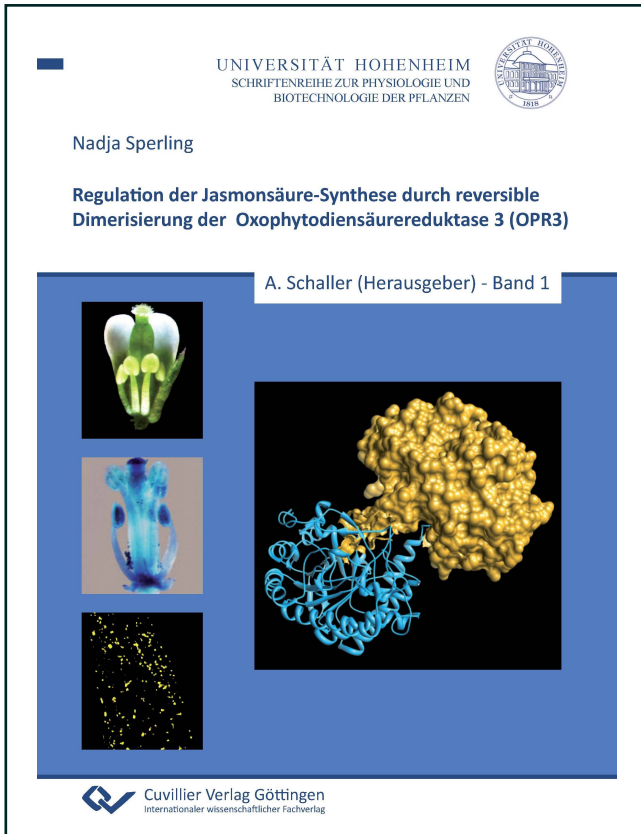




Nadja Sperling (Autor)

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



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6219>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



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 <i>A. thaliana</i> und Bedeutung der <i>opr3</i> (<i>oxophytodiensäurereduktase 3</i>)-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	<i>Escherichia coli</i>	24
2.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	26
2.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.5	Anzucht und Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	29



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