

Heteromerbildung von *Arabidopsis thaliana* Allenoxidzyklasen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Diplom-Biologen Markus Otto

geb. am 20.10.1979 in Oschatz

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Sacha Baginsky
2. PD Dr. Bettina Hause
3. Prof. Dr. Tina Romeis

Halle (Saale), 06.11.2012

Ich habe keine besondere Begabung,
sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.

- Albert Einstein -

Zusammenfassung

Jasmonate sind in Pflanzen sowohl an der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress als auch an der Regulierung von Wachstum und Entwicklung beteiligt. Die Biosynthese von Jasmonsäure (JA) erfolgt über verschiedene Reaktionen und Zwischenstufen, eine zentrale Komponente ist dabei die Allenoxidzyklase (AOC). Dieses Enzym katalysiert den Ringschluss vom Allenoxid zur 12-*oxo*-Phytodiensäure (OPDA). Dabei wird von der AOC spezifisch das Stereoisomer 9(S),13(S)-12-*oxo*-PDA gebildet. Von diesem leiten sich alle nachfolgenden Verbindungen dieses Biosyntheseweges ab. In *Arabidopsis thaliana* existieren vier Isoformen der AOC, von denen die Bildung von Homotrimeren bekannt ist. Die entsprechenden Gene werden zeitlich und räumlich überlappend exprimiert. Die zeitgleiche Expression verschiedener Isoformen im gleichen Gewebe und die Fähigkeit zur Trimerbildung könnte eine Heteromerbildung der verschiedenen AOCs bedeuten. Unter Verwendung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC, *split*-YFP) konnte die Interaktion aller vier AOCs in allen 16 möglichen Kombinationen gezeigt werden. Diese Interaktionen unterschieden sich zueinander in Fluoreszenzintensität und Aussehen, was möglicherweise durch unterschiedlich stark ausgeprägte Interaktionen verursacht wird und damit eine Veränderung der enzymatischen Aktivität der AOC-Heteromere zur Folge haben könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zwei Kombinationen von *AtAOC*-BiFC-Fusionskonstrukten, die sich in ihrer Interaktion extrem unterschiedlich verhalten, in *Nicotiana benthamiana* mit Hilfe von qRT-PCR untersucht. Hierbei konnte kein deutlicher Unterschied in der Aktivität zwischen den verwendeten Kombinationen festgestellt werden. Wurden die AOCs in unterschiedlichen Kombinationen mit *His-tag* und *Strep-tag* fusioniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und anschließend für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität eingesetzt, konnte eine Änderung der Aktivität für verschiedene Kombinationen gezeigt werden.

Die beobachtete Fähigkeit zur Bildung von Heterotrimeren und die daraus folgende Änderung der enzymatischen Aktivität deuten auf eine zusätzliche Regulation der Biosynthese von JA auf Proteinebene hin.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Jasmonat-Biosynthese	2
1.2 Jasmonat-Signaltransduktion.....	10
1.3 Regulation der Jasmonatbiosynthese	11
1.4 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.1.1 Quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR).....	15
2.1.1.1 cDNA Synthese.....	15
2.1.1.2 qRT-PCR	16
2.1.1.3 Auswertung qRT-PCR.....	17
2.1.2 Vektoren.....	17
2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	18
2.2.1 Proteinexpression	18
2.2.2 Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt	19
2.2.3 Native Proteinreinigung	19
2.2.3.1 Native Proteinreinigung mittels des Strep- <i>tag</i> [®] II Systems.....	19
2.2.3.2 Native Proteinreinigung mittels des His- <i>tag</i> -Systems	20
2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels des BCA-Testes	20
2.2.5 SDS-PAGE	20
2.2.5.1 Probenvorbereitung.....	21
2.2.5.2 Proteinmarker	21
2.2.5.3 Lineare SDS-PAGE.....	21

2.2.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	22
2.2.7	Western-Blot-Analyse	23
2.2.8	Strep-tag-Nachweis	24
2.2.9	Protein- <i>crosslinking</i>	25
2.2.10	Größenausschlusschromatographie	26
2.2.10.1	Auswertung	26
2.3	Bestimmung der AOC-Aktivität	27
2.3.1	Enzymassay	27
2.3.2	Auswertung	29
2.4	Methoden zur Anzucht und Transformation von Bakterien.....	30
2.4.1	Medien und Antibiotika	30
2.4.1.1	LB-Medium und LB-Agar.....	30
2.4.1.2	YEB-Medium.....	30
2.4.1.3	Antibiotika	30
2.4.2	Zellanzucht, Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.....	31
2.4.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
2.4.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen.....	31
2.4.2.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen.....	31
2.4.2.4	Herstellung elektrokompetenter <i>A.-tumefaciens</i> -Zellen	32
2.4.2.5	Transformation elektrokompetenter <i>A.-tumefaciens</i> -Zellen	32
2.5	Präparation von Mesophyllprotoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.6	Transformation von Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten	33
2.7	Infiltration von <i>Nicotiana-benthamiana</i> -Blättern.....	34
2.8	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> (CLSM).....	35
2.9	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.9.1	Samensterilisation und Selektion.....	36
2.10	Detektion der Glucuronidaseaktivität (GUS-Aktivität)	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Untersuchungen der AtAOC1-4 Multimerisierung <i>in vitro</i>	38
3.2	Bestimmung der Proteingrößen mittels Größenausschlusschromatographie	40

3.3	Affinitätsreinigung und Aktivitätsuntersuchungen.....	45
3.3.1	Affinitätsreinigung	45
3.3.2	Untersuchung der Enzymaktivität	46
3.4	AOC-Interaktion <i>in vivo</i> – <i>bimolecular fluorescence complementation</i> (BiFC)	49
3.4.1	<i>Arabidopsis-thaliana</i> -Mesophyllprotoplasten.....	49
3.4.2	<i>Nicotiana-benthamiana</i> -Blätter	57
3.5	Untersuchung der Enzymaktivität <i>in planta</i>	62
3.6	Untersuchungen zur Proteinstabilität	64
4	Diskussion	66
4.1	Organisation und Stabilität der <i>AtAOCs</i>	67
4.2	<i>AtAOC</i> -Heteromere sind <i>in vivo</i> nachweisbar	71
4.3	Enzymaktivität der Heteromere.....	73
5	Literaturverzeichnis.....	77
	Anhang	84
	Danksagung	91
	Lebenslauf	92
	Erklärung	93

Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat
ACS	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Synthase
ACX	Acyl-CoA-Oxidase
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
AOC	Allenoxidzyklase
AOS	Allenoxidsynthase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation; split-YFP</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CHX	Cycloheximid
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
COI	<i>coronatine insensitive</i>
crFP	<i>cerulean fluorescent protein</i>
DAD	<i>defective in anther dehiscence</i>
DGL	<i>dongle</i> ; koreanisch: runde Form
DIR	<i>dirigent protein</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGS	Ethylen Glycol <i>bis</i> (Succinimidyl Succinat)
12,13-EOT	12,13(S)-Epoxyoctadecatriensäure
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	Glucuronidase
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxylsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPL	Hydroperoxy-Lyase

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPOD	Hydroperoxydiensäure
HPOT	Hydroperoxytriensäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonylisoleucin
JAME	Jasmonsäuremethylester
JAZ	Jasmonat-ZIM-Domäne
KAT	Ketoacyl-CoA-Thiolase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LOX	Lipoxygenase
MaMg	Mannitol-Magnesium
MeOPDA	Methyl-OPDA
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OPC 8:0	3-oxo-2-[(Z) pent-2'-enyl]cyclopentan-1-octansäure
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
OPR-3	OPDA-Reduktase 3
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PIN	Proteinaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptions-PCR
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>region of interest</i>

RP-HPLC	<i>reversed phase</i> HPLC
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Skp1-Cullin-F-Box-Proteinkomplex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> ; Größenausschlusschromatographie
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salinelösung
TBSTT	Tris-gepufferte Salinelösung + Tween20 + Triton X-100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	ultraviolett
VIS	<i>visible</i> (sichtbares Licht)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YEB	<i>yeast extract broth</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
YFP ^C	<i>yellow fluorescent protein</i> C-terminaler Teil
YFP ^N	<i>yellow fluorescent protein</i> N-terminaler Teil

1 Einleitung

Pflanzen sind einer Vielzahl von Umweltfaktoren wie z. B. Trockenstress, Befall durch Pathogene oder Verwundungen durch Herbivoren ausgesetzt. Als sessile Organismen sind sie aber nicht in der Lage, sich diesen veränderlichen Umweltbedingungen durch Flucht aktiv zu entziehen. Daher haben sie im Verlauf der Evolution eine Vielzahl von Verteidigungsstrategien entwickelt, welche auf chemischen Signalen und Wirkstoffen basieren (Wasternack *et al.*, 2006). Beispiele für solche Verteidigungsstrategien gegen Herbivoren sind z. B. die Verbreitung von Lockstoffen zur Anlockung von Insektivoren (Birkett *et al.*, 2000), oder die Bildung von Proteinaseinhibitoren (PINs, Farmer & Ryan, 1990) und Aminosäuremetabolisierenden Enzymen (Chen *et al.*, 2005), welche die Verdauungsprozesse in den Herbivoren beeinflussen. Außerdem können von Pflanzen giftige Stoffe, wie z. B. Nicotin, gebildet und eingelagert werden (Steppuhn *et al.*, 2004; Steppuhn & Baldwin, 2007). Allen Prozessen geht die Bildung von Jasmonaten voraus. Zu den Jasmonaten gehören die Jasmonsäure (JA), die Vorstufe 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) und die von der JA abgeleiteten Derivate. Zu diesen gehören z. B. der Jasmonsäuremethylester (JAME) und das Aminosäurekonjugat Jasmonoylisoleucin (JA-Ile).

Die erste Isolierung von JAME erfolgte 1962 aus dem ätherischen Öl von *Jasminum grandiflorum* (Demole *et al.*, 1962). Dabei konnte jedoch noch keine physiologische Funktion charakterisiert werden (Demole *et al.*, 1962). Die ersten beschriebenen physiologischen Funktionen sind die Seneszenz-fördernde Wirkung von JAME und die wachstumsinhibierende Wirkung von JA (Ueda & Kato, 1980; Dathe *et al.*, 1981). Beide beschriebenen Wirkungen von JA bzw. JAME stellen noch keinen Zusammenhang zur Verwundung her. Der erste direkte Nachweis, dass Jasmonat bzw. JAME in Zusammenhang mit der Verwundungsreaktion von Pflanzen stehen, konnte von Farmer und Ryan (1990) erbracht werden. In dieser Arbeit wurde die Induktion der Synthese von PINs nach Verwundung gezeigt. Die Synthese stellt eine Art Immunisierung dar, da die PINs, wenn sie bereits in der Pflanze vorhanden sind, bei einem erneuten Insektenfraß direkt im Darm des Herbivoren aktiv sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das volatile JAME auch Nachbarpflanzen „immunisieren“ kann (Farmer & Ryan, 1990).

1.1 Jasmonat-Biosynthese

Die Biosynthese von JA startet mit der Freisetzung von α -Linolensäure (α -LeA) aus den Galaktolipiden der Chloroplastenmembran durch eine Phospholipase (Abb. 1, ①). Die Identifizierung dieser Phospholipase war und ist ein Objekt zahlreicher Untersuchungen. Erste Hinweise auf eine an der JA-Biosynthese beteiligten Phospholipase wurden 1999 berichtet, hierbei handelt es sich um eine durch Verwundung induzierbare Phospholipase A_2 (Narváez-Vásquez *et al.*, 1999). Kurze Zeit später wurde die *defective in anther dehiscence* (DAD)-like Phospholipase A_1 identifiziert (Ishiguro *et al.*, 2001), die Fettsäuren aus der sn-1 Position der chloroplastidären Galaktolipide freisetzt und nachweislich an der JA-Biosynthese beteiligt ist, aber ausschließlich in der Blüte exprimiert wird. 2008 wurde mit DONGLE (DGL) eine weitere Phospholipase beschrieben. Diese gehört zur gleichen Familie wie die DAD-like Phospholipase A_1 , wird aber in den vegetativen Organen exprimiert (Hyun *et al.*, 2008). Während DAD in der späten Phase der Verwundungsreaktion eine Rolle zu spielen scheint, wurde für DGL eine Beteiligung in der frühen Phase beschrieben. Zusätzlich wurde für beide Lipasen die „Grundversorgung“ der entsprechenden Organe mit JA diskutiert (Hyun *et al.*, 2008).

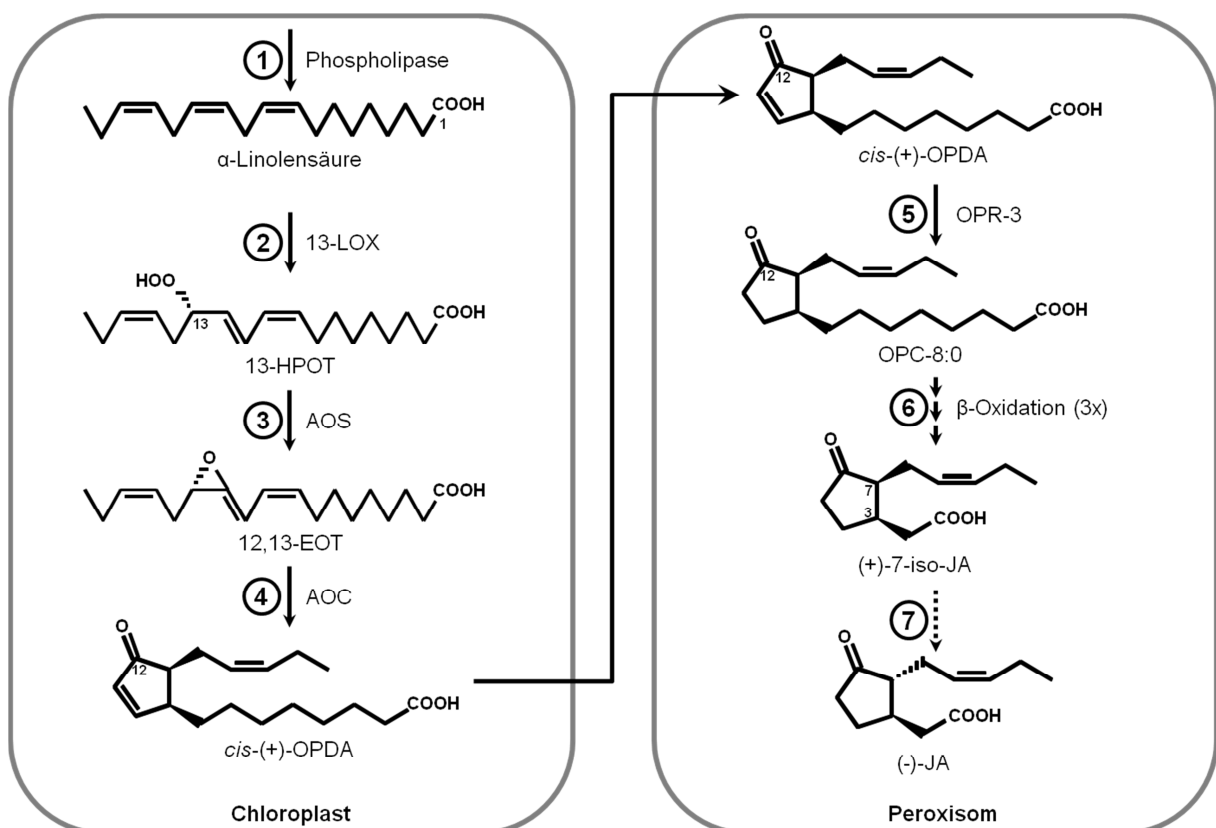


Abb. 1: Schematische Darstellung der Jasmonat-Biosynthese. Die Schritte 1 und 2 gehören zum Lipoxygenase-Syntheseweg. Erst mit Schritt 3 (AOS-Reaktion) wird die Synthese von JA festgelegt.

Weiterführende Untersuchungen zu DAD und DGL zeigten allerdings, dass beide Phospholipasen wahrscheinlich nur einen indirekten Effekt auf die Biosynthese von JA haben. So sind an der Freisetzung von α -Linolensäure, als Beginn der JA-Biosynthese, eine Vielzahl von redundanten Lipasen direkt oder indirekt beteiligt (Ellinger *et al.*, 2010).

Die im ersten Schritt der JA-Biosynthese freigesetzte α -LeA wird im zweiten Schritt von Lipoxygenasen (LOX) zu Hydroperoxyfettsäuren oxygeniert (Abb. 1, ②). Diese Reaktion kann am C-Atom 9 bzw. 13 stattfinden (Feussner & Wasternack, 2002). Aus α -LeA entstehen so die Hydroperoxide 13(S)-Hydroperoxyoctatriensäure (13-HPOT) oder 9(S)-Hydroperoxyoctatriensäure (9-HPOT), katalysiert durch eine 13-LOX bzw. 9-LOX. Das Produkt der Lipoxygenasereaktionen ist allerdings nicht der Synthese von Jasmonat vorbehalten. Vielmehr dient die gebildete Hydroperoxyfettsäure als Substrat für eine Vielzahl von weiteren Enzymen (Feussner & Wasternack, 2002). In Tab. 1 sind diese mit den gebildeten Produkten von 13-HPOT ausgehend zusammengefasst. Alle diese Produkte gehören zu den Oxylipinen, so auch die Gruppe der Jasmonate, welche JA, JAME, JA-Ile und weitere Derivate umfasst.

Tab. 1: Enzyme und deren Reaktionsprodukte mit 13-HPOT als Substrat (Feussner & Wasternack, 2002)

Enzym	Produkt
Allen-Oxid-Synthasen (AOS)	Octadecanoide und Jasmonate
Peroxygenasen	Epoxyhydroxy-PUFAs ¹
Hydroperoxy-Lyasen (HPL)	Aldehyde, ω -Fettsäuren und Alkohole
Divinyl-Ether-Synthasen	Divinyl-Ether-PUFAs
Epoxy-Alkohol-Synthasen	Epoxyhydroxy-PUFAs
Lipoxygenasen (LOX)	Keto-PUFAs
Reduktasen	Hydroxy-PUFAs

Der nachfolgende Schritt der Jasmonatbiosynthese wird von der Allenoxidsynthese (AOS) katalysiert (Abb. 1, ③). Sie ist das erste JA-spezifische Enzym und wurde bereits 1966 anhand der Umwandlung von 13-HPOD (Hydroperoxydiensäure, Derivat der Linolsäure) in α -Ketol postuliert (Zimmerman, 1966). Das α -Ketol ist aber vielmehr ein Hydrolyseprodukt des von der AOS gebildeten Allenoxids (12,13(S)-Epoxyoctadecatriensäure, 12,13-EOT, Abb. 1), welches im wässrigen Milieu und bei 0 °C eine Halbwertszeit von lediglich 33 s besitzt (Vick & Zimmerman, 1987). Die erste Charakterisierung einer AOS gelang 1991 nach

¹ PUFA = *polyunsaturated fatty acid*

der Isolierung aus Flachssamen (Song & Brash, 1991). Später gelang die Klonierung der AOS aus Flachssamen und die Charakterisierung als Hämprotein, welches zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme gehört (Song *et al.*, 1993). Die AOS und andere Cytochrom-P450-Enzyme haben ähnliche spektrale Eigenschaften, eine Aminosäureidentität von $\leq 25\%$ und besitzen ein Häm-bindendes Cystein. Dennoch waren in der AOS einige gravierende Unterschiede zu anderen Cytochrom-P450-Enzymen in der normalerweise hochkonservierten C-terminalen Region des Proteins zu finden. Aufgrund dieser Unterschiede wurde mit der AOS die neue Familie der CYP74-Enzyme begründet (Song *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die CYP74-Enzyme auch in weiteren Eigenschaften von den „typischen“ P450-Enzymen abweichen. So benötigen sie keinen molekularen Sauerstoff für die katalysierte Reaktion, keine NAD(P)H-abhängigen Cytochrom-P450-Reduktasen und zeigen eine geringere Affinität zu Kohlenmonoxid (Feussner & Wasternack, 2002). Die Allenoxidsynthase aus *Arabidopsis thaliana* wurde zuerst von Laudert *et al.* (1996) kloniert. Dabei konnten erste Hinweise gefunden werden, dass diese AOS sowohl 13-HPOT als auch 13-HPOD als Substrat verwenden kann. Weitere Arbeiten zur AtAOS zeigten eine duale Aktivität gegenüber 13-HPOT/HPOD und 9-HPOT/HPOD, mit einer höheren Affinität und katalytischen Rate gegenüber dem 13-Substrat (Hughes *et al.*, 2006). Dies ist insoweit ungewöhnlich, da viele der bisher bekannten Allenoxidsynthasen entweder eine 9-AOS oder eine 13-AOS darstellen (Stumpe & Feussner, 2006). Die 13-AOS ist in den Chloroplasten lokalisiert (Maucher *et al.*, 2000; Froehlich *et al.*, 2001), was mit der Lokalisierung der 13-LOX in den Chloroplasten übereinstimmt (Bell *et al.*, 1995; Bachmann *et al.*, 2002). Die 9-LOX und die 9-AOS sind im Zytoplasma lokalisiert (Feussner & Wasternack, 2002; Mosblech *et al.*, 2009).

Der letzte in den Chloroplasten stattfindende Schritt der JA-Biosynthese wird von der Allenoxidzyklase (AOC) katalysiert (Abb. 1, ④). Dementsprechend besitzt die AOC eine chloroplastidäre Signalsequenz (Tab. 12, Anhang S. 84; Ziegler *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2008). Die erste Aufreinigung und Charakterisierung einer AOC erfolgte aus getrockneten Maissamen, wobei Hinweise auf eine Multimerbildung der AOC beobachtet werden konnten (Ziegler *et al.*, 1997). Das Substrat der AOC ist das von der AOS gebildete, kurzlebige, Allenoxid, welches in Abwesenheit der AOC spontan und unspezifisch in α -Ketol und γ -Ketol zerfällt, oder in racemische 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) zyklisiert (Abb. 2).

Da *in vivo* lediglich das enzymatisch gebildete, reine Enantiomer 9(S),13(S)-12-oxo-PDA nachgewiesen werden konnte (Ziegler *et al.*, 2000), wurde eine Interaktion zwischen AOS und AOC vermutet. Diese Interaktion zwischen AOS und AOC scheint aber nicht notwendig, um die spontane Umwandlung des Allenoxids *in vivo* zu verhindern (Zerbe *et al.*, 2007). Der von der AOC katalysierte Ringschluss gilt als einer der wichtigsten Schritte der JA-

Familie der Lipocaline gezählt (Grzyb *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2006). Diese Proteinfamilie ist stark heterogen und deren Mitglieder werden nicht aufgrund von Sequenzhomologien, sondern aufgrund von Strukturähnlichkeiten charakterisiert (Flower, 1996). Das Hauptmerkmal der Lipocaline ist ein antiparalleles acht-strängiges β -barrel, welches die Substratbindetasche umschließt (Flower, 1996). Es war lange bekannt, dass die AOC-katalysierte Reaktion die enantiomere Form in der OPDA generiert wie sie auch in der JA *in planta* vorliegt. Der eigentliche Reaktionsmechanismus konnte aber erst 2008 aufgeklärt werden (Schaller *et al.*, 2008). Für die Reaktion spielen die bereits beschriebene Tasche und die in sie hineinragenden Aminosäuren (AS) eine essenzielle Rolle. Zu diesen zählen eine Reihe hydrophober Aminosäuren (z. B. die Phenylalanine an den Positionen 43, 51 und 85). Eine weitere prominente und konservierte Position ist das Glutamat 23, welches eine negative Ladung in die Bindetasche einbringt und die Öffnung des Oxiranringes begünstigt. Die AS katalysieren nicht nur die Reaktion, sondern führen auch durch sterische Einschränkungen und Stabilisierung des Substrates zur korrekten Bildung des „richtigen“ OPDA-Isomers (Abb. 5; Schaller *et al.*, 2008).

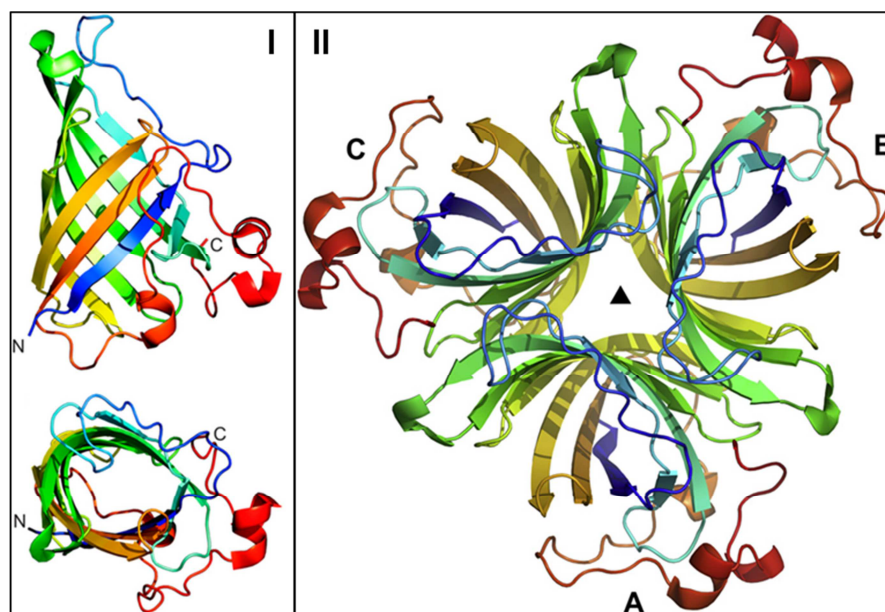


Abb. 4: Räumliche Struktur der AtAOC2. (I) Seitenansicht und Aufsicht des AOC2-Monomers, Farbwechsel von Blau (N-Terminus) zu Rot (C-Terminus). Aus Hofmann *et al.* (2006). (II) Aufsicht des AOC2-Trimers, Blick entlang der Trimerachse. Farbwechsel von Blau (N-Terminus) zu Rot (C-Terminus). Aus Hofmann & Pollmann (2008).

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für AtDIR6, ein Protein der Familie der *dirigent proteins* (DIR), beschrieben (Pickel *et al.*, 2012). Die *dirigent proteins* spielen bei der Synthese von Lignan eine entscheidende Rolle und werden aufgrund ihrer Struktur ebenfalls den Lipocalinen zugeordnet. DIRs sind *in vivo* Dimere und katalysieren die Verknüpfung der radikalen Phenoxy-Komponenten durch Bindung und richtige Positionierung in der hydrophoben Bindetasche. Die Reaktion wird durch die DIRs nicht direkt beschleunigt, es

wird eher die Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen der reaktiven Phenoxy-Komponenten herabgesetzt (Pickel *et al.*, 2012). Dabei begünstigt, wie bei der AOC, die richtige Positionierung der Substrate die Synthese der sterisch reinen Produkte (8-8'-verknüpfte Lignane, DIR; 9(S),13(S)-ODPA, AOC).

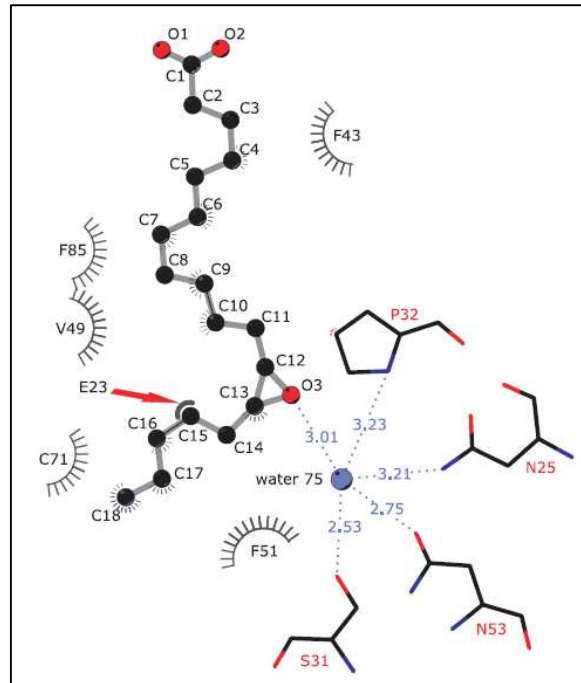


Abb. 5: Darstellung der molekularen Interaktionen der *AtAOC2* mit gebundener Vernolsäure. Hydrophobe Interaktionen sind mit gestrichelten Bögen dargestellt. Der Einfluss der negativen Ladung von Glu23 ist als roter Pfeil dargestellt. Die Interaktionen mit dem konservierten Wasser75 sind als blaue, gestrichelte Linien dargestellt. Aus Schaller *et al.* (2008).

Die nachfolgenden Schritte der JA-Biosynthese werden nicht mehr in den Chloroplasten, sondern in den Peroxisomen katalysiert. Der eigentliche Transfer des ODPA aus den Chloroplasten in die Peroxisomen ist nicht vollständig geklärt (Wasternack, 2007). Es gibt Anhaltspunkte für einen Transport von OPDA bzw. OPDA-CoA Estern in die Peroxisomen durch den ABC-Transporter COMATOSE (CTS, Theodoulou *et al.*, 2005). Allerdings sind die *cts* Deletionsmutanten nicht männlich steril, wie bei einem vollständigen Ausfall der JA-Biosynthese in Arabidopsis zu erwarten wäre (Stintzi & Browse, 2000). Daher werden im Moment zwei Möglichkeiten für den Transport von OPDA in die Peroxisomen angenommen: Erstens der Transport über CTS und zweitens ein bisher unbekannter Transporter bzw. ein passiver Mechanismus wie z. B. das *anion trapping* (Theodoulou *et al.*, 2005).

Der erste Schritt des in den Peroxisomen katalysierten Teils der JA-Biosynthese ist die Reduktion der konjugierten Enonstruktur des OPDA und damit die Bildung der 3-oxo-2-[(Z) pent-2'-enyl]cyclopentan-1-octanolsäure (OPC-8:0). Katalysiert wird dieser Schritt von einer OPDA-Reduktase (OPR; Abb. 1, ©). In *A. thaliana* existieren mindestens sechs Isoformen dieser Reduktase (Schaller & Stintzi, 2009). Von diesen sechs akzeptiert

aber lediglich die OPR3 das physiologisch relevante 9(S),13(S)-OPDA als Substrat und trägt damit zur Bildung von JA bei (Schaller *et al.*, 1998; Strassner *et al.*, 2002). Die Erklärung für diese Selektivität konnte mit der Aufklärung der Kristallstrukturen der OPR1 und OPR3 erbracht werden. Die Bindetasche der OPR3 ist etwas „offener“ und ermöglicht so den leichteren Zugang des Substrates (Breithaupt *et al.*, 2009). Außerdem existieren am Eingang der Bindetasche der OPR1 zwei Tyrosine (Tyr78 und Tyr246), welche als *gatekeeper* fungieren und so die Bindung der 9(S),13(S)-OPDA verhindern (Breithaupt *et al.*, 2001; Breithaupt *et al.*, 2009). Zusätzlich ist nur die OPR3 in den Peroxisomen lokalisiert, die OPR1 und OPR2 wurden dagegen im Zytoplasma gefunden.

Im letzten Schritt der JA-Biosynthese wird die Acylkette der OPC-8:0 in drei aufeinander folgenden β -Oxidationszyklen gekürzt (Abb. 1, ©). Bevor jedoch die β -Oxidation des Fettsäurerestes stattfinden kann, muss der JA-Vorläufer mit CoenzymA aktiviert werden. Katalysiert wird diese Aktivierung von einer 4-Coumarat:CoA-Ligase (4CL), welche eine hohe Aktivität mit langkettigen Fettsäuren und ODPDA besitzt, wobei OPDA das bessere Substrat darstellt (Schneider *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen an 4CL-*like* Proteinen zeigten, dass die Aktivierung von langkettigen Fettsäuren ein allgemeines Merkmal dieser Proteinunterfamilie darstellt. Vier Mitglieder dieser Familie besaßen eine besonders hohe Aktivität mit verschiedenen Vorläufern von JA (Kienow *et al.*, 2008). So wurde eine OPC-8:CoA-Ligase identifiziert, die nach Verwundung bzw. Infektion mit *Pseudomonas syringae* exprimiert wird (Koo *et al.*, 2006; Kienow *et al.*, 2008). Damit wurde sowohl für OPDA als auch für OPC-8:0 eine entsprechende CoA-Ligase identifiziert. Bisher konnten aber keine Hinweise gefunden werden, dass die OPR3 OPDA-CoA-Ester als Substrat akzeptiert (Wasternack, 2007). Das aktivierte OPC-8:0 durchläuft im Anschluss drei β -Oxidationszyklen, welche jeweils durch eine Acyl-CoA-Oxidase (ACX), das Multifunktionale Protein und eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) katalysiert werden. Bisher konnten nur die ACX1 aus Tomate und Arabidopsis (Castillo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005) und die ACX5, ebenfalls aus Arabidopsis (Schillmiller *et al.*, 2007), als beteiligte Enzyme der ACX-Familie identifiziert werden. Die Expression der ACX1 und ACX5 wird in Arabidopsis durch jeweils verschiedene Stimuli induziert, was für unterschiedliche Funktionen spricht (Schillmiller *et al.*, 2007). Für das Multifunktionale Protein AIM1 aus Arabidopsis konnte eine Beteiligung an der Biosynthese von JA beschrieben werden (Delker *et al.*, 2007). In der Mutante *aim1* werden nach Verwundung normale Mengen an ODPDA, aber kein JA gebildet. Aus der Familie der KAT konnten in Arabidopsis die KAT2 und im geringeren Ausmaß die KAT5 als für die JA-Biosynthese relevante Enzyme identifiziert werden (Castillo *et al.*, 2004).

Die gebildete (+)-7-*iso*-JA und ihr Isomer (-)-JA stellen den Endpunkt der eigentlichen JA-Biosynthese (Abb. 1) dar. Das gebildete JA unterliegt aber einem Metabolismus, der zu einer Vielzahl an verschiedenen Derivaten führt (Abb. 6). JA und den davon gebildeten Derivaten,

wie JAME und JA-Ile, wird eine Funktion in der Reaktion auf verschiedene Stimuli zugeordnet, wobei JA-Ile eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Kap. 1.2, S. 10 und Abb. 6; Seo *et al.*, 2001; Staswick & Tiryaki, 2004). Andere Derivate, wie das 12-Hydroxyjasmonat (12-OH-JA), dessen sulfatiertes Derivat (12-OH-JA-Sulfat) und gebildete Glucose-Ester, dienen wahrscheinlich der Inaktivierung von JA (Gidda *et al.*, 2003; Miersch *et al.*, 2008) oder als Speicher bzw. Langstreckentransportform der JA (Swiatek *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte eine Verknüpfung von JA mit ACC (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat) beobachtet werden. Für dieses Konjugat konnte bisher allerdings keine biologische Aktivität bestimmt werden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass über die Verknüpfung von JA mit ACC die jeweilige Verfügbarkeit beider Verbindungen im Gewebe reguliert werden könnte (Staswick & Tiryaki, 2004). Neben der Konjugation von JA mit verschiedenen Komponenten existiert auch die Möglichkeit der Bildung von *cis*-Jasmon (auch Z-Jasmon) durch Decarboxylierung (Koch *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde dieser Decarboxylierung eine Inaktivierung von JA zugeschrieben, allerdings zeigten weitere Arbeiten eine Beteiligung des volatilen *cis*-Jasmons bei der Anlockung von Insektivoren (z. B. Marienkäfer, Birkett *et al.*, 2000). Bisher wurde davon ausgegangen, dass die biologisch aktive Form die (-)-JA und deren Derivate, speziell das Isoleucin-Konjugat, sind. 2009 konnte jedoch gezeigt werden, dass (-)-JA-Ile biologisch inaktiv ist und die aktive Form (+)-7-*iso*-JA-Ile ist (Fonseca *et al.*, 2009). Die bis dahin gefundene Aktivität von (-)-JA-Ile ist auf eine „Verunreinigung“ mit der aktiven Form (+)-7-*iso*-JA-Ile zurückzuführen, da beide Formen durch pH-Verschiebungen in einander umwandelbar sind.

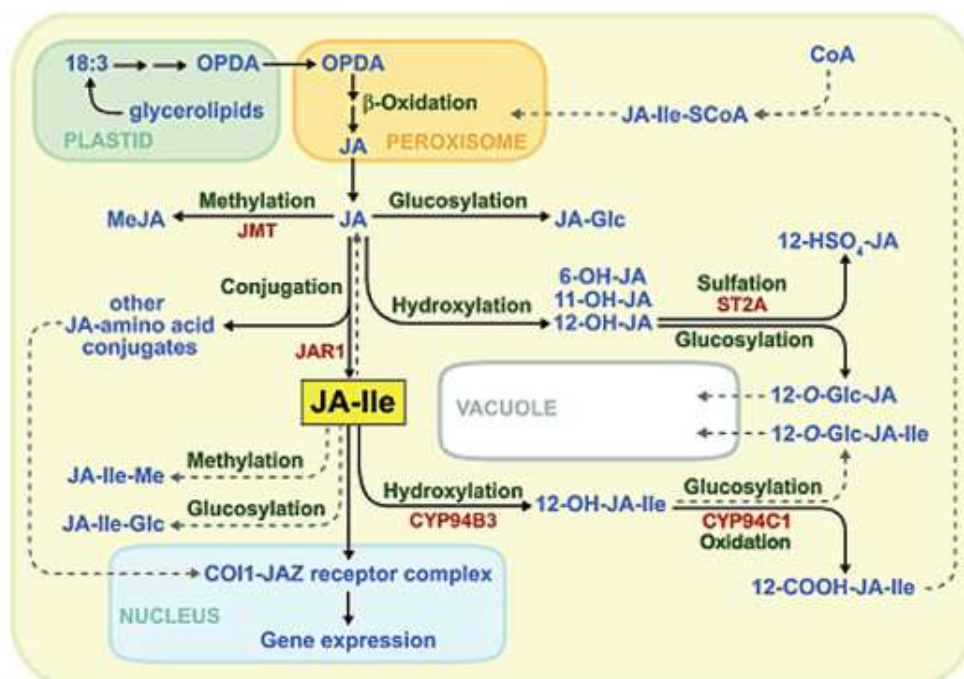


Abb. 6: Übersicht über Biosynthese und Metabolismus von Jasmonat und JA-Ile. Experimentell bestätigte Reaktionen sind in durchgehenden Linien dargestellt, gestrichelte Linien zeigen noch nicht gesicherte oder hypothetische Reaktionen an. Aus Koo & Howe (2012).

1.2 Jasmonat-Signaltransduktion

Die Perzeption des Signals (+)-7-*iso*-JA-Ile erfolgt in der Zelle über eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen. Zentrale Komponenten dieser Signalkette sind ein SCF-Komplex, das 26S-Proteasom, die Familie der JAZ-Proteine (Jasmonat-ZIM-Domäne) und verschiedene Transkriptionsfaktoren (Abb. 7). Bis 1998 war die Signaltransduktion, welche in Folge einer JA-Bildung stattfindet, noch unbekannt. Erst die Identifizierung von COI1 (*coronatine insensitive 1*) als F-Box-Protein und somit Teil eines möglichen SCF-Komplexes führte zu ersten Ideen für eine mögliche Signalkette (Creelman, 1998; Xie *et al.*, 1998). Wenig später konnte auch experimentell nachgewiesen werden, dass es sich bei COI um ein F-Box-Protein handelt. Zum einen konnten Xu *et al.* (2002) zeigen, dass die Mutation einer einzigen Aminosäure im F-Box-Motiv von COI1 die Bildung eines SCF-Komplexes verhindert. Und zum anderen konnte die direkte Interaktion von COI1 mit SKP1-*like* und Cullin *in planta* gezeigt werden (Xie *et al.*, 1998; Devoto *et al.*, 2002), mit denen COI1 eine E3-*like* Ubiquitin-Ligase binden kann. Dieser SCF^{COI}-Komplex bildet die zentrale Komponente des JA-Signalweges. Zur „Übersetzung“ eines JA-Signals in eine spezifische Expression von Genen sind jedoch noch weitere Komponenten nötig. Transkriptionsfaktoren (TF) sind die terminalen Komponenten bei der JA-abhängigen Expression von Genen. Zunächst konnte nur MYC2 als JA-abhängiger TF identifiziert werden, welcher die Transkription JA-responsiver Gene sowohl positiv als auch negativ reguliert (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). Allerdings sind *myc2*-Pflanzen nicht in allen JA-abhängigen Reaktionen defizient. Und so konnten MYC3 und MYC4, welche phylogenetisch stark mit MYC2 verwandt sind, und MYB21 und MYB24 (Mitglieder der R2R3-MYB Familie), als weitere TF identifiziert werden (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). Die Verbindung zwischen dem SCF^{COI}-Komplex und der Aktivierung der TF in Folge eines JA-Ile-Signals konnte 2007 mit den JAZ-Proteinen als „*missing link*“ des JA-Signalweges identifiziert werden (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Diese Proteinfamilie, in *A. thaliana* existieren zwölf Mitglieder, besitzt zwei stark konservierte Domänen. Am C-Terminus der JAZ-Proteine ist die Jas-Domäne lokalisiert. Diese Domäne wurde zunächst als Interaktionsstelle zwischen JAZ und COI in Abhängigkeit von JA-Ile identifiziert (Chini *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008b). Neuere Erkenntnisse zeigten aber auch, dass die Interaktion zwischen JAZ und MYC2 von dieser Domäne vermittelt wird (Chini *et al.*, 2009). Die zweite stark konservierte Domäne ist die ZIM-Domäne, welche eine Interaktionsdomäne zwischen verschiedenen JAZ-Proteinen darstellt (Chini *et al.*, 2009; Chung & Howe, 2009). Die Verbindung von MYC2 zum SCF^{COI}-JAZ Signalweg konnten Chini *et al.* (2007) experimentell zeigen. Außerdem wurden die bereits beschriebenen TF MYC3, MYC4, MYB21 und MYB24 als JAZ-reprimierte TF identifiziert und die Existenz weiterer JAZ-reprimierter TF vermutet

(JAZ-TF-Transkriptom, Katsir *et al.*, 2008a). Die JAZ-Proteine spielen nicht nur bei der Reprimierung/Aktivierung der entsprechenden TF eine wichtige Rolle. Sie sind zusätzlich, zusammen mit COI, für die spezifische Bindung des (+)-7-*iso*-JA-Ile und damit der Perzeption des JA-Signals essenziell (Sheard *et al.*, 2010).

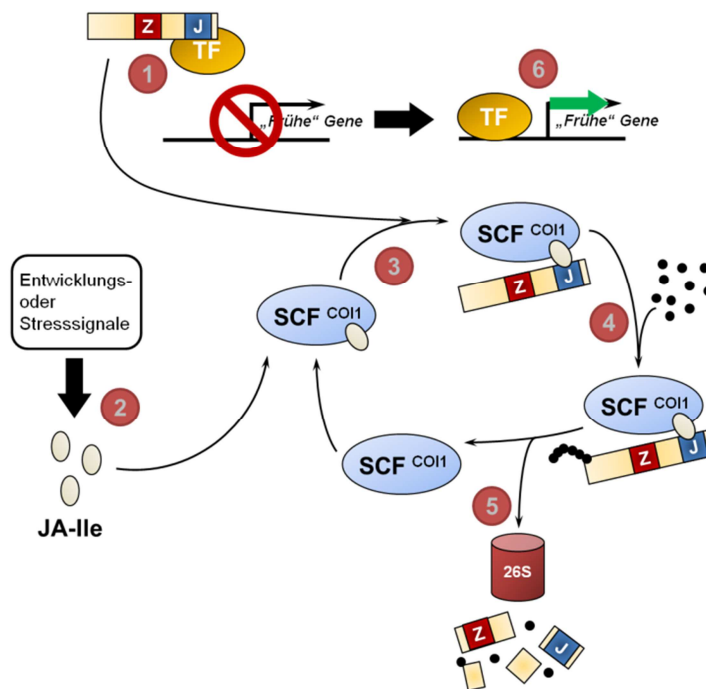


Abb. 7: Schematische Darstellung der JA-Signaltransduktion. Modifiziert aus Katsir *et al.* (2008a).

Aus dem Zusammenspiel der oben beschriebenen Komponenten ist für die JA-abhängige Regulation der Genexpression folgendes Modell vorgeschlagen worden (Abb. 7): Im „inaktiven“ Zustand (kein Signal/wenig JA-Ile) werden die TF (z. B. MYC2, MYC3 oder MYC4) von JAZ-Proteinen gebunden. Es erfolgt keine Expression JA-responsiver Gene (①). Kommt es z. B. zu einer Verwundung der Pflanze, wird JA-Ile in der Zelle gebildet und akkumuliert (②). In Folge dieser Akkumulation wird die spezifische Bindung zwischen dem F-Box-Protein COI und dem Repressor JAZ vermittelt (③), JAZ wird daraufhin ubiquitiniert (④) und über das 26S-Proteasom abgebaut (⑤). Die durch den JAZ-Abbau freigesetzten Transkriptionsfaktoren sind nun in der Lage, die Expression JA-responsiver Gene (z. B. AOC, AOS, JAZ u. v. m.) zu vermitteln (⑥).

1.3 Regulation der Jasmonatbiosynthese

Die Induktion der Expression JA-responsiver Gene wird in Folge eines externen Stimulus, z. B. einer Verwundung, ausgelöst. Dieser Stimulus führt in der Zelle zur Bildung und Akkumulation von JA-Ile, das anschließend in der Lage ist, die Expression zu aktivieren

(Kap. 1.2, S. 10). Zu den exprimierten Genen gehören z. B. alle Gene, welche für die Biosyntheseenzyme kodieren (Wasternack, 2007). Das bedeutet, dass das JA-Ile-Signal die Synthese der für seine Biosynthese benötigten Enzyme aktivieren kann. Diese *positive-feedback*-Regulation kommt allerdings nur bei langfristigen Prozessen (z. B. Entwicklungsprozesse oder wiederholtes Verwunden der Pflanze) zum Tragen. Experimentell gibt es für diesen Mechanismus, welcher einer von drei Mechanismen bei der Regulation der JA-Biosynthese ist, verschiedene Hinweise. In JA-defizienten Mutanten, z. B. *opr3*, *coi1*, kann eine verringerte AOC-Expression gemessen werden (Stenzel *et al.*, 2003b). In Mutanten, welche ein konstitutiv erhöhtes JA-Level zeigen (z. B. *cev*), konnte dagegen eine erhöhte Expression der AOC bestimmt werden (Ellis *et al.*, 2002). Beide Untersuchungen weisen darauf hin, dass JA seine eigene Biosynthese beeinflusst.

Ein wesentlich direkterer Mechanismus zur Regulation der JA-Biosynthese ist die Substratverfügbarkeit. In einem vollständig entwickelten Blatt sind die Biosyntheseenzyme LOX, AOS und AOC abundant vorhanden. Dennoch ist ein exogener Stimulus notwendig, um JA-Ile zu bilden (Laudert & Weiler, 1998; Stenzel *et al.*, 2003b). Werden z. B. die AOS oder die AOC konstitutiv exprimiert, ist im ungestressten Gewebe keine erhöhte Menge an JA nachweisbar. Wird diese Pflanze aber verwundet, steigt der JA Gehalt schneller als in Wildtyp-Pflanzen an (Laudert *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003a). Diese Ergebnisse deuten auf eine Freisetzung der benötigten Substrate für die JA-Biosynthese z. B. nach einer Verwundung hin.

Ein dritter Regulationsmechanismus liegt in dem zell- und gewebsspezifischen Vorkommen der JA-Biosyntheseenzyme (Schillmiller & Howe, 2005). Untersuchungen zur Promoteraktivität der *AtAOS* zeigten eine differenzierte Expression in verschiedenen Geweben (Kubigsteltig *et al.*, 1999). Die Expression der vier *AtAOC* kodierenden Gene zeigte ebenfalls eine räumliche und zeitliche Differenzierung, welche eine Regulierung der JA-Biosynthese über die Verfügbarkeit verschiedener Isoformen in unterschiedlichen Geweben vermuten lässt (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung; Abb. 3).

1.4 Zielstellung

Jasmonate sind als Signalstoffe sowohl an der Steuerung von Entwicklungsprozessen als auch an Abwehrreaktionen gegen Pathogene und Herbivoren beteiligt. Die Biosynthese von JA muss daher strikt reguliert werden. Welchen Effekt eine „fehlerhafte“ Regulation haben kann, zeigt die *coi*-Mutante. In *Arabidopsis thaliana* resultiert eine *coi*-Deletion in männlich sterilen und JA-insensitiven Pflanzen (Xu *et al.*, 2002). Diese zeigen keine Expression JA-responsiver Gene und sind so z. B. in ihren Abwehrreaktionen defizient.

Die Regulation der Genexpression (Kap. 1.2, S. 10) und die in Kap. 1.3 (S. 11) beschriebenen Mechanismen (*positive-feedback*-Regulation, Substratverfügbarkeit und das zell- und gewebsspezifische Vorkommen der Biosyntheseenzyme) beeinflussen die JA-Biosynthese unabhängig von der jeweiligen Aktivität der beteiligten Enzyme. Eine Regulation der Biosynthese über die Enzymaktivität ist jedoch ein weiterer und weit verbreiteter Mechanismus. Dabei kann die Multimerisierung von Proteinen eine große Rolle spielen.

Ein Beispiel für die Regulation der enzymatischen Aktivität in Folge einer Multimerisierung ist die OPR3. Dieses Enzym katalysiert während der JA-Biosynthese die Reduktion der konjugierten Enonstruktur des OPDA zu OPC-8:0 (Kap. 1.1, S. 2). Katalysiert wird die Reaktion von Monomeren der OPR3, *in vivo* wurden jedoch Homodimere gefunden, welche enzymatisch nicht aktiv waren (Breithaupt *et al.*, 2006). Diese Selbstinhibierung durch Homodimerisierung könnte einen Beitrag zur „Feinjustierung“ der JA-Biosynthese leisten.

Ein weiteres Beispiel sind die JAZ-Proteine. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der JA-Signaltransduktion (Kap. 1.2, S. 10) und sind ebenfalls in der Lage, Homo- und auch Heterodimere zu bilden (Chini *et al.*, 2009; Chung & Howe, 2009). Die Menge der identifizierten Heteromere lassen für die JAZ-Proteine den Schluss zu, dass verschiedene Kombinationen an JAZ-Proteinen in den Heterodimeren zur differenzierten Expression von JA-responsiven Genen in Folge eines JA-Signales führen könnte (Chung & Howe, 2009).

Die Regulation der enzymatischen Aktivität der 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Synthase (ACS) ist ein weiteres Beispiel für die Änderung der Aktivität in Folge einer Multimerisierung. Von der ACS wird 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC), eine Vorstufe von Ethylen, synthetisiert. Dieses Enzym katalysiert damit den entscheidenden Schritt der Ethylenbiosynthese (Zarembinski & Theologis, 1994). Von den neun Isoformen bilden acht Isoformen aktive Enzyme (ACS2, ACS4-ACS9 und ACS11), die ACS1 ist eine nicht aktive Isoform (Yamagami *et al.*, 2003; Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Alle Isoformen sind in der Lage, Homodimere zu bilden (Zarembinski & Theologis, 1994). Die räumlich und zeitlich überlappende Expression und die Fähigkeit, Heterodimere zu bilden, welche unterschiedlich aktiv sind, ließen für die ACS den Schluss zu, dass über die Heteromerisierung eine „Feinjustierung“ der Ethylenbiosynthese stattfinden kann (Tsuchisaka & Theologis, 2004a; Tsuchisaka & Theologis, 2004b; Tsuchisaka *et al.*, 2009).

Die Allenoxidzyklase (AOC) ist zentraler Bestandteil der Biosynthese von JA, da dieses Enzym die Stereospezifität der JA festlegt (Ziegler *et al.*, 2000). Vor dem Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die AOC *in planta* als Trimer vorkommt (Hofmann *et al.*, 2006). Außerdem konnte in *Arabidopsis* eine kleine Genfamilie von vier Mitgliedern für die AOC identifiziert werden (Stenzel *et al.*, 2003b), wobei diese vier Mitglieder in *Arabidopsis* in verschiedenen Organen überlappend exprimiert werden (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung). Das

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Heteromerisierung der *AtAOC*-Proteine sowohl *in vitro* als auch *in planta* zu zeigen und eine mögliche Änderung der enzymatischen Aktivität in Folge der Heteromerisierung zu untersuchen. Eine solche Änderung in der enzymatischen Aktivität könnte eine weitere Stufe der Regulierung der JA-Biosynthese sein und würde eine „Feineinstellung“ zulassen. Die Kenntnis einer solchen Feineinstellung würde die Wirkungsweise und die Bildung von JA in verschiedenen Geweben in Folge einer Verwundung oder eines Wachstumsstimulus genauer verständlich machen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung relativer Transkriptmengen wurde die quantitative *real time* RT-PCR eingesetzt.

Hierzu diente aus *N.-benthamiana*-Blattmaterial isolierte (Qiagen Plant RNeasy Kit, Hilden, Deutschland), am NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) quantifizierte und zur Verwendung in der *real time* RT-PCR in cDNA umgeschriebene mRNA.

2.1.1.1 cDNA Synthese

Zur Übersetzung der isolierten mRNA in cDNA kam die M-MLV RT (H-) reverse Transkriptase der Firma Promega (M3683) zum Einsatz.

20 µl Reaktionsansatz	1 µg	Gesamt-RNA
	1 µl	Oligo dT 19 Primer, 10 mM
	ad 14 µl	H ₂ O _{bidest.}

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert, danach in Eiswasser abgekühlt. Im Anschluss wurden 6 µl des RT-Mastermixes dazugegeben.

RT-Mastermix	4 µl	5x Reaktionspuffer M-MLV RT
	1 µl	10 mM dNTP
	1 µl	M-MLV RT (H-) 200 U/µl

Die Inkubation des gesamten Ansatzes erfolgte bei 42 °C für 50 min, anschließend wurde die Reaktion für 15 min bei 70 °C abgestoppt.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.1.1.2 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde der Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (600828, Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

Zu Beginn wurde die synthetisierte cDNA (Kap. 2.1.1.1, S. 15) 1:10 und der Referenzfarbstoff (ROX) 1:500 in H₂O_{bidest.} verdünnt. Für jede verwendete Primerkombination (Tab. 2) wurde anschließend ein eigener Mastermix hergestellt.

qRT-PCR Mastermix, je Probe	5 µl 0,15 µl 2 µl	Brilliant II SYBR Green qRT-PCR Mastermix 2x ROX (1:500) Primergemisch (2 µM je Primer)
--------------------------------	-------------------------	---

Der Reaktionsansatz enthielt 3 µl 1:10 verdünnte cDNA und 7 µl des jeweiligen Mastermixes. Die Reaktion wurde in einem Mx3000P oder Mx3005P Multiplex Quantitative PCR System von Stratagene (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

qRT-PCR Reaktionszyklus	10 min	95 °C
	30 s	95 °C
	1 min	60 °C
40 Zyklen, Messung am Ende jedes Zyklus		
	1 min	60 °C bis 95 °C
Messung während des Aufschmelzens		

Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde von allen Proben eine Schmelzkurve aufgenommen. Die Berechnung der C_T-Werte (*threshold cycle*) erfolgte mit der MxPRO Gerätesoftware (Stratagene, V4.10). Die relativen Transkriptmengen wurden im Anschluss mit Excel (Kap. 2.1.1.3, S. 17) berechnet.

Tab. 2: Primerübersicht für die qRT-PCR

	forward	reverse
<i>N. benthamiana</i> AOC	GCACATCAACACCCCACT	CCGTCTGAGTTGCTGGTT
<i>N. tabacum</i> RPS6	GACAATGCATCCACGGACAGAC	TTTAACTCCAGGCCGTGTTCC

2.1.1.3 Auswertung qRT-PCR

Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge des Zielgens (ZG) in Bezug auf das Referenzgen (RG) wurde aus den mit der MxPRO Software ermittelten C_t -Werten der ΔC_t -Wert über folgende Formel bestimmt:

$$\Delta C_t = C_{t\text{ZG}} - C_{t\text{RG}}$$

Der so gewonnene ΔC_t -Wert stellt einen logarithmischen Wert dar. Dieser kann in eine n-fache Expression (ZG zu RG) umgerechnet werden:

$$\text{n-fache Expression (ZG zu RG)} = 2^{-\Delta C_t}$$

Diese n-fache Expression kann im Anschluss in Relation zu den verwendeten Kontrollproben gesetzt werden. Dabei kann die Expression der behandelten Proben (BP) als Vielfaches der Kontrollproben (K) dargestellt werden, dies entspricht der $\Delta\Delta C_t$ -Methode:

$$\text{n-fache Expression (BP zu K)} = \frac{\text{n-fache Expression } \left(\frac{\text{ZG}}{\text{RG}}\right)_{\text{BP}}}{\text{n-fache Expression } \left(\frac{\text{ZG}}{\text{RG}}\right)_{\text{K}}}$$

2.1.2 Vektoren

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Name	Insert	Resistenz	Bemerkung	Herkunft
pQE30::AOC1	hisAOC1	Ampicillin	Expression His-tag AOC1	Arbeitsgruppe
pQE30::AOC2	hisAOC2	Ampicillin	Expression His-tag AOC2	Arbeitsgruppe
pQE30::AOC3	hisAOC3	Ampicillin	Expression His-tag AOC3	Arbeitsgruppe
pQE30::AOC4	hisAOC4	Ampicillin	Expression His-tag AOC4	Arbeitsgruppe
pQE30::hisAOC1 ::strepAOC2	hisAOC1 / strepAOC2	Ampicillin	Expression His-tag AOC1 / Strep-tag AOC2	diese Arbeit
pQE30::hisAOC3 ::strepAOC1	hisAOC1 / strepAOC3	Ampicillin	Expression His-tag AOC3 / Strep-tag AOC1	diese Arbeit
pQE30::hisAOC3 ::strepAOC2	hisAOC1 / strepAOC4	Ampicillin	Expression His-tag AOC3 / Strep-tag AOC2	diese Arbeit
pQE30::hisAOC4 ::strepAOC1	hisAOC2 / strepAOC3	Ampicillin	Expression His-tag AOC4 / Strep-tag AOC1	diese Arbeit
pQE30::hisAOC4 ::strepAOC2	hisAOC2 / strepAOC4	Ampicillin	Expression His-tag AOC4 / Strep-tag AOC2	diese Arbeit
pUC-SPYNE::AOC1	AOC1-YFP ^N	Ampicillin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC1	diese Arbeit
pUC-SPYNE::AOC2	AOC2-YFP ^N	Ampicillin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC2	diese Arbeit
pUC-SPYNE::AOC3	AOC3-YFP ^N	Ampicillin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC3	diese Arbeit
pUC-SPYNE::AOC4	AOC4-YFP ^N	Ampicillin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC4	diese Arbeit
pUC-SPYCE::AOC1	AOC1-YFP ^C	Ampicillin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC1	diese Arbeit
pUC-SPYCE::AOC2	AOC2-YFP ^C	Ampicillin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC2	diese Arbeit
pUC-SPYCE::AOC3	AOC3-YFP ^C	Ampicillin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC3	diese Arbeit
pUC-SPYCE::AOC4	AOC4-YFP ^C	Ampicillin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC4	diese Arbeit

Name	Insert	Resistenz	Bemerkung	Herkunft
pUC::pt-YFP	pt-YFP	Ampicillin	YFP mit Plastidensignal	Arbeitsgruppe
pUC::pt-N-YFP	pt-YFP ^N	Ampicillin	N-Terminus YFP mit Plastidensignal	diese Arbeit
pUC::pt-C-YFP	pt-YFP ^C	Ampicillin	C-Terminus YFP mit Plastidensignal	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYNE::AOC1	AOC1-YFP ^N	Kanamycin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC1; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYNE::AOC2	AOC2-YFP ^N	Kanamycin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC2; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYNE::AOC3	AOC3-YFP ^N	Kanamycin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC3; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYNE::AOC4	AOC4-YFP ^N	Kanamycin	BiFC; N-Terminus YFP, AOC4; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYCE::AOC1	AOC1-YFP ^C	Kanamycin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC1; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYCE::AOC2	AOC2-YFP ^C	Kanamycin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC2; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYCE::AOC3	AOC3-YFP ^C	Kanamycin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC3; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS-SPYCE::AOC4	AOC4-YFP ^C	Kanamycin	BiFC; C-Terminus YFP, AOC4; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS::35S-AOC1-GUS	35S-AOC1-GUS	Kanamycin	GUS-Fusionsprotein; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS::35S-AOC2-GUS	35S-AOC2-GUS	Kanamycin	GUS-Fusionsprotein; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS::35S-AOC3-GUS	35S-AOC3-GUS	Kanamycin	GUS-Fusionsprotein; binärer Vektor	diese Arbeit
pBINPLUS::35S-AOC4-GUS	35S-AOC4-GUS	Kanamycin	GUS-Fusionsprotein; binärer Vektor	diese Arbeit

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinexpression

Die Plasmidkonstrukte zur Expression (siehe Tab. 3) wurden in den Überexpressionsstamm *E. coli* M15 transformiert.

Eine über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubierte Vorkultur (50 ml) wurde in frisches LB-Medium (800 ml) überführt und weiter für etwa 3 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert ($OD_{600} \approx 1$). Die Induktion der Expression der Proteine erfolgte durch die Zugabe eines Induktors (Vgl. S. 19). Anschließend wurden die Kulturen zur Expression weitere 4 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4 °C). Das Medium wurde abgenommen, die Zellpellets in Puffer A oder HGNE D A resuspendiert (30 ml/2 Kulturen) und bei -80 °C bis zur Reinigung gelagert.

HGNE D A	25	mM	HEPES (pH 8,0)
	300	mM	NaCl
	10	%	Glycerin
	0,05	%	Tween20
Puffer A	100	mM	Tris (pH 8,0)
	300	mM	NaCl
	10	%	Glycerin
	0,05	%	Tween20

2.2.2 Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte für 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden je 30 ml Zellsuspension 40 mg Lysozym zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Der Aufschluss erfolgte nach der Zugabe von 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Sigma GmbH, Osterode, Deutschland) mittels Ultraschall (2 × 10 min, Bandelin Sonoplus HD2070 MS72, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland). Das erhaltene Zelllysate wurde dann für 30 min bei 4 °C und 15000g zentrifugiert und der Überstand zur Proteinreinigung eingesetzt.

2.2.3 Native Proteinreinigung

Zur Reinigung der überexprimierten Proteine aus *E. coli* M15 wurde ein Äkta Explorer System (GE Healthcare, München, Deutschland) eingesetzt. Als stationäre Phasen dienen StrepTrap HP, 1 ml (Strep-tag, 28-9075-46) und HisTrap HP, 5 ml (His-tag, 17-5248-02) Säulen. Beide Typen wurden von GE Healthcare bezogen.

2.2.3.1 Native Proteinreinigung mittels des Strep-tag® II Systems

Mit Hilfe des Strep-tag® II Überexpressionssystems können exprimierte Proteine in einer Einschritt-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung des Ziel-Proteins wird N-terminal ein Strep-tag-II angefügt, der aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) besteht. Dieser Strep-tag bindet spezifisch an StrepTactin, dem verwendeten Säulenmaterial. Unspezifisch bindende Proteine können während eines Waschschrtes entfernt werden, während das Ziel-Protein spezifisch durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin von der Säule eluiert wird.

Der tag beeinflusst normalerweise weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Die Induktion der Expression erfolgt mittels Anhydrotetracyclin (AHT, 200 µg/l).

Die verwendete StrepTrap HP, 1 ml Säule wurde zunächst äquilibriert (Puffer A oder HGNE D A). Anschließend wurde mit Zelllysate beladen, ungebundene Proteine durch Waschen mit dem entsprechenden Puffer entfernt und Zielproteine mit Elutionspuffer eluiert. Zum Schluss wurde das Säulenmaterial durch Spülen mit Regenerationspuffer regeneriert.

Elutionspuffer	2,5 mM	Desthiobiotin in Puffer A oder HGNE D A
Regenerationspuffer	1 mM	HABA (2-(4-Hydroxy-phenylazo)benzoesäure)

2.2.3.2 Native Proteinreinigung mittels des His-*tag*-Systems

Mit Hilfe des His-*tag*-Überexpressionssystems können exprimierte Proteine in einer Einschritt-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung des Ziel-Proteins wird N-terminal ein His-*tag* angefügt, der aus sechs Histidin-Molekülen (HHHHHH) besteht. Dieser His-*tag* bindet spezifisch an Ni-NTA-Agarose, dem verwendeten Säulenmaterial. Unspezifisch bindende Proteine können während eines Waschschrattes entfernt werden. Das Ziel-Protein eluiert spezifisch durch Austausch der Bindung mit Imidazol von der Säule. Die Induktion der Expression erfolgt mittels Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 1 mM). Die verwendete HisTrap HP, 5 ml Säule wurde zunächst äquilibriert (Puffer A oder HGNE D A). Anschließend wurde mit Zellysat beladen, ungebundene Proteine durch Waschen mit dem entsprechenden Puffer entfernt und Zielproteine mit Elutionspuffer eluiert. Zum Schluss wurde das Säulenmaterial durch Spülen mit Puffer regeneriert.

Elutionspuffer	400 mM	Imidazol in Puffer A oder HGNE D A
----------------	--------	--

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels des BCA-Testes

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA-Tests (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit; Sigma GmbH, Osterode, Deutschland) ermittelt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers mit einem auf 40 μ l verringertem Probenvolumen verfahren.

Eine entsprechende Eichgerade wurde durch Verdünnen einer Standard-Lösung aus Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Die Inkubation erfolgte bei 60 °C für 1 h.

Die Bestimmung der Absorption erfolgte mit einem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.5 SDS-PAGE

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die dabei verwendeten Glasplatten hatten eine Abmessung von 10,1 x 8,2 x 0,075 cm.

2.2.5.1 Probenvorbereitung

Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei Raumtemperatur, 42 °C oder 95 °C denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung der Proben mit Hilfe einer Mikroliterspritze auf das Gel.

SDS-Probenpuffer	125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	20 g/l	SDS
	50 %	Glycerin
	5 %	β-Mercaptoethanol
	0,01 g/l	Bromphenolblau

2.2.5.2 Proteinmarker

Zur Größenabschätzung der getrennten Proteine wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, SM1811) verwendet.

2.2.5.3 Lineare SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Die Konzentration der Gele betrug 12 %.

Trenngel (5 ml)	1,5 ml	Acrylamid; 37,5:1; 40 %
	2,175 ml	H ₂ O
	1,25 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	25 µl	20 % SDS
	2,5 µl	TEMED
	50 µl	10 % APS

Das Gelgemisch wurde nach vorsichtigem Mischen luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml Wasser überschichtet, welches nach Polymerisierung des Trenngels entfernt wurde. Das Sammelgel zur Aufnahme und Konzentrierung der Proben wurde auf das Trenngel gegeben und zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt.

Sammelgel (2 ml)	200	µl	Acrylamid; 37,5:1; 40 %
	1,28	ml	H ₂ O
	500	µl	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	10	µl	20 % SDS
	2,5	µl	TEMED
	20	µl	10 % APS

Der Elektrodenpuffer wurde in Anoden- und Kathodenraum der Elektrophoresekammer gegeben.

Elektrodenpuffer	14,4	g/l	Glycin
	3	g/l	Tris
	1	g/l	SDS

Die Trennung der Proben erfolgte in zwei Schritten: (1) Konzentrierung der Proben für 15 min mit 85 V und (2) Trennung der Proben für 45 min bei 135 V.

Die Gele wurden anschließend mit Coomassie (Kap. 2.2.6, S. 22) gefärbt oder für eine Western-Blot-Analyse (Kap. 2.2.7, S. 23) verwendet.

2.2.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mindestens 30 min oder über Nacht in Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärberlösung.

Färbelösung	40	%	Ethanol
	10	%	Essigsäure
	0,1	%	Coomassie G-250
Entfärberlösung	40	%	Ethanol
	7,5	%	Essigsäure

2.2.7 Western-Blot-Analyse

Zur Detektion von Proteinen durch Antikörper wurden diese nach erfolgter SDS-PAGE auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels *semi-dry-blot* transferiert.

Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol (HPLC *gradient grade*) geschwenkt und anschließend mit dem SDS-Gel in TOWBIN-Puffer bis zur Verwendung inkubiert.

Für den Blot wurde *extra thick blot paper* (170-3965, BioRad, München, Deutschland) ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in TOWBIN-Puffer getränkt.

In die Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München, Deutschland) wurde zunächst eine Lage *extra thick blot paper* gelegt, darauf folgte die PVDF-Membran, das Gel und eine weitere Lage *extra thick blot paper*. Alles wurde mit wenig TOWBIN-Puffer benetzt, luftblasenfrei zusammengebaut und die Apparatur verschlossen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 20 V für 30 min (konstante Spannung). Dabei sollte die Stromstärke 15 mA/cm² Gel nicht übersteigen.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran entnommen, kurz mit H₂O_{bidest.} gespült und anschließend für 1-16 h in einer Blockierungslösung inkubiert. Nach Abgießen der Blockierungslösung erfolgten vier Waschschrte in TBSTT und ein Waschschrte in TBS für jeweils 10 min. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit dem in 15 ml Blockierungslösung verdünntem primären Antikörper (Tab. 4) inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran wieder viermal in TBSTT und einmal in TBS für je 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem wieder in Blockierungslösung verdünntem sekundären Antikörper (Tab. 4) erfolgte ebenfalls über eine Stunde. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Membran fünfmal für je 10 min in TBSTT gewaschen.

Die in TBSTT gewaschene Membran wurde für 5-30 min in der frisch in AP-Puffer hergestellten Detektionslösung bis zur guten Sichtbarkeit der Banden inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Waschen in H₂O_{bidest.} gestoppt und die Membran anschließend getrocknet und archiviert.

TOWBIN, pH NICHT einstellen!	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	20	%	Methanol, HPLC <i>gradient grade</i>
TBS	10	mM	Tris (pH 7,5)
	100	mM	NaCl

TBSTT	20	mM	Tris (pH 7,5)
	500	mM	NaCl
	0,2	%	Triton X-100
	0,05	%	Tween-20
Blockierungslösung	3	%	BSA in TBS
AP-Puffer	100	mM	Tris-HCl (pH 9,5)
	100	mM	NaCl
	50	mM	MgCl ₂
Detektionslösung	15	ml	AP-Puffer
	60	µl	BCIP, 42 mg/ml
	60	µl	NBT, 83 mg/ml

Tab. 4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung. Im oberen Teil die primären Antikörper, im unteren Teil die sekundären Antikörper (AP=Alkalische Phosphatase)

Antikörper	Wirt	Verdünnung
Anti-His-tag	Maus	1:1000
Anti-AOC	Kaninchen	1:5000
Anti-HA-tag	Maus	1:500
Anti-myc-tag	Maus	1:10
Anti-YFP ^N	Ziege	1:2000
Anti-YFP ^C	Ziege	1:2000
Anti-mouse-AP	Ziege	1:5000
Anti-rabbit-AP	Ziege	1:5000

2.2.8 Strep-tag-Nachweis

Der Nachweis der Strep-tag-Markierung erfolgte durch ein verkürztes Protokoll, da das verwendete StrepTactin-HRP-Konjugat (IBA Biotagnology, Göttingen, Deutschland) direkt über die daran gekoppelte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden kann. Die in der SDS-PAGE getrennten Proteine wurden wie oben beschrieben auf die PVDF-Membran transferiert und die Membran anschließend in 15 ml Blockierungslösung für 30 min inkubiert. Danach wurde das StrepTactin-HRP-Konjugat direkt (Verdünnung 1:3750) in die Blockierungslösung gegeben und die Mischung für weitere 30-60 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran zweimal in TBS und einmal in Puffer W für jeweils 10 min

gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation in der frisch hergestellten Strep-*tag*-Detektionslösung für 2-20 min. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$.

Puffer W	100	mM	Tris (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
Strep- <i>tag</i> -Detektionslösung	7,5	ml	Puffer W
	7,5	μl	30 % H_2O_2
	51	μl	3 % 4-Chloro-1-naphthol in Methanol

2.2.9 Protein-crosslinking

Zunächst wurde eine 10x Stammlösung des *crosslinkers* (EGS; Ethylen Glycol *bis* (Succinimidyl Succinat), Abb. 8) in DMSO hergestellt.

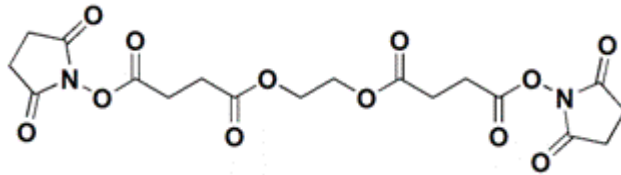


Abb. 8: Strukturformel des *crosslinkers* Ethylen Glycol *bis* (Succinimidyl Succinat)

Im Anschluss daran wurden 10 μg des Proteins in 9 μl HGNEP-Puffer gebracht. Zu den 9 μl Proteinlösung wurde dann 1 μl der 10x *crosslinker*-Lösung gegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend 5-40 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit 1 μl Tris-Glycin-Lösung abgestoppt.

Der Reaktionsansatz wurde mit 10 μl SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die Analyse mittels Größenausschlusschromatographie wurde das Volumen des Ansatzes entsprechend vergrößert. Dabei wurden 0,5-1 mg Protein eingesetzt.

HGNEP-Puffer	25	mM	HEPES (pH 8,0)
	100	mM	NaCl
	0,2	mM	EDTA
	10	%	Glycerin
	0,05	%	NP-40
	1	mM	DTT

Tris-Glycin-Lösung	1 M	Tris (pH 7,5)
	1 M	Glycin
<i>crosslinker</i> -Lösung, 10x	2 mM	in DMSO

2.2.10 Größenausschlusschromatographie

Zur genauen Größenbestimmung der beim *crosslinking* erhaltenen Proteinkomplexe wurde die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC, Gelfiltration) verwendet. Hierbei werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt, wobei große Moleküle schneller und kleine Moleküle langsamer von der Säule eluieren (umgekehrter Siebeffekt).

Die Analysen erfolgten an einem Äkta Explorer System (GE Healthcare, München, Deutschland). Die Proben wurden auf ein Volumen von 1,5 ml gebracht und über eine 2-ml-Probenschleife auf eine HiLoad 16/60 Superdex 200 *prepgrade* Säule (17-1069-01, Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) geladen. Die Trennung der Proben erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min.

SEC-Puffer	100 mM	Tris (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
	5 %	Glycerin

2.2.10.1 Auswertung

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe von Größenstandards und des Säulenausschlussvolumens (v_0). Hierzu wurden Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (Tab. 5) verwendet und deren Elutionsvolumina (v_E) in Relation zu v_0 gesetzt. Zur Bestimmung von v_0 diente Dextran Blue.

Tab. 5: Zur Kalibrierung der SEC-Säule verwendete Proteine

Protein	MW in kDa	v_E in ml	v_E/v_0
Dextran Blue	2000	44,2	1
Katalase	240	65,6	1,475
Aldolase	158	66,19	1,499
BSA	67	75,4	1,695
Ovalbumin	43	81,34	1,842
Chymotrypsinogen A	25	90,5	2,032
Ribonuklease	13,7	95,4	2,161

2.3 Bestimmung der AOC-Aktivität

2.3.1 Enzymassay

Die Bestimmung der AOC-Aktivität erfolgte mittels eines gekoppelten Enzymassays. Dabei stellt die Allenoxidsynthese (AOS) das Substrat für die Allenoxidzyklase (AOC) zur Verfügung (Kap. 1, Abb. 1, S. 2).

Der Assay erfolgte in zwei Schritten: 1. Enzymatische Reaktion, 2. Analyse der Reaktionsprodukte mittels RP-HPLC und chiraler HPLC.

Die enzymatische Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 200 μl statt. Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert bzw. inkubiert. Dabei wurden Phosphatpuffer (nach Sörensen; pH 7,0), AOS (A6481, Sigma GmbH, Osterode, Deutschland) und AOC vorgelegt und die Reaktion dann mit der Zugabe von 13(S)-HPOT gestartet.

200 μl Reaktionsansatz	ad 200 μl	Phosphatpuffer
AOC-Aktivitätsbestimmung	1 μl	AOS (1:60 Verdünnung)
	0,1 - 10 μg	AOC
	4 μl	13(S)-HPOT (= 39,9 nmol)

Nach einer Inkubationszeit von 5-30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 μl 2 N HCl abgestoppt.

Für die spätere Quantifizierung wurden 9,93 nmol Methyl-OPDA (MeODPA) als Standard dazugegeben. Zur Extraktion der Reaktionsprodukte wurde der Ansatz anschließend zweimal mit je 1 ml Diethylether ausgeschüttelt und beide Etherphasen in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Etherphasen wurden in der SpeedVac (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vollständig eingedampft, die getrockneten Reaktionsprodukte in 300 μl Methanol (HPLC *gradient grade*) aufgenommen und nach Zugabe von 35 μl 2 N NaOH für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zugabe von 40 μl 2 N HCl sollte der pH-Wert bei 3-4 liegen (Überprüfung mit pH-Testpapier). Danach wurde der Ansatz wieder zweimal mit je 1 ml Diethylether ausgeschüttelt, die Etherphasen in ein frisches 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und die vereinten Etherphasen wieder in der SpeedVac eingedampft. Um den wässrigen Rest im Reaktionsgefäß zu entfernen, wurden nochmals 300 μl Diethylether zugegeben, geschüttelt und wieder in der SpeedVac eingedampft. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt bis eine Phasentrennung zwischen Ether- und wässriger Phase erkennbar war. Die wässrige Phase wurde entfernt und die Etherphase bis zur Trockne eingedampft.

Anschließend wurde die getrocknete Substanz in 110 μl mobiler Phase 1 aufgenommen.

mobile Phase 1	75 %	Methanol
	25 %	0,2 % Essigsäure
isokratischer Gradient		

Die Probe wurde in ein HPLC-Probengefäß überführt, das Gefäß verschlossen und 90 µl zur Analyse in die HPLC injiziert. Die Trennung der Proben erfolgte im ersten Schritt an einer Eurospher 100 C18 Säule (Knauer, B6 Y535). Die OPDA-Fractionen (Tab. 6 und Abb. 9) wurden zu je 1,4 ml gesammelt und zur weiteren Analyse verwendet. Die MeOPDA-Fractionen (Tab. 6 und Abb. 9) wurden nicht gesammelt. Hier war nur die *peak*-Fläche für die Auswertung relevant.

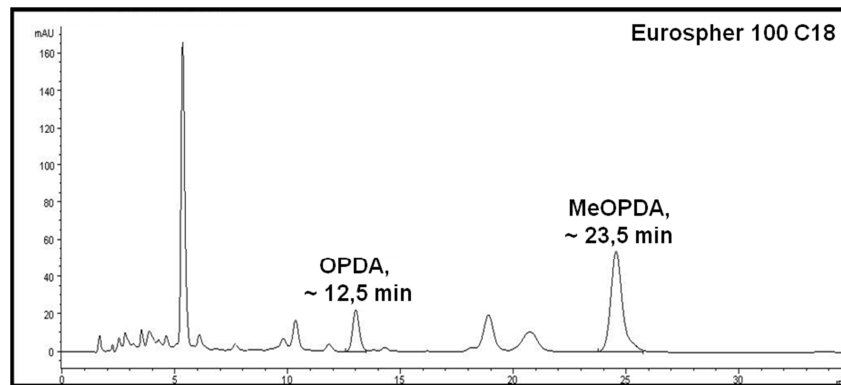


Abb. 9: Chromatogramm A einer Probe zur Bestimmung des OPDA-Gehaltes. Die Trennung erfolgte an einer Eurospher 100 C18 Säule mittels der mobilen Phase 1. OPDA eluiert bei 12-13 min und MeOPDA bei 23-24 min von der Säule.

Die gesammelten OPDA-Fractionen wurden in kleine Rundkolben (10 ml) überführt, am Rotationsverdampfer eingedampft und die getrocknete Substanz anschließend in 110 µl mobiler Phase 2 aufgenommen.

mobile Phase 2	65 %	Methanol
	35 %	0,2 % Essigsäure
isokratischer Gradient		

Es wurden wieder 90 µl zur zweiten, chiralen Analyse in die HPLC injiziert. Die Trennung erfolgte an einer EC200/4 Nucleodex beta PM Säule (Macherey-Nagel, 720125.40). Hier erfolgte die Trennung der beiden chiralen Formen des OPDA (9(S),13(R)-ODPA und 9(R),13(S)-OPDA, Abb. 10). Das 9(S),13(R)-ODPA ist die enzymatisch gebildete Form und das 9(R),13(S)-OPDA ist die spontan gebildete Form. Die Retentionszeiten sind in Tab. 6 aufgelistet.

Die Detektion der Analyten erfolgte bei 223 nm.

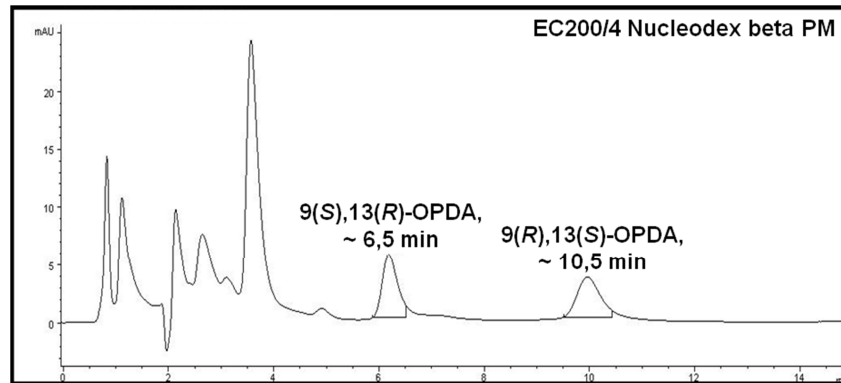


Abb. 10: Chromatogramm B einer Probe zur Bestimmung des OPDA-Gehaltes. Die Trennung erfolgte an einer EC200/4 Nucleodex beta PM Säule mittels der mobilen Phase 2. 9(S),13(R)-OPDA eluiert bei 6-7 min und 9(R),13(S)-OPDA bei 10-11 min von der Säule.

2.3.2 Auswertung

Die Integration der Flächen unter den detektierten *peaks* erfolgte mittels der Gerätesoftware HP-Chemstation (Rev. A.10.01 [1635]). In Tab. 6 sind die für die Auswertung wichtigen Detektionssignale zusammengestellt.

Tab. 6: Relevante Signale zur Bestimmung der AOC-Enzymaktivität. Die Detektion erfolgte bei 223 nm.

Substanz	Retentionszeit in min	Stationäre Phase	Mobile Phase
OPDA	12-13	Eurospher-100 C18, Knauer	75 % MeOH, 25 % 0,2 % Essigsäure, isokratisch
MeOPDA	23-24	Eurospher-100 C18, Knauer	75 % MeOH, 25 % 0,2 % Essigsäure, isokratisch
9S,13R OPDA (enzymatisch)	6-7	EC200/4 Nucleodex beta-PM, Macherey-Nagel	65 % MeOH, 35 % 0,2 % Essigsäure, isokratisch
9R,13S OPDA (spontan)	10-11	EC200/4 Nucleodex beta-PM, Macherey-Nagel	65 % MeOH, 35 % 0,2 % Essigsäure, isokratisch

Über die *peak*-Flächen erfolgte die Berechnung der gebildeten Menge an OPDA:

$$\text{nmol OPDA}_{\text{probe}} = \frac{[\text{Fläche OPDA}] \times [\text{nmol MeOPDA Standard}]}{[\text{Fläche MeOPDA Standard}]}$$

Die so errechnete Menge an OPDA beinhaltet jedoch beide Formen (9(S),13(R) und 9(R),13(S)) von OPDA. Um die spontan gebildete Menge an OPDA von der enzymatisch gebildeten Menge zu trennen, wurden die Ergebnisse der chiralen Trennung herangezogen. Zunächst wurde der prozentuale Anteil von enzymatisch gebildetem OPDA mit folgender Formel berechnet:

$$X \% = X \times 100 = \frac{[[\text{Fläche } 9(S),13(R)\text{-OPDA}] - [\text{Fläche } 9(R),13(S)\text{-OPDA}]]}{[[\text{Fläche } 9(S),13(R)\text{-OPDA}] + [\text{Fläche } 9(R),13(S)\text{-OPDA}]}$$

Mit beiden errechneten Werten kann der enzymatisch gebildete Anteil von OPDA in der Probe bestimmt werden.

2.4 Methoden zur Anzucht und Transformation von Bakterien

2.4.1 Medien und Antibiotika

2.4.1.1 LB-Medium und LB-Agar

LB Broth Medium und LB Agar wurden von Difco™ (Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD 21152, USA) bezogen und nach Herstellerangaben hergestellt.

2.4.1.2 YEB-Medium

0,5	%	Rinderextrakt
0,1	%	Hefeextrakt
0,5	%	Pepton
0,5	%	Saccharose
pH 7,0 einstellen und autoklavieren		
2	mM	MgSO ₄ , nach dem Autoklavieren

2.4.1.3 Antibiotika

Die Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt und den sterilen Medien in den in Tab. 7 aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 7: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen im Medium

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	125 in 50 % Ethanol	125
Kanamycin	25 in H ₂ O _{bidest.}	25
Chloramphenicol	20 in Ethanol	20
Streptomycin	50 in H ₂ O _{bidest.}	50
Spectinomycin	100 in H ₂ O _{bidest.}	100
Rifampicin	150 in Methanol	150
Carbenicillin	50 in 50 % Ethanol	50

2.4.2 Zellanzucht, Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

2.4.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die verwendeten ***E.-coli*-Stämme** (XL-1, M15) wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar angezogen, wobei zur Selektion die entsprechenden Antibiotika in den in Tab. 7 (S. 30) angegebenen Konzentrationen zugegeben wurden. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C.

Die Anzucht der verwendeten ***A.-tumefaciens*-Stämme** (LBA4404, GV2260) erfolgte in LB- oder YEB-Medium bzw. -Agar. Zur Selektion wurden ebenfalls die entsprechenden Antibiotika in den in Tab. 7 (S. 30) angegebenen Konzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben. Die Anzucht erfolgte bei 28 °C.

2.4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Mandel & Higa, 1970). Über Nacht wurde eine Vorkultur des zu transformierenden Stammes angezogen. Diese Kultur wurde in 50 ml frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert, in ein steriles, vorgekühltes 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, 5000 rpm). Dann wurden die Zellen in 2 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen, mit 2 ml 50 % Glycerin versetzt und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

2.4.2.3 Transformation chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen

Die Transformation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. $CaCl_2$ -kompetente Zellen (50 bzw. 100 μ l) wurden mit der zu transformierenden DNA (1-2 μ l, 10 μ l bei Ligationsansätzen) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gekühlt wurden (2 min). Nach Zugabe von LB-Medium (200 bzw. 400 μ l) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert, im Anschluss auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.2.4 Herstellung elektrokompetenter *A.-tumefaciens*-Zellen

Über Nacht wurden 2 x 3-ml-Kulturen in LB-Medium angezogen (28 °C). Diese wurden dann in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert (~ 3 h). Die Kultur wurde dann für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend in 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt und mit 3000 g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden dann zunächst mit 40 ml eiskaltem $H_2O_{bidest.}$ gewaschen, abzentrifugiert (3000g, 4 °C, 10 min) und dann nochmals mit 20 ml eiskaltem $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und abzentrifugiert (3000g, 4 °C, 10 min). Die Pellets wurden in 10 ml eiskaltem $H_2O_{bidest.}$ resuspendiert und die vier Fraktionen vereinigt. Nach einer weiteren Zentrifugation (3000g, 4 °C, 10 min) wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin aufgenommen, die Zellen zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.4.2.5 Transformation elektrokompetenter *A.-tumefaciens*-Zellen

Die Elektroporation erfolgte mit einem Micro Pulser (BioRad, München, Deutschland). Pro Ansatz wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, 1-5 µl Plasmid-DNA zugegeben und nach fünfminütiger Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von 3,8 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Zellen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 28 °C inkubiert. 50-200 µl des Ansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert und bei 28 °C inkubiert.

2.5 Präparation von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

nach Sheen (2002)

Samen von *Arabidopsis thaliana* Col-0 wurden auf Erde ausgesät und fünf Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) kultiviert. Zur Präparation von Mesophyllprotoplasten wurden 15 Blätter einzeln geerntet, die Spitze (vorderes Drittel) entfernt und anschließend mit einer frischen Rasierklinge in etwa ein bis zwei Millimeter breite Streifen geschnitten, wobei das letzte Drittel des Blattes wiederum verworfen wurde. Die Blattstreifen wurden sofort in die vorbereitete Enzymlösung (10 ml) überführt und untergetaucht. Nachdem alle 15 Blätter geerntet, geschnitten und in die Enzymlösung getaucht waren, wurde die Enzymlösung in die Blattstreifen infiltriert. Hierzu wurde die Petrischale in einen Exsikkator gestellt und für 30 min ein Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) angelegt. Danach

erfolgte die vier- bis fünfstündige Inkubation der Blattstreifen in der Enzymlösung bei 21 °C im Dunkeln. Im Anschluss an die Inkubation wurden 10 ml W5-Lösung zur Enzymlösung gegeben und die Protoplasten mittels Schwenken aus den Blattstreifen gelöst. Hierbei sollte sich die Lösung grünlich verfärben. Zur Trennung der Zellwandtrümmer von den Protoplasten wurde die Protoplasten/Enzymlösung filtriert. Nachfolgend wurde die Protoplastensuspension bei 100g für 8 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Protoplasten wurden nochmals mit 10 ml W5-Lösung gewaschen, zentrifugiert (100g, 8 min) und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Dieser Rest diente zur Resuspension der Protoplasten. Die Protoplasten (8 µl Aliquot) wurden in einer Blutzählkammer nach Thoma gezählt und auf Qualität überprüft.

Die Protoplastensuspension wurde nun mit 500–600 µl MaMg-Lösung versetzt und zur Transformation eingesetzt.

Enzymlösung (10 ml)	150 mg	Cellulase R-10
	30 mg	Macerozym
	5 ml	0,8 M Mannitol
	200 µl	1 M KCl ₂
	2 ml	MES-KOH (pH 5,7)
	10 min Inkubation bei 55 °C, abkühlen lassen	
	100 µl	1 M CaCl ₂
	10 mg	BSA
W5-Lösung	154 mM	NaCl
	125 mM	CaCl ₂
	5 mM	KCl
	5 mM	Glucose
	2 mM	MES (pH 5,7)
MaMg-Lösung	400 mM	Mannitol
	15 mM	MgCl ₂
	4 mM	MES (pH 5,7)

2.6 Transformation von Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten

nach Sheen (2002)

Die zu transformierende DNA (15 µg in max. 20 µl) wurde in ein steriles 15-ml-Kulturröhrchen vorgelegt und je 100 µl der in MaMg-Lösung aufgenommenen Protoplasten dazugegeben. Bei der Transformation von zwei verschiedenen Konstrukten wurden jeweils 15 µg DNA zugegeben, wobei das Gesamtvolumen 20 µl nicht überschritt.

Die Protoplasten wurden dann vorsichtig mit der DNA gemischt (schwenken), danach 110 µl PEG-Lösung (immer frisch hergestellt) zugegeben und wieder gemischt. Diese Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit 440 µl W5-Lösung verdünnt und abzentrifugiert (8 min, 100g, RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Protoplasten mit 1 ml W5-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde dann über Nacht (16-20 Stunden) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mittels *confocal laser scanning microscopy* (CLSM, Kap. 2.8, S. 35) untersucht.

PEG-Lösung	4 g	PEG 4000
	3 ml	H ₂ O _{bidest.}
	2,5 ml	0,8 M Mannitol
	1 ml	1 M CaNO ₃

2.7 Infiltration von *Nicotiana-benthamiana*-Blättern

Für die Infiltration von *N.-benthamiana*-Blättern wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 eingesetzt und mit den entsprechenden Konstrukten mittels Elektroporation transformiert.

Für die Infiltration wurden zunächst die entsprechenden, transformierten Agrobakterien in YEB-Medium (5 ml + Antibiotika) über Nacht angezogen. Anschließend wurde den Kulturen 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES (pH 5,6) zugegeben und für weitere 24 h bei 28 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst frisches 2x Infiltrationsmedium hergestellt. Zur Bestimmung der benötigten Kulturmenge wurde die OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt. Hierzu wurden 100 µl der Kulturen abgenommen und mit 900 µl frischem Medium verdünnt. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ konnte die benötigte Kulturmenge berechnet werden:

$$\frac{\text{Volumen}_{\text{soll}} \times \text{OD}_{\text{soll}}}{\text{OD}_{\text{ist}}} = x_{\text{Kultur}} \text{ ml}$$

Die entsprechende Kulturmenge wurde daraufhin abgenommen und bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Bei der Infiltration von Split-YFP-Konstrukten wurden die Kulturen der gewünschten Kombination gemischt und zusammen abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml frischem YEB-Medium resuspendiert und im Anschluss je 2 ml 2x Infiltrationsmedium und H₂O_{bidest.} zugegeben. Kurz vor der Infiltration wurde den Zellsuspensionen nochmals 20 µM Acetosyringon zugegeben. Die

Zellsuspension wurde nun mittels einer 1-ml-Spritze in die Unterseite der Blätter inokuliert und die Infiltrationsstellen markiert.

Die infiltrierten Pflanzen wurden dann für weitere 5 Tage wieder in das Gewächshaus zurückgestellt. Nach dieser Zeitspanne wurden die markierten Blattbereiche ausgeschnitten und mittels *confocal laser scanning microscopy* (Kap. 2.8, S. 35) untersucht bzw. für qRT-PCR-Versuche verwendet (Kap. 2.1.1, S. 15).

2x Infiltrationsmedium	10 %	Saccharose
	20 mM	Glucose
	8,6 g/l	MS-Medium (pH 5,6)

2.8 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Für alle mikroskopischen Untersuchungen mit dem *bimolecular-fluorescence-complementation*-System (BiFC, *split*-YFP) wurde das LSM 510 META von der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) verwendet. Entsprechend der Anregungswellenlängen von GFP (475 nm) und YFP (507 nm) wurden die Laserlinien 488 nm und 514 nm des Argon-Lasers zur Fluoreszenzanregung genutzt. Dabei wurden die Ausgangsleistung des Lasers auf 50 % und der Output auf 19,8 % eingestellt. Die eingesetzten Filter wurden passend zum Anregungs-/Emissionsspektrum der Proben gewählt, mit Ausnahme des λ -Scans. Hier wurden die Emissionen im Wellenlängenbereich von 516 – 680 nm aufgenommen.

Sowohl für die Untersuchungen von Mesophyllprotoplasten von *A. thaliana* als auch Blättern von *N. benthamiana* wurde das 63x Wasserimmersionsobjektiv (Apochromat) verwendet.

Die gewonnenen Bilder wurden mittels der Datenbankenfunktion der Mikroskopsoftware archiviert.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels der AIM-Image-Browser Software von Zeiss. Hier wurde zunächst mittels der aufgenommenen Spektren der λ -Scans die Identität der YFP-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Emission}} = 532 \text{ nm}$) überprüft. Anschließend wurden die aufgenommenen Mesophyllprotoplasten als ROI (*region of interest*) definiert und so die jeweilige Intensität bestimmt. Zusätzlich gingen die Laserleistung und die Öffnung des *pinhole* in diesen Wert mit ein. So ergibt sich ein relativer Fluoreszenzwert der zur objektiven Betrachtung der jeweiligen Fluoreszenzintensität herangezogen werden kann.

$$\text{rel. Fluoreszenz} = \left(\frac{\text{Emission 532 nm}}{\text{pinhole}^2 * \% \text{ Output}} \right) * 1000$$

2.9 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *A.-thaliana*-Pflanzen erfolgte mittels der *floral-dip*-Methode (Clough & Bent, 1998).

Hierfür wurde der *Agrobacterium-tumefaciens*-Stamm LBA4404 verwendet. Dieser wurde durch Elektroporation mit den entsprechenden binären Plasmiden (Tab. 3, S. 17) transformiert und anschließend zur Pflanzentransformation eingesetzt. Dazu wurden 5 ml YEB-Medium mit den Agrobakterien angeimpft und für zwei Tage bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde danach in 25 ml frisches YEB-Medium überführt und wieder bei 28 °C schüttelnd für 12-16 Stunden inkubiert. Bei einer $OD_{600} > 2$ wurde die Kultur geerntet (RT, 3000 rpm, 10 min) und in 30 ml frischem YEB-Medium resuspendiert. Die resuspendierte Kultur wurde dann in eine 5 %ige Sucrose-Lösung (unter Berücksichtigung des Kulturvolumens) überführt und mit 0,03 % Silwet L-77 versetzt.

Anschließend wurden die oberirdischen Teile gesunder *A.-thaliana*-Pflanzen (möglichst viele Blütenstände) für zehn Sekunden in die hergestellte Bakteriensuspension getaucht und dabei vorsichtig geschwenkt. Nach dem Dippen wurden die Pflanzen in ein leeres Gewächshaus gelegt, mit einer Plastikfolie abgedeckt und mit dem Deckel verschlossen für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Pflanzen wieder aufgestellt und bis zur Samenreife weiterkultiviert werden.

Die Samen abgeblühter *A.-thaliana*-Pflanzen wurden durch Sieben der Fruchtstände gesammelt. Die gesiebten Samen lagerten dann in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen oder Greiner-Röhrchen bei 4 °C.

2.9.1 Samensterilisation und Selektion

Die gesammelten Samen verblieben für mindestens zwei Tage bei 4 °C. Die Selektion transgener Samen erfolgte anschließend auf Selektions-Agar-Platten.

Dazu wurden die Samen zunächst für 5 min in 50 % Ethanol, anschließend für weitere 5 min in 50 % Na-Hypochlorid inkubiert und danach sofort 4x mit $H_2O_{bidest.}$ gewaschen. Die auf diese Weise sterilisierten Samen konnten dann auf vorbereitete Selektivagarplatten ausgelegt und im Lichtraum (16 h Tag/8 h Nacht, 24 °C/19,5 °C) für 3-4 Wochen inkubiert werden. Resistente Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und im Lichtschrank bis zur Samenreife weiterkultiviert.

2.10 Detektion der Glucuronidaseaktivität (GUS-Aktivität)

Die Detektion der Glucuronidase-Aktivität (GUS) erfolgte unter Verwendung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG). Die Glucuronidase spaltet dieses in Glucuronid und 4-Methylumbelliferon (4-MU), welches bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm fluorimetrisch bestimmt werden kann.

Das Pflanzenmaterial wurde von der Pflanze geerntet, in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 600 μ l Extraktionspuffer auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert, erneut kräftig gemischt (Vortex) und dann bei 4 °C, 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität wurden 25 μ l des Extraktes mit 225 μ l Reaktionspuffer gemischt. Danach wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min und 120 min jeweils 10 μ l entnommen und mit 190 μ l Stopplösung in einer 96-well-Platte gemischt.

Die Messung erfolgte mittels eines Fluorimeters (CytoFlourII, Perspective Biosystems). Die Emission wurde bei 460 nm nach einer Anregung bei 360 nm gemessen. Zur Quantifizierung diente ein 4-MU-Standard, in den Konzentrationen 0, 2, 5, 10 und 50 μ M.

Extraktionspuffer	50	mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
	10	mM	EDTA
	10	mM	2-Mercaptoethanol
	1	%	Triton X-100
Reaktionspuffer			Extraktionspuffer
	1	mM	4-MUG
Stopplösung	200	mM	Na ₂ CO ₃

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der *AtAOC1-4* Multimerisierung *in vitro*

Erste Hinweise auf eine Multimerisierung der *AtAOCs* konnten bei der Reinigung der rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteine beobachtet werden. Zunächst wurden für die *AOC2* nach einer SDS-PAGE Proteinbanden gefunden, die mit ~65 kDa um ca. 38 kDa größer als die erwarteten 27 kDa der *AOCs* waren (Abb. 11). Diese Multimer-Banden konnten mit einer stringenteren Denaturierungsphase entfernt bzw. aufgelöst werden (Abb. 11).

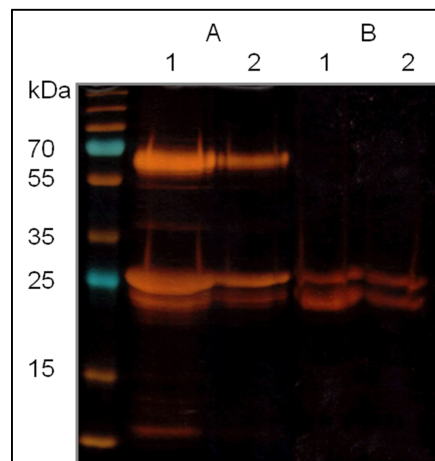


Abb. 11: SDS-PAGE der *AtAOC2*. Es wurden 10 µg (1) bzw. 2,5 µg (2) gereinigte *AtAOC2* mit SDS-Probenpuffer gemischt und bei 42 °C (A) bzw. 96 °C (B) für 5 min denaturiert und anschließend auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

Im Folgenden wurde das Denaturierungsverhalten aller vier *AtAOCs* weiter untersucht und die *AOCs* verschiedenen Denaturierungsbedingungen ausgesetzt (Kap. 2.2.5.1, S. 21). Dabei konnte festgestellt werden, dass die *AOC1*, *AOC2* und *AOC4* eine fünfminütige Denaturierung sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 42 °C überstehen und noch multimerisieren (Abb. 12). Auch eine längere Inkubation (20 min) bei Raumtemperatur führte hier nicht zur Trennung der Multimere. Erst bei 96 °C findet eine Auflösung dieser Multimerbanden statt (Abb. 12). Die Ergebnisse für die *AOC1*, *AOC2* und *AOC4* konnten bei der *AOC3* hingegen nicht beobachtet werden. Diese Isoform zeigte schon bei der Inkubation bei Raumtemperatur keine bzw. kaum Multimerbanden (Abb. 12). Um die Multimerisierung weiter zu untersuchen, wurden *crosslinking*-Experimente durchgeführt. In diesen sollten die gebildeten Multimere stabilisiert werden, um sie dann weiter untersuchen zu können. Der eingesetzte *crosslinker* spielt dabei eine wichtige Rolle für die Spezifität der *crosslinking*-Ereignisse. Ein kürzerer *crosslinker*

erhöht dabei die Spezifität, da sich „freie“ Aminogruppen (z. B. in der Lysinseitenkette) räumlich relativ nah sein müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb Ethylen Glycol *bis* (Succinimidyl Succinat) (EGS) verwendet (Kap. 2.2.9, S. 25). Die stabilisierten Proteinmultimere können anschließend mittels SDS-PAGE analysiert werden.

Dabei konnten die bei den AOC Isoformen 1 und 2 gefundenen Proteinmultimere stabilisiert werden. Während der sich anschließenden Probenvorbereitung und Denaturierung bei 96 °C blieben diese Multimere stabil und konnten mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 13 A und B). Für die AOC-Isoformen 3 und 4 konnten allerdings keine mit EGS stabilisierten Multimere detektiert werden (Abb. 13 C und D).

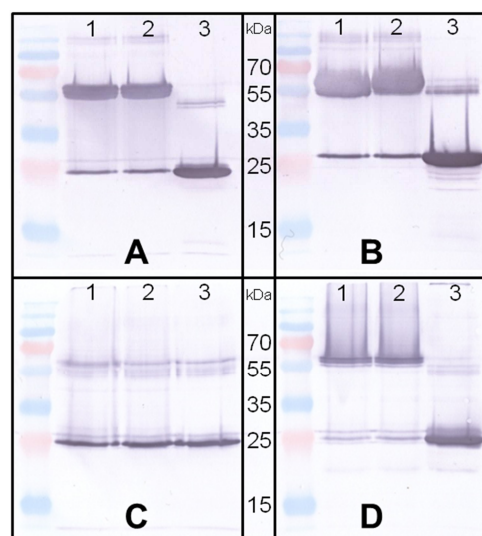


Abb. 12: Western-Blot-Analysen unterschiedlich behandelter Proben der *AtAOC1* (A), *AtAOC2* (B), *AtAOC3* (C) und *AtAOC4* (D). 5 µg AOC wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und bei RT (1), 42 °C (2) und 96 °C (3) für 5 min inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

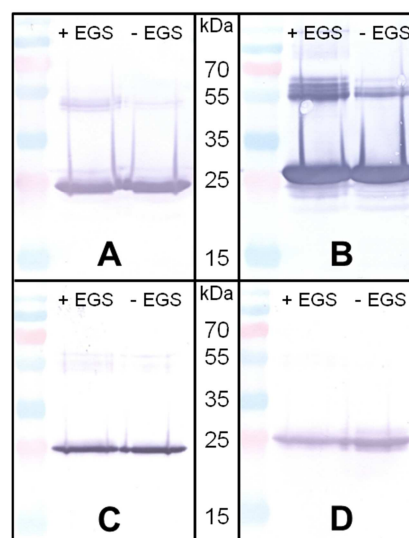


Abb. 13: Western-Blot-Analysen von verknüpften *AtAOC1* (A), *AtAOC2* (B), *AtAOC3* (C) und *AtAOC4* (D). Crosslinker: EGS, 200 µM für 40 min. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 96 °C denaturiert. Die Detektion erfolgte mittels His-tag-Antikörper.

3.2 Bestimmung der Proteingrößen mittels Größenausschlusschromatographie

Die in den Denaturierungs- bzw. *crosslinking*-Experimenten gefundenen Größen der Mono- und Multimere entsprechen, besonders in den *crosslinking*-Experimenten, nicht unbedingt der Situation *in vivo*. Deshalb wurde zur genaueren Bestimmung der Proteingröße die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) herangezogen. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine im nativen Zustand nach ihrer Größe getrennt werden. Dazu wurde zum einen für die unbehandelten AOC-Isomere und zum anderen für die Proteinaddukte nach den *crosslinking*-Experimenten die SEC durchgeführt.

Wird die verwendete Trennsäule zuvor mit einer Reihe von Proteinen mit bekannter Größe geeicht, lässt dies relativ genaue Aussagen zur gesuchten Proteingröße zu.

Die verwendeten Eichproteine und deren Elutionsvolumina (v_E) sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Proteine zur Eichung der SEC

Protein	kDa	log MW	v_E	v_E/v_0	$\log v_E/v_0$
Dextran Blue	2000	3,301	44,47 (v_0)	1	0
Aldolase	158	2,199	66,28	1,493	0,174
BSA	67	1,826	75,1	1,687	0,227
Ovalbumin	43	1,633	81,43	1,834	0,263
Chymotrypsinogen A	25	1,398	90,45	2,031	0,308
Ribonuklease	13,7	1,137	95,42	2,15	0,332

Abb. 14 zeigt die daraus resultierende Eichgerade.

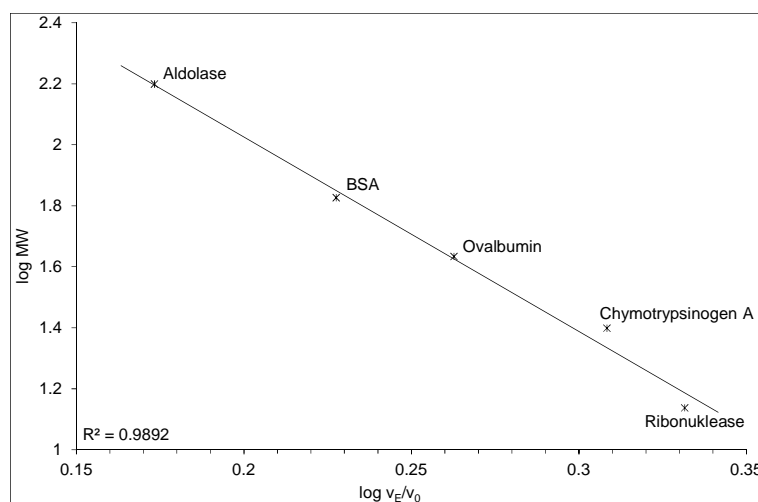


Abb. 14: Eichgerade der für die SEC verwendeten Eichproteine. Es wurde jeweils 1 mg aufgetragen und bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt.

Die aus der Eichgerade resultierende Formel:

$$y = 6,3817x + 3,3036$$

diente als Grundlage für die Berechnungen der Proteingrößen aus den Retentionszeiten der AOC-Isoformen.

Zur Bestimmung der Retentionszeiten, die auch eine Bestimmung des Oligomerisierungszustandes ermöglichen, wurden 0,5–1 mg Gesamtprotein der jeweiligen AOC-Isomere entweder direkt auf die Trennsäule geladen (Abb. 15A - Abb. 18A) oder vorher wie in Kap. 2.2.9 (S. 25) beschrieben mit dem *crosslinker* EGS behandelt (Abb. 15B - Abb. 18B). Im Anschluss wurden auch diese Proben zur Trennung auf die Säule geladen.

Die Trennung der AOC1-Proteinproben zeigte drei verschiedene *peaks* (Abb. 15A). Diese lagen bei den Elutionsvolumina (v_E) 64,68 ml; 77,28 ml und 85,64 ml (Abb. 15A). Das Signal bei 77,28 ml war dabei das Stärkste und das bei 85,64 ml das Schwächste (Abb. 15A). Die Behandlung der Proteinprobe mit EGS hatte dabei keine Auswirkung auf das Elutionsverhalten (Abb. 15B).

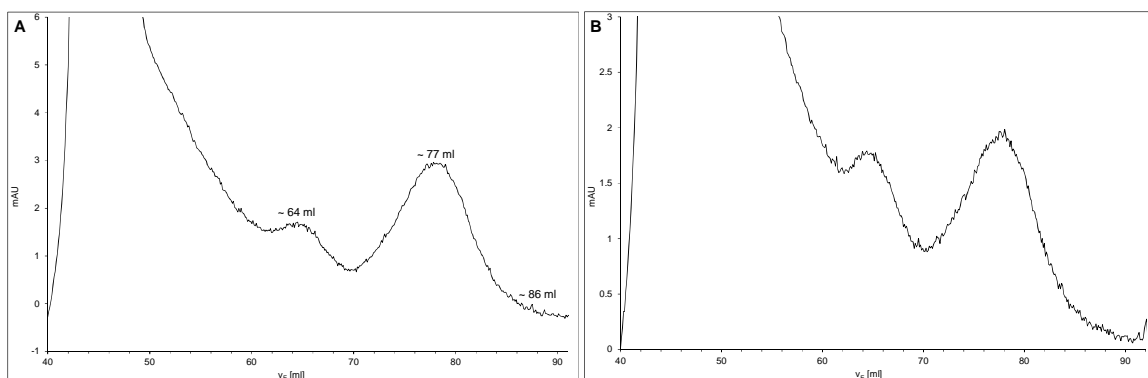


Abb. 15: SEC-Chromatogramme der AOC1. (A) unbehandeltes Protein; (B) mit 200 μ M EGS behandeltes Protein. Aufgetragen wurden jeweils 0,75 mg.

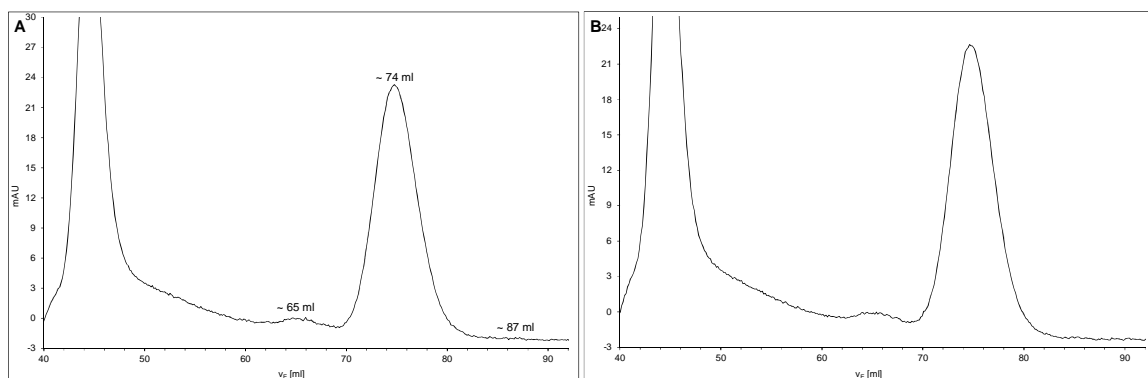


Abb. 16: SEC-Chromatogramme der AOC2. (A) unbehandeltes Protein; (B) mit 200 μ M EGS behandeltes Protein. Aufgetragen wurde jeweils 1 mg.

Auch die Trennung der AOC2 zeigte derartige Maxima. Hier lagen die v_E bei 64,72 ml; 74,45 ml und 86,6 ml (Abb. 16A+B), wobei der letzte *peak* wieder sehr schwach war.

Das Muster der AOC3 unterschied sich im Vergleich zu denen der AOC1 und AOC2. Auch hier konnten wieder drei verschiedene Maxima, bei 65,62 ml; 79,67 ml und 88,08 ml; beobachtet werden, allerdings war hier das Maximum bei 65,62 ml das Stärkste (Abb. 17A). Die Behandlung mit EGS hat auch hier keine Auswirkung auf das Elutionsverhalten (Abb. 17B).

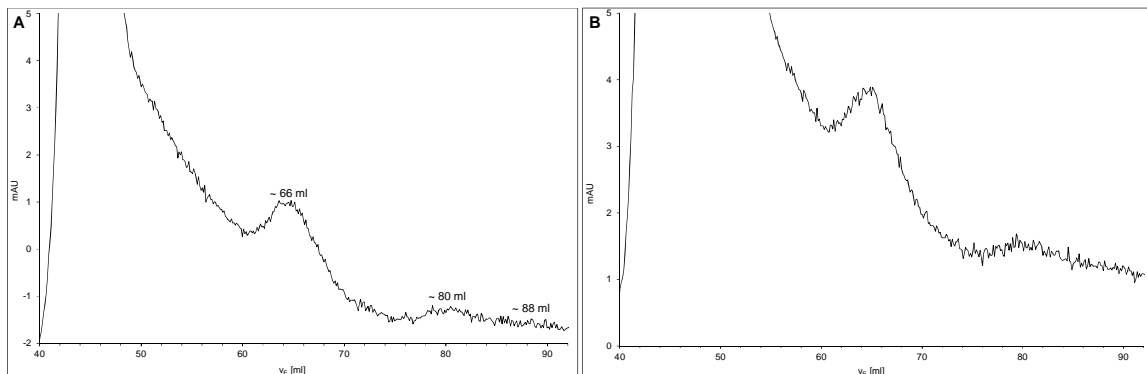


Abb. 17: SEC-Chromatogramme der AOC3. (A) unbehandeltes Protein; (B) mit 200 μ M EGS behandeltes Protein. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 mg.

Die Trennung der Proben der AOC4 ergab einen deutlichen Unterschied in den Maxima im Vergleich zu den drei anderen Isoformen. Hier konnten lediglich zwei verschiedene Maxima gefunden werden (Abb. 18A+B). Dabei eluierte das Protein bei 66,26 ml und 87,31 ml (Abb. 18A+B). Somit fehlt bei dieser Isoform das mittlere Maximum (ca. 77 ml).

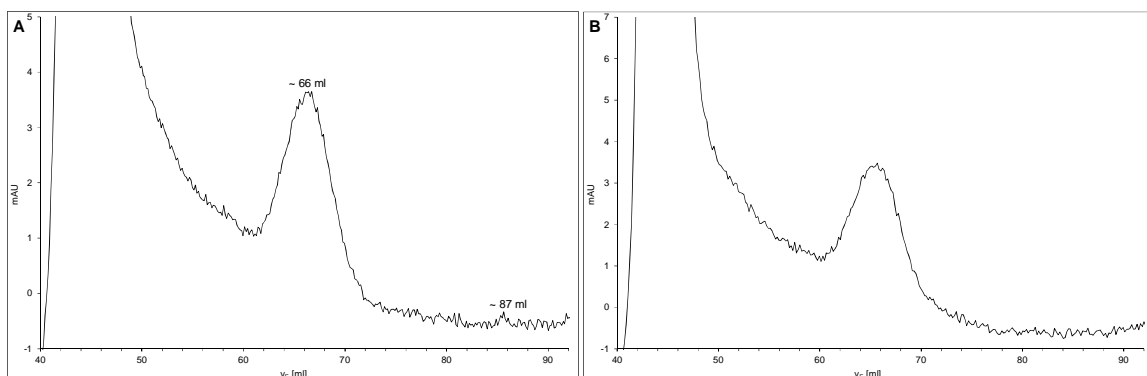


Abb. 18: SEC-Chromatogramme der AOC4. (A) unbehandeltes Protein; (B) mit 200 μ M EGS behandeltes Protein. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 mg.

Stellt man die mit der SEC ermittelten Daten, unter Verwendung der vorher generierten Eichgerade (Abb. 14), graphisch dar, so kann man eine Häufung der verschiedenen Elutionsvolumina in drei verschiedenen Regionen der Eichgerade feststellen (Abb. 19).

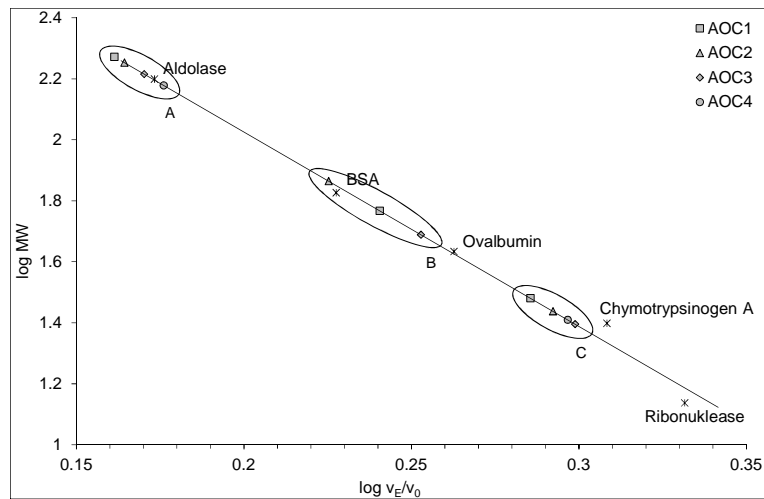


Abb. 19: Eichgerade der SEC mit eingefügten experimentell ermittelten Daten der AOC1, AOC2, AOC3 und AOC4.

Für den Bereich A entspricht das einem ungefähren Molekulargewicht von 158 kDa (Aldolase), für den Bereich B liegt das Molekulargewicht bei etwa 70-45 kDa (BSA bzw. Ovalbumin) und der Bereich C umfasst Proteine um etwa 30 kDa (Chymotrypsinogen A; Abb. 19). Die mit Hilfe der Eichgerade errechneten Molekulargewichte der vier AOC-Proteine in den Clustern sind in Tab. 9 dargestellt. Der Vergleich der berechneten Molekulargewichte der detektierten Proteinmultimere mit den theoretisch berechneten Molekulargewichten zeigt, dass die AOC1, AOC2 und AOC3 als Hexamere, Trimere und Monomere vorliegen (Tab. 9). Wobei die AOC1 und AOC2 in ihrer Hauptmenge als Trimere vorliegen (Abb. 15 und Abb. 16), während die AOC3 nur zum kleinen Teil als Trimer gefunden werden kann und hauptsächlich als Hexamer vorzuliegen scheint (Abb. 17). Bei der AOC4 ist nur eine hexamere bzw. monomere Anordnung zu finden (Abb. 18 und Tab. 9). Dabei war der größte Anteil des Proteins in der hexameren Fraktion lokalisiert (Abb. 18).

Tab. 9: Übersicht der SEC-Daten für die AOC1-4

	v_E in ml	v_E/v_0 (log)	kDa_{calc}	Multimer
AOC1 (26,8 kDa)	64,68	1,45 (0,163)	184,3	6,9
	77,28	1,74 (0,240)	59,2	2,2
	85,64	1,93 (0,286)	30,3	1,1
AOC2 (25,8 kDa)	64,72	1,46 (0,164)	180,1	7,0
	74,45	1,68 (0,225)	73,7	2,9
	86,6	1,96 (0,291)	28,1	1,1
AOC3 (27,3 kDa)	65,62	1,48 (0,169)	167,5	6,1
	79,67	1,79 (0,253)	48,7	1,8
	88,08	1,99 (0,299)	24,9	0,9
AOC4 (26,9 kDa)	66,26	1,5 (0,177)	150,3	5,6
	-	-	-	-
	87,31	1,98 (0,296)	25,8	1,0

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen zeigten eine deutliche Abweichung der berechneten Proteinmasse des putativen AOC-Trimers (~ 77 kDa) von der beobachteten Proteinmasse (~ 60 kDa; Abb. 11, S. 38). Diese Trimere konnten durch die Behandlung mit EGS stabilisiert werden (Abb. 13B). Im Anschluss an die SEC sollten die als Trimer identifizierten Maxima (Tab. 9) gesammelt und erneut mittels SDS-PAGE analysiert werden. Dies wurde mit der AOC2 exemplarisch durchgeführt.

Dabei konnte eindeutig das gleiche Bandenmuster wie in den vorherigen *crosslinking*-Experimenten detektiert werden (Abb. 13B und Abb. 20). Demnach hat die Proteinbande, die bei ca. 60 kDa detektiert werden kann (Abb. 20), ein tatsächliches Molekulargewicht von ca. 73,7 kDa (Tab. 9) und entspricht damit einem Trimer der AOC2.

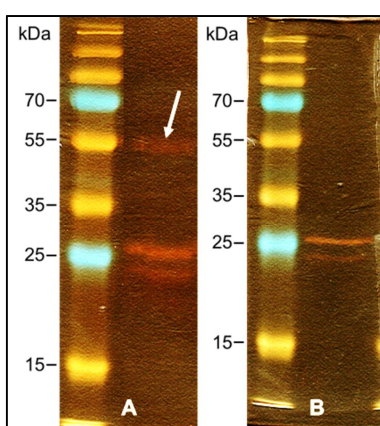


Abb. 20: SDS-PAGE der AOC2 nach SEC. (A) mit EGS (200 µM) behandelte Probe; (B) unbehandelte Probe.

3.3 Affinitätsreinigung und Aktivitätsuntersuchungen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Heteromerisierung der vier *AtAOC*-Proteine und eine damit verbundene Änderung der enzymatischen Aktivität zu untersuchen. Dazu müssen die Proteine, welche als Homomere exprimiert und gereinigt werden können (Kap. 3.1, S. 38), zunächst gemeinsam exprimiert werden. Hierzu wurden verschiedene Ansätze verfolgt, z. B. die Klonierung in verschiedene Vektoren mit anschließender Cotransformation und Coexpression. Alle verfolgten Ansätze waren erfolglos, mit Ausnahme der Klonierung in jeweils einem gemeinsamen Vektor für die verschiedenen Kombinationen (Abb. 21).

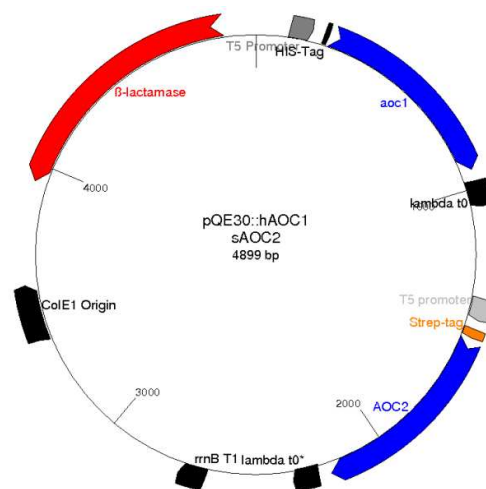


Abb. 21: Für die Coexpression der AOC-Kombinationen verwendeter Vektor. Dargestellt ist die Kombination His-AOC1 mit Strep-AOC2.

Diese Vektoren wurden in *E. coli* M15 transformiert und für die Expression der AOCs genutzt (Kap. 2.2.1, S. 18). Nach der erfolgten zweiteiligen Affinitätsreinigung (Kap. 3.3.1) konnten die so gewonnenen AOC-Heteromere zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität verwendet werden (Kap. 3.3.2, S. 46).

3.3.1 Affinitätsreinigung

Die Reinigung der AOC-Proteine erfolgte über Nickel-NTA-Sepharose (His-tag) und StrepTactin-Sepharose (Strep-tag; Kap. 2.2.3, S. 19). Dabei wurden die homomeren AOC-Proteine nur über den His-tag gereinigt. Die AOC-Kombinationen wurden in zwei Schritten gereinigt. Dies erfolgte unter Verwendung des His-tags im ersten und des Strep-tags im zweiten Schritt. Als Proteinprobe wurde im zweiten Schritt das verdünnte Eluat aus Schritt Eins verwendet. Nach beiden Schritten wurden die Eluate auf beide

AOC-Varianten hin untersucht. Dabei konnten nach der zweiten Elution beide Proteinvarianten (*His-tag* und *Strep-tag*) in der Probe nachgewiesen werden (Abb. 22 und Abb. 23).

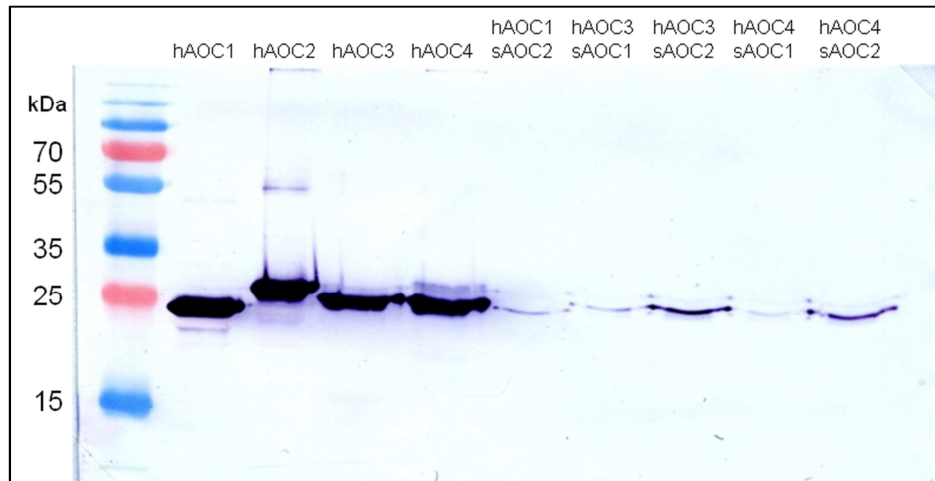


Abb. 22: Western-Blot, His-tag-Antikörper. AOC-Homomere nach Ni-NTA-Reinigung. AOC-Heteromere nach Zwei-Schritt-Reinigung mit Ni-NTA und StrepTactin.

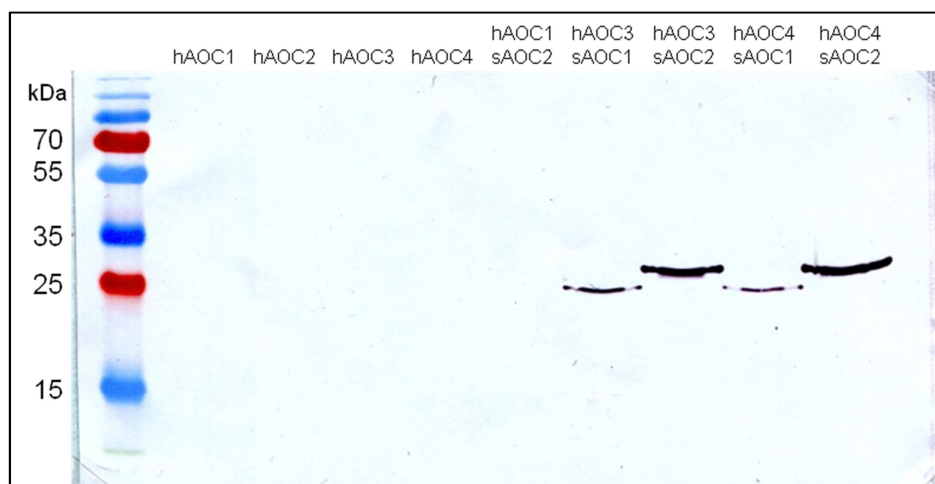


Abb. 23: Western-Blot, StrepTactin-Konjugat. AOC-Homomere nach Ni-NTA-Reinigung. AOC-Heteromere nach Zwei-Schritt-Reinigung mit Ni-NTA und StrepTactin.

Die so gewonnenen AOC-Homomere und -Heteromere wurden anschließend für die Untersuchung der Enzymaktivität eingesetzt.

3.3.2 Untersuchung der Enzymaktivität

Über den Enzymaktivitätstest sollte bestimmt werden, ob und wenn ja, in welchem Maße sich die Aktivität der heteromeren AOC-Proteine ändert.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der AOC-Proteine erfolgte über einen gekoppelten Assay mit der Allenoxidsynthase (AOS) als Hilfsenzym (Kap. 2.3, S. 27). Hierbei generiert

die AOS das Substrat der AOC, welches im wässrigen Milieu eine Halbwertszeit von nur 30 Sekunden hat (Hamberg, 1988; Hamberg & Fahlstadius, 1990).

Für den Aktivitätstest (Kap. 2.3, S. 27) wurden 0,15 μg der gereinigten Proteine (Kap. 3.3.1, S. 45) eingesetzt.

Die AOC4 ist das aktivste der vier Proteine, hier wurden 3,8 nmol OPDA je μg Protein und Minute gebildet (Abb. 24). Die AOC2 und die AOC1 zeigten eine mittlere Aktivität, mit einer Umsatzrate von 2,7 bzw. 1,9 nmol OPDA je μg Protein und Minute. Die AOC3 hingegen zeigte die schwächste Aktivität der vier AOC-Proteine, hier lag die Umsatzrate bei lediglich 1,5 nmol OPDA je μg Protein und Minute (Abb. 24).

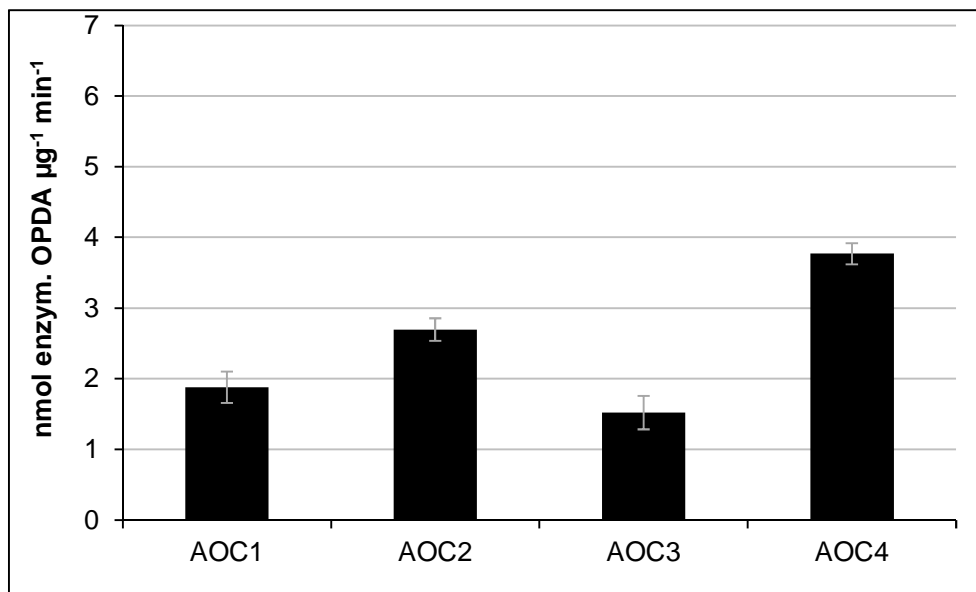


Abb. 24: Bestimmung der enzymatischen Aktivität der AOC-Homomere. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm SD (n=3).

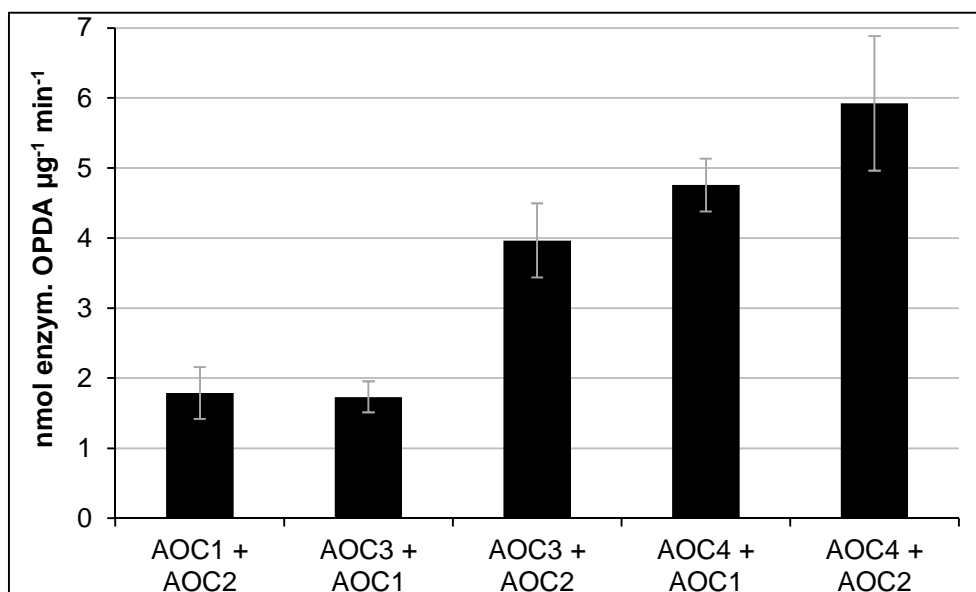


Abb. 25: Bestimmung der enzymatischen Aktivität verschiedener AOC-Heteromere. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm SD (n=3).

Anschließend wurden verschiedene Kombinationen von heteromeren AOC-Proteinen analysiert. Auch hier konnten unterschiedliche Umsatzraten bestimmt werden (Abb. 25). Die Kombination von AOC1 und AOC2 zeigte eine vergleichsweise schwache Aktivität mit einem Umsatz von lediglich 1,8 nmol OPDA je μg Protein und Minute. Bei der Interaktion von AOC3 und AOC1 wurde eine ähnlich schwache Aktivität mit einer Umsatzrate von 1,7 nmol enzymatischem OPDA je μg Protein und Minute gemessen (Abb. 25). Deutlich höhere Umsatzraten konnten für die Kombinationen von AOC3 mit AOC2, AOC4 mit AOC1 und AOC4 mit AOC2 festgestellt werden. So konnte bei der Kombination von AOC3 mit AOC2 eine Rate von 4,0 nmol gebildetem OPDA je μg Protein und Minute gemessen werden. Die Umsatzrate der AOC-Kombination 4/1 war mit 4,8 nmol nochmals etwas höher (Abb. 25). Die höchste Aktivität zeigte jedoch die Kombination AOC4 mit AOC2, hier wurde eine Umsatzrate von 5,9 nmol enzymatisch gebildetem OPDA je μg Protein und Minute bestimmt (Abb. 25). Dies bedeutet, verglichen mit der Aktivität der homomeren AOC-Proteine (Abb. 24), eine Aktivitätssteigerung durch Heteromerisierung.

3.4 AOC-Interaktion *in vivo* – *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC)

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen *in-vitro*-Daten zeigten, dass die AOC-Proteine in der Lage sind, sowohl Homomere (Kap. 3.2, S. 40 und Kap. 3.3.1, S. 45) als auch Heteromere (Kap. 3.3.1, S. 45) zu bilden. Die Heteromere wiesen dabei unterschiedliche Enzymaktivitäten im Vergleich zu den Homomeren auf (Kap. 3.3.2, S. 46). Diese Versuche wurden allerdings mit AOC-Proteinen durchgeführt, die in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt wurden. Daher stellte sich die Frage nach der *in-vivo*-Situation für die vier *At*AOC-Proteine. Diese sollte im nächsten Schritt mit der Untersuchung der Interaktionen der verschiedenen AOCs mit sich selbst und untereinander *in vivo* beantwortet werden.

Hierfür wurden transient transformierte *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten (Kap. 3.4.1) und infiltrierte *N. benthamiana*-Blätter (Kap. 3.4.2, S. 57) verwendet.

3.4.1 *Arabidopsis-thaliana*-Mesophyllprotoplasten

Die Präparation der Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*-Blättern erfolgte nach dem Protokoll von J. Sheen (2002; Kap. 2.5, S. 32). Die gewonnenen Protoplasten wurden anschließend mit verschiedenen Kombinationen von AOC-BiFC-Fusionskonstrukten transformiert (Vgl. Tab. 10 und Kap. 2.6, S. 33).

Tab. 10: BiFC-Kombinationen zur Transformation von *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten bzw. *N. benthamiana*-Blättern

AOC1-YFP ^N + AOC1-YFP ^C	AOC1-YFP ^N + AOC2-YFP ^C	AOC1-YFP ^N + AOC3-YFP ^C	AOC1-YFP ^N + AOC4-YFP ^C
AOC2-YFP ^N + AOC1-YFP ^C	AOC2-YFP ^N + AOC2-YFP ^C	AOC2-YFP ^N + AOC3-YFP ^C	AOC2-YFP ^N + AOC4-YFP ^C
AOC3-YFP ^N + AOC1-YFP ^C	AOC3-YFP ^N + AOC2-YFP ^C	AOC3-YFP ^N + AOC3-YFP ^C	AOC3-YFP ^N + AOC4-YFP ^C
AOC4-YFP ^N + AOC1-YFP ^C	AOC4-YFP ^N + AOC2-YFP ^C	AOC4-YFP ^N + AOC3-YFP ^C	AOC4-YFP ^N + AOC4-YFP ^C

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) der transformierten Mesophyllprotoplasten zeigte, dass die verschiedenen Kombinationen der vier *Arabidopsis*-Proteine alle in der Lage waren, miteinander zu interagieren. Allerdings zeigten verschiedene Kombinationen unterschiedliche Ausprägungen der Fluoreszenz in Bezug auf Lokalisierung, Intensität und

Erscheinungsbild. Im Folgenden werden die beobachteten Interaktionen beschrieben und dargestellt. Es wurden immer sechs Protoplasten aus verschiedenen Experimenten als typisches Beispiel zur Visualisierung ausgewählt.

Betrachtet man zunächst die homomeren Interaktionen der vier AOC-Proteine, so ist erkennbar, dass die AOC4 die stärkste Fluoreszenz aufweist (Abb. 29). Lokalisiert ist diese in vielen kleinen Arealen (pünktchenförmig) im gesamten Chloroplasten. Die bestimmte relative Fluoreszenzintensität (Kap. 2.8, S. 35) beträgt hier 15,2 und ist somit die stärkste gemessene und berechnete Fluoreszenz (Abb. 30). Die homomeren Interaktionen der AOC1 und AOC2 zeigen ein ähnliches Bild wie die der AOC4 (Abb. 26 und Abb. 27), wobei die Fluoreszenzintensitäten jedoch schwächer als bei der AOC4 waren. Untereinander verglichen, sind das Erscheinungsbild und die Fluoreszenzintensität der AOC1 und der AOC2 recht ähnlich. Zusätzlich sind neben der pünktchenförmigen Verteilung noch diffuse Fluoreszenzsignale an den Rändern der Chloroplasten erkennbar (AOC2, Abb. 27). Die berechneten relativen Fluoreszenzen dieser beiden Proteine bestätigen den gewonnenen Eindruck, für die AOC1 liegt sie bei 6,5 und für die AOC2 bei 5,9 (Abb. 30). Die homomere Interaktion der AOC3 erscheint zunächst deutlich schwächer als die Interaktionen der anderen drei AOC-Proteine (Abb. 28).

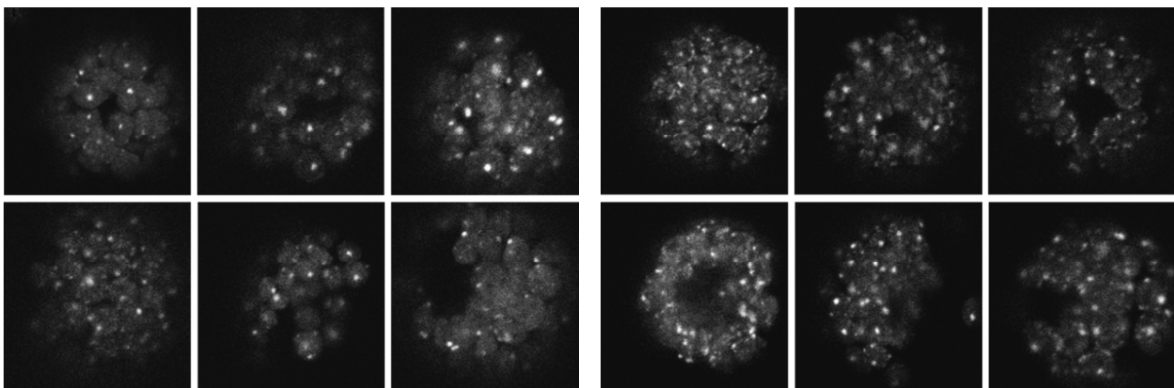


Abb. 26: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC1-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 27: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC2-YFP^C.

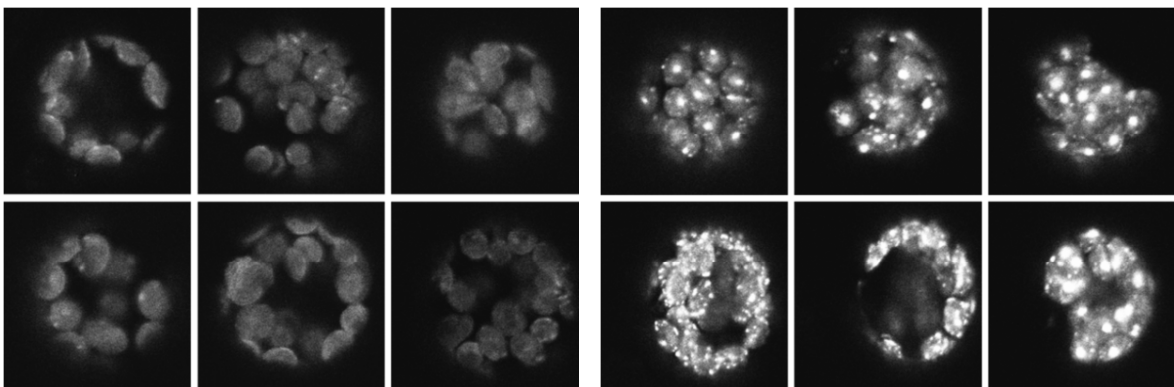


Abb. 28: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC3-YFP^N/AOC3-YFP^C.

Abb. 29: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC4-YFP^N/AOC4-YFP^C.

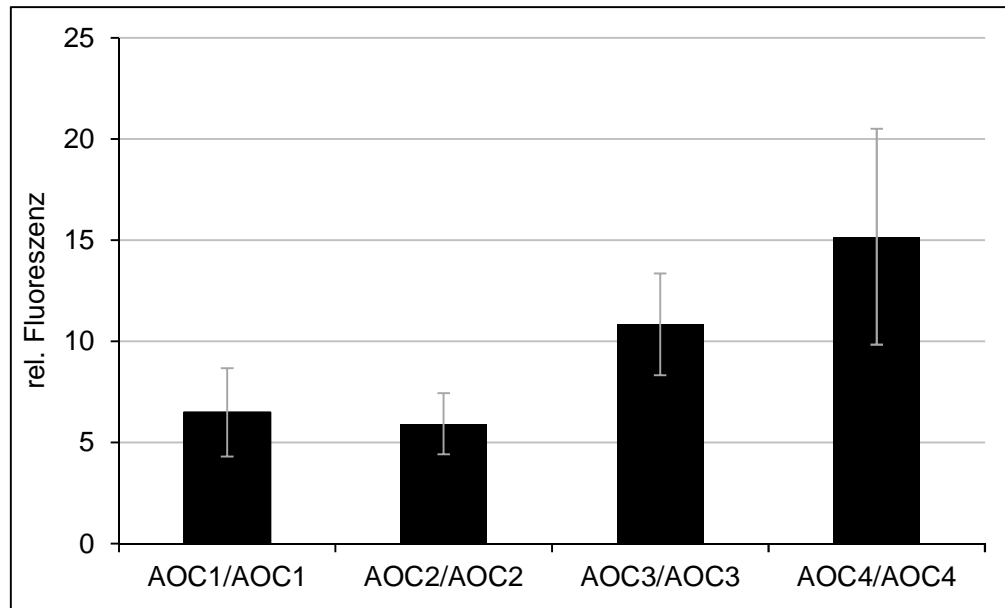


Abb. 30: Relative Fluoreszenzintensitäten der homomeren Interaktionen der Arabidopsis-AOCs. Ausgewertet wurden jeweils 30-50 einzelne Protoplasten aus verschiedenen Experimenten.

Die Fluoreszenz ist hier hauptsächlich diffus an den Rändern der Chloroplasten zu finden und kaum bzw. gar nicht in den punktförmigen Arealen im Chloroplasten. Die berechnete relative Fluoreszenz der homomeren AOC3-Interaktion zeigte dabei allerdings, dass diese sich mit einem Wert von 10,9 (Abb. 30) genau zwischen den Interaktionsstärken der AOC1/2 und AOC4 befindet.

Betrachtet man die möglichen heteromeren Interaktionen der AOC1, ist bei der Interaktion mit der AOC2 wieder eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 31), welche sich hauptsächlich auf den zentralen Bereich der Chloroplasten beschränkt. Zusätzlich kann aber auch eine leicht diffuse, nicht auf die Randbereiche des Chloroplasten beschränkte Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 31). Die relative Fluoreszenzintensität beträgt bei dieser Interaktion 6,1 (Abb. 34). Die bei der Interaktion der AOC1 mit der AOC3 beobachtbare Fluoreszenz scheint sehr schwach ausgeprägt zu sein und liegt mit einem relativem Fluoreszenzwert von 7,7 (Abb. 34) aber etwas über dem Wert der Interaktion zwischen AOC1 und AOC2. Die Begrenzung der Fluoreszenz ist hier deutlich weniger strikt, man kann diese diffus über den gesamten Chloroplasten verteilt beobachten, wobei eine deutliche Häufung an den Rändern der Chloroplasten auftrat (Abb. 32). Die Interaktion zwischen der AOC1 und der AOC4 wird hauptsächlich durch eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz charakterisiert, wobei die Fluoreszenz hier sehr deutlich zu erkennen ist (Abb. 33). Der relative Fluoreszenzwert beträgt bei dieser Kombination 12,6 und ist somit deutlich höher als der Wert der anderen Interaktionen der AOC1 (Abb. 34).

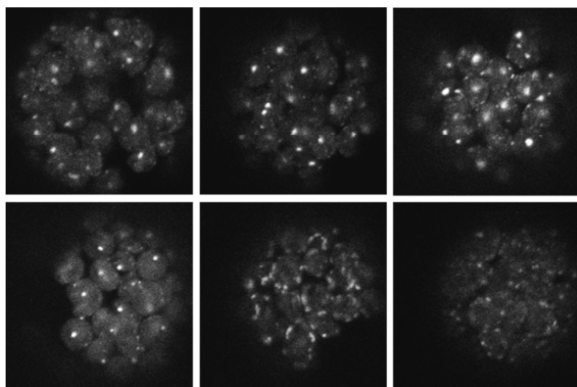


Abb. 31: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC1-YFP^N/AOC2-YFP^C.

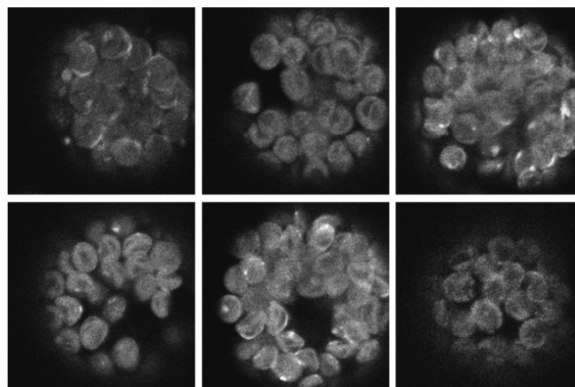


Abb. 32: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC1-YFP^N/AOC3-YFP^C.

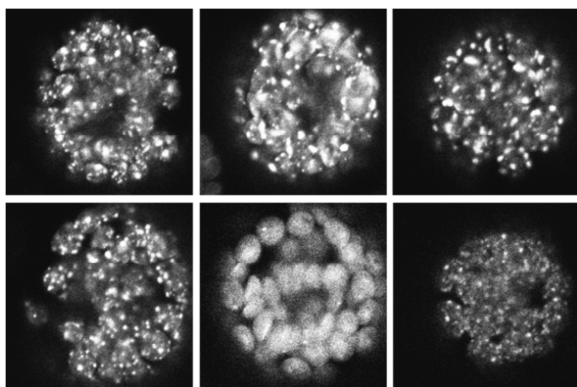


Abb. 33: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC1-YFP^N/AOC4-YFP^C.

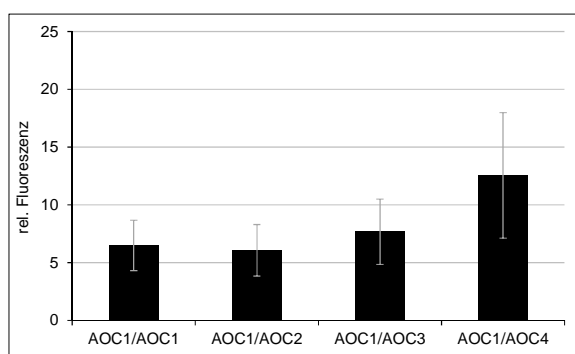


Abb. 34: Relative Fluoreszenzintensitäten der Interaktionen der AOC1.

Die Kombination von AOC2-YFP^N und AOC1-YFP^C ist die reverse Kombination zu der bereits in Abb. 31 betrachteten Kombination (AOC1-YFP^N und AOC2-YFP^C). Auch hier ist die Fluoreszenz in punktförmigen Arealen gut zu erkennen (Abb. 35), wie auch die zusätzliche diffuse Fluoreszenzverteilung. Der relative Fluoreszenzwert beträgt 7,1 (Abb. 38). Die Interaktion der AOC2 mit der AOC3 zeigte eine schwach sichtbare Fluoreszenz (Abb. 36), welche diffus über den gesamten Chloroplasten verteilt war. Der relative Wert wurde für diese Kombination mit 6,2 berechnet (Abb. 38). Bei der Interaktion der AOC2 mit der AOC4 konnte eine deutliche punktförmige Verteilung der Fluoreszenz beobachtet werden, wogegen hier kaum eine diffuse Fluoreszenzverteilung auftrat (Abb. 37). Die bereits beobachtete starke Fluoreszenz spiegelt sich auch im berechneten relativen Fluoreszenzwert von 11,1 wieder (Abb. 38).

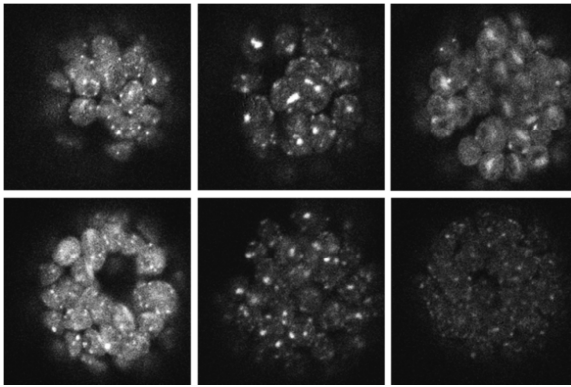


Abb. 35: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC1-YFP^C.

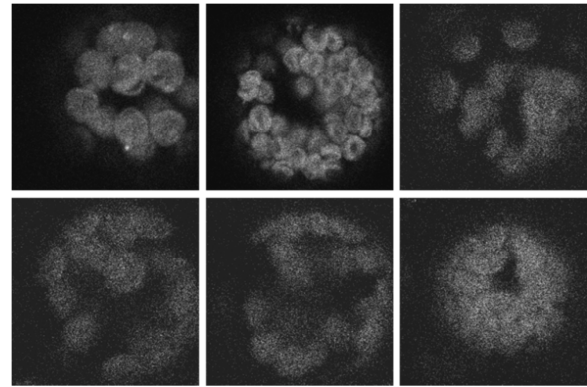


Abb. 36: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC3-YFP^C.

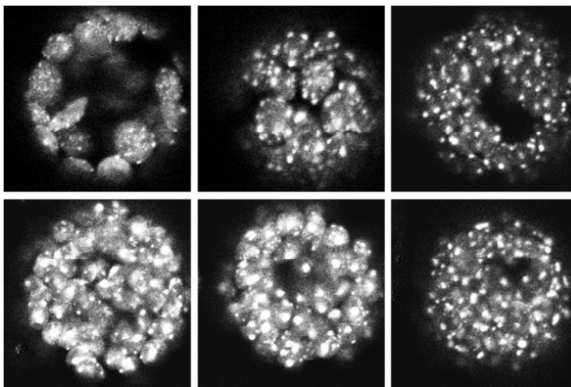


Abb. 37: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC4-YFP^C.

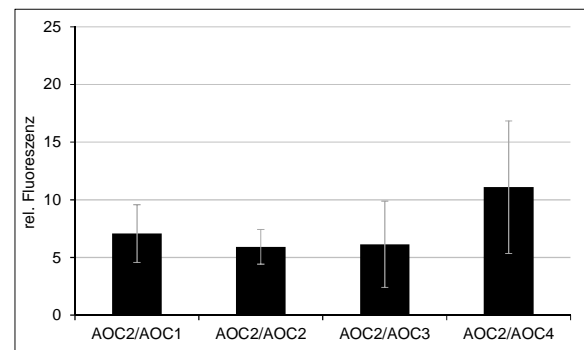


Abb. 38: Relative Fluoreszenzintensitäten der Interaktion der AOC2.

Die Beobachtung der Interaktion zwischen AOC3-YFP^N und AOC1-YFP^C zeigte, wie die reverse Kombination von AOC1-YFP^N mit AOC3-YFP^C (Abb. 32), eine deutlich diffuse Verteilung der Fluoreszenz über den gesamten Chloroplasten (Abb. 39). Eine punktförmige Verteilung konnte bei dieser Kombination gar nicht beobachtet werden. Die für diese Kombination errechnete relative Fluoreszenz lag bei einem Wert von 5,7 (Abb. 42). Die Kombination der AOC3-YFP^N mit der AOC2-YFP^C zeigte ein ähnliches Bild wie die umgekehrte Kombination (AOC2-YFP^N mit AOC3-YFP^C; Abb. 36). Auch hier konnte eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz über den gesamten Chloroplasten beobachtet werden, wobei wiederum keine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz sichtbar war (Abb. 40). Die errechnete relative Fluoreszenz betrug bei dieser Kombination 6,7 (Abb. 42). Die Untersuchung der Interaktion zwischen AOC3-YFP^N und AOC4-YFP^C zeigte eine starke bis sehr starke Fluoreszenz (Abb. 41). Diese war dabei diffus über die gesamten Chloroplasten verteilt, mit einer Häufung an den Chloroplastenrändern. Eine punktförmige Fluoreszenz, wie sie bei anderen Interaktionen beobachtet (z. B. Abb. 37) werden konnte, fehlte hier vollständig. Die relative Fluoreszenz wurde mit 13,9 berechnet.

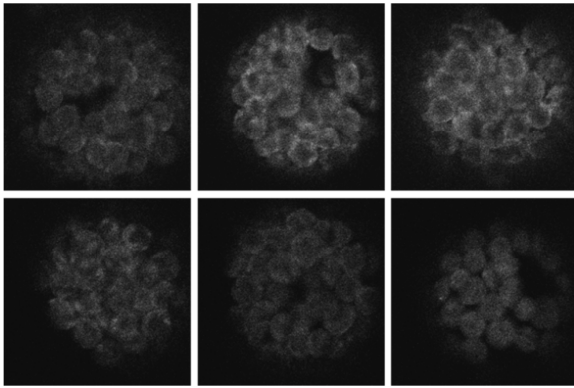


Abb. 39: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC3-YFP^N/AOC1-YFP^C.

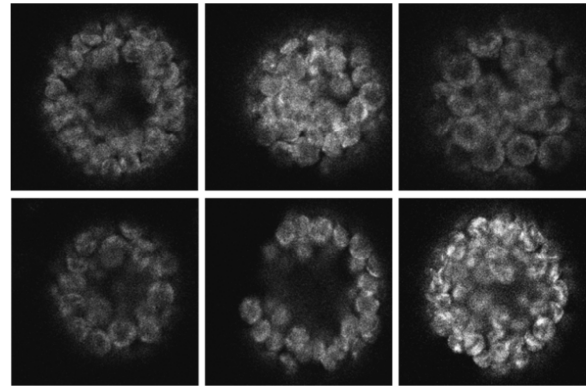


Abb. 40: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC3-YFP^N/AOC2-YFP^C.

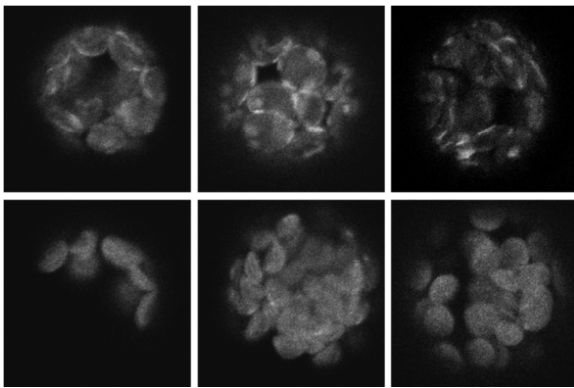


Abb. 41: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC3-YFP^N/AOC4-YFP^C.

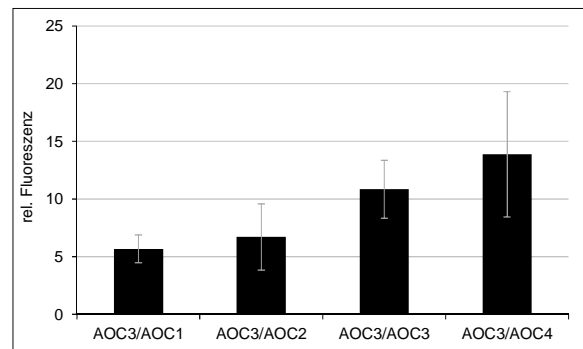


Abb. 42: Relative Fluoreszenzintensitäten der Interaktionen der AOC3.

Bei der Untersuchung der Kombination der AOC4-YFP^N mit der AOC1-YFP^C erkennt man wieder eine ausgeprägte punktförmige Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 43), welche von einer diffusen Verteilung begleitet war. Dies konnte schon bei der reversen Kombination (AOC1-YFP^N und AOC4-YFP^C) beobachtet werden (Abb. 33). Der relative Wert für diese Kombination liegt bei 9,1. Die beobachtete Fluoreszenz der Kombination AOC4-YFP^N mit AOC2-YFP^C war etwas schwächer ausgeprägt als die umgekehrte Kombination (Abb. 37), allerdings konnte auch hier eine punktförmige Verteilung mit zusätzlichen diffusen Arealen beobachtet werden (Abb. 44). Die relative Fluoreszenz für diese Kombination betrug 8,2 (Abb. 46). Die letzte untersuchte Kombination zwischen AOC4-YFP^N und AOC3-YFP^C zeigte eine stark diffuse, über die gesamten Chloroplasten verteilte Fluoreszenz (Abb. 45). Eine zusätzliche Häufung von Fluoreszenzarealen an den Rändern der Chloroplasten konnte auch bei der umgekehrten Kombination beobachtet werden (Abb. 41 und Abb. 45). Der relative Fluoreszenzwert für diese Kombination war 13,7 (Abb. 46). Eine Zusammenfassung aller relativen Fluoreszenzintensitäten aus den BiFC-Experimenten mit den Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten befindet sich im Anhang (Abb. 69, S. 84).

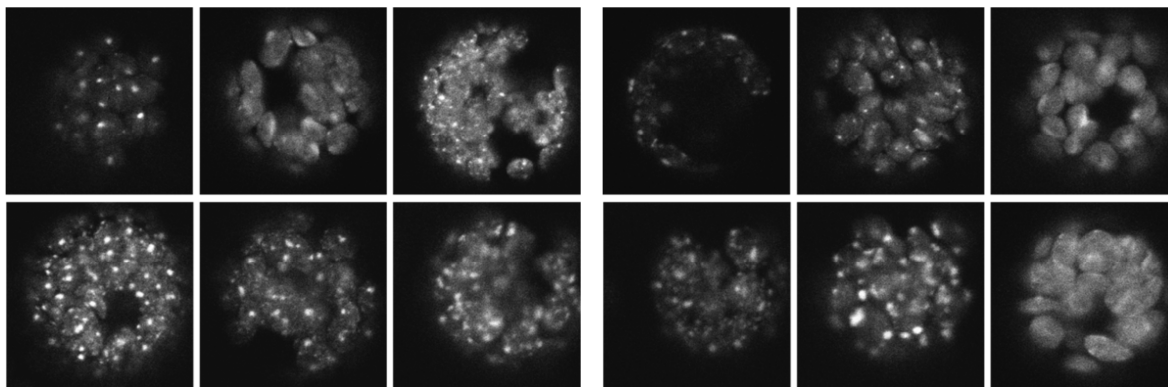


Abb. 43: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC4-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 44: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC4-YFP^N/AOC2-YFP^C.

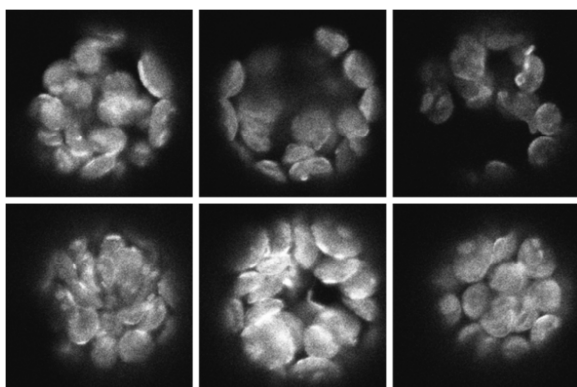


Abb. 45: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transfiziert mit AOC4-YFP^N/AOC3-YFP^C.

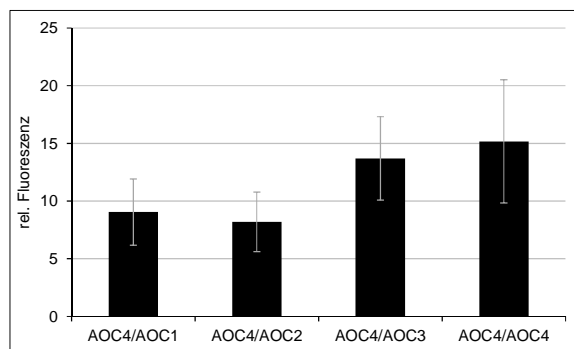


Abb. 46: Relative Fluoreszenzintensitäten der Interaktionen der AOC4.

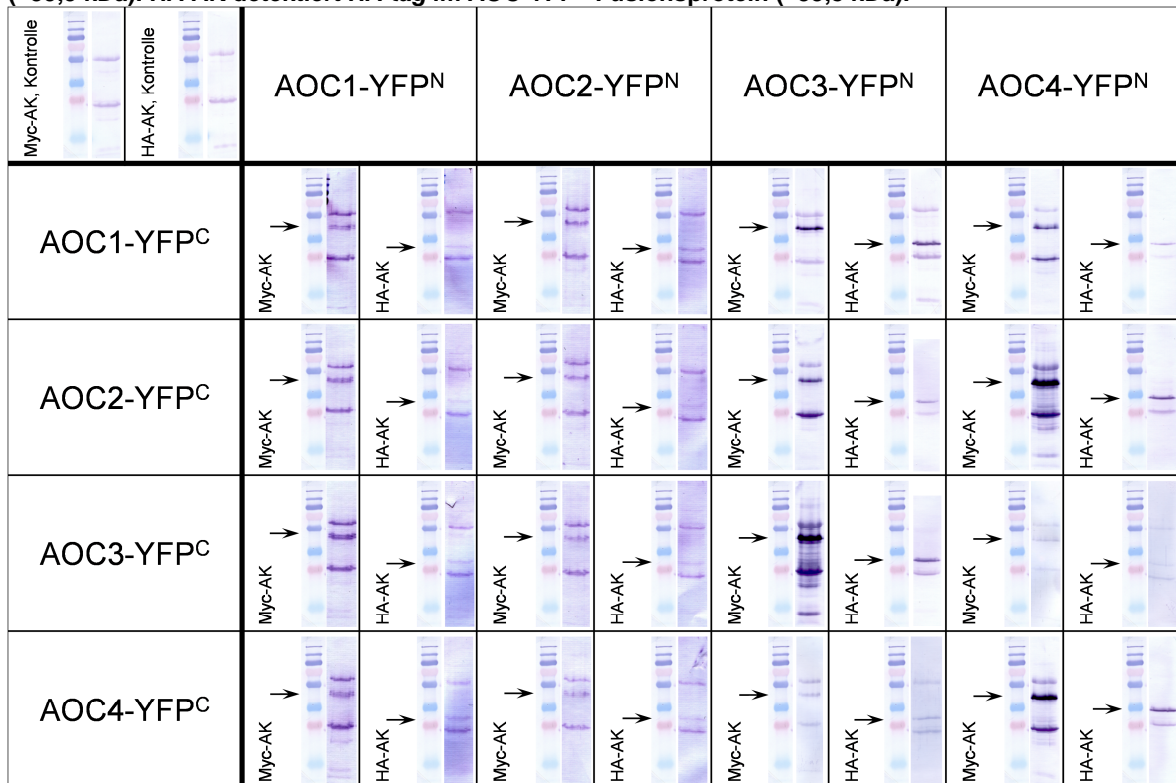
In Abb. 47 sind die Ergebnisse der BiFC in einer Übersicht zusammengefasst. Man kann deutlich die verschiedenen Lokalisierungen, Erscheinungsbilder und Intensitäten der einzelnen Kombinationen erkennen. Besonders deutlich sind dabei Interaktionen sichtbar, an denen die AOC4 beteiligt ist.

YFP ^N \ YFP ^C	AOC1	AOC2	AOC3	AOC4
	AOC1			
AOC2				
AOC3				
AOC4				

Abb. 47: Übersicht der BiFC-Untersuchungen in *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten.

Zur Überprüfung der Expression der AOC-BiFC-Fusionskonstrukte in den Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten wurden Proben der transformierten Protoplasten aufgeschlossen und die Proteinfraktion mittels Western-Blot untersucht. Für alle Fusionskonstrukte konnten dabei die entsprechenden Banden der Fusionsproteine detektiert werden (Tab. 11).

Tab. 11: Immunologischer Nachweis der AOC-YFP^{NC}-Fusionsproteine in *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten. Myc-AK detektiert Myc-tag im AOC-YFP^N-Fusionsprotein (~39,5 kDa). HA-AK detektiert HA-tag im AOC-YFP^C-Fusionsprotein (~33,8 kDa).



3.4.2 *Nicotiana-benthamiana*-Blätter

Die in Kapitel 3.4.1 (S. 49) gezeigten Ergebnisse sollten im Folgenden in einem zweiten System verifiziert werden. Zum Einen, um eine durch die Protoplastierung ausgelöste falsch-positive Interaktion auszuschließen. Und zum anderen, um eine durch die in den Mesophyllzellen abundant vorkommenden AOC-Proteine ausgelöste mögliche Interferenz mit dem BiFC-System auszuschließen. Die Wahl fiel dabei auf Blätter von *Nicotiana benthamiana*, da diese lediglich eine AOC besitzen, welche in den Leitbündeln exprimiert wird (B. Hause, persönliche Mitteilung). Daher war eine mögliche Interferenz zwischen *N.-benthamiana*-AOC und BiFC-System im Mesophyll sehr unwahrscheinlich.

Die Infiltration der Tabakblätter mit den entsprechenden Konstrukten (Tab. 10, S. 49) erfolgte nach dem in Kapitel 2.7 (S. 34) beschriebenen Protokoll.

Ähnlich den für die unterschiedlichen Kombinationen der *AtAOC* in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten beschriebenen Interaktionen konnten auch im Blatt von *N. benthamiana* unterschiedliche Intensitäten und Erscheinungsbilder der detektierten Fluoreszenz beobachtet werden. Auf eine Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität wurde hier verzichtet, da es sich bei den Proben um ganze Blattstücke handelte. Dadurch waren die Mesophyllzellen in tieferen Ebenen der Blattstücke optisch schlechter zugänglich. Außerdem wurde das Anregungslicht mehr oder weniger stark von der Kutikula gestreut, was selbst innerhalb eines Blattstückes zu starken Schwankungen in den Messungen führte.

Die homomere Interaktion der AOC3 konnte in den *N.-benthamiana*-Blättern als die optisch am stärksten sichtbare identifiziert werden (Abb. 50). Im Gegensatz zu den beobachteten Ergebnissen in Mesophyllprotoplasten (Abb. 28) ist die Fluoreszenz hier weniger diffus zu sehen und eher stark konzentriert an den Rändern der Chloroplasten zu beobachten. Die homomere Interaktion der AOC4 erscheint, anders als in den Mesophyllprotoplasten beobachtet, schwächer als die der AOC3 (Abb. 51), wobei die Fluoreszenz hier auch weniger diffus erscheint und mehr an den Rändern lokalisiert war. Ähnlich zu den Beobachtungen in Mesophyllprotoplasten sind die homomeren Interaktionen der AOC1 und AOC2 die optisch schwächsten (Abb. 48 und Abb. 49). Beide ähneln sich sehr stark in ihrem Erscheinungsbild und die Fluoreszenz erscheint mehr diffus und weniger stark auf bestimmte Areale konzentriert.

Mehrheitlich konnten die beobachteten homomeren Interaktionen der *AtAOCs* in *N.-benthamiana*-Blättern die zuvor in Kapitel 3.4.1 (S. 49) beschriebenen Ergebnisse mit den Mesophyllprotoplasten untermauern.

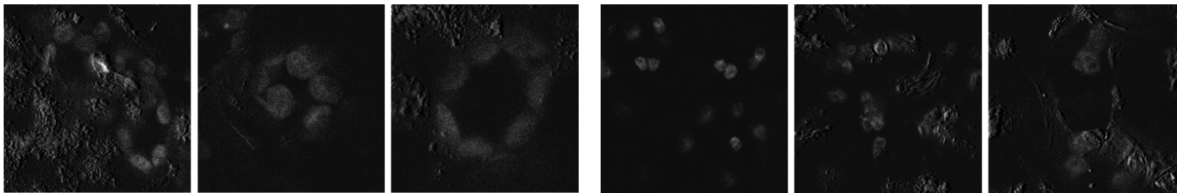


Abb. 48: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC1-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 49: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC2-YFP^C.

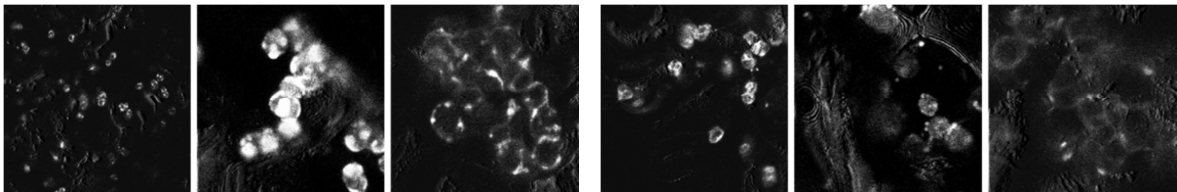


Abb. 50: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC3-YFP^N/AOC3-YFP^C.

Abb. 51: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC4-YFP^N/AOC4-YFP^C.

Bei der Beobachtung der heteromeren Interaktionen der AOC1 in den *N.-benthamiana*-Blättern wurden die in den Mesophyllprotoplasten gefundenen Ergebnisse (Abb. 31 bis Abb. 33) bestätigt. Die AOC1-YFP^N zeigte auch hier eine relativ schwache Fluoreszenz bei der Interaktion mit der AOC2-YFP^C, welche an den Rändern der Chloroplasten mit wenigen Punkten zu sehen war (Abb. 52). Bei der Interaktion der AOC1-YFP^N mit AOC3-YFP^C war die Fluoreszenz ähnlich. Zusätzlich konnten noch helle Punkte an den Rändern der Chloroplasten beobachtet werden (Abb. 53). Die Interaktion zwischen AOC1-YFP^N und AOC4-YFP^C, welche in den Mesophyllprotoplasten eindeutig ausgeprägt war (Abb. 33), war auch in den Blättern von *N. benthamiana* als relativ starkes Signal sichtbar (Abb. 54). Dieses war, im Gegensatz zu den Mesophyllprotoplasten, nicht stark punktförmig, sondern diffus über die gesamten Chloroplasten verteilt (Abb. 54).

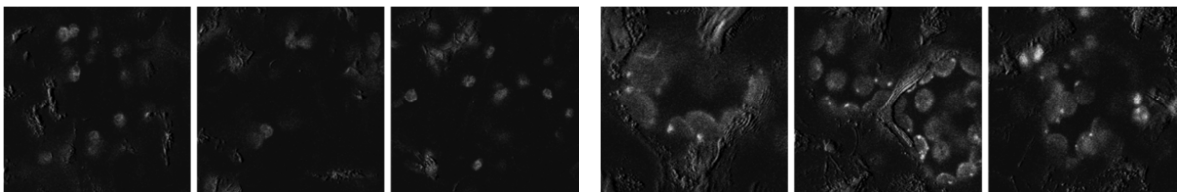


Abb. 52: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC1-YFP^N/AOC2-YFP^C.

Abb. 53: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC1-YFP^N/AOC3-YFP^C.

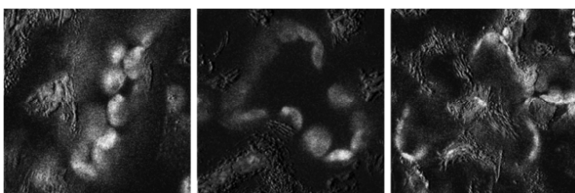


Abb. 54: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC1-YFP^N/AOC4-YFP^C.

Die heteromere Interaktion der AOC2-YFP^N mit der AOC1-YFP^C zeigte in *N.-benthamiana*-Blättern, wie in Mesophyllprotoplasten (Abb. 35), ein mittleres bis schwaches Fluoreszenzsignal (Abb. 55). Dabei war keine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz zu beobachten, sondern eine eher diffuse Verteilung über den gesamten Chloroplasten (Abb. 55). Ein ähnliches Bild ließ sich bei der Interaktion von AOC2-YFP^N und AOC3-YFP^C beobachten. Die Fluoreszenz war auch hier eher diffus verteilt, begleitet von einigen wenigen Häufungen an den Chloroplastenrändern mit einem mittel bis schwach einzuordnendem Signal (Abb. 56). Die Interaktion der AOC2-YFP^N mit der AOC4-YFP^C war sehr deutlich erkennbar, in ihrer Erscheinung weniger diffus und überwiegend an den Rändern der Chloroplasten gehäuft (Abb. 57). Sie ähnelte damit sehr den Ergebnissen aus den Mesophyllprotoplasten (Abb. 37).

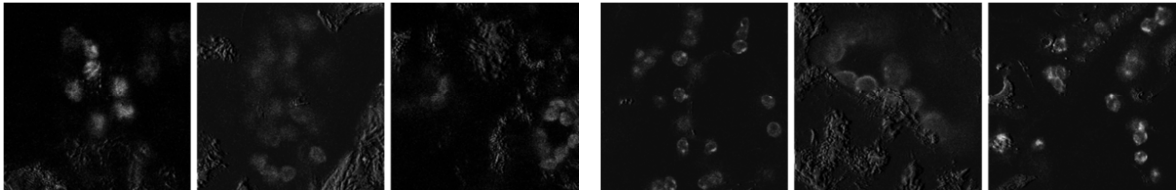


Abb. 55: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 56: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC3-YFP^C.

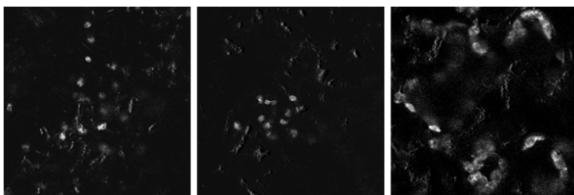


Abb. 57: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC2-YFP^N/AOC4-YFP^C.

Betrachtet man die möglichen heteromeren Interaktionen der AOC3 in *N.-benthamiana*-Blättern, erkennt man eine starke Ähnlichkeit der beobachteten Fluoreszenz mit den Ergebnissen mit den Mesophyllprotoplasten (Abb. 39 bis Abb. 41). Auch in den Tabakblättern war die Fluoreszenz der Interaktion von AOC3-YFP^N mit der AOC1-YFP^C in deutlich sichtbaren Arealen an den Rändern der Chloroplasten lokalisiert (Abb. 58). Die Interaktion der AOC3-YFP^N mit der AOC2-YFP^C zeigte ebenfalls dieses Bild (Abb. 59) und bestätigte somit die Ergebnisse mit den Mesophyllprotoplasten (Abb. 40). Die Experimente mit den Mesophyllprotoplasten zeigten bei der Interaktion der AOC3-YFP^N mit der AOC4-YFP^C eine der stärksten beobachteten Fluoreszenzen (Abb. 41), dies konnte auch in dem System der *N.-benthamiana*-Blättern beobachtet werden (Abb. 60). Die Fluoreszenz war hier sehr deutlich in hellen Arealen entlang der Chloroplastenränder zu beobachten.

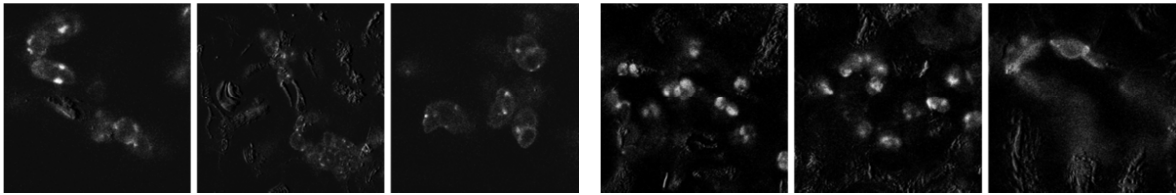


Abb. 58: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC3-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 59: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC3-YFP^N/AOC2-YFP^C.

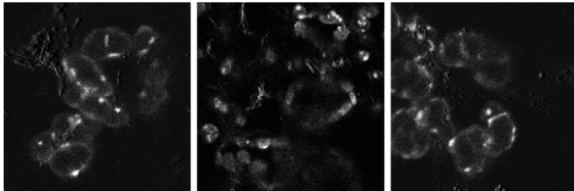


Abb. 60: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC3-YFP^N/AOC4-YFP^C.

Die heteromeren Interaktionen der AOC4 ähnelten stark den mit Mesophyllprotoplasten gefundenen Interaktionen. So ist die Interaktion der AOC4-YFP^N mit der AOC1-YFP^C, wie in Mesophyllprotoplasten (Abb. 43) beobachtet, in deutlichen Fluoreszenzarealen an den Rändern der Chloroplasten zu finden (Abb. 61). Dies entspricht auch der in der umgekehrten Interaktion (AOC1-YFP^N mit AOC4-YFP^C, Abb. 54) beobachteten Fluoreszenz. Das Gleiche gilt für die Interaktion der AOC4-YFP^N mit der AOC2-YFP^C. Hier sind deutliche Fluoreszenzareale an den Rändern der Chloroplasten zu finden (Abb. 62), welche sowohl in der inversen Kombination in Tabakblättern (Abb. 57) als auch während der Experimente mit Mesophyllprotoplasten (Abb. 44) auftraten. Bei der Beobachtung der heteromeren Interaktion der AOC4-YFP^N mit der AOC3-YFP^C konnte eine starke Fluoreszenz gefunden werden (Abb. 63). Diese trat wiederum in großen Arealen an den Rändern der Chloroplasten auf (Abb. 63). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus Mesophyllprotoplasten (Abb. 45) und der inversen Kombination in Tabak (Abb. 60) überein.

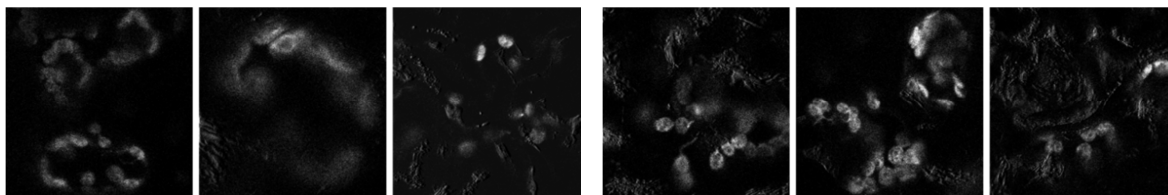


Abb. 61: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC4-YFP^N/AOC1-YFP^C.

Abb. 62: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC4-YFP^N/AOC2-YFP^C.

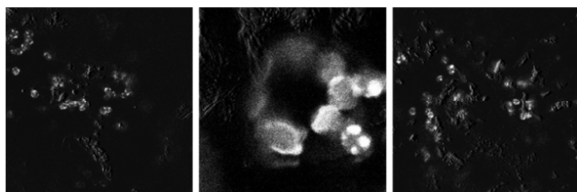


Abb. 63: *N.-benthamiana*-Blatt transformiert mit AOC4-YFP^N/AOC3-YFP^C.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in *N.-benthamiana*-Blättern gefundenen Interaktionen (Abb. 64), deren Erscheinungsbild, die Fluoreszenzverteilung und Intensität mit den mit Mesophyllprotoplasten gewonnenen Daten weitestgehend übereinstimmen.

YFP ^C \ YFP ^N	AOC1	AOC2	AOC3	AOC4
AOC1				
AOC2				
AOC3				
AOC4				

Abb. 64: Übersicht der BiFC-Untersuchungen in *N.-benthamiana*-Blättern.

3.5 Untersuchung der Enzymaktivität *in planta*

Die in Kapitel 3.4.1 (S. 49) und 3.4.2 (S. 57) erhaltenen Ergebnisse zeigten eine differenzierte Interaktion der vier AOC-Isoproteine. Dies lässt die Hypothese einer unterschiedlich starken Enzymaktivität der gebildeten Heteromere zu. Um dies zu testen, sollte eine mögliche Änderung der Expression der *Nicotiana-benthamiana*-AOC als Maß einer veränderten Aktivität der *Arabidopsis-thaliana*-AOC-Heteromere verwendet werden. Die Aktivitätssteigerung sollte zur Akkumulation von Jasmonat führen, das seinerseits die *NbAOC*-Expression erhöhen sollte, welche dann mittels *real time* PCR untersucht werden kann. Dieser Ansatz basiert auf folgenden Zusammenhängen: Die Expression der AOC wird durch Jasmonat, etwa bei einer Verwundung gebildet, induziert. Dieses Jasmonat wird von im Pflanzengewebe vorhandenen Biosyntheseenzymen (u. a. AOC) synthetisiert. Werden im Tabakblatt nun verschiedene Kombinationen an *Arabidopsis*-AOC transient exprimiert, können sich AOC-Heteromere bilden. Diese weisen möglicherweise unterschiedliche Enzymaktivitäten auf. Bei einer hohen Aktivität eines *AtAOC*-Heteromers würde dies zu einer verstärkten Anhäufung von Jasmonat führen, das die *NbAOC* stärker induziert. Bei einer niedrigen Aktivität würde die geringere Bildung von Jasmonat zu einer schwächeren Induktion der *NbAOC* führen (Abb. 65).

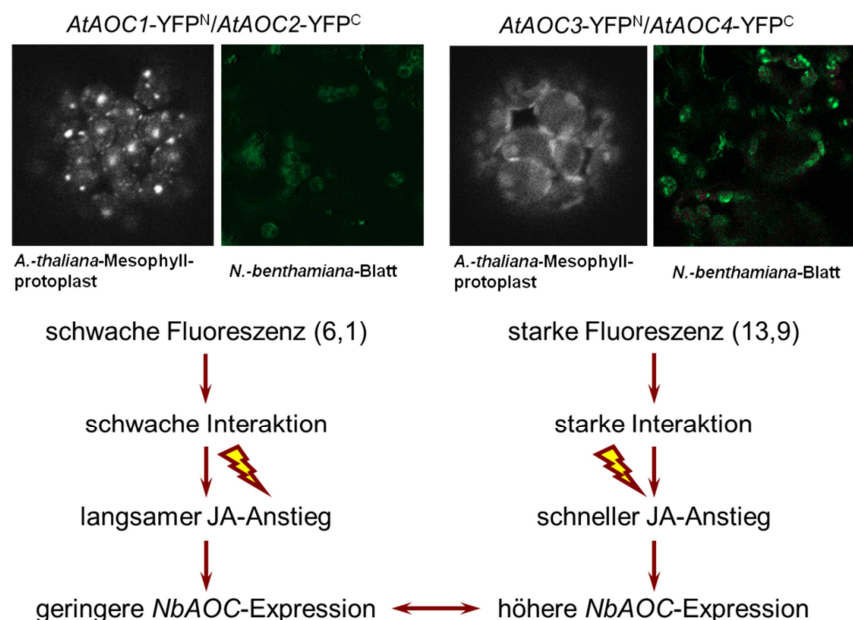


Abb. 65: Hypothese zur geänderten Expression der *NbAOC* als Resultat einer unterschiedlichen *AtAOC*-Aktivität.

Durch Verwendung der *real-time*-PCR-Technik sollte die Expression der *NbAOC* als Reaktion auf die Verwundung von mit *AtAOC* infiltrierte Blättern untersucht werden. Mit den Ergebnissen dieses Versuches sollte eine mögliche Korrelation zwischen visuell

beobachtbarer Interaktion (BiFC, Kap. 3.4.1, S. 49 und Kap. 3.4.2, S. 57) und enzymatischer Aktivität erfasst werden.

Hierfür wurden die Blätter von zwölf *Nicotiana-benthamiana*-Pflanzen wie in Kapitel 2.7 (S. 34) beschrieben infiltriert. Nach fünf-tägiger Inkubation wurden die Pflanzen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe diente als unverwundete Kontrollgruppe, die infiltrierten Blattbereiche der zweiten Gruppe wurden verwundet. Nach einer Stunde wurden die infiltrierten Blattbereiche beider Gruppen geerntet, wie in Kapitel 2.1.1 (S. 15) beschrieben aufgearbeitet, die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend für die *real time* PCR eingesetzt.

Nicotiana-benthamiana-Pflanzen, welche lediglich mit Leervektoren transformiert wurden, zeigten eine Steigerung der Expressionsrate nach Verwundung um den Faktor 9,5 (Abb. 66). Nach Transformation der Pflanzen mit den einzelnen Konstrukten verdoppelte sich die Expression der Tabak-AOC. So wurde für die mit *AtAOC1-YFP^N* transformierten Pflanzen eine Steigerung der Expressionsrate der tabakeigenen AOC von 16,23 gemessen (Abb. 66). Für das transformierte Konstrukt *AtAOC3-YFP^N* konnte mit 18,06 ein ähnlicher Wert bestimmt werden. Die beiden *YFP^C*-Konstrukte, *AtAOC2* und *AtAOC4*, resultierten in einer nochmaligen Steigerung der Expression der Tabak-AOC. Hier wurden Werte von 22,76 (*AtAOC3*) und 22,89 (*AtAOC4*) gemessen (Abb. 66).

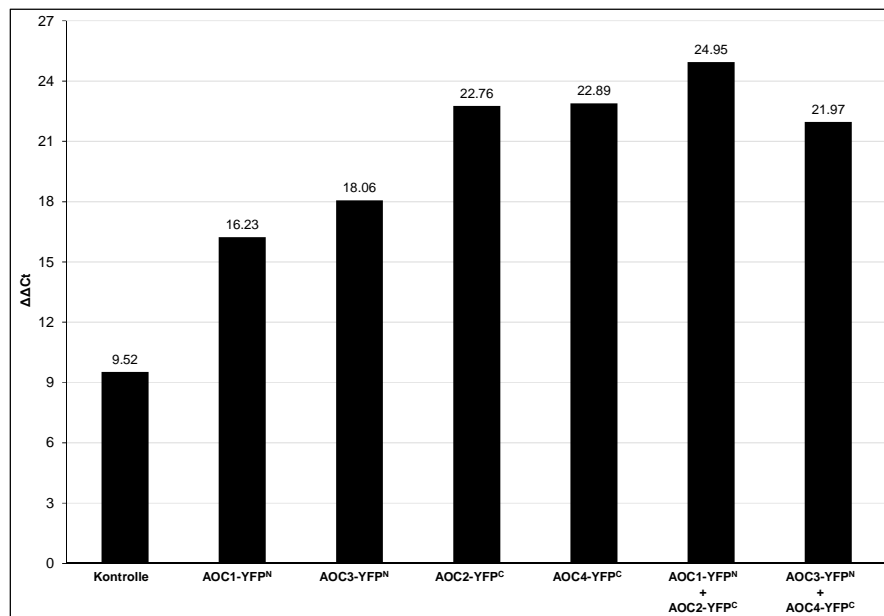


Abb. 66: Änderung der Expression der *NbAOC* relativ zu *NbRPS6* nach Verwundung. Transformation mit den entsprechenden *AtAOC*-Konstrukten.

Wurden die *N.-benthamiana*-Pflanzen mit der Kombination aus *AtAOC1-YFP^N* und *AtAOC2-YFP^C* transformiert, erhöhte sich die Expression der *NbAOC* um den Faktor 24,95. Die Transformation mit der Kombination aus *AtAOC3-YFP^N* und *AtAOC4-YFP^C* zeigte dagegen eine Vervielfachung der Expression der *NbAOC* um den Faktor 21,97.

3.6 Untersuchungen zur Proteininstabilität

In früheren Experimenten (Kap. 3.5, S. 62; Stenzel *et al.*, 2003b) konnte gezeigt werden, dass nach Verwundung die Menge an AOC-Transkript stark ansteigt. Dieser Anstieg zeigt sich jedoch nicht in einer Änderung des Proteinlevels. Dies kann zwei Ursachen haben: (1) die synthetisierte mRNA wird nicht translatiert, oder (2) ein schneller Protein-*turn-over* in Verbindung mit der Neusynthese von AOC-Protein führt zu diesem scheinbar unveränderten AOC-Proteinlevel.

Um dies zu untersuchen, sollten zunächst Glucuronidase-Fusionskonstrukte (GUS) unter der Expressionskontrolle des 35S-Promoters konstruiert werden (Abb. 67). Mit Hilfe der GUS ist die Expression des fusionierten Proteins direkt über einen Farb- oder einen Fluoreszenznachweis detektierbar. Dafür wurden *A. thaliana*-Col0-Pflanzen stabil mittels der *floral-dip*-Transformationsmethode (Kap. 2.9, S. 36) transformiert. Allerdings konnten lediglich mit Konstrukten für AOC1 und AOC3 stabil transformierte *A. thaliana*-Pflanzen erhalten werden.

Die verwendeten AOC-GUS-Fusionskonstrukte stehen unter der Expressionskontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promoters. Um mittels der GUS-Aktivität einen möglichen AOC-*turn-over* messen zu können, musste die Neusynthese des Fusionskonstruktes vor Beginn des Experimentes inhibiert werden. Zu diesem Zweck wurde Cycloheximid (CHX) in einer Konzentration von 200 mg/l (71 mM) in die Blätter infiltriert.

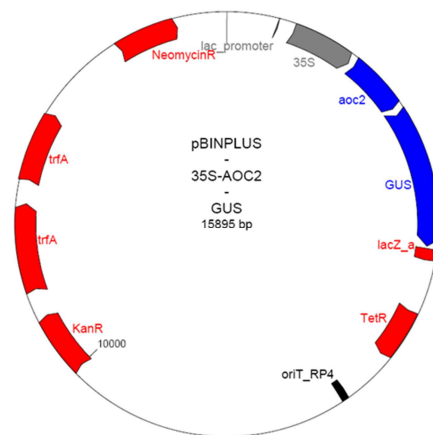


Abb. 67: Konstrukt zur Insertion eines AOC-GUS-Fusionskonstruktes in *A. thaliana*. Dargestellt ist als Beispiel das AOC2-Konstrukt.

Für die Experimente wurden fünf Wochen alte Pflanzen wie in Kapitel 2.10 (S. 37) beschrieben behandelt und aufgearbeitet. Die anschließende Messung der Glucuronidase-Aktivität (GUS-Aktivität) zeigte, dass in unbehandelten Kontrollproben (□) die Aktivität für beide Konstrukte ähnlich war (Abb. 68). So wurde für das AOC1-GUS-Konstrukt eine Aktivität von 3,92 pmol/s und für das AOC3-GUS-Konstrukt eine Aktivität

von 4,60 pmol/s gemessen (Abb. 68). Für die unverwundeten, mit Cycloheximid behandelten Pflanzen (▣), wurden Werte gemessen, die mit 4,18 bzw. 3,87 pmol/s ähnlich denen der unbehandelten Pflanzen waren (Abb. 68). Auch die Verwundung der Pflanzen, ohne die Behandlung mit Cycloheximid änderte die gemessenen GUS-Aktivitäten nicht. So konnte hier für die AOC1-GUS-Konstrukte ein Wert von 3,81 pmol/s und für die AOC3-GUS-Konstrukte ein Wert von 4,24 pmol/s gemessen werden (Abb. 68). Der erwartete erhöhte AOC-*turn-over*, der in Folge einer Verwundung zu einer verminderten GUS-Aktivität führen sollte, konnte auch für verwundete und mit Cycloheximid behandelte Pflanzen (■) nicht beobachtet werden. Hier wurden wieder Werte gemessen werden, die sich kaum von den bereits Gezeigten unterschieden. Das Konstrukt AOC1-GUS zeigte einen Wert von 4,82 pmol/s, das Konstrukt aus AOC4 und Glucuronidase eine Aktivität von 3,64 pmol/s (Abb. 68).

Ein veränderter Protein-*turn-over* konnte für die AOC1 und AOC3 mit Hilfe des hier verwendeten Systems nicht beobachtet werden.

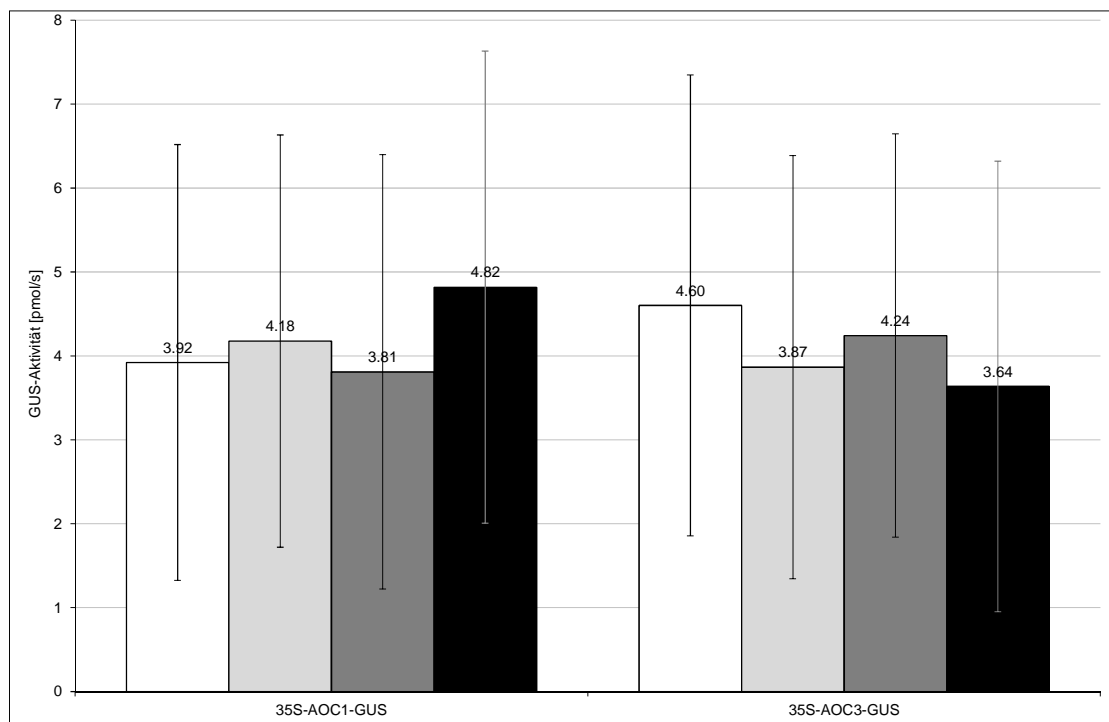


Abb. 68: Gemessene Glucuronidase-Aktivitäten in pmol/s. (□ nicht verwundet, ohne Cycloheximid; ▣ nicht verwundet, mit Cycloheximid; ▤ verwundet, ohne Cycloheximid; ■ verwundet, mit Cycloheximid). Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert +/- SD (n=6).

4 Diskussion

Die Allenoxidzyklase katalysiert den Schritt in der Biosynthese von Jasmonsäure (JA), bei dem die Stereospezifität der 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) festgelegt wird (Laudert *et al.*, 1997). In *Arabidopsis thaliana* sind vier Isoformen dieses Enzyms bekannt (Hause *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003b), wobei für alle vier Isoenzyme auch die katalytische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Stenzel *et al.*, 2003b). Des Weiteren zeigte sich ein Vorkommen der AOC in *A. thaliana* in verschiedenen Geweben, jedoch konnten hier die vier Isoformen nicht unterschieden werden (Hause *et al.*, 2003). Hinweise für eine differentielle aber auch eine überlappende Expression der vier AOC-kodierenden Gene konnten mit AOC-Promoter-GUS-Fusionen gewonnen werden (Abb. 3, S. 5; Stenzel *et al.*, in Vorbereitung). In ersten Arbeiten zur AOC aus *Zea mays* konnte festgestellt werden, dass diese *in vivo* wahrscheinlich als Dimer vorliegt (Ziegler *et al.*, 1997). Zusätzlich konnten Hofmann *et al.* (2006) für die *AtAOC2* eine Trimerisierung zeigen. Das AOC-Monomer besteht dabei aus einem 8-strängigen antiparallelen β -barrel, wobei jedes der drei Monomere um 30° gegen das nächste Monomer im Trimer gedreht ist (Hofmann *et al.*, 2006).

Für die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Synthase (ACC-Synthase), welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Ethylenbiosynthese katalysiert, zeigte sich, dass die neun in *A. thaliana* exprimierten Mitglieder dieser Familie überlappend exprimiert werden (Tsuchisaka & Theologis, 2004a). Außerdem sind sie in der Lage, heterolog miteinander zu interagieren und so die enzymatische Aktivität zu variieren (Tsuchisaka & Theologis, 2004b; Tsuchisaka *et al.*, 2009). Die Aktivitäts- bzw. Spezifitätsregulierung über die Bildung von Heteromeren ist ein Mechanismus, der z. B. auch für die OPDA-Reduktase 3 (OPR3) und die JAZ-Proteine (Jasmonat-ZIM-Domäne) beschrieben wurde (Breithaupt *et al.*, 2006; Chung & Howe, 2009). Die OPR3 wird durch Dimerbildung inaktiviert und die JAZ-Proteine zeigen als heterodimere Transkriptionsfaktoren eine veränderte Spezifität für unterschiedliche Promotoren JA-responsiver Gene. Für die AOC-Familie in *A. thaliana* könnte ein solcher Mechanismus ebenfalls zutreffen. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die AOC-Proteine aus *A. thaliana* untereinander Heteromere bilden können und dies möglicherweise zu einer veränderten Enzymaktivität führt. Ein solcher Mechanismus könnte das Wissen über JA erweitern und seine Funktionsweise besser zu verstehen helfen.

4.1 Organisation und Stabilität der AtAOCs

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob die AOC-Isoformen aus *A. thaliana* in der Lage sind, Multimere zu bilden. Erste Untersuchungen der AOC-Familie zeigten darauf keine Hinweise (Hause *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003b), kurze Zeit später konnte aber die AOC2 als Trimer kristallisiert werden (Hofmann *et al.*, 2006).

Hinweise auf die Bildung möglicher Proteinmultimere aller AOC-Isoformen lieferten SDS-PAGE Analysen zu Beginn dieser Arbeit. Diese Analysen wurden mit moderaten Denaturierungsbedingungen (42 °C, Kap. 3.1, S. 38) durchgeführt. Dabei konnte eine mögliche Multimerbande der AOC2 detektiert werden (Abb. 11, S. 38). Diese Bande liegt bei einer Größe von etwa 70 kDa (Abb. 11, S. 38), was weder dem Molekulargewicht eines Dimers (54 kDa), noch dem eines Trimers (81 kDa) entspricht. Die detektierte Monomerbande bei 27 kDa stimmt dabei mit dem berechneten Molekulargewicht überein. Die Abweichung des berechneten Dimer- bzw. Trimer-Molekulargewichtes (16 bzw. 11 kDa) vom detektierten Molekulargewicht ist vermutlich entweder auf eine noch vollständig intakte Faltung und Tertiärstruktur der AOC oder auf eine teilweise, auf einzelne Regionen der AOC beschränkte Denaturierung zurückzuführen. Ähnliches wurde auch für LamB, ein Trimerbildendes Membranprotein aus *E. coli* (Baldwin *et al.*, 2011) und das Virus-Bindeprotein σ_3 des Vogel-Reovirus S1 (Shapouri *et al.*, 1996) beschrieben. In beiden Arbeiten wurden in SDS-PAGE-Analysen Trimerbanden detektiert, welche entweder größer als das berechnete Molekulargewicht (σ_3 , Shapouri *et al.*, 1996) oder kleiner als das berechnete Molekulargewicht (LamB, Baldwin *et al.*, 2011) waren. Es konnte gezeigt werden, dass das deutlich höhere detektierte Molekulargewicht des σ_3 -Trimers auf eine unvollständige Denaturierung zurückzuführen war. Dies hatte zur Folge, dass sich ein Teil des Proteins entfaltete und das gesamte Trimer im Laufverhalten stark retardierte (Shapouri *et al.*, 1996). Der umgekehrte Fall konnte bei LamB beobachtet werden (Baldwin *et al.*, 2011). Hier zeigten nicht mit Hitze denaturierte LamB-Proteine ein kleineres Molekulargewicht in SDS-PAGE-Analysen als es für ein Trimer berechnet war. Wurde die Proteinprobe jedoch bei 96 °C denaturiert, zeigte sich das Monomer mit dem korrekten, berechneten Molekulargewicht. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten AOC-Proteine zeigten ebenfalls SDS-stabile Multimere, welche durch eine Denaturierung bei 96 °C aufgelöst werden können (Abb. 11, S. 38).

Wie oben beschrieben, gibt es zwei Möglichkeiten, die gefundene Multimerbande zu interpretieren. Um dies näher zu klären, wurden die AOC-Proteine einer Größenausschlusschromatographie (SEC, Gelfiltration) unterzogen (Kap. 2.2.10, S. 26 und Kap. 3.2, S. 40). Dabei konnte der größte Teil des auf die Trennsäule applizierten Proteins in einer Fraktion gefunden werden, welche bei ca. 75 – 80 ml eluierte (Tab. 9, S. 43). Das aus den

Elutionsvolumina errechnete Molekulargewicht der Proteinfractionen deutet auf die Existenz von AOC-Trimeren hin (Tab. 9, S. 43). Die Abweichung der experimentell bestimmten Molekulargewichte zu den theoretischen liegt dabei wahrscheinlich in den hydrodynamischen Eigenschaften der jeweiligen AOC-Proteine begründet. Bei der Verwendung der SEC und der Auswertung der erhaltenen Daten geht man davon aus, dass sich jedes Protein gleich verhält und ideal, symmetrisch globulär geformt ist (Stellwagen, 1990; O'Fagain *et al.*, 2011). Eine Abweichung von der idealen globulären Struktur führt zu einer Änderung der hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins und wird somit zu einem nicht erwarteten, abnormen Laufverhalten führen (Stellwagen, 1990; O'Fagain *et al.*, 2011). Die AOC-Proteine wurden aufgrund ihrer räumlichen β -*barrel* Struktur zur Familie der Lipocaline gezählt (Grzyb *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2006). Von dieser Proteinfamilie, welche sehr heterogen ist und eine große Vielfalt von Proteinen umfasst, ist die Bildung dimerer und auch höher organisierter Proteinkomplexe bekannt (Flower, 1996; Grzyb *et al.*, 2006). Aufgrund der Fass-Struktur dieser Proteine können die Proteinoligomere dichter gepackt sein als Vertreter globulärer Proteine (Grzyb *et al.*, 2006), was ein geringeres Volumen im Vergleich zur Proteinmasse bedeutet. Dies könnte die in dieser Arbeit beobachteten, abweichenden Molekulargewichte erklären (Tab. 9, S. 43). Bei SEC-Untersuchungen der AtAOC2 konnte von Hofmann *et al.* (2006) ebenfalls eine Abweichung des berechneten Molekulargewichtes zu den experimentell bestimmten Daten beobachtet werden. Die Abweichung von 25 % wurde als Resultat eines atypischen Laufverhaltens des AOC-Trimers interpretiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die AOC1, AOC2 und AOC3 in Trimeren organisiert sind (Tab. 9, S. 43), was sich im Falle der AOC2 mit den Kristallisationsergebnissen deckt (Hofmann *et al.*, 2006). Die AOC4 scheint sich anders zu verhalten. Hier wurde keine Trimerfraktion detektiert, das Protein scheint, zumindest *in vitro*, als Hexamer vorzuliegen (Tab. 9, S. 43).

Von Proteinen gebildete Multimere können durch den Einsatz von *crosslinkern* kovalent miteinander verknüpft werden (Mattson *et al.*, 1993; Jilaveanu *et al.*, 2005; Mikheikin *et al.*, 2009), was eine anschließende, gezieltere Untersuchung der Multimere zulässt. Zur Stabilisierung der AOC-Trimere wurde in dieser Arbeit Ethylen Glycol *bis* (Succinimidyl Succinat) (EGS, Abb. 8, S. 25) eingesetzt. EGS besitzt einen *linker* zwischen den endständigen, reaktiven N-Hydroxy-Succinimid-Gruppen, der sich über 16,1 Å erstreckt (Abdella *et al.*, 1979; Löster & Josic, 1997). Dabei ist zu beachten, dass sich mit der Verlängerung des *linkers* die Spezifität der Proteinverknüpfung vermindert. Je länger der *linker*-Arm ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Proteine verknüpft werden, die nicht miteinander interagieren (Phizicky & Fields, 1995). Im Falle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten AOC-Proteine sollten die Protein-Trimere (diese Arbeit, Hofmann *et al.*,

2006) stabilisiert werden, um anschließend deren Molekulargewicht untersuchen zu können. Bei der Verwendung des *crosslinkers* EGS konnten die Trimere der AOC1, AOC2 und AOC3 stabilisiert werden (Abb. 13, S. 39). Die Stabilisierung der Multimere der AOC4 war mit EGS nicht erfolgreich (Abb. 13, S. 39). Die AOC4 ist das Isomer der AOC-Familie in *Arabidopsis* welches sich am meisten von den anderen drei Mitgliedern der Familie unterscheidet. Die Identität der AOC4 zur AOC2 auf Aminosäureebene liegt bei lediglich 64 %, die anderen beiden AOCs zeigen Aminosäureidentitäten von 76 und 89 % (Anhang ab S. 84, Abb. 70 bis Abb. 75; Stenzel *et al.*, 2003b). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich im Fall der AOC4 die entsprechende(n) Lysinseitenkette(n) nicht in der richtigen Position oder gar nicht vorhanden sind, um eine Vernetzung durch EGS zu ermöglichen (Geisler, 1993). Beim Vergleich der Aminosäuresequenz der AOC4 mit der Aminosäuresequenz der AOC2 sind in beiden Proteinen Lysinseitenketten an den für eine Verknüpfung relevanten Positionen zu finden (Anhang, S. 87, Abb. 74). Daher wird eine Vernetzung der AOC4-Multimere wahrscheinlich durch die für dieses Protein beobachtete hexamere Struktur verhindert.

Die durch EGS stabilisierten Trimere von AOC1, AOC2 und AOC3 zeigten in SDS-PAGE-Untersuchungen das gleiche apparente Molekulargewicht wie die bereits beschriebenen SDS-stabilen AOC-Trimere (70 kDa, Vgl. Abb. 11, S. 38 und Abb. 13, S. 39). Wurden die Verknüpfungsprodukte der AOCs einer SEC unterzogen, konnte das gleiche Laufverhalten wie bei nicht verknüpften AOCs beobachtet werden (Abb. 15, S. 41 bis Abb. 18, S. 42). Erneut einer SDS-PAGE unterzogene gesammelte Trimerfraktionen zeigten wieder das bekannte Bandenmuster der verknüpften Proteinproben (Abb. 20, S. 44). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der Proteinbande von 70 kDa Molekulargewicht tatsächlich um die Trimerbande der AOCs handelt, welche aufgrund der dicht gepackten Proteinstruktur ein scheinbar kleineres Molekulargewicht in einer SDS-PAGE zeigten.

Mit Hilfe des *crosslinking*-Experimentes konnten die während der SDS-PAGE- und SEC-Untersuchungen beobachteten Trimerfraktionen der AOC1, AOC2 und AOC3 stabilisiert und verifiziert werden. Lediglich die AOC4 zeigte keine EGS stabilisierbaren Multimere, was vermutlich auf die beobachteten Proteinhexamere zurückzuführen ist.

Ein Nebenaspekt, welcher in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Stabilität der AOC-Proteine *in planta*. Das AOC-Proteinlevel bleibt auch nach einer Verwundung relativ konstant (Stenzel *et al.*, 2003b). Dies steht im Gegensatz zum Modell der Aktivierung der Expression von JA-responsiven Genen in Reaktion auf eine Verwundung (Vgl. Abb. 7, S. 11). Tatsächlich konnte ein Anstieg des AOC-mRNA-Gehaltes in *A. thaliana* nach einer Verwundung gemessen werden (Stenzel *et al.*, 2003b). Diese Diskrepanz könnte ebenfalls ein möglicher Regulationsmechanismus sein, welcher auf einem verstärkten AOC-*turn-over* im Zuge der Verwundungsreaktion basiert. Das würde bedeuten, dass die AOC dem

Biosyntheseweg beim Abklingen der Verwundungsreaktion entzogen wird. Auf diesem Weg kann kein neues JA gebildet werden und somit fände eine Metabolisierung der JA schneller statt. Um diese Hypothese zu testen, sollten die vier AOC-cDNAs mit dem GUS-Reportergen (Glucuronidase, Jefferson *et al.*, 1987) fusioniert werden (Kap. 2.10, S. 37), um über Veränderungen der enzymatischen Aktivität der Glucuronidase den AOC-*turn-over* sichtbar zu machen. Die dabei erhaltenen Daten der erfolgreich generierten und stabil transformierten Fusionskonstrukte der AOC1 und AOC3 zeigten jedoch keinerlei Hinweise auf einen erhöhten AOC-*turn-over* nach einer Verwundung (Abb. 68, S. 65). Um der Hypothese eines erhöhten AOC-*turn-overs* nach Verwundung weiter nachzugehen, wurden in einer parallelen Arbeit in der Arbeitsgruppe Untersuchungen mit Polysomen (naszierende Ribosomen) durchgeführt. Mit der Isolierung der Polysomen wird auch die daran gebundene und im Translationsprozess befindliche mRNA isoliert. Nach einer Verwundung steigt das AOC-mRNA-Level stark an (Stenzel *et al.*, 2003b), dieser Anstieg konnte auch an der polysomengebundenen AOC-mRNA nachverfolgt werden (Sperling, 2011). Dies spricht für eine Translation der AOC-mRNA, welche nach Verwundung gebildet wird. Es ist daher möglich, dass ein erhöhtes mRNA-Level der AOC den Protein-*turn-over* kompensiert, so dass die in früheren Arbeiten gezeigten konstanten AOC-Proteinlevel entstehen (Stenzel *et al.*, 2003b). Die Detektion des AOC-*turn-overs* mit dem hier verwendeten System erfordert aber eine vollständige Inhibierung der Proteinneusynthese, da sich das GUS-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des 35S-Promoters befand und dieser konstitutiv aktiv ist (Jefferson *et al.*, 1987). Zur Inhibierung wurde Cycloheximid (CHX) verwendet, welches in früheren Arbeiten mit Erfolg zur Inhibierung der Proteinsynthese eingesetzt wurde (van der Fits & Memelink, 2001; Dombrecht *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 200 mg/l (71 mM) liegt deutlich über der in anderen Arbeiten eingesetzten Konzentration von 100 µM (van der Fits & Memelink, 2001; Dombrecht *et al.*, 2007). In diesen wurde CHX dem Medium zugesetzt und über einen längeren Zeitraum bzw. direkt an die in Flüssigkultur wachsenden Pflanzenzellen appliziert. Dabei konnte eine Hemmung der Proteinbiosynthese erreicht werden (van der Fits & Memelink, 2001). In dieser Arbeit musste das CHX über die Epidermis erst in das Blatt gelangen (Kap. 0, S. 37). Möglicherweise wurde das CHX daher gar nicht, oder nur sehr wenig in die Zellen aufgenommen und damit auch die Proteinsynthese gar nicht oder nicht ausreichend gehemmt. Ein möglicher *turn-over* der AOC-Proteine könnte so nicht sichtbar gewesen sein. Um dieses Problem zu umgehen, sollten GUS-Fusionskonstrukte unter der Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promoters konstruiert werden. Diese Konstrukte konnten jedoch nicht stabil in *A. thaliana* transformiert werden und standen somit für diese Arbeit nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4.2 AtAOC-Heteromere sind *in vivo* nachweisbar

In Kapitel 4.1 (S. 67) wurde das Vorkommen der *Arabidopsis-thaliana*-AOCs als Trimere diskutiert. Da mehrere AOC-Gene gleichzeitig in gleichen Organen exprimiert werden (Vgl. Einleitung, Abb. 3, S. 5; Stenzel *et al.*, 2003b; Stenzel *et al.*, in Vorbereitung), stellt sich die Frage nach einer Heteromerbildung der verschiedenen AOC-Isoformen. Diese Möglichkeit sollte *in planta* mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (Bracha-Drori *et al.*) untersucht werden.

Die gewonnenen Daten weisen auf eine homo- und heteromere Interaktion aller vier AOC-Isoformen hin (Kap. 3.4, Abb. 47, S. 55). Für alle 16 möglichen Kombinationen (Vgl. Tab. 10, S. 49) konnten YFP-Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. 47, S. 55). Die Interaktion wurde dabei mittels des Emissionsspektrums von YFP kontrolliert (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Trotz der Identifizierung der Fluoreszenz könnte das Signal jedoch auch von falsch-positiven Interaktionen stammen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die YFP-Fragmente ohne fusioniertes Protein in die Protoplasten transformiert. Dabei trat in einigen Fällen lediglich eine schwache Hintergrundfluoreszenz auf (Anhang S. 89, Abb. 80 und Abb. 81). Ein ähnliches Phänomen konnten Walter *et al.* (2004) ebenfalls beobachten und führten es auf ein hohes Expressionsniveau der YFP-Fragmente zurück, die dadurch zu unspezifischer Interaktion neigen. Wurden jedoch zwei nicht interagierende Proteine an die YFP-Fragmente fusioniert, konnte keine YFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Bracha-Drori *et al.*, 2004).

Mit Hilfe der „klassischen“ BiFC können nur die Interaktionen von zwei Proteinen *in vivo* nachgewiesen werden (Hu *et al.*, 2002). Die AOCs liegen aber, wie bereits beschrieben auch *in planta* als Trimere vor (Hofmann *et al.*, 2006). Bei den hier gezeigten Untersuchungen wurden also nur Interaktionen von zwei der drei Partner sichtbar gemacht. Der dritte Partner könnte dabei einerseits ein weiteres Fusionsprotein sein, dessen *split*-YFP Anteil nicht zur Fluoreszenz beiträgt bzw. beitragen kann. Es besteht andererseits auch die Möglichkeit einer Interaktion der Fusionsproteine mit einer der bereits in der Zelle vorhandenen AOCs, die in *Arabidopsis*-Mesophyllzellen konstitutiv vorkommen (Stenzel *et al.*, 2003b). Die Visualisierung des dritten Partners im AOC-Trimer könnte über einen kombinierten Ansatz von BiFC und FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) erfolgen (Shyu *et al.*, 2008; Kwaaitaal *et al.*, 2010). Die BiFC-Konstrukte bzw. das daraus rekonstituierte YFP wird als Akzeptormolekül verwendet (Kwaaitaal *et al.*, 2010). Das dritte Konstrukt ist ein weiteres Fusionskonstrukt aus AOC und z. B. crFP (cerulean fluorescent protein). Alle drei Konstrukte müssen in die Zellen gebracht werden. Bei einem solchen Ansatz müsste man allerdings mit einer starken Verminderung der Transformationseffizienz rechnen, welche sich mit steigender Anzahl der zu transformierenden Konstrukte verringert (Walter *et al.*, 2004).

Dennoch würde mit einem solchen Ansatz möglicherweise die Stöchiometrie der Isoformen innerhalb eines AOC-Trimers und ein mögliche Bildung eines Heterotrimers aus drei verschiedenen Isoformen (BiFC-Fusions- und crFP-Fusionskonstrukt) untersucht werden können.

Beim Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzdaten aus Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten sind Unterschiede in Intensität und Aussehen der fluoreszierenden Areale erkennbar (Kap. 3.4.1, S. 49). Eine mögliche Erklärung könnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Interaktion und damit Fluoreszenzintensität der verschiedenen Kombinationen sein. Ein ähnlicher Effekt wurde von Walter *et al.* (2004) beschrieben. Hier wurden Wildtyp und Mutantenversionen von bZIP63, ein Transkriptionsfaktor der zur Familie der bZIP-Faktoren in Arabidopsis gehört (Jakoby *et al.*, 2002), untersucht. Der Transkriptionsfaktor bZIP63 ist in der Lage, *in vivo* Dimere auszubilden (Siberil *et al.*, 2001). Bei der mutierten Version wurden zwei Aminosäuren ausgetauscht, was sich negativ auf das Dimerisierungspotential des Proteins auswirkte (Siberil *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2004). So konnte in einem voran gestelltem *yeast-two-hybrid*-Assay eine Verminderung der Interaktion von Wildtyp- mit Mutanten-bZIP63 festgestellt werden (Walter *et al.*, 2004). Im Folgenden wurden die split-YFP-bZIP63-Fusionskonstrukte in Arabidopsis-Zellkulturprotoplasten transformiert und die Dimerisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Dabei konnte eine Abnahme der Fluoreszenz in den Protoplasten festgestellt werden, welche mit der Kombination aus Wildtyp- und Mutanten-bZIP63 transformiert worden sind (Walter *et al.*, 2004). Daraus schlossen die Autoren, dass die Fluoreszenz nicht nur ein qualitatives Maß für eine Interaktion ist, sondern auch ein quantitatives Maß für deren Ausprägung (Walter *et al.*, 2004). Aus den gesammelten Fluoreszenzdaten der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzspektren der Protoplasten extrahiert und standardisiert (Kap. 2.8, S. 35). Interpretiert man diese Daten mit den Erkenntnissen von Walter *et al.*, kann daraus geschlossen werden, dass einige Interaktionen der AOCs stark (z. B. AOC3-AOC4, Abb. 41, S. 54), anderen dagegen nur schwach ausgeprägt sind (z. B. AOC2-AOC1, Abb. 35, S. 53). Dies könnte auf eine unterschiedlich starke Ausbildung der Interaktionen der AOCs sowohl in Homomeren als auch Heteromeren *in planta* hinweisen.

4.3 Enzymaktivität der Heteromere

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die vier AOC-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* in der Lage sind, untereinander Heteromere zu bilden. Die Heteromerisierung kann dabei ein Hinweis auf eine mögliche Änderung der enzymatischen Aktivität der Heteromere sein, was in der Pflanze als zusätzliche Regulationsebene dienen könnte. In *Arabidopsis* wurde über die Entwicklungszeit eine Anhäufung von AOC-Protein in der Pflanze beobachtet (Hause *et al.*, 2003). Dabei ist auch die Verteilung der AOC-Proteine in den verschiedenen Organen (Blätter, Blüten, Stengel und Primärwurzeln) ausgeglichen (Hause *et al.*, 2003). Alle Identifizierungen der AOC-Proteine wurden mit einem Antikörper durchgeführt, der präferenziell die AOC2 und mit geringerer Affinität auch die anderen drei AOCs erkennt (Hause *et al.*, 2003). In weiteren Arbeiten zur Expression der AOCs in verschiedenen Organen in der Arbeitsgruppe konnte zusätzlich eine überlappende Promoteraktivität beobachtet werden (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung).

Die in allen Organen vorhandenen AOCs (Hause *et al.*, 2003), das überlappende Expressionsmuster der AOCs (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung) und die beobachteten AOC-Heteromere (vorliegende Arbeit) lassen die Möglichkeit zu, dass durch eine Bildung von Heteromeren eine Enzymaktivitätsregulierung entstehen kann, die in den jeweiligen Geweben oder Zellen zu einer spezifischen Jasmonatbildung beiträgt.

Zunächst sollte die Änderung der enzymatischen Aktivität *in planta* untersucht werden. Als Modell-System wurde hierfür *Nicotiana benthamiana* ausgewählt, da in diesem ähnliche Interaktionsergebnisse wie in den *A.-thaliana*-Protoplasten beobachtet werden konnten (Kap 3.4.2, S. 57). Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität *in planta* wurden jeweils eine gut sichtbare Interaktion (AOC3+AOC4, Abb. 60, S. 60) und eine schwach sichtbare Interaktion (AOC1+AOC2, Abb. 52, S. 58) ausgewählt. Aus der Arbeit von Walter *et al.* (2004) ist bekannt, dass sich aus der sichtbaren Fluoreszenz nicht nur eine aktive Interaktion ablesen lässt, sondern auch deren Intensität. Also sollte die Interaktion zwischen AOC3 und AOC4 stärker ausgeprägt sein, als die Interaktion zwischen AOC1 und AOC2. Die Cotransformation von AOC3 und AOC4 sollte danach zu einer stärkeren JA-Bildung nach Verwundung des Gewebes beitragen als bei einer Cotransformation mit AOC1 und AOC2. Als Reporter der JA-Bildung sollte die endogene, JA-responsive *NbAOC* dienen. Eine stärkere JA-Bildung würde die *NbAOC* stärker induzieren als eine schwächere JA-Bildung (Vgl. Abb. 65, S. 62). Diese postulierten Annahmen konnten experimentell aber nicht, oder nur sehr schwach, beobachtet werden. Zwar konnte eine deutliche Steigerung der Expression der *NbAOC* nach Verwundung beobachtet werden (Abb. 66, S. 63), dies ist aber vermutlich auf die Verwendung des 35S-Promoters zur Expression der *AtAOC*-Konstrukte zurückzuführen. Dieser Promoter ist konstitutiv aktiv (Jefferson *et al.*, 1987) und führt daher

zu einem hohen Proteinlevel der entsprechenden *AtAOC*-Fusionsproteine in den Chloroplasten. Diese sind in *N. benthamiana* aktiv und führen zu einer Verstärkung des Verwundungssignals, welches von den Leitbündeln ausgeht (Stenzel *et al.*, 2008). Beide Heteromere scheinen einen ähnlichen Einfluss auf die Expression der *NbAOC* zu haben. Allerdings geht die Annahme von einer „Feinjustierung“ der JA-Bildung durch unterschiedliche Kombinationen aus. Das bedeutet, dass eine relativ geringe Änderung der JA-Bildung, welche im Gewebe zu einer veränderten JA-Signatur führen würde, durch die starke Expression der *AtAOC*-Fusionsproteine überdeckt werden könnte. Die wahrscheinlich geringe Änderung der JA-Bildung im Zuge der Feinregulierung lässt auch keine direkte Messung des JA-Gehaltes in den Blättern zu, da für diese die Messung zu ungenau wäre. Eine weitere, nicht kontrollierbare, Schwierigkeit des Experimentes liegt in der Heteromerbildung selbst. Die Ausbildung der YFP-Fluoreszenz zeigt eindeutig die Bildung von AOC-Heteromeren, allerdings können auch AOC-Homomere gebildet werden. Diese sind nicht in der Lage ein YFP-Signal zu produzieren, können aber die Messung der Feinjustierung stören.

Da dieser Aspekt nicht kontrolliert werden kann, sollte die Aktivitätsbestimmung auch im *in-vitro*-System untersucht werden. In diesem werden die verwendeten AOC-Heteromere unter kontrollierten Bedingungen heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Die für die Expression genutzten Vektoren trugen jeweils zwei klonierte AOC-Isoformen (Kap. 3.3, Abb. 21, S. 45). Ein ähnliches System wurde auch zur Coexpression von verschiedenen Isoformen der ACC-Synthase verwendet (Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Der Vorteil dieses Systems liegt im annähernd gleichen Expressionslevel beider Komponenten, da sie zusammen in einem Plasmid vorliegen (Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Beide Komponenten konnten von den verwendeten Plasmiden exprimiert werden. Im Anschluss wurden über ein Zwei-Stufen-System AOC-Heteromere von Homomeren getrennt (Kap. 3.3.1, Abb. 22 und Abb. 23, S. 46). Die gewonnenen Heteromere wurden danach in ihrer Aktivität mit den Homomeren verglichen. Hier zeigte sich, dass verschiedene Kombinationen an AOC-Isoformen unterschiedliche Aktivitäten im Vergleich zu den Homomeren aufwiesen (Abb. 24, S. 47 und Abb. 25, S. 47). Bestimmte Kombinationen (z. B. AOC2+AOC4) zeigten eine höhere Aktivität als deren Homomere oder andere Heteromere. Wertet man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den überlappenden Promoteraktivitäten (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung), könnten verschiedene Kombinationen an exprimierten AOCs tatsächlich in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten beitragen. Ein ähnlicher Mechanismus, bei dem unterschiedliche Kombinationen an Monomeren die Aktivität des Heteromers variieren, wurde z. B. für die ACC-Synthase (ACS) postuliert. In Arabidopsis setzt sich die Familie aus acht enzymatisch aktiven und einer inaktiven Isoform zusammen (Yamagami *et al.*, 2003). Diese Isoformen zeigen zum einen

ein überlappendes Expressionsmuster und sind zum anderen in der Lage, in verschiedenen Kombinationen zu interagieren (Tsuchisaka & Theologis, 2004a; Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Experimente mit ACS-Mutanten zeigten ein Geflecht an möglichen Interaktionen der ACS-Familie, welches die Autoren als System zur Feinjustierung der Ethylenbiosynthese während der Pflanzenentwicklung deuteten (Tsuchisaka *et al.*, 2009). Ähnlich könnte es sich mit den heteromeren Interaktionen der AOC verhalten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sich die Mitglieder der AOC-Familie *in planta* in Heteromeren organisieren können (Kap. 3.4, S. 49). Außerdem konnte eine Änderung der Aktivität der *AtAOCs* in Folge der Trimerisierung gemessen werden (Kap. 3.3.2, S. 46). Dies bedarf aber im Falle der Aktivitätsbestimmungen *in vivo* noch weiterer Untersuchungen. Dennoch stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus diese Änderung der Aktivität erreicht wird. Jedes Monomer des AOC-Trimers besitzt ein eigenes aktives Zentrum, welches auch im monomeren Zustand der AOC aktiv zu sein scheint (Hofmann *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2008). Die Modifizierung der Aktivität der Heterotrimere der AOC wird also wahrscheinlich nicht über die Ausbildung gemeinsamer aktiver Zentren beeinflusst. Für die dimere ACC-Synthase, die RuBisCO und die 5-Aminolävulinat-Synthetase wurde eine Ausbildung des aktiven Zentrums an der Interaktionsfläche des Dimers beschrieben (Larimer *et al.*, 1987; Tan & Ferreira, 1996; Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Die Ausbildung der trimeren Struktur bei der *AtAOC* trägt möglicherweise zur Stabilität der gebildeten Heterotrimere bei. Diese verschiedenen Heterotrimere könnten zu unterschiedlichen Mengen an Jasmonat nach Verwundung oder während der Entwicklung in der Zelle bzw. dem Gewebe führen.

Betrachtet man die schon vor dieser Arbeit bekannten Ergebnisse zur *AtAOC*, die überlappenden Promoteraktivitäten (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung), das stabile Gesamt-AOC-Level in der Zelle (Stenzel *et al.*, 2003b) und die Trimerisierung *in planta* (Hofmann *et al.*, 2006) im Kontext der vorliegenden Arbeit, ergibt sich die Möglichkeit der Aktivitätsregulierung *in planta* als weiterer Mechanismus der Regulierung der JA-Biosynthese. So könnten die verschiedenen Promoteraktivitäten in unterschiedlichen Geweben die jeweilige Ausstattung an AOC-Isoformen bestimmen, während das stabile Gesamt-AOC-Level die gebildete Proteinmenge reguliert. Die verschiedenen AOCs könnten im Chloroplasten heteromerisieren und verschiedene Heterotrimere würden dann zu unterschiedlichen Mengen an gebildetem Jasmonat führen. Als Beispiel für eine solche Anpassung der JA-Biosynthese kann die erhöhte Aktivität der Kombination aus AOC4 und AOC2 dienen. Die Gene beider Isoformen werden z. B. im Leitbündel exprimiert und gebildete Heteromere würden hier zu einer starken Jasmonatbiosynthese führen (Stenzel *et al.*, in Vorbereitung; Hause *et al.*, 2003). Dies könnte für die Aufnahme und Weiterleitung eines systemischen Signals in das Blatt von Bedeutung sein. Ein systemisches Signal leitet

ein Verwundungssignal von der Verwundungsstelle in weiter entfernte Pflanzenteile. Die Natur des eigentlichen Signals ist bisher unbekannt, aber auf Grund der hohen gemessenen Geschwindigkeiten des Signals von 2-3 cm/s kommt ein JA-Signal nicht in Frage (Glauser *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2009). Signale können z. B. hydraulische Signale oder ein transmembraner Ionenfluss sein (Glauser *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2009). Allerdings steht fest, dass es sich bei dem Signal um ein über die Leitbündel weitergeleitetes Signal handeln muss (Glauser *et al.*, 2009). Das ankommende systemische Signal wird im distal zur Verwundung liegenden Blatt im Leitbündel perzipiert und zunächst in ein JA-Ile-Signal umgewandelt (Koo *et al.*, 2009). Das gebildete JA-Ile kann dann über den SCF^{COI}-JAZ-Signalweg die Expression JA-responsiver Gene aktivieren, wie z. B. die AOC2 und AOC4. Beide Biosyntheseenzyme könnten anschließend als Heteromer mit hoher Aktivität die JA-Biosyntheseleistung steigern. Somit würde ausreichend JA bereitgestellt, um im Mesophyll des systemischen Blattes die Expression JA-responsiver Gene zu aktivieren. Im Mesophyll werden die AOC-Gene 1 und 3 exprimiert (Hause *et al.*, 2003; Delker *et al.*, 2006) und können mit einer relativ geringen Aktivität des Heteromers die Biosyntheseleistung und damit den JA-Gehalt an eine erhöhte Abwehrbereitschaft anpassen. Bei experimentellen Bestimmungen des JA-Gehaltes konnten im distalen, unverwundeten Blatt ein etwa 10-fach niedrigerer JA-Gehalt gemessen werden als im verwundeten Blatt selbst (Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). Die Autoren deuteten den geringen JA-Gehalt im systemischen Blatt als eine erhöhte Abwehrbereitschaft der Pflanze gegenüber Herbivoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden eine Trimerisierung für die homomeren AOC1, AOC2 und AOC3 gezeigt werden. Für die AOC4 deuten die Ergebnisse dagegen auf eine hexamere Struktur hin. Mit Hilfe der BiFC war es möglich die Bildung von AOC-Heteromeren zu zeigen, wobei alle AOCs untereinander in der Lage sind zu heteromerisieren. Welchen Einfluss dabei die Hexamer-bildende Eigenschaft der AOC4 hat, muss noch näher untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die Heteromerisierung der AOCs mit einer Änderung der enzymatischen Aktivität der AOCs korreliert. *In-planta*-Versuche mit *N. benthamiana* konnten hier keine eindeutige Änderung der Aktivität zeigen. Um kontrollierbare Bedingungen zu schaffen, wurden die Experimente *in vitro* wiederholt. Hier konnte eine Änderung der Aktivität im Zuge der Heteromerisierung festgestellt werden. Welchen Einfluss diese Aktivitätsänderung in Verbindung mit den bereits vorher bekannten Eigenschaften der *AtAOCs* hat, muss noch im Detail geklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abdella PM, Smith PK & Royer GP (1979). A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins. — *Biochem Biophys Res Commun* 87, 3, 734-742.
- Bachmann A, Hause B, Maucher H, Garbe E, Vörös K, Weichert H, Wasternack C & Feussner I (2002). Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. — *Biol Chem* 383, 10, 1645-1657.
- Baldwin V, Bhatia M & Luckey M (2011). Folding studies of purified LamB protein, the maltoporin from the *Escherichia coli* outer membrane: Trimer dissociation can be separated from unfolding. — *Biochim Biophys Acta* 1808, 9, 2206-2213.
- Bell E, Creelman RA & Mullet JE (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. — *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 19, 8675-8679.
- Birkett MA, Campbell CAM, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ, Martin JL, Matthes M, Napier JA, Pettersson J, Pickett JA *et al.* (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. — *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 16, 9329-9334.
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S & Ohad N (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. — *Plant J* 40, 3, 419-427.
- 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. — *Proc Natl Acad Sci USA* 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. — *J Mol Biol* 392, 5, 1266-1277.
- Castillo MC, Martínez C, Buchala A, Métraux J-P & León J (2004). Gene-Specific Involvement of β -Oxidation in Wound-Activated Responses in *Arabidopsis*. — *Plant Physiol* 135, 1, 85-94.
- Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS & Howe GA (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. — *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 52, 19237-19242.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR *et al.* (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. — *Nature* 448, 7154, 666-671.
- Chini A, Fonseca S, Chico JM, Fernández-Calvo P & Solano R (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. — *Plant J* 59, 1, 77-87.
- Chung HS & Howe GA (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. — *Plant Cell* 21, 1, 131-145.
- Clough SJ & Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. — *Plant J* 16, 6, 735-743.
- Creelman RA (1998). Jasmonate perception: characterization of COI1 mutants provides the first clues. — *Trends Plant Sci* 3, 10, 367-368.

- Dathe W, Rönsch 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, 6, 530-535.
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I & Wasternack C (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - enzymes, products, regulation. — *Plant Biol* 8, 3, 297-306.
- Delker C, Zolman BK, 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.
- Demole E, Lederer E & Mercier D (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. — *Helv Chim Acta* 45, 2, 675-685.
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M & Turner JG (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. — *Plant J* 32, 4, 457-466.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM *et al.* (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. — *Plant Cell* 19, 7, 2225-2245.
- Ellinger D, Stingl N, Kubigsteltig II, Bals T, Juenger M, Pollmann S, Berger S, Schuenemann D & Mueller MJ (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 Physiol* 153, 1, 114-127.
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C & Turner JG (2002). The *Arabidopsis* mutant cev1 links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. — *Plant Cell* 14, 7, 1557-1566.
- Farmer EE & Ryan CA (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. — *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 19, 7713-7716.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico J-M, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM *et al.* (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. — *Plant Cell Online* 23, 2, 701-715.
- Feussner I & Wasternack C (2002). The lipoxygenase pathway. — *Annu Rev Plant Biol* 53, 275-297.
- Flower DR (1996). The lipocalin protein family: structure and function. — *Biochem J* 318, 1-14.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C & Solano R (2009). (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. — *Nat Chem Biol* 5, 5, 344-350.
- Froehlich JE, Itoh A & Howe GA (2001). Tomato Allene Oxide Synthase and Fatty Acid Hydroperoxide Lyase, Two Cytochrome P450s Involved in Oxylinin Metabolism, Are Targeted to Different Membranes of Chloroplast Envelope. — *Plant Physiol* 125, 1, 306-317.
- Geisler N (1993). Chemical crosslinking with disuccinimidyl tartrate defines the relative positions of the two antiparallel coiled coils of the desmin protofilament unit. — *FEBS Lett* 323, 1-2, 63-67.
- Gidda SK, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C & Varin L (2003). Biochemical and Molecular Characterization of a Hydroxyjasmonate Sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. — *J Biol Chem* 278, 20, 17895-17900.
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE & Wolfender J-L (2008). Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in *Arabidopsis* in Response to Wounding. — *Biol Chem* 283, 24, 16400-16407.

- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SAR, Rudaz S, Wolfender J-L & Farmer EE (2009). Velocity Estimates for Signal Propagation Leading to Systemic Jasmonic Acid Accumulation in Wounded *Arabidopsis*. — *Biol Chem* 284, 50, 34506-34513.
- Grzyb J, Latowski D & Strzalka K (2006). Lipocalins - a family portrait. — *J Plant Physiol* 163, 9, 895-915.
- Hamberg M (1988). Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase. — *Biochem Biophys Res Commun* 156, 1, 543-550.
- Hamberg M & Fahlstadius P (1990). Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. — *Arch Biochem Biophys* 276, 2, 518-526.
- Hause B, Stenzel I, Miersch O & Wasternack C (2003). Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. — *Phytochemistry* 64, 5, 971-980.
- Hofmann E, Zerbe P & Schaller F (2006). The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction. — *Plant Cell* 18, 11, 3201-3217.
- Hofmann E & Pollmann S (2008). Molecular mechanism of enzymatic allene oxide cyclization in plants. — *Plant Physiol Biochem* 46, 3, 302-308.
- Hu CD, Chinenov Y & Kerppola TK (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. — *Mol Cell* 9, 4, 789-798.
- Hughes RK, Belfield EJ, Ashton R, Fairhurst SA, Göbel C, Stumpe M, Feussner I & Casey R (2006). Allene oxide synthase from *Arabidopsis thaliana* (CYP74A1) exhibits dual specificity that is regulated by monomer-micelle association. — *FEBS Lett* 580, 17, 4188-4194.
- Hyun Y, Choi S, Hwang H-J, Yu J, Nam S-J, Ko J, Park J-Y, Seo YS, Kim EY, Ryu SB *et al.* (2008). Cooperation and Functional Diversification of Two Closely Related Galactolipase Genes for Jasmonate Biosynthesis. — *Dev Cell* 14, 2, 183-192.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I & Okada K (2001). The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 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*. — *Plant Cell Online* 13, 10, 2191-2209.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T & Parcy F (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. — *Trends Plant Sci* 7, 3, 106-111.
- Jefferson RA, Kavanagh TA & Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. — *EMBO J* 6, 13, 3901-3907.
- Jilaveanu LB, Zito CR & Oliver D (2005). Dimeric SecA is essential for protein translocation. — *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 21, 7511-7516.
- Katsir L, Chung HS, Koo AJ & Howe GA (2008a). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. — *Curr Opin Plant Biol* 11, 4, 428-435.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY & Howe GA (2008b). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. — *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19, 7100-7105.
- Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible H-P, Weng H, Miersch O, Wasternack C & Kombrink E (2008). Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. — *J Exp Bot* 59, 2, 403-419.
- Koch T, Bandemer K & Boland W (1997). Biosynthesis of *cis*-Jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? — *Helv Chim Acta* 80, 3, 838-850.
- Koo AJK, Chung HS, Kobayashi Y & Howe GA (2006). Identification of a Peroxisomal Acyl-activating Enzyme Involved in the Biosynthesis of Jasmonic Acid in *Arabidopsis*. — *J Biol Chem* 281, 44, 33511-33520.
- Koo AJK, Gao X, Daniel Jones A & Howe GA (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. — *Plant J* 59, 6, 974-986.

- Koo AJK & Howe GA (2012). Catabolism and Deactivation of the Lipid-derived Hormone Jasmonoyl-isoleucine. — *Front Plant Sci* 3, 1-7.
- Kubigsteltig I, Laudert D & Weiler EW (1999). Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. — In: *Planta*. Springer Berlin / Heidelberg, S. 463-471.
- Kwaaitaal M, Keinath NF, Pajonk S, Biskup C & Panstruga R (2010). Combined bimolecular fluorescence complementation and Förster resonance energy transfer reveals ternary SNARE complex formation in living plant cells. — *Plant Physiol* 152, 3, 1135-1147.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — *Nature* 227, 5259, 680-685.
- Larimer FW, Lee EH, Mural RJ, Soper TS & Hartman FC (1987). Intersubunit location of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase as determined by in vivo hybridization of site-directed mutants. — *J Biol Chem* 262, 32, 15327-15329.
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H & Weiler EW (1996). Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. — *Plant Mol Biol* 31, 2, 323-335.
- Laudert D, Hennig P, Stelmach BA, Müller A, Andert L & Weiler EW (1997). Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. — *Anal Biochem* 246, 2, 211-217.
- Laudert D & Weiler EW (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. — *Plant J* 15, 5, 675-684.
- Laudert D, Schaller F & Weiler EW (2000). Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. — In: *Planta*. Springer Berlin / Heidelberg, S. 163-165.
- Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y *et al.* (2005). Role of β -Oxidation in Jasmonate Biosynthesis and Systemic Wound Signaling in Tomato. — *Plant Cell Online* 17, 3, 971-986.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ & Solano R (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. — *Plant Cell Online* 16, 7, 1938-1950.
- Löster K & Josic D (1997). Analysis of protein aggregates by combination of cross-linking reactions and chromatographic separations. — *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 699, 1-2, 439-461.
- Mandel M & Higa A (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. — *J Mol Biol* 53, 1, 159-162.
- Mattson G, Conklin E, Desai S, Nielander G, Savage MD & Morgensen S (1993). A practical approach to crosslinking. — *Mol Biol Rep* 17, 3, 167-183.
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J & Wasternack C (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. — *Plant J* 21, 2, 199-213.
- 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 Phytol* 177, 1, 114-127.
- Mikheikin AL, Lin H-K, Mehta P, Jen-Jacobson L & Trakselis MA (2009). A trimeric DNA polymerase complex increases the native replication processivity. — *Nucleic Acids Res* 37, 21, 7194-7205.
- Mosblech A, Feussner I & Heilmann I (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. — *Plant Phys Biochem* 47, 6, 511-517.
- Narváez-Vásquez J, Florin-Christensen J & Ryan CA (1999). Positional Specificity of a Phospholipase A Activity Induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors in Tomato Leaves. — *Plant Cell Online* 11, 11, 2249-2260.
- O'Fagain C, Cummins PM & O'Connor BF (2011). Gel-filtration chromatography. — *Methods Mol Biol* 681, 25-33.

- Park J-H, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA & 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. — *Plant J* 31, 1, 1-12.
- Phizicky EM & Fields S (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. — *Microbiol Rev* 59, 1, 94-123.
- Pickel B, Pfannstiel J, Steudle A, Lehmann A, Gerken U, Pleiss J & Schaller A (2012). A Model of Dirigent Proteins Derived from Structural and Functional Similarities with Allene Oxide Cyclase and Lipocalins. — *FEBS J*, no.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Darmstadt.
- Schaller A & Stintzi A (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. — *Phytochemistry* 70, 13-14, 1532-1538.
- Schaller F, Hennig P & Weiler EW (1998). 12-Oxophytodienoate-10,11-Reductase: Occurrence of Two Isoenzymes of Different Specificity against Stereoisomers of 12-Oxophytodienoic Acid. — *Plant Physiol* 118, 4, 1345-1351.
- Schaller F, Zerbe P, Reinbothe S, Reinbothe C, Hofmann E & Pollmann S (2008). The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*: localization and cyclization. — *FEBS J* 275, 10, 2428-2441.
- Schilmiller AL & Howe GA (2005). Systemic signaling in the wound response. — *Curr Opin Plant Biol* 8, 4, 369-377.
- Schilmiller AL, Koo AJK & Howe GA (2007). Functional Diversification of Acyl-Coenzyme A Oxidases in Jasmonic Acid Biosynthesis and Action. — *Plant Physiol* 143, 2, 812-824.
- Schneider K, Kienow L, Schmelzer E, Colby T, Bartsch M, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E & Stuible H-P (2005). A New Type of Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Synthetase from *Arabidopsis thaliana* Has the Catalytic Capacity to Activate Biosynthetic Precursors of Jasmonic Acid. — *J Biol Chem* 280, 14, 13962-13972.
- Seo HS, Song JT, Cheong J-J, Lee Y-H, Lee Y-W, Hwang I, Lee JS & Choi YD (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. — *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8, 4788-4793.
- Shapouri MR, Arella M & Silim A (1996). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus $\sigma 3$ protein. — *J Gen Virol* 77, 1203-1210.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J *et al.* (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. — *Nature* 468, 7322, 400-405.
- Sheen J (2002). A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. — <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>.
- Shyu YJ, Suarez CD & Hu CD (2008). Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. — *Nat Protoc* 3, 11, 1693-1702.
- Siberil Y, Doireau P & Gantet P (2001). Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. — *Eur J Biochem* 268, 22, 5655-5666.
- 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*. — *Plant Cell Online* 23, 3, 1000-1013.
- Song W & Brash A (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. — *Science* 253, 5021, 781-784.
- Song W, Funk C & Brash A (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. — *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 18, 8519-8523.
- Sperling C. (2011). Analyse der Trimerisierung der *AtAOC2*. — Diplom, MLU Halle - Wittenberg.
- Staswick PE & Tiryaki I (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*. — *Plant Cell Online* 16, 8, 2117-2127.

- Stellwagen E (1990). Gel filtration. — *Methods Enzymol* 182, 317-328.
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA & Wasternack C (2003a). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. — *Plant J* 33, 3, 577-589.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I & Wasternack C (2003b). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. — *Plant Mol Biol* 51, 6, 895-911.
- Stenzel I, Hause B, Proels R, Miersch O, Oka M, Roitsch T & Wasternack C (2008). The AOC promoter of tomato is regulated by developmental and environmental stimuli. — *Phytochemistry* 69, 9, 1859-1869.
- Steppuhn A, Gase K, Krock B, Halitschke R & Baldwin IT (2004). Nicotine's Defensive Function in Nature. — *PLoS Biol* 2, 8, 1074-1080.
- Steppuhn A & Baldwin IT (2007). Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. — *Ecol Lett* 10, 6, 499-511.
- Stintzi A & Browse J (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. — *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 19, 10625-10630.
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, 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. — *Plant J* 32, 4, 585-601.
- Stumpe M & Feussner I (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. — *Phytochem Rev* 5, 2, 347-357.
- Swiatek A, van Dongen W, Esmans EL & van Onckelen H (2004). Metabolic Fate of Jasmonates in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. — *Plant Physiol* 135, 1, 161-172.
- Tan D & Ferreira GC (1996). Active site of 5-aminolevulinate synthase resides at the subunit interface. Evidence from in vivo heterodimer formation. — *Biochemistry* 35, 27, 8934-8941.
- Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR & Graham IA (2005). Jasmonic Acid Levels Are Reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. Implications for Transport of Jasmonate Precursors into Peroxisomes. — *Plant Physiol* 137, 3, 835-840.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA & Browse J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO11) complex during jasmonate signalling. — *Nature* 448, 7154, 661-665.
- Tsuchisaka A & Theologis A (2004a). Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. — *Plant Physiol* 136, 2, 2982-3000.
- Tsuchisaka A & Theologis A (2004b). Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. — *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8, 2275-2280.
- Tsuchisaka A, Yu G, Jin H, Alonso JM, Ecker JR, Zhang X, Gao S & Theologis A (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. — *Genetics* 183, 3, 979-1003.
- Ueda J & Kato J (1980). Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). — *Plant Physiol* 66, 2, 246-249.
- van der Fits L & Memelink J (2001). The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. — *Plant J* 25, 1, 43-53.
- Vick BA & Zimmerman DC (1987). Pathways of Fatty Acid Hydroperoxide Metabolism in Spinach Leaf Chloroplasts. — *Plant Physiol* 85, 4, 1073-1078.
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C *et al.* (2004). Visualization of protein interactions in living

- plant cells using bimolecular fluorescence complementation. — *Plant J* 40, 3, 428-438.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I & Miersch O (2006). The wound response in tomato - role of jasmonic acid. — *J Plant Physiol* 163, 3, 297-306.
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. — *Ann Bot* 100, 4, 681-697.
- Xie D-X, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M & Turner JG (1998). COI1: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. — *Science* 280, 5366, 1091-1094.
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D & Xie D (2002). The SCF^{COI} Ubiquitin-Ligase Complexes Are Required for Jasmonate Response in Arabidopsis. — *Plant Cell Online* 14, 8, 1919-1935.
- Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA & Theologis A (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. — *J Biol Chem* 278, 49, 49102-49112.
- Zarembinski TI & Theologis A (1994). Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. — *Plant Mol Biol* 26, 5, 1579-1597.
- Zerbe P, Weiler EW & Schaller F (2007). Preparative enzymatic solid phase synthesis of cis(+)-12-oxo-phytodienoic acid - physical interaction of AOS and AOC is not necessary. — *Phytochemistry* 68, 2, 229-236.
- Ziegler J, Hamberg M, Miersch O & Parthier B (1997). Purification and Characterization of Allene Oxide Cyclase from Dry Corn Seeds. — *Plant Physiol* 114, 2, 565-573.
- Ziegler J, Wasternack C & Hamberg M (1999). On the specificity of allene oxide cyclase. — *Lipids* 34, 10, 1005-1015.
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M & Wasternack C (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. — *J Biol Chem* 275, 25, 19132-19138.
- Zimmerman DC (1966). A new product of linoleic acid oxidation by a flaxseed enzyme. — *Biochem Biophys Res Commun* 23, 4, 398-402.

Anhang

Tab. 12: Übersicht ausgewählter Informationen der AtAOCs.

	<i>locus tag</i>	<i>accession #</i>	Chromosom	bp	AS	AS Plastidensignal
AOC1	AT3G25760	NM_113475	3	762	254	78
AOC2	AT3G25770	NM_113476	3	759	253	77
AOC3	AT3G25780	NM_113477	3	774	258	56
AOC4	At1G13280	NM_101199	1	762	254	52

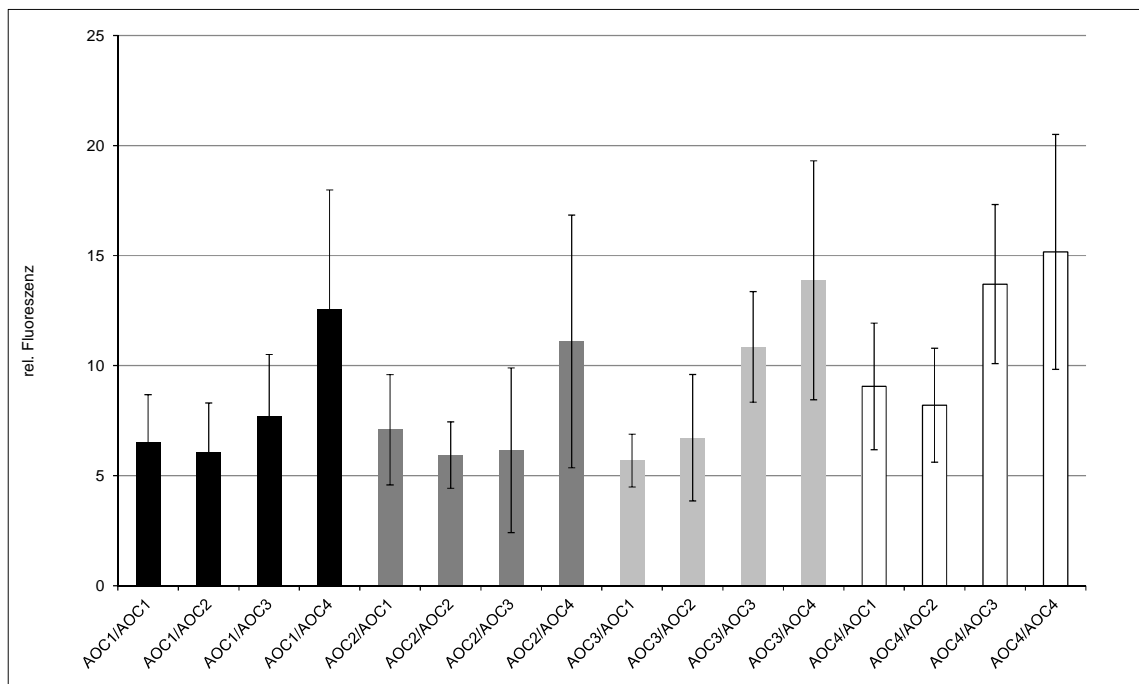


Abb. 69: Übersicht der relativen Fluoreszenzintensitäten der AOC-Interaktionen in den Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten.

BLAST AtAOC1 vs AtAOC2

>lcl|63013 unnamed protein product
Length=253

Score = 458 bits (1178), Expect = 1e-168, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 226/254 (89%), Positives = 237/254 (93%), Gaps = 1/254 (0%)

```
Query 1 MASSTISLQSI SM T T L N N L S Y S K Q F H R S S L L G F S K S F Q N F G I S S N G P G S S S P T S F T P K K K 60
      MASS +S L Q S I S M T T L N N L S ++Q F H R S S L L G S K S F Q N G I S S N G S P +S F T K K
Sbjct 1 MASSAVS L Q S I S M T T L N N L S C N Q Q F H R S S L L G S S K S F Q N L G I S S N G S D F S Y P S S F T A K K N 60

Query 61 L T P T R A L S Q N L G N T E N P R P S K V Q E L S V Y E I N D L D R H S P K I L K N A F S F R F G L G D L V P F T N K 120
      L T +R A L S Q N G N E N P R P S K V Q E L S V Y E I N +L D R H S P K I L K N A F S F L G D L V P F T N K
Sbjct 61 L T A S R A L S Q N - G N I E N P R P S K V Q E L S V Y E I N E L D R H S P K I L K N A F S L M F G L G D L V P F T N K 119

Query 121 L Y T G D L K K R V G I T A G L C V V I E H V P E K N G D R F E A T Y S F Y F G D Y G H L S V Q G P Y L T Y E D S F L A 180
      L Y T G D L K K R V G I T A G L C V V I E H V P E K G +R F E A T Y S F Y F G D Y G H L S V Q G P Y L T Y E D S F L A
Sbjct 120 L Y T G D L K K R V G I T A G L C V V I E H V P E K K G R F E A T Y S F Y F G D Y G H L S V Q G P Y L T Y E D S F L A 179

Query 181 I T G G A G I F E G A Y G Q V K L Q Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L I G T P V P P S K D V E P A P E A 240
      I T G G A G I F E G A Y G Q V K L Q Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L G T P V P P S K D + E P A P E A
Sbjct 180 I T G G A G I F E G A Y G Q V K L Q Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L T G T P V P P S K D I E P A P E A 239

Query 241 K A L K P S G V V S N F T N 254
      K A L + P S G V + S N + T N
Sbjct 240 K A L E P S G V I S N Y T N 253
```

Abb. 70: BLAST der AtAOC1 (Query) gegen die AtAOC2 (Sbjct).

BLAST AtAOC1 vs AtAOC3

>lcl|20359 unnamed protein product
Length=258

Score = 380 bits (976), Expect = 7e-138, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 196/258 (76%), Positives = 220/258 (85%), Gaps = 4/258 (2%)

```
Query 1 MASST--ISLQSI SM T T L N N L S Y S K Q F H R S S L L G F S K S F Q N F G I S S N G P G S S S P T S F T P K 58
      MASS+ +S L +S I S M T T L N N L S + Q H R S S L L G F S +S F Q N G I S S N G P S S + T
Sbjct 1 MASSAAMSLESISMTTLN N L S R N H Q H R S S L L G F S R S F Q N L G I S S N G P D F S S R S R S T T S 60

Query 59 K K L T P T R A L S Q N L G N - T E N P R P S K V Q E L S V Y E I N D L D R H S P K I L K - N A F S F R F G L G D L V P 116
      K L T R A N G T E N R P S K +Q E L +V Y E +N + D R +S P +L K L G D L V P
Sbjct 61 K N L N V T R A F F W N W G K K T E N S R P S K I Q E L N V Y E L N E G D R N S P A V L K L G K K P T E L C L G D L V P 120

Query 117 F T N K L Y T G D L K K R V G I T A G L C V V I E H V P E K N G D R F E A T Y S F Y F G D Y G H L S V Q G P Y L T Y E D 176
      F T N K L Y T G D L K K R V G I T A G L C V +I +H V P E K +G D R F E A +Y S F Y F G D Y G H L S V Q G Y L T Y E D
Sbjct 121 F T N K L Y T G D L K K R V G I T A G L C V L I Q H V P E K S G D R F E A S Y S F Y F G D Y G H L S V Q G Q Y L T Y E D 180

Query 177 S F L A I T G G A G I F E G A Y G Q V K L Q Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L I G T P V P P S K D V E P 236
      +F L A +T G G +G I F E G A Y G Q V K L +Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L G T V P S K D V +P
Sbjct 181 T F L A V T G G S G I F E G A Y G Q V K L R Q L V Y P T K L F Y T F Y L K G L A N D L P L E L T G T A V T P S K D V K P 240

Query 237 A P E A K A L K P S G V V S N F T N 254
      A P E A K A + + P S G V + S N F T N
Sbjct 241 A P E A K A M E P S G V I S N F T N 258
```

Abb. 71: BLAST der AtAOC1 (Query) gegen die AtAOC3 (Sbjct).

BLAST AtAOC1 vs AtAOC4

>lcl|56423 unnamed protein product
Length=254

Score = 312 bits (800), Expect = 3e-111, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 156/241 (65%), Positives = 188/241 (78%), Gaps = 2/241 (1%)

```
Query 15 TLNNLSYSKQFHRSSLLGFSSKSFQNFQISSNGPGSSSPTSFTPKKKLTPTRALSQNLGNT 74
          TL NLS + Q H+S+ LGFS+SF N ISSN PG S+ T R + + N
Sbjct 15 TLRNLSRHHQSHQSTFLGFSSRSFHNQRISNSPGLSTRARSTTSSTGGFFRTICSSSSN- 73

Query 75 ENPRPSKVQELSVEIINDLDRHSPKILK-NAFSFRFGLGDLVPFTNKLYTGDLKRVGIT 133
          + RP+K+QEL+VYE N+ DR+SP +LK + LGDLVPFTNKLYTGDL KR+GIT
Sbjct 74 DYSRPTKIQELNVYEFNEGDRNSPAVLKLGKPKDQLCLGDLVPFTNKLYTGDLTKRIGIT 133

Query 134 AGLCVVIEHVPEKNGDRFEATYSFYFGDYGHLSVQGPYLTYESFLAITGGAGIFEGAYG 193
          AGLCV+I+HVPEK GDRFEA+YSFYFGDYGH+SVQGPYLTYES+FLAITGG+G+FEGAYG
Sbjct 134 AGLCVLIQHVPEKKGDRFEASYSFYFGDYGHISVQGPYLTYESDFTLAITGGSGVFEGAYG 193

Query 194 QVKLQQLVYPTKLFYTFYLGKLANDLPLELIGTPVPPSKDVEPAPEAKALKPSGVVSNFT 253
          QVKL+QLVYPTKLFYTFYLGK+A DLP+EL G V PSK+V+PA EA+A +P ++NFT
Sbjct 194 QVKLRQLVYPTKLFYTFYLGKVAADLPVELTGKHVEPSKEVKPAEAQAQATQPGATIANFT 253

Query 254 N 254
          N
Sbjct 254 N 254
```

Abb. 72: BLAST der AtAOC1 (Query) gegen die AtAOC4 (Sbjct).

BLAST AtAOC2 vs AtAOC3

>lcl|20547 unnamed protein product
Length=258

Score = 384 bits (986), Expect = 2e-139, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 195/255 (76%), Positives = 218/255 (85%), Gaps = 3/255 (1%)

```
Query 2 ASSAVSLQSI SM T T L N N L S C N Q Q F H R S S L L G S S K S F Q N L G I S S N G S D F S Y P S S F T A K K N L 61
          +S+A+SL+SISMTTLNLS N Q HRSSLLG S+SFQNLGISSNG DFS S T KNL
Sbjct 4 SSAAMSLESISMTTLNLSRHHQSHRSSLLGFSSRSFQNLGISSNGPDFSSRSRSTTSKNL 63

Query 62 TASRALSQNG--NIENPRPSKVQELSVEIINDLDRHSPKILK-NAFSLMFLGDLVPFTN 118
          +RA N EN RPSK+QEL+VYE+NE DR+SP +LK LGDLVPFTN
Sbjct 64 NVTRAFFWNWGKKTENSRSKIQELNVYELNEGDRNSPAVLKLGKPKTELCGLDLPFTN 123

Query 119 KLYTGDLKRVGITAGLCVVIEHVPEKKGDRFEATYSFYFGDYGHLSVQGPYLTYESFL 178
          KLYTGDLKRVGITAGLCV+I+HVPEK G+RFEA+YSFYFGDYGHLSVQG YLTYES+FL
Sbjct 124 KLYTGDLKRVGITAGLCVLIQHVPEKSGDRFEASYSFYFGDYGHLSVQGYLTYESDFTL 183

Query 179 AITGGAGIFEGAYGQVKLQQLVYPTKLFYTFYLGKLANDLPLELTGTPVPPSKDIEPAPE 238
          A+TGG+GIFEGAYGQVKL+QLVYPTKLFYTFYLGKLANDLPLELTGT V PSK++PAPE
Sbjct 184 AVTGGSGIFEGAYGQVKLRQLVYPTKLFYTFYLGKLANDLPLELTGTAVTPSKDVKPAPE 243

Query 239 AKALEPSGVISNYTN 253
          AKA+EPSGVISN+TN
Sbjct 244 AKAMEPSGVISNFTN 258
```

Abb. 73: BLAST der AtAOC2 (Query) gegen die AtAOC3 (Sbjct).

BLAST AtAOC2 vs AtAOC4

>lcl|54751 unnamed protein product
Length=254

Score = 312 bits (800), Expect = 3e-111, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 154/240 (64%), Positives = 186/240 (78%), Gaps = 1/240 (0%)

```

Query 15  TLNNLSNCNQQFHRSSLLGSSKSFQNLGISSNGSDFSYSPSSFTAKKNLTASRALSQNGNIE 74
          TL NLS N Q H+S+ LG S+SF N ISSN S + T R + + + +
Sbjct 15  TLRNLSRNHQSHQSTFLGFSRSFHNQRISNSPGLSTRARSTTSSTGGFFRTICSSSSND 74

Query 75  NPRPSKVQELSVYEINELDRHS PKILK NAFSLMFGGLGDLVPFTNKLYTGD LKKR V GITA 133
          RP+K+QEL+VYE NE DR+SP +LK LGDLVPFTNKLYTGD L KR+GITA
Sbjct 75  YSRPTKIQELNVYEFNEGDRNS PAVLKI GKKEDQLCLGDLVPFTNKLYTGD LTKRIGITA 134

Query 134 GLCVVIEHVPEKKGERFEATYSFYFGDYGHLVSVQGPYLYTEDSFLAITGGAGIFEGAYGQ 193
          GLCV+I+HVPEKKG+RFEA+YSFYFGDYGH+SVQGPYLYTED+FLAITGG+G+FEAYGQ
Sbjct 135 GLCVLIQHVPEKKGDRFEASYSFYFGDYGHLVSVQGPYLYTEDTFLAITGGSGVFEGAYGQ 194

Query 194 VKLQQLVYPTKLFYTFYLKGLANDLPLELTGTPVPSKDIEPAPAKALEPSGVISNYTN 253
          VKL+QLVYPTKLFYTFYLKG+A DLP+ELTG V PSK+++PA EA+A +P I+N+TN
Sbjct 195 VKLRQLVYPTKLFYTFYLKGV AADLPVELTGKHVEPSKEVKPAAEAQATQPGATIANFTN 254
  
```

Abb. 74: BLAST der AtAOC2 (Query) gegen die AtAOC4 (Sbjct). Rote Kreise zeigen Lysinreste in guter Position für intermolekulare *crosslinking*-Ereignisse. Blaue Kreise zeigen Lysinreste in Positionen für keine oder intramolekulare *crosslinking*-Ereignisse.

BLAST AtAOC3 vs AtAOC4

>lcl|51601 unnamed protein product
Length=254

Score = 387 bits (995), Expect = 1e-140, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 189/244 (77%), Positives = 206/244 (84%), Gaps = 6/244 (2%)

```

Query 17  TLNNLSRNHQSHRSSLLGFSRSFQNLGISSNGPDFSSRSRSTTSKLNLVTRAFFWNWGKK 76
          TL NLSRNHQSH+S+ LGFSRSF N ISSN P S+R+RSTTS T FF
Sbjct 15  TLRNLSRNHQSHQSTFLGFSRSFHNQRISNSPGLSTRARSTTS----TGGFFRTICSS 70

Query 77  TEN--SRPSKIQELNVYELNEGDRNSPAVLKLGKKPTELCLGDLVPFTNKLYTGD LKKRV 134
          + N SRP+KIQELNVYE NEGDRNSPAVLKLGKKP +LCLGDLVPFTNKLYTGD L KR+
Sbjct 71  SSNDYSRPTKIQELNVYEFNEGDRNSPAVLKLGKKPDQLCLGDLVPFTNKLYTGD LTKRI 130

Query 135 GITAGLCVLIQHVPEKSGDRFEASYSFYFGDYGHLVSVQGYLYTEDTFLAVTGGSGIFEG 194
          GITAGLCVLIQHVPEK GDRFEASYSFYFGDYGH+SVQG YLYTEDTFLA+TGGSG+FEF
Sbjct 131 GITAGLCVLIQHVPEKKGDRFEASYSFYFGDYGHLVSVQGPYLYTEDTFLAITGGSGVFEG 190

Query 195 AYGQVKLRQLVYPTKLFYTFYLKGLANDLPLELTGTA VTPSKDVKPAPEAKAMEPSGVIS 254
          AYGQVKLRQLVYPTKLFYTFYLKG+A DLP+ELTG V PSK+VKPA EA+A +P I+
Sbjct 191 AYGQVKLRQLVYPTKLFYTFYLKGV AADLPVELTGKHVEPSKEVKPAAEAQATQPGATIA 250

Query 255  NFTN 258
          NFTN
Sbjct 251  NFTN 254
  
```

Abb. 75: BLAST der AtAOC3 (Query) gegen die AtAOC4 (Sbjct).

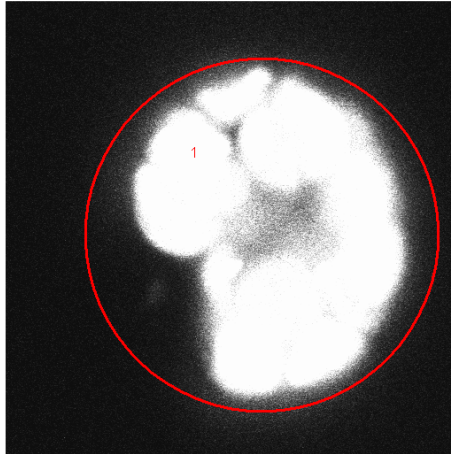
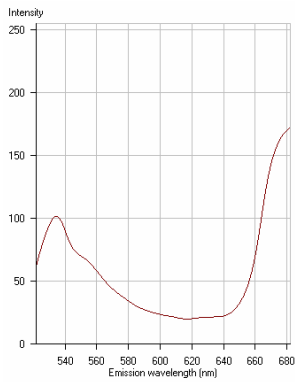
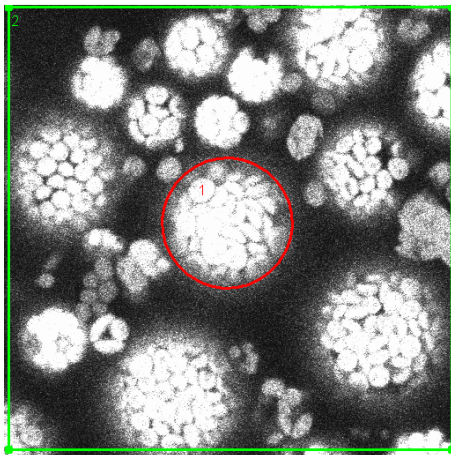
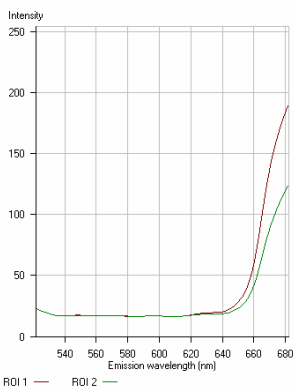
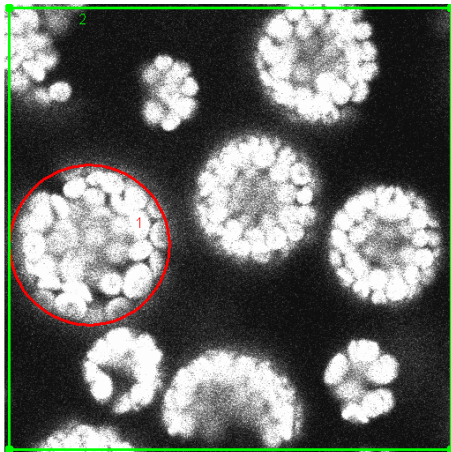
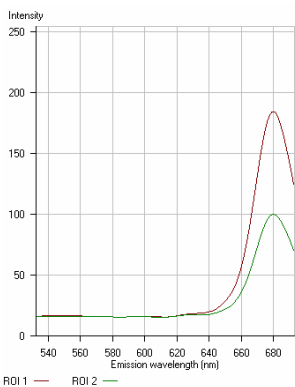


Abb. 76: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplast transformiert mit plastidär lokalisiertem YFP (ptYFP). λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum, mit einem Signal bei 532 nm (YFP-Emission).



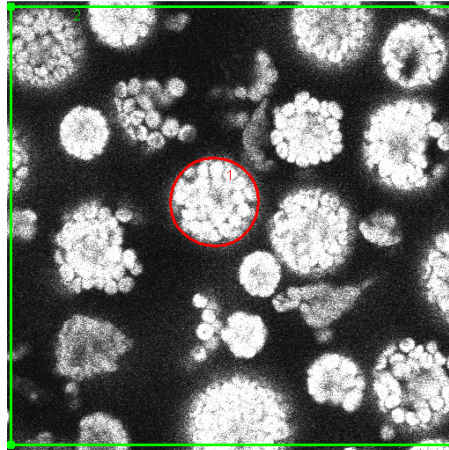
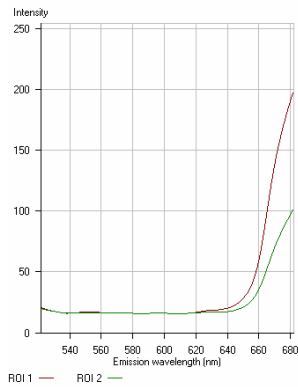
ptN_ptC_140110_06

Abb. 77: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit *split*-YFP-Komponenten. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Kein Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



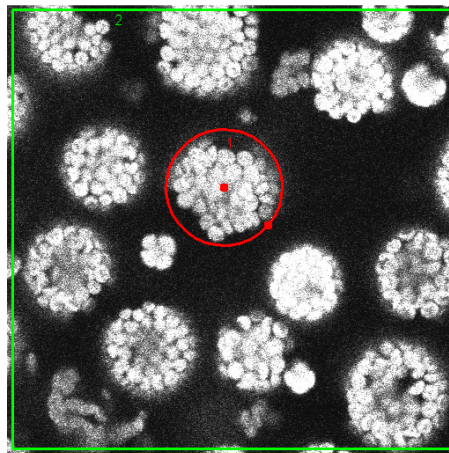
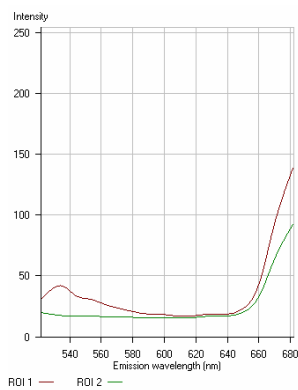
N1_ptC_101209_03

Abb. 78: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC1-YFP^N und pt-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Kein Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



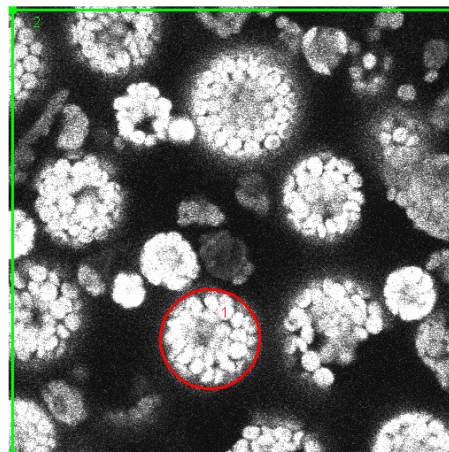
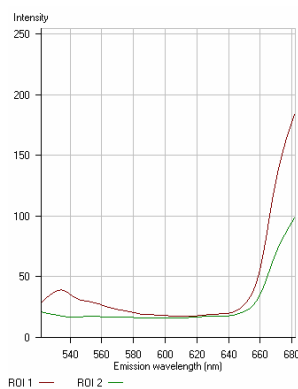
N2_ptC_101209_03

Abb. 79: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC2-YFP^N und pt-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Kein Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



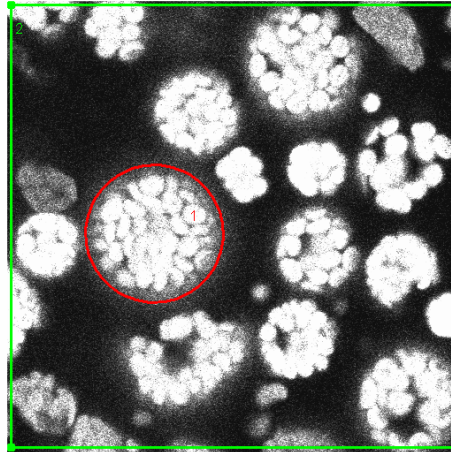
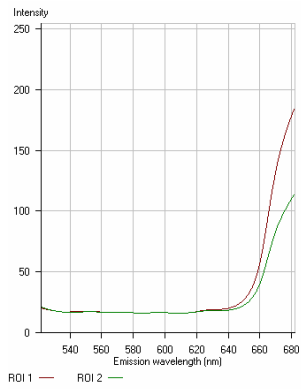
N3_ptC_171209_10

Abb. 80: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC3-YFP^N und pt-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



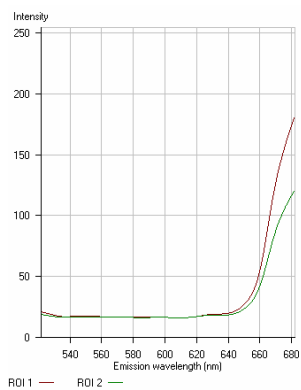
N4_ptC_171209_10

Abb. 81: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit AOC4-YFP^N und pt-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



C1_ptN_140110_08

Abb. 82: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit pt-YFP^N und AOC1-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Kein Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.



C4_ptN_140110_03

Abb. 83: *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten transformiert mit pt-YFP^N und AOC4-YFP^C. λ -Scan, Anregungswellenlänge 514 nm. Der linke Teil zeigt das extrahierte Emissionsspektrum. Kein Signal bei 532 nm (YFP-Emission) detektierbar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. em. Dr. Claus Wasternack und PD Dr. Bettina Hause, für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung während der Entstehung der Arbeit. Außerdem möchte Herrn Prof. em. Dr. Dieter Strack danken, der mir die abschließenden Arbeiten ermöglicht hat.

Danken möchte ich auch Kati und Sara für Rat und Tat und für die Gespräche in den kleinen Pausen zwischendurch. Ebenso möchte ich Hagen für das angenehme Arbeitsklima im Labor danken. Christin möchte ich für Ihre Selbständigkeit danken, was mir die Anleitung Ihrer Diplomarbeit ohne Stress ermöglichte.

Außerdem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe „Jasmonatfunktion & Mykorrhiza“ für die großartige Arbeitsatmosphäre danken. Der gesamten Abteilung „Stoffwechsel- und Zellbiologie“ gilt ebenso Dank für den angenehmen Laboralltag.

Der Graduiertenschule „Pflanzliche Proteinkomplexe – Struktur, Funktion und Evolution“ danke ich für die finanzielle Unterstützung und den Mitgliedern für die gute Zusammenarbeit.

Letztendlich gilt der größte Dank meiner Familie und meinen Freunden. Besonders Corinna, sie hat mich immer unterstützt und ermuntert. Und Konrad der mit seinem Gebrabbel alles andere unwichtig werden lässt.

Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name Markus Otto
geb. 20.10.1979 in Oschatz
Familienstand ledig, 1 Kind

AUSBILDUNG / BERUFLICHER WERDEGANG

seit Oktober 2006 Promotion: „Heteromerbildung von *Arabidopsis thaliana* Allenoxidzyklen“ im Rahmen des Graduiertenprogramms „Pflanzliche Proteinkomplexe – Struktur, Funktion und Evolution“ (Exzellenznetzwerk des Landes Sachsen-Anhalt „Biowissenschaften – Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“)

Januar 2005 – wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
September 2006 Institut für Mikrobiologie (Prof. Dr. D. H. Nies)
Thema: „Weiterführende Arbeiten zur Charakterisierung des Eisentransportproteins FieF aus *E. coli*“

Dezember 2004 Abschluss des Studiums, Diplom-Biologe (Note 1,7)

2004 Diplomarbeit: „Charakterisierung des Eiseneffluxsystems FieF aus *Escherichia coli*“

Februar 2003 – Aufenthalt an der *University of Arizona*, Tucson (USA) in der Arbeitsgruppe von
April 2003 Christopher Rensing (Laborpraktikum-Molekularbiologie, Strahlenschutzkurs)

1999 – 2004 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung Biologie, Vertiefungsfach: Mikrobiologie

1998/1999 Grundwehrdienst

Juni 1998 Abitur (Leistungsfächer Biologie/Mathematik)

1992 – 1998 Oskar-Reime-Gymnasium Delitzsch

1986 – 1992 Polytechnische Oberschule „Karl-Liebknecht“ Delitzsch

Publikationen

Grass, G.; Otto, M.; Fricke, B.; Haney, C. J.; Rensing, C.; Nies, D. H.; Munkelt, D. (2005) FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress, *Archives of Microbiology*, 183 (1), 9-18

Grosse, C.; Scherer, J.; Koch, D.; Otto, M.; Taudte, N.; Grass, G. (2006) A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 62, 120-131

Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., Wasternack, C. (2012) ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana* – Tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization, submitted

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht wurde.

Halle (Saale), den