




Kristin Mayer (Autor)
**Regulation der Jasmonsäurebiosynthese durch
posttranslationale Modifikation der
Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3)**


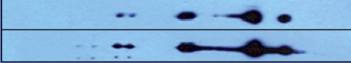
UNIVERSITÄT HOHENHEIM
SCHRIFTENREIHE ZUR PHYSIOLOGIE UND
BIOTECHNOLOGIE DER PFLANZEN



Kristin Mayer

**Regulation der Jasmonsäurebiosynthese
durch posttranslationale Modifikation
der Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3)**

A. Schaller (Herausgeber) - Band 4



Intensity [counts]

m/z

CVUILLIER VERLAG GÖTTINGEN
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6377>

Copyright:

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

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | V |
| TABELLENVERZEICHNIS..... | VII |
| ABKÜRZUNGEN..... | VIII |
| ZUSAMMENFASSUNG..... | XIII |
| SUMMARY..... | XV |
| 1 EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 Jasmonate: essentiell für Entwicklung und die Abwehr von Fressfeinden...1 | |
| 1.2 Regulation der Enzymaktivität von OPR3 durch posttranslationale Modifikationen | 7 |
| 1.3 Posttranslationale Modifikationen im Zusammenhang mit der Wundreaktion..... | 11 |
| 1.4 Kommunikation unter Pflanzen: das Phänomen des "Primings"..... | 14 |
| 1.5 Ziele dieser Arbeit..... | 15 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 19 |
| 2.1 Material..... | 19 |
| 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 19 |
| 2.1.2 Antikörper..... | 19 |
| 2.1.3 Enzyme..... | 19 |
| 2.1.4 Organismen..... | 20 |
| 2.1.4.1 Pflanzen..... | 20 |
| 2.1.4.2 Bakterienstämme..... | 20 |
| 2.1.5 Plasmide..... | 21 |
| 2.1.6 Genbezeichnung der mittels PCR amplifizierten Gene..... | 21 |
| 2.1.7 Oligonukleotide..... | 22 |
| 2.1.7.1 Oligonukleotide zur Klonierung und Genotypisierung..... | 22 |
| 2.1.7.2 Oligonukleotide zur Amplifikation von Transkripten JA- und SA- induzierbarer Gene sowie der Referenzgene <i>AtActin2</i> und <i>SIEF1α</i> | 23 |
| 2.1.7.3 Oligonukleotide für die reverse Transkription..... | 24 |
| 2.1.8 Medien und Sonstiges..... | 24 |
| 2.2 Anzucht und Kultur der Pflanzen..... | 26 |



INHALT UND VERZEICHNISSE

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 26 |
| 2.2.2 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 26 |
| 2.2.3 | Ernte des Pflanzenmaterials..... | 27 |
| 2.3 | Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 27 |
| 2.3.1 | Vorbereitung der Pflanzen..... | 27 |
| 2.3.2 | Animpfen der <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Kultur..... | 27 |
| 2.3.3 | Transformation der Pflanzen..... | 28 |
| 2.4 | Verwundungs- und Volatilzeitreihen..... | 28 |
| 2.5 | Bestimmung der Jasmonatkonzentration in Pflanzenmaterial..... | 29 |
| 2.6 | Proteinanalytische Methoden..... | 29 |
| 2.6.1 | Aufreinigung von OPR3 aus <i>E.coli</i> | 29 |
| 2.6.2 | <i>in vitro</i> -Phosphorylierung durch die Argininkinase McsB..... | 30 |
| 2.6.3 | Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial..... | 31 |
| 2.6.3.1 | Proteinextraktion und Probenaufbereitung für 1D-Gelelektrophorese..... | 31 |
| 2.6.3.2 | Proteinextraktion und Probenaufbereitung für 2D-Gelelektrophorese | 31 |
| 2.6.4 | Antikörperreinigung aus Serum..... | 32 |
| 2.6.4.1 | Affinitätsreinigung mit gereinigter S/OPR3..... | 32 |
| 2.6.4.2 | Reinigung gegen Proteinextrakt OPR3-defizienter Pflanzen..... | 33 |
| 2.6.5 | Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 34 |
| 2.6.6 | Western Blot und Immunodetektion..... | 34 |
| 2.6.7 | 2D-Gelelektrophorese..... | 35 |
| 2.6.7.1 | Isoelektrische Fokussierung (1.Dimension)..... | 35 |
| 2.6.7.2 | SDS-PAGE (2.Dimension)..... | 35 |
| 2.6.7.3 | Detektion der Proteine..... | 36 |
| 2.6.8 | Native Protein-Gelelektrophorese..... | 36 |
| 2.6.9 | Bestimmung des Molekulargewichtes mittels Ferguson-Plot | 37 |
| 2.6.10 | Dephosphorylierung der OPR3 durch λ -Phosphatase-Behandlung..... | 37 |
| 2.6.11 | Anreicherung von S/OPR3 aus Tomate mittels Polyethylenglykol- fraktionierung..... | 37 |
| 2.6.12 | Immunopräzipitation der OPR3 mittels antiAtOPR3 Antikörper..... | 39 |
| 2.6.13 | μ MACS Affinitätschromatographie mittels antiGFP..... | 40 |
| 2.6.14 | Metalloxid/hydroxid-Affinitätschromatographie (MOAC)..... | 41 |



INHALT UND VERZEICHNISSE

| | | |
|----------|---|----|
| 2.6.15 | Proteolytischer Verdau von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse..... | 42 |
| 2.6.16 | Massenspektrometrische Analyse..... | 43 |
| 2.6.16.1 | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight/Time Of Flight (MALDI-TOF/TOF) Mass Spectrometry (MS)..... | 43 |
| 2.6.16.2 | Electrospray-Ionisation Mass Spectrometry (nanoLC-ESI-MS) | 44 |
| 2.7 | Molekularbiologische Methoden..... | 45 |
| 2.7.1 | Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E.coli</i> | 45 |
| 2.7.2 | Restriktionsverdau..... | 46 |
| 2.7.3 | Elektrotransformation von <i>E.coli</i> und <i>A.tumefaciens</i> | 46 |
| 2.7.4 | Klonierung der Kassetten zur Expression von OPR3 und OPR3-Mutanten unter Kontrolle des <i>CaMV35S</i> -Promotor..... | 47 |
| 2.7.5 | DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial..... | 47 |
| 2.7.6 | RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial..... | 48 |
| 2.7.7 | Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion..... | 48 |
| 2.7.8 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 49 |
| 2.7.9 | DNA-Agarosegelelektrophorese..... | 51 |
| 2.7.10 | Quantitative Real-Time PCR-Analyse (qPCR)..... | 51 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 53 |
| 3.1 | Sind veränderte OPR3-Proteine mit reduziertem Dimerisierungspotential konstitutiv aktiv?..... | 53 |
| 3.1.1 | Komplementation der <i>opr3</i> -Mutante durch OPR3-Proteine mit reduziertem Dimerisierungspotential..... | 54 |
| 3.1.2 | Einfluss von OPR3-Mutanten auf die Wundreaktion..... | 56 |
| 3.2 | Charakterisierung der in <i>E.coli</i> exprimierten <i>S/OPR3</i> | 65 |
| 3.3 | Dynamik der <i>S/OPR3</i> -Expression in Tomatenpflanzen: Reaktion auf Verwundung und Volatilexposition..... | 71 |
| 3.4 | Eine Dephosphorylierung ändert den isoelektrischen Punkt der OPR3 ... | 76 |
| 3.5 | Das 2D-Spotmuster der OPR3 ist abhängig vom Bedarf an Jasmonsäure..... | 77 |
| 3.6 | Anreicherung von <i>S/OPR3</i> durch Polyethylenglykolfractionierung..... | 81 |



INHALT UND VERZEICHNISSE

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.7 | Anreicherung von OPR3 durch Metalloxid/hydroxid-Affinitätschromatographie..... | 84 |
| 3.8 | Immunopräzipitation der OPR3 mit Hilfe von antiAtOPR3..... | 87 |
| 3.9 | Isolierung des OPR3-YFP-Fusionsproteins aus <i>Arabidopsis</i> | 89 |
| 3.10 | Analyse der posttranslationalen Modifikationen der OPR3..... | 91 |
| 4 | DISKUSSION..... | 97 |
| 4.1 | OPR3-Monomere zeigen eine erhöhte Aktivität..... | 97 |
| 4.2 | Phosphorylierung der <i>S</i> OPR3 <i>in vitro</i> durch EphB1 und McsB | 102 |
| 4.3 | OPR3 wird <i>in planta</i> phosphoryliert und acetyliert..... | 105 |
| 4.4 | Posttranslationale Modifikationen der OPR3 korrelieren mit dem Jasmonsäurebedarf in pflanzlichen Geweben..... | 108 |
| 4.5 | Die physiologische Bedeutung der verschiedenen OPR3-Modifikationen | 110 |
| 4.6 | Welches sind die Regulatoren der OPR3-Modifikation(en)?..... | 115 |
| 4.7 | Schlussfolgerung und Ausblick..... | 119 |
| | LITERATUR..... | 121 |
| | ANHANG..... | 147 |
| A.1 | Sequenzen der <i>S</i> OPR3 und <i>At</i> OPR3..... | 147 |
| A.1.1 | cDNA-Sequenzen von <i>S</i> OPR3 und <i>At</i> OPR3..... | 147 |
| A.1.2 | Proteinsequenzen von <i>S</i> OPR3 und <i>At</i> OPR3..... | 148 |
| A.2 | Aminosäuresequenzen bekannter OPR3 Orthologe..... | 150 |
| A.2.1 | OPR3-Orthologe aus Mais (<i>Zea mays</i>)..... | 150 |
| A.2.2 | OPR3-Ortholog aus Reis (<i>Oryza sativa</i>)..... | 150 |
| A.3 | Fragmentierungsspektren zur Lokalisation der posttranslationalen Modifikationen..... | 151 |
| A.3.1 | Fragmentierungsspektren der <i>S</i> OPR3 nach Coexpression mit der Tyrosinkinase EphB1..... | 151 |
| A.3.2 | Fragmentierungsspektren der <i>S</i> OPR3 nach Inkubation mit der Argininkinase McsB..... | 152 |
| A.3.3 | Fragmentierungsspektren der durch PEG-Fraktionierung bzw. Immunopräzipitation gereinigten <i>S</i> OPR3..... | 167 |
| A.3.4 | Fragmentierungsspektren der durch μ MACS gereinigten <i>At</i> OPR3..... | 168 |



INHALT UND VERZEICHNISSE

| | |
|------------------|-----|
| DANKE..... | 173 |
| ERKLÄRUNG..... | 174 |
| LEBENS LAUF..... | 175 |