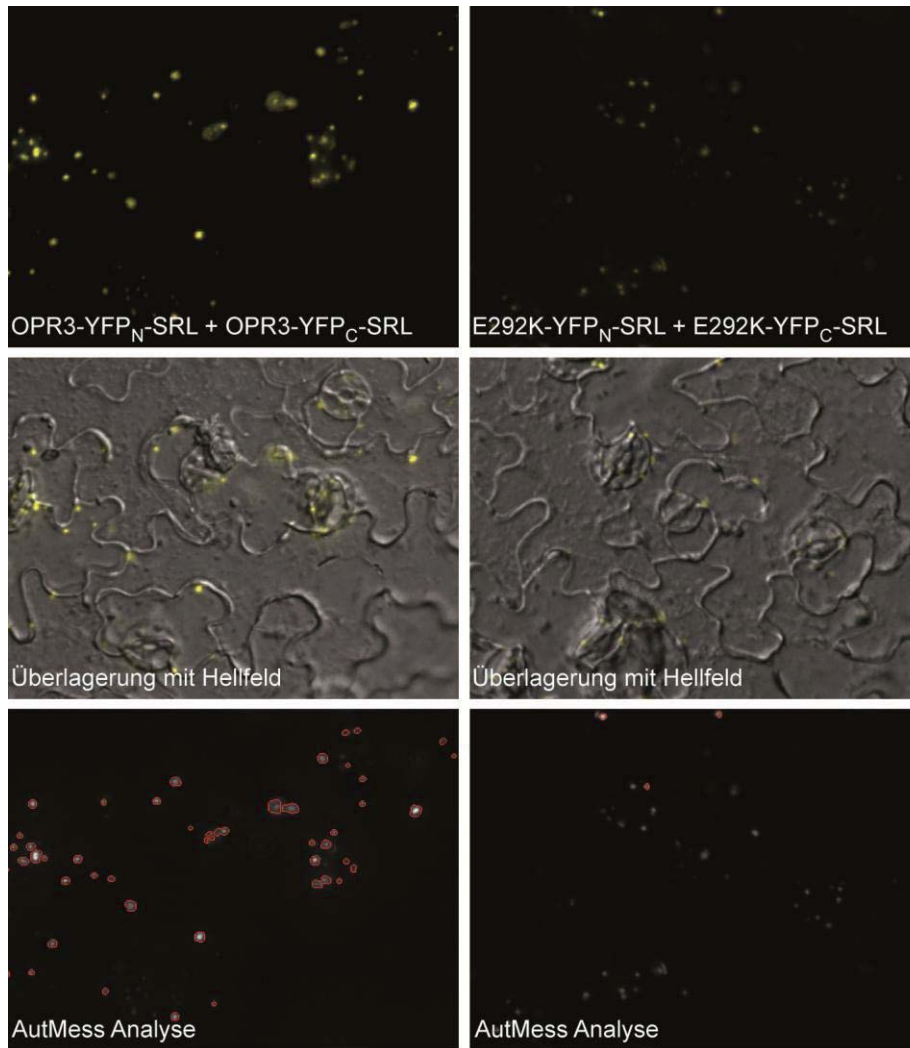


Abb. 3.3: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels BiFC in *A. thaliana* und schematische Darstellung der Fluoreszenzquantifizierung mittels des Axio Vision Moduls AutMess

Split-YFP-Fusionskonstrukte mit OPR3 und mutierten OPR3-Formen (hier E292K) wurden mittels *A. tumefaciens* stabil in das *Arabidopsis*-Genom eingebracht. Blattepidermis transgener Pflanzen (Alter: 2 Wochen) wurde bei 200-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde der Filtersatz 46 HE (YFP) verwendet. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Axio Vision Moduls AutMess (Zeiss), welches definierte Pixel-Grauwerte erkennt, diese als Objekte markiert und deren Anzahl bestimmt. Der Schwellwert für die Pixel-Grauwert Erkennung wurde für die quantitative Auswertung so definiert, dass nur stark fluoreszierende Peroxisomen ausgewählt wurden. Daher wurde bei einer starken Fluoreszenz (OPR3 split-YFP, links unten) eine höhere Peroxisomenanzahl ermittelt, als bei einer schwachen Fluoreszenz (E292K split-YFP, rechts unten).

Auf diese Weise wurden für jede transgene Pflanzenlinie zunächst der Mittelwert der Peroxisomenanzahl und die Standardabweichung bestimmt (Abb. 3.4, A).

Für Pflanzen, welche OPR3-YFP_{N+C}-SRL exprimierten, konnte eine größere Peroxisomenanzahl ermittelt werden (\bar{x} = 272 und 278 für Linien 1 und 2), als für Pflanzen, die die Fusionsproteine mit E292K (\bar{x} = 114 und 155) und DMEY (\bar{x} = 31 und 100) exprimierten. Pflanzen,



welche Y365F-YFP_{N+C}-SRL exprimierten, zeigten jedoch – anders als im Experiment mit Zwiebelepidermiszellen – eine im Vergleich zu wildtypischer OPR3 tendenziell erhöhte Fluoreszenz, (\bar{x} = 412 und 345) (Abb. 3.4, A).

Die Ergebnisse für die beiden transgenen Linien der einzelnen Konstruktkombinationen (z. B. Linien 1 und 2 für OPR3-YFP_{N+C}-SRL) wurden zu einem Datensatz zusammengefasst und, da die Werte im kombinierten Datensatz nicht normalverteilt waren, der Median (med) ermittelt (OPR3-YFP_{N+C}-SRL: med = 267, E292K-YFP_{N+C}-SRL: med = 131, Y365F-YFP_{N+C}-SRL: med = 365, DMEY-YFP_{N+C}-SRL: med = 54). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen OPR3 und Y365F zu den mutierten Proteinen E292K und DMEY. Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen OPR3 und Y365F und zwischen E292K und DMEY ermittelt (Kruskal-Wallis Test, Dunn's Methode, $P < 0,05$; Abb. 3.4, B).

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen wildtypischer OPR3 und den mutierten OPR3-Varianten im split-YFP-Experiment aufgrund des verschiedenen Dimerisierungsverhaltens der OPR3-Formen zustande kamen, oder nur auf eine unterschiedliche Stabilität der Proteine zurückzuführen waren, wurde zur Kontrolle die YFP-Fluoreszenz auch in Pflanzen quantifiziert, die mit den Fusionskonstrukten *35S:OPR3-YFP-SRL*, *35S:E292K-YFP-SRL*, *35S:Y365F-YFP-SRL* und *35S:DMEY-YFP-SRL* (siehe 2.6.9.6) transformiert worden waren und folglich das vollständige YFP in Fusion mit den OPR3-Varianten enthielten. Die Fluoreszenzintensität der transgenen Pflanzen wurde wiederum quantifiziert. Pro Konstrukt wurden zwölf Pflanzen einer Linie verwendet und 36 Aufnahmen analysiert. In diesem Fall konnten, wie erwartet, keine signifikanten Unterschiede in der Peroxisomenanzahl festgestellt werden (OPR3-YFP-SRL: med = 761, E292K-YFP-SRL: med = 784, Y365F-YFP-SRL: med = 721, DMEY-YFP-SRL: med = 751; Kruskal-Wallis Test, Dunn's Methode, $P < 0,05$; Abb. 3.4, B). Dadurch ließ sich schließen, dass die im split-YFP-System beobachteten Intensitätsunterschiede der YFP-Fluoreszenz in den transgenen Pflanzen auf ein unterschiedliches Dimerisierungsverhalten der OPR3-Varianten und nicht auf Unterschiede in ihrer Stabilität zurückzuführen waren.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Fluoreszenzunterschiede in den verschiedenen transgenen Linien durch aufgrund von Positionseffekten unterschiedlich starke Proteinexpression zustande kamen, wurde die Menge an exprimierten OPR3-Fusionsproteinen der einzelnen transgenen Linien bestimmt. Hierfür wurden von jeweils 25 Pflanzen (Alter: ein bis



zwei Wochen) Proteinextrakte gewonnen (siehe 2.11.2). 20 µg Gesamtprotein wurden mittels 12 %-igen SDS-PAGE-Gel (siehe 2.11.5) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (siehe 2.11.7) übertragen. Der Western-Blot wurde mit dem primären AK anti-GFP (1:3.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt und durch ECL (Enhanced Chemo Luminescence) entwickelt (obere Bande: OPR3-YFP_N-SRL, untere Bande: OPR3-YFP_C-SRL; Abb. 3.4, C).

Da tatsächlich Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den transgenen Linien beobachtet werden konnten, wurde die Intensität der OPR3-Fusionsproteinbanden für jede Pflanzenlinie quantifiziert (siehe 2.11.8) und auf die Menge an geladenem Protein normalisiert. Hierzu wurde der Western-Blot „gestrippt“ und anschließend mit anti-Aktin entwickelt. Die detektierten Banden wurden wiederum quantifiziert (Abb. 3.4, C unten). Für die Normalisierung wurden die Intensitätswerte für die OPR3-Fusionsproteine ins Verhältnis zu den Intensitätswerten der Aktin-Proteine gesetzt (Signalintensität OPR3/Aktin).

Nun konnte die Fluoreszenzintensität der OPR3-Varianten auf den Expressionsspiegel der Fusionsproteine bezogen werden (Peroxisomenanzahl/(Signalintensität OPR3/Aktin)). Für die Signalintensität von OPR3/Aktin standen zwei Werte zur Verfügung (OPR3-YFP_N-SRL/Aktin und OPR3-YFP_C-SRL/Aktin). Es wurde der kleinere Wert verwendet, da die geringere Menge an Fusionsprotein im split-YFP Experiment als die limitierende für die Interaktion angesehen werden kann (Werte im Anhang A2). Nachdem die Fluoreszenzdaten (Peroxisomenanzahl) der einzelnen transgenen Pflanzenlinien ins Verhältnis zur Proteinmenge (Signalintensität OPR3/Aktin) gesetzt worden waren, wurden die beiden Linien der einzelnen Konstrukte wieder zu einem Datensatz zusammengefasst.

Der höchste Wert wurde auf diese Weise für das wildtypische OPR3 ermittelt (med = 170) und erwies sich als signifikant unterschiedlich zu E292K (med = 118) und DMEY (med = 108). Y365F (med = 159) war sowohl zu OPR3 signifikant unterschiedlich als auch zu E292K und DMEY. Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen E292K und DMEY (Kruskal-Wallis-Test, SNK Methode, P<0,05; Abb. 3.4, E).

Das split-YFP-Experiment in *A. thaliana* wurde nicht nur für Messungen in Kotyledonen, sondern auch für Messungen in Leitbündeln (Blätter) von vier Wochen alten Pflanzen durchgeführt, um zu testen, ob auch in anderen Gewebe die gleichen Unterschiede zwischen den OPR3-Varianten beobachtet werden können. Es wurden die gleichen Pflanzenlinien untersucht (pro Linie fünf Pflanzen, n = 15) und die gleichen Werte für die exprimierte Proteinmenge verwendet wie zuvor. Tatsächlich bestanden auch in Leitbündeln die gleichen signifikanten Unterschiede zwischen OPR3 und den mutierten OPR3 Proteinen (OPR3: med = 391,



E292K: med = 161, Y365F: med = 280, DMEY: med = 154; Abb. 3.4, F). Zudem traten die Unterschiede zwischen OPR3 und den mutierten Proteinen in Leitbündeln noch deutlicher hervor.

Für Pflanzen, welche die OPR3-Varianten mit dem vollständigen YFP enthielten, wurde die Proteinmenge ebenfalls mittels Western-Blot-Analyse bestimmt und quantifiziert (Abb. 3.4., D). Auch hier wurde die zuvor ermittelte Peroxisomenanzahl ins Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt (Peroxisomenanzahl/(Signalintensität OPR3/Aktin)). Auch nach der so vorgenommenen Korrektur konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den OPR3-Varianten festgestellt werden (OPR3-YFP-SRL: med = 650, E292K-YFP-SRL: med = 682, Y365F-YFP-SRL: med = 655, DMEY-YFP-SRL: med = 620; Kruskal-Wallis Test, $P = 0,211$).

Zusätzlich wurde exemplarisch untersucht, ob alle transgenen *opr3*-Pflanzen welche die unterschiedlichen OPR3-Varianten exprimierten auch die gleiche Anzahl an Peroxisomen enthielten (Analyse der gesamten Peroxisomenanzahl in zwölf Aufnahmen pro OPR3-Variante, mittels Axio Vision Modul AutMess (siehe 2.13.2)). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die festgestellten Unterschiede in der Anzahl der fluoreszierenden Peroxisomen durch eine Veränderung der Peroxisomenzahl in den transgenen Pflanzengewebe zustande kamen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Peroxisomenanzahl festgestellt werden (nicht gezeigt).

Insgesamt konnten damit die im BiFC-Experiment mit Zwiebelepidermiszellen erhaltene Resultate in *A. thaliana* bestätigt werden. Für die mutierten Proteine Y365F, E292K und DMEY konnte mit dem split-YFP-System in *Arabidopsis* sowohl in Kotyledonen als auch in Leitbündeln beobachtet werden, dass diese nicht mehr oder zumindest nicht mehr in gleichem Maße wie wildtypische OPR3 interagieren. Dabei schien Y365F sowohl in Zwiebelepidermiszellen als auch in *A. thaliana* ein höheres Dimerisierungspotential aufzuweisen als E292K und DMEY. Zu erwarten wäre gewesen, dass die Doppelmutante DMEY noch schlechter in der Lage ist zu interagieren als die Einzelmutanten. Möglicherweise ist aber schon die Einzelmutante E292K nicht mehr in der Lage zu dimerisieren und damit der minimale Wert erreicht, weshalb für die Doppelmutante ein nicht noch geringerer Wert festgestellt werden konnte.

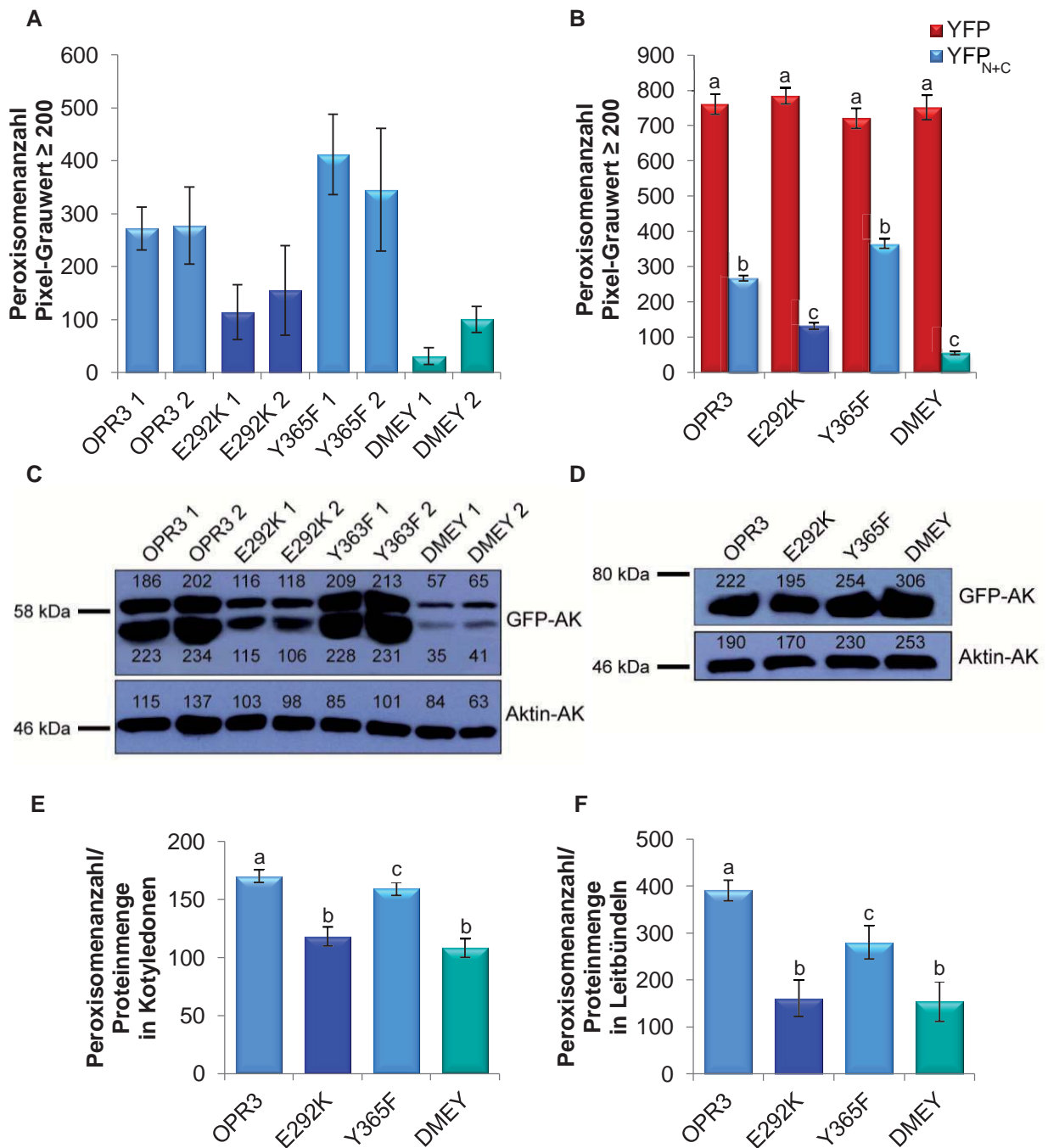


Abb. 3.4: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels BiFC in *A. thaliana* im Verhältnis zur exprimierten Proteinmenge

Das split-YFP-System wurde verwendet, um das Dimerisierungspotential der wildtypischen OPR3 mit dem der Einzelmutanten E292K und Y365F und der Doppelmutanten OPR3^{E292K; Y365F} (DMEY) in *Arabidopsis* quantitativ zu vergleichen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Axio Vision Moduls AutMess (Zeiss), durch das bei Fluoreszenzaufnahmen die Anzahl von Objekten (hier: Peroxisomen) über einem bestimmten Pixel-Grauwert (200) ermittelt werden konnte.

A Das Dimerisierungspotential der OPR3-Varianten wurde über die Peroxisomenanzahl in Kotyledonen bestimmt. Für jede OPR3-Variante wurden zwei unabhängige transgene Linien untersucht, welche die Fusionsproteine aus OPR3 (bzw. mutierten OPR3) und den beiden YFP-Hälften exprimierten. Pro Linie wurden 36 Aufnahmen von 12 Pflanzen (Alter: 1 Woche) analysiert. Mittelwert und Standardabweichung (+/-) werden angegeben. **B** Als Positivkontrolle wurden transgene Pflanzen analysiert (wie in A), welche Fusionsproteine aus



OPR3 bzw. E292K, Y365F und DMEY und dem vollständigen YFP exprimierten. Zudem wurden die Daten der 2 transgenen Linien mit den split-YFP-Fusionskonstrukten aus A in B zu einem Datensatz zusammengefasst. Es werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben.

C und D Jeweils 20 µg Gesamtprotein gewonnen aus 10 Tage alten Pflanzen (je 25) wurden in einem 12 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL entwickelt. Der Western-Blot wurde zunächst mit einem GFP-AK (1:3.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt (C: obere Bande: OPR3-YFP_N-SRL (60 kDa), untere Bande: OPR3-YFP_C-SRL (52 kDa), D: OPR3-YFP-SRL (70 kDa)), anschließend gestriipt und mit einem anti-Aktin-AK (1:4.000) und einem anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) inkubiert. Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Signalintensität der detektierten Banden wurde mittels Photomultiplier und der Software Simple PCI quantifiziert (Werte im Blot angegeben). **E und F** Die ermittelte Peroxisomenanzahl in Kotyledonen bzw. Leitbündeln transgener Pflanzen wurde ins Verhältnis zur Proteinmenge (Signalintensität GFP-AK/Aktin) aus C gesetzt.

Die Buchstaben in B, E und F geben signifikante Unterschiede an, $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis Test, Dunn's Methode (B) und SNK Methode (E und F)).

3.1.4 Dimerisierungszustand der OPR3 während der Blütenentwicklung von *A. thaliana*

Jasmonsäure spielt nicht nur bei Abwehrreaktion von Insekten eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Blütenentwicklung. So induziert und koordiniert Jasmonsäure nicht nur die Elongation der Antherenfilamente, sondern ist auch für die Öffnung des Stomiums während der Anthese und für die Produktion keimungsfähiger Pollen verantwortlich (Stintzi & Browse 2000).

In wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen tritt in den Stadien 11 und 12 eine verstärkte Längenzunahme der Antherenfilamente ein (Abb. 3.5). Stadium 12 beginnt, wenn die Kronblätter die langen Stamina erreichen und endet, wenn die Kelchblätter sich öffnen (Smyth et al. 1990). In Stadium 13 beginnt die Anthese, die Blüte ist geöffnet, die Kronblätter sind sichtbar und wachsen rasch. Zudem findet die Dehiszenz der Antheren statt, die Theken öffnen sich entlang des Stomiums und der Pollen wird freigesetzt (Smyth et al. 1990). In Stadium 14 wachsen die langen Antherenfilamente über die Narbe hinaus (Smyth et al. 1990 und Abb. 3.5). In *opr3*-Pflanzen ist die Blütenentwicklung gestört. Die Elongation der Antherenfilamente während der Stadien 12 und 13 bleibt aus (Stintzi & Browse 2000 und Abb. 3.5). Die Anthese tritt nicht in Stadium 13 auf und der Pollen wird nicht freigesetzt, so dass auf das Stigma der *opr3*-Blüte kein Pollen gelangt (Stintzi & Browse 2000). In Abb. 3.5 ist zu erkennen, dass in Stadium 14 die Antherenfilamente nicht über die Narbe hinauswachsen und der Pollen noch nicht freigesetzt wurde. Versuche mit *opr3*-Pflanzen haben gezeigt, dass die Applikation von Jasmonsäure zu einer Komplementation des männlich sterilen Phänotyps führt und Schoten ge-



bildet werden, wenn sich die Blüte zum Zeitpunkt der JA-Behandlung in einem frühen Entwicklungsstadium befindet. Eine Applikation der Jasmonsäure in einem späteren Stadium (nach Stadium 12) führt nicht zu einer Wiederherstellung der männlichen Fertilität (Stintzi & Browse 2000 und siehe 1.5). Diese Versuche lassen darauf schließen, dass Jasmonsäure vor dem Blütenstadium 13 benötigt und synthetisiert wird.

GUS-Färbungen transgener Pflanzen, welche das Reporter-gen GUS (β -Glucuronidase) unter dem OPR3-Promotor (*OPR3:GUS*) exprimieren zeigten, dass der OPR3-Promotor in den Stadien 11-14 in den Filamenten aktiv ist, und demzufolge das OPR3-Protein in diesen Stadien exprimiert wird (Abb. 3.5). Zudem konnten in Pflanzen, welche das Fusionsprotein aus OPR3 und dem vollständigen YFP exprimierten (OPR3-YFP-SRL), keine Fluoreszenzunterschiede zwischen Antherenfilamenten der Stadien 11-14 beobachtet werden (Abb. 3.5).

OPR3 scheint also in allen Stadien der Blütenentwicklung exprimiert zu werden, obwohl Jasmonsäure nur in den frühen Stadien benötigt wird. Ob OPR3 in den Stadien 11-14 auch immer aktiv ist und damit der Arbeitshypothese nach als Monomer vorliegt oder ob es sich in den späteren Stadien bereits in einen inaktiven Zustand als Dimer befindet, wurde mit Hilfe des split-YFP-Systems untersucht.

Tatsächlich war in den Stadien 11 und 12 bei Pflanzen, welche die Fusionsproteine OPR3-YFP_N-SRL und OPR3-YFP_C-SRL exprimierten, eine geringere Fluoreszenz in Antherenfilamenten zu beobachten, als in den Stadien 13 und 14 (Abb. 3.5). Wegen der gleichförmigen Expression des OPR3-YFP-SRL Fusionsproteins lässt sich schließen, dass die beobachteten Unterschiede im split-YFP-Experiment nicht aufgrund unterschiedlicher Expressionslevel der Proteine in den Stadien 11-14 zustande kamen.

Die beobachteten Unterschiede in der Intensität der YFP-Fluoreszenz in Antherenfilamenten der Stadien 11-14 wurden wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben quantifiziert und anhand der exprimierten Proteinmenge normalisiert. Für die Ermittlung der Fluoreszenzintensität (über die Anzahl der Peroxisomen, welchen einen Pixel-Grauwert über 200 aufwiesen) wurden drei Pflanzen einer transgenen Linie untersucht. Für jedes Stadium, das heißt ≤ 11 (Stadium 10 und 11) und 12-14, wurden 12 kurze und 24 lange Antheren präpariert ($n = 36$), unter dem Axio Imager Z1 bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen und ausgewertet (AutMess). Zur Bestimmung der Proteinmenge der OPR3-Fusionsproteine wurden pro Stadium 20-40 Blüten von vier bis sechs Wochen alten Pflanzen geerntet (Für das Stadium ≤ 11 wurden alle Knos-

pen am Blütenstand unter Stadium 12 geerntet). Die Quantifizierung der Proteinmenge mittels Western-Blot-Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

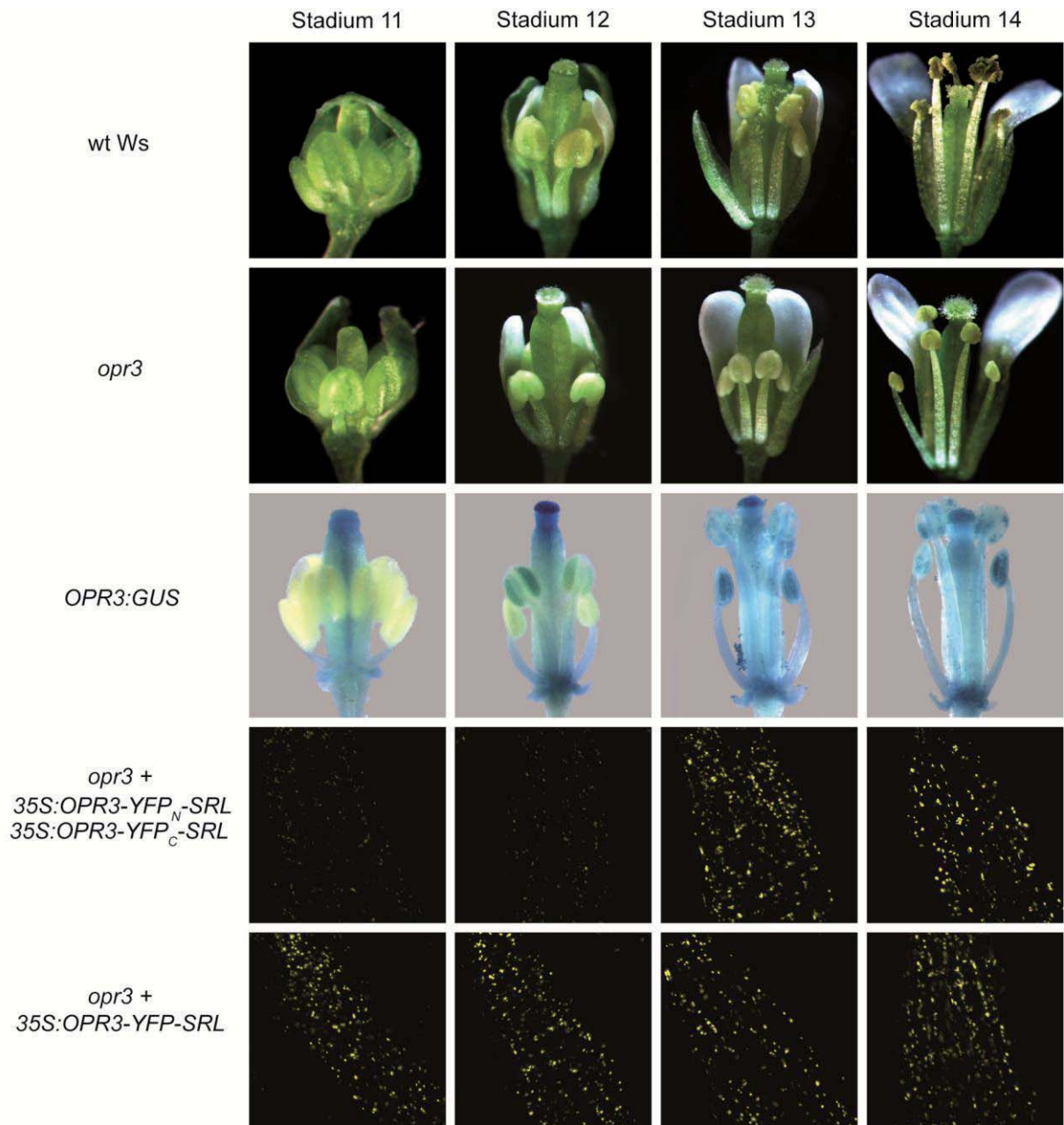


Abb. 3.5: Untersuchung des OPR3-Dimerisierungszustandes mittels BiFC in Antherenfilamenten der Stadien 11-14 der Blütenentwicklung von *A. thaliana*

Die *Arabidopsis*-Blütenstadien 11-14 von Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Wassilewskija (Ws)), von *opr3*-Pflanzen und von GUS gefärbten *OPR3:GUS* Pflanzen wurden bei vier- bis fünffacher Vergrößerung am Stereomikroskop aufgenommen. Antherenfilamente der Stadien 11-14 von *opr3*-Pflanzen, welche die OPR3 split-YFP-Fusionsproteine oder das OPR3-YFP-SRL-Fusionsprotein exprimierten, wurden präpariert und bei 200-facher Vergrößerung mit dem Axio Imager Z1 aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde der Filtersatz 46 HE (YFP) verwendet.



Das Ergebnis der Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung zeigte eindeutig, dass ein signifikanter Unterschied in der YFP-Fluoreszenzintensität zwischen den verschiedenen Stadien bestand. Für die Stadien ≤ 11 und 12 wurden signifikant geringere Werte ermittelt (Stadium ≤ 11 : med = 86, Stadium 12: med = 78), als für die Stadien 13 und 14 (Stadium 13: med = 251, Stadium 14: med = 251; Kruskal-Wallis-Test, Tukey Methode, $P < 0,05$; Abb. 3.6). Als Positivkontrolle wurden auch die Fluoreszenzintensitäten der transgenen Pflanzen quantifiziert, welche OPR3-YFP-SRL exprimierten. Die Quantifizierung erfolgte genauso wie für die Antherenfilamente der split-YFP-Pflanzen. Hier traten keine signifikanten Fluoreszenzunterschiede zwischen den Stadien auf (Stadium ≤ 11 : med = 199, Stadium 12: med = 190, Stadium 13: med = 239, Stadium 14: med = 199, Kruskal-Wallis-Test, $P = 0,081$; Abb. 3.6).

Um auch hier auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede nicht durch verschiedene Peroxisomenzahlen in den Blütenstadien zustande kamen, wurde in diesem Experiment ebenfalls exemplarisch (zwölf Aufnahmen je Stadium) die Gesamtzahl der Peroxisomen in jedem Blütenstadium mit Hilfe des AutMess Assistenten ermittelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Peroxisomengesamtanzahl zwischen den Stadien festgestellt werden (nicht gezeigt).

Somit konnte gezeigt werden, dass in den Stadien in denen die Elongation der Antherenfilamente beginnt und Jasmonsäure und damit aktives OPR3 benötigt wird, OPR3 größtenteils als Monomer vorlag. Ab Stadium 13 lag OPR3 verstärkt als Dimer vor. Dies könnte damit zu erklären sein, dass aktives OPR3 für die Jasmonsäurebildung nicht länger benötigt wird oder zumindest nicht mehr in gleichem Maße wie zuvor. Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den Stadien während der Blütenentwicklung stehen in Einklang mit der Hypothese, dass die Aktivität der OPR3 durch das Monomer/Dimer Gleichgewicht reguliert wird.

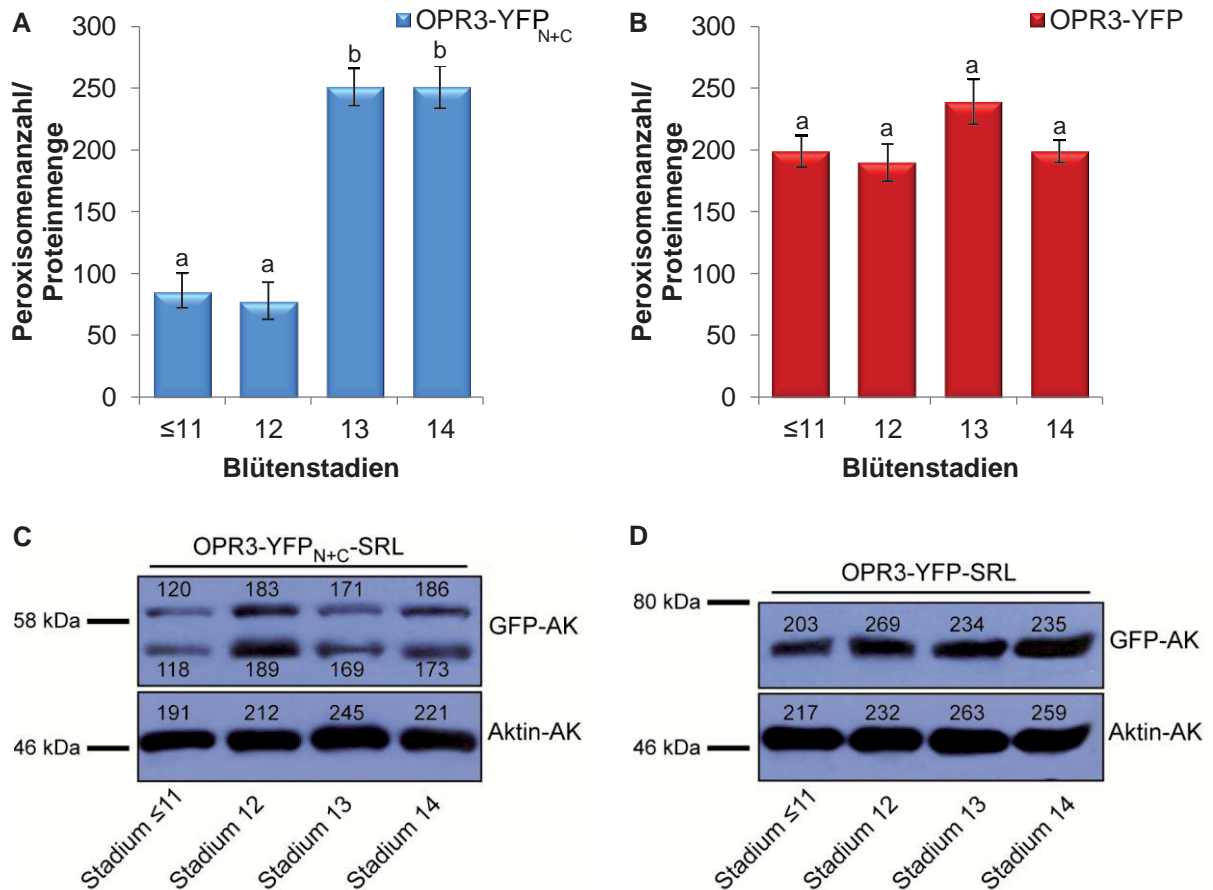


Abb. 3.6: Quantitative Bestimmung der OPR3-Dimerisierung während verschiedener Stadien der Antherenfilamententwicklung im Verhältnis zur exprimierten Proteinmenge

Das split-YFP-System wurde verwendet, um quantitativ die Dimerisierungsfähigkeit der OPR3 in Antherenfilamenten verschiedener Stadien der Blütenentwicklung zu vergleichen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Axio Vision Moduls AutMess, welches bei Fluoreszenzaufnahmen die Anzahl von Regionen (hier: Peroxisomen) über einem bestimmten Pixel-Grauwert (200) ermitteln kann. Die ermittelte Peroxisomenanzahl in den Blütenstadien 11-14 wurde ins Verhältnis zur exprimierten Proteinmenge (Signalintensität GFP-AK/Aktin) gesetzt. Es werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben.

A Pro Stadium wurden 36 Antheren (12 kurze, 24 lange) von jeweils 3 Pflanzen (Alter 4-6 Wochen), welche die split-YFP Fusionsproteine exprimierten (OPR3-YFP_{N+C}-SRL), analysiert. **B** Als Positivkontrolle wurden transgene Pflanzen, welche das Fusionsprotein OPR3-YFP-SRL exprimierten, analysiert. Der Versuch wurde wie in **A** durchgeführt. Die Buchstaben in **A** und **B** geben signifikante Unterschiede an, $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis Test, Tukey Methode). **C** und **D** Pro Stadium wurden 20-40 Blüten transgener Pflanzen (Alter 4-6 Wochen) geerntet. Jeweils 20 µg Gesamtprotein wurden in einem 12 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL entwickelt. Die Western-Blots wurde zunächst mit einem GFP-AK (1:3.000) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt (**C**: obere Bande: OPR3-YFP_N-SRL (60 kDa), untere Bande: OPR3-YFP_C-SRL (52 kDa), **D**: OPR3-YFP-SRL (70 kDa)), anschließend gestrippt und mit einem anti-Aktin-AK (1:4.000) und einem anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt. Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Signalintensität der detektierten Banden wurde quantifiziert (Werte im Blot angegeben, **C**: Werte aus zwei technischen Replikaten gemittelt).



Das split-YFP-Experiment zur Analyse der Fluoreszenzunterschiede in Antherenfilamenten verschiedener Stadien der Blütenentwicklung wurde zusätzlich auch für alle OPR3-Mutanten durchgeführt. Für alle transgenen Pflanzen, welche die verschiedenen split-YFP-Fusionsproteine exprimierten, (E292K-YFP_N-SRL, E292K-YFP_C-SRL; Y363F-YFP_N-SRL, Y365F-YFP_C-SRL; DMEY-YFP_N-SRL, DMEY-YFP_C-SRL) konnten ähnliche Ergebnisse wie für die wildtypische OPR3 beobachtet werden. Wie erwartet fiel die YFP-Fluoreszenz in den Antherenfilamenten dieser Pflanzen insgesamt sehr viel schwächer aus. Dennoch war auch hier in den frühen Stadien 11 und 12 eine signifikant geringere Fluoreszenz zu beobachten, als in den späteren Stadien 13 und 14 (Grafiken siehe Anhang A3).

Es wäre denkbar, dass *opr3*-Pflanzen, welche die mutierten OPR3-Varianten exprimierten, durch erhöhte Aktivität der OPR3 und höheren JA-Spiegel, im Vergleich zu *opr3*-Pflanzen mit wildtypischen OPR3 einen veränderten Phänotyp in Bezug auf die Antherenfilamentelongation und die Pollenfreisetzung zeigen. Es konnten jedoch keine auffälligen Unterschiede im Phänotyp beobachtet werden (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mutierten Proteine immer noch – wenn auch in sehr geringem Maße – in der Lage sind zu dimerisieren und einer Regulation während der Blütenentwicklung unterliegen.



3.2 Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 mit Hilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)

Mit Hilfe des split-YFP-Systems konnte die OPR3-Dimerisierung *in vivo* gezeigt werden. Jedoch ist es mit dem split-YFP-System nicht möglich, dynamische Veränderungen bei der OPR3-Interaktion zu beobachten. Die beiden YFP-Hälften des split-YFP-Systems besitzen eine hohe Affinität zueinander. Aus diesem Grund ist die Verbindung der beiden Hälften und funktionelle Rekonstitution des YFP praktisch irreversibel (Magliery et al. 2005). Die Fusionspartner (hier das OPR3-Dimer) könnten möglicherweise noch dissoziieren, aber die YFP-Fluoreszenz bliebe bestehen, weil die YFP-Hälften verbunden bleiben.

Um diese Limitierung des split-YFP-Systems umgehen zu können, wurde als alternative Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) eingesetzt (Bhat et al. 2006).

Durch FRET-Analysen sollte einerseits die split-YFP-Experimente zum Dimerisierungspotential der OPR3 und der mutierten OPR3-Varianten in Zwiebelepidermiszellen und *Arabidopsis* überprüft werden. Andererseits sollte untersucht werden, ob Unterschiede im Dimerisierungsverhalten der OPR3 vor und nach Verwundung bestehen. Auf diese Weise sollte die Hypothese untersucht werden, dass der rasche Anstieg der JA-Konzentration nach Verwundung durch ein Monomer/Dimer Gleichgewicht der OPR3 zu erklären ist, welches die Aktivität des Proteins reguliert.

3.2.1 Fusionskonstrukte und Erstellung transgener Pflanzen für die FRET-Analysen

Für die FRET-Analysen wurden zum einen die Fusionskonstrukte aus OPR3 bzw. den OPR3-Mutanten (Einzelmutanten E292K und Y365F, Doppelmutante DMEY) und dem vollständigen YFP verwendet (*35S:OPR3-YFP-SRL*, *35S:E292K-YFP-SRL*, *35S:Y365F-YFP-SRL*, *35S:DMEY-YFP-SRL*), welche bereits für das split-YFP-Experiment erstellt worden waren. Zum anderen wurden neue Fusionskonstrukte aus OPR3 bzw. den mutierten OPR3-Varianten und CFP („Cyan Fluorescent Protein“) generiert. Aus den gleichen Gründen wie im split-YFP-Experiment (siehe 3.1.1) wurde CFP an den C-Terminus des OPR3-ORF (ohne SRL und Stoppcodon) fusioniert und ein SRL an das Ende des Fusionskonstruktes gefügt (siehe 2.6.9.6). Die erstellten Fusionskonstrukte wurden in einen binären Transformationsvektor kloniert und mit Hilfe von *A. tumefaciens* stabil ins *Arabidopsis*-Genom eingebracht (siehe 2.6.3). Aus den gleichen Gründen wie im split-YFP-Experiment wurden wiederum *opr3*-Pflanzen verwendet. Transgene Pflanzenlinien wurden mit Hilfe der Basta-Resistenz selektiert. Außerdem wurden nur Pflanzen verwendet, die unter dem Mikroskop YFP- bzw. CFP-



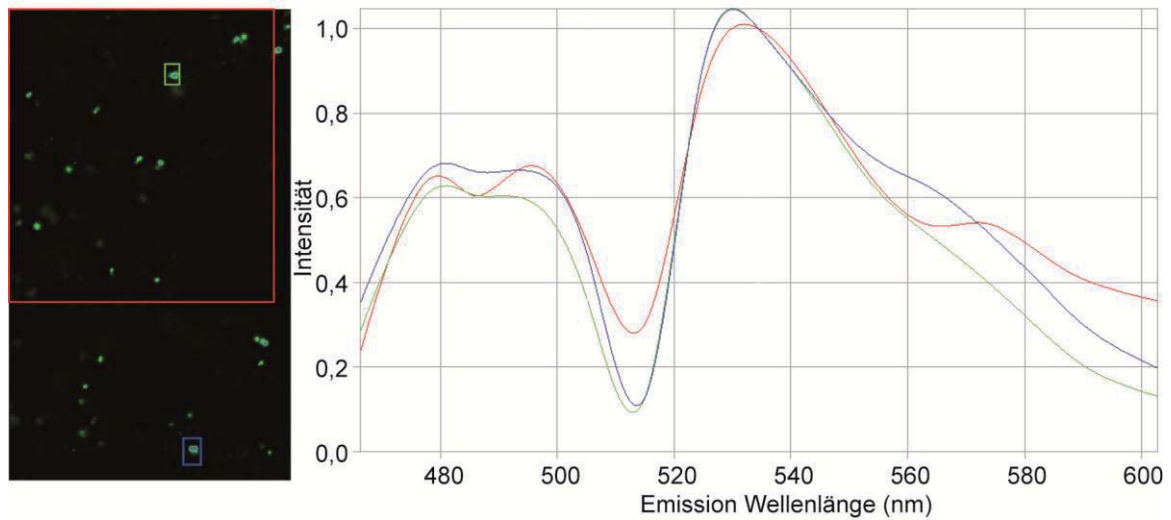
Fluoreszenz zeigten. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst Pflanzen ausgewählt wurden, die eine ähnlich starke CFP- und YFP-Fluoreszenz aufwiesen (Analyse der Fluoreszenzintensität mit Hilfe des AutMess Moduls, siehe 2.13.2). Diese Pflanzen wurden daraufhin gekreuzt, um Pflanzen zu erhalten, welche sowohl die CFP-Fusionsproteine, als auch die YFP-Fusionsproteine exprimierten. Für die FRET-Analysen wurden Pflanzen der F1-Generation verwendet, die jeweils hemizygot für die beiden Fluorophor-Fusionskonstrukte waren, was in $\frac{1}{4}$ der Individuen der F1-Population der Fall war.

3.2.2 Untersuchung des Interaktionsverhalten der OPR3 und der OPR3-Mutanten mittels FRET-Analyse in *A. thaliana*

Das Prinzip der FRET-Analyse beruht darauf, dass Energie von dem Donormolekül CFP auf das Akzeptormolekül YFP transferiert wird, wenn die Fusionspartner dieser Fluorophore miteinander interagieren. Nur dann ist eine für die Energieübertragung ausreichende Nähe gegeben (Bhat et al. 2006) (siehe 2.13.3). Durch die Methode des „acceptor photobleaching“ kann die Interaktion der Fusionspartner mit Hilfe der Berechnung der FRET-Effizienz (E) quantifiziert werden (Karpova et al. 2003) (siehe 2.13.3). Die FRET-Analysen wurden unter Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopes LSM710 (Zeiss) in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Dr. B. Hause (IPB, Halle) durchgeführt.

Die FRET-Analysen wurden in der Blattepidermis vier bis sechs Wochen alter transgener Pflanzen der F1-Generation durchgeführt. Vor Beginn der LSM-Aufnahmen wurden die Blätter mit 200 μ M Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon (CCCP) infiltriert (siehe 2.13.3), um die Organellenbewegung zu inhibieren (Hollenbeck et al. 1985). Nach Anregung des CFP mit einer Wellenlänge von 458 nm war in den Peroxisomen der Epidermis und angrenzendem Mesophyll der transgenen Pflanzen, die das wildtypische OPR3 exprimierten, auch die Emission des YFP zu beobachten. Nur im Falle von FRET tritt eine Emission des YFP nach Anregung des CFP ein (Bhat et al. 2006). Da in diesem Fall beide Fluorophore Fluoreszenz emittieren, konnte hier eine grün erscheinende Fluoreszenz der Peroxisomen beobachtet werden (Abb. 3.7, links oben). Zudem konnte nach dem Ausbleichen des Akzeptors YFP ein Anstieg der CFP-Fluoreszenz sowohl im gesamten gebleichten Bereich (rot), als auch für ein ausgewähltes Peroxisom (grün) verzeichnet werden, was mit einem gleichzeitigen Absinken der YFP-Fluoreszenz einherging (Abb. 3.7).

Vor dem „acceptor photobleaching“



Nach dem „acceptor photobleaching“

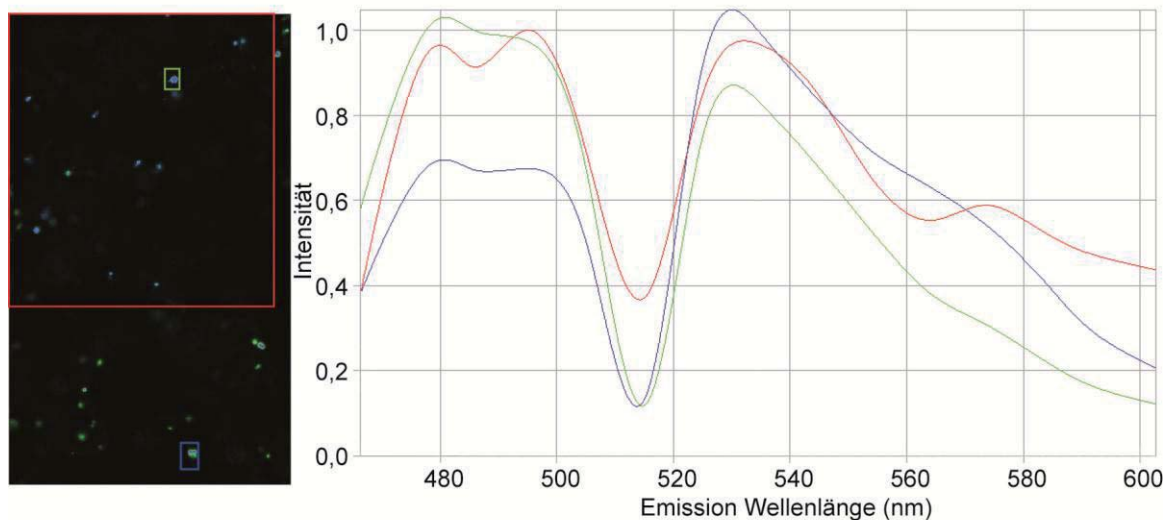


Abb. 3.7: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels FRET-Analyse

Blätter 4-6 Wochen alter *opr3*-Pflanzen, welche die Fusionsproteine OPR3-YFP-SRL und OPR3-CFP-SRL exprimierten, wurden bei einer Anregung von 458 nm (CFP Absorption) unter dem konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop LSM710 (Zeiss) aufgenommen. In einer ausgewählten Region (rot: Kasten und Kurve) wurde anschließend durch längere Anregung bei 514 nm das Akzeptormolekül YFP ausgebleicht. Nach dem „acceptor photobleaching“ stieg die Intensitätskurve für die CFP-Fluoreszenz in dem gebleichten Bereich (Maxima zwischen 480 und 500 nm), bei gleichzeitigem Absinken der Intensitätskurve für die YFP-Fluoreszenz (Maximum bei 530 nm). Das gleiche konnte für ein Peroxisom im gebleichten Bereich (grün: Kasten und Kurve) beobachtet werden, wohingegen bei einem Peroxisom in der ungebleichten Region (blau: Kasten und Kurve) keine Intensitätsveränderung zu verzeichnen war.

Die CFP-Fluoreszenz steigt nach Ausbleichen des Akzeptors nur an, wenn zuvor ein Energietransfer auf das YFP stattgefunden hat. Für ein ausgewähltes Peroxisom im nicht gebleichten Bereich (blau) konnte dagegen, wie erwartet, kein Anstieg in der CFP-Fluoreszenz verzeichnet werden (Abb. 3.7). Somit ließ sich auch mit Hilfe der FRET-Analyse bestätigen, dass OPR3 *in vivo* dimerisiert.



Eine Quantifizierung der OPR3-Interaktion erfolgte über die Bestimmung der FRET-Effizienz (E) für OPR3 und alle mutierten OPR3-Varianten. Die FRET-Effizienz wurde für jeweils 200 Peroxisomen aus zehn FRET-Messungen zweier transgener Linien (in gebleichter Region) ermittelt. Dabei wurde für jede FRET-Messung bzw. Aufnahme zunächst der Mittelwert aus E aller Peroxisomen im ungebleichten Bereich bestimmt und dieser Wert anschließend von allen einzelnen E-Werten der Peroxisomen im gebleichten Bereich abgezogen. So sollte die zufällige Bewegung des gesamten Objektes während der Aufnahme – ausgelöst durch den Laser und die Erwärmung des Objektes – und die natürliche Abnahme der CFP-Fluoreszenz, die zu einem gewissen Grad beim Bleichen des YFP auch CFP betrifft, berücksichtigt und ausgeglichen werden.

Für das wildtypische OPR3 konnte mit 14,9 % (Median der FRET-Effizienz von 200 Peroxisomen) die höchste FRET-Effizienz ermittelt werden. Alle mutierten OPR3-Varianten zeigten signifikant geringere FRET-Effizienzen gegenüber dem wildtypischen OPR3 mit 4,3 % für E292K, 5 % für Y365F und 4,1 % für DMEY (Abb. 3.8). Anders als im split-YFP-Experiment konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Dimerisierungspotential der Mutanten E292K und DMEY gegenüber dem Dimerisierungspotential der Mutanten Y365F festgestellt werden (Abb. 3.8).

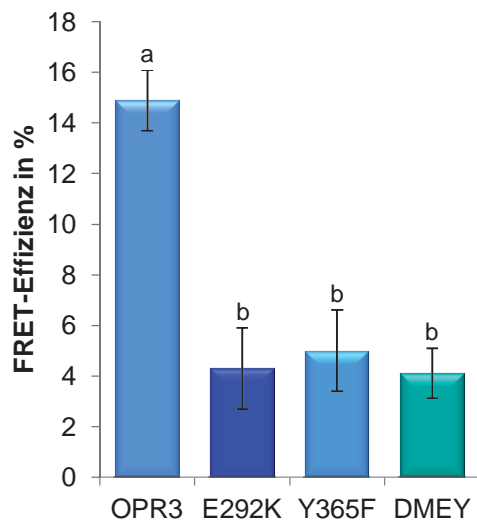


Abb. 3.8: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels FRET in Blattepidermiszellen von *A. thaliana*

Um das Dimerisierungspotential der wildtypischen OPR3 mit dem der Einzelmutanten E292K und Y365F und der Doppelmutanten OPR3_{E292K; Y365F} (DMEY) quantitativ zu vergleichen, wurden FRET-Messungen („acceptor photobleaching“) durchgeführt und die FRET-Effizienz von jeweils 200 Peroxisomen berechnet. Es wurden Blätter 4-6 Wochen alter *opr3*-Pflanzen verwendet. Für die ermittelten Daten werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben. Die Buchstaben geben signifikante Unterschiede an, $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis Test, Tukey Methode).

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass für FRET ein großer Anteil der Fluorophore miteinander interagieren müssen, wohingegen es mit der BiFC möglich ist, eine Interaktion auch dann wahrzunehmen, wenn nur ein geringer Anteil der Fusionsproteine assoziiert (Kerppola 2006). Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der Irreversibilität des split-YFP-



Systems. Sind die YFP-Hälften miteinander assoziiert, bleibt diese Interaktion stabil bestehen. Hingegen könnten bei der FRET-Analyse die Dynamik der OPR3 und die Reversibilität der Interaktion Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Möglicherweise konnten deshalb mit der BiFC-Methode in diesem Fall Unterschiede im Dimerisierungsverhalten der OPR3 und der OPR3-Mutanten besser detektiert werden.

Dessen ungeachtet konnte auch durch die FRET-Analyse bestätigt werden, dass die Aminosäuren an Position E292 und Y365 eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung der OPR3 einnehmen.

3.2.3 Untersuchung des Interaktionsverhaltens der OPR3 in *A. thaliana* nach Verwundung

Neben der Bestätigung der split-YFP-Experimente wurden FRET-Analysen auch eingesetzt, um mögliche Veränderungen in der OPR3-Interaktion in Antwort auf Verwundung zu untersuchen. Sollte das Dimer tatsächlich den inaktiven Zustand des OPR3-Proteins repräsentieren, so müsste mit Hilfe der FRET-Analyse nach Verwundung eine Abnahme der Dimerisierung der OPR3 *in planta* durch deren Aktivierung zu beobachten sein.

Um Aufschluss darüber zu gewinnen, welches Gewebe und welcher Zeitpunkt sich am besten für eine FRET-Analyse nach Verwundung eignen, wurde die gewebespezifische Expression der Enzyme des Oktadekanoidweges sowie eines Markergenes, welches spezifisch auf die Bildung von Jasmonsäure reagiert (*VSP2*), mit Hilfe von Promotor-Reporter (*GUS*)-Genfusionen untersucht. Die Promotor-Aktivität und Expression der Reportergene nach Verwundung wurde mittels histochemischer *GUS*-Tests sichtbar gemacht (Abb. 3.9). Schon 15 min nach Verwundung konnte für den OPR3-Promotor lokal an der Verwundungsstelle eine Aktivierung beobachtet werden (Abb. 3.9), welche sich nach 30 min systemisch auf die Blattadern ausweitete, nach einer Stunde im gesamten Keimling zu beobachten und besonders in den Blattadern ausgeprägt war. Auch für den *VSP2*- und den *AOS*-Promotor konnte eine bzw. zwei Stunden nach Verwundung eine Promotoraktivität in den Blattadern beobachtet werden (Abb. 3.9). Erst vier Stunden nach Verwundung war eine leichte Aktivität des *LOX*-Promotors an den Blatträndern zu erkennen (Abb. 3.9).

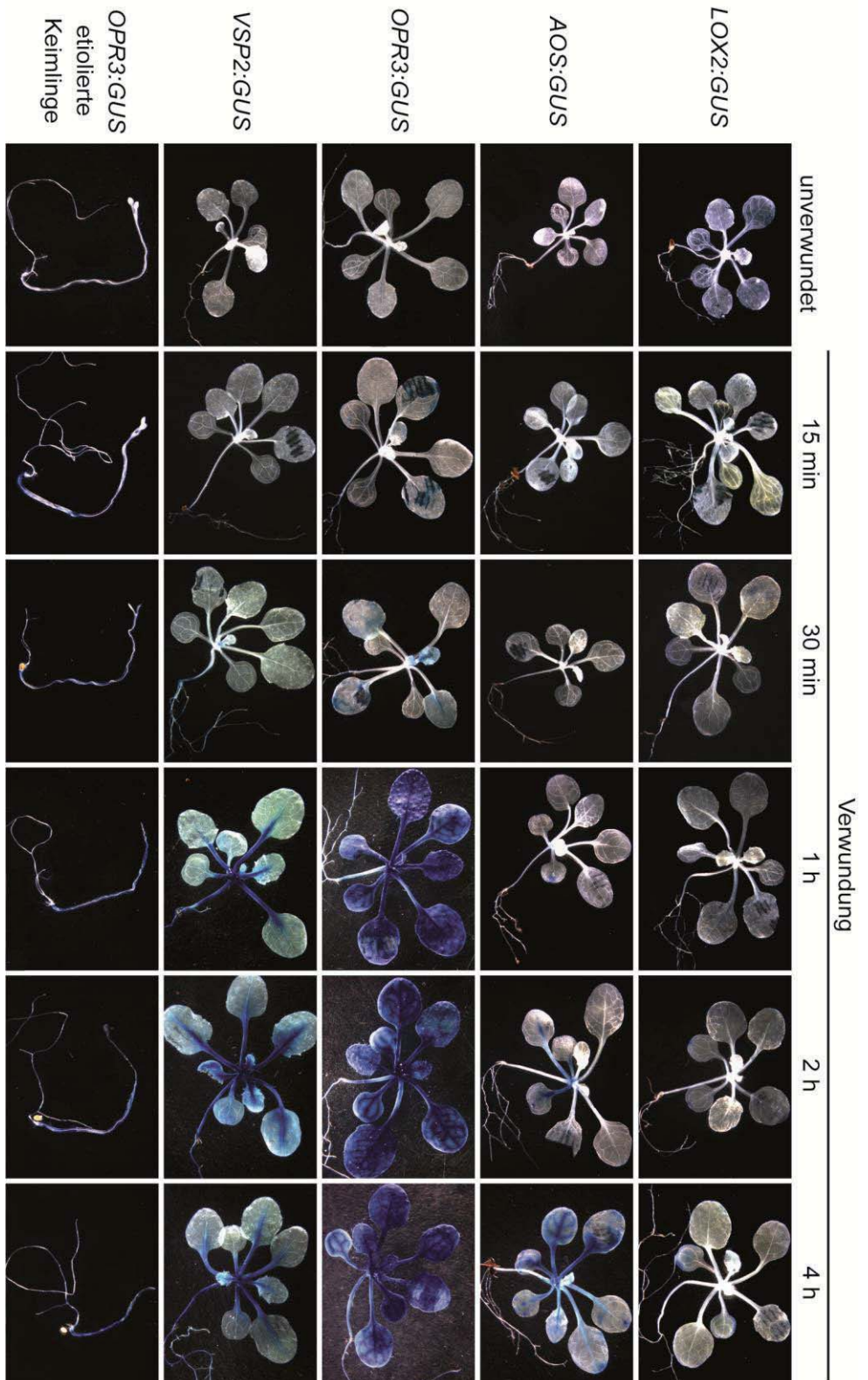


Abb. 3.9: Histochemischer GUS-Test zur Analyse der Expression der Gene *LOX2*, *AOS*, *OPR3*, *VSP2* nach Verwundung in *Arabidopsis*-Keimlingen

Eine Verwundungszeitreihe für transgene 2-3 Wochen alte *Arabidopsis*-Keimlinge, welche die Promotor-GUS-Fusionskonstrukte für Promotoren der Gene *LOX2*, *AOS*, *OPR3*, *VSP2* exprimierten, wurde durchgeführt (Alter der etiolierte Keimlinge: 2 Wochen). Die Keimlinge wurden verwundet und nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h bzw. 4 h mit GUS-Farbelösung infiltriert und gefärbt und anschließend bei zwei- bis dreifacher Vergrößerung am Stereomikroskop aufgenommen. Zur Kontrolle wurden unverwundete Keimlinge verwendet.



Da mit Ausnahme von LOX2 für alle Promotoren der Jasmonsäure-Biosynthesegene und auch für das Markergen *VSP2* eine erhöhte Aktivität in Leitbündeln festgestellt werden konnte und die Induktion des OPR3-Promotors bereits 15 min nach Verwundung eintrat, schien eine Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens der OPR3 in den Leitbündeln vor und 15 min nach Verwundung die besten Voraussetzungen zu liefern. Es stellte sich jedoch heraus, dass dies technisch nicht durchführbar war. In den Leitbündeln, also in der Tiefe des Blattgewebes, waren verlässliche FRET-Messungen nicht möglich. In den leichter zugänglichen Blattepidermiszellen waren keine signifikanten Unterschiede in der FRET-Effizienz nach Verwundung zu beobachten (nicht gezeigt). Da der OPR3-Promotor auch in Wurzeln aktiv ist (Abb. 3.9), und unpigmentierte Wurzeln einer FRET-Analyse leichter zugänglich sind, wurden die Untersuchungen an Wurzeln zwei Wochen alter Keimlinge durchgeführt.

Für die FRET-Messungen wurden Wurzeln (Differenzierungszone und meristematische Zone mit Wurzelhaube) unverwundeter und verwundeter Keimlinge eingesetzt. Es wurden drei bis fünf Pflanzen einer Linie verwendet. Bei der Untersuchung von Wurzeln im Bereich der Differenzierungszone fielen starke Unterschiede im FRET-Signal zwischen Peroxisomen des Zentralzylinders (ZZ) und denen des Cortex auf. Für Peroxisomen des ZZ konnte ein starkes FRET-Signal beobachtet werden (grüne Fluoreszenz), hingegen zeigten Peroxisomen des Cortex nur ein schwaches FRET-Signal (blaue Fluoreszenz) (Abb. 3.10, A). In den Wurzelspitzen (meristematische Zone und Wurzelhaube) der Keimlinge waren jedoch keine Unterschiede zwischen Peroxisomen des ZZ und des Cortex zu erkennen. Hier war durchgehend ein starkes FRET-Signal zu beobachten, besonders intensiv schien dieses in der Wurzelhaube (Abb. 3.10, C).

Es wurde daraufhin zunächst die Dimerisierungsfähigkeit der OPR3 im Cortex und im ZZ der Differenzierungszone von Wurzeln unverwundeter Keimlinge über die Berechnung der FRET-Effizienz (siehe 3.2.2) von jeweils 170 Peroxisomen bestimmt. Dafür wurden die Daten aus sieben verschiedenen FRET-Messungen ausgewertet.

Es bestand tatsächlich ein signifikanter Unterschied zwischen der Dimerisierung der OPR3 im Cortex (E: med = 4,7 %) und im ZZ (E: med = 10,7 %) der Wurzeln (Wilcoxon-Rangsummentest, $P = 0,003$; Abb. 3.11, A). Die FRET-Effizienz der OPR3 war in den Peroxisomen des ZZ damit mehr als doppelt so hoch wie in den Peroxisomen des Cortex.

Dieser Befund deutet daraufhin, dass für die Dimerisierung der OPR3 (bzw. die Interaktion der OPR3-YFP-SRL und OPR3-CFP-SRL Fusionsproteine) weitere Faktoren nötig sind, die



nur in den Zellen des ZZ, nicht aber denen des Cortex vorhanden sind. Nach der Arbeitshypothese könnte dies die postulierte Proteinkinase sein, die für die Phosphorylierung und damit die Dimerisierung von OPR3 gebraucht wird. Solche die Aktivität der OPR3 regulierenden Faktoren wären in den Zellen zu erwarten, in denen OPR3 normalerweise – und nicht wie hier unter Kontrolle des konstitutiven 35S Promotors – exprimiert wird. Um zu überprüfen, ob dies tatsächlich die Zellen des ZZ und nicht die des Cortex sind, wurde die Gewebespezifität der Expression eines GUS-GFP-Reportergens unter Kontrolle des endogenen OPR3-Promotors (OPR3:GUS-GFP) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

In der Differenzierungszone der Wurzel konnte GFP vor allem im ZZ detektiert werden (Abb. 3.10, B). In Wurzelspitzen (meristematische Zone und Wurzelhaube) war vor allem in der Wurzelhaube eine starke GFP-Fluoreszenz zu beobachten und es bestanden kaum Unterschiede in der GFP-Fluoreszenz zwischen Cortex und ZZ (Abb. 3.10, D).

Die Lokalisation des FRET-Signales im ZZ der Differenzierungszone und in der gesamten Wurzelspitze (Abb. 3.10, A und C; Abb. 3.11, A) spiegelt also die Gewebespezifität der OPR3-Expression (Abb. 3.10, B und D) wieder.

Im Weiteren wurde der Einfluss von Verwundung auf das Dimerisierungsverhalten der OPR3 untersucht. Hierfür wurden die Keimlinge im Bereich des Hypokotyls und an den Blättern mit einer Pinzette verletzt und nach 15 min durch FRET-Messungen und Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe 2.13.3).

Wegen der zuvor beobachteten Unterschiede im Dimerisierungsverhalten der OPR3 zwischen Cortex und ZZ der Wurzeln, erfolgte die Auswertung der FRET-Messungen für diese Gewebe getrennt. Dabei wurden die Daten aus jeweils sieben verschiedenen FRET-Messungen verwendet (von fünf Pflanzen einer Linie). Die FRET-Effizienz wurde von 340 Peroxisomen des ZZ (170 Peroxisomen vor und 170 nach Verwundung) und 260 Peroxisomen des Cortex (130 Peroxisomen vor und 130 nach Verwundung) bestimmt.

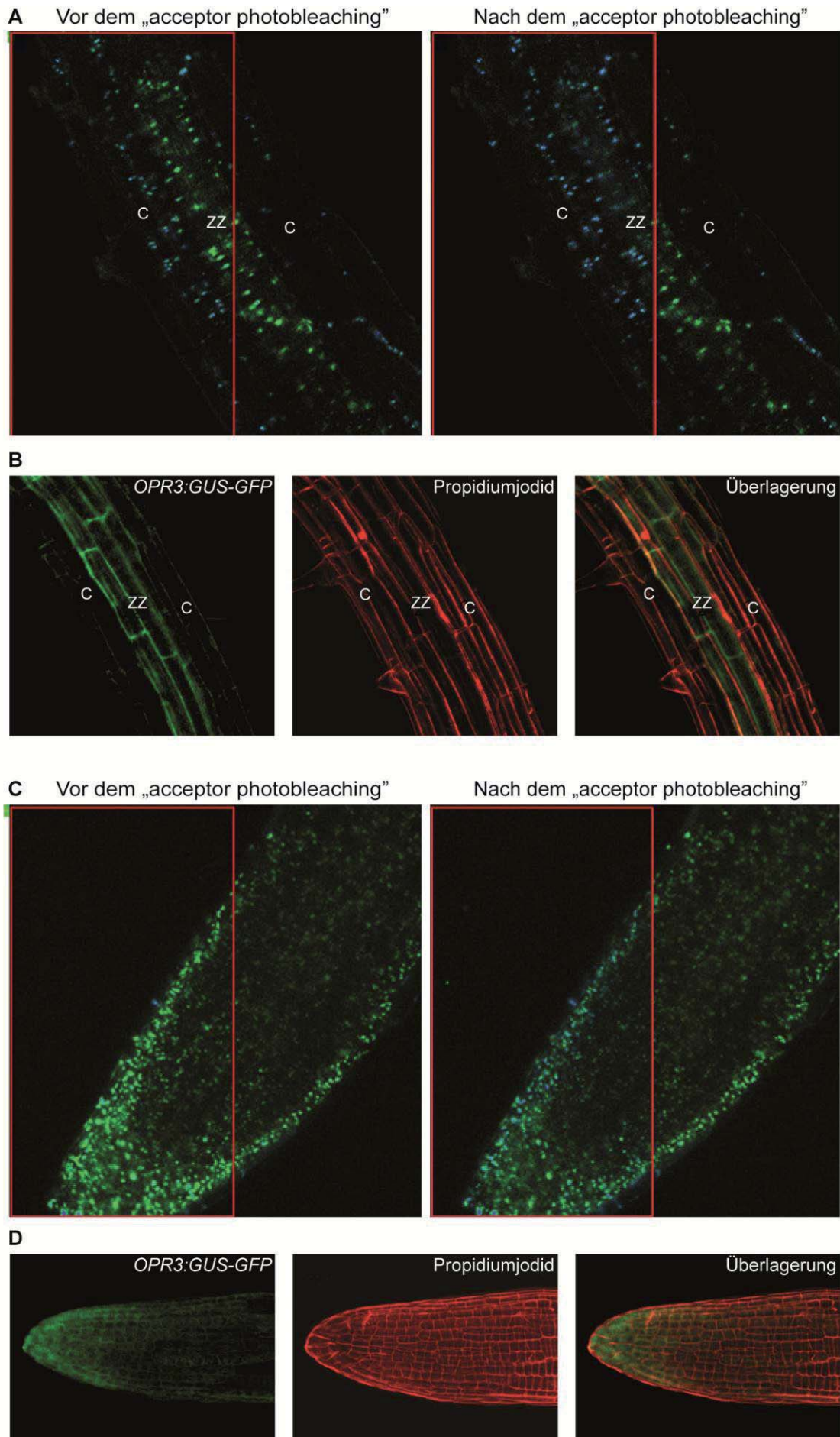




Abb. 3.10: Analyse der OPR3-Interaktion in unverwundeten Wurzelgewebe von *Arabidopsis*-Keimlingen mittels FRET und Untersuchung der OPR3-Expression mittels transgener *OPR3:GUS-GFP* Pflanzen

A und **C** Die Wurzeln (Differenzierungszone) bzw. Wurzelspitzen (Wurzelhaube und meristematische Zone) von 2 Wochen alten Keimlingen, welche die Fusionsproteine OPR3-YFP-SRL und OPR3-CFP-SRL exprimierten, wurden bei einer Anregung von 458 nm unter dem konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop LSM710 (Zeiss) aufgenommen. Rot umrandet ist die Region gezeigt, in der das Akzeptormolekül YFP ausgebleicht wurde. Das linke und rechte Bild zeigt Aufnahmen vor bzw. nach dem „acceptor photobleaching“. Im Zentralzylinder (ZZ) der Wurzeln ist in den Peroxisomen ein FRET-Signal zu erkennen (grüne Fluoreszenz). Dagegen zeigen Peroxisomen im Cortex (C) nur ein schwaches FRET-Signal (blaue Fluoreszenz). In Wurzelspitzen ist FRET vor allem in der Wurzelhaube erkennbar. **B** und **D** Wurzeln (Differenzierungszone) und Wurzelspitzen (Wurzelhaube und meristematische Zone) von 1 Woche alten Keimlingen, welche das Fusionsprotein GUS-GFP unter der Kontrolle des OPR3-Promotors exprimierten, wurden mit dem LSM 700 (Zeiss) aufgenommen. Das Wurzelgewebe wurde mit Propidiumjodid gefärbt.

Tatsächlich konnte ein signifikanter Unterschied in der OPR3-Dimerisierung vor (E: med = 10,7 %) und nach Verwundung festgestellt (E: med = 6,1 %) werden (Wilcoxon-Rangsummentest, $P = 0,014$, Abb. 3.11, B). Die FRET-Effizienz der OPR3 nahm nach Verwundung im ZZ um fast die Hälfte ab (Abb. 3.11, B). Hingegen konnte für die Peroxisomen des Cortex keine signifikante Veränderung der FRET-Effizienz vor Verwundung (4,5 %) und nach Verwundung (7,8 %) verzeichnet werden ($n = 130$, Wilcoxon-Rangsummentest, $P = 0,661$, Grafik siehe Anhang A4). Da schon vor Verwundung für OPR3 in den Peroxisomen des Cortexes nur ein geringes FRET-Signal zu beobachten war, war zu erwarten, dass hier keine weitere Abnahme des Signals detektiert werden kann.

Die FRET-Analyse belegt also, dass es in den Leitbündeln der Wurzeln 15 min nach Verwundung zu einer Abnahme der OPR3-Dimerisierung kommt. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass es nach Verwundung zu einer Verschiebung des Monomer/Dimer Gleichgewichtes von OPR3 in Richtung des Monomers kommt. Die Monomerisierung von OPR3 könnte so den raschen Anstieg der JA-Konzentration für die Abwehrreaktion ermöglichen.

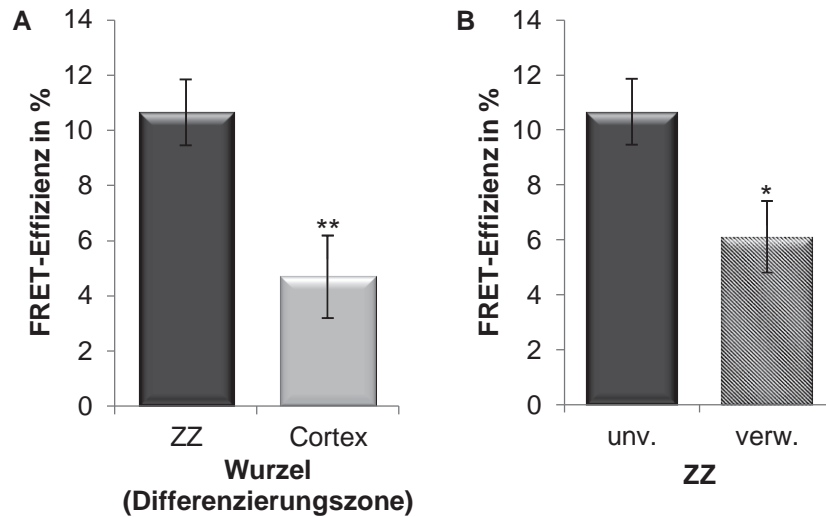


Abb. 3.11: Quantifizierung der OPR3-Interaktion in verschiedenen Wurzelgeweben und nach Verwundung mittels FRET

A Vergleich der FRET-Effizienz des wildtypischen OPR3 im Zentralzylinder (ZZ) und im Cortex der Wurzeln (Differenzierungszone) zwei Wochen alter Keimlinge. Jeweils 170 Peroxisomen aus 5 FRET-Messungen einer transgenen Linie wurden analysiert. **B** Die FRET-Effizienz für das wildtypische OPR3 wurde vor (unv.) und 15 min nach Verwundung (verw.) in Keimlingen des gleichen Entwicklungsstadiums bestimmt (170 Peroxisomen im ZZ aus 7 FRET-Messungen).

Für die ermittelten Daten werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben. Signifikante Unterschiede werden mit * $P \leq 0,05$ und ** $P \leq 0,01$ gekennzeichnet (Wilcoxon-Rangsummentest).



3.3 „Huckepack“-Experiment zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der OPR3-Phosphorylierung

Sowohl die Experimente mit dem split-YFP-System, als auch die FRET-Analysen haben gezeigt, dass OPR3 *in vivo* dimerisieren kann.

Es stellte sich jedoch die Frage, in welchem Kompartiment die Dimerisierung der OPR3 erfolgt, ob diese bereits im Cytosol oder erst im Peroxisom der Pflanzenzellen stattfindet. Durch Beantwortung dieser Frage ließe sich auch die Suche nach einer potentiellen Kinase, welche für die OPR3-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte, auf eines dieser beiden Kompartimente einschränken.

Eine Phosphorylierung im Cytosol ließe die Möglichkeit zu, dass OPR3 bereits im Cytosol dimerisiert und als inaktives Dimer in die Peroxisomen transportiert wird. Dagegen wäre bei einer Phosphorylierung im Peroxisom davon auszugehen, dass OPR3 zunächst ohne Phosphorylierung als Monomer importiert wird und hier nach der Phosphorylierung im Peroxisom dimerisiert. Um eine Voraussage treffen zu können, in welchem Kompartiment eine mögliche Phosphorylierung der OPR3 erfolgen könnte, wurde ein „Huckepack“-Experiment durchgeführt.

3.3.1 Das Prinzip des „Huckepack“-Experimentes

Voraussetzung für das „Huckepack“-Experiment war die Erstellung zweier unterschiedlicher OPR3-Varianten. Es wurde zum einen biochemisch inaktives OPR3 benötigt, welches aber nach wie vor die peroxisomale Zielsequenz SRL enthält. Zum anderen war die Erstellung einer aktiven OPR3-Variante erforderlich, welcher die SRL-Signalsequenz fehlt (OPR3 Δ SRL). Beide Konstrukte sollten für sich allein unfähig sein, den Defekt der *opr3*-Mutante in der Jasmonsäuresynthese zu komplementieren. Gemeinsam aber sollten sie dazu in der Lage sein, unter der Voraussetzung, dass die Phosphorylierung im Cytosol erfolgt. In diesem Fall kann sich im Cytosol ein Dimer beider OPR3-Varianten ausbilden und das inaktive OPR3-Protein könnte das aktive OPR3-Protein ohne peroxisomale Zielsequenz „Huckepack“ mit in die Peroxisomen transportieren.

Um eine inaktive Form der OPR3 zu erhalten, musste eine Modifikation im aktiven Zentrum vorgenommen werden. Als Möglichkeit bot sich das Tyrosin 191 an. Dieser Tyrosinrest ist für die Funktion der Enzymaktivität wichtig, wie für OYE (Old Yellow Enzyme) aus Hefe und OPR1 aus Tomate bereits beschrieben (Breithaupt et al. 2001). Der hier auf *At*OPR3 übertragene Reaktionsmechanismus ist folgender: Der bereits reduzierte FMN Kofaktor der



OPR3 überträgt ein Hydrid auf das Substrat C β der C=C-Doppelbindung der (9*S*,13*S*)-OPDA. Für die anschließende Protonierung des C α ist das Tyrosin 191 nötig. Wird das Tyrosin 191 gegen ein Phenylalanin ersetzt, sollte deshalb eine inaktive Form der AtOPR3 entstehen. Aus diesem Grund wurde durch zielgerichtete Mutagenese (siehe 2.6.7.3) die OPR3-Mutante OPR3_{Y191F} erstellt.

Die generelle Durchführbarkeit des „Huckepack“-Experiments und ebenso, dass Proteine als Komplexe aus mehreren Untereinheiten in Peroxisomen importiert werden können, wurde bereits gezeigt (McNew & Goodman 1994, Lee et al. 1997). In diesen Studien wurden die Isocitrat-Lyase und die Chloramphenicol-Acetyltransferase jeweils so modifiziert, dass deren Zielsequenzen fehlten. Es wurde beobachtet, dass die so modifizierten Proteinformen, welche normalerweise als Homotetramer bzw. Homotrimer vorliegen, mit Hilfe unveränderter Proteinformen als Komplex in die Peroxisomen importiert werden können.

Das Huckepack“-Experiment wurde sowohl in Zwiebelepidermiszellen als auch in *A. thaliana* durchgeführt.

3.3.2 Das „Huckepack“-Experiment in Zwiebelepidermiszellen

Für das Experiment in Zwiebelepidermiszellen wurde OPR3 Δ SRL, welches im Cytosol lokalisiert sein sollte, mit YFP fusioniert. Sofern eine Dimerisierung im Cytosol stattfindet, sollte OPR3_{Y191F} – welches die SRL-Signalsequenz noch besitzt, aber nicht fluoreszenzmarkiert ist – OPR3 Δ SRL zusammen mit dem fusionierten YFP ins Peroxisom transportieren. Dann wäre eine Veränderung der cytosolischen Lokalisation des OPR3 Δ SRL-YFP in eine peroxisomale Lokalisation zu beobachten (Abb. 3.12).

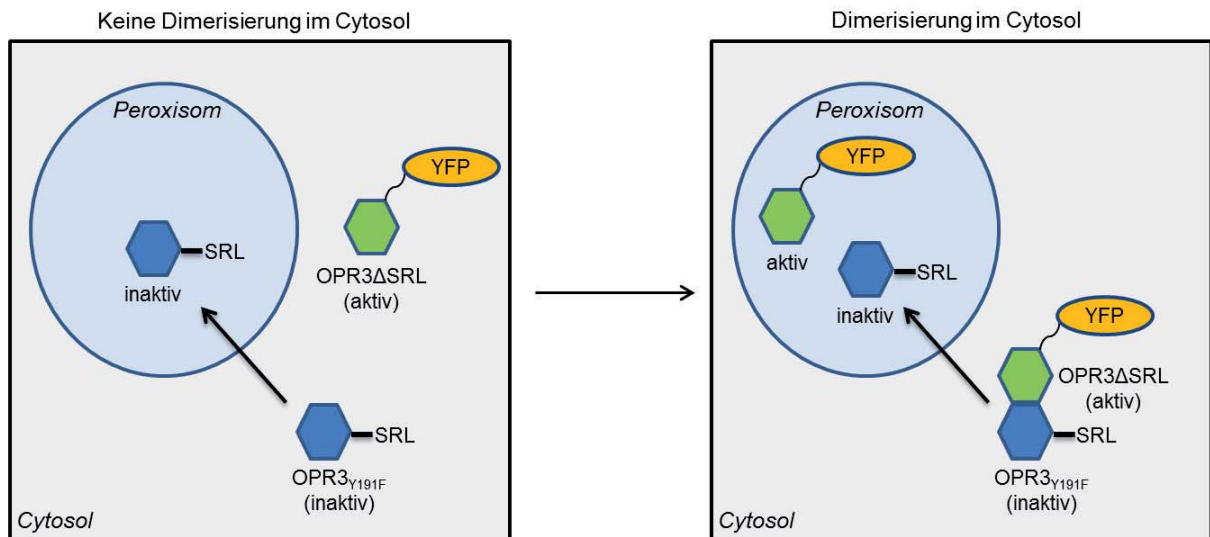


Abb. 3.12: Schematische Darstellung des „Huckepack“-Experimentes in Zwiebelepidermiszellen

OPR3 Δ SRL-YFP enthält keine peroxisomale Signalsequenz und kann daher nicht in Peroxisomen gelangen. OPR3_{Y191F} ohne YFP sollte dagegen ins Peroxisom transportiert werden, da es die SRL-Signalsequenz enthält. Falls eine Dimerisierung im Cytosol stattfindet und OPR3 als Dimer importiert werden kann, sollte OPR3_{Y191F}, das OPR3 Δ SRL-YFP „Huckepack“ mit in die Peroxisomen transportieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wäre dann in Zwiebelzellen, welche beide Proteine exprimieren die Lokalisation des OPR3 Δ SRL-YFP in Peroxisomen zu beobachten.

Zunächst wurde die Stabilität und Lokalisation der beiden OPR3-Varianten, OPR3 Δ SRL und OPR3_{Y191F} überprüft. Dafür wurden Fusionskonstrukte mit YFP erstellt (*35S:OPR3 Δ SRL-YFP* und *35S:YFP-OPR3_{Y191F}* im Vektor pART7, siehe 2.6.9.6) und diese mit Hilfe einer Partikelkanone transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert (siehe 2.7). Die Lokalisation der Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Als Expressions- und Lokalisationskontrollen wurden spezifische Markerkonstrukte koexprimiert. Als peroxisomaler Marker diente wiederum das Konstrukt pKAT2-eqFP611 (siehe 2.1.5). Für die erwartete cytosolische Lokalisation des OPR3 Δ SRL wurde als Marker ein von Liebig und Schaller zur Verfügung gestelltes Konstrukt im Vektor pCI60 verwendet, welches ebenfalls für eqRFP codiert. eqRFP wurde hier jedoch mit einem cytosolisch lokalisierten Protein fusioniert.

Beide OPR3-Varianten konnten in Zwiebelepidermiszellen exprimiert werden und zeigten die erwartete subzelluläre Lokalisation (OPR3 Δ SRL cytosolisch und OPR3_{Y191F} peroxisomal) (Abb. 3.13).

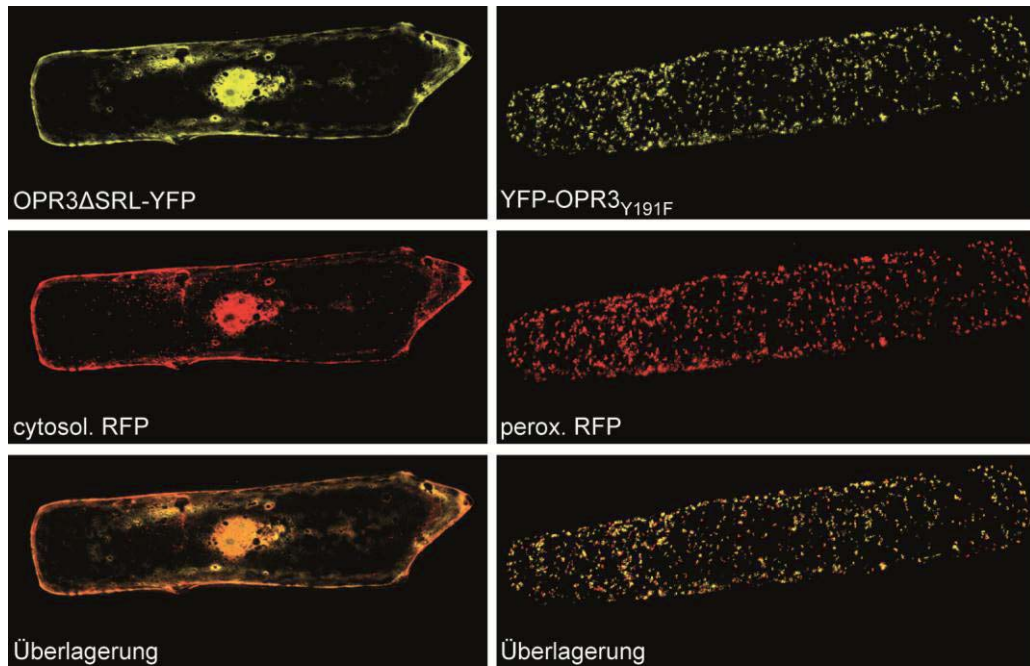


Abb. 3.13: Lokalisation der OPR3-Varianten OPR3 Δ SRL und OPR3_{Y191F} in Zwiebelepidermiszellen

Die Konstrukte *35S:OPR3 Δ SRL-YFP* und *35S:YFP-OPR3_{Y191F}* wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert. Als Lokalisationsmarker wurden peroxisomal bzw. cytosolisch lokalisierte RFP-Fusionsproteine koexprimiert (Forner & Binder 2007 bzw. Liebig & Schaller, unveröffentlicht). Positive Signale wurden nach 24 h bei 200-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Dargestellt sind der gelbe Fluoreszenzkanal (oben, Filtersatz für YFP: 46 HE), der rote Fluoreszenzkanal (mitte, Filtersatz für RFP: 43 HE) und eine Überlagerung der beiden Kanäle (unten).

Nachdem die vermutete Lokalisation und die Stabilität der beiden OPR3-Varianten bestätigt worden waren, konnte das „Huckepack“-Experiment in Zwiebelepidermiszellen durchgeführt werden.

Dafür wurde das für die Lokalisationsbestimmung schon erstellte Konstrukt *35S:OPR3 Δ SRL-YFP* und das Konstrukt *35S:OPR3_{Y191F}* (siehe 2.6.7.3) verwendet. Ein freier N-Terminus des OPR3 Δ SRL wurde auch für dieses Experiment bevorzugt (siehe 3.1.1), da BiFC- und FRET-Analysen gezeigt hatten, dass eine Dimerisierung bei C-terminaler Fusion des fluoreszierenden Proteins möglich ist. Beide Konstrukte *35S:OPR3_{Y191F}* und *35S:OPR3 Δ SRL-YFP* wurden in Zwiebelzellen koexprimiert, zusammen mit dem cytosolischen RFP-Marker.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte beobachtet werden, dass OPR3 Δ SRL-YFP auch weiterhin cytosolisch lokalisiert blieb und nicht durch OPR3_{Y191F} in die Peroxisomen transportiert wurde (Abb. 3.14).

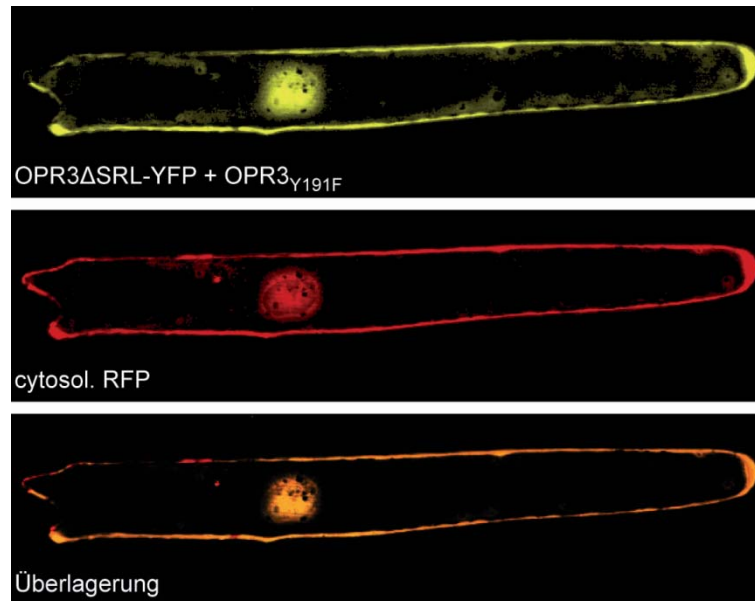


Abb. 3.14: „Huckepack“-Experiment in transformierten Zwiebelepidermiszellen

Die Konstrukte *35S:OPR3ΔSRL-YFP* und *35S:OPR3_{Y191F}* wurden transient in Zwiebelepidermiszellen koexpressiert. Als Expressions- und Lokalisationsmarker wurde ein cytosolisches RFP-Fusionsprotein verwendet (Liebig & Schaller, unveröffentlicht). Positive Signale wurden nach 24 h bei 100-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Dargestellt sind der gelbe Fluoreszenzkanal (oben, Filtersatz für YFP: 46 HE), der rote Fluoreszenzkanal (mitte, Filtersatz für RFP: 43 HE) und eine Überlagerung der beiden Kanäle (unten).

Die bestehende bleibende cytosolische Lokalisation des *OPR3ΔSRL-YFP* deutete darauf hin, dass *OPR3* entweder nicht in der Lage ist, im Cytosol zu dimerisieren oder der Import als Dimer nicht erfolgen kann. Dennoch wurde das „Huckepack“-Experiment auch in *A. thaliana* durchgeführt, da die Möglichkeit bestand, dass in Zwiebelzellen nicht alle Voraussetzungen für dieses Experiment gegeben waren (z. B. fehlende Kinase).

3.3.3 Das „Huckepack“-Experiment in *A. thaliana*

Für das Huckepack“-Experiment *in planta* wurden männlich sterile *opr3*-Pflanzen verwendet. Der Phänotyp dieser Pflanzen kann durch den Import eines aktiven *OPR3*-Proteins in die Peroxisomen komplementiert werden (Stintzi & Browse 2000). Transgene *opr3*-Pflanzen, die die inaktive *OPR3* in den Peroxisomen oder die aktive aber cytosolische *OPR3ΔSRL* exprimieren, sollten jeweils steril bleiben. Falls *OPR3* in der Lage ist, im Cytosol zu dimerisieren, sollte die Kreuzung beider transgenen Linien jedoch zur Herstellung der Fertilität führen. In diesem Fall sollte das inaktive *OPR3* Protein, das aktive *OPR3*-Protein ohne peroxisomale Zielsequenz „Huckepack“ mit in die Peroxisomen transportieren. Falls jedoch keine Dimerisierung im Cytosol stattfindet, wäre nach erfolgter Kreuzung der transgenen Linien keine Aufhebung der Sterilität zu erwarten, da weiterhin keine JA gebildet werden kann (Abb. 3.15).

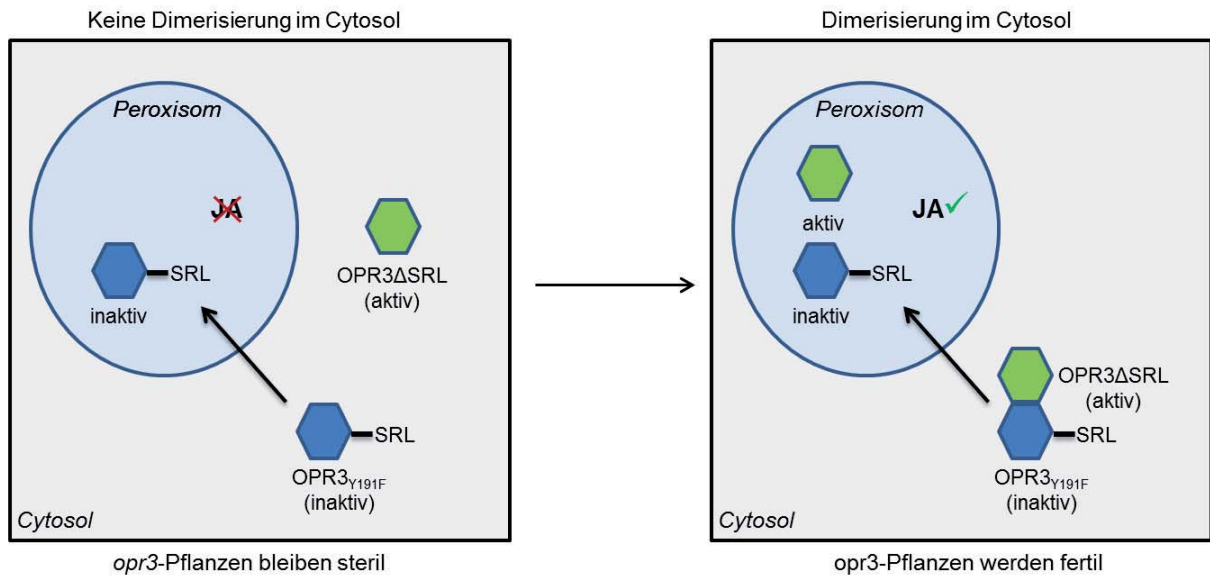


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des „Huckepack“-Experimentes in Pflanzen

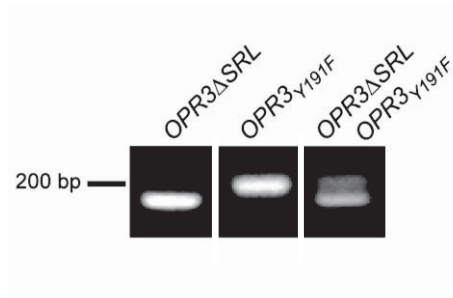
OPR3 Δ SRL enthält keine peroxisomale Signalsequenz und sollte daher nicht in der Lage sein, im Peroxisom die Umsetzung von OPDA zu katalysieren. OPR3_{Y191F} sollte als inaktive Form der OPR3 ebenfalls nicht zur Biosynthese der JA geeignet sein. Falls eine Dimerisierung im Cytosol stattfindet und OPR3 als Dimer importiert werden kann, sollte das inaktive OPR3_{Y191F}, das aktive OPR3 Δ SRL ohne peroxisomale Zielsequenz „Huckepack“ mit in die Peroxisomen transportieren. Dies sollte in Pflanzen zur Synthese der JA führen und damit zur Fertilität.

Für das Komplementierungsexperiment in Pflanzen wurden die zwei Konstrukte *OPR3:OPR3 Δ SRL* bzw. *OPR3:OPR3_{Y191F}* erstellt (siehe 2.6.9.6) und jeweils mittels *A. tumefaciens* ins Genom der *opr3*-Pflanzen eingebracht (siehe 2.6.3). Transgene *OPR3:OPR3 Δ SRL* bzw. *OPR3:OPR3_{Y191F}* Linien wurden durch Basta-Selektion ermittelt. Durch DNA-Extraktion aus geernteten Pflanzenmaterial (siehe 2.6.4.2) und anschließende PCR mit spezifischen Primern (5'OPR3 1126F (ocsTerm), 3'ocs 125R) (siehe 2.6.7.1) wurde die Insertion der Konstrukte überprüft (Abb. 3.16).

Die transgenen *opr3*-Pflanzen wurden mit Methyljasmonat besprüht (siehe 2.6.3), um lebensfähigen Pollen zu erhalten und die Kreuzung (siehe 2.5.3) der F1-Generation der beiden Linien zu ermöglichen. Aus dieser Kreuzung hervorgehende Pflanzen wurden mittels PCR auf Anwesenheit der beiden OPR3-Konstrukte getestet (s. o.). Aufgrund des geringen Sequenzlängenunterschiedes von nur 9 bp (SRL-Sequenz) zwischen *OPR3 Δ SRL* und *OPR3_{Y191F}* wurde für die Auftrennung der Amplifikate ein 3 %-iges Agarosegel verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die transgenen Pflanzen die Sequenzen für beide OPR3-Konstrukte enthielten (Abb. 3.16).



Abb. 3.16: PCR zum Nachweis der Konstrukte *OPR3:OPR3 Δ SRL* und *OPR3:OPR_{Y191F}* in transgenen *opr3*-Pflanzen



DNA aus transgenen *opr3*-Pflanzen wurde mittels PCR amplifiziert, die Produkte auf ein 3 %-iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht detektiert. Die verwendeten Primer waren für OPR3 und den *ocs* Terminator aus pART7 spezifisch. Die erhaltenen DNA-Fragmente hatten eine Länge von 177 bp (*OPR3 Δ SRL*) und 186 bp (*OPR3_{Y191F}*). Pflanzen, die beide Konstrukte enthielten, zeigten beide Banden. Größenstandard: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Weiterhin wurde die Expression von *OPR3 Δ SRL* und *OPR3_{Y191F}* in den transgenen *opr3*-Linien durch SDS-PAGE (siehe 2.11.5) und Western-Blot (siehe 2.11.7) untersucht. Um die Proteinexpression zu steigern und den Nachweis zu erleichtern, wurden die transgenen Pflanzen zunächst verwundet und das verwundete Blattmaterial nach drei Stunden geerntet.

Sowohl transgene Pflanzen mit dem Konstrukt *OPR3:OPR3 Δ SRL*, als auch Pflanzen mit dem Konstrukt *OPR3:OPR3_{Y191F}* exprimierten das OPR3-Protein (Größe OPR3: 43 kDa, Abb. 3.17). Auch Pflanzen, die aus der Kreuzung der transgenen Linien hervorgingen, exprimierten OPR3, wobei hier zwischen *OPR3 Δ SRL* und *OPR3_{Y191F}* aufgrund des geringen Größenunterschiedes nicht unterschieden werden konnte (Abb. 3.17). Mittels PCR war jedoch geprüft worden, ob die Pflanzen beide DNA-Konstrukte enthielten (s. o).

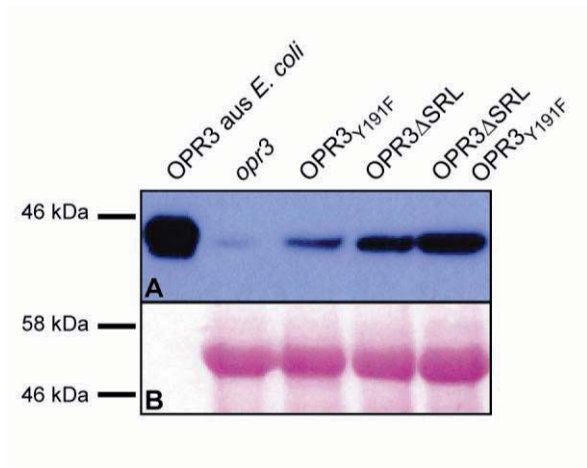


Abb. 3.17: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Proteine OPR3 Δ SRL und OPR3_{Y191F} in transgenen *opr3*-Pflanzen

A 3 h nach Verwundung wurden Proteinproben aus transgenen *opr3*-Pflanzen (Alter: 6 Wochen) extrahiert. 25 μ g Gesamtprotein wurden in einem 12 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL entwickelt. Der Western-Blot wurde mit dem primären antiAtOPR3-Antiserum (1:650) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behan-

delt. Als Positivkontrolle wurden 25 ng aus *E. coli* aufgereinigtes SIOPR3 verwendet. **B** Als Ladekontrolle diente die mit Ponceau angefärbte RubisCO. Proteinstandard: PageRulerTM Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die transgenen *opr3*-Pflanzen sowohl die Konstrukte enthielten, als auch Protein exprimierten, wurde die Fertilität der Pflanzen geprüft. Pflanzen, die entweder das Konstrukt *OPR3:OPR3 Δ SRL* oder das Konstrukt *OPR3:OPR3_{Y191F}* enthielten, zeigten weiterhin einen männlich sterilen Phänotyp und wurden – wie erwartet – durch die eingeführten Konstrukte nicht komplementiert. Jedes der beiden veränderten OPR3-Proteine war für sich alleine somit nicht in der Lage die JA-Synthese funktionell zu rekonstituieren (Abb. 3.18, A und B).

Transgene *opr3*-Pflanzen können durch die Applikation von Jasmonsäure chemisch komplementiert werden (Stintzi and Browse, 2000). Durch die Behandlung der transformierten *opr3*-Pflanzen mit JA konnte auch deren Fertilität wieder hergestellt werden (Abb. 3.18, A und B). Dies zeigte, dass durch die Insertion der Konstrukte ins Pflanzengenom keine Beeinträchtigungen im nachfolgenden Signalweg entstanden. Durch die weiter bestehende Sterilität der beiden transformierten *opr3*-Linien waren die Voraussetzungen für den eigentlichen „Huckepack“-Komplementierungsversuch gegeben.

Die transgenen Pflanzen, welche durch Kreuzung beider *opr3*-Linien erzeugt worden waren, und die beide Konstrukte *OPR3:OPR3 Δ SRL* und *OPR3:OPR3_{Y191F}* enthielten (Abb. 3.16) und OPR3-Protein exprimierten (Abb. 3.17), zeigten weiterhin einen männlich sterilen Phänotyp (Abb. 3.18, C).

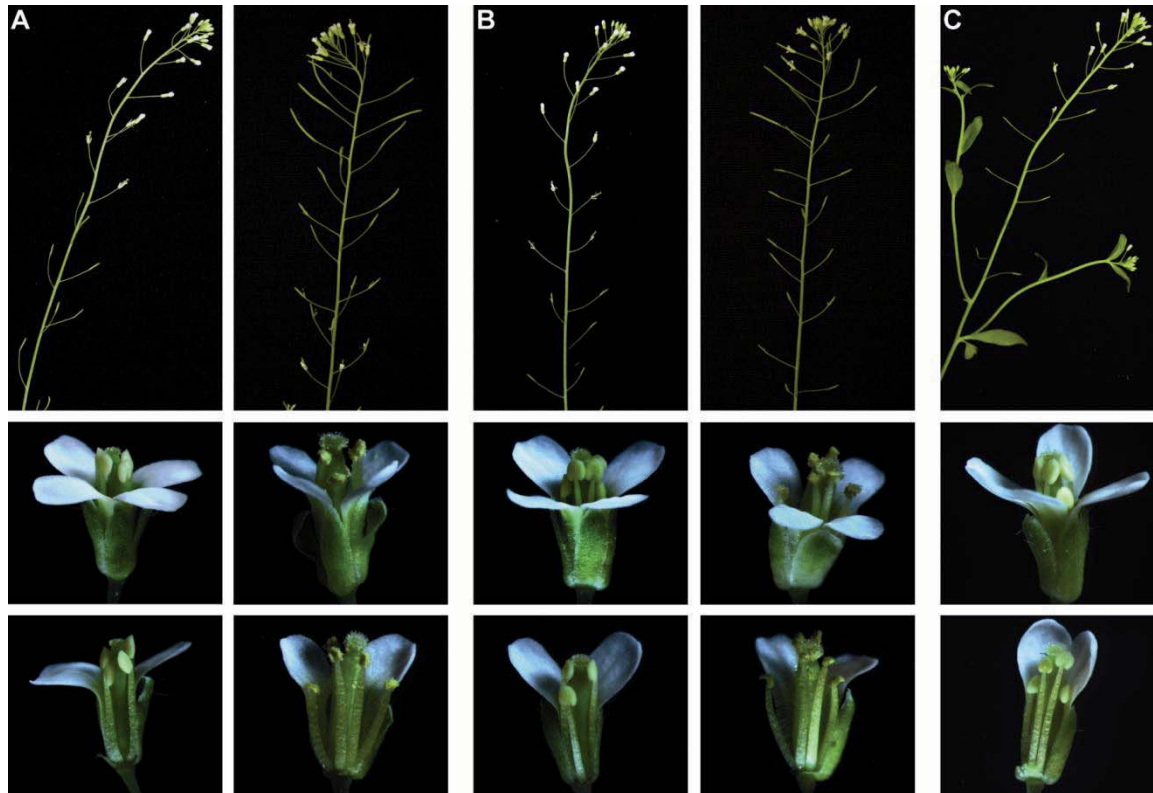


Abb. 3.18: Untersuchung der Fertilität transgener *opr3*-Pflanzen

A *opr3*-Pflanze transformiert mit dem Konstrukt *OPR3:OPR3 Δ SRL* **B** *opr3*-Pflanze transformiert mit dem Konstrukt *OPR3:OPR3_{Y191F}* **C** *opr3*-Pflanze (F1-Generation), die aus einer Kreuzung der beiden transgenen Linien (A und B) hervorging und beide *OPR3*-Konstrukte enthielt.

Die Fertilität der transgenen *opr3*-Linien *OPR3:OPR3 Δ SRL* und *OPR3:OPR3_{Y191F}* wurde durch JA-Applikation hergestellt (A und B jeweils Bilder rechts). Die Pflanzen wurden in einem Alter von 6 Wochen fotografiert. Blüten im Stadium 13 wurden mit vierfacher Vergrößerung (Stereomikroskop SV11 (Zeiss)) aufgenommen. Zur besseren Sichtbarkeit der Antheren wurden jeweils 2 Sepalen und 2 Petalen entfernt (unten).

Sowohl das Resultat des „Huckepack“-Experiment in Pflanzen, als auch das Ergebnis des „Huckepack“-Versuches in Zwiebelepidermiszellen wiesen darauf hin, dass *OPR3* nicht als Dimer in die Peroxisomen gelangen und/oder im Cytosol nicht dimerisieren kann.

Möglicherweise kann *OPR3* nicht im Cytosol dimerisieren, weil für die Dimerisierung zusätzliche Faktoren benötigt werden, die nur im Peroxisom und nicht im Cytosol vorhanden sind. Dies würde dafür sprechen, dass eine potentielle *OPR3*-phosphorylierende Proteinkinase peroxisomal lokalisiert ist.

Um zu überprüfen, ob die Dimerisierung der *OPR3* im Cytosol prinzipiell nicht möglich ist, oder die Problematik darin bestand, dass *OPR3* zwar möglicherweise im Cytosol dimerisieren, aber nicht als Dimer ins Peroxisom gelangen kann, wurden weitere Versuche in Zwiebelepidermiszellen durchgeführt.



3.3.4 Untersuchung des Dimerisierungspotentials von OPR3 Δ SRL mittels BiFC in Zwiebelepidermiszellen

Die Dimerisierung von OPR3 Δ SRL im Cytosol wurde mit Hilfe des split-YFP-Systems untersucht (siehe 2.13.2). Es wurden Fusionskonstrukte von OPR3 Δ SRL mit der N- bzw. C-terminalen Domäne des YFP erstellt. Die Konstrukte 35S:OPR3 Δ SRL-YFP_N und 35S:OPR3 Δ SRL-YFP_C wurden zusammen mit dem cytosolischen RFP-Marker in Zwiebelzellen exprimiert (siehe 2.7). Um das Dimerisierungsverhalten von OPR3 Δ SRL genauer beurteilen und vergleichen zu können, wurden außerdem Zwiebelepidermiszellen mit den Konstrukten 35S:OPR3 Δ SRL-YFP, welches das vollständige YFP enthielt, und dem cytosolischen Markerkonstrukt beschossen.

Es konnte beobachtet werden, dass Zwiebelepidermiszellen, die OPR3 Δ SRL-YFP_N und OPR3 Δ SRL-YFP_C exprimierten, YFP-Fluoreszenz zeigten (Abb. 3.19, A). Die Fluoreszenz wurde quantifiziert (siehe 2.13.2, Belichtung 100 ms) und um die Stärke der Interaktion besser beurteilen zu können mit der Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle mit vollständigem YFP (OPR3 Δ SRL-YFP) verglichen (Abb. 3.19).

Die Quantifizierung wurde für jeweils 25 Zellen durchgeführt. Der cytosolische RFP-Marker wurde als Standard verwendet. Die Fluoreszenzintensität in Zellen mit OPR3 Δ SRL-YFP_{N+C} (med = 31,6) war zwar vermindert gegenüber Zellen mit OPR3 Δ SRL-YFP (med = 78,3), aber nur auf 40 % (Abb. 3.19, B). Dies entspricht in etwa dem Unterschied, der auch zwischen OPR3-YFP_{N+C}-SRL und OPR3-YFP-SRL in Peroxisomen beobachtet werden konnte (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu war der Wert für OPR3-YFP-SRL 17-mal höher als der Wert für die Dimerisierungs-defiziente Mutante E292K (Abb. 3.2).

Diese Resultate sprechen dafür, dass OPR3 auch im Cytosol dimerisieren kann, und es stellt sich die Frage, warum es dann im „Huckepack“-Experiment nicht zur Komplementierung der *opr3*-Mutante kam (Abb. 3.18). Möglicherweise könnte OPR3 im Cytosol modifiziert, aber nicht als Dimer in Peroxisomen importiert werden. Denkbar wäre auch, dass zwar OPR3 Δ SRL im Cytosol dimerisiert, dass aber ein vorhandenes SRL Signal und die Bindung an die Komponenten der peroxisomalen Importmaschinerie die Dimerisierung verhindert. Ebenso könnte der Zeitfaktor des Aufenthalts im Cytosol eine Rolle spielen. Es könnte sein, dass sich OPR3 nicht lange genug im Cytosol aufhält, um phosphoryliert zu werden und zu dimerisieren.

Die Frage in welchen Kompartiment nach einer möglichen Kinase für die OPR3-Phosphorylierung zu suchen ist, blieb damit weiterhin offen.

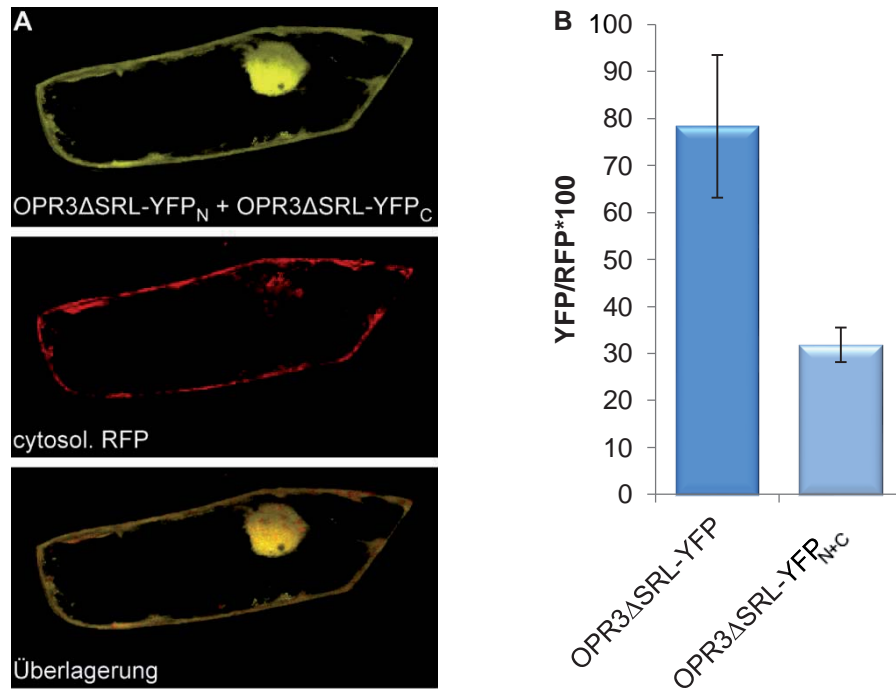


Abb. 3.19: Nachweis der Dimerisierung der OPR3ΔSRL im Cytosol und Quantifizierung mittels BiFC nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen

A Die Konstrukte $35S:OPR3\Delta SRL-YFP_N$ und $35S:OPR3\Delta SRL-YFP_C$ wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert. Als Expressions- und Lokalisationsmarker wurde ein cytosolisches RFP-Fusionsprotein koexprimiert (Liebig & Schaller, unveröffentlicht). Positive Signale wurden nach 24 h bei 200-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Dargestellt sind der gelbe Fluoreszenzkanal (oben, Filtersatz für YFP: 46 HE), der rote Fluoreszenzkanal (mitte, Filtersatz für RFP: 43 HE) und eine Überlagerung der beiden Kanäle (unten). **B** Für die Quantifizierung wurde die Fluoreszenzintensität des YFP-Proteins im Verhältnis zur Fluoreszenzintensität des koexprimierten RFP-Proteins gemessen. Als Positivkontrolle diente das Fusionskonstrukt $35S:OPR3\Delta SRL-YFP$. Für die Auswertung wurden jeweils 25 Zellen analysiert.



3.4 Untersuchung zweier potentieller Proteinkinasen für die Phosphorylierung von OPR3

Die Frage, in welchem Kompartiment eine potentielle Proteinkinase für die OPR3-Phosphorylierung zu finden ist, konnte mit dem „Piggy-back“-Experiment nicht beantwortet werden. Die Existenz einer solchen Proteinkinase blieb aber weiterhin naheliegend, wenn man davon ausgeht, dass die Aktivität der OPR3 durch ein Monomer/Dimer Gleichgewicht geregelt wird und dieses Gleichgewicht phosphorylierungsabhängig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mögliche Proteinkinasen identifiziert und auf eine Beteiligung an der Regulation von OPR3 getestet werden.

3.4.1 Auswahlkriterien für die potentiellen OPR3-Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950

Für die Ermittlung der an der reversiblen Phosphorylierung beteiligten Proteinkinase(n) wurde ein Kandidatengen-Ansatz verfolgt. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte aufgrund dreier Kriterien. Als erstes Kriterium wurde die Koregulation mit OPR3 gewählt, als zweites Kriterium die Lokalisation mit OPR3 – auch wenn aufgrund der cytosolischen Dimerisierung der OPR3 in Zwiebelepidermiszellen (siehe 3.3.4) nicht ausgeschlossen ist, dass auch eine cytosolisch lokalisierte Kinase in Betracht gezogen werden kann. Außerdem wurde als drittes Kriterium aufgrund der vermuteten Phosphorylierung der OPR3 am Tyrosin 364 (Tomate) bzw. 365 (*Arabidopsis*) der Kandidatenkreis auf Kinasen mit Tyrosin-Spezifität eingengt. Mithilfe der Datenbanken AraPerox (Reumann et al. 2004) und Peroxisome DB2.0 (Schlüter et al. 2010) wurden elf Proteinkinasen identifiziert, für die eine Lokalisation in Peroxisomen vorhergesagt wird. Fünf dieser Proteinkinasen weisen ein Interpro-Motiv IPR001245 auf, was für eine Tyr- oder kombinierte Tyr/Ser/Thr-Spezifität spricht. Für zwei dieser Kinasen konnte eine starke Koregulation mit OPR3 festgestellt werden (Tab. 3.1).



	AraPerox	Peroxisome DB	Tyr-Kinase Motiv	Koregulation („Pearson coefficient“)
At3g08720	+		IPR001245	r = 0,935
At4g18950	+		IPR001245	r = 0,893
At3g20530	+		IPR001245	-
At3g61960	+		-	-
At4g31230	+		-	-
At2g18530	+		-	-
At5g04870		+	IPR001245	-
At1g09440		+	IPR001245	-
At3g17420		+	-	-
At5g18500		+	-	-
At1g56720		+	-	-

Tab. 3.1: Kandidatengene für Proteinkinasen für die OPR3-Phosphorylierung

Proteinkinasen, für die eine peroxisomale Lokalisation vorhergesagt wird, wurden mit Hilfe der Datenbanken AraPerox (Reumann et al. 2004) und Peroxisome DB2.0 (Schlüter et al. 2010) identifiziert. Eine mögliche Tyr-Spezifität wird durch das Interpro-Motiv IPR001245 angezeigt. Eine Koregulation mit OPR3 wurde über die BAR-Datensatzsuche des Expression Angler der University of Toronto ermittelt (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi).

3.4.2 Subzelluläre Lokalisation der Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 in Zwiebelepidermiszellen

Für die beiden Kinasen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation in Zwiebelepidermiszellen bestimmt, um die Vorhersage der Datenbanken zu überprüfen. Dafür wurden Fusionskonstrukte mit YFP hergestellt (siehe 2.6.9.6). YFP wurde jeweils an den N-Terminus der Kinasen fusioniert (YFP-At3g08720 und YFP-At4g18950). Das Startcodon der Kinasen wurde entfernt. Beide Fusionsproteine wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert (siehe 2.7). Als Expressions- und Lokalisationskontrolle wurde außerdem der peroxisomale Marker pKAT2-eqFP611 (Forner & Binder 2007) koexprimiert.

Für YFP-At3g08720 war eine Lokalisation in den Peroxisomen und für YFP-At4g18950 eine Lokalisation im Cytosol zu beobachten (siehe 3.20), was mit den Ergebnissen von Ma (2005) übereinstimmt.

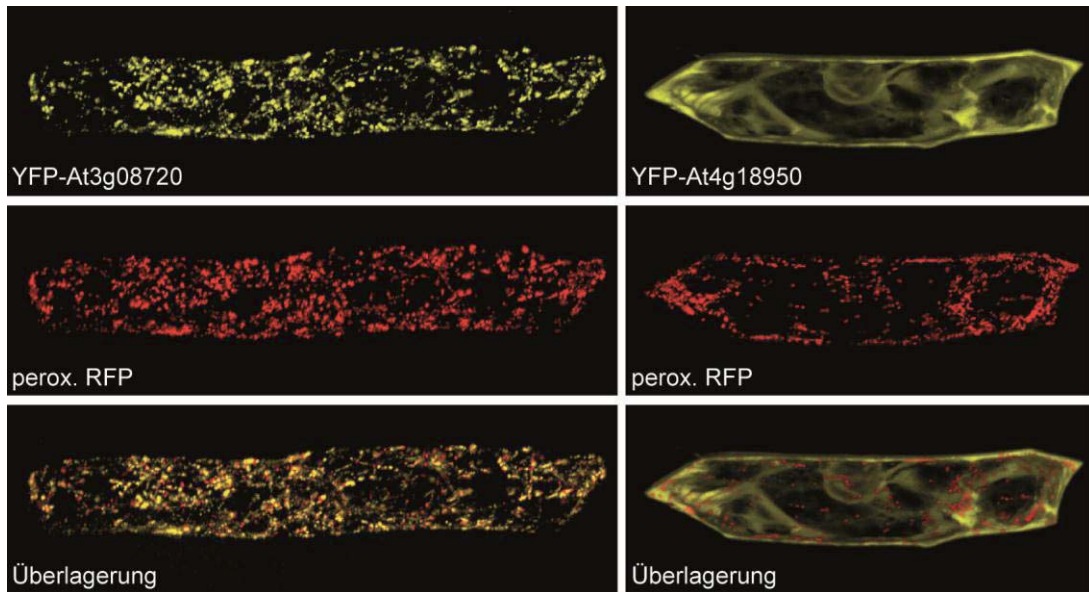


Abb. 3.20: Subzelluläre Lokalisation der Kinasen At3g08720 und At4g18950

YFP-At3g08720 und YFP-At4g18950 wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert. Als Expressions- und Lokalisationskontrolle diente der koexprimierte peroxisomale (perox.) Marker pKAT2-eqFP611 (Fornier & Binder 2007). Positive Signale wurden nach 24 h bei 200-facher Vergrößerung unter dem Axio Imager Z1 (Zeiss) aufgenommen. Dargestellt sind der gelbe Fluoreszenzkanal (oben, Filtersatz für YFP: 46 HE), der rote Fluoreszenzkanal (mitte, Filtersatz für RFP: 43 HE) und eine Überlagerung der beiden Kanäle (unten).

Die von der Computervorhersage abweichende cytosolische Lokalisation des At4g18950-Proteins wurde auch durch eine weitere Arbeitsgruppe in *Arabidopsis*-Zellen durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation gezeigt (Koroleva et al. 2005).

Da nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann, ob OPR3 im Peroxisom oder im Cytosol phosphoryliert wird (siehe 3.3), wurde aufgrund dieser Ergebnisse keine der beiden Kinasen als Kandidat für die Phosphorylierung von OPR3 ausgeschlossen.

3.4.3 Analyse der „loss-of-function“-Mutanten der Gene *At3g08720* bzw. *At4g18950* und Untersuchung von deren Einfluss auf die JA-Synthese

Sollte eine der beiden Kinasen in der Lage sein, OPR3 zu phosphorylieren, so müsste OPR3 – der Arbeitshypothese entsprechend – in „loss-of-function“-Mutanten durch die fehlende Phosphorylierung konstitutiv aktiv sein. Auch in unverwundeten Pflanzen wäre damit eine konstitutive JA-Synthese zu erwarten. In den „loss-of-function“-Mutanten sollte dies dazu führen, dass Jasmonsäure-induzierte Markergene (z. B. *VSP1* und *PDF1.2*) verstärkt exprimiert werden.

Aus diesem Grund wurden für die beiden Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 *Arabidopsis* T-DNA Insertionslinien aus öffentlich zugänglichen Sammlungen (SALK, SAIL, GABI-Kat; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) bestellt und daraufhin untersucht, ob



der Verlust der Proteinkinase einen Effekt auf die Aktivität der OPR3 und damit die JA-Synthese nimmt.

Für *At3g08720* wurden drei SALK T-DNA Insertionslinien (SALK_039937, SALK_083811 und SALK_013334, Abb. 3.21, oben) und für *At4g18950* eine WiscDsLox T-DNA Insertionslinie (WiscDsLox345-348B17, Abb. 3.21, unten) eingehend analysiert. Für die Linie SALK_013334 ließ sich bei Überprüfung der T-DNA Insertion mittels PCR die T-DNA nicht nachweisen (Abb. 3.22). Diese Linie wurde daher nicht weiter verwendet.

Die Linien SALK_039937, SALK_083811 und WiscDsLox345-348B17 enthielten die erwarteten Insertionen (Abb. 3.22) und wurden in Hinblick auf den Insertionsort genetisch näher charakterisiert: Zur Verifikation des Integrationsortes wurde ein Fragment genomischer DNA, das die Integrationsstelle umschließt, mittels PCR amplifiziert (siehe 2.6.7.1) und einer Sequenzanalyse (siehe 2.6.10) unterzogen.

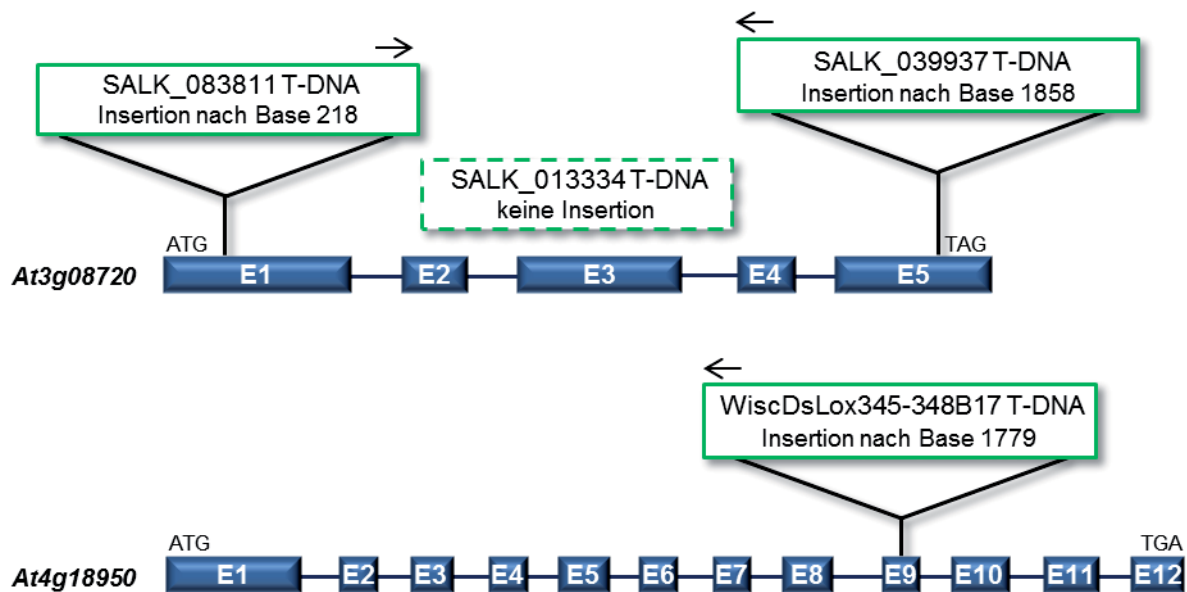


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der T-DNA Insertion(en) in die Gene *At3g08720* und *At4g18950*

At3g08720 besteht aus 5 codierenden Exons (E1-E5) und 4 Introns (Striche zwischen Exons). Die T-DNA der SALK_083811 Linie wurde nach Base 218 in Exon 1 (Watson-Strang) und die T-DNA der SALK_039937 Linie nach Base 1858 in Exon 5 (Crick-Strang) integriert. Die Linie SALK_013334 enthielt keine T-DNA Insertion. *At4g18950* setzt sich aus 12 Exons (E1-E12) und 11 Introns zusammen. Die T-DNA der Linie WiscDsLox345-348B17 wurde nach Base 1779 in Exon 9 (Crick-Strang) inseriert.

Für die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente wurde für die SALK-Linien der Primer Lbb1 (bindet in der T-DNA Sequenz an der „Left Border“, 5'-Ende der T-DNA) und für WiscDsLox345-348B17 der genspezifische Primer At4g1606F verwendet. Der ermittelte In-



sertionsort und die Orientierung der T-DNA sind für die untersuchten Linien in Abb. 3.21 schematisch dargestellt.

Für die SALK-Linien des Gens *At3g08720* und die WiscDsLox-Linie des Gens *At4g18950* wurden für die T-DNA Insertion homozygote Pflanzen selektiert. Dafür wurden 24 Pflanzen aus Samen des „Stock Centers“ mittels PCR analysiert (siehe 2.6.7.1). Durch DNA-Extraktion aus Pflanzen (siehe 2.6.4.2) und PCR-Reaktionen mit jeweils zweierlei Primerkombinationen wurde überprüft, ob die Pflanzen die T-DNA homozygot enthielten. In der ersten Primerkombination wurden zum Nachweis, ob das Wildtypallel noch vorhanden war, zwei genspezifische Primer verwendet (SALK-Linien: 662F und 2278R, WiscDsLox: *At4g1476F* und *At4g2491R*). Die T-DNA Insertion wurde mit Hilfe der zweiten Primerkombination einem T-DNA spezifischen Primer (SALK: LBA1, WiscDsLox: pDSLb) und einem genspezifischen Primer nachgewiesen (SALK_013334 und SALK_039937: 662F, SALK_083811: 2278R, WiscDsLox345-348B17: *At4g1476F*). Konnte in den PCR-Reaktionen nur in der zweiten Primerkombination ein Amplifikat nachgewiesen werden und kein Produkt für das Wildtypallel, so zeigt dies, dass die Insertion homozygot vorliegt. Für die beiden SALK-Linien SALK_039937 und SALK_083811 und für die WiscDsLox-Linie konnten Pflanzen selektiert werden, die die T-DNA Insertion homozygot enthielten (Abb. 3.22). Für die Linie SALK_013334 konnte keine T-DNA Insertion nachgewiesen werden (Abb. 3.22).

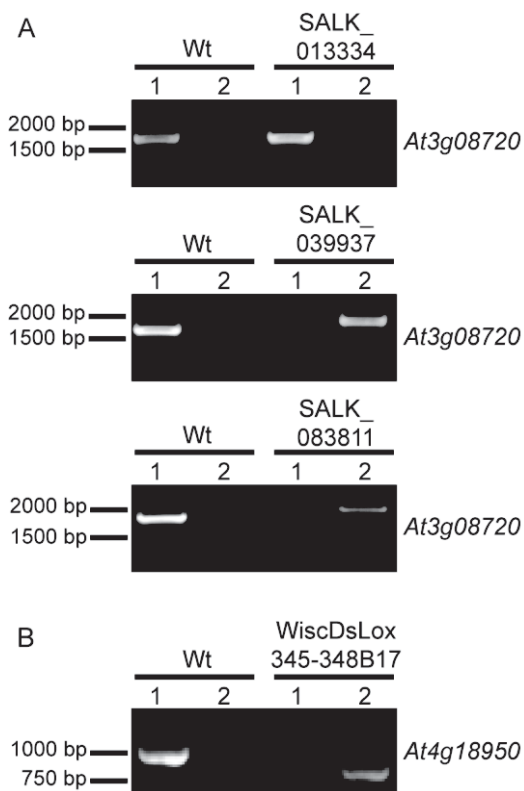


Abb. 3.22: Nachweis homozygoter T-DNA Insertionslinien der Gene *At3g08720* und *At4g18950*

Durch PCR-Reaktionen mit zweierlei Primerkombinationen wurde das Wildtypallel (1) bzw. die T-DNA Insertion (2) nachgewiesen. Zum Nachweis des Wildtypalles wurden genspezifische Primer verwendet (SALK-Linien: 662F und 2278R, WiscDsLox: *At4g1476F* und *At4g2491R*). Zum Nachweis der T-DNA wurden ein T-DNA spezifischer (SALK: LBA1, WiscDsLox: pDSLb) und ein genspezifischer Primer (SALK_013334 und SALK_039937: 662F, SALK_083811: 2278R, WiscDsLox345-348B17: *At4g1476F*) verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht detektiert.

A SALK-Linien für *At3g08720* **B** WiscDsLox-Linie für *At4g18950*



Weitergehend wurden die homozygoten Linien der beiden Kinasen daraufhin untersucht, ob es durch die T-DNA Insertion zum Verlust des Transkriptes und dadurch zum Funktionsverlust des betroffenen Gens kam. Dazu wurde RNA aus vier Wochen alten Blättern der homozygoten Mutanten beider Kinasen extrahiert (siehe 2.6.5). Zur Kontrolle wurde auch RNA aus wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen gewonnen. Mittels reverser Transkriptase Reaktion (siehe 2.6.6) wurde die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in einer PCR-Reaktion (siehe 2.6.7.1) mit spezifischen, den ORF des Gens flankierenden Primern (At3g08720: 5'At3gBamHI und 3'At3gXbaI, At4g18950: 5'At4gBamHI und 3'At4gXbaI) als Matrize eingesetzt, um zu überprüfen, ob noch ein Transkript gebildet wurde. Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine PCR mit spezifischen Primern für Aktin („housekeeping gene“) durchgeführt, um zu testen, ob die RT-PCR erfolgreich war. Wie erwartet, konnte für die die Linien SALK_039937 und SALK_083811 kein Transkript des Gens *At3g08720* nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Auch für die WiscDsLox-Linie konnte der Verlust des Transkriptes des *At4g18950* Gens beobachtet werden (Abb. 3.23). In Pflanzen der SALK_013334-Linie, die sich als keine echte Insertionslinie herausgestellt hatte (Abb. 3.22), war weiterhin ein Transkript nachzuweisen (Abb. 3.23).

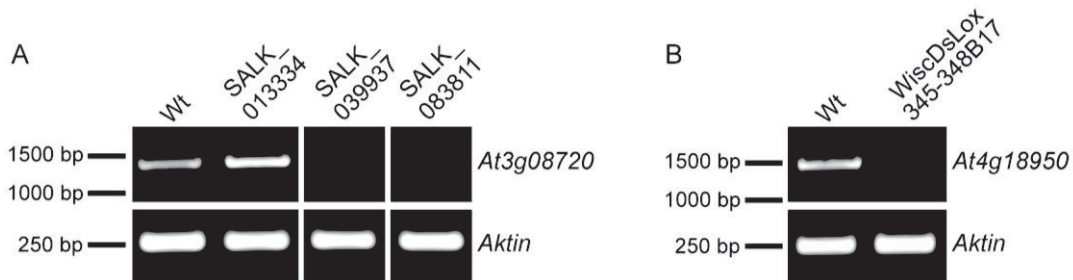


Abb. 3.23: Transkriptanalyse homozygoter T-DNA Insertionslinien der Gene *At3g08720* und *At4g18950* durch RT-PCR

Mittels RT-PCR wurde getestet, ob es durch eine Insertion der T-DNA zum Verlust des Transkriptes in den Pflanzen kam. Für die PCR wurden genspezifische Primer verwendet (At3g08720: 5'At3gBamHI und 3'At3gXbaI, At4g18950: 5'At4gBamHI und 3'At4gXbaI). Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht detektiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern für das „housekeeping gene“ Aktin durchgeführt (AtActin2-865F und AtActin2-112R). **A** SALK-Linien für *At3g08720* **B** WiscDsLox-Linie für *At4g18950*

Nachdem nun für die Gene *At3g08720* und *At4g18950* „loss-of-function“-Mutanten selektiert worden waren, wurde die Expression der JA-Markergene *VSP1* und *PDF1.2* in Mutanten und Wildtyp durch semiquantitative RT-PCR verglichen. Als Ladekontrolle wurde der Transkriptspegel des *Aktin*-Gens analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde auch der Transkriptspegel des *OPRI*-Gens untersucht, für welchen kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten



erwartet wurde. Auch der Transkriptspiegel des *OPR3*-Gens wurde analysiert. Falls in einer der beiden Mutanten ein hoher JA-Gehalt durch konstitutiv aktives OPR3 vorhanden wäre, müsste hier auch die OPR3-Transkriptmenge erhöht oder aber möglicherweise durch eine negative Rückkopplung herabgesetzt sein. Die semiquantitativen PCR-Reaktionen wurden sowohl nach 24 als auch nach 30 Zyklen auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen (siehe 2.6.8). Für die *OPR1*-*OPR3*- und *PDF1.2*-Transkriptspiegel war in keiner der Mutanten ein Unterschied zum Wildtyp zu verzeichnen (Abb. 3.24). Für *VSP1* konnte in allen mutierten Linien zwar keine Erhöhung, jedoch eine gewisse Verringerung des Transkriptspiegels beobachtet werden. Weiterhin war für die beiden „loss-of-function“-Mutanten des Gens *At3g08720* auch für *PDF1.2* eine leichte Erniedrigung des Transkriptspiegels zu beobachten (Abb. 3.24, A und B).

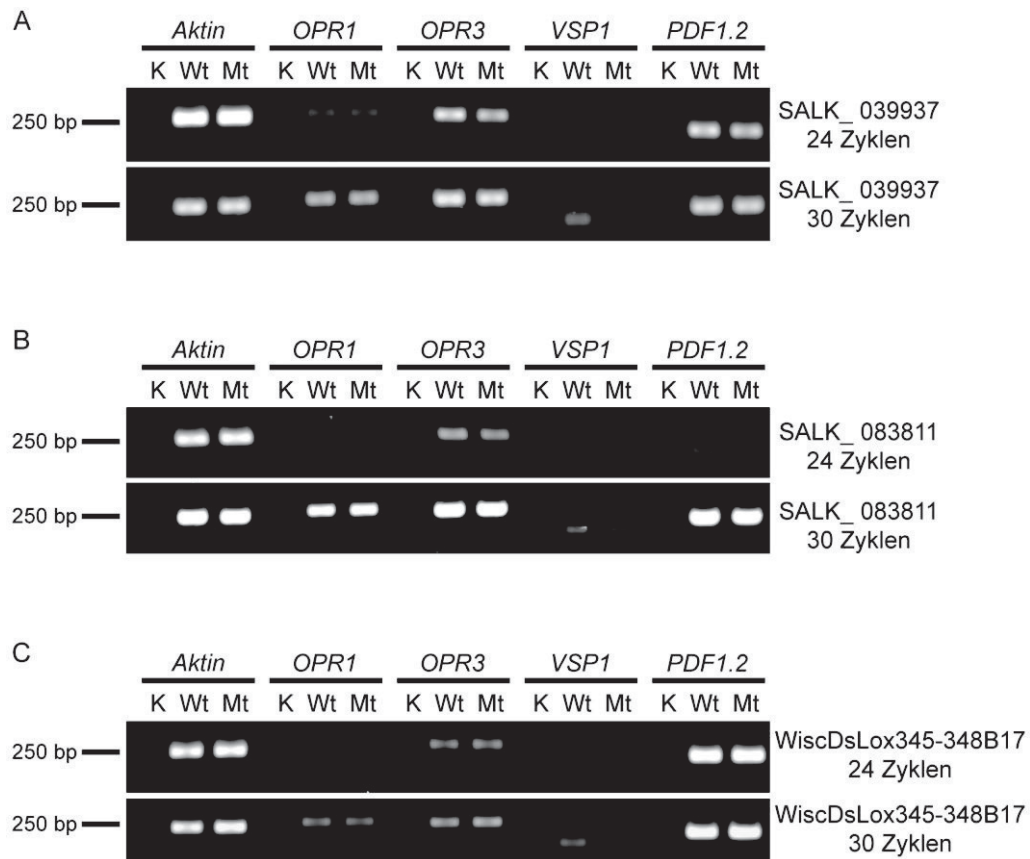


Abb. 3.24: Vergleich der Transkriptspiegel von JA-Markergenen zwischen den „loss-of-function“-Mutanten der Gene *At3g08720* bzw. *At4g18950* und Wildtyp durch semiquantitative PCR

RT-PCR-Reaktionen wurden für die Gene *Aktin*, *OPR1*, *OPR3*, *VSP1* und *PDF1.2* durchgeführt. Als Kontrolle (K) wurden ebenfalls PCR-Reaktionen mit sterilen ddH₂O angesetzt. Es wurde jeweils der Wildtyp (Wt) mit der „loss-of-function“-Mutante (Mt) verglichen. Die PCR-Produkte wurden sowohl nach 24 als auch nach 30 PCR-Zyklen auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, durch Elektrophorese getrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht detektiert. **A** SALK_039937 für *At3g08720* **B** SALK_083811 für *At3g08720* **C** WiscDsLox345-348B17 für *At4g18950*



Wenn eine der Kinasen für die OPR3-Phosphorylierung verantwortlich wäre, müsste OPR3 in der „loss-of-function“-Mutante als aktives Monomer vorliegen (nicht phosphoryliert), was zu einem Anstieg der JA-Konzentration und damit eigentlich zu einer Erhöhung des *VSP1*- und *PDF1.2*-Spiegels hätte führen müssen. Da dies nicht der Fall war und auch keine Veränderung des *OPR3*-Transkriptspiegel zwischen Wildtyp und Mutante verzeichnet werden konnte, ist wahrscheinlich, dass keine der beiden Kinasen OPR3 phosphoryliert. Es wäre aber auch denkbar, dass mit *VSP1* und *PDF1.2* nicht die geeigneten Markergene gewählt wurden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt.

3.4.4 Mikroarray Expressionsanalyse in Blättern der „loss-of-function“-Mutante der Kinase *At4g18950* im Vergleich zum Wildtyp

Bei den RT-PCR-Reaktionen blieb der erwartete Anstieg der JA-Markertranskripte aus. Allerdings bestand die Möglichkeit, dass andere Gene durch einen Anstieg der JA-Konzentration eine Expressionsänderung erfahren. Um diese zu erfassen, wurde zunächst für die *At4g18950* „loss-of-function“-Mutante eine Mikroarray Expressionsanalyse im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Für den Versuch wurden die Blätter von jeweils 24 Pflanzen der „loss-of-function“-Mutante und des *Arabidopsis*-Wildtyps (Ws) in Stickstoff geerntet. Es wurden nicht gestresste Pflanzen in einem Alter von vier Wochen verwendet.

Das verwendete Mikroarray 3.2.2.Y (Version 1.0) wurde von der University of Arizona (Galbraith Laboratory) bezogen. Das Microarray enthält 26.000 Oligonukleotide des *Arabidopsis*-Genoms und zusätzliche Elemente als Kontrollen (<http://ag.arizona.edu/microarray/deconvolution>). Für die Durchführung der Mikroarray Analyse wurde zunächst die RNA aus den Blättern der „loss-of-function“-Mutante und des Wildtyps extrahiert. Diese wurde revers transkribiert und dabei mit Cy3-dCTP und Cy5-dCTP fluoreszenzmarkiert. Die so markierte cDNA wurde anschließend vereinigt und mit dem Mikroarray hybridisiert. Nicht gebundene Fragmente wurden anschließend entfernt und das Fluoreszenzsignal jeder Position des Mikroarrays mittels eines Lasers ausgelesen (siehe 2.12).

Es wurden drei Mikroarrays in technischen Replikaten mit jeweils 100 µg RNA verwendet. Bei zwei der Mikroarrays wurden die RNA des Wildtyps mit Cy5-dCTP und die RNA der Mutante mit Cy3-dCTP markiert. Bei dem dritten Mikroarray erfolgte die Markierung in umgekehrter Weise („dye swap“).

Die Normalisierung und Auswertung der Mikroarrays erfolgte wie unter 2.12.4 beschrieben. Es wurden dabei nur solche Gene berücksichtigt, welche in mindestens zwei der drei Replikate



eine wenigstens zweifach erhöhte oder erniedrigte Expression im Vergleich zum Wildtyp zeigten.

Es konnten 295 Gene identifiziert werden, die in der Mutante differentiell zum Wildtyp exprimiert wurden (Anhang A5, Gene nach absteigender Expression – in Bezug auf die Expression des Wildtyps – gelistet). Zwei Gene waren in der Mutanten stärker und 293 Gene schwächer exprimiert als in Wildtyp-Pflanzen.

Für die 293 in der Mutanten schwächer exprimierten Gene wurde eine Einteilung nach der zellulären Organisation, ihrer molekularen Funktion und ihrer Beteiligung an biologischen Prozesse vorgenommen und die prozentuale Verteilung der Gruppen ermittelt (<http://www.arabidopsis.org>, „gene ontology annotations“). Dem wurde die prozentuale Verteilung der Gruppen im *Arabidopsis*-Gesamtgenom gegenüber gestellt (siehe Tab. 3.2, 3.3 und 3.4). Auffällige Veränderungen in der prozentualen Verteilung waren bei der „loss-of-function“-Mutante vor allem im Nucleus (Tab. 3.2), bei der Transferaseaktivität sowie der Protein- und Nukleinsäurebindung (Tab. 3.3) und in Entwicklungsprozessen (Tab. 3.4) zu verzeichnen.

GO (gene ontology) Zelluläre Komponenten	<i>Arabidopsis</i> (Gesamtgenom) %	Mikroarray %
unbekannte zelluläre Komponenten	18,8	5,9
sonstige intrazelluläre Komponenten	16,1	20,2
sonstige Komponenten des Cytoplasma	11,0	14,1
sonstige Membranen	10,2	11,4
Chloroplast	8,9	7,5
sonstige zelluläre Komponenten	8,5	6,2
Nucleus	5,6	10,5
Plastid	4,3	3,2
Plasmamembran	3,8	3,7
Cytosol	3,7	5
Mitochondrien	2,8	5,2
Ribosom	1,9	1,4
Zellwand	1,4	2,7
Golgi Apparat	1,2	0,9
ER	1	1,2
Extrazellulär	0,9	0,9

Tab. 3.2: Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer zellulären Organisation im Vergleich zum *Arabidopsis*-Gesamtgenom

Die Gene des gesamten *Arabidopsis*-Genoms wurden nach ihrer zellulären Organisation in 16 Gruppen eingeteilt und der prozentuale Anteil der Gene innerhalb jeder Gruppe in Bezug auf das Gesamtgenom bestimmt (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>; Spalte 2). Dementsprechend wurden die in der Mutanten At4g18950 als differentiell herunterregulierten ermittelten Gene eingeteilt und aufgelistet (Spalte 3).



GO (gene ontology) Molekulare Funktion	<i>Arabidopsis</i> (Gesamtgenom) %	Mikroarray %
unbekannte molekulare Funktion	18,2	5,5
Transferaseaktivität	11	14,3
sonstige Bindung	10,7	11,4
Proteinbindung	10,6	12,1
sonstige Enzymaktivität	9,4	13,8
Hydrolaseaktivität	8,1	7,4
Nucleotidbindung	6,5	8,4
DNA oder RNA Bindung	6,4	6,3
Kinaseaktivität	6,1	7,4
Transporteraktivität	4,2	5,4
Transkriptionsfaktoraktivität	2,8	3,3
Nukleinsäurebindung	2,7	0,8
sonstige molekulare Funktion	2,2	2,0
strukturelle Molekülaktivität	0,9	0,9
Rezeptorbindung oder -aktivität	0,4	1,2

Tab. 3.3: Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer zellulären Organisation im Vergleich zum *Arabidopsis*-Gesamtgenom

Die Gene des gesamten *Arabidopsis*-Genoms wurden nach ihrer molekularen Funktion in 15 Gruppen eingeteilt und der prozentuale Anteil der Gene innerhalb jeder Gruppe in Bezug auf das Gesamtgenom bestimmt (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>; Spalte 2). Dementsprechend wurden die in der Mutanten At4g18950 als differentiell herunterregulierten ermittelten Gene eingeteilt und aufgelistet (Spalte 3).

GO (gene ontology) Biologische Prozesse	<i>Arabidopsis</i> (Gesamtgenom) %	Mikroarray %
sonstige zelluläre Prozesse	24,3	25,9
sonstige metabolische Prozesse	21,3	22,2
unbekannte biologische Prozesse	14,8	4,3
Proteinmetabolismus	6,7	5,6
Antwort auf Stress	5,2	6,2
Entwicklungsprozesse	5,1	8
Antwort auf abiotischen oder biotischen Stimulus	4,7	6,5
Transport	4,7	5,4
sonstige biologische Prozesse	3,9	5,3
DNA-abhängige Transkription	3	3,7
Zellorganisation und Biogenese	2,6	2,5
Signaltransduktion	2,2	2,5
DNA oder RNA Metabolismus	1	2
Elektronentransport oder Energie-Signalweg	0,5	0,2

Tab. 3.4: Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer biologischen Funktion im Vergleich zum *Arabidopsis*-Gesamtgenom

Die Gene des gesamten *Arabidopsis*-Genoms wurden nach ihrer biologischen Funktion in 14 Gruppen eingeteilt und der prozentuale Anteil der Gene innerhalb jeder Gruppe in Bezug auf das Gesamtgenom bestimmt (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>; Spalte 2). Dementsprechend wurden die in der Mutanten At4g18950 als differentiell herunterregulierten ermittelten Gene eingeteilt und aufgelistet (Spalte 3).



Signifikante Unterschiede in den Annotationen („GO term“) der im *Arabidopsis*-Gesamtenom in der Mikroarray Analyse unterschiedlich stark repräsentierten Gene wurden mit Hilfe des „GO Term Enrichment“-Programmes ermittelt ($P < 0,001$, <http://amigo.geneontology.org>). Dies betraf folgende GO Annotationen: zelluläre Komponenten: Cytosol, Nucleus; molekulare Funktionen: Proteinbindung, katalytische Aktivität; biologische Prozesse: primäre Stoffwechselprozesse, Stoffwechsel Stickstoff-haltiger Verbindungen, Regulation von Entwicklungsprozessen.

Hier ist insbesondere die Kategorie biologische Prozesse sehr aufschlussreich. Die Kinase At4g18950 scheint im primären Stoffwechsel und hier besonders am Stoffwechsel Stickstoff-haltiger Verbindungen und an der Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein. Letzteres äußert sich in der Häufigkeit, mit der Transkriptionsfaktoren unter den differentiell exprimierten Genen vertreten waren (12 %), was wiederum mit der häufigen Nennung des Stichwörtes „Nucleus“ in der Kategorie „zelluläre Komponenten“ in Einklang steht.

Würde die Kinase bei der Regulation des JA-Signalwegs eine Rolle spielen, wäre nicht nur eine Veränderung bei der Regulation von Entwicklungsprozessen zu erwarten gewesen, sondern auch in Bezug auf die Stressantwort und Antworten auf einen abiotischen oder biotischen Stimulus. Veränderungen waren hier zwar zu beobachten, aber es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Desweiteren wurden alle differentiell-exprimierten Gene daraufhin überprüft, ob sie in den Jasmonsäure-Signalweg involviert sind, beispielsweise, ob sie auf einen Jasmonsäure Stimulus reagieren oder an der Biosynthese oder am Jasmonsäuremetabolismus beteiligt sind (Vergleich TAIR-Datenbank <http://www.arabidopsis.org>, „get all GO annotations“; Mikroarraydaten: Jung et al. 2007; Schommer et al. 2008). Dadurch konnten elf Gene identifiziert werden, die im JA-Signalweg eine Rolle spielen (siehe Anhang A5). Dies bedeutet, dass insgesamt 3,7 % der im Array identifizierten Gene davon betroffen waren. Darunter befanden sich verschiedene Transkriptionsfaktoren (z. B. TCP4, MYB30, MYB60, OBP2...), eine MAP Kinase (ATMPK8) und ein JAZ-Protein (JAZ3) (siehe Anhang A5).

Wenn die Kinase At4g18950 in der Lage wäre OPR3 zu phosphorylieren, müsste – der Arbeitshypothese entsprechend – in der Mutante ein dauerhaft aktives OPR3 vorliegen und eine hohe JA-Konzentration zur Überexpression JA-abhängiger Gene führen. Jedoch war hier in der Mutante nur eine verminderte Expression der Gene zu beobachten, die in den JA-Signalweg involviert sind und zudem war nur ein geringer Prozentsatz, aller als differentiell-exprimiert identifizierten Gene davon betroffen. Denkbar wäre, dass eine negative Rückkopp-



lung, ausgelöst durch eine Überexpression der JA, zu einer verstärkten Repression JA-abhängiger Gene führt. Allerdings wäre dann zu erwarten gewesen, dass JAZ-Proteine in der Mutanten verstärkt exprimiert werden würden, was nicht beobachtet werden konnte. Die Befunde lassen darauf schließen, dass At4g18950 bei der Regulation der Jasmonsäure-Biosynthese wahrscheinlich keine Rolle spielt.

Auch die Analyse der Mutanten mittels semiquantitativer PCR (siehe 3.4.3) deutete darauf hin, dass die beiden ausgewählten Kinasen At4g18950 und At3g08720 wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Regulation der OPR3 nehmen. Diese Schlussfolgerung wird durch Ergebnisse von Kocsis (Diplomarbeit, 2011) unterstützt. Die rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten Kinasen waren nicht in der Lage OPR3 *in vitro* zu phosphorylieren. Aus diesen Gründen wurden die Kinasen At4g18950 und At3g08720 aus dem Kreis potentiell OPR3-regulierender Kinasen ausgeschlossen und keine weiteren Mikroarray Experimente mehr durchgeführt.



3.5 Untersuchung der OPR3-Dimerisierung mittels Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-System und Hefe-Zwei-Hybrid (H3H)-System

Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-System lassen sich ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen beobachten (Fields & Song 1989). Es ist sogar sensitiv genug, um transiente Enzym-Substrat-Interaktionen nachzuweisen. Auch konnten dadurch bereits erfolgreich Substrate von Proteinkinasen identifiziert werden (Jiang & Carlson 1999). Umgekehrt sollte es also auch möglich sein, eine unbekannte Proteinkinase für ein bekanntes Substrat zu identifizieren. In diesem Fall würde das eine potentielle Proteinkinase für OPR3 betreffen.

Hier wurde zunächst untersucht, ob die Dimerisierung der OPR3 im H2H-System auch ohne eine koexprimierte Proteinkinase aus Pflanzen möglich ist. Obgleich die in Kapitel 3.4 ausgewählten Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 keine eindeutigen Hinweise darauf lieferten, für die Phosphorylierung der OPR3 verantwortlich zu sein, wurde mit Hilfe des H3H-Systems untersucht, ob eine dieser Proteinkinasen möglicherweise doch einen Einfluss auf Dimerisierung der OPR3 nimmt.

3.5.1 Erstellung der Fusionskonstrukte für die H2H-Analyse

Für die Untersuchung der OPR3-Dimerisierung im H2H-System wurden DNA-Fusionskonstrukte erstellt, die für die DNA-bindende Domäne (BD) bzw. die transkriptionsaktivierende Domäne (AD) eines Hefe-Transkriptionsfaktors (GAL4) in Fusion mit OPR3 aus *S. lycopersicum* kodieren (siehe 2.6.9.6). Aufgrund der Vektorverfügbarkeit wurde OPR3 dieses Mal jeweils N-terminal mit den Domänen des Transkriptionsfaktors fusioniert (AD-*S/OPR3* im Vektor pGAD424 (Clontech), BD-*S/OPR3* im Vektor pGBT9 (Clontech)). Die SRL-Signalsequenz wurde zuvor entfernt. Die erstellten Konstrukte wurden in den Hefe-Reporterstamm HF7c transformiert (siehe 2.6.2). Falls eine Dimerisierung der OPR3 auch ohne Proteinkinasen aus Pflanzen möglich wäre, sollten die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors zusammengeführt und dadurch die Funktion des Transkriptionsfaktors rekonstituiert werden. Dadurch sollte ein Reporter gen (*lacZ*) exprimiert werden, welches unter der Kontrolle eines durch GAL4 regulierbaren Promotors steht (siehe 2.13.1).

3.5.2 Analyse der Proteinexpression in transformierten Hefezellen

Der Hefestamm HF7c ist unter anderem auxotroph für die Aminosäuren Leucin und Tryptophan (siehe 2.2.3 und 2.4). Die verwendeten Plasmide pGAD424 und pGBT9 enthielten die Gene für LEU bzw. TRP und ermöglichten dadurch nur transformierten Hefezellen ein Wachstum auf SD-Minimalmedium ohne diese Aminosäuren. Eine Selektion transformierter



Hefezellen konnte hier, unter Verwendung von SD-Minimalmedium (siehe 2.4), dem alle nötigen Zusätze außer TRP und/oder LEU zugefügt wurden, erfolgreich durchgeführt werden. Mittels SDS-PAGE (siehe 2.11.5) und Western-Blot-Analyse (siehe 2.11.7) wurde überprüft, ob die Fusionsproteine aus OPR3 und den Transkriptionsfaktordomänen in den transformierten Hefen exprimiert wurden. Proteinextrakte aus Hefezellen wurden gewonnen (siehe 2.11.3) und 40 µl des aufgekochten Extraktes aufgetragen. Die Fusionsproteine konnten im Western-Blot bei etwa 62 kDa (GAL4AD-*S/OPR3*) und 65 kDa (GAL4BD-*S/OPR3*) detektiert werden (Abb. 3.25). Auf dem Western-Blot war außerdem für Proteinextrakte, die aus Hefezellen mit GAL4AD-*S/OPR3* gewonnen wurden, ein zusätzliches Signal oberhalb von 62 kDa zu beobachten (Abb. 3.25). Möglicherweise trat hier eine Modifizierung des Fusionsproteins – beispielsweise durch Glycosylierung – ein. Warum dies aber nicht auch für das Fusionsprotein GAL4BD-*S/OPR3* beobachtet werden konnte, blieb offen. Durch den geringen Größenunterschied der beiden Fusionsproteine von nur 3 kDa war mittels Western-Blot keine Unterscheidung zwischen GAL4AD-*S/OPR3* und GAL4BD-*S/OPR3* möglich (Abb. 3.25). Hefen, die mit beiden Plasmiden pGAD424 (*ADH:GAL4AD-S/OPR3*) und pGBT9 (*ADH:GAL4BD-S/OPR3*) transformiert worden waren, wuchsen jedoch auf SD-Minimalmedium ohne die Zusätze LEU und TRP. Deshalb und aufgrund des eindeutigen Nachweises der GAL4-Fusionsproteine in den Hefen, die nur mit einem Plasmid transformiert worden waren, wurde davon ausgegangen, dass diese Hefen beide Fusionsproteine exprimierten.

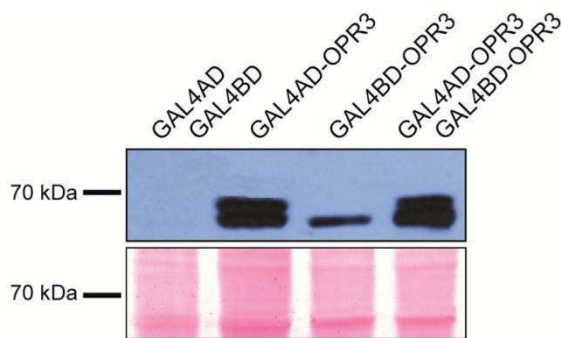


Abb. 3.25: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse zum Nachweis der H2H-Fusionsproteine in Hefe

Proteinextrakte wurden aus transformierten Hefezellen erstellt, in einem 10 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, immunodetektiert und durch ECL entwickelt. Der Western-Blot wurde mit dem primären *AtOPR3*-Antiserum (1:650) und einem anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10.000) behandelt (untere Bande: GAL4AD-*S/OPR3* (62 kDa) bzw. GAL4BD-*S/OPR3* (65 kDa), obere Bande: zusätzliches Signal des GAL4AD-*OPR3*).

Als Ladekontrolle diente eine Ponceau-Färbung. Proteinstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)



3.5.3 OPR3-Interaktionsverhalten im H2H-System

Obwohl die transformierten Hefen die Fusionsproteine aus den GAL4-Domänen und *S/OPR3* exprimierten, konnte keine Aktivierung des *lacZ*-Reportergens beobachtet werden (Abb. 3.26). Eine Dimerisierung der *S/OPR3* konnte im H2H-System also nicht gezeigt werden. Verschiedene Gründe können dafür verantwortlich sein, warum es hier anders als in Pflanzenzellen zu keiner Interaktion zwischen den *S/OPR3*-Protomeren kommt. Die Domänen des Hefe-Transkriptionsfaktors könnten die richtige Konformationsausbildung und Dimerisierung von *S/OPR3* verhindern oder im Nucleus der Hefen könnten für die Dimerisierung von *S/OPR3* ungeeignete Bedingungen bestehen. Es könnte jedoch auch sein, dass der Hefestamm keine Kinase(n) für die Phosphorylierung von *S/OPR3* besitzt. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da Tyrosin-Phosphorylierungen in Hefen nur in sehr geringen Ausmaß vorkommen und als Regulationsmechanismus eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Chi et al. 2007).

3.5.4 Untersuchung des Einflusses der Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 auf die OPR3-Dimerisierung mit Hilfe des H3H-Systems

Um festzustellen, ob sich eine Interaktion der OPR3 in Hefe durch Koexpression ausgewählter Kinasen aus *A. thaliana* erreichen lässt, wurden weitere Versuche im H3H-System durchgeführt.

Dafür wurde jeweils der ORF der Proteinkinase At3g08720 bzw. At4g18950 aus *A. thaliana*, die als mögliche Kandidaten für die Phosphorylierung von OPR3 ausgewählt worden waren (siehe 3.4), in den Vektor pBridge kloniert (enthält TRP-Gen), der bereits das DNA-Konstrukt für das GAL4BD-*S/OPR3*-Fusionsprotein enthielt (siehe 2.6.9.6). Die Expression des GAL4BD-*S/OPR3*-Fusionsproteins in Hefezellen war zuvor mittels SDS-PAGE (siehe 2.11.5) und Western-Blot-Analyse (siehe 2.11.7) überprüft worden (nicht gezeigt). Der Vektor pBridge wurde zusammen mit dem Vektor pGAD424 (für GAL4AD-*S/OPR3*) in kompetente Hefezellen transformiert. Die Selektion der transformierten Hefezellen erfolgte auf SD-Minimalmedium ohne LEU und TRP. Für die transformierten Hefezellen war ein Nachweis der Kinasen auf Proteinebene mittels SDS-PAGE (siehe 2.11.5) und Western-Blot-Analyse (siehe 2.11.7) nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper gegen die Kinasen zur Verfügung stand. Mittels Sequenzierung (siehe 2.6.10) und Restriktionsanalyse der DNA (siehe 2.6.9.2) konnte aber eindeutig nachgewiesen werden, dass die ORFs der beiden Kinasen vollständig und in richtiger Orientierung (siehe 2.6.9.6) im Vektor pBridge enthalten waren (nicht gezeigt).



Zum Nachweis einer Interaktion der OPR3 im H3H-System wurden die transformierten Hefezellen auf eine Platte mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, 0,008 %) überimpft. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle Hefezellen verwendet, welche die GAL4AD und GAL4BD ohne fusioniertes *S/OPR3* exprimierten (Abb. 3.26). Außerdem wurden zwei Positivkontrollen eingesetzt, und zwar erstens Hefezellen, die das vollständige GAL4-Protein exprimierten, und zweitens Hefezellen verwendet, welche die GAL4AD und GAL4BD in Fusion mit SV-40 T-Antigen und p53 exprimierten, die bekanntermaßen miteinander interagieren können (Clontech, (Abb. 3.26)).

Durch die Koexpression der Kinasen mit den OPR3-Fusionsproteinen konnte jedoch kein Effekt auf die OPR3-Interaktion in Hefe erzielt werden (Abb. 3.26). Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass keine der gewählten Kinasen in der Lage ist, OPR3 zu phosphorylieren. Es könnten allerdings auch oben bereits genannte Gründe dafür verantwortlich sein, dass keine Interaktion zu beobachten war. Möglich wäre auch, dass für die Aktivierung der Kinasen weitere Kinasen oder andere Enzyme nötig sind, über die Hefe nicht verfügt.



Abb. 3.26: Untersuchung des OPR3-Interaktionsverhaltens im H2H-System bzw. H3H-System

Transformierte Hefezellen wurden auf eine Platte mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, 0,008 %) überimpft. Das Reportergen *lacZ* codiert für das Enzym β -Galactosidase, welches X-Gal zu einem blauen Präzipitat umsetzt. Das *lacZ*-Gen steht unter Kontrolle des „Upstream Activation Sequence“-Promotors, der durch den Transkriptionsfaktor GAL4 aktiviert wird. Hefen, die das Reportergen *lacZ* exprimieren färben sich blau. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen verwendet, welche die GAL4AD und GAL4BD ohne Fusionspartner exprimierten. Als erste Positivkontrolle wurden Hefezellen eingesetzt, die das vollständige GAL4-Protein enthielten. Als zweite Positivkontrolle wurden Hefezellen verwendet, welche die GAL4AD und GAL4BD in Fusion mit SV-40 T-Antigen und p53 exprimierten (Clontech). Für den H2H-Versuch wurden Hefezellen getestet, welche die GAL4AD und GAL4BD in Fusion mit *S/OPR3* enthielten. Für den H3H-Versuch wurden Hefezellen untersucht, welche neben GAL4AD-*S/OPR3* und GAL4BD-*S/OPR3* die Proteinkinase At3g08720 bzw. die Proteinkinase At4g18950 aus *A. thaliana* exprimierten.



4 DISKUSSION

Die dynamische Dimerisierung von Proteinen kann als ein wichtiger regulatorischer Mechanismus weitreichende Folgen haben. Beispielsweise kann dadurch wie im Falle verschiedener Zellmembranrezeptoren die Weiterleitung eines Signals erfolgen, eine Erhöhung der Proteinspezifität stattfinden oder die Aktivität reguliert werden (Klemm et al. 1998).

Eine reversible Dimerisierung des Jasmonat-Biosyntheseenzym OPR3 (Breithaupt et al. 2006), die einen schnellen Wechsel zwischen dem aktiven und inaktiven Zustands des Proteins ermöglichen würde, könnte eine regulatorische Rolle bei der Jasmonat-Biosynthese übernehmen. Mithilfe einer Proteinkinase könnte OPR3 phosphoryliert werden und damit in ungestressten Pflanzen als inaktives Dimer vorliegen. Abiotischer oder biotischer Stress wie beispielsweise Herbivorie oder mechanische Verwundung, aber auch spezifische Entwicklungsprozesse der Pflanze könnten die Dephosphorylierung von OPR3 durch eine Phosphatase bewirken, den dimeren und damit inaktiven Zustand aufheben und zur raschen Synthese der Jasmonate führen. Vor Beginn dieser Arbeit gab es einige Hinweise, die für eine reversible Dimerisierung der OPR3 sprachen, welche möglicherweise durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert wird, und die damit diese Arbeitshypothese unterstützten.

Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte für OPR3 aus *S. lycopersicum* gezeigt werden, dass das Protein als Homodimer kristallisiert und dieses Dimer den inaktiven Zustand des Proteins darstellt (Breithaupt et al. 2006). Eine mögliche Regulation der OPR3-Dimerisierung durch Phosphorylierung wird dadurch unterstützt, dass sich im Kristall in unmittelbarer Nähe des Tyrosins 364 ein Sulfat-Ion befindet, welches über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit beiden Protomeren eine Stabilisierung des OPR3-Dimers bewirkt. *In vivo* könnte eine Phosphatgruppe, die stabilisierende Rolle des Sulfats übernehmen (Breithaupt et al. 2006).

Eine posttranslationale Aktivierung von OPR3 könnte erklären, warum innerhalb weniger Minuten nach Verwundung die Konzentration von JA und JA-Ile sowohl lokal als auch systemisch um ein Vielfaches (ca. 25-fach (Chung et al. 2008)) ansteigt (Glauser et al. 2008). Eine posttranslationale Regulation des Oktadekanoidweges auf Ebene der OPR3 würde auch erklären, warum der Grundgehalt an OPDA in unverwundeten Pflanzengewebe recht hoch ist (Stintzi et al. 2001, Stenzel et al. 2003a, Delker et al. 2007), aber nach Verwundung rasch abnimmt, was mit einem rapiden Anstieg der JA und JA-Ile Konzentration einhergeht (Koo et al. 2009).



Zu Beginn dieser Arbeit lagen keinerlei Erkenntnisse über die Fähigkeit der OPR3 zur Dimerisierung *in vivo* und zu einer Veränderung des Dimerisierungszustandes unter verschiedenen Bedingungen (z. B. unverwundete oder verwundete Pflanze) oder während unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Pflanzen vor.

4.1 Dimerisierungsverhalten der OPR3 *in vivo*

Durch zwei Fluorophor-basierende Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (BiFC und FRET) konnte in dieser Arbeit die Dimerisierung von *AtOPR3 in vivo* nachgewiesen werden (siehe 3.1 bzw. 3.2.2.). Mithilfe des split-YFP-Systems wurde die Dimerisierung von *AtOPR3*, sowohl in Zwiebelepidermiszellen als auch in unterschiedlichen Pflanzengewebe von *Arabidopsis* beobachtet (siehe 3.1.2-3.1.4).

Zudem konnte mittels split-YFP-System und FRET-Analyse *in planta* gezeigt werden, dass die Aminosäuren E292 und Y365 (entsprechend E291 und Y364 in *SlOPR3*) für die Dimerisierung von OPR3 entscheidend sind (siehe 3.1.2, 3.1.3 und 3.2.2). Für die Mutanten E292K, Y365F und DMEY ließ sich mit beiden Methoden ein im Vergleich zur wildtypischen OPR3 reduziertes Dimerisierungspotential nachweisen. Im split-YFP-Experiment war dies sowohl in Zwiebelepidermiszellen, als auch in verschiedenen Organen von *Arabidopsis* der Fall.

Damit konnte sowohl die *in vitro* festgestellte Homodimerisierung der *SlOPR3* (Breithaupt et al. 2006) bestätigt, als auch die Beteiligung der Aminosäuren E292 und Y365 bei der OPR3-Interaktion *in vivo* untermauert werden. Breithaupt und Mitarbeiter (2006) berichteten, dass die OPR3-Mutanten E291K und Y364F als Monomer kristallisieren. Zusätzlich wurde für die Mutante E291K durch analytische Ultrazentrifugation ausschließlich die monomere Form nachgewiesen. Damit war die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Dimerisierung *in vitro* belegt. Zudem wurde für die E291K Mutante der *SlOPR3* ein sechsmal schnellerer Substratumsatz als für wildtypische OPR3 gemessen, was darauf schließen lässt, dass die Dimerisierung die Aktivität reduziert (Breithaupt et al. 2006).

Ob die mutierten OPR3-Varianten *in vivo* nicht nur ein im Vergleich zu wildtypischer OPR3 geringeres Dimerisierungspotential aufweisen, sondern auch eine höhere Aktivität im Umsatz von OPDA zeigen, ließe sich durch die Messung der Jasmonat-Konzentration in den entsprechenden transgenen *opr3*-Pflanzen untersuchen. Da die Jasmonsäure nicht notwendigerweise akkumuliert, sondern auch weiter metabolisiert und inaktiviert werden



könnte, ist es sicher ratsam auch den Gehalt der Hydroxyjasmonsäuren, die als inaktive Formen der Jasmonsäure gelten (Miersch et al. 2008), zu untersuchen. Gegenwärtig werden diese Untersuchungen durchgeführt (Mayer, Schaller & Hause).

*At*OPR3 und *Sj*OPR3 sind nahe miteinander verwandt und besitzen sowohl große Ähnlichkeiten in der Primärstruktur als auch in ihrer subzellulären Lokalisation und Substratspezifität (Strassner et al. 2002). Bei einem Vergleich der Proteinsequenzen weisen 84 % aller Aminosäuren eine Ähnlichkeit zueinander auf und 74 % sind sogar identisch (<http://ccr.ceh.uvic.ca/blast/wblast2.html>). Beide Proteine sind peroxisomal lokalisiert (Strassner et al. 2002) und darüber hinaus sind sowohl *At*OPR3 als auch *Sj*OPR3 in der Lage, alle vier Stereoisomere der OPDA zu reduzieren (Schaller et al. 2000, Strassner et al. 2002). Der fingerähnliche L6-Loop, der im Homodimer für die gegenseitige Blockierung des aktiven Zentrums verantwortlich zu sein scheint, konnte bisher nur für die Kristallstruktur von *Sj*OPR3 nachgewiesen werden (Breithaupt et al. 2006), nicht aber für *At*OPR3 (Malone et al. 2005, Han et al. 2011). Jedoch geben die hohe strukturelle und funktionelle Übereinstimmung und die Tatsache, dass die Aminosäuren des L6-Loops zwischen den OPR3 verschiedener Spezies hochkonserviert sind (Breithaupt et al. 2006), sowie die hier *in vivo* nachgewiesene Dimerisierung von *At*OPR3 weitere Hinweise darauf, dass es sich bei der reversiblen Dimerisierung um einen generellen Regulationsmechanismus der OPR3 verschiedener Spezies handelt.

Sowohl die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als auch der Förster-Resonanz-Energie-Transfer sind mittlerweile etablierte Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Durch die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation konnten zahlreiche Protein-Interaktionen in verschiedenen Zelltypen und Organismen gezeigt werden (Kerppola 2006). Die Technik wurde erstmals für das Fluorophor GFP von Ghosh und Mitarbeitern (2000) beschrieben und in *E. coli* erfolgreich durchgeführt. Bereits 2008 waren damit schon mehr als 200 Proteininteraktionen nachgewiesen worden (Ciruela 2008). Heute (Stand Juni 2012) wird auf der Internetseite <http://sitemaker.umich.edu/kerppola.bifc> auf über 500 Experimente verwiesen. Auch die FRET-Methode wurde in den letzten Jahren extensiv genutzt um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Für FRET-Experimente in Pflanzen liegen jedoch nicht so viele erfolgreiche Belege vor (Bhat et al. 2006) wie für BiFC-Experimente.



Da beide Methoden generelle Unterschiede aufweisen, die zu verschiedenen Ergebnissen bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen führen können, ist es stets sinnvoll beide Techniken anzuwenden (Bhat et al. 2006).

FRET erlaubt eine Detektion der Protein-Interaktion ohne Verzögerung, wohingegen es bei der BiFC-Methode zu einer Verzögerung kommt, da chemische Reaktionen für die Rekonstitution des Fluorophors nötig sind. Die BiFC-Methode ermöglicht die Detektion einer Interaktion bei geringen Proteinkonzentrationen. Eine Interaktion ist wahrzunehmen, wenn ein geringer Anteil der Fusionsproteine assoziiert. Dagegen muss für ein FRET-Signal ein großer Anteil der Fluorophore miteinander interagieren. Für FRET müssen die Fluorophore in enger räumlicher Nähe zueinander stehen, während für die BiFC die Fragmente der Fluoreszenzproteine die dynamische Flexibilität besitzen müssen, im Proteinkomplex assoziieren zu können (Kerppola 2006). Split-FP (Fluoreszenzprotein)-Fragmente können auch spontan assoziieren, unabhängig davon, ob die Fusionsproteine miteinander interagieren oder nicht (Kerppola 2006, Ciruela 2008). Diese spontan auftretende Interaktion ist die Hauptquelle für Hintergrundsignale und hängt vom Expressionsspiegel der Fusionsproteine und von deren Eigenschaften ab. FRET ist dagegen weitgehend unabhängig vom Expressionsspiegel der Fusionsproteine (Kerppola 2006). DFRAP („Donor Fluorescence Recovery After Photobleaching“) ist eine verbesserte Technologie, um FRET zu dokumentieren und wenig anfällig gegenüber Artefakten, die durch unterschiedliche Expressionsspiegel der Fusionsproteine entstehen können (Bhat et al. 2006). Da bei DFRAP derselbe Zellausschnitt vor und nach dem „photobleaching“ vermessen wird, kann die Mobilität der Fusionsproteine, bzw. der sie beherbergenden Organellen, ein Problem bei dieser Methode darstellen (Bhat et al. 2006). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Gewebe mit CCCP behandelt (Hollenbeck et al. 1985), um die Bewegung der Peroxisomen und damit der exprimierten (in Peroxisomen lokalisierten) Fusionsproteine zu verhindern.

Eine weitere Eigenschaft des split-FP-Systems, die sowohl als Vorteil als auch als Nachteil gesehen werden kann, ist dessen Irreversibilität: ein einmal rekonstituiertes FP-Molekül wird nicht wieder dissoziieren (Magliery et al. 2005). Dadurch wird das System wenig durch zelluläre Bedingungen beeinflusst, welche die Fluoreszenzintensität und die Lebenszeit der Proteine verändern können (Kerppola 2006). Hingegen können mit FRET auch dynamische Veränderungen bei Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* beobachtet werden (Bhat et al. 2006).



4.1.1 Dynamik der OPR3-Interaktion

Hinweise auf eine dynamische Veränderung der OPR3-Dimerisierung und die Möglichkeit, dass die Aktivität der OPR3 tatsächlich durch ein Monomer/Dimer Gleichgewicht gesteuert werden könnte, wurden in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Weisen erhalten.

In Antherenfilamenten konnten Unterschiede im Dimerisierungszustand der OPR3 während verschiedener Stadien der Blütenentwicklung mit Hilfe der BiFC-Methode nachgewiesen werden. In den frühen Stadien 11 und 12 wurde für OPR3 ein geringerer Dimerisierungsgrad festgestellt, als in den späteren Stadien 13 und 14 (Abb. 3.5 und 3.6).

Jasmonsäure wird im Stadium 12 für die Elongation der Antherenfilamente benötigt, wie durch die Komplementation des männlich sterilen Phänotyps von *opr3*-Pflanzen mittels MeJA-Applikation gezeigt werden konnte (Stintzi et al. 2000, Abb. 1.2). Das setzt die Bildung von JA und damit die Aktivität der OPR3 in diesem Stadium und womöglich auch schon in den Stadien zuvor voraus. Der Arbeitshypothese nach müsste OPR3 in diesen Stadien als Monomer vorliegen, wie es hier auch tatsächlich der Fall war (Abb. 3.5 und 3.6). Desweiteren ist anzunehmen, dass OPR3 in den späteren Stadien nicht mehr benötigt wird, wie es die Wirkungslosigkeit der MeJA-Applikation in späteren Stadien als Stadium 12 nahe legt (Stintzi et al. 2000). Übereinstimmend mit einer zu diesem Zeitpunkt inaktiven OPR3 wurde in den Stadien 13 und 14 die Dimerisierung der OPR3 beobachtet (Abb. 3.5 und 3.6). Eine OPR3-phosphorylierende Kinase, die nur in den späteren Stadien der Blütenentwicklung in den Antherenfilamenten exprimiert wird und die Dimerisierung erst in den späteren Stadien erlaubt, könnte dies erklären. Die Daten legen nahe, dass die Regulation der OPR3-Aktivität über die Dimerisierung auch in Entwicklungsprozessen wie im Falle der Blütenentwicklung eine Rolle spielt.

Neben der Regulation der OPR3-Aktivität im Rahmen der Blütenentwicklung war die vermutete schnelle Aktivierung der OPR3-Aktivität nach Verwundung von besonderem Interesse. Da der Arbeitshypothese zu Folge OPR3 in der gesunden Pflanze als inaktives Dimer vorliegt, welches nach Verwundung zerfällt, war das split-YFP-System nicht zur Untersuchung dieses Phänomens geeignet. Die irreversible Assoziation der beiden Hälften des YFP würde es unmöglich machen, die Dissoziation des OPR3-Dimers zu beobachten. Aus diesem Grund wurde für diese Fragestellung DFRAP eingesetzt. Wegen der Lokalisation der OPR3 in den Leitbündeln, und der starken Pigmentierung in Blättern, waren diese Organe der



DFRAP-Analyse leider nicht zugänglich. Daher wurde die Dynamik der OPR3-Dimerisierung nach Verwundung mittels DFRAP in Wurzeln analysiert.

Das OPR3-Dimer ließ sich durch DFRAP in den Leitbündeln wie auch im gesamten Bereich der Wurzelspitze nachweisen, aber nicht im Cortex der Differenzierungszone der Wurzeln. Eine Abnahme der Dimerisierung war in den Leitbündeln der Wurzeln von *Arabidopsis*-Keimlingen 15 min nach Verwundung zu beobachten (Abb. 3.11). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass Verwundung zur Monomerisierung und damit Aktivierung der OPR3 führt.

4.1.2 Rolle der gewebespezifischen Lokalisation der OPR3

Verschiedene Resultate dieser und früherer Arbeiten Anderer unterstützen die Vermutung, dass OPR3 hauptsächlich in den Leitbündeln der Pflanze lokalisiert sein könnte, hier deren Regulation erfolgt und die Synthese der Jasmonsäure ebenfalls in den Leitbündeln stattfindet. Eine Dynamik von OPR3 konnte mittels FRET-Analyse nur in den Leitbündeln von Wurzeln transgener *opr3*-Keimlinge gezeigt werden, welche die Fusionsproteine OPR3-YFP-SRL und OPR3-CFP-SRL exprimierten (Abb. 3.11). Nach Verwundung konnte für die Promotor-GUS-Linien *AOS:GUS*, *OPR3:GUS-GFP* und *VSP2:GUS* eine erhöhte GUS-Aktivität in den Blattadern beobachtet werden (Abb. 3.11). Wurzeln sieben Tage alter transgener Keimlinge, welche das Konstrukt *OPR3:GUS-GFP* enthielten, zeigten unter dem Laser-Scanning-Mikroskop eine starke GFP-Expression in Leitbündeln (Abb. 3.11).

Zudem wies wildtypische OPR3 in den Leitbündeln vier bis sechs Wochen alter Pflanzenblätter ein deutlich höheres Dimerisierungspotential auf als in Kotyledonen (Alter: eine Woche), von welchen das gesamte Gewebe analysiert wurde (Abb. 3.4).

In der Literatur gibt es direkte Hinweise dafür, dass Jasmonsäure in den Leitbündeln der Pflanzen gebildet wird (Hause et al. 2000, Hause et al. 2003a, b, Stenzel et al. 2003b). Für die Biosynthesenzyme LOX, AOS und AOC der Tomate konnte die Lokalisation in Leitbündeln – genauer in den Siebelementen des Phloems – mittels immunohistochemischen Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Enzyme gezeigt werden (Hause et al. 2003b). Außerdem ist nach Verwundung in den Blättern von Tomate eine deutlich höhere Konzentrationen an OPDA und JA in den Blattadern (2,2 nmol/g FW), als in der Lamina (1,0 nmol/g) zu messen. Zudem liegt der Gehalt an (+)-7-*iso*-JA mit 70 % von allen Jasmonaten in den Hauptadern von verwundeten Blattgewebe (Wt) deutlich über der Konzentration der Blattlamina mit nur 15 % (Stenzel et al. 2003b).

Unterstützend kommt hinzu, dass in der Datenbank <http://efp.ucr.edu> für *Arabidopsis*-Keimlinge eine erhöhte Konzentration der OPR3 mRNA in Leitbündeln der Wurzeln und im Phloem des Sprosses angegeben wird (Abb. 4.1).

Auch für eines an der β -Oxidation des Oktadekanoidweges beteiligten Enzyme, die 3-Keto-Acyl-CoA-Thiolase 1 (At1g04710), die wie OPR3 im Peroxisom lokalisiert ist, zeigt die Datenbank eine deutliche erhöhte mRNA-Konzentration in den Leitbündeln der Wurzeln und im Phloem des Sprosses (nicht gezeigt).

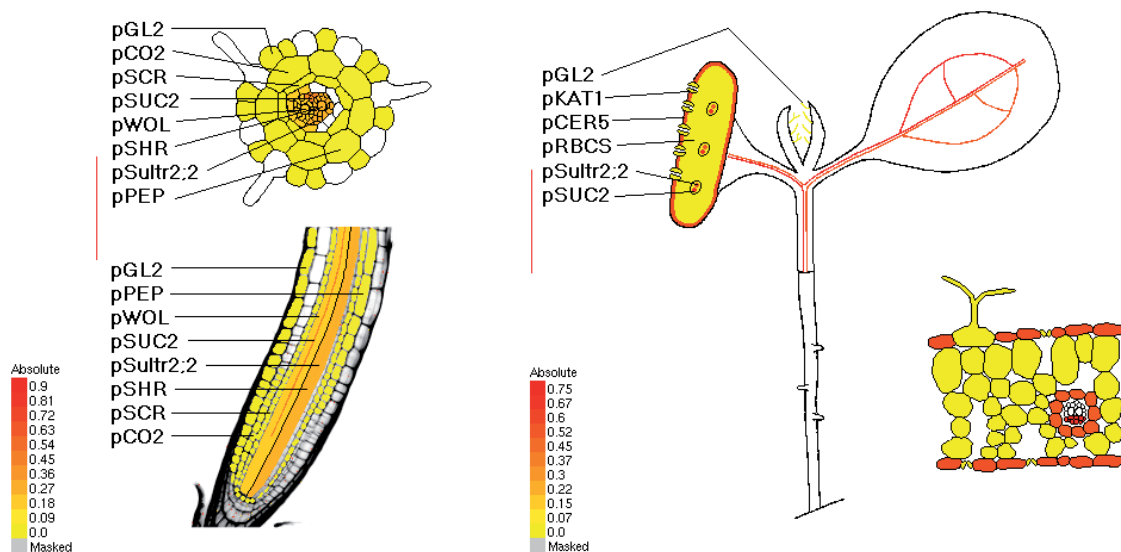


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der OPR3 mRNA-Expression in Wurzel und Spross von *A. thaliana*-Keimlingen (<http://efp.ucr.edu>)

13 verschiedene Promotor:FLAG-RPL18 Linien wurden für die Immunopräzipitation von mRNA-Ribosom Komplexen (Translatome) in *A. thaliana* (Col-0) generiert (zellspezifische Aktivität der Promotoren siehe http://efp.ucr.edu/efp_Translatomes-brief.pdf).

Links sind die relativen mRNA-Daten für die Zellen der Wurzel, rechts die relativen mRNA-Daten für den Spross dargestellt. Eine erhöhte Konzentration translatierbarer OPR3 mRNA weisen in Wurzeln die Zellen des Leitgewebes (pWOL, pSHR) und die Geleitzellen des Phloems (pSUC2 und pSultr2;2), und im Spross die Bündelscheidenzellen und Geleitzellen des Phloems (pSUC2 und pSultr2;2) sowie die Epidermis (pCER5) auf.

Vieles spricht dafür, dass OPR3 vornehmlich in den Leitbündeln lokalisiert ist und daher auch in diesem Gewebe deren Regulation erfolgen muss. Immunohistochemische Analysen mit einem OPR3 spezifischen Antikörper wären eine Möglichkeit, die Lokalisation des OPR3-Proteins in Leitbündeln direkt zu bestätigen und den Zelltyp der Lokalisation (Siebelement oder Geleitzellen etc.) zu spezifizieren.

Vorausgesetzt, die gewebspezifische Lokalisation von OPR3 ist tatsächlich in den Leitbündeln, ließe sich die dort auftretende verstärkte Homodimerisierung folgendermaßen



erklären: Ebenfalls nur in Leitbündeln ist ein Protein (oder möglicherweise auch mehrere) vorhanden, wie beispielweise eine Proteinkinase, welches OPR3 modifiziert und die Dimerisierung ermöglicht. Diese Annahme könnte ein anderes Phänomen ebenfalls erklären, welches in dieser Arbeit in Wurzeln während der FRET-Analysen beobachtet werden konnte. Wurzeln, die die Fusionsproteine OPR3-YFP-SRL und OPR3-CFP-SRL unter dem konstitutiven CaMV 35S Promotor exprimierten, zeigten nur im Zentralzylinder FRET. Im Cortex der Wurzeln war kein FRET zu beobachten, obwohl hier ebenfalls beide Fusionsproteine vorhanden waren (siehe 3.2.3). Eine allein in Leitbündeln vorkommende – für die OPR3-Phosphorylierung verantwortliche Kinase bzw. Phosphatase – könnte die Erklärung dafür liefern, warum eine OPR3-Dimerisierung bzw. -Monomerisierung nur in den Leitbündeln der Wurzeln auftritt.

In Wurzelspitzen war FRET dagegen durchgehend in allen Zellen zu beobachten. Möglicherweise sind OPR3 und eine potentielle Kinase/Phosphatase hier gemeinsam vorhanden.

4.2 Regulation der OPR3-Dimerisierung durch posttranslationale Protein-Modifizierung

4.2.1 OPR3-Dimerisierung durch eine Proteinkinase vermittelte Phosphorylierung

In pflanzlichen Systemen konnte eine Dimerisierung der OPR3 nachgewiesen werden. In Hefen war dies jedoch mit Hilfe des H2H- bzw. H3H-Systems nicht möglich (siehe 3.5). Dieses negative Ergebnis steht in Einklang mit der Annahme, dass weitere Faktoren für die OPR3-Dimerisierung erforderlich sind, möglicherweise die posttranslationale Modifikation in Form einer Tyr-Phosphorylierung.

Proteinphosphorylierung bzw. -dephosphorylierung ist ein weit verbreiteter Mechanismus, um die Aktivität von Enzymen zu steuern. Von tierischen Zellen ist bekannt, dass die Tyr-Phosphorylierung eine bedeutende Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse spielt, wohingegen in Pflanzen die Bedeutung der Tyr-Phosphorylierung für die Regulation gerade erst klar zu werden beginnt (Ghelis 2011).

Aufgrund fehlender posttranslatiionaler Proteinmodifikationen in Hefen, besonders wenn Protein-Interaktionen höherer Eukaryoten untersucht werden, kommt es in diesem System oft zu falsch-negativen Ergebnissen (Brückner et al. 2009). Darüber hinaus sind gerade Tyr-Phosphorylierungen in Hefen äußerst selten. In einer Phosphoproteomanalyse mittels



Massenspektrometrie in Hefen wird angegeben, dass von den 1.252 entdeckten Phosphorylierungen in 629 Proteinen nur 0,027 % an Tyrosin auftreten (Chi et al. 2007).

Eine Erweiterung des H2H-Systems wurde entwickelt: das „Hefe-Tribrid-System“. Damit sollte der Problematik entgegengewirkt werden, dass mittels des klassischen H2H-Systems normalerweise keine Protein-Interaktionen nachgewiesen werden können, die von posttranslationalen Modifikationen abhängig sind. Durch Expression einer dritten Komponente, wie beispielsweise einer Tyrosin-Proteinkinase, kann eine phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Interaktion detektiert werden (Osborne et al. 1995).

Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit versucht, durch das Einbringen der ausgewählten Proteinkinasen At3g08720 oder At4g18950 in das H2H-System eine Interaktion von OPR3 zu erzielen. Dies führte allerdings zu keinem Erfolg. Dieser Befund allein erlaubt es aber nicht die beiden Kinasen als mögliche OPR3-Kinasen auszuschließen, denn es wäre gut möglich, dass eine Kinase, die OPR3 phosphoryliert, erst durch eine andere Kinase aktiviert werden muss.

Proteinkinasen sind typischerweise in Signalkaskaden organisiert, in welcher eine Kinase die nächste durch Phosphorylierung aktiviert (Colcombet & Hirt 2008). Es wird angenommen, dass über 30 % aller Proteine in einer eukaryotischen Zelle phosphoryliert sind (Colcombet & Hirt 2008) und über 5 % des Genoms von Pflanzen für Proteinkinasen codieren (The Arabidopsis Genome Initiative 2000, Genome International Rice Sequencing 2005). Ungefähr 10 % aller Pflanzenkinasen sind in MAP Kinase Signalkaskaden involviert (Colcombet & Hirt 2008). Diese sind in Pflanzen an der Regulation des Wachstums, der Entwicklung, des programmierten Zelltodes und in der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen wie Trockenheit, UV-Strahlung, Kälte, Hitze, Pathogenbefall und Verwundung beteiligt (Zhang & Klessig 2001, Colcombet & Hirt 2008). MAP Kinase Signalkaskaden ermöglichen, dass Zellen extrazelluläre Reize in intrazelluläre Antworten übertragen können. Sie bestehen aus mindestens drei Kinasen, einer MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), einer MAP Kinase Kinase (MAPKK) und einer MAP Kinase (MAPK). MAPKs sind Serin/Threonin Kinasen, welche eine Vielzahl an Substraten phosphorylieren können, darunter auch andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren (Colcombet & Hirt 2008). Das *Arabidopsis*-Genom enthält zahlreiche Gene, welche für Kinasen des MAPK Signalwegs codieren: 20 MAPKs, 10 MAPKKs und mehr als 60 MAPKKKs (MAPK Group 2002).



Eine der hier untersuchten Kinasen, At4g18950, wird unter den potentiellen MAPKKKs aufgeführt (MAPK Group 2002). Über diese Kinase ist zudem bekannt, dass sie zu den dualspezifischen STY Kinasen (STY12) gehört, die besonders in den frühen Stadien der Blütenentwicklung, in ausgewachsenen Blättern, unter bestimmten Stressbedingungen, wie beispielsweise Kälte und unter SA-Einfluss exprimiert wird (Rudrabhatla et al. 2006).

Die zweite hier untersuchte potentiell OPR3-phosphorylierende Proteinkinase At3g08720 – auch bekannt als ATS6K2 oder ATPK19 – ist ein Homolog ribosomaler S6 Kinasen. At3g08720 wird durch Kälte und hohe Salzkonzentrationen induziert (Mizoguchi et al. 1995) und ist in der Lage, ribosomale S6 Proteine von Pflanzen, welche an der Regulation der Translation beteiligt sind, zu phosphorylieren (Turck et al. 1998).

Die genaue biologische Funktion ist für beide Kinasen noch nicht geklärt. Falls die beiden Proteinkinasen in andere Prozesse involviert sein sollten, schließt dies nicht aus, dass sie eine OPR3-regulierende Funktion übernehmen könnten, da Proteinkinasen in vielen Fällen multifunktionell sind und verschiedene Proteine phosphorylieren (Cohen 2002).

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen hilft zelluläre Prozesse zu verstehen und die Rolle einzelner Proteine in dem komplexen Protein-Netzwerk der Zelle aufzuklären (Keskin et al. 2008). In einer kürzlich veröffentlichten Studie sind für *A. thaliana* mehr als 10.000 Protein-Protein-Interaktionen gelistet, welche durch H2H-Analysen und mit Hilfe von Informationen zu Protein-Interaktionen aus verschiedenen Datenbanken (IntAct, TAIR und Biogrid, Stand April 2010) zusammengestellt wurden (Consortium, Arabidopsis Interactome Mapping 2011). Für At3g08720 können dabei keinerlei Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Dagegen sind für At4g18950 Interaktionen mit sieben verschiedenen Proteinen gelistet (At1g66410, At2g41090, At2g41100, At3g43810, At3g51920, At4g14640, At5g21274). Allerdings bestehen diese Angaben nur aufgrund der Datenbankanalysen und werden durch die H2H-Analysen der Studie nicht verifiziert (Consortium 2011). Auffällig ist, dass für sechs der gelisteten, mit At4g18950 interagierenden Proteine, eine Calmodulin oder Calmodulin-ähnliche Funktion angegeben wird (<http://www.arabidopsis.org>, TAIR). Für diese Proteinfamilie ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Pflanzenentwicklung und bei Stressantworten einnimmt. Calcium-Signale werden durch sie weitergeleitet und führen zu Proteinphosphorylierungen, metabolischen Veränderungen und Transkriptionsantworten (Perochon et al. 2011). Damit wird für At4g18950 ein weiteres Indiz



für eine Beteiligung an der Regulation von Entwicklungsprozessen und Stressantworten geliefert. Ob eine direkte Verbindung des Proteins mit dem JA-Signalweg besteht, bleibt jedoch weiterhin offen.

Für keine der beiden hier untersuchten Kinasen wird in der Studie eine Protein-Protein-Interaktion mit OPR3 aufgezeigt. Dafür wird für OPR3 eine Interaktion mit At3g46090 (Datenbanken: IntAct, TAIR und Biogrid, Stand April 2010), At1g13030 (H2H-Screen) und At4g21160 (H2H-Screen) angegeben (Consortium 2011). At3g46090 (ZAT7) besitzt eine Transkriptionsfaktoraktivität, für At1g13030 gibt es keine genauen Angaben (sphere organelles protein-related) und At4g21160 (ZAC) ist ein ARF (ADP-Ribosylation Factor) GTPase aktivierendes Protein (<http://www.arabidopsis.org>, TAIR). ARF GTPasen spielen in Pflanzen bekanntermaßen eine Rolle bei der Regulation des Vesikeltransportes (Nielsen et al. 2008). Dass die in der Studie angegebenen, mit OPR3-interagierenden Proteine, an der Regulation von OPR3 beteiligt sein könnten, bleibt aufgrund ihrer bisher bekannten biologischen und molekularen Funktion fragwürdig.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation einer potentiellen OPR3-regulierenden Proteinkinase

Es wäre durchaus möglich, dass eine OPR3-regulierende Kinase im Cytosol lokalisiert ist, die Dimerisierung der OPR3 im Cytosol stattfindet und OPR3 als Dimer ins Peroxisom importiert wird.

Allerdings konnte hier ein Import des OPR3-Dimers mit Hilfe des „Huckepack“-Experimentes in Zwiebelepidermiszellen und *A. thaliana* nicht gezeigt werden (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Modifikation von OPR3, die zur Dimerisierung führt, im Cytosol stattfindet. Mit dem split-YFP-System konnte nachgewiesen werden, dass eine OPR3-Dimerisierung im Cytosol durchaus möglich ist (siehe 3.3.4).

Die genauen Mechanismen, die zum Import peroxisomaler Matrixproteine führen, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Neue Erkenntnisse zeigen, dass bei der Translokation der Matrixproteine eine große transiente Pore in der Membran der Peroxisomen gebildet wird, die es erlaubt, dass auch große Proteinkomplexe durch die Lipiddoppelschicht gelangen können (Erdmann & Schliebs 2005, Meinecke et al. 2010).

Peroxisomen können gefaltete und sogar oligomerisierte Proteine aufnehmen, ohne dass die Interaktion der Proteinuntereinheiten aufgelöst wird (Erdmann & Schliebs 2005).



Die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *S. cerevisiae* wird als Dimer in Peroxisomen importiert. Eine verkürzte Form der Thiolase, von welcher das PTS2-Motiv entfernt wurde, gelangt durch Heterodimerisierung mit einer unveränderten Thiolase in Peroxisomen (Glover et al. 1994). Auch für die Homotrimer bildende bakterielle Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) konnten in *S. cerevisiae* und der Säugetierzelllinie CV-1 erfolgreiche „Huckepack“-Experimente durchgeführt werden. Protomere der CAT sind in der Lage aus dem Cytosol in Peroxisomen zu gelangen, indem sie mit CAT Untereinheiten oligomerisieren, die ein zusätzliches PTS1-Motiv tragen (McNew & Goodman 1994). In höheren Pflanzen wurde gezeigt, dass die Glyoxysomen von Zellen einer Tabakkultur befähigt sind, eine verkürzte Form der Isocitrat-Lyase, von welcher das PTS1-Motiv entfernt wurde, aufzunehmen, sofern gleichzeitig in den Zellen wildtypische Isocitrat-Lyase exprimiert wird (Lee et al. 1997).

Zunächst wurde jedoch bei der ersten Suche nach einer geeigneten Proteinkinase für die OPR3-Phosphorylierung davon ausgegangen, dass diese wie OPR3 im Peroxisom lokalisiert ist. Dabei wurden die zwei potentielle Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 ausgewählt.

Für die beiden Kandidaten At3g08720 und At4g18950 wurde die Lokalisation, durch Fusion mit YFP und transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen überprüft. Es stellte sich heraus, dass At3g08720 peroxisomal und At4g18950 cytosolisch lokalisiert waren (Abb. 3.20). Obwohl die Proteinkinase At4g18950 eine PTS1-Signalsequenz besitzt (SHL) und in der Datenbank AraPerox (Reumann et al. 2004) eine peroxisomale Lokalisation vorhergesagt wird, konnte sowohl hier als auch von einer anderen Arbeitsgruppe (Ma 2005) gezeigt werden, dass das Protein in Zwiebelepidermiszellen im Cytosol lokalisiert ist.

Durch das Miteinbeziehen cytosolisch lokalisierter Kinasen in die Suche nach einer OPR3-regulierenden Kinase, würden sich weitere potentielle Kandidaten eröffnen. Bei einer Datensatzsuche mit dem BAR Expression Angler (Botany Array Resource dataset) erhält man insgesamt 109 Kinasen, die mit OPR3 koreguliert sind und einen r-Wert zwischen 0,85-0,95 aufweisen. Eine vor kurzem veröffentlichte Proteomanalyse für *A. thaliana* listet 1071 cytosolisch lokalisierte Proteine auf (Ito et al. 2011). Von den 109 mit OPR3-koregulierten Kinasen sind dieser Proteomanalyse zufolge sechs cytosolisch lokalisiert, darunter auch die Kinase At4g18950. Drei der Proteine enthalten eine spezifische Tyrosin-Kinase-Domäne (siehe Tab. 4.1).



Locus	Koregulation (r-Wert)	Tyr-Kinase-Domäne	Name/Beschreibung in TAIR
At1g01560	r = 0.929	IPR020635	MAP kinase 11
At4g09570	r = 0.913	-	ATCPK4_CPK4__calcium-dependent protein kinase 4
At2g46500	r = 0.910	-	ATPI4K GAMMA 4_P14K GAMMA 4_UBDK GAMMA 4__phosphoinositide 4-kinase gamma
At4g18950	r = 0.893	IPR001245	Integrin-linked protein kinase family
At1g22870	r = 0.881	IPR020635	Protein kinase family protein with ARM repeat domain
At5g56350	r = 0.869	-	Pyruvate kinase family protein

Tab. 4.1: Cytosolisch lokalisierte Kandidaten für die OPR3-Phosphorylierung

Durch eine Datensatzanalyse mittels des BAR Expression Angler (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi) und einer Proteomanalyse für cytosolisch lokalisierte Proteine (Ito et al. 2011) können sechs mögliche Kandidaten für die OPR3-Phosphorylierung identifiziert werden. Die Koregulation mit OPR3 wird über den r-Wert („Pearson Correlation Coefficient“) und eine mögliche Tyrosin-Spezifität über die Motive IPR001245 und IPR020635 angegeben.

4.2.3 Ausschlusskriterien für die untersuchten Proteinkinasen At3g08720 und At4g18950 von der Kandidatenliste OPR3-regulierender Kinasen

Dass die Suche nach einem OPR3 modifizierenden Protein noch ausgeweitet werden muss, ist wahrscheinlich, da vieles dafür spricht, dass die hier untersuchten Kinasen At3g08720 und At4g18950 von der Liste der geeigneten Kandidaten ausgeschlossen werden können:

Im H3H-System konnte durch die Koexpression der Kinasen keine OPR3-Interaktion erzielt werden (siehe 3.5.4). Zudem konnte *in vitro* für keine der beiden Kinasen eine Phosphorylierung von OPR3 nachgewiesen werden (Diplomarbeit, Kocsis 2011). Experimente mit *Arabidopsis*-T-DNA Insertionslinien für beide Kinasegene lieferten keine eindeutigen Hinweise darauf, dass eine der beiden Kinasen an der Regulation von OPR3 beteiligt ist (siehe 3.4.3 und 3.4.4). „Loss-of-function“-Mutanten sollten durch einen verwundungsunabhängigen hohen JA-Gehalt auffallen, welcher in einer erhöhten Expression Jasmonat-abhängiger Gene resultieren sollte. Mittels semiquantitativer PCR konnten für OPR3 und die Jasmonat-induzierten Gene *PDF1.2* und *VSP2* keine erhöhten Transkriptlevel im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen nachgewiesen werden (siehe 3.4.3). Hingegen war eine leichte Verminderung der Transkriptlevel für *PDF1.2* und *VSP2* zu beobachten. Es wäre denkbar, dass die T-DNA Insertionslinien für die beiden Kinasen eine hohe JA-Konzentration aufweisen, jedoch aufgrund negativer Rückkopplung, beispielsweise durch die Expression der JAZ-Proteine (Chini et al. 2007) keine erhöhte Expression anderer JA-abhängiger Gene



zeigen. Die Messung des Jasmonsäure-Gehaltes in den „loss-of-function“-Mutanten könnte möglicherweise Klarheit verschaffen.

In einer vergleichenden Transkriptomanalyse der „loss-of-function“-Mutante der At4g18950 konnte keine erhöhte Expression der *JAZ*-Gene festgestellt werden. Auch andere JA-abhängige Gene wurden nicht verstärkt exprimiert. Vielmehr trat für fast alle im Mikroarray erfassten Gene in der „loss-of-function“-Mutante eine verminderte Expression ein.

In der Diplomarbeit von Peter Kocsis (2011) wird aufgrund der erhöhten Expression der At4g18950 Kinase nach Salicylsäure (SA)-Behandlung (Rudrabhatla et al. 2006) und einer guten Koregulation mit dem SA-abhängigen *NPR1* Gen eine Beteiligung der Kinase an SA-vermittelten Prozessen vorgeschlagen. SA spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr biotropher Pathogene und ist ein Antagonist der JA (Thaler et al. 2012). Hinzu kommt, dass SA das Herunterregulieren der JA-abhängigen Markergene *PDF1.2* und *VSP2* bewirkt (Leon-Reyes et al. 2010). Im Mikroarray Experiment mit der „loss-of-function“-Mutante At4g18950 sind jedoch laut der Datenbank <http://www.arabidopsis.org> („get all GO Annotations“) nur drei der differentiell exprimierten Gene *At3g28910*, *At1g08810* und *At2g46830*, (codierend für MYB30, MYB60 bzw. CCA1) in den SA-Signalweg involviert.

Es wäre auch denkbar, dass die At4g18950 Kinase an anderen entwicklungsphysiologischen Prozessen beteiligt ist. Bei einer Genexpressionanalyse wurden Stamina von *opr3*-Pflanzen (*Arabidopsis*) nach JA-Behandlung untersucht. Dabei wurden 13 Transkriptionsfaktoren identifiziert, darunter auch Transkriptionsfaktoren der MYB-Familie, welche an der Reifung der Stamina beteiligt sind (Mandaokar et al. 2006). Zwar befinden MYB30 und MYB60 sich nicht unter den in der Studie identifizierten Transkriptionsfaktoren, aber die differentielle Regulation der beiden *Myb*-Gene in der Microarray Analyse dieser Arbeit könnte auf eine Beteiligung von At4g18950 in der Staminaentwicklung hinweisen.

Weitere Studien müssen zeigen, ob und welche Rolle die Kinasen At4g18950 und At3g08720 im JA- und/oder SA-Signalweg spielen.

4.3 Alternative Modifikationen und Mechanismen zur Regulation der OPR3-Interaktion

Es gibt einige Anzeichen dafür, dass das OPR3 Monomer/Dimer Gleichgewicht durch Phosphorylierung reguliert wird. Abgesehen von den Ergebnissen von Breithaupt und Mitarbeitern (2006) und den in dieser Arbeit gelieferten Hinweisen (vermindertes Dimerisierungspotential der Y365F-Mutanten) konnte gezeigt werden, dass OPR3 aus



Proteinextrakten von *A. thaliana* und *S. lycopersicum* nach einer Auftrennung über 2D Gelelektrophorese und Detektion mittels anti-OPR3-Antikörper in einem Muster aus meist fünf verschiedenen „Spots“ resultiert, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden (Mayer & Schaller, unveröffentlicht). Dies deutet stark darauf hin, dass OPR3 *in planta* in verschiedenen Modifikationen vorliegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach einer Phosphatase-Behandlung der Proteinextrakte sich dieses Spotmuster verändert. Eine Phosphorylierung konnte bisher jedoch massenspektrometrisch weder am Y364 bzw. Y365 noch an einer anderen Position in OPR3 nachgewiesen werden (Mayer & Schaller, unveröffentlicht).

Denkbar wäre, dass sich die Phosphorylierung nicht an Position Y364 befindet, sondern an einem der Arginine R343 oder R366 (Tomate), da diese ebenfalls in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des stabilisierenden Sulfat-Ions eingebunden sind (Abb. 1.4, B). Berichte über Arginin-Phosphorylierungen sind zwar selten und betreffen meist die Phosphorylierung von Histonen (Cieśła et al. 2011), können aber bei Proteinen wie beispielsweise MBP (myelin basic protein) durchaus auftreten (Smith et al. 1976). Phosphorarginine und andere Phosphoramidate sind säureempfindlich und werden aus diesem Grund bei konventionellen Analysen zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen generell übersehen (Cieśła et al. 2011). Dies könnte der Grund dafür sein, warum bisher kein Nachweis über eine Phosphorylierung von OPR3 erfolgen konnte.

Zielgerichtete Mutagenese der Arginine und die Analyse des Dimerisierungspotentials der erstellten OPR3-Mutanten mit Hilfe des split-YFP-Systems könnten Aufschluss über deren Rolle bei der Interaktion liefern und werden gegenwärtig durchgeführt (Hoffmann & Schaller).

Ebenso wäre möglich, dass die OPR3-Dimerisierung nicht über eine Phosphorylierung, sondern durch eine andere posttranslationale Modifikation wie beispielsweise Glykosylierung reguliert wird. Die Glykosylierung von Proteinen gehört neben der Phosphorylierung zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen (Huber & Hardin 2004). O-GlcNAc Transferasen (OGT) katalysieren die O-glykosidische Verbindung eines einfachen Monosaccharids N-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf ein Serin- oder Threoninrest. O-GlcNAc-Glykosylierungen sind vergleichbar mit Proteinphosphorylierungen. Beide sind reversibel, können aufgrund eines zellulären Signals entfernt oder hinzugefügt werden und verändern die Funktion und/oder das Interaktionsverhalten eines Proteins (Slawson et al. 2006).



Direkte Indizien für eine mögliche Glykosylierung der OPR3 wurden von einer anderen Arbeitsgruppe geliefert, die in einem H2H-Screen gezeigt hat, dass die OGT Spindly mit OPR3 interagiert (Olszewski et al., unveröffentlicht).

4.4 Ausblick

Um dynamische Veränderungen im Dimerisierungszustand von OPR3 – insbesondere nach Verwundung – weiterführend zu untersuchen, könnte die Co-Immunopräzipitation eingesetzt werden. Die Co-Immunopräzipitation ist ebenfalls eine weit verbreitete Methode mit deren Hilfe Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden können (Geva & Sharan 2011).

Mittels zweier unterschiedlich markierter OPR3-Fusionsproteine (z. B. 3x3-Mye Tag und YFP), die beide in Pflanzen exprimiert werden, wäre es möglich die Dimerisierung bzw. Monomerisierung nach Verwundung von transgenen *opr3*-Pflanzen zu untersuchen. Eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers, der nicht für die Aufreinigung eingesetzt wurde, sollte Aufschluss darüber geben, ob nach Verwundung eine geringere Konzentration an dimerisierten Protein als vorher, vorhanden ist. Gegenwärtig werden im Rahmen einer Masterarbeit erste Versuche dazu durchgeführt (Darimont & Stintzi).

Bei der weiteren Suche zur Identifizierung einer OPR3-phosphorylierenden Kinase könnten unterstützend zu Datenbankanalysen nachfolgend beschriebene Methoden eingesetzt werden: Denkbar wäre, erneut mit Hilfe des H3H-Systems, zu versuchen, die Kinase zu identifizieren – dieses Mal aber eine cDNA Bank aus *A. thaliana* oder *S. lycopersicum* zu verwenden (der H2H-Versuch wurde mit *S/OPR3* durchgeführt). Dazu müsste zusätzlich zu den Fusionsproteinen aus OPR3 und der GAL4-AD bzw. GAL4-BD diese cDNA Bank in Hefen eingebracht werden. Durch die Expression des Reportgens sollte die Anwesenheit eines Proteins angezeigt werden (z. B. Blaufärbung der Hefen auf Platten mit X-Gal), welche zur Dimerisierung von OPR3 führt. Durch Isolierung und Analyse der entsprechenden cDNA könnte das Protein identifiziert werden. Allerdings könnte sich der Screen in Hefen auch als schwierig erweisen, falls die OPR3-Modifizierung tatsächlich über eine Phosphorylierungskaskade reguliert wird. Der Vorteil dieser Methode wäre, dass nicht nur Proteinkinasen, sondern sämtliche Proteine identifiziert werden könnten, die OPR3 modifizieren und dessen Interaktion auslösen, falls die OPR3-Dimerisierung durch einen anderen Mechanismus als Phosphorylierung zustande käme.

Eine weitere Möglichkeit für eine experimentelle Identifizierung der Kinase, wäre ein „in Gel Kinase Test“ (Mayer, mündliche Mitteilung). Der Test beruht auf dem Prinzip, dass eine im



Gel renaturierte Kinase in ein SDS-Gel eingegossenes Substrat (in diesem Fall OPR3) phosphoryliert (Besant & Attwood 2010). Proteinextrakte werden direkt auf ein SDS-Gel (mit Substrat) geladen. Der Einsatz von radioaktiv markiertem ATP für die Kinasereaktion ermöglicht das Ausschneiden markierter Bande(n) aus dem Gel, die anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert werden können.

Diese Methode hätte den Vorteil, dass eine potentielle OPR3-regulierende Proteinkinase *in planta* und nicht in einem künstlichen System wie in Hefen exprimiert werden würde. Deshalb beständen gute Chancen, dass die Kinase sich in einem aktiven Zustand befände und OPR3 phosphoryliert.

4.5 Regulation des Jasmonat-Signalweges durch verschiedene Ebenen der Kontrolle

Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein so wichtiger Signalweg, wie der der Jasmonate, auf mehreren verschiedenen Ebenen und in einer zeitlichen Abfolge kontrolliert wird. Dies könnte sowohl während der Biosynthese als auch während der Signaltransduktion geschehen. Es wäre denkbar, dass als einer der ersten Mechanismen – nach Verwundung oder einem anderen Stimulus – die Aktivierung von OPR3 durch posttranslationale Modifikation eintritt, welche zunächst lokal und systemisch das verfügbare OPDA umsetzt. Ein Stimulus scheint für die Aktivierung der OPR3 eindeutig nötig zu sein, da beispielsweise eine erhöhte Genexpression der OPR3 (ausgelöst durch Coronatin-Applikation) ohne Verwundung nicht zur Synthese der JA-Ile führt. Bemerkenswert ist, dass sich die OPDA-Konzentration in verwundeten Blättern innerhalb von fünf Minuten verdreifacht, systemisch aber innerhalb der ersten Minuten um 70 % verringert wird. Der JA-Ile Gehalt steigt dagegen sowohl lokal als auch systemisch an (Koo et al. 2009). Eine posttranslationale Modifikation von OPR3, die lokal und systemisch nach Verwundung erfolgt und das freie OPDA umsetzt, könnte eine Erklärung hierfür liefern.

Nach erfolgter Stimulation von OPR3 könnte zumindest lokal die Aktivierung verschiedener Lipasen eingeleitet werden, die durch die Freisetzung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus der Chloroplastenmembran eine weitere Substratverfügbarkeit für die Jasmonat-Biosynthese sichern und den folgenden Verlauf der Biosynthese gewährleisten (Stenzel et al. 2003a, b). Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass mehrere redundante Lipasen für die Jasmonsäure-Synthese existieren müssen (Ellinger et al. 2010), was wiederum eine neue Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten eröffnet.

Da schon längere Zeit darüber diskutiert wird, ob die Substratverfügbarkeit und/oder die posttranslationale Modifikation der JA-Biosynthesenzyme bei der Regulation der JA-



Biosynthese entscheidend und limitierend sind (Ziegler et al. 2001, Stenzel et al. 2003a, Breithaupt et al. 2006) erscheint die Möglichkeit einer regulierten zeitlichen Abfolge plausibel.

Eine Beendigung des Signals könnte auf Ebene der Signaltransduktion durch die Synthese der JAZ-Repressoren (Chini et al. 2007) und durch die Umwandlung der Jasmonsäure in eine inaktive Form durch Hydroxylierung erfolgen (Miersch et al. 2008). Für den Katabolismus und damit die Deaktivierung der bioaktiven Form JA-Ile wird mittlerweile der ω -Oxidationsweg als hauptverantwortlich angesehen. In diesem wird JA-Ile zu 12-Hydroxy-JA-Ile (12-OH-JA-Ile) konvertiert und anschließend weiter zu Dicarboxy-JA-Ile (12-COOH-JA-Ile) oxidiert, wofür die Enzyme der Cytochrom P450 Familie CYP94B3 bzw. CYP94C1 verantwortlich sind (Koo & Howe 2012).

Auf Ebene der Biosynthese könnte eine Regulation durch Inaktivierung von OPR3 möglicherweise durch eine erneute Phosphorylierung stattfinden.

Ein Beitrag zur Aufklärung der regulatorischen Rolle der OPR3 im Jasmonat-Signalweg konnte in dieser Arbeit durch den Nachweis der OPR3-Dimerisierung *in planta* und die Veränderung der Interaktion unter spezifischen Bedingungen geleistet werden. Weitere Studien werden darüber Aufschluss geben, ob sich die Regulation der Jasmonat-Biosynthese über ein Monomer/Dimer Gleichgewicht von OPR3 bestätigen lässt und welche posttranslationale Modifikation von OPR3 zur Dimerisierung führt.



5 LITERATURVERZEICHNIS

- Acosta, I. F., & Farmer, E. E. (2010). Jasmonates. *In: The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA.
- Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W., & Kunau, W.-H. (2003). Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Molecular Cell*, 11(3), 635-646.
- Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman, G. H., & Goldman, M. H. S. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 484-505.
- Baldwin, I. T., Schmelz, E. A., & Ohnmeiss, T. E. (1994). Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris*. *Journal of Chemical Ecology*, 20(8), 2139-2157.
- Baldwin, I. T., Zhang, Z.-P., Diab, N., Ohnmeiss, T. E., McCloud, E. S., Lynds, G. Y., & Schmelz, E. A. (1997). Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 201(4), 397-404.
- Bartel, P. L., Chien, C. T., Sternglanz, R., & Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *In: Hartley, D. A (Ed.), Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, 153-179.
- Besant, P. G., & Attwood, P. V. (2010). Histidine phosphorylation in histones and in other mammalian proteins. *Methods in Enzymology*, 471, 403-426.
- Bhat, R. A., Lahaye, T., & Panstruga, R. (2006). The visible touch: In planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, 2, 12.
- Bilwes, A. M., den Hertog, J., Hunter, T., & Noel, J. P. (1996). Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*, 382(6591), 555-559.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., & Benfey, P. N. (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, 302(5652), 1956-1960.
- Bonaventure, G., & Baldwin, I. T. (2010). New insights into the early biochemical activation of jasmonic acid biosynthesis in leaves. *Plant Signaling and Behavior*, 5(3), 287-289.
- Böttcher, C., & Pollmann, S. (2009). Plant oxylipins: plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *The FEBS Journal*, 276(17), 4693-4704.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brash, A. R., Baertschi, S. W., Ingram, C. D., & Harris, T. M. (1988). Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3382-3386.
- Breithaupt, C., Strassner, J., Breiting, U., Huber, R., Macheroux, P., Schaller, A., & Clausen, T. (2001). X-ray structure of 12-oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. *Structure*, 9(5), 419-429.
- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Lilie, H., Schaller, A., Strassner, J., Huber, R., Macheroux, P. & Clausen, T. (2006). Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14337-14342.



- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Schaller, F., Stintzi, A., Schaller, A., Huber, R., Macheroux, P., & Clausen, T. (2009). Structural basis of substrate specificity of plant 12-oxophytodienoate reductases. *Journal of Molecular Biology* 392(5), 1266-1277.
- Browse, J. (2009a). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Browse, J. (2009b). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1539-1546.
- Browse, J., & Howe, G. A. (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiology*, 146(3), 832-838.
- Brocard, C., Kragler, F., Simon, M. M., Schuster, T., & Hartig, A. (1994). The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204(3), 1016-1022.
- Brown, L. A., & Baker, A. (2008). Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Molecular Membrane Biology*, 25(5), 363-375.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2763-2788.
- Chen, Y., Hoehenwarter, W., & Weckwerth, W. (2010). Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. *The Plant Journal*, 63(1), 1-17.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., & Xie, D. (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 4(2), 279-288.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L. Y., Coon, J. J., Syka, J. E. P., Bai, D. L., Shabanowitz, J., Burke, D. J., Troyanskaya, O. G., & Hunt, D. F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2193-2198.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9578-9582.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L. & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671.
- Chung, H. S., Koo, A. J. K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2008). Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 146(3), 952-964.
- Chung, H. S., Niu, Y., Browse, J., & Howe, G. A. (2009). Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1547-1559.
- Cieśla, J., Frączyk, T., & Rode, W. (2011). Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 58(2), 137-148.
- Ciruela, F. (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(4), 338-343.



- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4(5), E127-130.
- Colcombet, J., & Hirt, H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal*, 413(2), 217-226.
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*, 383(6603), 826-829.
- Consortium, *Arabidopsis* Interactome Mapping (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science*, 333(6042), 601-607.
- Corbineau, F., Rudnickiz, R. M., & Come, D. (1988). The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation*, 7(3), 157-169.
- Costa, C. L., Arruda, P., & Benedetti, C. E. (2000). An *Arabidopsis* gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Molecular Biology*, 44(1), 61-71.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4114-4119.
- Dathe, W., Rönch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., & Schreiber, K. (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)- jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*, 153, 530-535.
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., & Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* (in press).
- Delker, C., Zolman, B. K., Miersch, O., & Wasternack, C. (2007). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal β -oxidation enzymes - additional proof by properties of *pex6* and *aim1*. *Phytochemistry*, 68(12), 1642-1650.
- Devoto, A., & Turner, J. G. (2005). Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 161-172.
- Díaz, M., Polanco, V., Ramírez, I., Peña-Cortés, H. (2012). Molecular cloning and expression analysis of 12-oxophytodienoate reductase cDNA by wounding in *Solanum tuberosum*. *Electronic Journal of Biotechnology* (online), 15(1).
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Höner, C.B., & Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7(7), 691-692.
- Erdmann, R., & Schliebs, W. (2005). Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9), 738-742.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I. I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., & Müller, M. J. (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiology*, 153(1), 114-127.
- Fan, S.-G., & Wu, G.-J. (2005). Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46, 273-292.
- Falkenstein, E., Groth, B., Mithöfer, A., & Weiler, E. W. (1991). Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta*, 185(3), 316-322.



- Farmer, E. E. (2007). Jasmonate perception machines. *Nature*, 448(7154), 659-660.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7713-7716.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4(2), 129-134.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R., & Ryan, C. A. (1991). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology*, 98(3), 995-1002.
- Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 372-378.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J. M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M. I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., Solano, R. (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701-715.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., & Turner, J. G. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell*, 6(5), 751-759.
- Feys, B. F., Wiermer, M., Riyaz, A. B., Moisan, L. J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., & Parker, J. E. (2005). *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *The Plant Cell*, 17(9), 2601-2613.
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-247.
- Footitt, S., Slocombe, S. P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., Holdsworth, M. (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *The EMBO Journal*, 21(12), 2912-2922.
- Forner, J., & Binder, S. (2007). The red fluorescent protein eqFP611: application in subcellular localization studies in higher plants. *BMC Plant Biology*, 7, 28.
- Fox, K. M., & Karplus, P. A. (1994). Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure*, 2(11), 1089-1105.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction, *New Phytologist*, 156 (140), 145-169.
- Genome International Rice Sequencing (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793-800.
- Geva, G., & Sharan, R. (2011). Identification of protein complexes from co-immunoprecipitation data. *Bioinformatics*, 27(1), 111-117.
- Ghelis, T. (2011). Signal processing by protein tyrosine phosphorylation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(7), 942-951.
- Ghosh, I., Hamilton, A. D., & Regan, L. (2000). Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *Journal American Chemical Society*, 122(23), 5658-5659.



- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., & Wolfender, J.-L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16400-16407.
- Gleave, A. P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20(6), 1203-1207.
- Gould, S. G., Keller, G. A., & Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 2), 2923-2931.
- Glover, J. R., Andrews, D. W., & Rachubinski, R. A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10541-10545.
- Hamberg, M., & Fahlstadius, P. (1990). Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276(2), 518-526.
- Han, B. W., Malone, T. E., Kim, D. J., Bingman, C. A., Kim, H.-J., Fox, B. G., & Phillips, G. N. (2011). Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* 12-oxophytodienoate reductase isoform 3 in complex with 8-iso prostaglandin A1. *Proteins*, 79(11), 3236-3241.
- Hanks, S. K., & Quinn, A. M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology*, 200, 38-62.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861), 42-52.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., & Wasternack, C. (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *The Plant Journal*, 24(1), 113-126.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., & Wasternack, C. (2003a). Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 64(5), 971-980.
- Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O., & Wasternack, C. (2003b). Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant & Cell Physiology*, 44(6), 643-648.
- Häusler, T., Stierhof, Y. D., Wirtz, E., & Clayton, C. (1996). Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *The Journal of Cell Biology*, 132(3), 311-324.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T., & Nishimura, M. (2002). Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant & Cell Physiology*, 43(1), 1-11.
- Hofmann, E., & Pollmann, S. (2008). Molecular mechanism of enzymatic allene oxide cyclization in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 302-308.
- Hollenbeck, P. J., Bray, D., & Adams, R. J. (1985). Effects of the uncoupling agents FCCP and CCCP on the saltatory movements of cytoplasmic organelles. *Cell Biology International Reports*, 9(2), 193-199.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41-66.
- Howe, G. A., & Schaller, A. (2008). Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In: Schaller, A. (Ed.), *Induced Plant Resistance Against Herbivory*. Springer, Heidelberg, 7-29.



- Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., & DeRocher, A. E. (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology*, 123(2), 711-724.
- Huber, S. C., & Hardin, S. C. (2004). Numerous posttranslational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 318-322.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHIER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(10), 2191-2209.
- Ito, J., Batth, T. S., Petzold, C. J., Redding-Johanson, A. M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., Meyer, E. H., Millar, A. H., & Heazlewood, J. L. (2011). Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1571-1582.
- Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H., & Meyerowitz, E. M. (2007). The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(11), 3516-3529.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, 8(6), 1693-1696.
- Jiang, J., & Carlson, M. (1999). Analysis of protein kinase interactions using the two-hybrid method. Protein Phosphorylation. *In*: Hardie, D. G. (Ed.), *Protein Phosphorylation – A Practical Approach*. Oxford University Press, Inc., New York, 315-333.
- Jung, C., Lyou, S. H., Yeu, S., Kim, M. A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J. S., Choi, Y. D., Cheong, J.-J. (2007). Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 26(7), 1053-1063.
- Karban, R., & Baldwin, I. T. (1997). *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- Karpova, T. S., Baumann, C. T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G. L., McNally, J. G. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *Journal of Microscopy*, 209(1), 56-70.
- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 7100-7105.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 299-328.
- Kerppola, T. K. (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols*, 1(3), 1278-1286.
- Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Review of Biophysics* 37, 465-487.
- Keskin, O., Tuncbag, N., & Gursoy, A. (2008). Characterization and prediction of protein interfaces to infer protein-protein interaction networks. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(2), 67-76.
- Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.-P., Weng, H., & Miersch, O. (2008). Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 403-419.



- Klemm, J. D., Schreiber, S. L., & Crabtree, G. R. (1998). Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annual Review of Immunology*, 16, 569-592.
- Kocsis, P. (2011). Charakterisierung zweier Proteinkinasen und deren Rolle in der Jasmonat-Biosynthese. Diplomarbeit, Universität Hohenheim Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen.
- Koo, A. J. K. & Howe, G. A. (2012). Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine. *Frontiers in Plant Science*, 3(19), 1-7.
- Koo, A. J. K., Chung, H. S., Kobayashi, Y., & Howe, G. A. (2006). Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33511-33520.
- Koo, A. J. K., Gao, X., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(6), 974-986.
- Koroleva, O. A., Tomlinson, M. L., Leader, D., Shaw, P., & Doonan, J. H. (2005). High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *The Plant Journal*, 41(1), 162-174.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Schmidt, J., Sembdner, G., & Parthier, B. (1995). Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(1), 29-36.
- Kubigsteltig, I., Laudert, D., & Weiler, E. W. (1999). Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta*, 208(4), 463-471.
- Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., & Hartig, A. (1998). The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33635-33643.
- Laudert, D., Hennig, P., Stelmach, B. A., Müller, A., Andert, L., & Weiler, E. W. (1997). Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Analytical Biochemistry*, 246(2), 211-217.
- Lazarow, P. B., & Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology*, 1, 489-530.
- Lee, M. S., Mullen, R. T., & Trelease, R. N. (1997). Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *The Plant Cell*, 9(2), 185-197.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C. M., Ritsema, T., & Pieterse, C. M. J. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, 232(6), 1423-1432.
- Li, B., & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal*, 7(10), 957-963.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E., & Howe, G. A. (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell*, 16(1), 126-143.
- Lindberg, R. A., Quinn, A. M., & Hunter, T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3), 114-119.



- Ma, C. (2005). Subcellular and functional analyses of two small heat shock proteins and protein kinases from peroxisomes of *Arabidopsis thaliana* L. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Ma, C., Agrawal, G., & Subramani, S. (2011). Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 193(1), 7-16.
- Magliery, T. J., Wilson, C. G. M., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A. D., & Regan, L. (2005). Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1), 146-157.
- Malone, T. E., Madson, S. E., Wrobel, R. L., Jeon, W. B., Rosenberg, N. S., Johnson, K. A., Bingman, C. A., Smith, D. W., Philips, G. N., Markley, J. L. & Fox, B. G. (2005). X-ray structure of *Arabidopsis* At2g06050, 12-oxophytodienoate reductase isoform 3. *Proteins*, 58(1), 243-245.
- Mandaokar, A., & Browse, J. (2009). MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(2), 851-862.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B. M., Choi, G., Koo, Y. J., Yoo, Y. J., Choi, Y. D., Choi, G., & Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal*, 46(6), 984-1008.
- Manning, G. (2005). Genomic overview of protein kinases. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1-19.
- MAPK Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7), 301-308.
- McConn, M., & Browse, J. (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell*, 8(3), 403-416.
- McNew, J. A., & Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), 1245-1257.
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., & Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biology*, 12(3), 273-277.
- Merz, G. S., Benedikz, E., Schwenk, V., Johansen, T. E., Vogel, L. K., Rushbrook, J. I., & Wisniewski, H. M. (1997). Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells. *Journal of Cellular Physiology*, 173(3), 423-432.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., & Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist*, 177(1), 114-127.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., & Shinozaki, K. (1995). Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 358(2), 199-204.
- Müssig, C., Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U., Weiler, E., W., Altmann, T. (2000). A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 157(2), 143-152.
- Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Daudi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., & Shirasu, K. (2010). Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiology*, 153(3), 1161-1174.



- Nielsen, E., Cheung, A. Y., & Ueda, T. (2008). The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology*, 147(4), 1516-1526.
- Niu, Y., Figueroa, P., & Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 2143-2154.
- Oberdorfer, G., Steinkellner, G., Stueckler, C., Faber, K., & Gruber, K. (2011). Stereopreferences of Old Yellow Enzymes: structure correlations and sequence patterns in enoate reductases. *ChemCatChem*, 3(10), 1562-1566.
- Ohad, N., Shichrur, K., & Yalovsky, S. (2007). The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiology*, 145(4), 1090-1099.
- Osborne, M. A., Dalton, S., & Kochan, J. P. (1995). The yeast tribrid system - genetic detection of transphosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology*, 13(13), 1474-1478.
- Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., & Hashimoto, T. (1991). Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 947-954.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., & Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 31(1), 1-12.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. V., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J. A., De Jaeger, G., Solano, R., & Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, 464(7289), 788-791.
- Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J. P., Ranty, B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, 93(12), 2048-2053
- Petterson, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Printen, J. A., & Sprague, G. F. (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics*, 138(3), 609-619.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(5), 1795-1814.
- Ralph, S. G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J. A., Nelson, C. C., Butterfield, Y. S., Kirkpatrick, R., Liu, J., Jones, S. J., Marra, M. A., Douglas, C. J., Ritland, K., Bohlmann, J. (2006). Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant, Cell & Environment*, 29(8), 1545-1570.
- Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M., & Kunau, W.-H. (1996). The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *PAS7* gene. *The EMBO Journal*, 15(12), 2901-2913.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., & Babujee, L. (2004). AraPerox . A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiology*, 136(1), 2587-2608.



- Reumann, S., Quan, S., Aung, K., Yang, P., Manandhar-Shrestha, K., Holbrook, D., Linka, N., Switzenberg, R., Wilkerson, C. G., Weber, A. P., Olsen, L. J., Hu, J. (2009). In-depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiology*, 150(1), 125-143.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(5), 707-720.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., & Farmer, E. E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell*, 16(11), 3132-3147.
- Rucktäschel, R., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2011). Protein import machineries of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), 892-900.
- Rudrabhatla, P., Reddy, M. M., & Rajasekharan, R. (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/ threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Molecular Biology*, 60(2), 293-319.
- Sablowski, R. (2010). Genes and functions controlled by floral organ identity genes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 94-99.
- Sanders, P. M., Lee, P. Y., Biesgen, C., Boone, J. D., Beals, T. P., Weiler, E. W., & Goldberg, R. B. (2000). The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell*, 12(7), 1041-1061.
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2008). Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. *In: Schaller, A. (Ed.), Induced Plant Resistance Against Herbivory*. Springer, Heidelberg, 349-365.
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1532-1538.
- Schaller, F., Hennig, P., & Weiler, E. (1998). 12-Oxophytodienoate-10,11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiology*, 118(4), 1345-1351.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., & Weiler, E. W. (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210(6), 979-984.
- Schaller, F., Schaller, A., & Stintzi, A. (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 179-199.
- Schlüter, A., Real-Chicharro, A., Gabaldón, T., Sánchez-Jiménez, F., & Pujol, A. (2010). PeroxisomeDB 2.0: an integrative view of the global peroxisomal metabolome. *Nucleic Acids Research*, 38, D800-805.
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U., & Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology*, 6(9), e230.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405.
- Slawson, C., Housley, M. P., & Hart, G. W. (2006). O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(1), 71-83.



- Smith, L. S., Kern, C. W., Halpern, R. M., & Smith, R. A. (1976). Phosphorylation on basic amino acids in myelin basic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(2), 459-465.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3), 1000-1013.
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127.
- Staswick, P. E., Su, W., & Howell, S. H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6837-6840.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., & Wasternack, C. (2003a). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51(6), 895-911.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C. A., & Wasternack, C. (2003b). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *The Plant Journal*, 33(3), 577-589.
- Steppuhn, A., & Baldwin, I. T. (2008). Induced defenses and the cost-benefit paradigm. *In: Schaller, A. (Ed.), Induced Plant Resistance to Herbivory*, Springer, Heidelberg, 61-83.
- Stintzi, A., & Browse, J. (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., & Farmer, E. E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12837-12842.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P., & Schaller, A. (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal*, 32(4), 585-601.
- Suza, W. P., & Staswick, P. E. (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, 227(6), 1221-1232.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A., & Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *The EMBO Journal*, 10(11), 3255-3262.
- Takeda, A., Matsuda, A., Paul, R. M. J., & Yaseen, N. R. (2004). CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity. *Blood*, 103(9), 3440-3447.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., Ohta, H. (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(3), 1268-1283.



- Terlecky, S. R., Nuttley, W. M., McCollum, D., Sock, E., & Subramani, S. (1995). The *Pichia Pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *The EMBO Journal*, 14(15), 3627-3634.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260-270.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815.
- Theodoulou, F. L., Job, K., Slocombe, S. P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, & T. R., Graham, I. A. (2005). Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* 137(3), 835-840.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COII) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665.
- Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J., & Egly, J. M. (1997). A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 22995-22999.
- Turck, F., Kozma, S. C., Thomas, G., & Nagy, F. (1998). A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70 s6k function *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 2038-2044.
- Ueda, J., & Kato, J. (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*, 66(2), 246-249.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*, 75(2), 458-461.
- Vogelmann, J. (2005). Identifizierung und Charakterisierung genetischer Suppressoren der männlich sterilen *opr3* Mutante in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Hohenheim Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., & Keller, B. (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta*, 216(1), 187-192.
- Wager, A., & Browse, J. (2012). Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science*, 3, 41.
- Walton, P. A., Hill, P. E., & Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell*, 6(6), 675-683.
- Warburg, O., & Christian, W. (1932). Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum. *Naturwissenschaften*, 20, 688.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- Wasternack, C., & Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, 5(1), 63-77.
- Weber, H., Vick, B. A., & Farmer, E. E. (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10473-10478.



LITERATURVERZEICHNIS

- Wellmer, F., Riechmann, J. L., Alves-Ferreira, M., & Meyerowitz, E. M. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell*, 16(5), 1314-1326.
- Wickner, S., Hoskins, J., & McKenney, K. (1991). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7903-7907.
- Xie, D., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280(5366), 1091-1094.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., & Xie, D. (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant Cell*, 21(8), 2220-2236.
- Yoshihara, T., Omer, E. A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y., & Koda, Y. (1989). Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2835-2837.
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6(11), 520-527.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A., M., Jiang, Z., Kim, J. M., To, T. K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W. Q., Seki, M., Zhou, J. M., & Guo, H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12539-12544.
- Ziegler, J., Keinänen, M., & Baldwin, I. T. (2001). Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, 58(5), 729-738.
- Zolman, B. K., Silva, I. D., Bartel, B., Biology, C., & Texas, B. K. Z. (2001). The *Arabidopsis pxal* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiology*, 127(3), 1266-1278.





6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Jasmonat-Biosynthese	4
Abb. 1.2: Phänotyp wildtypischer und OPR3 mutanter Pflanzen bei der Blüten- und Pollenentwicklung von <i>A. thaliana</i>	7
Abb. 1.3: Darstellung der überlagerten Strukturen von OPR3 (gelb), OPR1 (blau) und OYE (rot)	11
Abb. 1.4: Strukturmodell der OPR3 aus <i>S. lycopersicum</i>	12
Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Beschusskanone	48
Abb. 2.2: Prinzip der BiFC	56
Abb. 2.3: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität transgener <i>A. thaliana</i> (<i>35S:OPR3-YFP-SRL</i>) in der F2-Generation durch die Bestimmung der Peroxisomenanzahl über einem definierten Pixel-Grauwert	60
Abb. 2.4: Prinzip von FRET und des „Acceptor photobleaching“	61
Abb. 3.1: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels BiFC in Zwiebel-epidermiszellen	66
Abb. 3.2: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels BiFC nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen	68
Abb. 3.3: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels BiFC in <i>A. thaliana</i> und schematische Darstellung der Fluoreszenzquantifizierung mittels des Axio Vision Moduls AutMess	70
Abb. 3.4: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels BiFC in <i>A. thaliana</i> im Verhältnis zur exprimierten Proteinmenge	74
Abb. 3.5: Untersuchung des OPR3-Dimerisierungszustandes mittels BiFC in Antherenfilamenten der Stadien 11-14 der Blütenentwicklung von <i>A. thaliana</i> ..	77
Abb. 3.6: Quantitative Bestimmung der OPR3-Dimerisierung während verschiedener Stadien der Antherenfilamententwicklung im Verhältnis zur exprimierten Proteinmenge	79
Abb. 3.7: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 mittels FRET-Analyse	83
Abb. 3.8: Quantifizierung der OPR3-Dimerisierung mittels FRET in Blattepidermiszellen von <i>A. thaliana</i>	84
Abb. 3.9: Histochemischer GUS-Test zur Analyse der Expression der Gene <i>LOX2</i> , <i>AOS</i> , <i>OPR3</i> , <i>VSP2</i> nach Verwundung in <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	86
Abb. 3.10: Analyse der OPR3-Interaktion in unverwundeten Wurzelgewebe von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen mittels FRET und Untersuchung der OPR3-Expression mittels transgener <i>OPR3:GUS-GFP</i> Pflanzen	90
Abb. 3.11: Quantifizierung der OPR3-Interaktion in verschiedenen Wurzelgeweben und nach Verwundung mittels FRET	91



Abb. 3.12: Schematische Darstellung des „Huckepack“-Experimentes in Zwiebelepidermiszellen	94
Abb. 3.13: Lokalisation der OPR3-Varianten OPR3 Δ SRL und OPR3 _{Y191F} in Zwiebelepidermiszellen	95
Abb. 3.14: „Huckepack“-Experiment in transformierten Zwiebelepidermiszellen	96
Abb. 3.15: Schematische Darstellung des „Huckepack“-Experimentes in Pflanzen.....	97
Abb. 3.16: PCR zum Nachweis der Konstrukte <i>OPR3:OPR3ΔSRL</i> und <i>OPR3:OPR_{Y191F}</i> in transgenen <i>opr3</i> -Pflanzen.....	98
Abb. 3.17: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Proteine OPR3 Δ SRL und OPR3 _{Y191F} in transgenen <i>opr3</i> -Pflanzen.....	99
Abb. 3.18: Untersuchung der Fertilität transgener <i>opr3</i> -Pflanzen.....	100
Abb. 3.19: Nachweis der Dimerisierung der OPR3 Δ SRL im Cytosol und Quantifizierung mittels BiFC nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen	102
Abb. 3.20: Subzelluläre Lokalisation der Kinasen At3g08720 und At4g18950	104
Abb. 3.21: Schematische Darstellung der T-DNA Insertion(en) in die Gene <i>At3g08720</i> und <i>At4g18950</i>	106
Abb. 3.22: Nachweis homozygoter T-DNA Insertionslinien der Gene <i>At4g08720</i> und <i>At4g18950</i>	107
Abb. 3.23: Transkriptanalyse homozygoter T-DNA Insertionslinien der Gene <i>At3g08720</i> und <i>At4g18950</i> durch RT-PCR.....	108
Abb. 3.24: Vergleich der Transkriptspiegel von JA-Markergenen zwischen den „loss-of-function“-Mutanten der Gene <i>At3g08720</i> bzw. <i>At4g18950</i> und Wildtyp durch semiquantitative PCR.....	109
Abb. 3.25: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse zum Nachweis der H2H-Fusionsproteine in Hefe.....	116
Abb. 3.26: Untersuchung des OPR3-Interaktionsverhaltens im H2H-System bzw. H3H-System.....	118
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der OPR3 mRNA-Expression in Wurzel und Spross von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen.....	125



7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1:	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	22
Tab. 2.2:	Verwendete Plasmide	24
Tab. 2.3:	Verwendete <i>E. coli</i> -Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps sowie der Resistenzeigenschaft.....	24
Tab. 2.4:	Verwendeter <i>A. tumefaciens</i> -Stamm unter Angabe des Genotyps sowie der Resistenzeigenschaft	25
Tab. 2.5:	Verwendeter <i>S. cerevisiae</i> -Stamm unter Angabe des Genotyps.....	25
Tab. 2.6:	Verwendete Antibiotika unter Angabe der Stammlösung und Endkonzentration im Medium	27
Tab. 2.7:	Verwendete Zusätze („Dropout Supplement“) für das SD-Medium	28
Tab. 2.8:	Verwendete Bedingungen für Standard-PCR-Reaktionen	36
Tab. 2.9:	Durch Mutagenese-PCR erstellte Konstrukte.....	37
Tab. 2.10:	Reaktionsbedingungen für die Ligation	39
Tab. 2.11:	Schematische Darstellung der erstellten Konstrukte und Klonierungsvorgehen...	46
Tab. 3.1:	Kandidatengene für Proteinkinasen für die OPR3-Phosphorylierung	104
Tab. 3.2:	Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer zellulären Organisation im Vergleich zum <i>Arabidopsis</i> -Gesamtgenom	111
Tab. 3.3:	Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer zellulären Organisation im Vergleich zum <i>Arabidopsis</i> -Gesamtgenom	112
Tab. 3.4:	Prozentuale Verteilung der in der „loss-of-function“-Mutante differentiell-regulierten Gene nach ihrer biologischen Funktion im Vergleich zum <i>Arabidopsis</i> -Gesamtgenom	112
Tab. 4.1:	Cytosolisch lokalisierte Kandidaten für die OPR3-Phosphorylierung.....	131





A1

Quantifizierung der OPR3 Dimerisierung mittels BiFC nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen

Es sind der Median und der Mittelwert, sowie deren Standardabweichung (STABW) und Standardfehler (STF) der Fluoreszenzintensität für YFP und RFP in jeweils 30 analysierten Zellen angegeben.

YFP	AtOPR3-YFP	S/OPR1-YFP_{N+C}	AtOPR3-YFP_{N+C}	E292K-YFP_{N+C}	Y365F-YFP_{N+C}	DMEY-YFP_{N+C}	DMEY-YFP
Median	119,4	5,7	66,3	6,8	29,2	8,7	153,1
Mittelwert	240,7	6,9	124,4	18,3	46,1	23,0	414,7
STABW	267,9	2,5	114,8	19,6	46,6	38,3	498,8
STF	48,9	0,4	21,0	3,6	8,5	7,0	91,1

RFP	AtOPR3-YFP	S/OPR1-YFP_{N+C}	AtOPR3-YFP_{N+C}	E292K-YFP_{N+C}	Y365F-YFP_{N+C}	DMEY-YFP_{N+C}	DMEY-YFP
Median	453,6	643,2	412,7	439,1	352,0	459,8	314,9
Mittelwert	492,5	709,5	413,9	478,9	365,9	504,0	331,9
STABW	179,8	264,5	122,3	164,3	121,8	164,5	81,5
STF	32,8	48,3	22,3	30,0	22,2	30,0	14,9

YFP/RFP*100	AtOPR3-YFP	S/OPR1-YFP_{N+C}	AtOPR3-YFP_{N+C}	E292K-YFP_{N+C}	Y365F-YFP_{N+C}	DMEY-YFP_{N+C}	DMEY-YFP
Median	25,6	1,1	19,5	1,5	6,7	1,8	44,6
Mittelwert	51,4	1,1	31,7	4,1	13,0	5,0	134,9
STABW	59,4	0,5	29,4	4,8	12,8	8,2	181,3
STF	10,8	1,0	5,4	0,9	2,3	1,5	33,1

A2

Verhältnis der Signalintensität OPR3/Aktin der im Western Blot detektierten Banden

(verwendete Werte sind hervorgehoben (Fett))

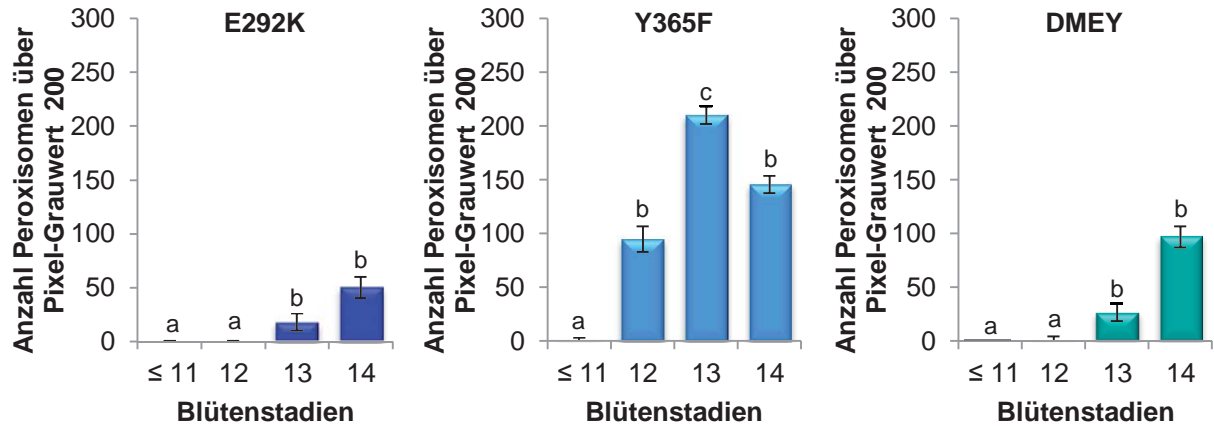
OPR3/Aktin	OPR3 1	OPR3 2	E292K 1	E292K 2	Y365F 1	Y363F 2	DMEY 1	DMEY 2
OPR3-YFP _N	1,62	1,48	1,12	1,20	2,07	2,52	0,68	1,03
OPR3-YFP _C	1,94	1,71	1,11	1,08	2,26	2,73	0,42	0,65



A3

Quantitative Bestimmung der OPR3-Dimerisierung während verschiedener Stadien der Antherenfilamententwicklung für die OPR3-Varianten E292K, Y365F und DMEY

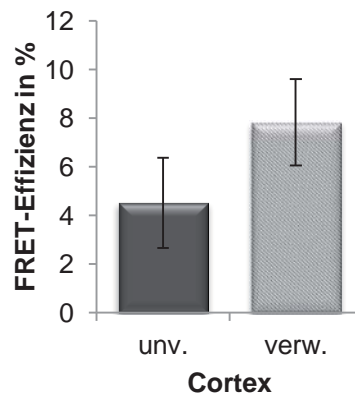
Das split-YFP-System wurde verwendet, um quantitativ die Dimerisierungsfähigkeit der OPR3-Mutanten in Antherenfilamenten verschiedener Stadien der Blütenentwicklung zu vergleichen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Axio Vision Moduls AufMess. Es werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben. Die Buchstaben geben signifikante Unterschiede an, $P < 0,05$ (Kruskal-Wallis Test, Tukey Methode).



A4

Abb. 3.1: Quantifizierung der OPR3-Interaktion im Cortex der Wurzeln (Differenzierungszone) mittels FRET

Die FRET-Effizienz für das wildtypische OPR3 wurde vor (unv.) und 15 min nach Verwundung (verw.) in Keimlingen des gleichen Entwicklungsstadiums (Alter: 2 Wochen) bestimmt (130 Peroxisomen aus 7 FRET-Messungen). Für die ermittelten Daten werden Median und Standardfehler (+/-) angegeben (Wilcoxon-Rangsummentest, $P = 0,661$).





A5

Übersicht über differentiell-regulierte Gene in der „loss-of-function“-Mutante At4g18950 im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen

Angegeben werden die „Gene-ID“, die Genfunktion nach TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz und das Expressionsverhältnis von Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Mut./Wt) aus drei Mikroarrays in absteigender Reihenfolge geordnet. Hervorgehoben (**Fett**) wurden Gene, die bekanntermaßen in den Jasmonsäure-Signalweg involviert sind (Vergleich der Daten: <http://www.arabidopsis.org>, „get all GO Annotations“; Mikroarraydaten von Jung et al. 2007; Schommer et al. 2008).

Gene-ID	Genfunktion (Tair)	p-Wert	Expressionsverhältnis Mut./Wt
At5g12480	CPK7 (CALMODULIN-DOMAIN PROTEIN KINASE 7); calmodulin-dependent protein kinase/ kinase	0.004741	2,89
At4g02590	UNE12 (unfertilized embryo sac 12); DNA binding / transcription factor	0.000551	2,14
At1g52155	unknown protein	0.000503	0,48
At5g38460	ALG6, ALG8 glycosyltransferase family protein	0.000030	0,47
At2g41220	GLU2 (Glutamate synthase)	0.007439	0,44
At4g23460	beta-adaptin, putative	0.011586	0,44
At4g11260	SGT1B (enhanced downy mildew 1b); protein binding	0.003493	0,43
At1g03090	MCCA (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1)	0.004681	0,43
At2g06850	EXGT-A1 (ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE); hydrolase, acting on glycosyl bonds	0.002221	0,42
At1g15750	TPL/WSIP1 (WUS-INTERACTING PROTEIN 1); protein binding	0.010879	0,42
At1g02660	lipase class 3 family protein	0.011486	0,42
At3g27640	transducin family protein/WD-40 repeat family protein	0.000297	0,42
At4g31600	UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter-related	0.001356	0,42
At4g01892	No GO annotation data for this gene	0.012945	0,42
At4g15850	ATRH1 (Arabidopsis thaliana RNA helicase 1); ATP-dependent helicase	0.004084	0,41
At4g08685	SAH7	0.000778	0,41
At1g54130	RSH3 (RELA/SPOT HOMOLOG 3); catalytic	0.024648	0,41
At3g60320	DNA binding	0.044839	0,41
At1g09350	ATGOLS3 (ARABIDOPSIS THALIANA GALACTINOL SYNTHASE 3); transferase, transferring glycosyl groups / transferase, transferring hexosyl groups	0.004914	0,40



At5g59613	hypothetical protein	0.004474	0,40
At3g47860	apolipoprotein D-related	0.034641	0,40
At1g27350	similar to unknown protein (TAIR:AT1G27330.1); similar to membrane protein [Brassica juncea] (GB:AAT38818.1)	0.024498	0,39
At2g22540.1	SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE), AGL22 (AGAMOUS-LIKE 22)	0.001923	0,39
At1g51650	ATP synthase epsilon chain, mitochondrial	0.031468	0,39
At1g78670	ATGGH3 (GAMMA-GLUTAMYL HYDROLASE 3); gamma-glutamyl hydrolase	0.004083	0,39
At4g05530	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	0.025516	0,39
At3g61820	aspartyl protease family protein	0.009535	0,39
At5g18800	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit (NDUFA8) family protein	0.002471	0,38
At2g40930	UBP5 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 5); ubiquitin-specific protease	0.006068	0,38
At4g32590	ferredoxin-related	0.007864	0,38
At5g43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	0.031612	0,38
At1g68340	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G25370.1)	0.020512	0,38
At5g50375	CPI1 (CYCLOPROPYL ISOMERASE)	0.020604	0,38
At1g73410	MYB54 (myb domain protein 54); DNA binding / transcription factor	0.020579	0,38
At1g68945	unknown protein	0.007430	0,38
At1g14980	CPN10 (CHAPERONIN 10)	0.004449	0,38
At1g19050	ARR7 (RESPONSE REGULATOR 7); transcription regulator/ two-component response regulator	0.014703	0,38
At5g66420	similar to tm-1 ^G GCR26 protein [Solanum lycopersicum] (GB:BAF75725.1)	0.017721	0,38
At5g41685	mitochondrial import receptor subunit TOM7 / translocase of outer membrane 7 kDa subunit (TOM7.1)	0.013806	0,37
At3g15950.1	Similar to TSK-associating protein 1 (TSA1), contains 10 EFE repeats	0.003677	0,37
At3g28910	MYB30 (myb domain protein 30); DNA binding / transcription factor	0.033129	0,37
At1g09760	U2A' (U2 small nuclear ribonucleoprotein A); protein binding	0.029182	0,37
At2g41880	GK-1 (GUANYLATE KINASE 1); guanylate kinase	0.001051	0,37
At2g36780	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.029522	0,37
At3g20820	leucine-rich repeat family protein	0.023992	0,36
At3g17900	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO70781.1)	0.033053	0,36



At1g09010	glycoside hydrolase family 2 protein	0.037512	0,36
At1g08810	MYB60 (myb domain protein 60); DNA binding / transcription factor	0.007827	0,36
At1g01480	ACS2 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2)	0.004725	0,36
At1g64520.1	regulatory particle non-ATPase 12A (RPN12a); peptidase activity	0.033133	0,36
At2g22800	HAT9 (homeobox-leucine zipper protein 9); DNA binding / transcription factor	0.000146	0,36
At1g58340	ZF14; transporter	0.001317	0,36
At5g51690	ACS12 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	0.011090	0,36
At5g26240	CLC-D (chloride channel D); anion channel/ voltage-gated chloride channel	0.015825	0,36
At1g54340	ICDH; isocitrate dehydrogenase (NADP+)	0.030384	0,35
At3g26840	esterase/lipase/thioesterase family protein	0.019831	0,35
At1g79470	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.013985	0,35
At5g62540	UBC3 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 3); ubiquitin-protein ligase	0.000471	0,35
At5g27330	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G05130.1)	0.045922	0,35
At5g20040	ATIPT9 (Arabidopsis thaliana isopentenyltransferase 9); ATP binding / tRNA isopentenyltransferase	0.001402	0,35
At5g51300	splicing factor-related	0.026446	0,35
At4g33780	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G69935.1)	0.030157	0,35
At5g20680	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G64020.1)	0.004945	0,35
At1g04170	EIF2 GAMMA (eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit); translation factor, nucleic acid binding	0.009166	0,35
At5g07070	CIPK2 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 2); kinase	0.024282	0,35
At2g41760	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO23603.1)	0.001256	0,35
At5g41970	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G49320.1); contains InterPro domain Metal-dependent protein hydrolase (InterPro:IPR003226)	0.019430	0,34
At2g29680	CDC6	0.037143	0,34
At2g32950	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)	0.011102	0,34
At1g29710	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	0.029111	0,34
At1g61890	MATE efflux family protein	0.018850	0,34
At1g10210	ATMPK1 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1); MAP kinase/ kinase	0.044017	0,33
At3g56490	zinc-binding protein, putative / protein kinase C inhibitor, putative	0.014309	0,33



At5g61160	AACT1 (ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANSFERASE 1); transferase	0.014198	0,33
At5g25450	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative	0.020780	0,33
At3g14660	CYP72A13 (cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13); oxygen binding	0.017152	0,33
At3g22300	RPS10 (RIBOSOMAL PROTEIN S10); structural constituent of ribosome	0.003132	0,33
At5g63560	transferase family protein	0.020466	0,33
At5g18830	SPL7 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7); DNA binding / transcription factor	0.029893	0,33
At2g36070	ATTIM44-2 (Arabidopsis thaliana translocase inner membrane subunit 44-2)	0.000710	0,33
At1g18150	ATMPK8 (ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 8); MAP kinase	0.010642	0,32
At5g44630	terpene synthase/cyclase family protein	0.030332	0,32
At4g38540	monooxygenase, putative (MO2)	0.033692	0,32
At1g60850	ATRPAC42 (Arabidopsis thaliana RNA polymerase I subunit 42); DNA binding / DNA-directed RNA polymerase	0.034013	0,32
At1g21640	NADK2 (NAD KINASE 2); NAD ⁺ kinase/ calmodulin binding	0.011472	0,32
At1g67325	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein; binding, zinc ion binding	0.001598	0,32
At1g46768	RAP2.1 (related to AP2 1); DNA binding / transcription factor	0.003049	0,32
At3g22780	TSO1 (CHINESE FOR 'UGLY'); transcription factor	0.025673	0,32
At1g03930	ADK1 (DUAL SPECIFICITY KINASE 1); kinase	0.041801	0,32
At1g08100	ATNRT2.2 (Arabidopsis thaliana high-affinity nitrate transporter 2.2); nitrate transmembrane transporter	0.040220	0,32
At1g05810	ARA/Ara-1/AtRABA5e/AtRab11D (Arabidopsis Rab GTPase homolog A5e); GTP binding	0.003965	0,32
At1g24530	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	0.009068	0,31
At4g29900.1	CIF1 (COMPACT INFLORESCENCE 1), AUTOINHIBITED CA(2+)-ATPASE 10	0.022856	0,31
At5g65010	ASN2 (ASPARAGINE SYNTHETASE 2); asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	0.006163	0,31
At1g73380	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO62045.1)	0.039545	0,31
At1g02065	SPL8 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8)	0.000410	0,31
At3g17910	SURF1 (SURFEIT 1)	0.029762	0,31
At5g11490	adaptin family protein	0.029662	0,31
At4g31780	MGD1 (MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE 1, MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE A); 1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups	0.021985	0,31



At5g20570	RBX1 (RING-BOX 1)	0.023208	0,31
At5g19370	rhodanese-like domain-containing protein / PPIC-type PPIASE domain-containing protein	0.002688	0,31
At1g74100	sulfotransferase family protein	0.024210	0,31
At1g17720	ATB BETA (Arabidopsis thaliana serine/threonine protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform); nucleotide binding	0.004882	0,31
At4g29670	thioredoxin family protein	0.024019	0,31
At3g16850	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	0.046116	0,30
At5g27740	EMB2775 (EMBRYO DEFECTIVE 2775); DNA binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	0.035642	0,30
At3g63270	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55350.1)	0.018535	0,30
At2g45190	AFO (ABNORMAL FLORAL ORGANS); transcription factor	0.003349	0,30
At5g06280	similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN67410.1)	0.031949	0,30
At1g30200	F-box family protein	0.004796	0,30
At2g42200	squamosa promoter-binding protein-like 9 (SPL9)	0.000938	0,30
At1g29750	RKF1 (RECEPTOR-LIKE KINASE IN FLOWERS 1); ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase	0.018354	0,30
At4g26640	WRKY20 (WRKY DNA-binding protein 20); transcription factor	0.041384	0,30
At1g71810	ABC1 family protein	0.039679	0,30
At3g58600	similar to ATNAP4 (ARABIDOPSIS THALIANA NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 4)	0.034984	0,30
At4g31480	coatamer beta subunit, putative / beta-coat protein, putative / beta-COP	0.023127	0,30
At3g02880	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	0.010342	0,29
At5g49890	CLC-C (chloride channel C); anion channel/ voltage-gated chloride channel	0.040263	0,29
At1g05180	AXR1 (AUXIN RESISTANT 1); small protein activating enzyme	0.029474	0,29
At5g48290	heavy-metal-associated domain-containing protein	0.035106	0,29
At3g50520	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	0.012861	0,29
At5g65020	ANNAT2 (ANNEXIN ARABIDOPSIS 2); calcium ion binding / calcium-dependent phospholipid binding	0.015068	0,29
At1g44810	transcription regulator	0.033619	0,29
At5g14660	PDF1B (PEPTIDE DEFORMYLASE 1B); peptide deformylase	0.008094	0,29
At5g45750	AtRABA1c (Arabidopsis Rab GTPase homolog A1c); GTP binding	0.012443	0,29
At3g53750	ACT3 (ACTIN 3); structural constituent of cytoskeleton	0.037213	0,29



At5g20830	SUS1 (SUCROSE SYNTHASE 1); UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase	0.001013	0,29
At3g11240	arginine-tRNA-protein transferase, putative / arginyltransferase, putative / arginyl-tRNA-protein transferase	0.031766	0,29
At2g26340	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO43885.1)	0.044827	0,28
At2g32340	TraB family protein	0.031594	0,28
At1g30530	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.015995	0,28
At3g54010	PAS1 (PASTICCINO 1); FK506 binding / peptidyl-prolyl cis- trans isomerase	0.006195	0,28
At1g08350	endomembrane protein 70 family protein	0.015228	0,28
At1g15430	similar to zinc ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G80220.1)	0.027299	0,28
At1g64460	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	0.036507	0,28
At5g64813	LIP1 (LIGHT INSENSITIVE PERIOD1); GTPase	0.028640	0,28
At4g18780	CESA8 (CELLULOSE SYNTHASE 8); cellulose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups	0.030825	0,28
At5g55540	TRN1 (TORNADO 1)	0.019439	0,28
At5g03220	transcriptional co-activator-related	0.012836	0,27
At1g35670	ATCDPK2 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 2); calmodulin-dependent protein kinase/ kinase	0.026241	0,27
At1g10810	aldo/keto reductase family protein	0.014474	0,27
At5g21170	5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit, putative	0.039388	0,27
At1g09570	PHYA (PHYTOCHROME A); G-protein coupled photoreceptor/ signal transducer	0.036456	0,27
At1g24610	SET domain-containing protein	0.019344	0,27
At1g30330	ARF6 (AUXIN RESPONSE FACTOR 6); transcription factor	0.045273	0,27
At5g54250	ATCNGC4 (DEFENSE, NO DEATH 2); calmodulin binding / cation channel/ cyclic nucleotide binding	0.027861	0,27
At1g49200	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.027408	0,27
At4g27450	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G15450.1)	0.042977	0,26
At5g43260	chaperone protein dnaJ-related	0.020027	0,26
At2g35670	FIS2 (FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2); transcription factor	0.023117	0,26
At4g36430	peroxidase, putative	0.017151	0,26
At1g58520	RXW8; hydrolase activity	0.017856	0,26
At1g02790	PGA4 (POLYGALACTURONASE 4); polygalacturonase	0.023085	0,26



At2g45240	MAP1A (METHIONINE AMINOPEPTIDASE 1A); methionyl aminopeptidase	0.010512	0,26
At1g26560	glycosyl hydrolase family 1 protein	0.043538	0,26
At1g07640	OBP2 (OBF BINDING PROTEIN 2); DNA binding / transcription factor	0.043385	0,26
At3g59550	SYN3 (SISTER CHROMATID COHESION 1 PROTEIN 3)	0.025256	0,25
At1g17745	PGDH (3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE); phosphoglycerate dehydrogenase	0.006007	0,25
At1g16850.1	unknown protein	0.006854	0,25
At5g21070	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO67366.1)	0.015318	0,25
At1g59580	ATMPK2 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE HOMOLOG 2); MAP kinase/ kinase	0.012270	0,25
At1g71230	AJH2/CSN5/CSN5B (COP9-SIGNALOSOME 5B); protein binding	0.001618	0,25
At1g44446	CH1 (CHLOROPHYLL B BIOSYNTHESIS); chlorophyllide a oxygenase	0.037123	0,25
At1g21980	ATPIP5K1 (ARABIDOPSIS THALIANA 1-PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHOSPHATE 5-KINASE 1); 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	0.010364	0,25
At3g11800	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G44150.1)	0.038224	0,25
At5g18065.1	unknown protein	0.033679	0,25
At4g20880	ethylene-responsive nuclear protein / ethylene-regulated nuclear protein (ERT2)	0.012707	0,24
At5g17020	XPO1A (exportin 1A); protein transporter	0.007001	0,24
At5g01430	Got1-like family protein	0.036979	0,24
At5g27540	EMB2473 (EMBRYO DEFECTIVE 2473); GTP binding	0.012732	0,24
At1g20500	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	0.049258	0,24
At1g19140	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO65215.1);	0.047608	0,24
At4g25820	XTR9 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 9); hydrolase, acting on glycosyl bonds	0.009092	0,24
At3g53620	ATPPA4 (ARABIDOPSIS THALIANA PYROPHOSPHORYLASE 4); inorganic diphosphatase/ pyrophosphatase	0.016344	0,24
At2g31450	endonuclease-related	0.003012	0,24
At2g32300	UCC1 (UCLACYANIN 1); copper ion binding	0.002500	0,24
At1g56170	HAP5B (Heme activator protein (yeast) homolog 5B); DNA binding / transcription factor	0.044171	0,24
At3g18140	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	0.036718	0,24
At5g05620	ATGCP2/TUBG2 (GAMMA-TUBULIN); structural molecule	0.032752	0,24
At2g25730.1	unknown protein	0.005708	0,24



At2g31370	bZIP transcription factor (POSF21)	0.022187	0,24
At3g26200	CYP71B22 (cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 22); oxygen binding	0.044281	0,24
At1g21590	protein kinase family protein	0.039897	0,24
At5g41240	ATGSTT2 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class theta) 2); glutathione transferase	0.041600	0,23
At2g46830	CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1); transcription factor	0.012837	0,23
At4g12110.1	4,4-dimethyl-9beta,19-cyclopropylsterol-4alpha- methyl oxidase	0.031114	0,23
At4g14096	F-box family protein	0.049324	0,23
At1g29880	glycyl-tRNA synthetase / glycine--tRNA ligase	0.042667	0,23
At4g01480	ATPPA5 (ARABIDOPSIS THALIANA PYROPHOSPHORYLASE 5); inorganic diphosphatase/ pyrophosphatase	0.030884	0,23
At1g35620	ATPDIL5-2 (PDI-LIKE 5-2); thiol-disulfide exchange intermediate	0.017393	0,23
At3g17860	JAI3/JAZ3/TIFY6B (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 3)	0.042529	0,23
At5g14950	ATGMII/GMII (GOLGI ALPHA-MANNOSIDASE II); alpha-mannosidase	0.016015	0,23
At1g70100	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G24160.1)	0.046237	0,23
At1g71770	PAB5 (POLY(A)-BINDING PROTEIN); RNA binding	0.029831	0,23
At3g57010	strictosidine synthase family protein	0.010400	0,23
At2g17380	AP19 (associated protein 19); ATP binding / protein binding / protein kinase	0.044255	0,22
At4g29100	ethylene-responsive family protein	0.021258	0,22
At1g23840	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23830.1)	0.028547	0,22
At5g18940	Mo25 family protein	0.042538	0,22
At3g48110	EDD1 (EMBRYO-DEFECTIVE-DEVELOPMENT 1)	0.012053	0,22
At1g50410	SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein / RING finger domain-containing protein	0.028441	0,22
At4g13261	Protein of unknown function (DUF784)	0.043884	0,22
At3g55640	mitochondrial substrate carrier family protein	0.023346	0,21
At2g41190	amino acid transporter family protein	0.032997	0,21
At1g48520.1	GATB (GLU-ADT SUBUNIT B), Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	0.026624	0,21
At1g67980	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase); caffeoyl-CoA O-methyltransferase	0.016050	0,21
At4g02075	PIT1 (PITCHOUN 1); protein binding / zinc ion binding	0.042722	0,21



At1g77220	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G38360.2)	0.028183	0,21
At3g27660	OLEO4 (OLEOSIN4)	0.015764	0,21
At3g09100.1	mRNA capping enzyme family protein	0.028106	0,21
At4g25990	CIL, chloroplast import apparatus CIA2-like	0.043154	0,21
At1g49890	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G19570.1)	0.032943	0,21
At1g27360	squamosa promoter-binding protein-like 11 (SPL11)	0.026927	0,21
At1g21000	zinc-binding family protein	0.035251	0,21
At1g08560	SYP111 (syntaxin 111); SNAP receptor	0.018971	0,21
At2g17360	40S ribosomal protein S4 (RPS4A)	0.018813	0,20
At3g01170	structural constituent of ribosome	0.034279	0,20
At1g26380	FAD-binding domain-containing protein	0.035644	0,20
At3g09150	HY2 (ELONGATED HYPOCOTYL 2); phytochromobilin:ferredoxin oxidoreductase	0.046024	0,20
At4g20370	TSF (TWIN SISTER OF FT); phosphatidylethanolamine binding	0.013024	0,20
At3g15352	ATCOX17 (Arabidopsis thaliana cytochrome c oxidase 17)	0.004236	0,20
At3g19510	homeobox protein (HAT 3.1)	0.036788	0,20
At1g23780	F-box family protein	0.030198	0,20
At1g34150	tRNA pseudouridine synthase family protein	0.009505	0,20
At2g42570	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G31110.2)	0.023379	0,19
At5g20520	WAV2 (WAVY GROWTH 2)	0.006230	0,19
At1g75090	methyladenine glycosylase family protein	0.009110	0,19
At1g09020	SNF4 (Sucrose NonFermenting 4)	0.032752	0,19
At1g69340	appr-1-p processing enzyme family protein	0.004898	0,19
At3g60250	CKB3 (casein kinase II beta chain 3); protein kinase CK2 regulator	0.004781	0,19
At3g52610	similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN71367.1)	0.006115	0,19
At3g15030	TCP4 (TCP FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR 4); transcription factor	0.038813	0,19
At5g59710	VIP2 (VIRE2 INTERACTING PROTEIN2); transcription regulator	0.038118	0,19
At1g55510	BCDH BETA1 (BRANCHED-CHAIN ALPHA-KETO ACID DECARBOXYLASE E1 BETA SUBUNIT); 3-methyl-2- oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring)	0.029634	0,18



At4g08895	inorganic phosphate transporter family protein	0.013350	0,18
At5g14780	FDH (FORMATE DEHYDROGENASE); NAD binding / binding / catalytic/ cofactor binding / oxidoreductase	0.021651	0,18
At2g32040	integral membrane transporter family protein	0.006908	0,18
At5g04940	SUVH1 (SU(VAR)3-9 HOMOLOG 1)	0.040550	0,18
At1g02580	MEA (MEDEA); transcription factor	0.011025	0,17
At5g57160	ATLIG4 (ARABIDOPSIS THALIANA DNA LIGASE IV)	0.003050	0,17
At1g53570	MAP3KA (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3); kinase	0.039436	0,17
At3g20290	calcium-binding EF hand family protein	0.005926	0,17
At2g06925	ATSPLA2-ALPHA/PLA2-ALPHA (PHOSPHOLIPASE A2-ALPHA); phospholipase A2	0.005196	0,16
At5g58370	GTP binding	0.020527	0,16
At3g46510	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing family protein	0.013445	0,16
At1g07910	ATRNL/RNL (ARABIDOPSIS THALIANA RNA LIGASE); 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase/ RNA ligase (ATP)/ polynucleotide kinase	0.011135	0,16
At4g39690.1	unknown protein	0.029454	0,16
At1g62360	STM (SHOOT MERISTEMLESS); transcription factor	0.017428	0,16
At4g30993	similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN67945.1)	0.039794	0,16
At1g49160	WNK7 (Arabidopsis WNK kinase 7); kinase	0.037624	0,16
At3g54860	ATVPS33 (Arabidopsis thaliana vacuolar protein sorting 33); protein transporter	0.006979	0,16
At5g53310	myosin heavy chain-related	0.007685	0,15
At3g60880	dihydrodipicolinate synthase 1 (DHDPS1)	0.027084	0,15
At2g43780	similar to expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:ABA99375.1)	0.007189	0,15
At1g72330	ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2); alanine transaminase	0.002063	0,15
At2g46270	GBF3 (G-BOX BINDING FACTOR 3); transcription factor	0.040135	0,15
At1g14950	major latex protein-related / MLP-related	0.040848	0,14
At2g27385.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0.048972	0,14
At2g35720	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	0.018022	0,14
At3g16650	PP1/PP2A phosphatases pleiotropic regulator 2 (PRL2)	0.001818	0,14
At1g35190	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	0.032406	0,14



At2g37560	ATORC2/ORC2 (ORIGIN RECOGNITION COMPLEX SECOND LARGEST SUBUNIT); DNA replication origin binding / protein binding	0.037656	0,14
At1g07110	F2KP (FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE); fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase	0.035945	0,14
At4g33220	pectinesterase family protein	0.005868	0,14
At1g05760	RTM1 (RESTRICTED TEV MOVEMENT 1)	0.030686	0,14
At5g43270	SPL2 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 2); DNA binding / transcription factor	0.002301	0,13
At1g15550	GA4 (GA REQUIRING 4); gibberellin 3-beta-dioxygenase	0.012837	0,13
At5g65260	polyadenylate-binding protein family protein / PABP family protein	0.025852	0,13
At1g47670	amino acid transporter family protein	0.010976	0,13
At1g80410	EMB2753 (EMBRYO DEFECTIVE 2753); binding	0.049641	0,13
At3g24492	unknown protein	0.030846	0,13
At5g20930	TSL (TOUSLED); kinase	0.035891	0,12
At1g19100	ATP-binding region, ATPase-like domain-containing protein-related	0.046997	0,12
At1g72420	similar to auxin-induced-related / indole-3-acetic acid induced-related [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G17350.1)	0.025597	0,12
At2g27250	CLV3 (CLAVATA3); kinase activator/ receptor binding	0.016169	0,12
At3g27620	AOX1C (alternative oxidase 1C); alternative oxidase	0.012550	0,12
At5g41010	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 7 kDa subunit, putative	0.003098	0,12
At1g03230	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	0.040214	0,12
At4g04910	NSF (N-ETHYLMALEIMIDE SENSITIVE FACTOR); ATP binding / binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	0.044160	0,12
At5g57940	ATCNGC5 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 5); calmodulin binding / cyclic nucleotide binding / potassium channel	0.024654	0,11
At1g10520	DNA polymerase lambda (POLL)	0.046847	0,11
At2g02500	ISPD (2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE CYTIDYLTRANSFERASE)	0.013882	0,11
At4g14940	ATAO1 (Arabidopsis thaliana amine oxidase 1); copper ion binding	0.028025	0,11
At3g16080	60S ribosomal protein L37 (RPL37C)	0.022853	0,10
At3g13040	myb family transcription factor	0.024160	0,10
At5g09230	SRT2; DNA binding	0.024362	0,09
At1g49570	peroxidase, putative	0.044553	0,09



At3g57510	ADPG1 (endo-polygalacturonase 1); polygalacturonase	0.017976	0,09
At3g15990	SULTR3;4; sulfate transmembrane transporter	0.026951	0,09
At4g33210	F-box family protein (FBL15)	0.004992	0,09
At5g22050	protein kinase superfamily protein	0.033523	0,09
At3g01670	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G01680.1)	0.049074	0,08
At5g04660	CYP77A4 (cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 4); oxygen binding	0.042593	0,06
At5g20140	SOUL heme-binding family protein	0.048493	0,05
At1g65400 At1g65390	hypothetical protein	0.020839	0,03



B. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Nadja Sperling
Steinwaldstraße 40
70599 Stuttgart-Plieningen

geboren am 13.10.1983 in Ludwigsburg
verheiratet, keine Kinder

Studium

08/2008 – 09/2012

Doktorandin/wissenschaftliche Angestellte, Universität Stuttgart-Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen

Abschluss mit magna cum laude (1,0)

Thema der Dissertation: „Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch reversible Dimerisierung der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3)“

09/2009 – 08/2011

Promotionsstipendium der Landesgraduiertenförderung

10/2003 – 06/2008

Biologiestudium, Universität Stuttgart-Hohenheim

Abschluss mit Auszeichnung, Note: 1,0

Thema der Diplomarbeit: „Transkriptionsregulation der Gene des ATCV-1 (*Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus-1)“, Institut für Genetik, Fachgebiet Allg. Virologie

Berufliche Tätigkeiten und Praktika

01/2005 – 07/2008

Nachhilfelehrerin, ABACUS-Institut, Stuttgart

02/2007 – 03/2007

6-wöchiges Praktikum, Institut für Laboratoriumsmedizin Marienhospital Stuttgart

10/2005 – 08/2006

Studentische Hilfskraft und Tutorin für Studierende des Grundstudiums, Universität Stuttgart-Hohenheim, Institut für Genetik

07/2005 – 09/2005

12-wöchiges Praktikum, Akademie für Natur- und Umweltschutz, Umweltministerium Baden-Württemberg

Schulbildung

09/1994 – 07/2003

Herzog-Christoph-Gymnasium Beilstein, Abitur

Abschluss mit der Auszeichnung Preis

09/1990 – 07/1994

GHS Großbottwar

Ehrenamtliches Engagement

02/2011 – 03/2012

Mentorin für Kinder und Jugendliche, BBBS Stuttgart Deutsche Jugendhilfe gGmbH

12/2003 – 12/2008

Souffleuse in der Laientheatergruppe „Vanillegeschmack“, Oberstenfeld

01/1998 – 12/2005

Mitarbeit in der katholischen Jugend der Kirchengemeinde St. Pius X. Großbottwar, Oberstenfeld, Beilstein

Interessen

Tiere und Natur, Wandern, Lesen





C. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, „Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch reversible Dimerisierung der Oxophytodiensäurereductase 3 (OPR3)“ selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Stuttgart, 06.07.2012





D. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Andreas Schaller für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Unterstützung während dieser Arbeit in allen Bereichen.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. Bettina Hause möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur, für die FRET-Messungen und all die Zeit bedanken, die Sie sich für mich genommen hat.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Annick Stintzi für die direkte Betreuung dieser Arbeit und die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Tipps bedanken.

Der Landesgraduiertenstiftung danke ich für die zweijährige finanzielle Förderung.

Bei Herrn Prof. Artur Pfitzner bedanke ich mich für die gewährte Unterstützung in allen Hefefragen. Dem Institut für Zoologie danke ich, dass ich ihr LSM nutzen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen TAs des Instituts und dem Gewächshausteam, besonders danken möchte ich dabei Brigitte und Ursi für die tolle Hilfe beim Zwiebeln beschießen und die „Sisyphus“-Arbeit beim Präparieren.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und Motivation nicht nur im Laboralltag bedanke ich mich insbesondere bei Kristin, Nadja, Marko, Isabelle und Lucile sowie natürlich auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts.

Meinen Freunden Bärbel, Steffen, Nadja und Andi danke ich für die ergiebigen Diskussionen zu jeder Tages- und Nachtzeit und ihren Beistand in wirklich allen Lebenslagen.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie – meinem Mann Jürgen, der in den letzten Jahren viel mit mir aushalten musste, meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre Aufmunterungen sowie ihre praktische und finanzielle Unterstützung und meiner Schwester Britta und Ari, auf die ich mich immer verlassen kann.





