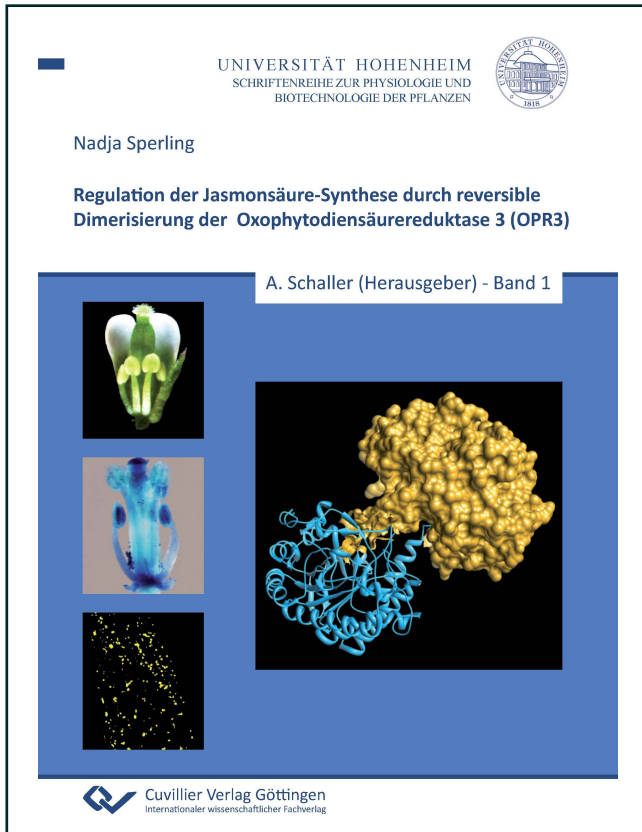




Nadja Sperling (Autor)  
**Regulation der Jasmonsäure-Synthese durch  
reversible Dimerisierung der  
Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3)**



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

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto: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 *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



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	Plasmid isolation (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
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>63</b>
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 $\Delta$ 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
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>119</b>
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
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>153</b>
<b>A</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>155</b>
<b>B</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>169</b>
<b>C</b>	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>171</b>
<b>D</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>173</b>