

**"Zell- und gewebespezifische Detektion
von Jasmonaten"**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biochem. Kati Mielke

geb. am 17. Juli 1981 in Wolmirstedt

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Bettina Hause
2. Prof. Dr. Jörg Degenhardt
3. Prof. Dr. Thomas Schmülling

Datum der Verteidigung: 22.01.2014

Meiner Familie

„Inmitten der Schwierigkeiten liegen die Möglichkeiten“

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Allgemeine Einleitung	1
1.1 Jasmonsäure – Biosynthese, Derivate und physiologische Bedeutung	1
1.2 Mechanismus der JA-Perzeption und Regulation der Expression JA-induzierter Gene.....	4
1.3 Zielstellung der Arbeit	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	10
2.2 Synthetische Oligo- und Polynukleotide	11
2.3 Vektoren	11
2.4 Mikrobiologische Techniken.....	11
2.4.1 Bakterienstämme und Bakterienanzucht.....	11
2.4.2 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	11
2.4.3 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	12
2.4.4 Herstellung elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	12
2.4.5 Transformation elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	12
2.5 Zellkulturtechniken.....	13
2.5.1 <i>A. thaliana</i> -Zellkultur und Kultivierung	13
2.6 Pflanzentechniken	13
2.6.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht	13
2.6.2 Techniken zur Pflanzentransformation	14
2.6.3 Hormonapplikation und Verwundung von Pflanzen	15
2.7 Isolation, Transformation und Behandlung von Protoplasten.....	16
2.7.1 Isolation und Transformation von Zellkulturprotoplasten.....	16
2.7.2 Isolation und transiente Transformation von <i>A. thaliana</i> - Mesophyllprotoplasten	17
2.7.3 Hormonbehandlung von Protoplasten.....	18

2.8 Molekularbiologische Methoden	18
2.8.1 Hybridisierung komplementärer synthetischer Oligonukleotide.....	18
2.8.2 Nukleinsäureisolation aus pflanzlichem Gewebe.....	19
2.8.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase.....	19
2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.8.5 Agarosegelelektrophorese	20
2.8.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	21
2.8.7 Klonierungstechniken	21
2.8.8 Plasmidpräparation	23
2.8.9 Restriktion von DNA-Fragmenten	23
2.9 Analytische und biochemische Methoden.....	23
2.9.1 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität	23
2.9.2 Bestimmung der relativen GUS-Aktivität in Protoplasten.....	24
2.9.3 Indirekter <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	25
2.9.4 Indirekter, kompetitiver <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (kompetitiver ELISA).....	26
2.10 Herstellung eines Anti-JA-Antikörpers in Kaninchen	27
2.10.1 Herstellung eines JA-BSA-Konjugates.....	27
2.10.2 Immunisierung von Kaninchen mit dem JA-BSA-Konjugat.....	27
2.10.3 Aufreinigung des Anti-JA-Antikörpers aus dem Kaninchenserum	27
2.11 Fixierung, Einbettung und Immunmarkierung von <i>S. lycopersicum</i> -Blättern.....	29
2.11.1 Vorbereitung der Objektträger.....	29
2.11.2 Fixierung und Einbettung von Blattmaterial	29
2.11.3 Anfertigen von Semidünnschnitten.....	30
2.11.4 Immunmarkierung.....	30
2.12 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	30
2.13 <i>In silico</i> -Analysen	31
3. Kapitel I – Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Anti-JA-Anti- körpers zur zell- und gewebespezifischen Visualisierung von JA in pflanzlichen Geweben	33
3.1 Einleitung.....	33
3.1.1 Immunhistochemie.....	33
3.1.2 Polyklonale Antikörper – Definition, Herstellung und Charakterisierung.....	36
3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von Phytohormonen	39

3.2 Ergebnisse.....	42
3.2.1 Erzeugung eines polyklonalen Anti-JA-Antikörpers in Kaninchen.....	42
3.2.2 Charakterisierung der gereinigten Anti-JA-Antikörperfraktionen AK I und AK II mittels kompetitivem ELISA	45
3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Jasmonaten in pflanzlichem Probenmaterial	51
3.3 Diskussion	56
3.3.1 Die Immunisierung von Kaninchen mit JA-BSA-Konjugat führt zu Antiseren mit putativ JA-spezifischen AKs	56
3.3.2 Die Bindungseigenschaften der Anti-JA-AKs werden durch die Aufreinigungsmethode nicht beeinflusst.....	57
3.3.3 In EDC-fixierten Pflanzengewebe binden die gewonnenen AKs an JA und JA-Ile	58
3.3.4 Anwendung des Anti-JA-AKs zum Nachweis von JA/JA-Ile in der Wundantwort von Tomate	61
4. Kapitel II – Visualisierung von JA-Ile mittels der spezifisch durch JA-Ile-induzier- ten Interaktion von COI1 und JAZ1	64
4.1 Einleitung.....	64
4.1.1 Der Co-Rezeptorkomplex für JA-Ile	64
4.1.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) als klassische Methode zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktion	68
4.2 Ergebnisse.....	72
4.2.1 Etablierung des BiFC-Systems für COI1 und JAZ1 in Zellkulturprotoplasten	72
4.2.2 Stabilisierung von JAZ1 ohne Einsatz eines Proteasominhibitors	76
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Lokalisations- und BiFC-Analysen.....	84
4.3 Diskussion	85
4.3.1 Die Lokalisationsstudien mit den YFP-Fusionskonstrukten weisen auf eine Kernlokalisierung der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes hin	85
4.3.2 Für ein stabiles BiFC-Signal muss der infolge der Interaktion mit dem SCF ^{COI1} - Komplex eintretende Abbau des JAZ1-Proteins unterdrückt werden.....	87
5. Kapitel III – Herstellung eines synthetischen Promotors zur zell- und gewebe- spezifischen Visualisierung von JA/JA-Ile	94
5.1 Einleitung.....	94
5.1.1 Die Rolle von <i>cis</i> -Elementen für die Regulation der Genexpression.....	94
5.1.2. Synthetische Promotoren als Werkzeuge der Zellbiologie	96
5.1.3 Vorarbeiten zur Selektion JA-responsiver Elemente.....	99

5.2. Ergebnisse.....	101
5.3 Diskussion	119
5.3.1 Die G-Box als putativ JA-spezifisches Element	119
5.3.2 Ein AT-reiches Element als putatives Kopplungselement für die JA-spezifische G-Box	122
6. Zusammenfassung	126
7. Literaturverzeichnis	129
8. Anhang	145
8.1 Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit genutzten synthetischen Oligo- und Polynukleotide	145
8.2 Auflistung aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Vektoren	149
8.3 Vollständige CDS von <i>JAZ1</i> und <i>COI1</i> und Darstellung der im Rahmen der Arbeit erzeugten Varianten der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes	150
8.4 Berechnung der wahrscheinlichen Ubiquitinierungsstellen mit CKSAAO_UBSITE und UbPred	152
8.5 Promotorsequenzen der <i>AOC2</i> und <i>AOC3</i> aus <i>A. thaliana</i>	153
8.6 Identifizierung von G-Boxen und T/G-Boxen in den Promotoren verschiedener JA- induzierter Promotoren von <i>A. thaliana</i> und Analyse der Genexpressionsmuster dieser Gene mit der Genevestigator-Datenbank	155
8.7 Haarnadelstruktur des 5xG- <i>JAZP</i> Polynukleotids	158
8.8 Charakterisierung der G-Box- und T/G-Box basierten synthetischen Promotoren	158
8.9 Transkriptanalysen in T2-Pflanzen	161
8.10 Charakterisierung des synthetischen Promotors 4x(AT+G)- <i>AOC3</i> in transient transformierten <i>N. benthamiana</i> -Blättern.....	161
8.11 Vektorkarten.....	163
Danksagung.....	166
Eidesstattliche Erklärung	168

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Der 13-LOX-Weg zur JA-Biosynthese.	2
Abb. 1.2:	Jasmonsäure und ihre Metabolite.	3
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der SCF-E3-Ubiquitinligase.	6
Abb. 1.4:	Vereinfachtes Schema der JA-Signaltransduktionskette.	7
Abb. 3.1:	Prinzip der direkten und indirekten Immunmarkierung.	34
Abb. 3.2:	Aufbau von Immunglobulinen.	37
Abb. 3.3:	Übersicht über die Arbeitsschritte zur Gewinnung eines polyklonalen AKs für den immunhistochemischen Nachweis von JA in pflanzlichen Gewebeschnitten.	41
Abb. 3.4:	Reaktionsmechanismus der Fixierung von Jasmonaten mit EDC.	42
Abb. 3.5:	Vereinfachte Darstellung des Vorgehens beim kompetitiven indirekten ELISA.	46
Abb. 3.6:	Ergebnisse des indirekten ELISA zur Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen für die Charakterisierung von AK I im kompetitiven ELISA.	48
Abb. 3.7:	Charakterisierung der polyklonalen Kaninchen-Anti-JA-AK-Fraktionen.	49
Abb. 3.8:	Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Detektion von JA in Blättern der JA-defizienten <i>S. lycopersicum</i> -Mutante <i>spr2</i> nach Infiltration mit EDC-aktivierter JA.	53
Abb. 3.9:	Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Detektion von JA/JA-Ile in verwundeten Blättern verschiedener <i>S. lycopersicum</i> -Genotypen.	54
Abb. 3.10:	Immunhistochemische Detektion von JA/JA-Ile in Blättern von <i>S. lycopersicum</i> -Wildtyp nach Verwundung.	55
Abb. 4.1:	Aufbau des F-Box-Proteins COI1.	64
Abb. 4.2:	Primärstruktur der JAZ-Proteine am Beispiel des JAZ1-Proteins aus <i>A. thaliana</i>	66
Abb. 4.3:	Struktur des Co-Rezeptorkomplexes für JA-Ile.	67
Abb. 4.4:	Das BiFC-System.	69
Abb. 4.5:	Grundprinzip der BiFC-Methode zum nicht-invasiven <i>in vivo</i> -Nachweis von JA-Ile.	71
Abb. 4.6:	Aufnahmen von mit YFP-Fusionskonstrukten transfizierten Zellkulturprotoplasten.	73
Abb. 4.7:	Abnahme der YFP-Fluoreszenz eines mit <i>YFP:JAZ1</i> transfizierten Zellkulturprotoplasten nach Applikation von Coronatin (30 μ M).	75
Abb. 4.8:	Coronatin-induzierte BiFC-Signale durch Interaktion von COI1 und JAZ1 in transfizierten Zellkulturprotoplasten.	75
Abb. 4.9:	Strategien für eine Stabilisierung des JAZ1-COI1-Komplexes.	76
Abb. 4.10:	Darstellung der F-Box-Domäne von COI1.	77
Abb. 4.11:	Darstellung von Mesophyllprotoplasten, die mit den verschiedenen Varianten des <i>COI1:YFP</i> -Fusionskonstruktes transfiziert wurden.	79
Abb. 4.12:	JAZ1-Degron und potentielle Ubiquitinierungsstellen.	80

Abb. 4.13: Nach Coronatin-Applikation aufgenommene Zeitserien von <i>JAZ1:YFP</i> - und <i>JAZ_{K85/105/110/119R}:YFP</i> -transfizierten Mesophyllprotoplasten.	81
Abb. 4.14: Zeitserien von Mesophyllprotoplasten, die mit den Fusionskonstrukten <i>JAZ1:YFP</i> - und <i>JAZ1-Degron:YFP</i> transfiziert wurden.	83
Abb. 5.1: Der Aufbau von Genen.	95
Abb. 5.2: Aufbau synthetischer Promotoren.	97
Abb. 5.3: Funktionsprinzip eines synthetischen Promotors zum nicht-invasiven <i>in vivo</i> -Nachweis von JA/JA-Ile.	99
Abb. 5.4: Darstellung der über <i>AOC2P:GUS</i> - und <i>AOC3P:GUS</i> -Fusionen und verschiedenen Promotordeletionskonstrukten erzielten relativen GUS-Aktivitäten.	100
Abb. 5.5: Flankierende Sequenzen der 19 identifizierten G-Boxen aus den <i>JAZ</i> -Promotoren.	103
Abb. 5.6: Einfluss einer Multimerisierung der <i>AOC3P</i> -G-Box auf die Aktivität synthetischer Promotorkonstrukte.	106
Abb. 5.7: Durch putativ JA-responsive synthetische Promotoren hervorgerufene GUS-Aktivitäten.	108
Abb. 5.8: Histochemische GUS-Färbung der mit GUS-Konstrukten interner Deletionsfragmente des <i>AOC3P</i> stabil transformierten Pflanzen.	114
Abb. 5.9: Aufbau des neuen putativ JA-responsiven Promotors 4x(AT+G)-AOC3 und des Kontrollpromotors 2xAT-AOC3.	115
Abb. 5.10: Mikroskopische Aufnahmen von Blättern von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen, die <i>HAT6:GFP</i> unter Kontrolle der synthetischen Promotoren 4xJERE, 2xAT-AOC3 und 4x(AT+G)-AOC3 exprimieren.	118
Abb. 8.1: Vollständige CDS von <i>JAZ1</i>	150
Abb. 8.2: Vollständige CDS von <i>COI1</i>	151
Abb. 8.3: Wahrscheinliche Ubiquitinierungsstellen in <i>JAZ1</i>	152
Abb. 8.4: Promotorsequenz der <i>AOC2</i> aus <i>A. thaliana</i>	153
Abb. 8.5: Promotorsequenz der <i>AOC3</i> aus <i>A. thaliana</i>	154
Abb. 8.6: Auf Grund der palindromischen Basenfolge bildet das basierend auf der G-Box des <i>JAZ2P</i> abgeleitete Multimer intramolekulare Basenpaare und somit eine Haarnadelstruktur aus.	158
Abb. 8.7: Mikroskopische Aufnahmen der mit den synthetischen Promotoren transient transformierten <i>N. benthamiana</i> -Blätter.	159
Abb. 8.8: Untersuchung der Transkriptakkumulation von <i>HTA6:GFP</i> in stabil transformierten <i>A. thaliana</i> -Pflanzen vor und nach Verwundung.	161
Abb. 8.9: Mikroskopische Aufnahmen der mit den synthetischen Promotoren transient transformierten <i>N. benthamiana</i> -Blätter.	162

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1:	Auflistung aller verwendeten Datenbanken und Software-Tools sowie deren Verwendungszweck.	32
Tab. 3.1:	Vergleich der zu etablierenden affinitätschromatographischen Methoden zur Anti-JA-AK-Reinigung aus dem Kaninchenantiserum hinsichtlich ihres Arbeits- und Zeitaufwandes.	44
Tab. 3.2:	Auflistung der für AK I und AK II ermittelten IC ₅₀ -Werte.	50
Tab. 3.3:	Eigenschaften der AK-Fraktionen hinsichtlich Proteingehalt, Verdünnungsfaktoren und der sich daraus ergebenden im kompetitiven ELISA eingesetzten Endkonzentration (pg Protein/ml).	50
Tab. 4.1:	Kombinationen der Interaktionspartner für die BiFC-Versuche.	74
Tab. 4.2:	Überblick über die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit den generierten YFP-Fusionsproteinen von COI1, JAZ1 bzw. deren modifizierten Varianten.	84
Tab. 4.3:	Überblick über die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit den generierten BiFC-YFP-Fusionsproteinen von COI1, JAZ1 bzw. deren modifizierten Varianten.	84
Tab. 4.4:	Kombinationen der Interaktionspartner für die BiFC-Versuche mit dem modifizierten COI1-Protein COI1 _{E22V} bzw. den modifizierten JAZ-Proteinen JAZ1 _{K85/105/110/119R} und JAZ-Degron.	93
Tab. 5.1:	Identifizierte JAREs in den Promotoren der <i>AOC2</i> und <i>AOC3</i> von <i>A. thaliana</i> . .	101
Tab. 5.2:	Für die Herstellung putativ JA-responsiver synthetischer Promotoren ausgewählte G-Boxen aus den Promotorsequenzen der <i>JAZ</i> -Gene von <i>A. thaliana</i> . .	104
Tab. 5.3:	Auflistung und Beschreibung der generierten synthetischen Promotoren.	107
Tab. 5.4:	Zusammenfassung der nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion von <i>N. benthamiana</i> -Blättern mit den putativ JA-spezifischen synthetischen Promotoren beobachteten Fluoreszenzsignalen.	110
Tab. 5.5:	Übersicht über Sequenzbereiche JA-regulierter Promotoren, die Ähnlichkeiten zum AT-reichen Element des <i>ORCA3P</i> aufweisen.	113
Tab. 5.6:	Zusammenfassung der nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion von <i>N. benthamiana</i> -Blättern mit dem neuen putativ JA-spezifischen Promotor und den Kontrollkonstrukten beobachteten Fluoreszenzsignalen.	116
Tab. 8.1:	Auflistung aller PCR-Primer und deren Verwendungszweck.	145
Tab. 8.2:	Auflistung aller weiteren im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligo- und Polynukleotide.	146
Tab. 8.3:	Auflistung der verwendeten Vektoren.	149
Tab. 8.4:	TAIR-Codes der verschiedenen in die Promotor- und Genexpressionsanalysen einbezogenen JA-responsiven Gene aus <i>A. thaliana</i>	155
Tab. 8.5:	Auflistung der in den <i>JAZ</i> -Promotoren gefundenen G-Boxen und ihrer flankierenden Sequenzen.	155
Tab. 8.6:	Ergebnisse der mit den JA-regulierten <i>JAZ</i> -Genen aus <i>A. thaliana</i> durchgeführten Promotoranalysen und der Analysen ihrer Genexpressionsmuster.	156

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abscisinsäure
ABF	ABRE- <i>Binding Factor</i>
ABRE	ABA-responsives Element
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure
<i>acx1</i>	<i>acyl-coA-oxidase 1</i> (Mutante)
AG	Antigen
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AOC	Allenoxidzyklase
AOS	Allenoxidsynthase
AS	Aminosäure
ASK1	<i>Arabidopsis SKP1-like Proteine</i>
<i>att</i> -Stellen	<i>attachment</i> -Stellen
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
bidest.	zweifach destilliert
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bZIP	<i>basic Leucine Zipper Domain</i>
CaMV 35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus 35 S</i> -Promotor
<i>ccdB</i>	<i>Control of death B</i>
Cdc4	<i>Cell division cycle protein 4</i>
CDS	vollständige kodierende Gensequenz
CE	<i>Coupling Element</i>
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
Cm	Chloramphenicol
COI1	<i>Coronatin Insensitive 1</i>
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>A.thaliana</i>
CPF	<i>Cleavage and Polyadenylation Factor</i>
dest.	destilliert
DPE	<i>Downstream Promoter Element</i>
dsDNA	dopplesträngige DNA
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	Fluorescindiaceat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTF	<i>General Transcription Factors</i>
GUS	β-Glucuronidase
HTA6	Histon H2A 6
Hygro	Hygromycin
IAA	Indol-3-Essigsäure
IgG	Immunglobulin G

IHC	Immunhistochemie
JA	Jasmonsäure
JA-IIe	Jasmonsäure-Isoleucin
JAME	Methyljasmonat
Jas	<i>Jasmonate associated</i>
JARE	JA-responsive <i>cis</i> -Elemente
JAZ	<i>Jasmonate-ZIM-domain</i>
Km	Kanamycin
LOX	Lipoxygenase
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
LUC	Luciferase
MED25	<i>Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25</i>
Met30	<i>Methionine-requiring Protein 30</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NINJA	<i>Novel Interactor of JAZ</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
OPDA	<i>cis-(+)-12-Oxophytodiensäure</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIC	Transkriptions-Präinitiationskomplex
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
Pol II	DNA-abhängige RNA-Polymerase II
Poly(A)	Poly-Adenylierungssignal(sequenz)
RBX1	<i>Ringbox Protein 1</i>
REN	Restriktionsendonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SCF-Komplex	<i>SKP, CULLIN, F-box containing-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex</i>
SKP1	<i>S-Phase Kinase associated Protein 1</i>
<i>spr2</i>	<i>supressor of prosystemin-mediated response 2 (Mutante)</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBP	<i>TATA-Binding Protein</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TIR1	<i>Transprot Inhibitor Response 1</i>
TPL	TOPLESS
UTR	<i>untranslated region</i>
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
Y2H-System	Hefe-Zwei-Hybrid-System
ZIM	<i>Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem</i>
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
12-OH-JA	12-Hydroxyjasmonsäure
35S MP	-46/+8 CaMV 35S-Minimalpromotor

1. ALLGEMEINE EINLEITUNG

1.1 Jasmonsäure – Biosynthese, Derivate und physiologische Bedeutung

Jasmonsäure (JA) und ihre Derivate gehören zu der ubiquitär im Pflanzenreich verbreiteten Phytohormonklasse der Jasmonate. Dabei handelt es sich um niedermolekulare Botenstoffe, die an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt sind. Ihre Entdeckungsgeschichte reicht zurück bis in das Jahr 1962 als aus dem ätherischen Öl von *Jasminum grandiflorum* der JA-Methylester (JAME) isoliert wurde (Demole *et al.*, 1962). Zahlreiche physiologische Effekte der Jasmonate wurden bereits in den 1980er Jahren in Applikationsexperimenten festgestellt. Dazu gehörten ihre hemmende Wirkung auf Wurzel- und Keimlingswachstum (Yamane *et al.*, 1980, 1981; Dathe *et al.*, 1981), sowie ihre fördernde Wirkung auf Seneszenz (Ueda & Kato, 1980), Fruchtentwicklung (Saniewski *et al.*, 1987) und Knollenbildung (Yoshihara *et al.*, 1989). Spätere Analysen zeigten zudem, dass Jasmonate nicht nur in die Steuerung pflanzlicher Wachstums- und Entwicklungsvorgänge involviert sind, sondern auch für die Adaptation der Pflanzen an sich ändernde Umwelteinflüsse sowie für biotische Interaktionen mit Pathogenen, Phytophagen und Symbionten bedeutend sind (Schilmiller & Howe, 2005; Wasternack, 2007; Wasternack & Hause, 2013). Nach Befall durch Blattläuse, Thripse, Raupen, pathogene Pilze und Bakterien (Glazebrook, 2005; Pozo *et al.*, 2005; Schilmiller & Howe, 2005; Wasternack, 2007), einer Besiedlung durch arbuskuläre Mykorrhizapilze (Hause *et al.*, 2007), sowie in Reaktion auf abiotische Stressfaktoren wie osmotischen Stress, Trockenstress und UV-Behandlung (Kramell *et al.*, 1995; Berger, 2002; Wasternack, 2007) wurde in verschiedenen Geweben unterschiedlicher pflanzlicher Spezies ein Anstieg im endogenen JA-Gehalt beobachtet. Dieser ist verknüpft mit Veränderungen in den Genexpressionsmustern. Es erfolgte z. B. eine Induktion von Genen, die für die Abwehr von Pathogenen und Phytophagen bzw. für die Reaktion auf abiotische Stressfaktoren relevant sind (Wasternack & Hause, 2002; Wasternack, 2007). So wurde u. a. gezeigt, dass es zu einer JAME-induzierten Akkumulation von Proteinaseinhibitoren in den Blättern von *Solanum lycopersicum* kommt (Farmer & Ryan, 1990).

Jasmonate gehören in die Stoffgruppe der Oxylipine und werden durch enzymatische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren über den 13-Lipoxygenase (LOX)-Weg gebildet (Feussner & Wasternack, 2002) (siehe Abb. 1.1). Die Biosynthese erfolgt dabei in zwei verschiedenen Kompartimenten – den Plastiden und Peroxisomen. Die Aufklärung des JA-Biosyntheseweges gelang bereits in den 1980er Jahren durch Vick & Zimmermann (1983, 1984) sowie Hamberg & Hughes (1988). Die Ausgangsverbindung hierfür ist die ungesättigte Fettsäure α -Linolensäure (α -LeA), die im ersten Schritt der JA-Biosynthese durch die Phospholipase A1 (PLA1) aus Galaktolipiden der Chloroplastenmembran freigesetzt wird (Wasternack & Hause, 2013). Durch die 13-LOX erfolgt anschließend die Insertion von O_2 an Position C-13 der α -LeA. Die dabei gebildete 13-Hydroperoxy-

octadecatriensäure (13-HPOT) kann als Substrat für verschiedene Enzymreaktionen dienen (Feussner & Wasternack, 2002).

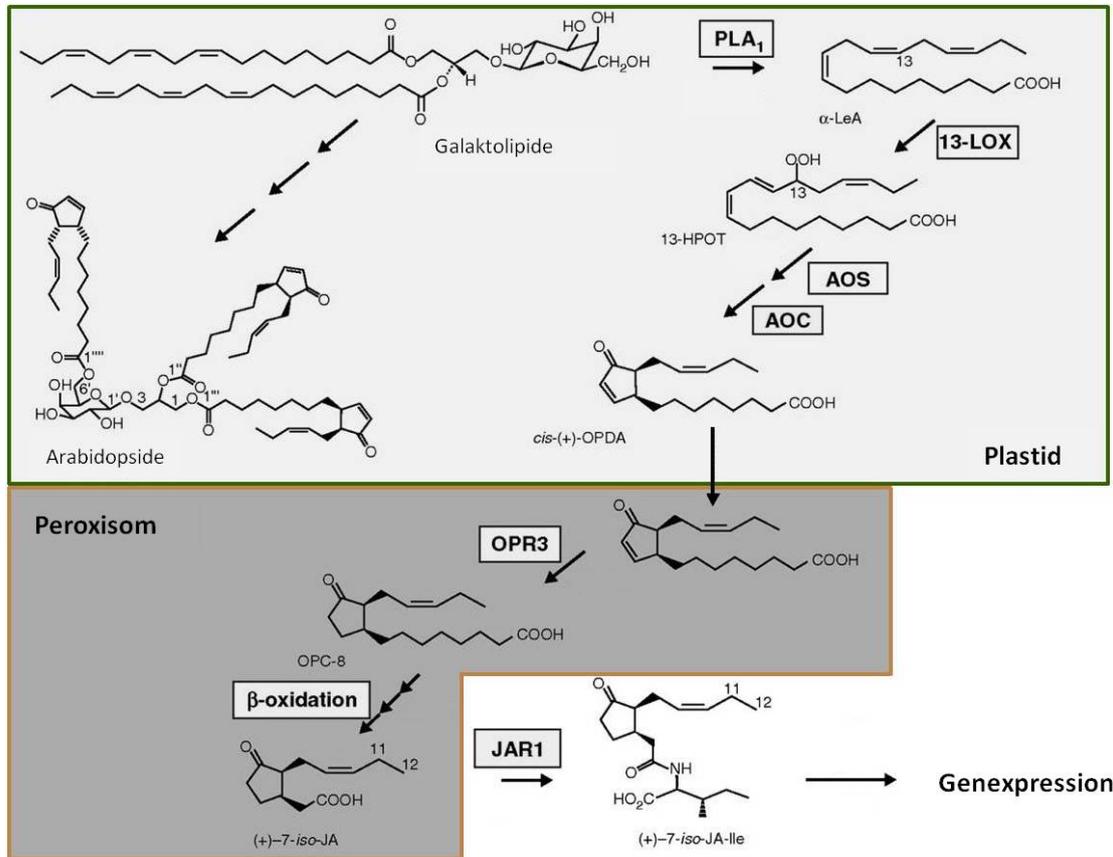


Abb. 1.1: Der 13-LOX-Weg zur JA-Biosynthese.

Die Biosynthese von JA erfolgt in den Chloroplasten (oben, grün umrandet) und Peroxisomen (unten, braun umrandet). Die Ausgangsverbindung dafür ist die aus den Galaktolipiden der Chloroplastenmembran von der PLA1 freigesetzte α-Linolensäure. Das Endprodukt des plastidär ablaufenden Teils der Biosynthese ist cis-(+)-OPDA, die in das Peroxisom transloziert und dort zum vorläufigen Endprodukt (+)-7-iso-JA umgesetzt wird. Durch Konjugation mit Isoleucin erfolgt die Bildung des als bioaktive Form der (+)-7-iso-JA identifizierten JA-Ile. In Pflanzen der Gattung Arabidopsis kann OPDA in Form von Arabidopsiden gebunden an Glycerolipide vorkommen. Diese stellen vermutlich eine Speicherform dar. Die Abbildung wurde in leicht abgewandelter Form von Wasternack & Hause (2013) übernommen.

Für die JA-Biosynthese wird aus 13-HPOT, katalysiert durch die Allenoxidsynthase (AOS), das instabile Intermediat 12,13-Epoxylinolensäure (12,13-EOT) gebildet. Dieses wird von der Allenoxidzyklase (AOC) zu cis-(+)-Oxophytodiensäure [cis-(+)-OPDA] umgesetzt. Cis-(+)-OPDA ist die erste zyklische Verbindung innerhalb des JA-Biosyntheseweges. Sie ist zudem das Endprodukt des plastidär ablaufenden Teils der Biosynthese und wird in die Peroxisomen transloziert. Wie die Translokation erfolgt, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Während der Transporter für den Export von OPDA aus dem Chloroplasten bisher nicht identifiziert wurde, erfolgt der Import in das Peroxisom vermutlich über den ABC-Transporter COMATOSE (CTS1) und/oder mittels eines Ionenfallen-Mechanismus (Waster-

nack & Kombrink, 2010). Durch die OPDA-Reduktase 3 (OPR3) wird *cis*-(+)-OPDA im Peroxisom zunächst zu 12-Oxophytoensäure (OPC-8) reduziert, deren Carboxyl-Seitenkette anschließend durch drei β -Oxidations-Zyklen verkürzt wird. Die β -Oxidationen werden durch die Enzyme Acyl-CoA-Oxidase (ACX), *Multifunctional Proteine* (MFP) und Keto-Acyl-CoA-Thiolase (KAT) katalysiert und führen zum Jasmonoyl-CoA, aus dem durch eine bisher nicht identifizierte Thioesterase (+)-7-*iso*-JA freigesetzt wird (Feussner & Wasternack, 2002).

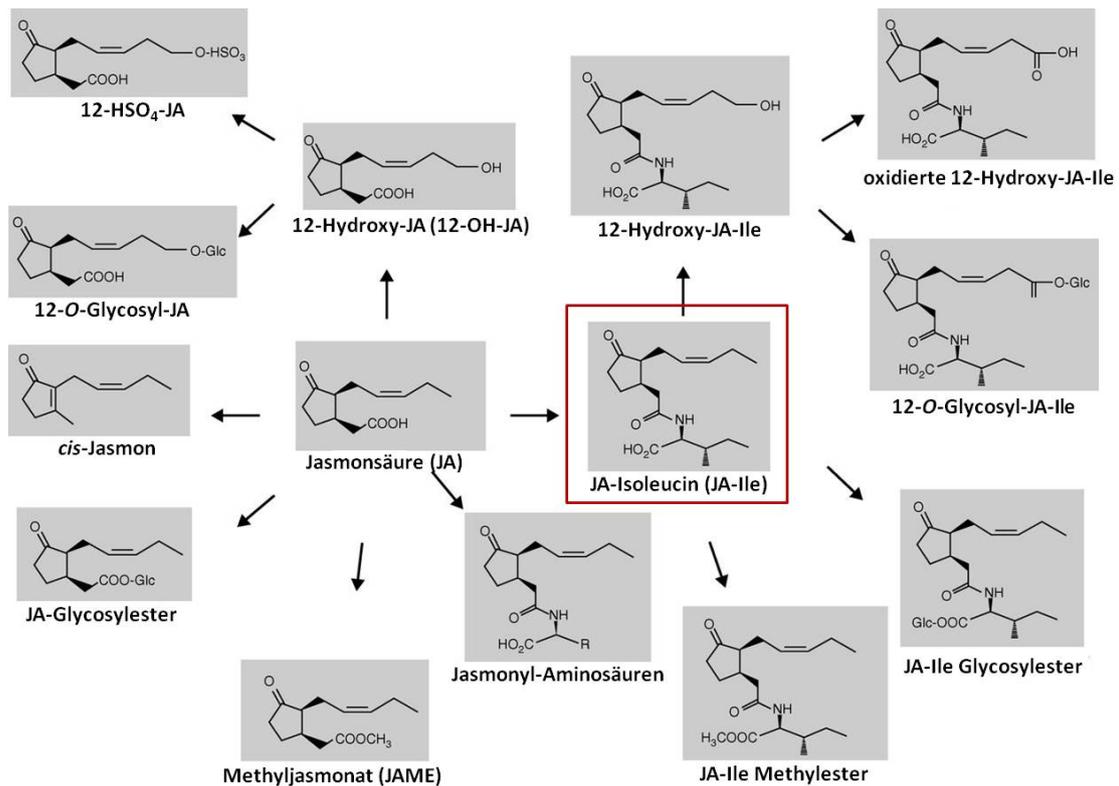


Abb. 1.2: Jasmonsäure und ihre Metabolite.

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der bisher gefundenen, von (+)-7-*iso*-JA abgeleiteten Jasmonate. Rot umrandet ist das Isoleucinkonjugat, welches als bioaktive Form der JA identifiziert wurde. Die Abbildung wurde in leicht abgewandelter Form von Wasternack & Hause (2013) übernommen.

(+)-7-*iso*-JA ist jedoch nicht das Endprodukt des Biosynthesewegs, denn in pflanzlichen Geweben wurden zahlreiche natürlich vorkommende Derivate der (+)-7-*iso*-JA sowie die Enzyme, die deren Bildung katalysieren, identifiziert (Wasternack & Hause, 2013) (siehe Abb. 1.2). JA-Derivate werden unter anderem durch Konjugation mit Aminosäuren wie Isoleucin, Hydroxylierung an der Position C-11 oder C-12 der Pentenylseitenkette, Sulfatierung, O-Glycosylierung und/oder Decarboxylierung gebildet (Wasternack & Hause, 2013). Im Jasmonatprofil können dabei in Abhängigkeit von der Spezies, dem Zell- und Gewebetyp, dem Entwicklungsstadium und/oder den auf die Pflanze wirkenden abiotischen/biotischen Umweltfaktoren z. T. erhebliche Unterschiede auftreten (Creelman & Mullet, 1995, 1997; Hause *et al.*, 2000). Bisher konnte noch nicht für alle identifizierten natürlich vorkom-

menden JA-Derivate die physiologische Funktion aufgeklärt werden (Wasternack & Hause, 2013). Wurden viele der beobachteten physiologischen Effekte ursprünglich noch der freien Form der JA zugeschrieben (Farmer & Ryan, 1992) ist mittlerweile bekannt, dass das Isoleucinkonjugat (JA-Ile) der eigentliche Ligand für den Jasmonatrezeptor und somit die biologisch aktive Form der (+)-7-*iso*-JA darstellt (Fonseca *et al.*, 2009) (siehe Punkt 1.2). Eine wichtige Bedeutung wird jedoch auch der JA-Vorstufe *cis*-(+)OPDA und dem an der C-12-Position hydroxylierten JA-Derivat 12-OH-JA zugeschrieben.

Für Pflanzen der Gattung *Arabidopsis* ist belegt, dass OPDA auch als Arabidopside in veresterter Form gebunden an Mono- und Digalactosyldiacylglyceride (MGDG und DGDG) der Thylakoidmembran vorkommt (Stelmach *et al.*, 2001; Mosblech *et al.*, 2009). Stressinduziert erfolgt ein Anstieg im Gehalt von 12-OH-JA, freier OPDA, aber auch der Arabidopside. So konnten Miersch *et al.* (2008) belegen, dass eine wundinduzierte Akkumulation des auf die Expression JA-induzierter Gene reprimierend wirkenden JA-Derivates 12-OH-JA erfolgt. Weiterhin ist in der Literatur ein Anstieg im Gehalt an freier OPDA unter anderem nach Verwundung (Stelmach *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2002; Buseman *et al.*, 2006), Herbivorbefall (Zhu *et al.*, 2011), und Applikation von Sorbitol (Kramell *et al.*, 2000) bzw. Behandlung mit dem Pathogenelicitor Chitosan (Rakwal *et al.*, 2002) beschrieben. Es gibt Hinweise darauf, dass in Pflanzen der Gattung *Arabidopsis* OPDA durch die enzymatische Aktivität einer *sn1*-Lipase aus der Glycerollipid-Fraktion der Thylakoidmembran freigesetzt werden kann. Dies könnte der Grund für die rasche Akkumulation freier OPDA nach Einwirkung abiotischer und biotischer Stressoren sein (Stelmach *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). Die Rolle lipidgebundener OPDA in *Arabidopsis* ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt. Neben ihrer möglichen Funktion als eine Art Speicherstoff für die rasche Freisetzung von OPDA, die in die JA-Biosynthese eingespeist wird bzw. die eigene, JA-unabhängige Signaleigenschaften besitzt (Stintzi *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2005; Ribot *et al.*, 2008; Mueller & Berger, 2009), gibt es auch Anhaltspunkte dafür, dass Arabidopside selbst als Signalstoffe fungieren könnten (Kourtchenko *et al.*, 2007). So wurde sowohl eine wund- (Buseman *et al.*, 2006; Kourtchenko *et al.*, 2007), als auch pathogeninduzierte (Andersson *et al.*, 2006; Grun *et al.*, 2007; Kourtchenko *et al.*, 2007) Akkumulation lipidgebundener OPDA nachgewiesen und gezeigt, dass diese eine mögliche Rolle bei der Pathogenabwehr spielen könnten (Andersson *et al.*, 2006; Kourtchenko *et al.*, 2007).

1.2 Mechanismus der JA-Perzeption und Regulation der Expression JA-induzierter Gene

Obwohl Jasmonate bereits seit den 1980er Jahren Gegenstand pflanzenphysiologischer Untersuchungen sind und ihre Biosynthese in dieser Zeit aufgeklärt wurde, war lange nichts über die an der JA-Perzeption beteiligten Komponenten bekannt. Die Aufklärung der Jasmonatsignaltransduktion begann, als die *A. thaliana*-Mutante *coi1* (*coronatine insensitive 1*) auf Grund ihrer Resistenz gegenüber JAME und Coronatin, einem funktionellen JA-Analogen aus dem Phytopathogen *Pseudomonas syringae*, isoliert wurde (Feys *et al.*, 1994). Bei der

phänotypischen Charakterisierung erwies sich die Mutante als männlich steril, resistent gegenüber der durch JAME bzw. Coronatin vermittelten Hemmung des Wurzelwachstum und defizient in der Expression JAME-induzierter Gene (Feys *et al.*, 1994). Daraus wurde geschlossen, dass das von *COI1* kodierte Genprodukt eine essentielle Rolle in der Jasmonatsignaltransduktion spielt.

Die Identifizierung des von der Mutation betroffenen Gens erfolgte vier Jahre später durch Xie und Mitarbeiter. Sie zeigten, dass *COI1* für ein F-Box-Protein kodiert (Xie *et al.*, 1998). F-Box-Proteine sind ubiquitär verbreitet und zeichnen sich durch ein meist N-terminal lokalisiertes, etwa 40 AS umfassendes Proteinmotiv aus (Bai *et al.*, 1996) (siehe auch Kapitel II Punkt 4.1.1). Über das F-Box-Motiv erfolgt nachweislich die Interaktion verschiedener F-Box-Proteine mit dem SKP1 (*S-Phase Kinase associated Protein 1*)-Protein (Bai *et al.*, 1996; Schulman *et al.*, 2000). SKP1 ist Bestandteil einer SCF (*SKP, CULLIN, F-box containing*)-E3-Ubiquitinligase – einem Proteinkomplex, der die ubiquitinabhängige Proteolyse vermittelt (Patton *et al.*, 1998; Deshaies, 1999). SCF-E3-Ubiquitinligasen kommen in Eukaryoten ubiquitär vor und bestehen aus vier Hauptkomponenten: der bereits erwähnten F-Box- und SKP-Komponente, einem CULLIN-Protein und der RBX1 (*Ringbox protein 1*)-Untereinheit (Sadanandom *et al.*, 2012) (siehe Abb. 1.3). Strukturell zeichnet sich RBX1 durch eine Ringfingerdomäne aus. Über diese Domäne wird die E2-Ubiquitinligase rekrutiert, welche die Übertragung von Ubiquitin auf das Substratprotein des SCF-Komplexes katalysiert (Vierstra, 2003). Der Abbau der ubiquitinmarkierten Proteine erfolgt in Eukaryoten durch das 26S-Proteasom – einen 2 MDa großen Multiproteinkomplex (Sadanandom *et al.*, 2012). Da verschiedene Vertreter der F-Box-Proteinfamilie mit SKP1 interagieren können (Bai *et al.*, 1996), wurde vermutet, dass die F-Box-Komponente des SCF-Komplexes dessen Substratspezifität festlegt und somit entscheidend dafür ist, welches Zielprotein ubiquitiniert und dem proteolytischen Abbau zugeführt wird (Patton *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens*, die nur ein bekanntes funktionelles *SKP1*-Gen besitzen, enthält das Genom von *A. thaliana* 21 *SKP1*-ähnliche Gene, deren Genprodukte als ASK- (*Arabidopsis-SKP1-like*)-Proteine bezeichnet werden (Arabidopsis *et al.*, 2000). Im Jahr 2002 wurde bestätigt, dass *COI1* über die F-Box-Domäne mit ASK1 interagiert und Bestandteil eines SCF-Komplexes ist (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002).

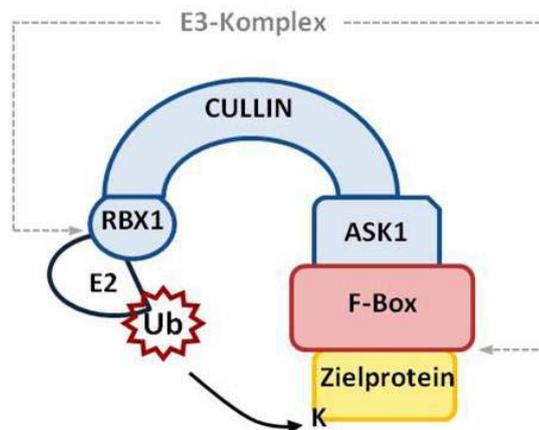


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der SCF-E3-Ubiquitinligase.

Dargestellt ist der Grundaufbau einer SCF-E3-Ubiquitinligase. Die Hauptbestandteile des E3-Komplexes sind dabei das F-Box-Protein, ein SKP- oder SKP-ähnliches Protein (z. B. ASK1 in *A. thaliana*), ein CULLIN-Protein und das RBX1-Protein. Über das RBX1-Protein erfolgt die Rekrutierung der E2-Ligase, die Ubiquitinmoleküle (Ub) auf einen Lysinrest (K) des Zielproteins der E3-Ligase überträgt. Die Substratspezifität, die bestimmt welches Zielprotein vom E3-Komplex gebunden wird, wird dabei durch die F-Box-Komponenten des Komplexes festgelegt. Abbildung nach Vierstra (2003).

Zu den in Pflanzen identifizierten F-Box-Proteinen gehört neben COI1 auch TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) – eine Schlüsselkomponente der pflanzlichen Auxinantwort (Ruegger *et al.*, 1998). Das TIR1-Protein ist Bestandteil des SCF^{TIR1}-Komplexes (Gray *et al.*, 1999) und wurde als Rezeptor für das Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA) identifiziert (Kepinski & Leyser, 2005). Die Bindung des Phytohormons vermittelt die Interaktion von TIR1 mit dem Protein Aux/IAA, das als Repressor auxininduzierter Gene wirkt und infolge der Interaktion mit dem SCF^{TIR1}-Komplex ubiquitiniert und abgebaut wird (Gray *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2007; Maraschin *et al.*, 2009). Auf Grund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zwischen COI1 und TIR1 wurde vermutet, dass das COI1-Protein als Teil der SCF^{COI1}-E3-Ubiquitinligase direkt als Rezeptor an der JA-Perzeption beteiligt sein könnte (Tan *et al.*, 2007). Völlig ungeklärt war bis *dato* jedoch noch die Frage nach dem Zielprotein des SCF^{COI1}-Komplexes und damit nach dem Mechanismus der Regulation JA-induzierter Gene. Erst mit Entdeckung mehrerer Vertreter einer neuen Proteinfamilie, den JAZ (*Jasmonate ZIM-domain*)-Proteinen, wurde das fehlende Bindeglied in der JA-Signaltransduktionskette identifiziert (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007) (siehe auch Kapitel II Punkt 4.1.1). Die JAZ-Proteine, von denen in *A. thaliana* 12 verschiedenen Vertreter identifiziert wurden (Chung *et al.*, 2008; Katsir *et al.*, 2008a), agieren als Schlüsselregulatoren der JA-Signalkaskade. Sie binden bei niedrigem zellulären JA-Gehalt an Transkriptionsfaktoren (TFs), die bei der Expression JA-responsiver Gene beteiligt sind, und unterdrücken so die Genexpression (Chini *et al.*, 2007) (siehe Abb. 1.4). Zu den bekanntesten TFs, die eine Rolle bei der Regulation JA-induzierter Gene spielen, gehört MYC2, ein Vertreter aus der Familie der bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*)-TFs. Er bindet in den Promotoren JA-regulierter Gene an *cis*-regulatorische

G-Box-Elemente (Boter *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). Für MYC2 konnte erstmals die Interaktion mit den JAZ-Proteinen nachgewiesen werden (Chini *et al.*, 2007). Mittlerweile wurden weitere TFs aus der Familie der bHLH-TFs (z. B. MYC3 und MYC4), aber auch aus der Familie der R2R3-MYB-TFs (z. B. MYB21 und MYB24) identifiziert, die ebenfalls durch JAZ-Proteine gebunden werden (Pauwels & Goossens, 2011; Wager & Browse, 2012).

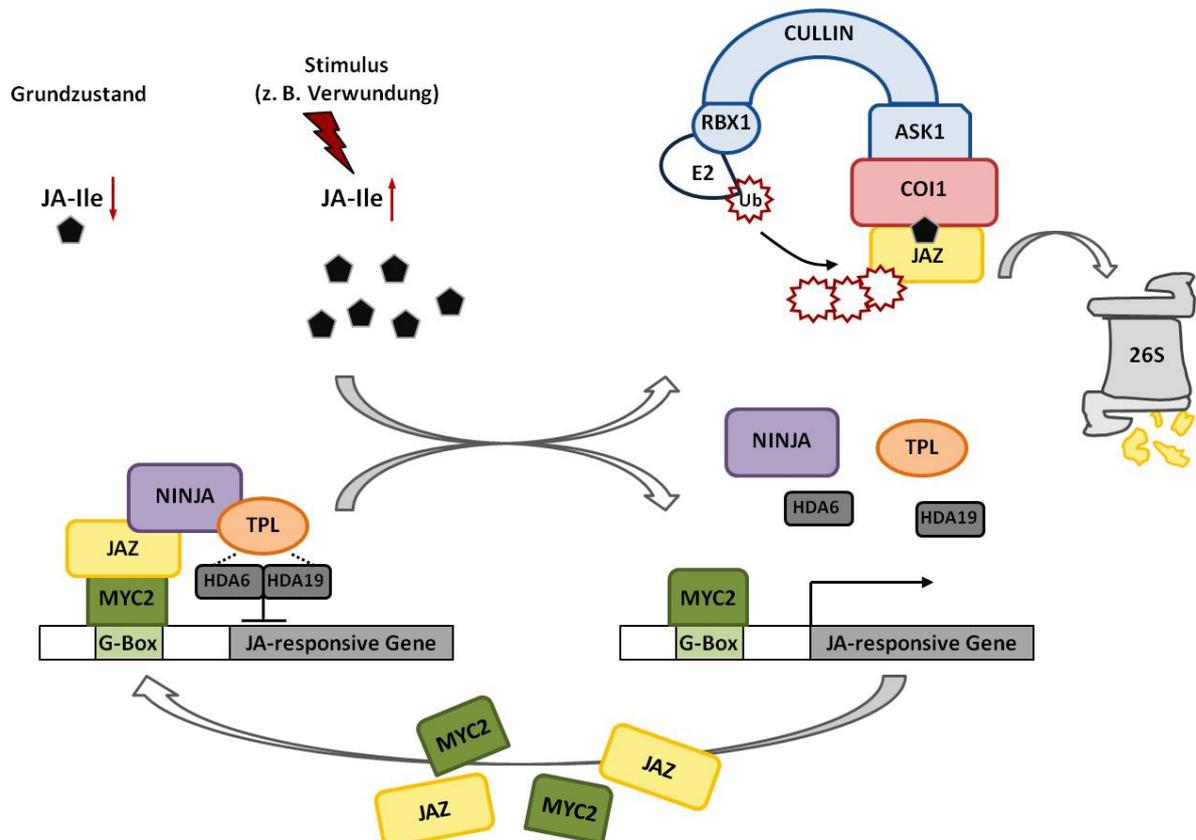


Abb. 1.4: Vereinfachtes Schema der JA-Signaltransduktionskette.

Im Grundzustand (niedriger JA-Ile-Gehalt) wird der TF MYC2 durch JAZ-Proteine gebunden. Über das mit JAZ interagierende Adapterprotein NINJA werden der Co-Repressor TPL und die Histondeacetylasen HDA6/HDA19 rekrutiert. Somit wird trotz Bindung des TFs an das korrespondierende *cis*-Element (G-Box) im Promotor die Expression der entsprechenden JA-responsiven Gene inhibiert. Erfolgt z. B. induziert durch einen externen Stimulus ein Anstieg im JA-Ile-Gehalt, so bindet JAZ an das COI1-Protein und wird infolge dessen als Substrat des SCF^{COI1}-Komplexes ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Dadurch wird die Genrepression aufgehoben und MYC2 kann die Transkription JA-induzierter Gene aktivieren. Da JAZ und MYC2 selbst zu den frühen JA-induzierten Genen gehören, wird der Pool an TFs aufgefüllt. Dargestellt nach Wasternack & Hause (2013).

Die Repressorwirkung der JAZ-Proteine auf die Genexpression ist jedoch nicht allein auf die Bindung eines TF zurückzuführen. Sie resultiert vielmehr daraus, dass über das an JAZ gebundene Adapterprotein NINJA (*Novel Interactor of JAZ*) der allgemeine Co-Repressor TPL (TOPLESS) und über diesen wiederum die Histondeacetylasen HDA6 und HDA19 rekrutiert

werden (Pauwels *et al.*, 2010) (siehe Abb. 1.4). Kommt es zu einem Anstieg im intrazellulären JA-Gehalt, so erfolgt eine Bindung der JAZ-Proteine an COI1. Mittlerweile ist belegt, dass die Interaktion von JAZ-Proteinen und dem F-Box-Protein dabei nicht durch JA, sondern spezifisch durch deren AS-Konjugat (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile) vermittelt wird (Fonseca *et al.*, 2009). Die Perzeption von JA-Ile erfolgt nicht wie zunächst vermutet über das COI1-Protein allein, sondern durch einen COI1-JAZ-Rezeptorkomplex, an dessen Ausbildung auch ein Inositolpentaphosphat (IP₅) beteiligt ist (Sheard *et al.*, 2010; Mosblech *et al.*, 2011) (siehe Kapitel II Punkt 4.1.1). Infolge der Bindung an COI1 wird das JAZ-Protein durch die SCF^{COI1}-E3-Ubiquitinligase ubiquitiniert und anschließend durch das 26-Proteasom abgebaut. Dies führt dazu, dass der JAZ-NINJA-TPL-Komplex zerfällt und die Transkription der JA-responsiven Gene aktiviert werden kann (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007).

Da sowohl die JAZ-Gene als auch *MYC2* zu den frühen JA-induzierten Genen gehören, erfolgt eine Auffüllung des intrazellulären Pools an Transkriptionsregulatoren (Chung *et al.*, 2008). Die Neusynthese von JAZ-Proteinen führt dabei zu einer negativen Rückkopplung, indem sie erneut die TFs binden und inhibieren (Chini *et al.*, 2007). Die neu synthetisierten TFs hingegen wirken entweder als Aktivatoren oder Inhibitoren auf die Expression bestimmter JA-responsiver Gene und beeinflussen darüber als positive oder negative Regulatoren JA-vermittelte zelluläre Prozesse (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). So wirkt *MYC2* z. B. als Aktivator der pflanzlichen Wundantwort und Anthocyanbiosynthese, jedoch als Repressor der Tryptophanbiosynthese (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). Die Details der Transkriptionsregulation durch *MYC2* sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Die Aktivierung JA-regulierter Gene erfolgt vermutlich unter Beteiligung des MED25 (*Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25*)-Proteins – einer Untereinheit des für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II essentiellen Mediator-Komplexes (Çevik *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Wie in Punkt 1.1 dargestellt, ist JA/JA-Ile an der Regulation einer Vielzahl pflanzenphysiologischer Prozesse beteiligt. Für die Aufklärung ihrer biologischen Funktionen werden verschiedene Nachweismethoden für Jasmonate genutzt. So ermöglichen verschiedene sensitive chromatographische Methoden, wie z. B. die UPLC-MS/MS (Balcke *et al.* 2012), eine quantitative Gehaltsbestimmung von JA/JA-Ile in pflanzlichen Geweben. Dazu ist die Extraktion des Probenmaterials erforderlich. Dies kann bei einem lokal auf bestimmte Zelltypen beschränkten Anstieg im JA/JA-Ile-Gehalt einerseits zu einer Verdünnung des Phytohormons bis unter die Nachweisgrenze führen, und zum anderen ist eine Analyse des zellspezifischen Auftretens durch den erforderlichen Aufschluss des Probenmaterials nicht möglich. Indirekt lassen sich Jasmonate über die Transkriptakkumulation JA-induzierter Gene, wie z. B. das JA-Biosynthesegen *AOC*, detektieren. Auf diese Weise ist mittels *in situ*-Hybridisierung auch ein gewebespezifischer Nachweis möglich. Allerdings kann aufgrund des indirekten Nachweises nicht zwangsläufig von einem Anstieg des JA/JA-Ile-Gehaltes

ausgegangen werden – eine Induktion der Genexpression durch andere Faktoren könnte gegebenenfalls möglich sein. Viele der biologischen Funktionen von JA/JA-Ile wurden zudem mit Hilfe von Mutanten aufgeklärt, die JA-insensitiv (z. B. *coi1-1*) oder JA-defizient sind (z. B. *aos* und *opr3*) (Devoto & Turner, 2005). Diese stellen wertvolle Werkzeuge zur Identifizierung der Gewebe dar, in denen JA/JA-Ile ihre physiologische Funktion entfalten. Allerdings kann auch dies nur als indirekter Nachweis für ein tatsächliches Auftreten bioaktiver Jasmonate in diesen Geweben angesehen werden.

Um die physiologische und stressrelevante Wirkungsweise von JA/JA-Ile besser zu verstehen, ist es notwendig, ihr räumliches und zeitabhängiges Vorkommen zu untersuchen. Für derartige Lokalisationsstudien sind jedoch Techniken erforderlich, die einen präzisen Nachweis der zell- und gewebespezifischen Verteilung dieses Phytohormons ermöglichen. Solche direkten Nachweismethoden standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zur Verfügung. Die Entwicklung von Methoden, die dies ermöglichen, war Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit. Hierfür wurden drei gegensätzliche, sich jedoch ergänzende Strategien verfolgt:

- (i) Es sollte ein Antikörper generiert werden, der spezifisch an bioaktive Jasmonate bindet. Gleichzeitig galt es zudem, die Fixierung von Jasmonaten in den Zellen zu optimieren um ein Auswaschen von JA/JA-Ile aus dem Gewebe zu verhindern und so den Nachweis in Gewebeschnitten zu ermöglichen.
- (ii) Zum direkten und nicht-invasiven *in vivo*-Nachweis von JA-Ile sollte die Interaktion der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes COI1 und JAZ1 (siehe Punkt 1.2) mittels der Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) visualisiert werden.
- (iii) Aus den Promotoren JA-regulierter Gene sollten JA-responsive *cis*-Elemente (JAREs) selektiert und für die Erzeugung eines JA-spezifischen synthetischen Promotors verwendet werden. Fusioniert mit einem geeigneten Reporter gen sollte dieser für die non-invasive Visualisierung von JA/JA-Ile in Pflanzen verwendet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Laborchemikalien und molekularbiologischen Reagenzien von folgenden Anbietern bezogen:

Antibiotika	Carl Roth, Sigma-Aldrich
Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP-gekoppelt	Chemicon
DNA-Marker	Bioline, Fermentas
Enzyme Restriktionsenzyme, T4-Ligase, Zellulase, Mazerozym, M-MLV <i>reverse Transcriptase</i> (H-), <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP) Gateway [®] BP Clonase [™] II Enzyme Mix, Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzyme Mix, Go Taq DNA Polymerase	Carl Roth, Fermentas, Serva, Promega
Farbstoffe Coomassie-Brillantblau R250, Ethidiumbromid	Carl Roth, Serva
Inhibitoren Proteasominhibitor MG132	Calbiochem
Laborchemikalien und Lösungsmittel	Applichem, Bio&Sell, Carl Roth, Kurt Obermeier GmbH, Merck, Serva, Sigma-Aldrich
Molekularbiologische Kits <i>Sure Clean</i> , <i>Invisorb[®] Fragment Clean-up</i> , <i>Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two Kit</i> , <i>Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity</i> , <i>PureYield[™] Plasmid Midiprep System</i> , <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> , <i>DNeasy[®] Plant Mini Kit</i> , <i>RNeasy[®] Plant Mini Kit</i> , <i>Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System</i>	Bioline, Invitex, Invitrogen, Promega, Qiagen
Nährmedien und Agar für pflanzliche Zellkultur und Bakterienkultur	Carl Roth, Duchefa, Merck, Sigma-Aldrich
kommerziell erwerbliche Phytohormone¹ und Phytotoxine Abscisinsäure (ABA), 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC), Coronatin, Indol-3-Essigsäure (IAA), Salicylsäure (SA)	Sigma-Aldrich
Säulenmaterial Protein A-Agarose, CNBr-Sepharose	Roche, GE Healthcare
Substrate und Reagenzien für Enzymassays 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronid (X-Gluc), D-Luciferin (als Natriumsalz), 4-Methylumbelliferon (4-MU), 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (4-MUG), <i>para</i> -Nitrophenylphosphat (Dinatriumsalz Hexahydrat; pNPP)	Glycosynth, Sigma-Aldrich

¹ 12-Hydroxyjasmonsäure (12-OH-JA), (±)-7-*iso*-Jasmonsäure [(±)-JA], Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile), Jasmonsäuremethylester (JAME) und *cis*-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA) wurden uns freundlicherweise von Dr. R. Kramell und Dr. O. Miersch (IPB Halle) zur Verfügung gestellt.

2.2 Synthetische Oligo- und Polynukleotide

Eine Auflistung der Sequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit genutzten Oligo- und Polynukleotide sowie deren Verwendungszweck befindet sich im Anhang (siehe Punkt 8.1). Alle Nukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

2.3 Vektoren

Eine vollständige Auflistung und Beschreibung aller im Rahmen dieser Arbeit genutzten Vektoren befindet sich in Punkt 8.2 im Anhang.

2.4 Mikrobiologische Techniken

2.4.1 Bakterienstämme und Bakterienanzucht

Mit Ausnahme der *ccdB* (*Control of death B*)-Gen tragenden GATEWAY-Plasmide, deren Amplifikation über chemokompetente *One Shot ccdB Survival™ 2 T1R* Zellen (Invitrogen) erfolgte, wurden zur Vermehrung von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* chemo-kompetente Zellen vom Stamm XL-1 Blue verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht (ü. N.) bei 37 °C als Schüttelkultur (200 rpm) in 5 bis 50 ml LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten jeweils unter Zusatz des erforderlichen Selektionsmarkers (Antibiotikakonzentration 50 mg/ml). Zur Nutzung der Blau-Weiß-Selektion (bei Verwendung von Vektoren, die das *lacZ*-Gen enthielten) wurden die Agarplatten zusätzlich mit 20 µl X-Gal-Lösung (0,5 mg/ml) und 100 µl IPTG-Lösung (100 mM) bestrichen.

Für die stabile und transiente Transformation von Pflanzen wurden transformierte Zellen des elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms LBA 4404 genutzt, deren Anzucht für 2 bis 3 d bei 28 °C unter Zusatz von 50 mg/ml Kanamycin als Flüssigschüttelkultur (200 rpm) in 5 bis 50 ml YEB-Medium bzw. auf YEB-Agarplatten erfolgte.

LB-Medium:

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
<i>Micro Agar</i> (LB-Platten)	15 g/l

YEB-Medium: pH 7,2

Hefeextrakt	1 g/l
Fleischextrakt	5 g/l
Baktopepton	5 g/l
Saccharose	5 g/l
MgSO ₂ * 7 H ₂ O	2 mM
<i>Micro Agar</i> (YEB-Platten)	15 g/l

2.4.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Mandel & Higa (1970). Dazu wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm) von 0,6 inkubiert. Nachdem die Kultur 1 h auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend für 5 min bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert wurden, erfolgte die Resuspension des Pellets in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung. Nach erneuter Zentrifugation

wurden die pelletierten Zellen in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen, zur Bakteriensuspension 2 ml 50%iges Glycerin (v/v) zugegeben und die Zellen zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C eingelagert.

2.4.3 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock (Sambrook & Russel, 1989), wobei pro 50 µl chemokompetenter Zellen 1 bis 5 µl Plasmid-DNA, Ligationsansatz bzw. Gateway-Klonierungsansatz eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Ansätze 20 min auf Eis, 50 s bei 42 °C und 2 min erneut auf Eis inkubiert. Nachdem die Transformationsansätze in 400 bis 600 µl SOC-Medium aufgenommen und 90 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt wurden, erfolgte das Ausstreichen der Zellen auf LB-Agarplatten.

SOC-Medium: pH 7,0

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KaCl	10 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	20 mM
Glucose	20 mM

2.4.4 Herstellung elektrokompeter *A. tumefaciens*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompeter *A. tumefaciens*-Zellen nach Riker *et al.* (1930) wurden 100 ml streptomycinhaltiges (50 mg/ml) YEB-Medium mit 2,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 28 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen 10 min bei 3.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in je 40 ml eiskaltem, zweifachdestilliertem (bidest.) Wasser resuspendiert, erneut abzentrifugiert und zur Resuspension in 20 ml eiskaltem, bidest. Wasser aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 10 ml 10%igem Glycerol (v/v) aufgenommen, vereint, nochmals zentrifugiert und die Zellen abschließend in 1 ml 10%igem Glycerol aufgenommen. Zur Lagerung wurden die *A. tumefaciens*-Zellen zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.5 Transformation elektrokompeter *A. tumefaciens*-Zellen

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte mittels Elektroporation (Mersereau *et al.*, 1990). Dazu wurden 50 µl elektrokompeter Zellen mit 3 µl Plasmid-DNA gemischt und in eine vorgekühlte 0,1 cm-Elektroporationsküvette (BIO-RAD) pipettiert. Anschließend erfolgte die Elektrotransformation mittels *MicroPulser* (BIO-RAD). Die Zellen wurden in 1 ml YEB-Medium aufgenommen, für 3 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert und auf YEB-Agarplatten ausgestrichen.

2.5 Zellkulturtechniken

2.5.1 A. *thaliana*-Zellkultur und Kultivierung

Für die Isolation von Protoplasten wurde eine *A. thaliana*-Suspensionskultur des Ökotyps Columbia (Col-0) genutzt, welche von Dr. J. Lee (IPB Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Die Kultivierung der Zellkultur erfolgte in MS-B5-Medium (Murashige & Skoog, 1962). Dazu wurden im Abstand von 7 d 10 ml der bei 24 °C und 120 rpm in Dunkelheit angezogenen Zellkultur in 30 ml frisches Medium passagiert.

MS-B5-Medium: pH 5,7

MS-Medium mit GamborgB5 Vitaminen	nach Herstellerangaben
2,4-D	1 mg/ml
Saccharose	30 g/l

2.6 Pflanzentechniken

2.6.1 Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

Versuche mit *A. thaliana* wurden vorwiegend mit Pflanzen bzw. Mesophyllprotoplasten aus Blättern des Ökotyps Col-0 durchgeführt. Das Saatgut der wurde uns freundlicherweise von Dr. C. Delker (IPB Halle) zur Verfügung gestellt.

Die Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte auf einem GS90-Vermikulit-Gemisch oder zur Nutzung von Selektionsmarkern in steriler Kultur auf Medium wie nachfolgend beschrieben. Die Anzucht der auf Erde angezogenen Pflanzen erfolgte unter standardisierten Bedingungen in Klimaschränken (Percival, CLF) bei 70 % relativer Luftfeuchte, 22 °C Tagestemperatur, 20 °C Nachttemperatur, $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 8 h (16 h Dunkelheit) unter Kurztagbedingungen. Die Pflanzen wurden mit Leitungswasser nach Bedarf gewässert. Zur Blühinduktion erfolgte vier bis sechs Wochen nach Aussaat ein Wechsel zu Langtagbedingungen mit einer Belichtungsdauer von 16 h (8 h Dunkelheit) bei gleichbleibender relativer Luftfeuchte, Temperatur und Lichtintensität. Zum Abreifen der Samen wurden die Pflanzen in den Klimaschränken belassen und trocken gehalten.

Die Anzucht in steriler Kultur erfolgte auf antibiotikahaltigen (50 mg/ml) MS-Mediumplatten (Murashige und Skoog, 1962) nach Oberflächensterilierung der Samen (Estelle & Somerville, 1987). Dazu wurden diese jeweils 5 min mit 1 ml 70 % Ethanol (v/v) und 1 ml 50 % Natriumhypochlorid (v/v) behandelt und anschließend mit sterilem Wasser gründlich gewaschen. Zwei bis vier Wochen nach Aussaat wurden die selektierten Pflanzen in Erde umgesetzt und wie oben bereits beschrieben, in Klimaschränken weiter kultiviert.

Neben *A. thaliana* wurden *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen verwendet, die im Gewächshaus auf einem GS90-Vermikulit-Gemisch bei einer Tagestemperatur von 25 °C, einer Nachttemperatur von 23 °C, einer Luftfeuchte von 50 %, einer Lichtintensität von 2,2 lx und einer Belichtungsdauer von 16 h (8 h Dunkelheit) kultiviert wurden. Die Anzucht und Pflege von *N. benthamiana* wurde freundlicherweise von den Gärtnern des IPB Halle übernommen.

Weiterhin wurden Versuche mit *Solanum lycopersicum*-Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden zum einen Wildtyp-Pflanzen der Sorte Castlemart und zum anderen die JA-defizienten Mutanten *spr2* (*supressor of prosystemin-mediated response 2*) und *acx1* (*acyl-coA-oxidase 1*) verwendet. Zur Anzucht von Pflanzen dieser drei Genotypen wurden die Samen in mit destilliertem Wasser befeuchtetem feinem Blähton ausgesät und die Töpfe für eine Woche unter standardisierten Bedingungen (Belichtungsdauer 16 h; Lichtintensität $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Luftfeuchte 50 %, Temperatur 28 °C) in eine Phytokammer überführt. Nach Pikieren der Keimlinge wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiter kultiviert (Belichtungsdauer 16 h, Lichtintensität 2,2 lx, Tagestemperatur 25 °C, Nachttemperatur 23 °C, Luftfeuchte 50 %) und zweimal pro Woche eine Düngung mit Long-Ashton-Dünger (100 % Phosphat, 5 ml pro Pflanze) gedüngt. Die Anzucht und Pflege der Tomatenpflanzen wurde freundlicherweise von den Gärtnern des IPB Halle übernommen.

MS-Medium: pH 5,7

MS-Salze	nach Herstellerangaben
Saccharose	10 g/l
Plant Agar	8 g/l

Long-Ashton-Dünger: 100% Phosphat

Makroelemente:

KNO ₃	4,04 g/l
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	9,44 g/l
NaH ₂ PO ₄ x 4 H ₂ O	1,84 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,53 g/l

Mikroelemente:

Lösung A (10 ml/l Makroelementlösung):

MNSO ₄ x 4 H ₂ O	2,23 g/l
CuSO ₂ x 5 H ₂ O	0,25 g/l
ZnSO ₄ x 5 H ₂ O	0,29 g/l
H ₃ BO ₃	3,1 g/l
NaCl	5,9 g/l

Lösung B (1 ml/l Makroelementlösung):

(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ x 4 H ₂ O	0,88 g/l
EDTA-Ferrat	0,22g/l

2.6.2 Techniken zur Pflanzentransformation

2.6.2.1 Transiente Transformation von *N. benthamiana*-Blättern

Für die transiente Transformation von *N. benthamiana* erfolgte in abgewandelter Form nach den Protokollen von Voinnet *et al.* (2003) und Wydro *et al.* (2006). Dazu wurden 5 ml YEB-Medium mit transgenem *A. tumefaciens* inokuliert und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde mit 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) (pH 5,6), 10 mM Glucose und 20 µM Acetosyringon versetzt und erneut über Nacht bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde die OD₆₀₀ der Kultur durch Verdünnen mit einem entsprechenden Volumen YEB-Medium auf 1 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 5 ml abzentrifugiert (10 min; 4.000 rpm; 4 °C), das Pellet in 1 ml YEB-Medium resuspendiert und 2 ml Infiltrationsmedium, 2 ml bidest. Wasser und 200 µM Acetosyringon hinzugegeben. Für Co-Infiltrationsversuche wurden die Zellsuspensionen im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Infiltration der *N. benthamiana*-Blätter erfolgte unter Verwendung einer sterilen, nadellosen 1 ml-Spritze an der Blattunterseite. Die Fläche der Bereiche, in denen die Infiltration erfolgte, wurde dabei so weit reduziert, dass etwa 6 Konstrukte gleichzeitig pro Blatt eingebracht werden konnten. Die infiltrierten Bereiche wurden auf der Blattoberseite markiert und 24 h nach Infiltration verwundet bzw. zur Applikation der Phytohormonlösung geerntet (siehe Punkt 2.6.3).

Infiltrationsmedium:

Saccharose	10 % (w/v)
Glucose	20 mM
MS-Medium (pH 5,7)	8,6 g/l

2.6.2.2 Stabile Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen

Für die stabile Transformation von *A. thaliana* durch *A. tumefaciens* wurden die *floral-dip*-Methode (Clough & Bent, 1998) angewendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben. Um die Ausbildung möglichst vieler Blütenstände zu fördern wurden allerdings die primären Infloreszenzen entfernt. Weiterhin wurden bereits ausgebildete Schoten vor der Transformation abgeschnitten, um das Verhältnis transgener zu nicht-transgenen Samen zu erhöhen.

Für die Pflanztransformation wurde zunächst eine 5 ml-Vorkultur transgener *A. tumefaciens*-Zellen in 25 ml YEB-Medium überführt und bei 28 °C und 200 rpm für 12 bis 16 h bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von $\geq 2,0$ inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend abzentrifugiert (10 min; 3000 rpm; RT), das Pellet in 30 ml YEB-Medium aufgenommen und mit 150 ml einer frisch angesetzten Saccharose-Silwet-Lösung versetzt. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden für 20 s unter leichtem Schwenken in die Bakteriensuspension eingetaucht und für 24 h in einer feuchten, abgedunkelten Kammer liegend inkubiert, anschließend wieder aufgerichtet und bis zur Samenreife, wie oben beschrieben, im Klimaschrank kultiviert.

Saccharose-Silwet-Lösung:

Saccharose	5 % (w/v)
Silwet L-77	0,03 % (w/v)

2.6.3 Hormonapplikation und Verwundung von Pflanzen

Die Applikation von Phytohormonen erfolgte durch Flotieren von ganzen Blättern in wässrigen Phytohormonlösungen [10 µM Coronatin; 50 µM Abscisinsäure (ABA); 50 µM 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC); 50 µM Indol-3-Essigsäure (IAA); 50 µM Salicylsäure (SA); 50 µM 12-Hydroxyjasmonsäure (12-OH-JA); *cis*-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA); 50 µM Gibberillinsäure (GA), 50 µM (±)-Jasmonsäure (JA) und 50 µM Jasmonsäuremethylester (JAME)] über eine definierte Zeitspanne unter Anzuchtbedingungen im Klimaschrank (*A. thaliana*) bzw. im Gewächshaus (*N. benthamiana*).

Zur Durchführung von Verwundungsexperimenten wurden Blätter mit einer Pinzette quer zur Mittelrippe mehrmals gequetscht und nach einer definierten Zeitspanne für die mikroskopische Analyse geerntet.

Parallel zu den Applikations- und Verwundungsversuchen wurden Kontrollexperimente mit unbehandelten bzw. auf Wasser flotierten Blättern durchgeführt.

2.7 Isolation, Transformation und Behandlung von Protoplasten

2.7.1 Isolation und Transformation von Zellkulturprotoplasten

2.7.1.1 Isolation von Protoplasten aus der *A. thaliana*-Zellkultur

Die Isolation von Protoplasten erfolgte in leicht abgewandelter Form nach Dangl *et al.* (1987) aus Zellen 5 d-alter *A. thaliana*-Suspensionskulturen. Dazu wurden die Zellen zunächst 5 min bei 800 rpm und RT abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml 0,24 M CaCl₂ resuspendiert, die Suspension auf zwei große Petrischalen (ø 15 cm) aufgeteilt und jeweils weitere 20 ml 0,24 M CaCl₂ zugegeben. Nachdem jeder Ansatz mit 15 ml der Enzymlösung gemischt wurde, wurden diese für 6 h unter vorsichtigem Schwenken (10 rpm) in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, die Protoplasten 5 min bei 1.000 rpm und RT abzentrifugiert, in je 30 ml 0,24 M CaCl₂ gewaschen, erneut abzentrifugiert und anschließend vorsichtig in je 20 ml B5-Saccharose aufgenommen. Die Suspensionen wurden auf jeweils zwei 15 ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt und 5 min bei 800 rpm und RT zentrifugiert. Bei diesem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zelltrümmer pelletiert, wohingegen die intakten Protoplasten auf der B5-Sucrose schwammen. Letztere wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und gegebenenfalls mit B5-Saccharose auf eine Zellzahl von 8 bis 12 * 10⁶ Protoplasten/ml verdünnt (dies entspricht der optimalen Protoplastenzahl für die Transformation).

2.7.1.2 Transiente Transformation der *A. thaliana*-Zellkulturprotoplasten

Um Zellkulturprotoplasten zu transformieren wurden 100 µl der Protoplastensuspension (8 bis 12 * 10⁶ Protoplasten/ml) mit je 15 µg der zu testenden Plasmid-DNA versetzt. Zur Analyse JA-responsiver *Promotor:GUS*-Konstrukte erfolgte eine Co-Transfektion der Protoplasten mit dem Vektor *pRT100:LUC⁺* (15 µg/Transformationsansatz). Für alle Split-YFP-Analysen wurde eine Co-Transfektion mit dem Kontrollvektor *pEXSG:CFP* (15 µg/Transformationsansatz) vorgenommen. Die Ansätze wurden anschließend mit 300 µl Polyethylenglykol (PEG)-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und unter Ausschluss von Licht für 20 min bei RT inkubiert.

PEG-Lösung: pH 7,0

PEG 6000	25 % (w/v)
Ca(NO ₃) ₂	100 mM
Mannitol	450 mM

2.7.1.3 Ernte der transformierten Zellkulturprotoplasten

Sollten die Protoplasten für biochemische Analysen (siehe Punkt 2.9.2) verwendet werden, wurden zunächst tropfenweise 1 ml und anschließend weitere 4 ml einer 275 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (pH 6,0) zum Transformationsansatz gegeben. Die Protoplasten wurden anschließend 5 min bei 1.000 rpm und RT abzentrifugiert und in 4 ml B5-Saccharose resuspendiert. Für den Vergleich der GUS-Aktivität unbehandelter und mit Coronatin behandelter Protoplasten wurden die Ansätze zu je 2 ml aufgeteilt, für eine Erholungsphase 16 h bei RT im Dunkeln inkubiert und jeweils einer der Parallelansätze mit 10 μM Coronatin versetzt. Der zweite Ansatz blieb unbehandelt. Alle Proben wurden anschließend für weitere 6 h unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Protoplastenernte wurden die Ansätze vorsichtig mit 5 ml 0,24 M CaCl_2 versetzt, 10 min bei 2.500 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand abgossen, die Protoplasten dann mit der restlichen Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 12.000 rpm und RT abzentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur biochemischen Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Sollten die Protoplasten für mikroskopische Analysen genutzt werden (siehe Punkt 2.12), wurden diese nach der Transformation ebenfalls mit 5 ml 275 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (pH 6,0) versetzt und abzentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden dann jedoch in 1 ml B5-Saccharose aufgenommen, für 20 bis 24 h im Dunkeln inkubiert und zur Ernte für 8 min bei 100 x g und RT erneut abzentrifugiert.

Enzymlösung:

in 0,24 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Macerozyme

Zellulase R-10

6 mg/30 ml

200 mg/30 ml

B5-Saccharose: pH 5,5

Gamborg-B5-Medium

2,4-D

Saccharose

nach Hersteller

1 mg/ml

0,28 M

2.7.2 Isolation und transiente Transformation von *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten

2.7.2.1 Isolation von *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten

Die Isolation von Mesophyllprotoplasten aus Blättern von sieben Wochen alten *A. thaliana* Col-0 Wildtyp-Pflanzen wurde in leicht abgewandelter Form nach Yoo *et al.* (2007) durchgeführt. Dazu wurden die Blätter mit einer Rasierklinge in 0,5 bis 1,0 mm breite Streifen geschnitten und in einer Petrischale (\varnothing 8 cm) in Enzymlösung aufgenommen (30 ml Enzymlösung für 15-30 Blätter). Der Ansatz wurde dann für 30 min vakuumfiltriert, in Dunkelheit für 4 bis 6 h inkubiert und anschließend durch ein 100 μM -Nylonnetz filtriert. Der Durchfluss wurde in 3 x 10 ml-Portionen in 12 ml-Kulturröhrchen mit rundem Boden und spezieller Oberflächenbeschichtung zur verbesserten Zelladhäsion (Greiner Bio One) aufgefangen und mit je 10 ml W5-Lösung versetzt. Danach wurden die Protoplasten 1 min bei 200 x g und 4°C abzentrifugiert, in je 2 ml W5-Lösung vorsichtig resuspendiert, 40 min auf Eis inkubiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Die pelletierten Protoplasten wurden anschließend wieder in je 2 ml W5-Lösung aufgenommen, 40 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert und je nach Pelletgröße in 200 bis 600 μl MMg-Lösung aufgenommen. Anschließend erfolgten eine

mikroskopische Auszählung und gegebenenfalls eine Verdünnung der Protoplastensuspension mit MMg-Lösung auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Protoplasten/ml.

<u>Enzymlösung:</u>		<u>W5-Lösung:</u>		<u>MMg-Lösung:</u>	
Zellulase R-10	1,5 % (w/v)	NaCl	154 mM	Mannitol	0,4 M
Pektinase	0,3 % (w/v)	CaCl ₂	125 mM	MgCl ₂	15 mM
Mannitol	0,4 M	KCl	5 mM	MES (pH 5,7)	4 mM
KCl	20 mM	MES (pH5,7)	2 mM		
MES (pH 5,7)	20 mM	Glucose	5 mM		
Inkubation für 10 min bei 55°C					
BSA	0,1% (w/v)				
CaCl ₂	10 mM				

2.7.2.2 Transiente Transformation von *A. thaliana*- Mesophyllprotoplasten

Die Transformation von *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll von Yoo *et al.* (2007). Hierbei wurden je 15 µg der zu testenden Plasmid-DNA zu 100 µl Protoplastensuspension pipettiert, die Ansätze mit 110 µl einer 40%igen (v/v) PEG-Lösung versetzt, gut gemischt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in 440 µl W5-Lösung verdünnt, zentrifugiert (1 min; 200 x g; RT), das Pellet in 100 µl W1-Lösung aufgenommen und die Ansätze für 16 bis 24 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert (siehe Punkt 2.12).

<u>PEG-Lösung:</u>		<u>W1-Lösung:</u>	
PEG 4000	4 g/l	MES	4 mM
NaCl	100 mM	Mannitol	500 mM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	100 mM	KCl	20 mM
Mannitol	200 mM		

2.7.3 Hormonbehandlung von Protoplasten

Für die biochemische Analyse von Zellkulturprotoplasten, die mit JA-responsiven *Promotor:GUS*-Konstrukten transformiert wurden, erfolgte wie in Punkt 2.7.1.3 beschrieben eine Behandlung mit 10 µM Coronatin über 6 h. Für die Untersuchung der JA-induzierten Interaktion der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes für JA-Ile wurden die mit den entsprechenden *Split-YFP*-Konstrukten transformierten Protoplasten 2 h vor der mikroskopischen Analyse mit 30 µM Coronatin versetzt. Die Ansätze zur Untersuchung der nativen Proteine wurden zusätzlich 1 h vor der Analyse mit 10 µM Proteasominhibitor inkubiert, um den Abbau von JAZ1 zu hemmen. Zur Kontrolle wurden in alle Versuche unbehandelte Protoplasten einbezogen.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Hybridisierung komplementärer synthetischer Oligonukleotide

Zur Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Moleküle (dsDNA) wurden die von Eurofins MWG Operon synthetisierten und lyophilisierten einzelsträngigen Oligonukleotide (ssDNA)

in einem adäquaten Volumen STE-Puffer gelöst (Endkonzentration der Oligonukleotide 100 pmol/ μ l). Komplementäre Oligonukleotide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, die Mischung bis zu einer Konzentration von 1 pmol/ μ l mit STE-Puffer verdünnt, anschließend 5 min bei 95 °C inkubiert und langsam bis zum Erreichen der Raumtemperatur über 4 h abgekühlt. Zur Lagerung wurden die hybridisierten Oligonukleotide bei -20 °C eingefroren.

STE-Puffer: pH 8,0

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM

2.8.2 Nukleinsäureisolation aus pflanzlichem Gewebe

2.8.2.1 Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana*-Blättern

Die Isolation genomischer DNA aus Blättern von *A. thaliana* erfolgte entweder nach Herstellerangaben mit dem *DNeasy® Plant Mini Kit* von Qiagen oder unter Anwendung einer Extraktionsmethode, bei welcher 5 mg Blattmaterial mit 200 μ l 1x Extraktionspuffer versetzt, mit einem Pistill direkt im Reaktionsgefäß mechanisch zerkleinert und noch unzerkleinerte Bestandteile durch Zentrifugation (12.000 rpm; 1 min; RT) vom Extrakt abgetrennt wurden. Vom frischen Extrakt wurden 0,5 bis 1 μ l direkt für die PCR eingesetzt (siehe Punkt 2.8.4).

10x Extraktionspuffer:

Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 % (w/v)

1x Extraktionspuffer:

10x Extraktionspuffer 1:10
in TE-Puffer verdünnt

TE-Puffer:

Tris	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

2.8.2.2 RNA-Isolation aus *A. thaliana*-Blättern

Die Isolation von RNA aus Blättern von *A. thaliana* erfolgte mit dem *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.8.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Zum Umschreiben der mRNA in cDNA wurde jeweils 1 μ g Gesamt-RNA mit 1 μ l Oligo(dT)-Primer versetzt, der Ansatz mit bidest. Wasser auf 10 μ l aufgefüllt, 5 min bei 70 °C inkubiert und in Eiswasser überführt. Die Proben wurden mit je 9 μ l frisch angesetztem reverse Transkriptase-Mastermix gemischt und die enzymatische Reaktion unter sukzessiver Erhöhung der Temperatur durchgeführt (10 min bei 40 °C, 50 min bei 42 °C, 15 min bei 70 °C). Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bei -20 °C.

reverse Transkriptase-Masermix:

M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (Promega)	4 μ l
dNTPs (je 2,5 mM)	4 μ l
<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i> , <i>RNase H Minus</i> (M-MLV RT (H-)) (Promega)	1 μ l

2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten zur Klonierung und Sequenzierung erfolgte unter Anwendung des *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen) nach Herstellerangaben (Standard-PCR-Ansatz siehe unten).

Um *Insert*-Fragmente nach der Ligation bzw. der BP- und LR-Reaktion (siehe Punkt 2.8.7) in den entsprechenden Zielvektoren nachzuweisen, wurde eine Kolonie-PCR unter Anwendung der *Go Taq* DNA-Polymerase von Promega durchgeführt. Dazu wurden die auf antibiotikahaltigen Agarplatten gewachsenen *E. coli*-Kolonien direkt in 10 µl PCR-Reaktionsmix überführt. *A. tumefaciens*-Zellen wurden zuvor alkalisch lysiert, indem sie für 5 min bei 37 °C in 10 µl einer 20 mM NaOH Lösung inkubiert wurden. Von dem Lysat wurde anschließend 1 µl für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Alle PCR-Reaktionen wurden im Eppendorf *Mastercycler® PCR Cycler* nach dem entsprechenden Standardprogramm durchgeführt.

<u>Platinum PCR-Reaktionsmix: (50 µl)</u>		<u>Go Taq-PCR-Reaktionsmix: (10 µl)</u>	
<i>Platinum® PCR SuperMix High Fidelity</i>	45 µl	bidest. Wasser	6,15 µl
<i>forward</i> Primer (200 nM)	1 µl	5x <i>Go Taq®</i> Flexi Puffer	2 µl
<i>reverse</i> Primer (200 nM)	1 µl	dNTPs (5 mM)	0,4 µl
DNA-template (1 bis 200 ng)	3 µl	<i>forward</i> Primer (5 bis 50 µM)	0,2 µl
		<i>reverse</i> Primer (5 bis 50 µM)	0,2 µl
		<i>Go Taq®</i> DNA-Polymerase	0,05 µl

Standard-PCR-Programme:

Reaktionsschritt	Platinum PCR-Programm:	Go Taq-PCR-Programm:
initiale Denaturierung	95 °C / 5 min	94 °C / 2 min
Denaturierung	95 °C / 30 s	94 °C / 30 s
<i>Annealing</i> der Primer	T _m Primer/ 30 s	55 °C bzw. T _m Primer/ 30 s
Elongation	72 °C / 1 min pro kb	68 °C / 1 min pro kb

30 bis 35 Zyklen		

finale Elongation	72 °C / 2 min	keine
Kühlung	4 °C / ∞	4 °C / ∞

2.8.5 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion und Dokumentation von frisch isolierter RNA, von PCR-Produkten und von mit Restriktionsendonukleasen (REN) geschnittener Plasmid-DNA erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (je nach Fragmentgröße 1 bis 3 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer) unter Verwendung des DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) unter UV-Licht am *BioDocAnalyzer*-Geldokumentationssystem (Biometra).

1x TAE-Puffer:

Tris	40 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
Essigsäure	1 % (v/v)

2.8.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die für die Klonierung und Sequenzierung amplifizierten DNA-Fragmente wurden direkt im Anschluss an die PCR mit der Bionline *Sure Clean*-Lösung wie vom Hersteller angegeben aufgereinigt.

Mit REN geschnittene Plasmid-DNA wurde zur Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.8.5) und unter Verwendung des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* von Promega wie im Herstellerprotokoll angegeben aus dem Agarosegel isoliert.

2.8.7 Klonierungstechniken

2.8.7.1 „A-T“-Klonierung

Die Ligation von PCR-Produkten und dsDNA-Oligonukleotiden in den linearisierten Eingangsvektor pGEM®-T Easy (Promega) erfolgte unter Zuhilfenahme der Thymin-Überhänge (T-Überhänge) an den 3'-Enden des Vektors. Diese können mit den bei der PCR von der *Taq*-Polymerase generierten Adenosin-Überhängen (A-Überhänge) bzw. mit den A-Überhängen der hybridisierten Oligonukleotide interagieren und anschließend von der T4-Ligase verknüpft werden. Die Ligationsansätze wurden dazu über Nacht bei 4 °C inkubiert.

„A-T“ Ligationsansatz: (10µl)

2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	5 µl
pGEM®-T Easy (50 ng)	1 µl
DNA-Fragment	3 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

2.8.7.2 Konventionelle Klonierung mit Restriktionsendonukleasen (REN)

Neben der „A-T-Klonierung“ wurden Klonierungsreaktionen unter Verwendung von REN durchgeführt. Hierbei wird das mittels Restriktion aus einem *Donor*-Vektor freigesetzte DNA-Insert von der T4-Ligase mit dem ebenfalls durch Restriktion linearisierten Zielvektor ligiert. Die Hybridisierung von *Insert* und Zielvektor wird dabei über die durch die REN erzeugten kohäsiven Enden vermittelt.

Die Ligation geschnittener DNA-Moleküle erfolgte entweder ohne vorherige Gelaufreinigung der mit REN geschnittenen DNA-Fragmente oder im Anschluss an eine Gelaufreinigung der DNA-Fragmente wie in Punkt 2.8.6 beschrieben. Um bei einer Ligation nicht aufgereinigter DNA-Fragmente die Re-Ligation der freien *Insert*-Moleküle in den *Donor*-Vektor zu verhindern, wurde dieser mit einer weiteren REN im Vektorrückgratbereich zerschnitten. Die eingesetzten REN wurden anschließend mittels Hitzeschock inaktiviert (je nach Enzym 5 bis 10 min bei 65 bis 80 °C) und die DNA-Enden des geschnittenen Vektors mit der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, 1 µl/20 µl Ansatz, 30 min bei 37 °C) dephosphoryliert. Die enzymatische Verknüpfung von *Insert* und Zielvektor erfolgte mittels T4-Ligase bei 4 °C über Nacht.

Ligationsansatz ohne Aufreinigung der DNA: (25 µl)

unaufgereinigte <i>Insert</i> -DNA	5 bis 15 µl
unaufgeinigter Zielvektor	5 bis 15 µl
10x T4 DNA Ligase-Puffer	2,5 µl
T4-Ligase	2,5 µl

Ligationsansatz mit gereinigter DNA: (20 µl)

Insert-DNA	< 15 µl
Zielvektor (50 ng)	1 µl
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl

2.8.7.3 Klonieren mit dem Gateway-System

Die *Gateway*-Klonierungstechnik von Invitrogen (www.invitrogen.com) basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Hierbei erfolgt die Integration der Phagen-DNA in das Wirtsgenom mittels sequenzspezifischer Rekombination zwischen homologen DNA-Abschnitten, den *attachment (att)*-Stellen des Phagen (*attP*) und des Wirtsbakteriums (*attB*). Beide *att*-Stellen rekombinieren bei dieser BP-Reaktion zu den *attR*- bzw. *attL*-Stellen, welche für die als LR-Reaktion bezeichnete Freisetzung des Phagen-genoms aus dem Wirtsgenom notwendig sind. Sowohl die BP-, als auch die LR-Reaktion werden durch eine Klonase katalysiert. Durch die Integration der entsprechenden *att*-Stellen in PCR-Produkte und Vektoren wird dieses sequenzspezifische Rekombinationssystem für eine schnelle und gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten genutzt (Hartley *et al.*, 2000).

Um DNA-Fragmente zu generieren, die mit den *attP*-Stellen des Eingangsvektors pDONR®221 rekombinieren konnten, wurden bei der PCR *attB*-Stellen-tragende Primer verwendet und auf diese Weise den zu klonierenden DNA-Fragmenten die *attB*-Stellen angehängen. Der BP-Klonierungsansatz wurde 1 h bei RT inkubiert, und die Reaktion durch Zusatz von 1 µl Proteinase K und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C abgestoppt. Nach Vermehrung der Eingangsvektoren in *E. coli* (siehe Punkt 2.4.1) erfolgte die Umklonierung des *attL*-Stellen-tragenden *Insert*-Moleküls aus dem Eingangsvektor in einen *attR*-Stellen-tragenden Zielvektor (siehe Anhang 8.1) mittels LR-Reaktion. Die Durchführung der LR-Reaktion mit dem LR-Klonierungsansatz erfolgte analog zum BP-Klonierungsansatz.

Sowohl Eingangs- als auch Zielvektoren besitzen vor der Rekombination das letale *ccdB*-Gen, das im Verlauf der Rekombination gegen das zu klonierende DNA-Fragment ausgetauscht wird. Das CcdB-Protein, für das das *ccdB*-Gen kodiert, wirkt in *E. coli* als Gyrasehemmer (Bahassi *et al.*, 1999). Daher werden Klone, die nach der BP- bzw. LR-Reaktion noch das *ccdB*-Gen und nicht das Zielgen tragen, über die toxische Wirkung des *ccdB*-Genproduktes ausselektiert.

Da sich *JAZ1* nicht mittels BP-Reaktion in den Eingangsvektor klonieren ließ, erfolgte die Klonierung dieses Konstruktes mit Hilfe des TOPO-*Cloning*-Systems in den *attB*-Stellen tragenden und somit *Gateway*-kompatiblen Eingangsvektor pENTR/SD/D/TOPO (www.invitrogen.com). Von diesem Eingangsvektor erfolgte die weitere Klonierung in die Zielvektoren wie beschrieben mittels LR-Reaktion.

BP-Klonierungsansatz:

<i>attB</i> -PCR-Produkt (150 ng)	1 µl
pDONOR®221 (150 ng)	1 µl
TE-Puffer	6 µl
BP-Klonase	2 µl

LR-Klonierungsansatz:

Eingangsvektor (150 ng)	1 µl
Zielvektor (150 ng)	1 µl
TE-Puffer	6 µl
LR-Klonase	2 µl

TOPO-Cloning-Ansatz:

PCR-Produkt	5,5 µl
Salzlösung	1 µl
pENTR/SD/D/TOPO	0,5 µl

2.8.8 Plasmidpräparation

Je nach benötigter Plasmidmenge erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Kulturen mittels Minipräparation (5 ml Kultur; ca. 20 µg Plasmid-DNA) unter Verwendung des *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen oder des *Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit* von Invitex bzw. mittels Midipräparation (50 ml Kultur; ca. 100 µg Plasmid-DNA) unter Nutzung des *PureYield Plasmid Midiprep System* von Promega. Alle Plasmidisolationen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Aufkonzentration von mittels Midipräparation isolierter Plasmid-DNA erfolgte durch ethanolische Fällung. Dazu wurde die DNA mit 3 M Natriumacetat-Lösung (1/10 Volumen) und 96 % Ethanol (3-faches Volumen) versetzt, die Ansätze über Nacht bei -80 °C inkubiert, die DNA durch Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 12.000 rpm) pelletiert und in 50 bis 80 µl sterilem Wasser resuspendiert.

2.8.9 Restriktion von DNA-Fragmenten

Die Restriktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit *Fast Digest*-REN von Fermentas. Für eine Restriktion wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA und 1 U REN eingesetzt, die Restriktionsansätze wurden 15 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und die Enzyme anschließend thermisch inaktiviert (je nach REN für 5 bis 10 min bei 65 bis 80 °C und 300 rpm).

Restriktionsansatz: (20 µl)

1x <i>Fast Digest Green</i> -Puffer	2 µl
Plasmid-DNA (1 µg)	≤ 16 µl
<i>Fast Digest</i> -REN (1 U)	je REN 1 µl
bidest. Wasser	add 20 µl

2.9 Analytische und biochemische Methoden**2.9.1 Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidaseaktivität**

Der Nachweis der β-Glucuronidase (GUS)-Aktivität in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte mit Hilfe eines histochemischen GUS-Assays nach Blume & Grierson (1997). Dazu wurden die zuvor auf Wasser bzw. 50 µM JA-Lösung flotierten Blätter (siehe Punkt 2.6.3) mit 2 ml Fixativ versetzt, 10 min vakuumfiltriert und für 30 min im Fixativ inkubiert. Die Blätter wurden anschließend mehrfach mit 1 ml 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und nach kurzer Vakuuminfiltration für 16 h bei 37 °C in je 2 ml Färbelösung inkubiert. Abschließend wurde das Chlorophyll durch Behandlung mit 70 % (v/v) Ethanol aus den Blättern ausgewaschen und die Färbung der Präparate mit einer Kamera dokumentiert.

<u>Fixativ:</u>		<u>Färbelösung:</u>	
Formaldehyd	0,3 % (v/v)	Tris-HCl	100 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaCl	50 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
		Triton X-100	0,5 % (v/v)
		Sarcosin	0,2 % (w/v)
		K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,1 mM
		K ₄ [Fe(CN) ₆]	0,1 mM
		X-Gluc	2 mM

2.9.2 Bestimmung der relativen GUS-Aktivität in Protoplasten

Zur Bestimmung der relativen GUS-Aktivität wurden die bei -80 °C gelagerten Protoplasten zunächst für eine Proteinextraktion 10 min auf Eis aufgetaut, mit 140 bis 180 µl GUS-Extraktionspuffer versetzt, gevortext, 10 min auf Eis inkubiert, erneut gevortext, 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit diesem Rohextrakt wurde anschließend die quantitative Bestimmung der GUS- und Luciferase (LUC)-Aktivitäten, sowie eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe unten).

GUS-Extraktionspuffer:

NaH ₂ PO ₄ (pH7,0)	50 mM
EDTA (pH 7,0)	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)

2.9.2.1 Quantitative Bestimmung der LUC-Aktivität

Zur Bestimmung der LUC-Aktivität wurden zu 10 µl Rohextrakt 100 µl LUC-Reagenz zugesetzt, der Ansatz kurz geschüttelt und die Probe mit einem Luminometer (Lumat LB 9591; Berthold) in Zweifachbestimmung vermessen (Kroj *et al.*, 2003).

LUC-Reagenz:

Tricin	20 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	15 mM
ATP	5 mM
BSA	0,5 mg/ml
Luciferin (frisch zugesetzt)	0,5 mM

2.9.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden 5 µl des Rohextraktes in 96-Well-Mikrotiterplatten (Roth) mit 200 µl Bradford-Lösung gemischt und nach 5 min Inkubation die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (Spektrometer Tecan-Sunrise; Tecan Group). Die Messung erfolgte mit drei technischen Replikaten. Die Quantifizierung des Proteingehaltes wurde unter Einbezug einer Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA; 0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; 3 mg/ml) durchgeführt.

Bradford-Lösung:

Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio Rad)	65 mg
Methanol	50 ml
unter Wärmezufuhr lösen	
dest. Wasser	500 ml
85%ige H ₃ PO ₄	100 ml
mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen	
Reagenz durch Faltenfilter in braune Flasche filtrieren	

2.9.2.3 Quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität

Die Quantifizierung der GUS-Aktivität in Protoplasten erfolgte wie von Kroj *et al.* (2003) beschrieben. Dazu wurden in Dreifachbestimmungen 25 µl Rohextrakt mit 225 µl Reaktionspuffer gemischt und je 50 µl des Reaktionsansatzes nach 0 min, 60 min und 120 min Inkubationszeit (300 rpm, 37 °C) zu 950 µl Stopplösung gegeben. Zur spektrometrischen Messung der Fluoreszenz des durch enzymatische Hydrolyse aus dem Substrat 4-MUG gebildeten Fluorochroms 4-MU wurden 200 µl der abgestoppten Reaktionslösung in 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One) pipettiert und mit dem CytoFlorII-Plattenleser (Perspective Biosystems) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm vermessen. Die quantitative Auswertung erfolgte unter Einbeziehung einer 4-MU-Eichreihe (0 µM; 2 µM; 5 µM; 10 µM). Die Angabe der relativen GUS-Aktivität erfolgt in der SI-Einheit pmol * mg⁻¹ Protein * s⁻¹. Für die Berechnung der relativen GUS-Aktivität wurde für jede Probe zunächst die quantitative GUS-Aktivität wie auch die LUC-Aktivität jeweils zum Proteingehalt ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde die GUS-Aktivität auf die LUC-Aktivität bezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit MS Office. Die Mittelwerte wurden mittels Student-t-Test auf Signifikanz geprüft. Signifikante Unterschiede wurden mit P ≤ 0,05 definiert.

Reaktionspuffer:

4-MUG 1 mM
in GUS-Extraktionspuffer

Stopplösung:

Na₂CO₃ 0,2 M

2.9.3 Indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis des Anti-JA-Antikörpers (Anti-JA-AK) im Kaninchenserum und in den nach Aufreinigung und Dialyse erhaltenen AK-Fraktionen (siehe Punkt 2.10.3) erfolgte mit einem indirekten Immunoassay. Hierbei wurde das AG an ELISA-Platten (Nunc *Maxisorp*-Platten) gebunden. Dazu wurden je nach Versuch 0,1 bis 0,02 µg JA-BSA-Konjugat pro Well verdünnt in 1x PBS-Puffer genutzt. Die Lösungen wurde nach 12 h Inkubation verworfen, die Platte dreimal mit PBST-Puffer gewaschen und freie Bindestellen der ELISA-Platten mit 3 % (w/v) BSA in PBST-Puffer (100 µl/Well) für 4 h bei 25 °C blockiert. Nach Entfernen des Blockreagenz und dreimaligem Waschen mit PBST-Puffer wurden entsprechende Verdünnungen der zu testenden AK-Lösung zugegeben (100 µl/Well; Verdünnung in 3 % (w/v) BSA/PBST-Puffer). Die Ansätze wurden 1 h bei 25 °C inkubiert, der primäre AK anschließend verworfen und die Platten dreimal mit PBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der Anti-JA-AK erfolgte

nachfolgend mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-Fc-spezifischen AK (0,6 mg/ml), der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war (100 µl/Well; 1:2.000 verdünnt in 3 % BSA/PSBT). Nach einstündiger Inkubation bei 25 °C wurde der sekundäre AK verworfen, die Platte erneut mit PSBT- und 1x PBS-Puffer gewaschen und für 1 h bei 37 °C mit 100 µl/Well Substratlösung (1 mg pNPP/ml Substratlösung) inkubiert. Abschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei 405 nm (Tecan-Sunrise; Tecan Group).

<u>1x PBS -Puffer: pH7,4</u>		<u>PBST-Puffer: pH 7,4</u>		<u>Substratpuffer: pH 9,8</u>	
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM	Diethanoalamin	97 ml
Na ₂ HPO ₄	8 mM	Na ₂ HPO ₄	8 mM	MgCl ₂	0,1 g
KH ₂ PO ₄	2 mM	KH ₂ PO ₄	2 mM	NaN ₃	0,2 g
		Tween20	0,1 % (v/v)		

2.9.4 Indirekter, kompetitiver *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (kompetitiver ELISA)

Die Charakterisierung der gereinigten Anti-JA-AK-Fraktionen hinsichtlich der Bindungseigenschaften für verschiedene AGs erfolgte mit der Methode des kompetitiven ELISA. Zur AG-Beschichtung wurde das JA-BSA-Konjugat in die Wells der ELISA-Platte gegeben (0,02 µg JA-BSA-Konjugat/Well verdünnt in 1x PBS-Puffer; siehe Punkte 3.2.2) und ü. N. bei 25 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die ELISA-Platte zum Blockieren freier Bindungsstellen für 4 h bei 25 °C mit 3 % (w/v) in BSA/PBST-Puffer (100 µl/Well) abgesättigt. Parallel dazu erfolgte außerdem die Absättigung der aktiven Bindungsstellen auf der Oberfläche einer unbeschichteten 96-Well-Platte (Roth). In den Wells dieser sogenannten Masterplatte wurden 50 µl des zu testenden AK in der entsprechenden Verdünnung (siehe 3.2.3.1) mit 50 µl des zu testenden freien AG vorinkubiert. Dazu wurde der AK bei gleichbleibender Konzentration mit von Well zu Well steigenden Konzentrationen (21 Konzentrationen im Konzentrationsbereich von 0 µM bis 450 µM) an freiem AG gemischt, und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Mit einer Multipipette wurden anschließend 90 µl der AK-AG-Mischungen aus den Wells der Masterplatte in die Wells der geblockten ELISA-Platte überführt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Lösungen wurden danach verworfen, die Platte dreimal mit PBST-Puffer gewaschen und 90 µl/Well eines alkalische Phosphatase-gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-Fc-spezifischen-AK (0,6 mg/ml) zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationphase (25 °C) wurde die AK-Lösung verworfen, die Platte erneut gewaschen (dreimal mit PBST- und dreimal mit 1x PBS-Puffer) und je Well 90 µl der Substratlösung für das Enzym (1 mg/ml pNPP) zugegeben. Diese wurde zur enzymatischen Bildung des gelben Reaktionsproduktes für 1 h bei 37 °C in den Wells belassen und anschließend die OD₄₀₅ photometrisch bestimmt. Die Darstellung und Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte wie beschrieben (Marciel, 1985; Huang *et al.*, 1996; Micheli *et al.*, 2002) und wurde unter Verwendung der SigmaPlot-Software (Systat Software Inc) vorgenommen. Die Angleichung der sigmoiden Kurven und Berechnung der IC₅₀-Werte (siehe 3.2.2) aus den Kurvenverläufen erfolgte dabei wie in genannter Literatur angegeben unter Anwendung der 4-Parameter-logistischen-(4PL)-Regression.

2.10 Herstellung eines Anti-JA-Antikörpers in Kaninchen

2.10.1 Herstellung eines JA-BSA-Konjugates

Die Kopplung von JA und BSA erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Kramell (IPB Halle) wie von Knöfel *et al.* (1984) beschrieben unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC). Hierzu wurden 0,05 mM (\pm)-JA in 175 μ l Tetrahydrofuran und 50 μ l DMF gelöst, die Lösung mit 78,2 μ M EDC-HCl (gelöst in 0,2 M Tris; pH 5,5) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die JA-Lösung in 0,1 ml-Portionen zu 1,7 ml einer BSA-Lösung gegeben, der Ansatz 2 h bei RT unter Rühren inkubiert und über Nacht bei 4 °C weiter gerührt.

Zur Abtrennung nicht kovalent gebundener JA bzw. von EDC-Harnstoff wurde die JA-BSA-Lösung in einen Dialyseschlauch (Carbon Union) überführt und bei 4 °C zunächst für 3 h gegen 100 ml 0,1 M Tris (pH 5,5) und dann für 1 h gegen 100 ml H₂O dialysiert. Anschließend folgten vier weitere Dialysezyklen alternierend gegen jeweils 250 ml 0,1 M Natriumboratpuffer (pH 8,5) und bidest. Wasser. Nach abgeschlossener Dialyse wurde das JA-BSA-Konjugat aus dem Dialyseschlauch in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, der Niederschlag abzentrifugiert (10.000 rpm 1 min RT) und das gewonnene Konjugat aliquotiert, mit Glycerol (1:1, v/v) versetzt und bei -20 °C gelagert.

BSA-Lösung: pH 5,5

BSA 15,53 mg/ml

in 0,2 M Tris-Puffer (pH 5,5)

2.10.2 Immunisierung von Kaninchen mit dem JA-BSA-Konjugat

Zur Generierung von polyklonalen Anti-JA-AKs wurden zwei Kaninchen subkutan mit 500 μ g JA-BSA-Konjugat immunisiert. Die *Booster*-Immunisierungen erfolgten fünf und elf Wochen nach der Erstimmunisierung durch Injektion von jeweils 300 μ g des Konjugates. Weitere 10 d nach der letzten Immunisierung wurde der Serumtiter im indirekten ELISA (siehe Punkt 2.9.4) kontrolliert und die Seren drei Wochen nach der letzten Injektion geerntet, zu 5 ml-Portionen aufgeteilt und bei -20 °C eingelagert. Für die weiteren Versuche wurde das Serum des Tieres verwendet, welches bei der Titerkontrolle die höchste Avidität zu JA aufwies. Sowohl die Immunisierung der Kaninchen, als auch die Titerkontrolle und Ernte der Seren erfolgte durch Dr. U. Conrad (IPK Gatersleben).

2.10.3 Aufreinigung des Anti-JA-Antikörpers aus dem Kaninchenserum

2.10.3.1 Protein A-Affinitätschromatographie zur Reinigung der Immunglobulin G-Fraktion (IgG) aus Kaninchenserum

Die Aufreinigung der IgG-Immunglobuline aus dem Kaninchenserum erfolgte in abgewandelter Form nach Ey *et al.* (1978) mit der Methode der Protein A-Affinitätschromatographie. Protein A ist ein bakterielles Oberflächenprotein aus *Staphylococcus aureus*, welches mehrere Bindungsstellen für den Fc-Teil von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) aufweist

(Hober *et al.*, 2007). Die Bindungsaffinität von Protein A zu IgG-Molekülen ist pH-abhängig, somit reversibel und kann daher für eine Reinigung von polyklonalen AKs aus Seren verwendet werden.

Für die Affinitätsreinigung wurden 2,5 ml Protein A-Agarose der Firma Roche in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt, bei RT sedimentiert und der Puffer abgenommen. Die Agarose wurde anschließend zweimal mit 8 ml 1x PBS-Puffer gewaschen, nach dem letzten Sedimentieren in 3 ml 1x PBS-Puffer aufgenommen, mit 5 ml Kaninchenserum gemischt und unter Rühren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine Chromatographiesäule von Qiagen überführt und sukzessiv mit insgesamt 50 ml 1x PBS-Puffer gewaschen. Die Elution der AKs erfolgte mit 20 ml Elutionspuffer wobei das Eluat in 1 ml Fraktionen aufgefangen wurde. Alle Fraktionen wurden sofort mit 1 M Tris-Puffer (pH 7,9) neutralisiert und in der Verdünnungsstufe 1:10 im indirekten ELISA (Plattenbeschichtung mit 0,1 µg JA-BSA-Konjugat/Well) auf die Präsenz von AKs getestet. Die antigenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Dialyse durch Überführen in einen Dialyseschlauch (*Spectra/Por 2 RC Dialysis Membrane Tubing*, MWCO 12000-14000) und das Einlegen des Schlauches für ca. 10 min in festes PEG 6000 aufkonzentriert. Abschließend erfolgte die Entsalzung der AK-Lösung durch einen weiteren 16-stündigen Dialyseschritt in einer *Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2* MWCO 8000-10000-Dialysemembran gegen 1x PBS-Puffer (mehrmals ausgetauscht) bei 4 °C. Nach Entnahme der AK-Lösung aus dem Dialyseschlauch wurde diese aliquotiert und bei -20 °C eingelagert.

Elutionspuffer: pH 2,2

Glycin	0,1 M
NaCl	0,1 M

2.10.3.2 Immunoaffinitätschromatographie zur spezifischen Reinigung des polyklonalen Anti-JA-AKs aus Kaninchenserum

Um den polyklonalen Anti-JA-AK aus dem Gesamt-IgG zu separieren, erfolgte die Aufreinigung des Kaninchenserums mit der Methode der Immunoaffinitätschromatographie, welche auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung zwischen Antikörper und AG beruht. Für die Durchführung musste das JA-BSA-Konjugat an Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose immobilisiert werden (Page & Thorpe, 2009). Dazu wurden 2 ml (etwa 4 mg) Konjugatlösung in einen Dialyseschlauch (*SERVAPOR®*-Dialyseschlauch, MWCO 12000-14000; Serva) überführt und für ca. 16 h bei 4 °C unter Rühren gegen *Coupling*-Puffer dialysiert (Puffer wurde dabei mehrmals ausgetauscht). Es wurden 0,5 g CNBr-aktivierte Sepharose (Sigma-Aldrich) abgewogen, zum Quellen für 20 min in 10 ml 1 mM HCl inkubiert und auf einer Glasfritte mit 200 ml 1 mM HCl und anschließend mit 200 ml *Coupling*-Puffer gewaschen. Danach wurde die Sepharose in 10 ml *Coupling*-Puffer equilibriert, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt, mit dem dialysierten JA-BSA-Konjugat versetzt und das Gemisch über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Konjugat-Sepharose-Gemisch erneut auf eine Fritte überführt, mit 10 ml *Coupling*-Puffer

gewaschen und in 7 ml 0,2 M Glycin (in *Coupling*-Puffer) aufgenommen. Die Lösung wurde in 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 2 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Der Inhalt des Röhrchens wurde erneut auf eine Fritte überführt, sukzessiv mit 20 ml Acetatpuffer, 20 ml Tris-Puffer, 80 ml *Coupling*-Puffer und 80 ml 1x PBS-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde in 1x PBS-Puffer aufgenommen, in eine Chromatographiesäule von Qiagen überführt und mehrfach mit 1x PBS-Puffer gespült. Nachdem der PBS-Puffer vollständig durch die Säule gelaufen war, wurden 2 ml Kaninchenserum auf die Säule aufgetragen, der Säulinhalt anschließend in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurde die Sepharose wieder in die Säule überführt, die Säule mit 40 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und mit 10 ml Elutionspuffer eluiert, wobei der Durchfluss in 1 ml-Fractionen getrennt aufgefangen wurde. Die einzelnen Fractionen wurden wie oben beschrieben im indirekten ELISA auf die Präsenz von Antikörpern getestet, vereinigt und mittels Dialyse eingengt und entsalzt.

Coupling-Puffer: pH 8,3

NaHCO ₃	0,1 M
NaCl	0,5 M

Acetatpuffer: pH 4,0

Natriumacetat	0,1 M
NaCl	0,5 M

Tris-Puffer: pH 8,0

Tris	0,1 M
NaCl	0,5 M

2.11 Fixierung, Einbettung und Immunmarkierung von *S. lycopersicum*-Blättern

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte der generierte polyklonale Anti-JA-AK für den immunhistochemischen Nachweis von JA in Blättern von *S. lycopersicum* verwendet werden. Die Etablierung der nachfolgend angegebenen Methodenprotokolle für die Fixierung, Einbettung und Immunmarkierung des biologischen Materials erfolgte in Zusammenarbeit mit S. Forner (IPB Halle) im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

2.11.1 Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger, auf die die Semidünnschnitte des biologischen Probenmaterials für eine Immunmarkierung später überführt werden sollten, wurden zunächst mit Ethanol (30 min Einwirkzeit) gesäubert, mit einem fusselfreien Tuch getrocknet und anschließend mit je 60 µl 0,1 % (w/v) Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurde über jeden der Objektträger ein zweiter Objektträger so platziert, dass sich die Lösung gleichmäßig und luftblasenfrei dazwischen verteilte. Anschließend wurden die präparierten Objektträger für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert, dreimal 5 min mit H₂O gewaschen und anschließend bei RT getrocknet.

2.11.2 Fixierung und Einbettung von Blattmaterial

Von dem zu analysierende Blattmaterial wurden mit einem Skalpell kleine Stücke (etwa dreimal 3 mm) entnommen und sofort in mit Fixativ (4 % [v/v] EDC in PBS-Puffer) gefüllte Gläschen überführt. Für die Positivkontrolle mit aktivierter JA (siehe Punkt 3.2.3.2) wurde das Fixativ vor der Probenfixierung für 30 min mit JA inkubiert. Anschließend wurde das

Fixativ mittels Vakuuminfiltration in die Blattstücke eingebracht. Nach der Infiltration wurden die Proben für 2 h bei RT im Fixativ inkubiert, die Blattstücke anschließend zweimal für 15 min mit PBS-Puffer gewaschen und danach in Ethanol wie folgt dehydriert: 10 % Ethanol (30 min), 30 % (60 min), 50 % (60 min), 70 % (ü. N. bei 4 °C), 90 % (30 min) und 100 % (2x 30 min). Anschließend wurden die Blattstücke bei 50 °C wie folgt mit Polyethylenglycol 1500 (PEG 1500) infiltriert: 25 % PEG in Ethanol (60 min), 50 % PEG in Ethanol (60 min), 75 % PEG in Ethanol (60 min) und 100 % PEG (2x 60 min). Die Proben wurden zur Einbettung in eine Silikonform gegeben und abschließend zum Aushärten ü. N. bei RT belassen.

2.11.3 Anfertigen von Semidünnschnitten

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM325, Microm) wurden von dem eingebetteten Probenmaterial Semidünnschnitte (mit 3 bis 5 µm dick) angefertigt. Die Schnitte wurden mittels der Methode des „hängenden Tropfens“ auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger überführt. Dazu wurde eine zuvor mit 45 % (w/v) PEG 6000 in PBS-Puffer beladene Drahtöse verwendet.

2.11.4 Immunmarkierung

Die Objektträger mit den Schnitten wurden zur Entfernung des PEG 10 min in PBS inkubiert. Um freie Aldehyde zu blockieren, wurden die Schnitte für 5 min in 0,1 M NH₄Cl (in PBS-Puffer) inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen (5 min). Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit 5 % (w/v) BSA (in PBS) für 60 min. Anschließend erfolgte die Immunmarkierung mit dem primären Anti-JA-AK. Dazu wurde dieser 1:1.000 in BSA/BSA_{acet}-PBS (5 % BSA [w/v] und 1 % [w/v] BSA_{acet}, Biotrend Chemikalien GmbH) ü. N. bei 4 °C inkubiert. Um Negativkontrollen zu generieren, wurden zusätzlich 8 µg/ml JA-BSA-Konjugat mit in die AK-Lösung geben und das Gemisch für 30 min vorinkubiert (siehe Punkt 3.2.3.2). Anschließend wurden die Objektträger 3x 10 min mit 0,1 % (w/v) BSA in PBS-Puffer und 1x 10 min 1 % BSA in PBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären AK (Alexa Fluor 488-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-AK (Invitrogen 1:500 in 5 % (w/v) BSA-PBS) erfolgte bei 37 °C für 2 h in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger viermal 10 min mit PBS-Puffer gewaschen und mit dem Anti-Fading-Reagenz Citiflour (Agar Scientific) eingedeckelt.

2.12 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Zur mikroskopischen Analyse von infiltrierten und in Phytohormonlösung flotierten *N. benthamiana*-Blättern wurden ca. 1 cm große Blattscheiben ausgestochen und am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z.1 (Carl Zeiss) unter Verwendung von GFP-spezifischen Filtern (Anregung BP 470/40; Strahlenteiler FT 485; Emission BP 525/50) analysiert. Die

Dokumentation erfolgte mit der Kamera AxioCam MRm und der Software AxioVision (Carl Zeiss).

Die Lokalisationsanalysen mit YFP-Fusionsproteinen und die Split-YFP-Analysen in transient transformierten Protoplasten erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 bzw. LSM 510 (Zeiss) unter Nutzung der Anregungswellenlängen 514 nm (YFP) und 458 nm (CFP) und des Detektionsbereichs bei 515 bis 550 nm (YFP) und 470 bis 510 nm (CFP). Die Dokumentation erfolgte mit der LSM-Software (Carl Zeiss).

Die mikroskopische Analyse der immunmarkierten *S. lycopersicum*-Blätter erfolgte ebenfalls am Axio Imager Z.1 (Carl Zeiss) unter Verwendung des entsprechenden Filtersatzes (Anregung BP450/90; Strahlenteiler FT 510; Emission LP 515). Die Dokumentation erfolgte mit der Kamera AxioCam MRc5 und der Software AxioVision (Carl Zeiss).

2.13 *In silico*-Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Gewinnung und/oder Auswertung von Nukleotid- oder Proteinsequenzen die in Tab. 2.1 aufgeführten Datenbanken und Software-Tools verwendet.

Tab. 2.1: Auflistung aller verwendeten Datenbanken und Software-Tools sowie deren Verwendungszweck.

Bezeichnung	Verwendungszweck	URL/Referenz
Datenbanken		
Genevestigator	Analyse von Genexpression	https://www.genevestigator.ethz.ch/ Zimmermann <i>et al.</i> (2004), Hruz <i>et al.</i> (2008)
Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Informationen zu Genen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PLACE	Durchführung von Promotormotivanalysen	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ Higo <i>et al.</i> (1999)
PlantCARE	Durchführung von Promotormotivanalysen	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/ Lescot <i>et al.</i> (2002)
RAGE	Durchführung von Promotor-Motiv-Analysen	http://rage.psc.riken.jp/db_home.pl
The Arabidopsis Information Resource (TAIR)	allgemeine Informationen zu Genen und Sequenzen	www.arabidopsis.org Huala <i>et al.</i> (2001)
Software- und Bioinformatik-Tools		
CKSAAP_UBSITE	Vorhersage potentieller Ubiquitinierungsstellen	http://protein.cau.edu.cn/cksaap_ubsite/ Chen <i>et al.</i> (2011)
Clone Manager	Sequenz- und Primeranalysen; Vektorkartenerstellung; Ableiten und Analyse von konventionellen PCR-Primern	Sci-Ed Software
DNA to Protein Converter	Umschreiben von DNA- in Proteinsequenzen	Applied Computational Biology and Bioinformatics (ACBB)-Gruppe des Paterson Institute for Cancer Research
Sequence Editor	Konvertieren von DNA-Sequenzen	http://www.fr33.net/seqedit.php
UbPred	Vorhersage potentieller Ubiquitinierungsstellen	http://www.ubpred.org/ Radivojac <i>et al.</i> (2010)
WebLogo	Durchführung von Sequenzvergleichen	http://weblogo.berkeley.edu Crooks <i>et al.</i> (2004)

3. KAPITEL I

Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Anti-JA-Antikörpers zur zell- und gewebespezifischen Visualisierung von JA in pflanzlichen Geweben

3.1 Einleitung

3.1.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC), oft auch als Immunzytochemie bezeichnet, ist eine Teildisziplin der Histologie, bei der für die *in situ*-Visualisierung von zellulären Komponenten innerhalb eines Gewebes oder einer Zelle das Prinzip einer Antigen(AG)-Antikörper(AK)-Reaktion genutzt wird (siehe Punkt 3.1.2). Dabei ist es durch die Verwendung von spezifischen AKs möglich nicht nur makromolekulare Zellstrukturen (z. B. Nukleinsäuren, Polysaccharide, Proteine), sondern auch niedermolekulare Zellbestandteile (z. B. Peptide, Hormone, Phytohormone) sichtbar zu machen. Die Idee einen mit einem Marker gekoppelten AK zur Lokalisation eines AGs auf mikroskopischer Ebene zu nutzen, geht zurück auf Coons und Mitarbeiter, denen die Darstellung des Erregers *Pneumococcus* mit Hilfe eines Fluorescein-gekoppelten AKs gegen bakterielle Polysaccharide gelang (Coons *et al.*, 1942; Coons & Kaplan, 1950; Coons *et al.*, 1950; Kaplan *et al.*, 1950). Im Verlauf der 50er Jahre wurde die von Coons und Mitarbeitern entwickelte Technik der „direkten Immunfluoreszenz“ für den Nachweis verschiedener Mikroorganismen in Gewebeschnitten angewandt (Goldman, 1957; Carter & Leise, 1958; Carver & Goldman, 1959) und seit ihrer Einführung kontinuierlich weiter ausgebaut. So wurde die Methode durch die Entwicklung enzymgekoppelter AKs (Nakane & Pierce, 1966; Avrameas & Ternynck, 1971; Kuhlmann & Avrameas, 1971; Avrameas, 1972), aber auch durch Einführung neuer Fluoreszenzmarker wie den im Vergleich zum Fluorescein stabileren Rhodamin- (Chadwick *et al.*, 1958; McKay *et al.*, 1981), Aminocoumarin- (Khalfan *et al.*, 1986), Cyanin- (Southwick *et al.*, 1990) und Alexa Fluor-Farbstoffen (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999) verbessert. Vor allem die Alexa Fluor-Farbstoffe, die durch chemische Modifizierung von Rhodamin- bzw. Aminocoumarinderivaten erzeugt wurden, besitzen, im Vergleich zu den unmodifizierten Farbstoffen, deutlich verbesserte Eigenschaften. So fluoreszieren diese um ein Vielfaches stärker, sind darüber hinaus wesentlich photo- und pH-stabiler und außerdem für alle Spektralbereiche vom Ultraviolettbereich bis hin zum Infrarotbereich erhältlich.

Bei der von Coons *et al.* (1942) eingeführten IHC-Methode handelt es sich um eine Technik zur direkten AG-Markierung (siehe Abb. 3.1). Hierbei ist der primäre AK mit dem Marker (Fluoreszenzfarbstoff oder Enzym) gekoppelt und wird in nur einem Arbeitsschritt unmittelbar auf die entsprechende Gewebeprobe aufgetragen (Lang, 2006). Nachteilig ist dabei, dass keine Signalverstärkung erfolgt, da nur ein einzelner mit einem Marker konjugierter AK an das AG binden kann. Somit lassen sich mit der direkten Methode nur AGs

nachweisen, die in der Gewebeprobe stark exprimiert vorliegen. Außerdem können nur AGs dargestellt werden, für die mit einem Marker konjugierte primäre AKs vorhanden sind. Daher wird oftmals auf die Methode der indirekten Markierung zurückgegriffen. Bei dieser IHC-Methode wird im ersten Arbeitsschritt ein unkonjugierter, gegen das nachzuweisende AG gerichteter primärer AK eingesetzt, an den im folgenden Arbeitsschritt der mit dem Marker gekoppelte sekundäre AK bindet (Lang, 2006) (siehe Abb. 3.1). Da hierbei mehrere sekundäre AKs an den primären AK binden können, erfolgt auf Grund der damit einhergehenden Signalverstärkung, eine bessere Visualisierung der AG-AK-Reaktion. Ein Nachteil der indirekten Markierung ist jedoch, dass unerwünschte Kreuzreaktionen auftreten können, da der sekundäre AK an andere AGs der zu untersuchenden Zellen/dem zu untersuchenden Gewebe binden und somit unspezifische Markierungen verursachen kann. Ein allgemein auftretendes Problem beim immunhistochemischen Nachweis bestimmter AGs stellen unspezifische Hintergrundfärbungen dar. Diese können durch Wechselwirkungen zwischen dem markierten AKs und den hydrophoben Gruppen des Gewebes entstehen. Durch den Einsatz von γ -Globulinen, wie z. B. bovines Serumalbumin (BSA), bei der Aufbereitung der Gewebeprobe und der AK-Lösungen lassen sich diese jedoch blockieren (McKinney *et al.*, 1964; McKinney *et al.*, 1966)

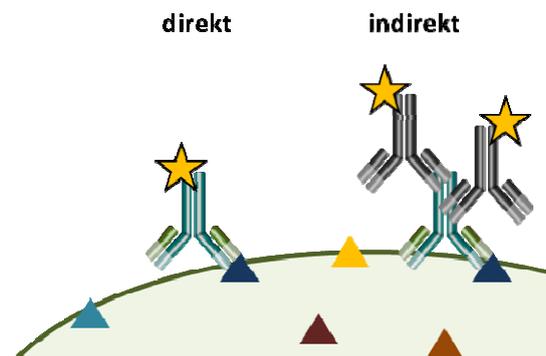


Abb. 3.1: Prinzip der direkten und indirekten Immunmarkierung.

Bei der indirekten Immunmarkierung bindet der mit einem Marker (gelber Stern) gekoppelte, spezifische AK (grün) direkt an das nachzuweisende AG (blaues Dreieck). Im Gegensatz dazu wird bei der indirekten Methode gegen das nachzuweisende AG ein unkonjugierter AK verwendet. An diesen bindet dann ein Marker-gekoppelter sekundärer AK (schwarz).

Immunhistochemische Techniken können grundsätzlich für die Untersuchung von allen Zell- und Gewebetypen herangezogen werden. Dabei ist es für einen authentischen zell- bzw. gewebespezifischen Nachweis von AGs im biologischen Probenmaterial mittels IHC unerlässlich, die ursprüngliche Lokalisation der AGs zum Zeitpunkt der Probennahme zu erhalten. Dies wird durch einen Fixierungsschritt gewährleistet, welcher zum einen dazu dient, die Feinstruktur der Zellen bzw. Gewebe zu stabilisieren und dabei vor allem auch eine Lageveränderung von Zellbestandteilen (Nukleinsäuren, Proteine, niedermolekulare Verbindungen etc.) zu verhindern (Hause *et al.*, 2006). Zum anderen ist eine adäquate Fixierung notwendig um die nach Abtrennung von einzelnen Organen bzw. Geweben vom

Gesamtorganismus einsetzende Autolyse der Zellen zu inhibieren aber auch um bakterielle Zersetzungsprozesse zu verhindern. Zur Fixierung von biologischem Probenmaterial kann man zwischen der Cryofixierung und der konventionellen chemischen Fixierung wählen (Hause *et al.*, 2006). Da erstere einen hohen technischen Aufwand erfordert, wird meist auf eine chemische Fixierung mittels quervernetzender oder koagulierender Agenzien zurückgegriffen. Eine universell anwendbare Fixierlösung gibt es dabei jedoch nicht. Die Wahl des passenden Fixativs ist in Abhängigkeit von dem zu analysierenden Gewebe und der zu bearbeitenden Fragestellung zu treffen. So ist zu beachten, dass während des Fixierungsschrittes nicht nur die Zellstruktur erhalten bleibt, sondern vor allem auch das mittels IHC nachzuweisende AG unlöslich gemacht wird, um so dessen Auswaschen im Verlauf der weiteren Probenaufbereitung zu verhindern. Für die Fixierung niedermolekularer Verbindungen mit Säuregruppen, zu denen auch JA und einige ihrer Derivate gehören, können Carbodiimide wie das EDC verwendet werden (van Pelt-Verkuil & Emeis, 1981; Moffett *et al.*, 1993; Pena *et al.*, 2009). Diese verknüpfen unter Ausbildung einer Säureamidbindung die Säurefunktion des AG mit der Aminogruppe eines Proteins (siehe Punkt 3.2.1.1). Die Dauer, mit der das Fixativ für eine erfolgreiche Fixierung auf die Gewebeproben einwirken muss, ist dabei zu optimieren. Zu kurze Fixierungszeiten können zu Veränderungen in der Morphologie und zur erhöhten Empfindlichkeit der auf der AG-Oberfläche lokalisierten AK-Bindungsstellen gegenüber nachfolgend eingesetzten Reagenzien führen (Lang, 2006). Zu lange Fixierungszeiten hingegen können die Schädigung oder Maskierung der AK-Bindungsstellen nach sich ziehen. Beides würde die Ergebnisse der IHC nachteilig beeinflussen (Lang, 2006).

Für eine effektive Fixierung von Geweben pflanzlichen Ursprungs sind neben der Art des Fixativs und Dauer der Fixierung noch weitere Aspekte zu beachten. Höhere Pflanzen weisen eine Vielzahl an sowohl physikalischen, als auch chemischen Barrieren auf, die die Wirksamkeit der Fixierung nachteilig beeinflussen können (Kuo, 2007). Hierzu gehören die wachsartigen Substanzen, die die Oberfläche von Organen, v. a. von Blättern, Stängeln und Früchten bedecken, wie auch die Zellwand, deren physikalische und chemische Eigenschaften wiederum in Abhängigkeit vom Zelltyp und -alter stark variieren können. Weiterhin enthalten pflanzliche Zellen im Gegensatz zu tierischen Zellen eine große Zentralvakuole, deren Membran, der Tonoplast, leicht im Verlauf der Fixierungsprozedur aufbrechen kann. Dadurch würde der Zellsaft in das Zytoplasma entlassen werden, bevor eine Stabilisierung der Zelle erreicht wäre. Der Zellsaft enthält phenolische Substanzen, hydrolytische Enzyme und organische Säuren, die sich schädigend auf die Zellstruktur und somit auf die immunhistochemische Detektion von spezifischen AGs auswirken können (Kuo, 2007). Daher muss die Probe nicht nur in einer angemessenen Zeitspanne in eine Fixierlösung überführt werden, sondern zusätzlich so schnell wie möglich mit dieser infiltriert werden.

Abgesehen von der effizienten Fixierung ist es notwendig, die für eine Immunmarkierung von AGs in biologischen Proben benötigten spezifischen AKs (primäre und/oder sekundäre) in das Probenmaterial und somit in räumliche Nähe zu ihren AGs zu bringen. Dies kann wie

bei der „*whole mount*“-Technik durch Infiltration der AKs in ungeschnittenes Probenmaterial erfolgen (Wikgren & Reuter, 1985). Problematisch bei pflanzlichen Proben ist hierbei jedoch, dass zum einen auf Grund der physikalischen Barrieren das Einbringen der AKs in das Gewebe beeinträchtigt ist. Zum anderen sind die meisten pflanzlichen Gewebe zu groß bzw. zu dick, um sie ungeschnitten mikroskopieren zu können. Außerdem wird die mikroskopische Analyse häufig durch das Auftreten von autofluoreszierenden Verbindungen (Pigmente, Tannine, Zucker etc.), die das spezifische Signal maskieren können, erschwert (Hause *et al.*, 2006). Daher wird bei Fragestellungen, die sich auf pflanzliches Probenmaterial beziehen, bevorzugt die sogenannte „*post embedding*“-Markierung eingesetzt, bei denen Stücke der zu analysierenden Organe/Gewebe nach der Fixierung aber noch vor der Immunmarkierung in ein aushärtendes Medium (Gelatine, Agar, Paraffin, Paraplast, Polyethylenglycol, Epoxidharze, o. ä.) eingebracht werden (Lang, 2006). Eine derartige Einbettung erlaubt es von dem zu untersuchenden biologischen Probenmaterial Schnittpräparate mit Stärken im Mikro- bis Nanometerbereich anzufertigen. Diese lassen sich auf Grund der erhöhten Lichtdurchlässigkeit besser mikroskopieren und die AKs zur AG-Markierung können leichter eingebracht werden. Die Wahl des Einbettungsmediums hängt ähnlich wie die Wahl der Fixierungsmethode von der Beschaffenheit der biologischen Probe und der verfolgten Fragestellung ab.

Die vielfältigen Variationsmöglichkeiten bei der Gewebepräparation (Fixierung und Einbettung), den Inkubationszeiten und -temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte der IHC bis hin zur Auswahl der Nachweismethode (Enzym- oder Fluoreszenzmarker) hat zur Folge, dass die Qualitätssicherung der Versuchsergebnisse von großer Bedeutung ist. Diese erfolgt mit Hilfe geeigneter Kontrollen, wobei idealerweise sowohl Kontrollen für die verwendeten AKs (vor allem die primären AKs), als auch für unspezifische Gewebereaktionen durchzuführen sind (Lang, 2006).

3.1.2 Polyklonale Antikörper – Definition, Herstellung und Charakterisierung

Neben der adäquaten Probenvorbereitung ist eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunmarkierung, die Verfügbarkeit eines spezifischen und hochaffinen AKs, der das AG im Probenmaterial erkennt und bindet. AKs sind zur Klasse der Immunglobuline (Ig) gehörende Proteine, welche die humorale Immunantwort der Vertebraten vermitteln. Die AKs werden zur Neutralisation eines AG (z. B. Krankheitserreger) durch reife B-Lymphozyten sezerniert und kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe vor. B-Lymphozyten besitzen spezifische Rezeptoren zur AG Erkennung, so dass jeder einzelne B-Lymphozyt nach Ablauf des Reifungsprozesses zur AK-sezernierenden Zelle AK-Moleküle mit einzigartiger Spezifität produziert. Obwohl es fünf verschiedene Klassen von AKs gibt (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM), besitzen alle den gleichen Grundaufbau (Hanly *et al.*, 1995) (siehe Abb. 3.2). Die Aufklärung des Grundaufbaus von Ig-Molekülen gelang durch Porter bzw. Edelman *et al.* (Porter, 1958; Eedelman *et al.*, 1960). Die Y-förmige Grundstruktur eines AK wird aus insgesamt vier über Disulfidbrücken miteinander verknüpfte Polypeptidketten

gebildet – den zwei identischen leichten (L-) Ketten mit jeweils etwa 220 AS und den zwei identischen schweren (H-) Ketten mit jeweils etwa 440 AS (Cohen & Milstein, 1967; Llewelyn *et al.*, 1992). Die „Stiele“ der AK-Moleküle bilden dabei die konstanten Regionen, welche nach enzymatischer Abspaltung mittels Papain kristallisiert werden können. Sie werden daher auch als Fc-Fragmente (*crystallizable fragments*) bezeichnet und sind bei allen AKs derselben Klasse eines Individuums gleich. Die beiden „Arme“ eines AK-Moleküls werden als Fab-Fragmente (*antigen binding fragments*) bezeichnet, wobei deren N-terminale Enden als Fv-Fragmente (*variable fragments*) definiert werden, da hier die sogenannten hypervariablen Regionen lokalisiert sind. Diese bilden durch ihre räumliche Anordnung die AG-Bindungsstellen (Paratope). In Abhängigkeit von der AK-Klasse können AKs in monomerer (IgD, IgE und IgG), dimerer (IgA) oder pentamerer Form (IgM) auftreten.

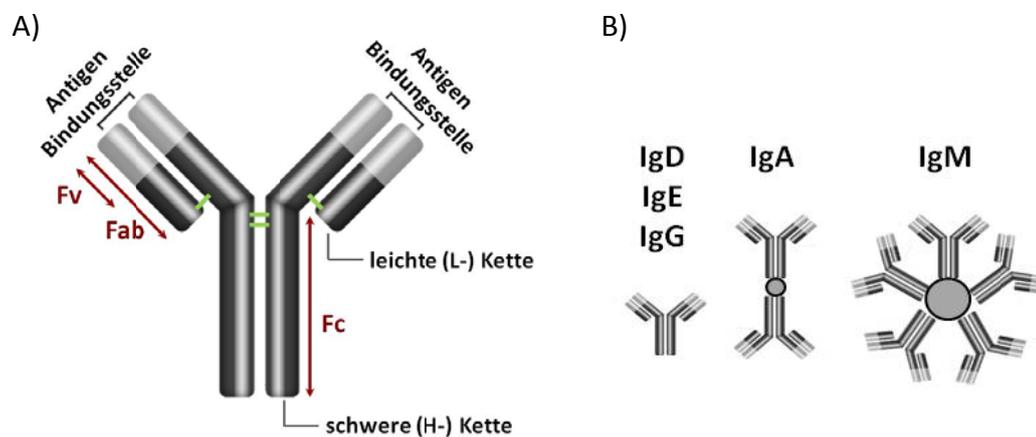


Abb. 3.2: Aufbau von Immunglobulinen.

A) Dargestellt ist die Grundstruktur eines AK. Jedes AK-Molekül besteht aus jeweils zwei identischen schweren (H-) und leichten (L-) Ketten, die über Disulfidbrücken (grün) miteinander verknüpft sind. Das Fc-Fragment bildet den „Stiel“ des AK-Moleküls. Die N-terminalen Enden der Fab-Fragmente werden als Fv-Fragmente definiert, da hier die hypervariablen Regionen lokalisiert sind. B) In Abhängigkeit von der Klasse treten die Immunglobuline als Monomere, Dimere oder Pentamere auf.

Die im Verlauf der Immunantwort gebildeten AKs zirkulieren im Blutkreislauf und gelangen so in alle Körpergewebe. Dabei bilden die IgG-AKs mit die dominierende AK-Klasse im Blut. IgG-AKs können von Vertebraten gegen eine enorme Vielfalt an AGs generiert werden. Daher ist es möglich, spezifische AKs für die Immunmarkierung bestimmter Zellbestandteile in biologischen Proben mit Hilfe der *in vivo* ablaufende AK-Produktion von Vertebraten herzustellen. Um immunogen zu wirken, d. h. vom Immunsystem eines Organismus erkannt zu werden und somit zur AK-Produktion zu führen, müssen von einem AG mehrere Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen muss es sich um eine körperfremde Verbindung handeln, um somit die Selbsttoleranz zu umgehen, durch die eine Immunantwort gegen körpereigene AGs unterdrückt wird. Zum anderen ist ein weiterer Faktor, der die Immunogenität beeinflusst, die chemische Struktur des Moleküls. Immunogene müssen auf ihrer Oberfläche antigene Determinanten (Epitope) aufweisen. Dabei handelt es sich um

chemische Gruppen wie sie in Lipiden, Zuckern oder Peptiden vorkommen. Sie stellen die Andockstellen für die Paratope der korrespondierenden AKs dar und bestimmen so durch ihre Anzahl, Dichte und Anordnung auf dem Immunogen die Spezifität des AK. Neben der Körperfremdheit und der chemischen Struktur spielt außerdem die Molekülgröße des AG eine bedeutende Rolle. Kleinere Moleküle, wie z. B. Phytohormone, werden vom Immunsystem nicht erkannt und sind somit nicht immunogen. Sie müssen daher zunächst an ein Trägermolekül (z. B. Albumine wie BSA oder Polyaminosäuren wie Polylysin) kovalent gekoppelt werden. Der so erhaltene Komplex ist groß genug um eine AK-Produktion zu induzieren. Solche nicht-immunogenen Verbindungen werden auch als Haptene bezeichnet. Zur Produktion spezifischer AKs wird einem Wirtstier (meist Kaninchen, Maus, Ratte oder Ziege) das zu untersuchende AG subkutan injiziert. Um eine Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort zu bewirken und damit einen hohen Titer an AKs im Serum zu erzielen, folgen der Primärinjektion im Abstand einiger Wochen meist mehrere sogenannte „Booster“-Injektionen. Da vom Immunsystem potentiell gegen jedes Epitop des applizierten Immunogens AKs generiert werden können, zirkuliert zum Zeitpunkt der Serumernste nicht nur eine IgG-Spezies im Blutserum. Vielmehr handelt es sich um eine Mischpopulation aus verschiedenen IgGs gegen das Ziel-AG aber auch aus anderen im Verlauf der bisherigen Lebensspanne des Wirtstieres gebildeten IgGs (z. B. gegen Krankheitserreger). Da die IgGs von den Nachkommen (= Klone) verschiedener (= poly) B-Lymphozyten sezerniert werden, bezeichnet man das Gemisch aus verschiedenen IgG-Populationen nach AK-Produktion *in vivo* auch als polyklonalen AK. Die immunologische Heterogenität polyklonaler AKs birgt sowohl Vor- als auch Nachteile. Von Vorteil ist zum einen, dass die Stärke, mit der ein polyklonales Antiserums das Ziel-AG bindet, nicht nur von einem einzelnen Klon abhängt. Vielmehr weisen die verschiedenen AK-Populationen auch verschiedene Aviditäten gegenüber dem AG auf, die sich ausgleichen können (Lang, 2006). Abgesehen davon ist vorteilhaft, dass sich in der gemischten AK-Population meist Populationen finden, die auch an Epitope des AG binden, wenn dieses durch den Fixierungsprozess beeinflusst wird (Hause *et al.*, 2006) (siehe Punkt 3.1.1). Nachteilig ist, dass ein polyklonaler AK auf Grund der Vielzahl an AK-Populationen neben AG-spezifischen AKs oft auch AKs enthält, die unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen AGs aufweisen (Hause *et al.*, 2006). Dies ist vor allem dann der Fall, wenn Epitope zur des Immunisierung genutzten AG auch auf anderen potentiellen AGs der mittels IHC zu analysierenden Gewebeproben vorkommen. Besonders problematisch können dabei Derivate oder Synthesestufen von dem nachzuweisenden AG sein, welche in der Regel strukturell eng mit dem Ziel-AG verwandt sind. Um unerwünschte Kreuzreaktionen eines polyklonalen AK mit anderen potentiellen AG als dem gewünschten auszuschließen und seine Eignung für den IHC-Nachweis des Ziel-AGs in biologischen Proben beurteilen zu können, muss zunächst eine Charakterisierung des AKs hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften durchgeführt werden (Hause *et al.*, 2006) (siehe Punkt 3.2.2).

3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von Phytohormonen

Die von Coons und Mitarbeitern Mitte des 20. Jh. auf den Weg gebrachte Methode der IHC (Coons *et al.*, 1942; Coons & Kaplan, 1950; Coons *et al.*, 1950; Kaplan *et al.*, 1950) ermöglicht einen Nachweis des räumlichen und zeitabhängigen Vorkommens von sowohl makromolekularen, als auch niedermolekularen Verbindungen (siehe Punkte 3.1.1 und 3.1.2). Der Einsatz spezifischer AKs eignet sich demnach prinzipiell auch für die Durchführung von *in situ*-Lokalisationsstudien von Phytohormonen in pflanzlichem Probenmaterial. Die Bestrebungen, AKs gegen Phytohormone für deren immunhistochemischen Nachweis in pflanzlichem Gewebe zu generieren, reichen zurück bis in die 1980er Jahre (Dewitte & Van Onckelen, 2001). Dennoch gelang dies bisher nur für wenige Vertreter der pflanzlichen Wachstumsregulatoren. Zur quantitativen Analyse des Auxinderivates IAA in Gewebeextrakten mittels Radioimmunassay (RIA) bzw. ELISA wurden sowohl ein polyklonaler (Weiler, 1981), als auch verschiedene monoklonaler Anti-IAA-AK (Mertens *et al.*, 1985) generiert. Für einen immunhistochemischen Nachweis sind diese jedoch nicht geeignet (Dewitte & Van Onckelen, 2001). Daneben werden in der Literatur verschiedene polyklonale Anti-ABA-AKs beschrieben, die allerdings auch für die Quantifizierung von ABA mittels RIA bzw. ELISA in pflanzlichen Gewebeextrakten entwickelt wurden (Weiler, 1980; Daie & Wyse, 1982). Ihre Anwendbarkeit für die IHC ist nicht belegt.

Erst der von Mertens und Mitarbeitern ursprünglich ebenfalls für die Quantifizierung von ABA entwickelte monoklonale Anti-ABA-AK (Mertens *et al.*, 1983), ist, wie von Schraut und Mitarbeitern bei der Untersuchung des radialen bzw. lateralen ABA-Transportes in Wurzelspitzen von *Zea mays* demonstriert, auch für die Immunlokalisierung von ABA in Pflanzenmaterial geeignet (Schraut *et al.*, 2004). Darüber hinaus werden in der Literatur mehrere spezifische AKs für den immunhistochemischen Nachweis verschiedener aromatischer und isoprenoide Zytokinine beschrieben. Dabei handelt es sich um polyklonale AKs, die für die Immunlokalisierung der Zytokinine Zeatinribosid, Dihydrozeatinribosid und/oder Isopentenylalanin in Wurzelspitzen von *Zea mays* (Zavala & Brandon, 1983), *Solanum lycopersicum*-Keimlingen (Sossountzov *et al.*, 1988) und in sich entwickelnden *Nicotiana tabacum*-Blüten (Dewitte *et al.*, 1999) generiert und eingesetzt wurden. Die Anwendung eines von Eberle *et al.* (1986) für die Quantifizierung von Zeatinribosid und Dihydrozeatinribosid generierten monoklonalen AK ist für einen IHC-Nachweis dieser Zytokinine hingegen nicht dokumentiert. Weiterhin ist in der Literatur die Immunlokalisierung der Brassinosteroide Brassinolid, Castasteron und 3-Epicasteron in Pollen von *Lolium perenne* (Taylor *et al.*, 1993) beschrieben. Dabei wurde ein ursprünglich für die Quantifizierung von Brassinosteroiden in Pflanzenextrakten generierter polyklonaler AK (Yokota *et al.*, 1990) verwendet. Zusätzlich zu den aufgezählten AKs sind mittlerweile auch einige kommerzielle Phytohormon-AKs erhältlich. So werden z. B. von Agrisera (www.agrisera.com) für einen zell- und gewebespezifischen Nachweis mittels IHC polyklonale AKs gegen ABA, die Ethylenvorstufe ACC, das Auxin IAA und auch gegen verschiedenen Zytokinine angeboten.

Für die Immunlokalisation von JA standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch keine geeigneten spezifischen AKs zur Verfügung. Zwar sind in der Literatur sowohl ein polyklonaler AK (Knöfel *et al.*, 1984), als auch zwei monoklonale AKs (Albrecht *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 2008) beschrieben, die spezifisch an JA und/oder an verschiedene JA-Metabolite binden. Jedoch wurden diese für die Quantifizierung der entsprechenden Jasmonate in Pflanzenextrakten mittels RIA oder ELISA entwickelt und verwendet. Der mögliche Nutzen dieser AKs für einen immunhistochemischen Nachweis der von ihnen spezifisch gebundenen Jasmonate wurde nicht diskutiert. Zudem stehen der für JA und ihre AS-Konjugate spezifische polyklonale AK von Knöfel *et al.* (1984) und der für JA und deren Methylester spezifische monoklonale AK von Albrecht *et al.* (1993) mittlerweile nicht mehr zur Verfügung. Der von Deng *et al.* (2008) generierte monoklonale AK ist hingegen auf Grund seiner hohen Spezifität für JAME für eine Immunlokalisation von JA nicht geeignet.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen JA-spezifischen polyklonalen AK zu generieren, der in Kombination mit einer geeigneten Fixierungsmethode für den direkten Nachweis von JA in pflanzlichen Geweben verwendet werden kann. In Abb. 3.3 sind alle dazu erforderlichen Arbeitsschritte in einer Übersicht dargestellt. Die AK-Produktion sollte in Kaninchen unter Verwendung von an BSA gekoppelter JA als Immunogen erfolgen. Zur Wahl einer adäquaten Prozedur zur Reinigung des gewonnenen AK aus dem Serum sollten außerdem zwei chromatographische Methoden verglichen werden. Für die Charakterisierung der beiden gewonnenen AK-Fraktionen sollte ein kompetitiver, indirekter ELISA etabliert und die Bindungseigenschaften der AK-Fraktionen gegenüber verschiedenen JA-Metaboliten untersucht werden. Weiterhin waren geeignete Methodenprotokolle für die Fixierung, Einbettung und die anschließende Immunmarkierung mit dem gewonnenen polyklonalen AK zu etablieren, um mittels IHC den Nachweis eines wundinduzierten JA-Anstiegs erbringen zu können. Dies sollte unter Verwendung von Blattschnitten von *S. lycopersicum* erfolgen, wobei zur Absicherung der Versuchsergebnisse dabei sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen in die Versuche einbezogen werden sollten.

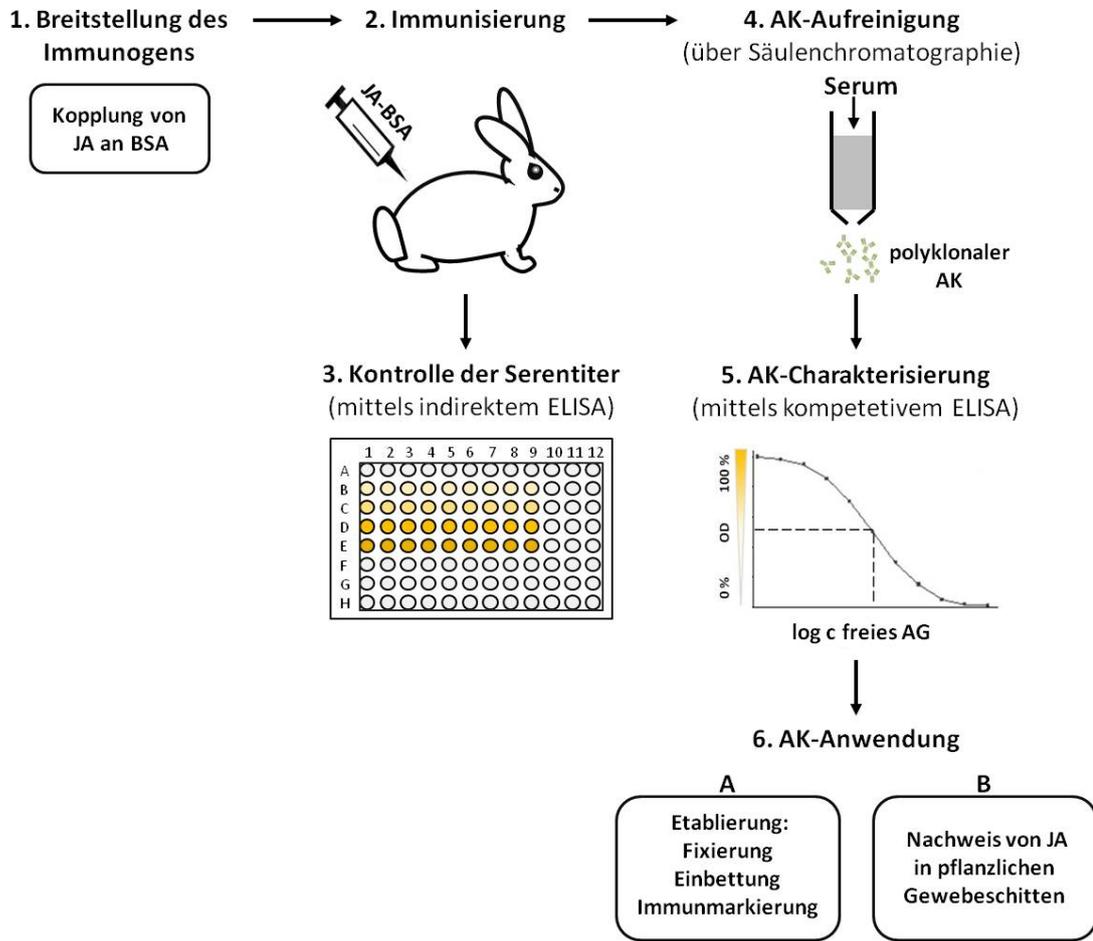


Abb. 3.3: Übersicht über die Arbeitsschritte zur Gewinnung eines polyklonalen AKs für den immun-histochemischen Nachweis von JA in pflanzlichen Gewebeschnitten.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Erzeugung eines polyklonalen Anti-JA-Antikörpers in Kaninchen

3.2.1.1 Immunisierung von Kaninchen und Untersuchung der Serentiter

JA ist eine niedermolekulare organische Verbindung, die auf Grund ihres geringen Molekulargewichtes nicht immunogen wirkt, d. h. in Vertebraten keine Immunantwort auslösen kann (siehe Punkt 3.1.2). Aus diesem Grund musste JA zunächst an das Trägerprotein BSA gekoppelt werden. Die Kopplung erfolgte durch Aktivierung von JA mit dem Carbodiimid EDC (siehe Abb 3.4). Im Ergebnis an die in Punkt 2.10.1 beschriebene Prozedur zur Herstellung und Reinigung des Konjugates konnte eine Ausbeute von ca. 5 ml Konjugat-Lösung mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml erzielt werden. Unter Verwendung eines verbliebenen Restbestandes an beschriebenen Anti-JA-AK aus Kaninchen (Knöfel *et al.*, 1984) wurde von Dr. U. Conrad (IPK Gatersleben) überprüft, ob die Kopplung von JA an BSA erfolgreich war. Dies erfolgte im indirekten ELISA (siehe Punkt 2.9.3), wobei die Wells der ELISA-Platten mit 0,5 µg JA-BSA-Konjugat pro Well beschichtet wurden und die Anti-JA-AK-Lösung (1 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:2.000 eingesetzt wurde. Als sekundärer AK wurde, wie auch in allen nachfolgend durchgeführten ELISA-Experimenten, ein Anti-Kaninchen-AK aus Ziege (0,6 mg/ml) verwendet, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war. Durch Messung der OD₄₀₅ konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Bindung des Anti-JA-AKs an das JA-BSA-Konjugat erfolgte (U. Conrad, persönliche Mitteilung).

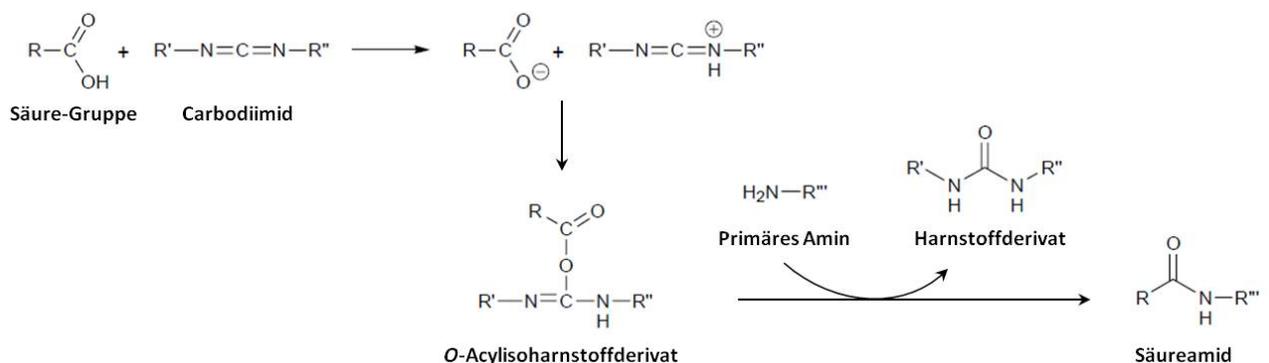


Abb. 3.4: Reaktionsmechanismus der Fixierung von Jasmonaten mit EDC.

Die ungeschützte Carboxylgruppe der Säure-Komponente (z. B. JA) bildet mit dem Carbodiimid (z. B. EDC) ein instabiles O-Acylisoharnstoffderivat aus. Dieses bildet nachfolgend mit der Aminokomponente (Protein), unter Abspaltung eines Harnstoffderivates, das Säureamid aus.

Das JA-BSA-Konjugat wurde anschließend in mehreren Immunisierungsschritten zwei Kaninchen (Kaninchen 1 und 2) subkutan verabreicht (siehe Punkt 2.10.2). Um nachzuweisen, dass in den immunisierten Tieren AKs gegen das injizierte AG JA-BSA-Konjugat generiert wurden, wurden 10 d nach der letzten Immunisierung am IPK Gatersleben die Serentiter kontrolliert. Dazu wurde im indirekten ELISA die Bindung der polyklonalen Seren-

AKs (getestete Verdünnungsstufen 1:1.000; 1:10.000 und 1:100.000) an das AG JA-BSA-Konjugat (0,5 µg Konjugat/Well) getestet. Um eine möglicherweise auftretende Kreuzreaktivität der AK mit dem Trägerprotein ausschließen zu können, wurde außerdem vergleichend dazu die Bindung beider Serentiter an reines BSA (0,5 µg BSA/Well) als AG analysiert. Für die Antiseren beider Versuchstiere konnte in den Kontrollversuchen über die OD_{405} -Bestimmung eine Bindung von AK an das JA-BSA-Konjugat nachgewiesen werden, jedoch nicht an reines BSA (U. Conrad, persönliche Mitteilung). Das deutet darauf hin, dass die IgG-Fractionen beider Seren keine Kreuzreaktivität mit BSA aufweisen, sondern nur an Epitope des JA-BSA-Konjugates binden. Daher wurden die Seren beider Tiere geerntet. Weiterhin ging aus den Titerkontrollen hervor, dass der Serumtiter von Kaninchen 2 eine höhere Avidität zum AG aufwies als das des Tieres 1 (U. Conrad, persönliche Mitteilung). Auf Grundlage dieser Kontrollversuche wurde für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Gewinnung eines spezifischen polyklonalen Anti-JA-AK für eine *in situ*-Detektion von JA in pflanzlichen Gewebeschnitten das Serum von Kaninchen 2 ausgewählt.

3.2.1.2 Aufreinigung des Anti-JA-AK aus dem Serum von Kaninchen 2

Wie in Punkt 3.1.2 erläutert zirkulieren zum Zeitpunkt der Serumernte nicht nur die gegen das injizierte Immunogen generierten AKs im Blut des Wirtstieres. Zusätzlich dazu setzt sich das Blutserum aus verschiedenen Komponenten zusammen. Zu diesen gehören neben den während einer Immunantwort gebildeten Immunglobulinen (γ -Globuline) auch andere globuläre Proteine wie Albumin und α_1 -, α_2 - und β -Globuline aber auch Elektrolyte und niedermolekulare Substanzen wie Lipide und Hormone. Um die spezifischen IgGs von anderen Serumbestandteilen abzutrennen, bedurfte es daher zunächst einer Reinigung dieser AKs aus dem Blutserum. Dies erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Dabei mussten zwei Aspekte beachtet werden:

- (i) Die Bindungseigenschaften sind auf Grund der immunologischen Heterogenität eines polyklonalen Antikörpers schwer im Voraus abzuschätzen (siehe Punkt 3.1.2) und
- (ii) der Zeitaufwand des Reinigungsschrittes ist in einem angemessenen Rahmen zu halten.

Im vorliegenden Fall sollte eine Methode etabliert werden, mit welcher aus dem Serum des immunisierten Versuchstiers 2 ein polyklonaler AK isoliert werden kann, der zum einen möglichst spezifisch an JA bindet und keine störenden Kreuzreaktionen aufweist, dessen Reinigungsprozedur zugleich jedoch so einfach wie möglich gehalten werden sollte. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden der AK-Reinigung vergleichend durchgeführt (siehe Punkt 2.10.3). Unter Verwendung von jeweils 5 ml Serum wurde zum einen eine unspezifische Proteinreinigungsmethode etabliert, bei welcher zur Gewinnung der Gesamt-IgG-Fraktion (im Folgenden als AK I bezeichnet) eine Protein A-gekoppelte Säulenmatrix genutzt wurde (Duhamel *et al.*, 1979; Hober *et al.*, 2007). Zum anderen kam eine AG-spezifische Methode zum Einsatz, bei der für die Gewinnung von JA-

spezifischen IgG-Populationen (im Folgenden als AK II bezeichnet) JA-BSA-Konjugat als AG an die Säulenmatrix gekoppelt wurde.

Tab. 3.1: Vergleich der zu etablierenden affinitätschromatographischen Methoden zur Anti-JA-AK-Reinigung aus dem Kaninchenantiserum hinsichtlich ihres Arbeits- und Zeitaufwandes.

Tag/Nacht	unspezifische Reinigung (Protein A-Agarose) → AK I		spezifische Reinigung (an Sepharose gekoppeltes JA-BSA) → AK II	
	Nr.	Arbeitsschritt	Nr.	Arbeitsschritt
Tag 1	1	zwei vorzubereitende Lösungen: - PBS-Puffer - Elutionspuffer	1	fünf vorzubereitende Lösungen: - Coupling Puffer - Acetat-Puffer - Tris-Puffer - PBS-Puffer - Elutionspuffer - HCL
	2	Waschschrift 1		
	3	Waschschrift 2		
Nacht 1	4	Mischen der Agarose mit dem Antiserum und Inkubation üN	2	Dialyse JA-BSA
Tag 2	5	Befüllen der Säule	3	Quellen der Sepharose
	6	Waschschrift 3	4	Waschschrift 1
	7	Elutionsschritt	5	Waschschrift 2
	8	Neutralisation der gesammelten Fraktionen	6	Equilibrieren der Sepharose
Nacht 2			7	Mischen der Sepharose mit dem Konjugat und Inkubation ü.N.
Tag 3			8	Waschschrift 3
			9	Inkubationsschritt
			10	Waschschrift 4
			11	Waschschrift 5
			12	Waschschrift 6
			13	Waschschrift 7
Nacht 3			14	Mischen der Sepharose mit dem Antiserum und Inkubation üN
Tag 4			15	Befüllen der Säule
			16	Waschschrift 8
			17	Elutionsschritt
			18	Neutralisation der gesammelten Fraktionen

In Tab. 3.1 sind alle Arbeitsschritte beider Methoden vergleichend aufgelistet. Wie aus der Auflistung hervorgeht, war die Reinigung von AKs über die AG-spezifische Methode mit einer Gesamtdauer von ca. 4 d deutlich zeit- und damit auch kostenintensiver als die unspezifische Reinigung, bei welcher der Zeitaufwand ca. 2 d betrug. Außerdem war bei der AG-spezifischen Methode ein höherer Bedarf an JA-BSA-Konjugat erforderlich, der bei der Synthese des Konjugates beachtet werden musste. Mit beiden Reinigungsprozessen wurde eine Ausbeute von je ca. 2 ml gewonnene polyklonale AK-Lösung erzielt, wobei mittels

Bradford-Test ein Proteingehalt von 0,83 µg/ml (AK I) bzw. 0,04 µg/ml (AK II) bestimmt wurde.

3.2.2 Charakterisierung der gereinigten Anti-JA-Antikörperfraktionen AK I und AK II mittels kompetitivem ELISA

Um unerwünschte Kreuzreaktionen der gewonnenen AK-Fractionen mit anderen Jasmonaten auszuschließen, sollten die Bindungseigenschaften der gewonnenen AK-Varianten AK I und AK II untersucht werden. In den Titerkontrollen konnte bereits in einem indirekten ELISA nachgewiesen werden, dass der ungereinigte polyklonale Anti-JA-AK an das JA-BSA-Konjugat, nicht jedoch an reines BSA bindet (siehe Punkt 3.2.1.1). Darüber hinaus sollten zwei weitere wichtige Eigenschaften untersucht werden:

- (i) Es sollte zur Auswahl der Reinigungsmethode geprüft werden, ob sich AK I und AK II hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften unterscheiden.
- (ii) Es sollte für eine spätere Nutzung der AKs für die *in situ*-Detektion von JA in Gewebeschnitten untersucht werden, ob AK I und AK II zwischen verschiedenen JA-Metaboliten diskriminieren können.

3.2.2.1 Vorgehen beim kompetitiven ELISA

Eine AK-Charakterisierung hinsichtlich der Bindungseigenschaften für verschiedene AGs kann wie in der Literatur für verschiedene Beispiele dokumentiert mit Hilfe eines kompetitiven, indirekten enzymgekoppelten Immunabsorbentassay (ELISA) erfolgen (Knöfel *et al.*, 1984; Heussner *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008; Suárez-Pantaleón *et al.*, 2008) (siehe Abb 3.5). Hierbei wird der zu testende AK zunächst in einer 96-Well-Platte (Masterplatte) mit steigenden Konzentrationen an zu testendem freien AG gemischt und vorinkubiert (siehe Abb. 3.5A). Sofern der AK das zu testende AG erkennt und bindet, erfolgt während dieser Vorinkubation eine Absättigung von AK-Molekülen mit diesem AG. Je höher dabei die Konzentration an freiem AG ist, je mehr AK-Moleküle werden während der Inkubationsphase mit AG-Molekülen abgesättigt. Die Absättigung des AK, also seine Fähigkeit das zu testende AG binden zu können, wird nachfolgend über die Ziel-AG-Bindung in einer zweiten 96-Well-Platte (ELISA-Platte) ausgewertet. Die ELISA-Platte wird zuvor mit dem AG beschichtet, welches in der biologischen Probe detektiert werden soll (Ziel-AG) und für die Immunisierung des Wirtstieres verwendet wurde (siehe Abb. 3.5B). Die Bereiche der ELISA-Platte, die nicht mit dem Ziel-AG bedeckt sind, werden durch BSA geblockt, um eine unspezifische Anlagerung des AK an die Plattenoberfläche zu verhindern. Danach wird das AK-AG-Gemisch von der Masterplatte in die ELISA-Platte überführt. Während einer anschließenden Inkubationsphase können freie AK-Moleküle an das Ziel-AG auf der Oberfläche der ELISA-Platte binden. Ungebundene AKs werden anschließend gewaschen und der mit einem Markerenzym (alkalische Phosphatase) gekoppelte, sekundäre AK zugegeben. Während der anschließenden Inkubationsphase erfolgt die Bindung von sekundären AK-Molekülen an die Fc-Fragmente der auf der Oberfläche immobilisierten primären AKs.

Ungebundene sekundäre AKs werden anschließend gewaschen. Durch Zugabe des farblosen Substrates (*para*-Nitrophenylphosphat) für das an den sekundären AK gekoppelte Enzym erfolgt die Bildung eines gelben Reaktionsproduktes (*para*-Nitrophenol). Abschließend erfolgt die Messung der OD₄₀₅.

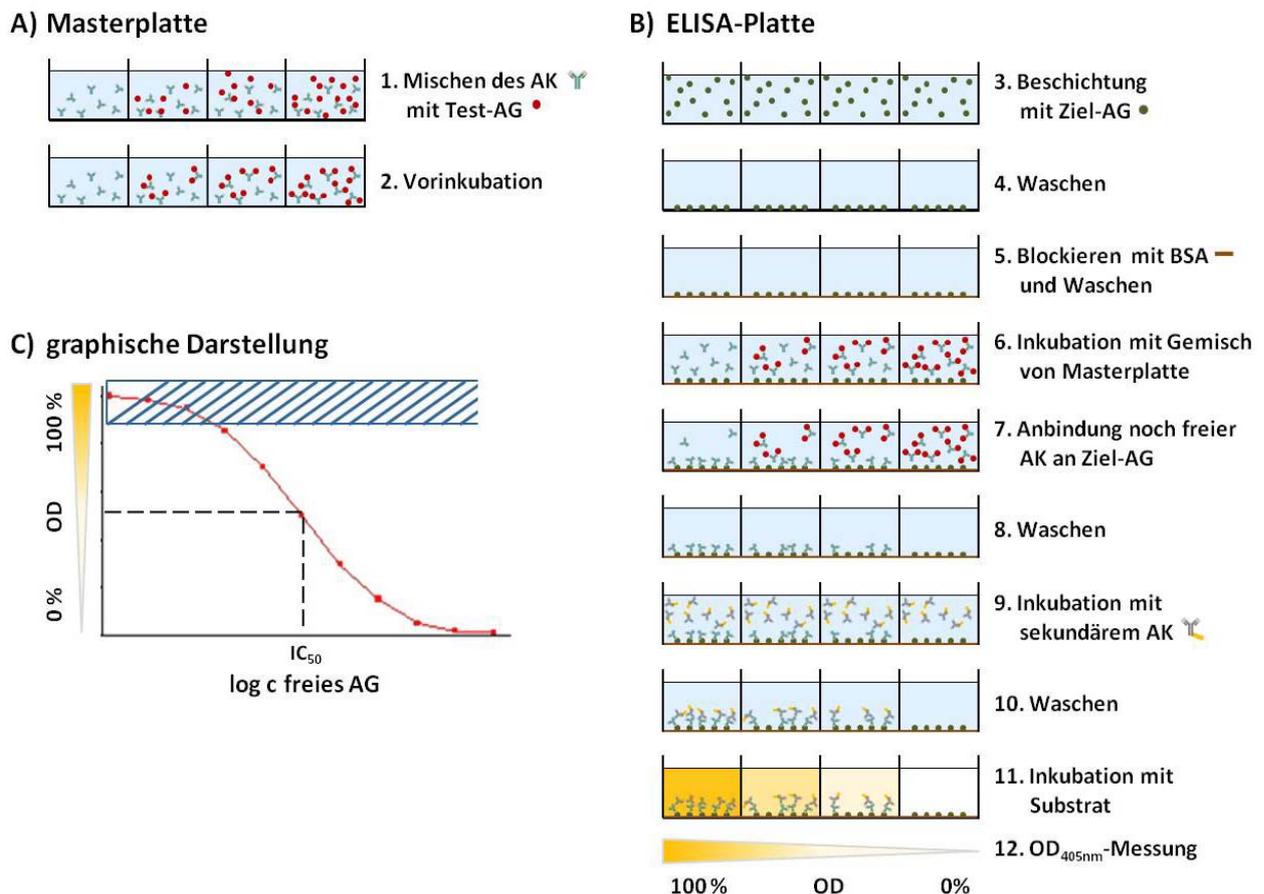


Abb. 3.5: Vereinfachte Darstellung des Vorgehens beim kompetitiven indirekten ELISA.

Zunächst wird in der Masterplatte der zu testende primäre AK mit von Well zu Well steigenden Konzentrationen an zu testendem freien AG gemischt und vorinkubiert (A). Die AK-Absättigung, also die Fähigkeit des AKs das zu testende AG binden zu können, wird über die Ziel-AG-Bindung in einer zweiten 96-Well-Platte (ELISA-Platte) ausgewertet (B). Dazu erfolgt nach Bindung der freien Anti-JA-AK-Moleküle an das, auf der Oberfläche der ELISA-Platte immobilisierte Ziel-AG und der anschließenden schrittweisen Inkubation mit dem alkalische Phosphatase-gekoppelten, sekundären AK und dem entsprechenden Substrat für das Enzym die Messung der OD. Die OD, die nach Vorinkubation mit einer AG-freien Lösung gemessen wurde, wird dabei auf 100 % gesetzt, da diese einer maximalen Bindung des AKs an das immobilisierte Ziel-AG entspricht. Zur Auswertung der Daten werden die gemessenen ODs (in %) gegen den Logarithmus (log) der Konzentration an freiem AG aufgetragen. Im Fall einer Bindung des primären AKs an das zu testende freie AG erhält man einen sigmoiden Kurvenverlauf (rot), dessen Wendepunkt den IC₅₀-Wert markiert. Erfolgt keine Erkennung des getesteten AGs durch den AK, so ist der Kurvenverlauf parallel zur x-Achse (blau schraffierter Bereich).

Die gemessene OD ist abhängig von der Menge an Enzym und demnach umso größer, je mehr primärer AK an der Oberfläche der ELISA-Platte immobilisiert vorliegt, d. h. je weniger AK-Moleküle in der Vorinkubationsphase mit dem zu testenden freien AG abgesättigt

wurden. Die OD-Werte, die nach Vorinkubation mit einer AG-freien Lösung gemessen wurde, wurde zur Auswertung auf 100 % gesetzt, da diese einer maximalen Bindung des AKs an das immobilisierte Ziel-AG entspricht – ohne Hemmung durch vorherige AG-Bindung. Wird die gemessene OD (in %) gegen den Logarithmus (log) der Konzentration an freiem getestetem AG dargestellt, erhält man einen sigmoiden Kurvenverlauf (siehe Abb. 3.5C). Der Wendepunkt der Kurve markiert den sogenannten IC_{50} -Wert, bei dem die Absättigung des AK und damit die Hemmung der nachfolgenden Ziel-AG-Bindung halbmaximal ist. Je besser das getestete freie AG durch den AK gebunden werden kann, desto steiler ist der Kurvenverlauf und desto kleiner ist der entsprechende IC_{50} -Wert. Somit kann dieser Wert zur Bewertung der Bindungseigenschaften eines polyklonalen AKs herangezogen werden (Rath *et al.*, 1988). Findet keine Erkennung des getesteten AGs durch den AK statt, so verläuft die aufgenommene Kurve parallel zur x-Achse. In dem Fall tritt unabhängig von der Konzentration des freien AG in der Vorinkubationsphase keine Hemmung der nachfolgenden AK-Bindung an das immobilisierte Ziel-AG auf.

3.2.2.2 Etablierung des kompetitiven ELISA

Die optimalen Bedingungen zur Durchführung eines kompetitiven Immunoassays müssen in Vorversuchen ermittelt werden. Dies betrifft sowohl die Verdünnung des zu testenden AK. Als auch die Menge an Ziel-AG zur Beschichtung der ELISA-Platte. Zur Festlegung dieser Bedingungen für die Charakterisierung von AK I und AK II hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften für verschiedene JA-Metabolite (JAME, JA, JA-Ile 12-OH-JA und OPDA) und für das strukturell verwandte Phytotoxin Coronatin wurde in einem ersten Vorversuch mittels indirektem ELISA die optimale Verdünnung beider AK-Lösungen in Kombination mit der optimalen Menge an JA-BSA-Konjugat für die ELISA-Plattenbeschichtung ermittelt. Hierfür wurden die Wells einer ELISA-Platte mit variierenden Mengen JA-BSA-Konjugat (0,1 µg; 0,05 µg bzw. 0,02 µg) beschichtet und dazu AK I jeweils in den Verdünnungsstufen 1:10.000; 1:25.000; 1:50.000 bzw. 1:100.000 eingesetzt (siehe Abb. 3.6). Zur Kontrolle wurden parallel dazu Versuche mit ungereinigtem Serum in den gleichen Verdünnungsstufen durchgeführt. Wie der graphischen Darstellung zu entnehmen ist, war für den kompetitiven ELISA zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von AK I eine Verdünnung der AK-Lösung von 1:100.000 bei einer Plattenbeschichtung von 0,02 µg JA-BSA-Konjugat/Well optimal, da hier die gemessene OD_{405} etwa 1,0 betrug. Für AK II wurde im indirekten ELISA bei gleicher Plattenbeschichtung die Verdünnungsstufe 1:10.000 als optimal bestimmt (Daten nicht gezeigt).

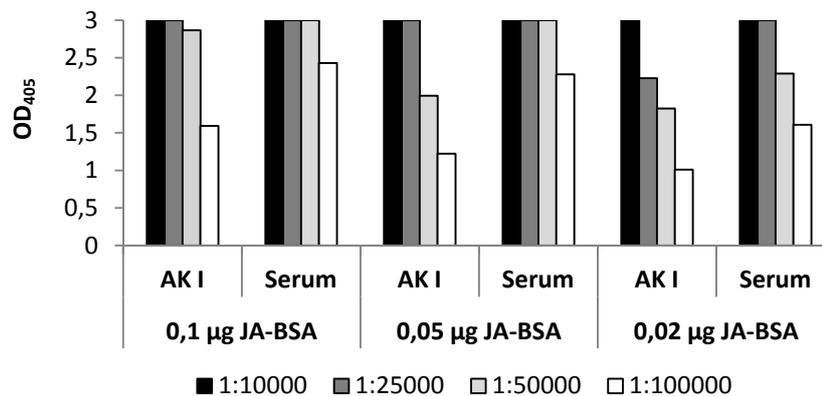


Abb. 3.6: Ergebnisse des indirekten ELISA zur Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen für die Charakterisierung von AK I im kompetitiven ELISA.

Bestimmung der optimalen AK-Verdünnung und Menge an immobilisiertem AG mittels indirektem ELISA. Getestet wurde die Bindung von AK I in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1.000/1:25.000/1:50.000/1:100.000) an variierende Mengen von immobilisiertem JA-BSA-Konjugat (0,1 µg/0,05 µg/0,02 µg pro Well). Als Kontrolle wurde das ungereinigte Antiserum in gleichen Verdünnungsstufen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von $n = 2$.

3.2.2.3 Charakterisierung der Anti-JA-AKs hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften

Die beiden durch unterschiedliche Aufreinigung erhaltenen polyklonalen AK-Fraktionen AK I und AK II wurden im kompetitiven ELISA auf die Bindung der JA-Metabolite JAME, JA, JA-Ile, 12-OH-JA und OPDA und des Phytotoxins Coronatin, dem funktionellen und strukturellen Analogon von JA-Ile (Sheard *et al.*, 2010), getestet. Abb. 3.7 zeigt die für beide AK-Fraktionen nach Vorinkubation mit 21 verschiedenen Konzentrationen (Konzentrationsbereich von 0 µM bis 450 µM) der sechs zu testenden AGs aufgenommenen ELISA-Kurven.

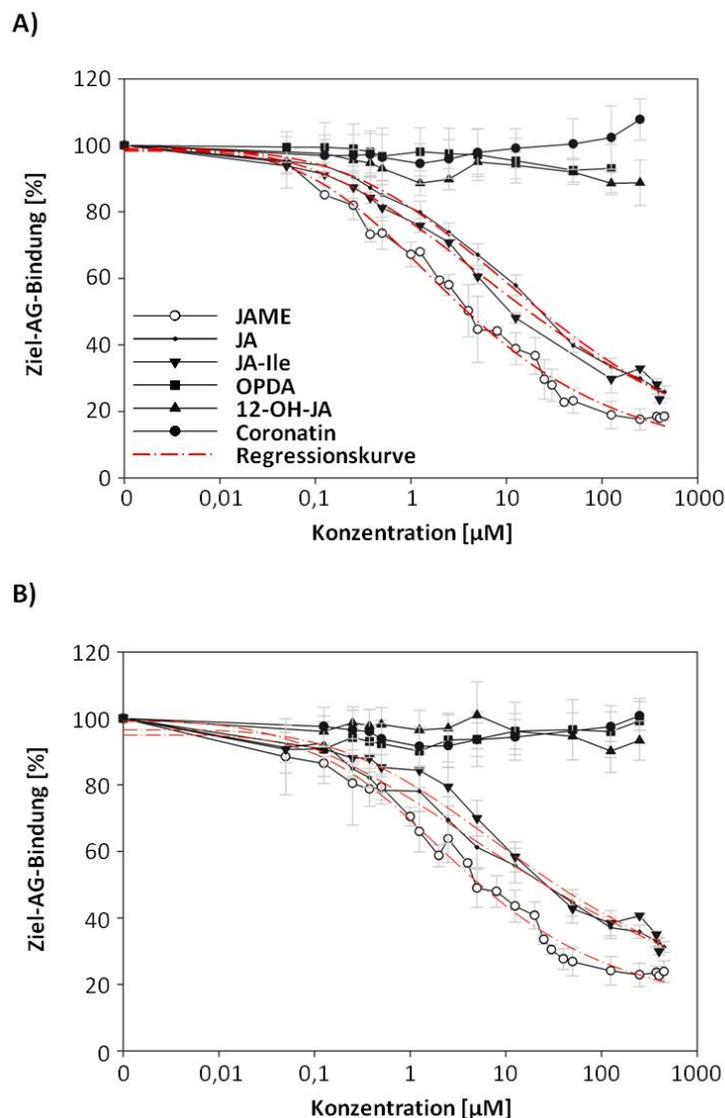


Abb. 3.7: Charakterisierung der polyklonalen Kaninchen-Anti-JA-AK-Fraktionen.

Mittels kompetitivem ELISA wurden die Bindungseigenschaften von AK I (A) und AK II (B) gegenüber JAME, JA, JA-Ile, OPDA, 12-OH-JA und Coronatin ermittelt. Die Menge an immobilisiertem AG betrug dabei $0,02 \mu\text{g}$ JA-BSA/Well, die freien AGs wurden in einem Konzentrationsbereich von $0 \mu\text{M}$ bis $450 \mu\text{M}$ eingesetzt (Skalierung der x-Achse logarithmisch) und die AK-Fraktionen in den Verdünnungen 1:100.000 (AK I) bzw. 1:10.000 (AK II) verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n \geq 14$). Ein Teil der Daten wurden von S. Forner aufgenommen. Abbildung modifiziert nach Mielke *et al.* (2011).

Vergleicht man die für AK I und AK II aufgenommenen Kurven, so zeigen beide ein sehr ähnliches Bindungsverhalten. Die nach Vorinkubation mit OPDA, 12-OH-JA und Coronatin aufgenommenen Kurven verliefen bei beiden AK-Fraktionen mehr oder weniger parallel zur x-Achse, was darauf hinweist, dass durch AK I und AK II keine Bindung dieser AGs erfolgte. Im Gegensatz dazu deuten die sigmoiden Kurvenverläufe der mit JAME, JA und JA-Ile vorinkubierten AK-Fraktionen daraufhin, dass sowohl AK I als AK II diese AGs erkannten und banden. Zur Abschätzung der Avidität, mit der die AK-Varianten die drei AGs banden, wurden aus den sigmoiden Kurvenverläufen die entsprechenden IC_{50} -Werte bestimmt. Die

ermittelten IC_{50} -Werte für die Bindung von JAME, JA und JA-Ile lagen für AK I wie auch für AK II im μM -Bereich (siehe Tab. 3.2). Hierbei wurde der kleinste Wert mit $3,8 \mu\text{M}$ (AK I) bzw. $4,2 \mu\text{M}$ (AK II) für JAME ermittelt, gefolgt von JA-Ile mit IC_{50} -Werten von $25,9 \mu\text{M}$ (AK I) bzw. $25,7 \mu\text{M}$ (AK II) und JA mit Werten von $31,26 \mu\text{M}$ (AK I) bzw. $34,62 \mu\text{M}$ (AK II). Zwischen beiden AK-Fraktionen wurde auch beim Vergleich der berechneten IC_{50} -Werte kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Wahl der Aufreinigungsmethode beeinflusste demnach die Bindungseigenschaften des polyklonalen Anti-JA-AK nicht. Berücksichtigt man den Proteingehalt der AK-Fraktionen und die Verdünnungsfaktoren beim kompetitiven ELISA erhält man als Endkonzentration der AK-Fraktionen im kompetitiven ELISA Werte von $8,3 \text{ pg Protein/ml}$ für AK I und 4 pg Protein/ml für AK II (siehe Tab. 3.3). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die spezifische Aufreinigungsmethode mit an Sepharose gebundenem JA-BSA bei AK-Fraktion AK II eine leichte Anreicherung von Ziel-AG-spezifischen AK-Populationen erfolgte. Da sich die AK-Varianten ansonsten hinsichtlich ihrer Qualität nachweislich nicht wesentlich voneinander unterscheiden, ist anzunehmen, dass beide in gleichem Maße für eine Immunmarkierung von Jasmonaten in pflanzlichen Gewebeschnitten geeignet wären.

Tab. 3.2: Auflistung der für AK I und AK II ermittelten IC_{50} -Werte.

Aus den sigmoiden Kurvenverläufen für JAME, JA und JA-Ile wurden unter Verwendung der SigmaPlot-Software mit der 4PL-Regression die IC_{50} -Werte berechnet. Tabelle modifiziert nach Mielke *et al.* (2011).

AG	IC_{50} AK I [μM]	IC_{50} AK II [μM]
JAME	3,76	4,19
JA-Ile	25,86	25,73
JA	31,26	34,62

Tab. 3.3: Eigenschaften der AK-Fraktionen hinsichtlich Proteingehalt, Verdünnungsfaktoren und der sich daraus ergebenden im kompetitiven ELISA eingesetzten Endkonzentration (pg Protein/ml).

AK-Fraktion	Proteingehalt ($\mu\text{g/ml}$)	Verdünnungsfaktor im ELISA	Endkonzentration im ELISA (pg/ml)
AK I	0,83	1:100.000	8,3
AK II	0,04	1:10.000	4,0

3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Jasmonaten in pflanzlichem Probenmaterial

3.2.3.1 Etablierung einer Methode zur Fixierung und Immunmarkierung des pflanzlichen Probenmaterials

Durch kompetitive Immunoassays konnte gezeigt werden, dass sich die beiden untersuchten AK-Fraktionen bezüglich ihrer Bindungseigenschaften für JAME, JA, JA-Ile, OPDA, 12-OH-JA und Coronatin nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Sowohl AK I als auch AK II banden an JAME, JA und JA-Ile, wohingegen keine Erkennung von OPDA, 12-OH-JA und Coronatin erfolgte. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass sich beide AKs gleichermaßen für eine Immunmarkierung dieser JA-Verbindungen in pflanzlichen Geweben eignen.

Für den zell- und gewebespezifischen Nachweis von Jasmonaten unter Anwendung der aufgereinigten polyklonalen AKs war es in einem nächsten Schritt notwendig, eine geeignete Methode für die Fixierung und Einbettung von pflanzlichem Gewebe zu etablieren. Das Hauptproblem bei der *in situ*-Detektion von Phytohormonen ist ihre Immobilisierung innerhalb von Zellen bzw. Geweben (siehe Punkt 3.1.1). Das AG ist dabei einerseits so zu fixieren, dass es im Verlauf der weiteren Probenbearbeitung nicht ausgewaschen werden kann, darf dabei andererseits jedoch nicht seine Antigenität einbüßen. Darüber hinaus erfordert die zell- bzw. gewebespezifische Untersuchung von Jasmonaten den Erhalt der zellulären Struktur des zu untersuchenden Gewebes. Sowohl die Methodenetablierung, als auch die anschließende Anwendung dieser für eine immunhistochemische Untersuchung der wundinduzierten Biosynthese von Jasmonaten in Blättern von *S. lycopersicum* erfolgte in Zusammenarbeit mit S. Forner im Rahmen ihrer Diplomarbeit zur Untersuchung der Zellspezifität der lokalen Wundantwort in Tomate (Forner, 2009). Im Folgenden werden nur die für die vorliegende Dissertation wichtigen Endergebnisse der von S. Forner durchgeführten Experimente im Überblick zusammengefasst. Detaillierte Informationen zum Vergleich verschiedener Fixiermittel für die Immobilisierung von JA in Blattproben von *S. lycopersicum* nach Verwundung und zur Analyse der Fixierungseffizienz von JA an BSA bei Verwendung von in PBS-Puffer gelöstem EDC sind in der entsprechenden Publikation (Mielke *et al.*, 2011) nachzulesen.

Es wurde ermittelt, dass für die Fixierung von Jasmonaten in dem zu untersuchenden Blattmaterial von *S. lycopersicum* 4 % (v/v) EDC am geeignetsten ist (Prinzip der Kopplung siehe Punkt 3.2.1.1). Hierbei ist anzumerken, dass bei der Fixierung mit EDC die Säurefunktion von Jasmonaten aktiviert und unter Ausbildung einer Säureamidbindung mit der Aminogruppe eines Proteins verknüpft wird. JAME kann nicht fixiert werden, da dessen Säuregruppe verestert vorliegt. Somit wird JAME im Verlauf der Probenaufbereitung ausgewaschen. JA, JA-Ile, OPDA und 12-OH-JA verfügen hingegen über eine freie Säurefunktion, die für die kovalente Verknüpfung mit Proteinen genutzt werden kann. Die Immunmarkierung von JA-Verbindungen erfolgte in Semidünnschnitten. Dazu wurden zum Vergleich beide AK-Varianten verwendet, wobei diese hierfür in den Verdünnungsstufen 1:1.000 (AK I) bzw. 1:200 (AK II) eingesetzt wurden. Als sekundärer AK diente ein mit dem Fluoreszenz-

farbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-AK, so dass der Nachweis der AK-Bindung über das grüne Fluoreszenzsignal erfolgte. Da mit beiden AK-Varianten vergleichbare Ergebnisse bei der immunhistochemischen Detektion von Jasmonaten in Blattschnitten erzielt wurden (Forner, 2009), werden im Folgenden repräsentativ nur die nach Immunmarkierung mit AK I aufgenommenen Mikrographen dargestellt. Die ausführlichen Protokolle für die Durchführung der Probenfixierung, Einbettung und Immunmarkierung können dem Punkt 2.11 entnommen werden.

3.2.3.2 Spezifität der immunhistochemischen Detektion von JA/JA-Ile in *S. lycopersicum*-Blättern unter Verwendung des AK I

Wie in Punkt 3.2.1 erläutert handelt es sich bei einem polyklonalen AK um eine Mischpopulation von verschiedenen IgG-AKs. Diese können sich in ihren AG-Spezifitäten mitunter stark voneinander unterscheiden. Mit kompetitiven Immunoassays wurde zwar eine Charakterisierung der AKs hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften bezüglich des zu untersuchenden AGs bzw. der Molekülklasse vorgenommen. Alle in einem Gewebeschnitt vorhandenen potentiellen AGs können damit jedoch nicht abgedeckt werden. Außerdem sind es nicht nur einzelne Moleküle, sondern teilweise erst deren Zusammenlagerung zu makromolekularen Strukturen, die im biologischen Präparat entsprechende Epitope für einzelne AK-Populationen des polyklonalen AK bereitstellen. Wie in Punkt 3.2.3.1 erläutert erfolgt in eingebetteten Pflanzengeweben keine immunhistochemische Detektion von JAME, da hier die Säuregruppe verestert vorliegt und daher nicht durch das Fixativ EDC immobilisiert werden kann. Um ausschließen zu können, dass der AK I neben JA/JA-Ile auch unbekannte Verbindungen bzw. Strukturen erkennt, war es notwendig in Vorversuchen Positiv- und Negativkontrollen zu generieren.

In den ersten Experimenten wurde daher Blattmaterial der *S. lycopersicum*-Mutante *spr2* verwendet, die auf Grund eines Defektes in der ω 3-Fettsäure-Desaturase keine 18:3-Fettsäuren bilden kann und somit JA-defizient ist (Li *et al.*, 2003). Als geeignete Positiv- und Negativkontrollen wurden Blätter dieser Mutante mit Lösungen EDC-aktivierter JA im Konzentrationsbereich von 0 bis 500 μ M infiltriert. Die Proben wurden wie in Punkt 3.2.3.1 beschrieben für die Immunmarkierung mit AK I als primärem und dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-AK als sekundärem AK aufbereitet. In Gewebeschnitten von Blättern, die mit EDC-aktivierter JA infiltriert wurden, trat eine deutliche Fluoreszenzmarkierung auf (siehe Abb. 3.8). Dabei war mit steigender JA-Konzentration der infiltrierten Lösung ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals sichtbar. Nach Infiltration der 25 μ M-Lösung konnte bereits ein schwaches Signal beobachtet werden (siehe Abb. 3.8B), die stärkste Fluoreszenzmarkierung trat jedoch in den mit 500 μ M JA-Lösung infiltrierten Blattchnitten auf (siehe Abb. 3.8D). Blattgewebe, das mit einer JA-freien Lösung infiltriert wurde, wies keine Markierung auf (siehe Abb. 3.8A). Wurde der AK I zuvor durch Inkubation mit JA-BSA (8 μ g/ml) abgesättigt, brachte dieser bei JA-infiltriertem Gewebe – selbst bei der 500 μ M JA-Lösung – kein Fluoreszenzsignal (siehe Abb. 3.8E). Somit war die Fluoreszenz-

markierung im Blattgewebe der *spr2*-Mutante eindeutig auf die Bindung des AK I an JA zurückzuführen. Es lagen keine anderen Verbindungen in diesem Pflanzengewebe vor, die vom AK erkannt und gebunden wurden.

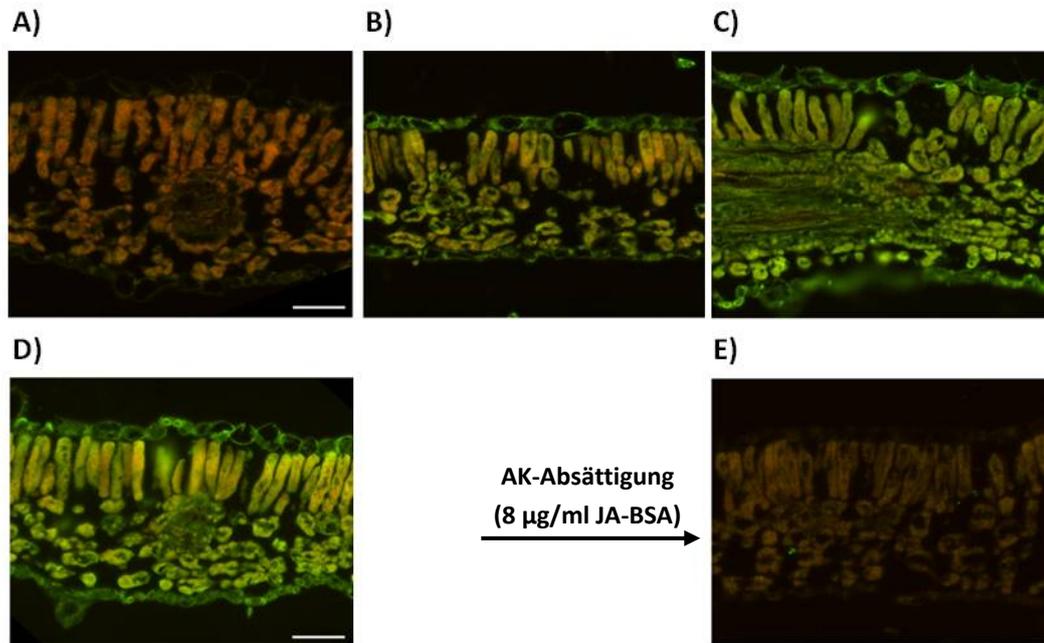


Abb. 3.8: Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Detektion von JA in Blättern der JA-defizienten *S. lycopersicum*-Mutante *spr2* nach Infiltration mit EDC-aktivierter JA.

Blätter der jüngsten Triebe von sechs Wochen alten *spr*-Mutanten wurden mit EDC-aktivierten JA-Lösungen der Konzentration 0 μM (A), 25 μM (B), 100 μM (C) und 500 μM (D, E) infiltriert. Bei den in D und E dargestellten Schnitten handelt es sich um Parallelschnitte von der gleichen eingebetteten Probe. Alle Gewebeprobe wurden wie in Mielke *et al.* (2011) beschrieben für die Immunmarkierung aufbereitet. Zur JA-Markierung wurde der gereinigte AK I in einer Verdünnung von 1:1.000 bei Semidünnschnitten eingesetzt (A-D). Als Kontrolle wurde der AK I vor der Immunmarkierung mit 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ JA-BSA abgesättigt. Als sekundärer AK wurde ein Alexa Fluor 488-gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen-AK verwendet. Die Maßstabsbalken in A und D repräsentieren eine Größe von 50 μm und gelten auch für alle anderen Bilder, die in der gleichen Vergrößerung dargestellt sind. Die Abbildung wurde in leicht abgewandelter Form aus Mielke *et al.* (2011) entnommen.

Weiterhin galt es auszuschließen dass, der AK an unbekannte endogene Verbindungen bindet, die zusätzlich zu den Jasmonaten in verwundeten Blättern akkumulieren. Dazu wurden neben den Infiltrationsversuchen Verwundungsexperimente mit Blättern von Wildtyp-Tomatenpflanzen der Sorte Castlemart und der JA-defizienten *S. lycopersicum*-Mutanten *spr2* und *acx1* durchgeführt. Im Gegensatz zur *spr2*-Mutante, die auf Grund ihres Defektes im Fettsäuremetabolismus weder JA, noch OPDA generieren kann, weist die *acx1*-Mutante einen Defekt in der Acyl-CoA-Oxidase auf. Dadurch ist die JA-Biosynthese erst ab dem Reaktionsschritt der peroxisomalen β -Oxidation gestört, so dass von dieser Mutante zwar kein JA, jedoch noch OPDA generiert werden kann (Li *et al.*, 2005). Blätter dieser Genotypen wurden mit einer Pinzette quer über die Mittelrippe gequetscht. Für die Immunmarkierung wurde 30 min nach erfolgter Verwundung etwa 1 cm entfernt von der Verwundungsstelle Blattgewebe entnommen und sofort fixiert.

In den Gewebeschnitten des Wildtyps war nach mechanischer Verwundung ein sehr ausgeprägtes Fluoreszenzsignal in allen Zellen zu beobachten (siehe Abb. 3.9A). Demgegenüber blieb eine Immunmarkierung in den Gewebeschnitten der verwundeten Blätter der *spr2*- und *acx1*-Mutante aus (siehe Abb. 3.9B). Auf Grund der fehlenden Fluoreszenz im Gewebe der JA-defizienten Mutanten und der unter Punkt 3.2.2 beschriebenen Bindungseigenschaften des Anti-JA-AK kann das starke Fluoreszenzsignal in den verwundeten Wildtyp-Blättern als spezifische Detektion für das Vorkommen von JA/JA-Ile gewertet werden. Auf Grund der fehlenden Immobilisierung durch das Fixativ EDC wird JAME im Gewebeschnitt nicht nachgewiesen.

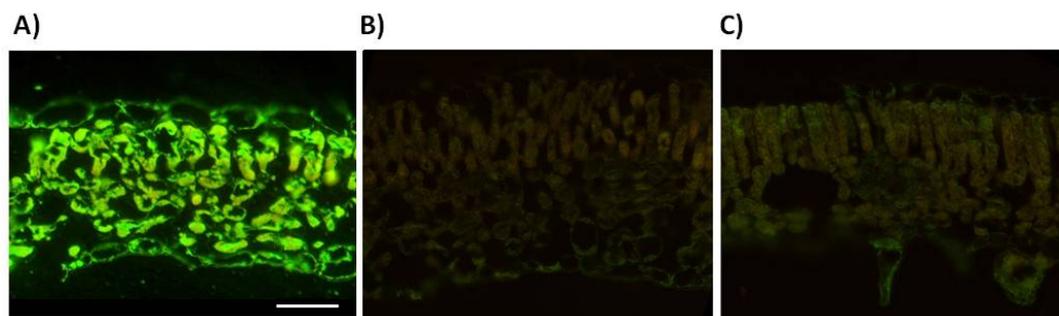


Abb. 3.9: Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Detektion von JA/JA-Ile in verwundeten Blättern verschiedener *S. lycopersicum*-Genotypen.

Voll entwickelte Blätter der jüngsten Triebe von sechs Wochen alten Wildtyp-Tomatenpflanzen der Sorte Castlemart (A), der *spr2*-Mutante (B) und der *acx1*-Mutante (C) wurden mit einer Pinzette durch dreimaliges Quetschen quer über die Mittelrippe verwundet. Die Gewebeprobe wurde 30 min nach Verwundung etwa 1 cm von der Verwundungsstelle entfernt aus der Blattspreite entnommen und wie in Mielke *et al.* (2011) beschrieben für die Immunmarkierung von JA/JA-Ile mit AK I (1:1000 verdünnt) aufbereitet. Als sekundärer AK wurde der Alexa Fluor 488-gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen-AK verwendet. Der Maßstab in A repräsentiert eine Größe von 50 μm und gilt auch für die anderen mikroskopischen Aufnahmen. Die Abbildung wurde in leicht abgewandelter Form aus Mielke *et al.* (2011) entnommen.

3.2.3.3 Anwendung des spezifischen Antikörpers für die Untersuchung der Wundantwort in *S. lycopersicum*-Blättern

Um unter Verwendung des gewonnenen Anti-JA-AK das Vorkommen und die Verteilung von JA/JA-Ile nach mechanischer Verwundung auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen, wurden Verwundungsexperimente mit Blättern von Wildtyp-Tomatenpflanzen (Castlemart) durchgeführt. Hierzu wurden die Blätter mit einer Pinzette durch Quetschen über die Mittelrippe mechanisch verletzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung (0 min; 1 min; 5 min; 10 min; 15 min; 240 min) Gewebeprobe in unterschiedlichen Abständen von der Verwundungsstelle entnommen. Zusätzlich wurden zu gleichen Zeitpunkten Gewebeprobe aus einem unverwundeten systemischen Blatt der verwundeten Pflanzen entnommen. Die Gewebeprobe wurden sofort nach Entnahme fixiert, eingebettet, geschnitten und für die Immunmarkierung mit dem primären AK (AK I) und sekundären AK (Alexa Fluor 488-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-AK) inkubiert. Sowohl

nahe der Verwundungsstelle, als auch am distalen Blattende war zu allen Zeitpunkten nach Verwundung ein deutliches Fluoreszenzsignal nachweisbar (siehe Abb. 3.10A bis C), welches auf einen Anstieg des JA und/oder JA-Ile Gehaltes zurückzuführen war. Die Fluoreszenzmarkierung war bereits 5 min nach Verwundung deutlich ausgeprägt. Das stärkste Signal war 15 min nach Verwundung zu beobachten, wohingegen nach Ablauf einer Zeitspanne von 4 h nach Verwundung die Intensität des Signals, vor allem in den Proben vom distalen Blattende, wieder deutlich schwächer ausgeprägt war. Wie in den Mikrographen zu sehen ist, trat das auf die wundinduzierte Akkumulation von JA/JA-Ile zurückzuführende Fluoreszenzsignal gleichmäßig verteilt in allen Zelltypen, sowohl der Mittelvene, als auch der Blattspreite auf. In den Gewebeschnitten der systemischen Blätter konnte ab 5 min nach erfolgter Verwundung nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden (Abb. 3.10D). Hier scheinen die zellulären JA-/JA-Ile-Konzentrationen weitgehend an der Nachweisgrenze des AK zu liegen.

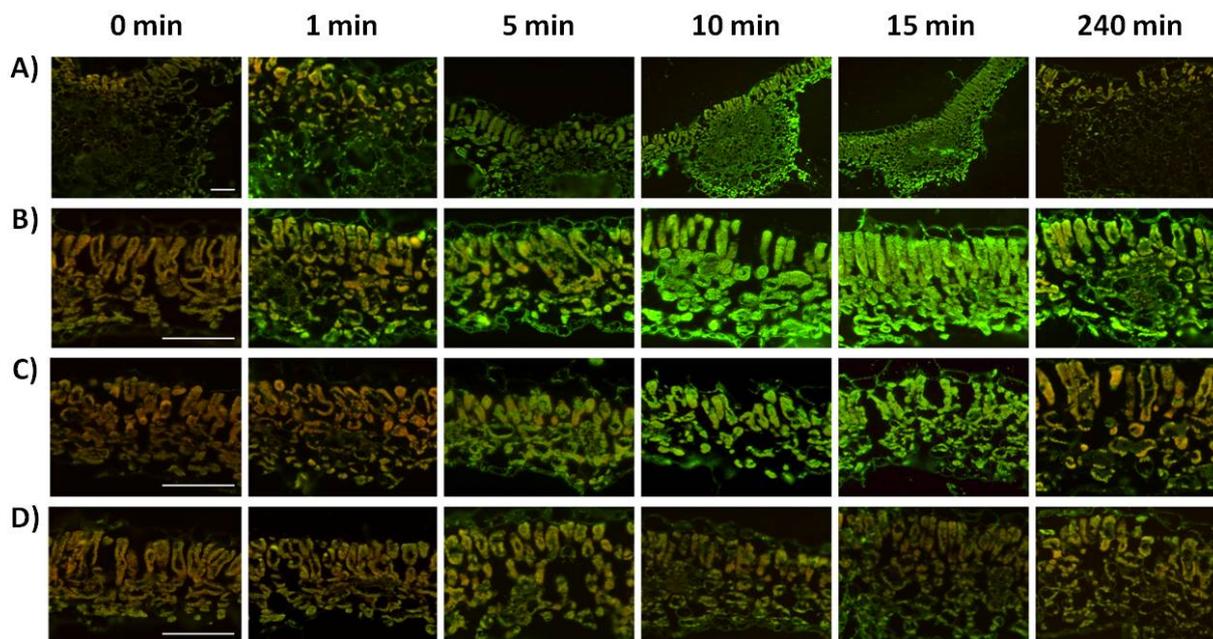


Abb. 3.10: Immunhistochemische Detektion von JA/JA-Ile in Blättern von *S. lycopersicum*-Wildtyp nach Verwundung.

Voll entwickelte Blätter der jüngsten Triebe von 6 Wochen alten Tomatenpflanzen der Sorte Castlemart wurden mit einer Pinzette im Bereich der Blattspitze quer über die Mittelrippe dreimalig gequetscht. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0; 1; 5; 10; 15 und 30 min) nach Verwundung wurden an verschiedenen Stellen Stücke vom Blattgewebe entnommen und sofort fixiert. Etwa 1 cm entfernt von der Verwundungsstelle wurde Gewebe der Mittelvene (A) bzw. der Blattspreite (B) entnommen. Zusätzlich wurde Gewebe der Blattspreite vom distalen Ende etwa 3,5 cm entfernt von der Verwundungsstelle (C) bzw. von einem unverwundeten systemischen Blatt (D) entnommen. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme mit EDC fixiert und für die immunhistochemische Detektion von JA/JA-Ile wie beschrieben vorbereitet (Mielke *et al.*, 2011). Zur Immunmarkierung wurde die Reinigungsfraction I des Anti-JA-AK (AK I) in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet. Als sekundärer AK wurde ein Alexa Fluor 488-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-AK verwendet. Die Maßstabbalken in der ersten Spalte (0 min) repräsentieren eine Größe von 50 μm und gelten für alle mikroskopischen Aufnahmen der jeweiligen Zeile. Die Abbildung wurde in leicht abgewandelter Form aus Mielke *et al.* (2011) entnommen.

3.3 Diskussion

3.3.1 Die Immunisierung von Kaninchen mit JA-BSA-Konjugat führt zu Antiseren mit putativ JA-spezifischen AKs

Um die Wirkungsweise von Phytohormonen zu verstehen, ist es notwendig, ihr räumliches und zeitabhängiges Vorkommen zu untersuchen. Für derartige Lokalisationsstudien sind Techniken erforderlich, die einen präzisen Nachweis der zell- und gewebespezifischen Verteilung der Wachstumsregulatoren ermöglichen. Wie in Punkt 3.1 aufgezeigt, ist die IHC eine geeignete Methode dafür. Dabei ist die Verfügbarkeit eines spezifischen AK eine wichtige Voraussetzung. Da für die *in situ*-Lokalisation von JA zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit keine spezifischen AKs zur Verfügung standen (siehe Punkt 3.1.3), wurden im ersten Teil der Promotionsarbeit polyklonale AKs in Kaninchen für die immunhistochemische Visualisierung von JA generiert. Dazu wurde zur Immunisierung der Versuchstiere an BSA gekoppelte JA eingesetzt (siehe Punkt 3.2.1.1). Die erfolgreiche Verwendung von BSA als geeignetes Trägerprotein zur Generierung polyklonaler AKs gegen niedermolekulare Phytohormone war in der Literatur bereits hinreichend dokumentiert (Weiler, 1980, 1981, 1982; Zavala & Brandon, 1983; Knöfel *et al.*, 1984; Sossountzov *et al.*, 1988; Dewitte *et al.*, 1999) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit für JA erfolgreich genutzt werden.

Durch etwa 13 Wochen nach Erstimmunisierung vorgenommene Titerkontrollen wurde sichergestellt, dass die Immunisierung der Versuchstiere zu einer effektiven Immunantwort gegen das AG JA-BSA geführt hatte (siehe Punkt 3.2.1.1). Dabei wurde im indirekten ELISA nicht nur gezeigt, dass beide Antiseren an immobilisiertes JA-BSA-Konjugat banden, sondern auch dass keine Bindung an BSA allein erfolgte. Daraus lässt sich schließen, dass in beiden Versuchstieren AK-Populationen generiert wurden, die Epitope der Phytohormon-Komponente (JA) des eingesetzten AG JA-BSA-Konjugat erkennen und nicht nur an antigene Determinanten auf der Oberfläche des Trägerproteins binden. Prinzipiell waren damit beide Antiseren für die Gewinnung putativ JA-spezifischer AKs geeignet. Jedoch wurde zusätzlich im Immunassay gezeigt, dass der Serentiter von Versuchstier 2 im Vergleich zum Versuchstier 1 eine höhere Avidität gegenüber dem JA-BSA-Konjugat aufwies. Diese Beobachtung kann mit der individuell ablaufenden Immunreaktion der Versuchstiere gegen das injizierte AG erklärt werden. Zum einen erfolgt im Rahmen der Antikörperreifung durch Selektion eine Abnahme der AK-Heterogenität. Hierbei werden AKs, die das AG mit geringer Avidität binden, aussortiert, so dass erst in der Spätphase der Infektion ein AK-Gemisch mit hoher Avidität übrig bleibt (Eisen & Siskind, 1964; Werblin *et al.*, 1973). Somit könnten sich die Immunreaktionen beider Versuchstiere zum Zeitpunkt der Titerkontrollen in unterschiedlichen Phasen befunden haben. Zum anderen bilden verschiedene Individuen gegen das gleiche AG im Verlauf ihrer Immunantwort keinen identischen Satz an AKs aus. Neben Unterschieden in der Spezifität kann diese chargenabhängige Schwankung zwischen den AK-Kollektiven auch zu Unterschieden in deren Avidität führen. Auf Grund der geringeren Avidität von Antiserum 1 wurde für die Gewinnung des JA-spezifischen polyklonalen AK das Serum von Kaninchen 2 ausgewählt.

3.3.2 Die Bindungseigenschaften der Anti-JA-AKs werden durch die Aufreinigungsmethode nicht beeinflusst

Um die IgG-Fraktion von anderen Serumbestandteilen abzutrennen, wurde eine Aufreinigung mittels Affinitätsäulenchromatographie durchgeführt. Zur Wahl der optimalen Reinigungsprozedur wurden dabei zum Vergleich zwei verschiedene Aufreinigungsmethoden angewandt:

- (i) eine unspezifische Aufreinigung der Gesamt-IgG-Fraktion aus dem Serum über eine Protein A-gekoppelte Säulenmatrix (AK I) und
- (ii) eine AG-spezifische AK-Aufreinigung über eine JA-BSA-Konjugat-gekoppelte Säulenmatrix (AK II).

Die gewonnenen AK-Fraktionen wurden mittels kompetitivem ELISA hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften für fünf verschiedene JA-Metabolite (JA, JAME, JA-Ile, 12-OH-JA und OPDA) und das Phytotoxin Coronatin charakterisiert (siehe Punkt 3.2.2). Beide AK-Fraktionen zeigten eine spezifische Bindung an JA, JAME und JA-Ile (sigmoider Verlauf der ELISA-Kurven), nicht jedoch an OPDA, 12-OH-JA und Coronatin (parallel zur x-Achse verlaufende ELISA-Kurven) (siehe Abb. 3.7). Somit könnten sowohl der Cyclopentanonring, als auch die Pentenylseitenkette für die AK-Spezifität bedeutsame Strukturmerkmale sein, da dies die gemeinsamen Charakteristika der drei durch den AK erkannten AGs sind. OPDA hingegen ist eine Cyclopentenonverbindung, 12-OH-JA besitzt eine Hydroxylgruppe am C12-Atom der Pentenylseitenkette und Coronatin besitzt keinen Pentenylrest und zusätzlich zum Cyclopentanonring einen Cyclohexenring.

Die Spezifität der hergestellten polyklonalen AKs für JAME, JA und JA-Ile ist ein bedeutender Aspekt für die Nutzung für einen physiologisch relevanten IHC-Nachweis von Jasmonaten in Pflanzengeweben. Freie JA, ihr Methylester und das Isoleucin-Konjugat sind in der JA-Signaltransduktion miteinander verknüpft. Von Vorteil war jedoch auch, dass die AKs weder 12-OH-JA noch die JA-Vorstufe OPDA bindet. Für beide Verbindungen wurde in Geweben verschiedener pflanzlicher Spezies ein konstitutives Vorkommen nachgewiesen (Hause *et al.*, 2000; Stenzel *et al.*, 2003b; Miersch *et al.*, 2008). Eine AK-Bindung dieser Metabolite würde daher den IHC-Nachweis der physiologisch aktiven Jasmonate überdecken. Zudem kann es unter verschiedenen Bedingungen zu einem Anstieg im Gehalt von OPDA und 12-OH-JA kommen (zur Übersicht siehe Punkt 1.1), der mit dem stressinduzierten Anstieg von JA überlappt. Da weder OPDA noch 12-OH-JA von den aufgereinigten AK-Fraktionen gebunden werden, kann auch deren stressinduzierte Akkumulation in pflanzlichen Geweben nicht zu unspezifischen Signalen bei der Anwendung von AK I bzw. AK II führen. Damit stellen die in dieser Arbeit generierten AKs potentielle Werkzeug für den spezifischen JA-Nachweis mittels IHC dar.

Wie mittels kompetitivem ELISA gezeigt (siehe Tab. 3.2), weisen beide AK-Fraktionen gleiche Bindungseigenschaften auf. Somit hatte die deutlich aufwendigere Aufreinigung mittels immobilisiertem JA-BSA-Konjugat im Vergleich zur einfacheren und schnelleren, aber unspezifischen Aufreinigung mittels Protein A (siehe Tab. 3.1) keinen Einfluss auf die Spezifität der

erhaltenen AK-Fraktionen. Zieht man zusätzlich zur Bewertung der beiden Aufreinigungszusammenfassungen die AK-Ausbeute und die verwendeten Verdünnungsstufen der polyklonalen AKs in Betracht (Punkte 3.2.1.2 und 3.2.3.1), so ist die unspezifische Aufreinigung der spezifischen vorzuziehen. Obwohl durch die AG-spezifische Aufreinigung über die JA-BSA-Konjugat-gekoppelte Sephadex-Säule eine geringfügige Anreicherung JA-spezifischer AK- Populationen erzielt werden konnte, sprechen sowohl der vergleichsweise schnelle und einfache Ablauf, als auch der wesentlich geringere Bedarf an JA-BSA-Konjugat für die unspezifische Reinigungsprozedur mittels Protein A-Agarose.

3.3.3 In EDC-fixierten Pflanzengeweiben binden die gewonnenen AKs an JA und JA-Ile

Der immunhistochemische Nachweis von Phytohormonen ist auf Grund ihres geringen Molekulargewichts und ihrer guten Wasserlöslichkeit im Vergleich zu makromolekularen Verbindungen erschwert. Daher war neben der Spezifität der isolierten polyklonalen AKs eine weitere Voraussetzung für deren erfolgreiche Anwendung zur Immunmarkierung von JA die Etablierung einer geeigneten Fixierungsmethode (siehe Punkt 3.1.1). Im Vergleich zu chemischen Fixierungsmethoden sind die physikalischen, wie z. B. die Cryofixierung, zur Immobilisierung kleiner Moleküle besser geeignet, jedoch bedürfen diese einer speziellen technischen Ausstattung (Hause *et al.*, 2006). Die konventionell zur chemischen Fixierung verwendeten Aldehyde (Hause *et al.*, 2006) wirken durch Ausbildung von Methylenbrücken zwischen zwei primären Aminen (im Fall von Glutaraldehyd) oder zwischen einem primären bzw. sekundären Amin und einer Carbonylverbindung (im Fall von Formaldehyd und Paraformaldehyd) (Kiernan, 2000) und sind daher nicht für die Immobilisierung aller Phytohormone geeignet. Zwar sind in der Literatur verschiedene Ansätze dokumentiert, bei denen eine Immobilisierung von Phytohormonen wie IAA und ABA mit Paraformaldehyd angestrebt wurde (Schlicht *et al.*, 2006; Verdier *et al.*, 2013), jedoch ist aus Studien mit tierischen Peptidhormonen (Histamin, Endorphin und Trijodthyronin) bekannt, dass im Vergleich zur Aldehydfixierung eine Fixierung mittels EDC wesentlich effektiver ist (Csaba *et al.*, 2006). Weiterhin ist belegt, dass EDC auch ein geeignetes Fixativ zur Immobilisierung sehr kleiner Moleküle mit Säurefunktionen, wie z. B. miRNA (Pena *et al.*, 2009) und ABA (Sossountzov *et al.*, 1986), darstellt. Daher wurde zur Immobilisierung von JA eine Methode zur chemischen Fixierung mittels EDC etabliert (siehe Punkte 2.11.2 und 3.2.3.1). In Vorversuchen zur vergleichenden Anwendung verschiedener Fixative wurde gezeigt, dass EDC das einzige der getesteten Fixative war, das zur effektiven Immobilisierung von wundinduziert gebildetem JA in Blättern von *S. lycopersicum* führte (Daten nicht gezeigt, siehe Mielke *et al.*, 2011). Die Verwendung von EDC als Fixativ für JA ist insofern von Bedeutung, da auch die Kopplung des AGs an das Trägerprotein BSA zur Gewinnung eines geeigneten Immunogens durch EDC erfolgte (siehe Punkt 2.10.1).

Bei der Fixierung mit EDC erfolgt die Verknüpfung durch Ausbildung von Säureamidbindungen zwischen Säuregruppen von Jasmonaten und Aminogruppen von Proteinen. Sie führt im Probengewebe somit zur Immobilisierung von JA, JA-Ile, OPDA und 12-OH-JA. Die

beiden zuletzt genannten werden jedoch, wie erläutert, nicht von den Anti-JA-AKs erkannt. Obwohl beide AK-Fraktionen neben JA und JA-Ile auch den Methylester von JA binden können, wird JAME bei der gewählten Fixierungsmethode mit EDC nicht immobilisiert, da hier die Säurefunktion verestert vorliegt. Daher wird der Methylester bei der Probenaufbereitung aus dem zu analysierenden Pflanzenmaterial ausgewaschen und folglich nicht markiert. Zwar wurde für verschiedene Pflanzenspezies gezeigt, dass in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand, vom Gewebe- bzw. Organtyp und/oder vom Einwirken externer Reize auch JAME auftritt bzw. akkumuliert (Creelman *et al.*, 1992; Hamberg & Gardner, 1992; Mueller & Brodschelm, 1994; Wilbert *et al.*, 1998; Kondo & Tomiyama, 2000), jedoch ist nur JA-Ile die bioaktive Form der Jasmonate (Fonseca *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu JA-Ile kann JAME nicht die Interaktion der an der Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes beteiligten Proteine COI1 und JAZ1 vermitteln (Thines *et al.*, 2007) (siehe Punkt 1.2). Darüber hinaus haben transgene Ansätze (Wu *et al.*, 2008) und Versuche mit deuteriertem JAME (Tamogami *et al.*, 2008) gezeigt, dass die biologische Wirkung des Methylesters seine Spaltung in JA und die nachfolgende Umsetzung zu JA-Ile erfordert. Daher ist die *in situ*-Detektion von JAME durch den Anti-JA-AK in pflanzlichen Geweben nicht erforderlich.

Die beiden gewonnenen polyklonalen AKs sind somit leistungsstarke Werkzeuge für den immunhistochemischen Nachweis von JA und JA-Ile. JA kann zwar ebenso wie der Methylester nicht zur Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes führen (Thines *et al.*, 2007), jedoch wurde gezeigt, dass in Geweben verschiedener Pflanzenspezies ein stressinduzierter Anstieg im JA-Gehalt auch mit einem Anstieg im JA-Ile-Gehalt verknüpft ist (Wang *et al.*, 2007; Stork *et al.*, 2009; Gilardoni *et al.*, 2010; Suza *et al.*, 2010). Diese Korrelation, aber auch die induzierende Wirkung extern applizierter JA auf die Expression zahlreicher Gene (Memelink, 2009), deuten drauf hin, dass zwischen beiden Komponenten ein intrazelluläres Gleichgewicht vorliegt. Es wird angenommen, dass der Anstieg im JA-Level die Grundvoraussetzung für die Synthese des Isoleucinkonjugates ist und somit der endogene JA-Gehalt als wichtiger Faktor zur Regulation der bioaktiven Komponente dient (Suza *et al.*, 2010). Daher ist das Vorkommen von JA in Geweben auch indikativ für das Vorliegen von JA-Ile. Da der endogene JA-Gehalt in den bisher untersuchten Geweben bis zu 10-fach höher war als der von JA-Ile (Wang *et al.*, 2007; Stork *et al.*, 2009; Gilardoni *et al.*, 2010; Suza *et al.*, 2010), kann die zusätzliche Bindung der AKs an JA gewissermaßen als eine Form der Signalverstärkung für den Nachweis der eigentlichen bioaktiven Verbindung gewertet werden.

Die *in vitro* durchgeführte Charakterisierung der beiden AKs hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften für verschiedene JA-Metabolite deckt nicht alle in einem Gewebeschnitt vorhandenen potentiellen AGs ab (siehe Punkt 3.2.3.2). Folglich war nicht auszuschließen, dass die AK-Fraktionen in präparierten Gewebeproben unspezifische Kreuzreaktionen aufweisen, obwohl sie, wie beschrieben, spezifisch nur JA und JA-Ile binden sollten. Wie in Punkt 1.1 dargestellt, spielt JA eine wichtige Rolle bei der Reaktion pflanzlicher Organismen auf Umweltreize. Zu den am besten charakterisierten Prozessen gehört die Reaktion von

Pflanzen auf mechanische bzw. durch Herbivore verursachte Verwundung, in der ein transienter Anstieg im endogenen JA-Gehalt erfolgt (Wasternack, 2007). Dabei setzt die JA-Akkumulation bereits wenige Minuten nach Verwundung ein (Glauser *et al.*, 2008; Glauser *et al.*, 2009). Eine der wichtigen Modellpflanzen für die Untersuchung der Wundantwort ist *S. lycopersicum* (Stenzel *et al.*, 2003a; Wasternack *et al.*, 2006; Suza *et al.*, 2010). Deswegen wurde die Spezifität der Immunmarkierung von JA/JA-Ile mit den gewonnenen Anti-JA-AK-Fraktionen in Verwundungsexperimenten an Blättern von *S. lycopersicum* getestet. Wie in Punkt 3.1.1 dargelegt ist dabei die Einbeziehung von adäquaten Kontrolleexperimenten zur Absicherung der Versuchsergebnisse von großer Bedeutung. Daher wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen generiert, um auszuschließen, dass die AKs neben JA/JA-Ile auch unbekannte Verbindungen bzw. Strukturen im Blattgewebe erkennen und binden (siehe Punkt 3.2.3.2). Zu diesem Zweck wurden unter anderem Infiltrationsexperimente mit Blättern JA-defizienter Mutanten durchgeführt.

Die Experimente mit der JA- und OPDA-defizienten *spr2*-Mutante zeigten eindeutig, dass das nach Infiltration der Blätter mit EDC-aktivierter JA-Lösung auftretende Fluoreszenzsignal auf die Bindung der AK-Fraktionen an JA zurückzuführen ist. So trat bei Infiltration mit einer JA-freien Lösung bzw. bei Vorabsättigung der zur Immunmarkierung eingesetzten AKs mit JA-BSA-Konjugat keine Markierung auf (siehe Abb. 3.8). Weiterhin konnte durch die Immunmarkierungen von verwundeten Blättern verschiedener Tomaten-Genotypen belegt werden, dass die AKs keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit anderen unbekanntem Verbindungen aufweisen, die während der Wundantwort akkumulieren. Während in den Blättern der Wildtyp-Pflanzen 30 min nach Verwundung ein starkes Fluoreszenzsignal auftrat, konnte in den in gleicher Weise behandelten Blättern der JA-defizienten *spr2*- und *acx1*-Mutanten kein Signal nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.9). Wie in anderen Studien belegt, wird das Maximum der JA-Akkumulation in Blättern von *S. lycopersicum* innerhalb einer Zeitspanne von 1 bis 2 h nach Verwundung erreicht (Doares *et al.*, 1995; Conconi *et al.*, 1996; Stenzel, 2003a). Der Anstieg im JA-Gehalt ist dabei auch mit einem Anstieg im JA-Ile Gehalt verknüpft (Suza *et al.*, 2010). Da die *acx1*-Mutante im Gegensatz zur *spr2*-Mutante noch in der Lage ist OPDA zu generieren, stützt die nach Verwundung ausbleibende Markierung in Blattschnitten dieses Genotyps die Ergebnisse der kompetitiven Immunoassays. Die gewonnenen AKs können eindeutig zwischen JA und ihrer ebenfalls wundinduziert akkumulierenden Vorstufe OPDA (Stelmach *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2002; Buseman *et al.*, 2006) diskriminieren. Die in den Wildtyp-Blättern beobachtete Markierung kann daher auf die Bindung der spezifischen AKs an die im Verlauf der Wundantwort akkumulierenden Phytohormone JA und JA-Ile zurückgeführt werden.

3.3.4 Anwendung des Anti-JA-AKs zum Nachweis von JA/JA-Ile in der Wundantwort von Tomate

Bei der Analyse des zell- und gewebespezifischen Vorkommens von JA/JA-Ile im Verlauf der Wundantwort von *S. lycopersicum* unter Anwendung der gewonnenen Anti-JA-AKs war sowohl nahe der Verwundungsstelle, als auch am distalen Blattende zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Verwundung ein deutliches Fluoreszenzsignal nachweisbar (siehe Abb. 3.10). Die Intensität des Fluoreszenzsignals nahm dabei innerhalb der ersten Minuten nach Verwundung deutlich zu, jedoch war nach Ablauf einer Zeitspanne von 4 h nur noch eine sehr schwache Markierung zu beobachten. Dies korreliert mit den Ergebnissen quantitativer JA-Bestimmungen in verwundeten Blättern von *S. lycopersicum*, die ebenfalls einen transienten Anstieg der stressinduzierten JA-Akkumulation belegen (Doares *et al.*, 1995; Conconi *et al.*, 1996; Suza *et al.*, 2010; Heil *et al.*, 2012). Nach dem aktuellen Modell zur Wundantwort in *S. lycopersicum*, das auf Grundlage der in Tomate nachgewiesenen leitbündelspezifischen Lokalisation des JA-Biosynthese-Enzyms *SIAOC* (Hause *et al.*, 2000; Hause *et al.*, 2003; Stenzel, 2003a) und des Prosystemins (Jacinto *et al.*, 1997; Narvárez-Vásquez & Ryan, 2004) aufgestellt wurde, erfolgt die Bildung und Akkumulation von Jasmonaten präferentiell im Leitgewebe (Stenzel, 2003a; Wasternack *et al.*, 2006). Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von JA/JA-Ile unter Anwendung der gewonnenen AK-Fractionen nicht bestätigt werden. Die auf die wundinduzierte Akkumulation von JA/JA-Ile zurückzuführende Immunmarkierung trat gleichmäßig verteilt in allen Zelltypen der Blattspreite und Mittelvene auf (siehe Abb. 3.10). Dies deckt sich mit gemessenen JA-Gehalten in den Geweben nach Verwundung. Sowohl in der Blattspreite als auch der Mittelvene war ein signifikanter Anstieg im JA-Gehalt zu vermerken (Daten nicht gezeigt, siehe Mielke *et al.*, 2011). Weiterhin konnte durch *in situ*-Hybridisierung und durch Transkriptquantifizierung nachgewiesen werden, dass die wundinduzierte Expression früher JA-induzierter Gene, *SIAOC* und *SIJAZ*, räumlich mit der beobachteten JA-Akkumulation korreliert (Daten nicht gezeigt, siehe Mielke *et al.*, 2011). Weiterhin zeigten histochemische GUS-Färbungen, dass der Promotor der *SIAOC* nach Verwundung auch in Mesophyllzellen aktiv ist (Stenzel *et al.*, 2008). Da, wie erläutert, nur das Isoleuzinkonjugat der JA zur Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes (Thines *et al.*, 2007) und somit zur Freisetzung des in die Genexpression involvierten Transkriptionsfaktors MYC2 führt (Dombrecht *et al.*, 2007), ist die transkriptionelle Aktivierung dieser Gene zusätzlich ein Beleg für die Bildung des physiologisch aktiven JA-Ile in diesen Geweben.

In welcher Weise und in welcher Form die nach Verwundung beobachtete Verteilung von Jasmonaten erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Jasmonate sind auf Grund ihrer guten Löslichkeit in wässrigen Lösungen sehr mobil. Die Zellen der Blätter von *S. lycopersicum* sind durch eine hohe Dichte an Plasmodesmata miteinander verknüpft (Forner, 2009). Außerdem wurde das JA/JA-Ile-Vorkommen mittels Immunmarkierung ausschließlich innerhalb der Zellen nachgewiesen. Daher kann ein symplastischer Transport von Jasmonaten von den Zellen des Leitgewebes zu den Mesophyllzellen der Blattspreite bzw. zwischen den

einzelnen Mesophyllzellen vermutet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass möglicherweise im Apoplasten vorliegendes JA/JA-Ile auf Grund des geringen Proteingehaltes weniger effizient immobilisiert wird und aus diesem Grund nicht mittels IHC nachgewiesen werden konnte. Für JA (Stenzel *et al.*, 2008) wie auch für JA-Ile (Sato *et al.*, 2011; Matsuura *et al.*, 2012) konnte in Applikationsversuchen mit radioaktiv markierten Phytohormon-Derivaten gezeigt werden, dass diese auch in systemische Blätter transportiert werden können. Auf Grundlage von Experimenten mit radioaktiv markiertem JAME wurde vorgeschlagen, dass der systemische Transport nicht, wie bisher angenommen, über das Phloem allein (Howe, 2004; Schilmiller & Howe, 2005), sondern zusätzlich auch über das Xylem erfolgen könnte (Thorpe *et al.*, 2007). Wie für verschiedene Spezies gezeigt wurde, erfolgt in Reaktion auf Verwundung auch in systemischen Blättern ein Anstieg im JA-Gehalt (Wang *et al.*, 2000; von Dahl & Baldwin, 2004; Hlavinka *et al.*, 2012) und eine Induktion der Expression JA-responsiver Gene (Ryan, 2000).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der gewonnenen AK-Fractionen vorgenommene Immunmarkierung in Gewebeproben systemsicherer Blätter führte jedoch nur zu einem sehr schwachen Signal, das auf Grund der geringen Ausprägung nicht eindeutig auf eine Akkumulation von JA/JA-Ile zurückgeführt werden kann (siehe Abb. 3.10). Die Ursache für die schwache Markierung könnte sein, dass die zelluläre JA-Konzentration, trotz wundinduzierter Akkumulation, noch unter der Nachweisgrenze der spezifischen AKs liegt. Wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde, führt der Verwundungsstress im systemischen Blatt zu einem JA- bzw. JA-Ile-Gehalt, der nur etwa $\leq 10\%$ des Gehaltes vom direkt verwundeten Blatt entspricht (von Dahl & Baldwin, 2004; Schilmiller & Howe, 2005; Koo *et al.*, 2009; Hlavinka *et al.*, 2012). In einigen Studien wurde außerdem gezeigt, dass eine rein mechanische Verwundung in systemischen Blättern nicht zwangsläufig zu einer signifikanten JA-Akkumulation und Expression JA-induzierter Gene führt (Strassner *et al.*, 2002) bzw. erst eine zusätzlich zur mechanischen Verwundung vorgenommene Applikation von Raupenspeichel zum Anstieg im JA-Gehalt führt (von Dahl & Baldwin, 2004). Daher könnte die fehlende Markierung darauf hinweisen, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Verwundungsmethode (dreimaliges Quetschen der Mittelrippe) keine, für eine ausgeprägte Induktion der systemischen Wundantwort ausreichende, Blattschädigung zur Folge hatte. Um diese Fragestellungen weiterzuverfolgen, könnten in weiterführenden Experimenten in systemischen Blättern zusätzlich zur Immunmarkierung Transkriptanalysen JA-induzierter Gene bzw. quantitative JA-Bestimmungen vorgenommen werden.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Blättern von *S. lycopersicum* wurde in Verwundungsexperimenten mit *A. thaliana* exemplarisch gezeigt, dass die gewonnenen Anti-JA-AK-Fractionen nicht nur zur Immunmarkierung von JA/JA-Ile in *S. lycopersicum*-Blättern, sondern auch für andere Modellsysteme anwendbar sind (Daten nicht gezeigt; siehe Mielke *et al.*, 2011). Inwieweit die Empfindlichkeit der Anti-JA-AKs ausreichend ist für einen zell- und gewebespezifischen Nachweis von JA/JA-Ile im Verlauf von pflanzlichen Prozessen, die mit einem moderaten Anstieg im JA-Gehalt verknüpft sind, wäre in zukünftigen

Experimenten zu testen. Insbesondere für pflanzliche Entwicklungsprozesse ist bekannt, dass schon geringe Konzentrationsänderungen an JA/JA-Ile wirksam sind (Goetz *et al.*, 2012). Über die Empfindlichkeit der AKs lässt sich mit den bis dato durchgeführten Versuchen nur bedingt eine Aussage treffen. Aus den Infiltrationsversuchen mit EDC-aktiviertem JA-BSA-Konjugat können keine Rückschlüsse auf die Nachweisgrenze der AKs gezogen werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Markierung bei Infiltration mit einer 25 μM JA-BSA-Lösung deutlich schwächer als nach Infiltration mit einer 100 μM bzw. 500 μM Lösung war (siehe Abb. 3.8), jedoch lässt sich nicht feststellen, wie viel vom Konjugat tatsächlich in die Zellen aufgenommen wurde. Außerdem ist ein weiterer erschwerender Aspekt, dass der Markierungsgrad bei histochemischen Methoden von verschiedenen Parametern, wie der Schichtdicke und der Fixierungseffizienz beeinflusst wird. Da bisher nur Daten von JA-Bestimmungen in Extrakten aus kompletten pflanzlichen Organen bzw. Geweben vorliegen, ist die genaue zelluläre JA/JA-Ile-Konzentration im Verlauf von Entwicklungsprozessen oder anderen pflanzlichen Reaktionen auf Umweltreize, die mit einem moderaten Anstieg im JA-Gehalt verknüpft sind, nicht bekannt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass lokal auftretende JA-Gehalte den gemessenen Durchschnittswert z. T. überschreiten und somit ein histochemischer Nachweis auch bei Prozessen mit insgesamt eher geringer JA-Akkumulation möglich wäre. Gerade ungleich verteilte JA/JA-Ile-Akkumulationen können mit Hilfe der IHC eingehender untersucht oder auch überhaupt erst nachgewiesen werden, falls der Verdünnungseffekt bei Extraktion unterschiedlich gearteten Gewebes zu stark für einen analytischen Nachweis ist. Zweifelsfrei sind die im Rahmen dieser Arbeit generierten polyklonalen Anti-JA-AKs auf Grund ihrer Spezifität wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung des spezifischen Vorkommens von JA/JA-Ile im Verlauf von pflanzlichen Stressreaktionen, die zu einem sogenannten „JA-Burst“, einem starken Anstieg im JA-Gehalt, führen. Zu diesen gehören neben der Reaktion auf mechanische und durch Herbivore verursachte Verwundung auch die Reaktion auf osmotischen Stress, Trockenstress (Wasternack, 2007) und Interaktionen mit nekrotrophen Pathogenen und symbiotischen Mykorrhizapilzen (Glazebrook, 2005; Hause & Schaarschmidt, 2009).

4. KAPITEL II

Visualisierung von JA-Ile mittels der spezifisch durch JA-Ile-induzierten Interaktion von COI1 und JAZ1

4.1 Einleitung

4.1.1 Der Co-Rezeptorkomplex für JA-Ile

Als eine der ersten Schlüsselkomponenten der JA-Signalkaskade wurde das F-Box-Protein COI1 identifiziert (Xie *et al.*, 1998). Dieses Protein ist Bestandteil einer SCF^{COI1}-E3-Ubiquitinligase (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002) und bestimmt als F-Box-Protein deren Substratspezifität (Patton *et al.*, 1998) (siehe Punkt 1.2). Neben dem 45 AS umfassenden N-terminal lokalisierten F-Box-Motiv, das die Interaktion des Proteins mit dem ASK1-Protein im SCF-Komplex vermittelt (Bai *et al.*, 1996; Schulman *et al.*, 2000; Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002), zeichnet sich COI1 durch insgesamt 18 repetitive Leucin-reiche Regionen aus, die sich zur hufeisenförmigen LRR (*Leucine Rich Repeats*)-Domäne zusammenlagern (Xie *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2009) (siehe Abb. 4.1 und 4.3). LRR-Domänen, die eine wichtige Rolle für Protein-Protein-Interaktionen spielen, sind dadurch gekennzeichnet, dass die parallel zueinander angeordneten α -Helices und β -Faltblätter der leucinreichen Wiederholungsbereiche einen hydrophoben Kern ausbilden, wogegen die Außenseite der LRR-Domäne einen hydrophilen Charakter besitzen (Kobe & Deisenhofer, 1994).

```
(1) MEDPDIKRCK LSCVATVDDV IEQVMTYITD PKDRDSASLV CRRWFKIDSE TREHVTMALC YTATPDRLSR
RFPNLRSLKL KGKPRAAAMFN LIPENWGGYV TPWVTEISNN LRQLKSVHFR RMIVSDLDLD RLAKARADDL
ETLKLDKCSG FTTDGLLSIV THCRKIKITLL MEESSEKDK GKWLHELAQH NTSLEVLNFI MTEFAKISPK
DLFTIARNCR SLVSVKVGDF EILELVGFFK AAANLEEFCE GSLNEDIGMP EKYMNLVFPK KLCRLGLSYM
GPNEMPILFP FAAQIRKLDL LYALLETEDH CTLIQKCPNL EVLETRNVIG DRGLEVLAQY CKQLKRLRIE
RGADEQGMED EEGLVSQRGL IALAQQCQEL EYMAVVVSDI TNESLESIGT YLKNLCDFRL VLLDREERIT
DLPLDNGVRS LLIQCKLRR FAFYLRQGL TDGLSYIGQ YSPNVRWMLL GYVGSDEGL MEFSRGCPLN
QKLEMRGCCF SERAIAAAVT KLPSLRYLWV QGYRASMTGQ DLMQMARPYW NIELIPSRV PEVNQQGEIR
EMEHPAHILA YYSLAQRTD CPTTVRVLKE PI (592)
```

Abb. 4.1: Aufbau des F-Box-Proteins COI1.

Abbildung A zeigt die Primärstruktur von COI1 (N-Terminus → C-Terminus). Gelb markiert ist die F-Box-Domäne, wobei die 15 AS, die die Interaktion mit der ASK1-Untereinheit des SCF-Komplexes vermitteln, rot hervorgehoben sind. Die 18 leucinreichen Wiederholungsregionen, die die LRR-Domäne ausbilden, sind grau hinterlegt.

Ähnlich der JA-Antwort läuft auch die pflanzliche Auxinantwort unter Beteiligung eines SCF-Komplexes ab (Gray *et al.*, 1999). Bei diesem fungiert die F-Box-Untereinheit TIR1, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu COI1 aufweist (34 % Aminosäuresequenzidentität,

N-terminales F-Box-Motiv und LRR-Domäne aus 18 leucinreichen Wiederholungsbereichen) (Xie *et al.*, 1998), direkt als Auxinrezeptor (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski & Leyser, 2005). Das Phytohormon wird dabei in einer von der LRR-Domäne ausgebildeten hydrophoben Tasche auf der Oberfläche des Proteins gebunden (Tan *et al.*, 2007). Auf Grund der funktionellen und strukturellen Übereinstimmungen zwischen den beiden F-Box-Proteinen wurde vermutet, dass COI1 als Rezeptorprotein an der Hormonperzeption beteiligt ist und JA über die LRR-Domäne bindet (Tan *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008b). Entscheidende Fortschritte bei der Aufklärung der Details zum Mechanismus der JA-Perzeption wurden jedoch erst nach Entdeckung der JAZ-Proteine als Zielproteine des SCF^{COI1}-Komplexes erzielt.

Die JAZ-Proteine sind kernlokalisierte Transkriptionsrepressoren (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007), von denen in *A. thaliana* 12 verschiedene Vertreter identifiziert wurden (Chung *et al.*, 2008; Katsir *et al.*, 2008a). Sie unterdrücken im Grundzustand zusammen mit dem Co-Repressorprotein TPL die pflanzliche JA-Antwort, indem sie TFs (z. B. MYC2) binden, die an der Transkription JA-regulierter Gene beteiligt sind (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2010) (siehe Punkt 1.2). Ein Anstieg im endogenen JA-Gehalt führt zur Interaktion der JAZ-Proteine mit COI1, einer Untereinheit der SCF^{COI1}-E3-Ubiquitinligase. Dies hat die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau der JAZ-Proteine durch das 26S-Proteasom zur Folge, so dass durch Freisetzung der TFs von ihren Repressoren die Transkription der JA-responsiven Gene aktiviert werden kann (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Die Bindung von JAZ an COI1 wird dabei nicht durch JA, sondern durch deren Isoleucin-Konjugat (Thines *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008b) – und dabei spezifisch durch das JA-Ile-Stereoisomer (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucin (Fonseca *et al.*, 2009) – vermittelt. Im Vergleich zu anderen Jasmonaten passt dieses Stereoisomer am besten in die von der LRR-Domäne ausgebildete hydrophobe Tasche (Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

Strukturell zeichnen sich JAZ-Proteine durch drei große Domänen aus (Pauwels & Goossens, 2011; Wager & Browse, 2012) (siehe Abb. 4.2):

- (i) die gering konservierte NT (N-terminale)-Domäne, die vermutlich in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist, jedoch strukturell und funktionell bisher kaum charakterisiert wurde;
- (ii) die namensgebende ZIM (*Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem*)-Domäne, die ein hochkonserviertes TIFY-Motiv (TIFF/YXG) enthält und die Bindung des NINJA/TPL-Repressorkomplexes (siehe Punkt 1.2) an das JAZ-Protein vermittelt (Pauwels *et al.*, 2010) – außerdem erfolgen über das TIFY-Motiv homo- und heteromere Interaktionen zwischen verschiedenen JAZ-Proteinen von *A. thaliana* (Chini *et al.*, 2009; Chung & Howe, 2009);
- (iii) die am C-Terminus lokalisierte konservierte Jas (*JA-associated*)-Domäne, die durch das Vorliegen eines S-L-X(5)-K-R-X(2)-R-Motiv charakterisiert ist (Yan *et al.*, 2007). Die Jas-Domäne umfasst 12 bis 29 AS, enthält ein Kernlokalisierungssignal (NLS) (Grunewald *et al.*, 2009) und vermittelt unter anderem die Interaktion der JAZ-

Repressorproteine mit MYC2 und anderen TFs (Pauwels & Goossens, 2011; Wager & Browse, 2012). Weiterhin erfolgt über die Jas-Domäne die Bindung von JAZ-Proteinen an COI1 (Yan *et al.*, 2007), wobei zwei innerhalb der Jas-Domäne N-terminal lokalisierte AS (R205 und R206 bei JAZ1 aus *A. thaliana*) eine essentielle Rolle spielen (Melotto *et al.*, 2008).

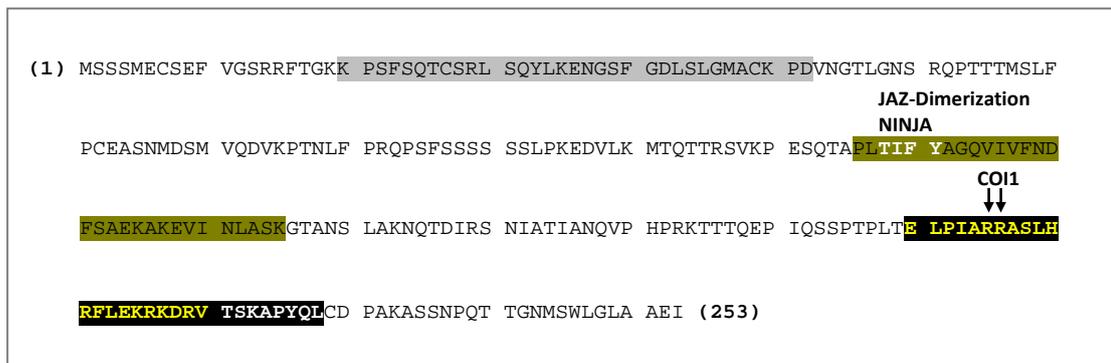


Abb. 4.2: Primärstruktur der JAZ-Proteine am Beispiel des JAZ1-Proteins aus *A. thaliana*.

Gezeigt ist die AS-Sequenz des JAZ1-Proteins aus *A. thaliana* (N-Terminus → C-Terminus). JAZ-Proteine zeichnen sich strukturell durch drei Domänen aus: (i) die C-terminale NT-Domäne (K20 bis D52, grau unterlegt); (ii) die konservierte ZIM-Domäne (P126 bis K155, grün unterlegt) mit dem konservierten TIFY-Motiv (AS weiß hervorgehoben), über die die Ausbildung von JAZ-Homo- und Heterodimeren sowie die Bindung des Adapterproteins NINJA erfolgt; (iii) die hochkonservierte C-terminale Jas-Domäne (E200 bis L226, schwarz unterlegt), welche die Interaktion mit TFs (z. B. MYC2) und dem F-Box-Protein COI1-Protein vermittelt und für die Bindung des Phytohormons JA-Ile essentiell ist. Die Bindung von COI1 und JA-Ile erfolgt dabei durch das konservierte Degron-Peptid (E200 bis V220, AS gelb hervorgehoben). Bei den durch schwarze Pfeile markierten AS innerhalb des Degrons handelt es sich um konservierte Arginine (R), die eine essentielle Rolle bei der Interaktion der JAZ-Proteine mit COI1 spielen.

Nach heutigem Erkenntnisstand erfolgt die Perzeption von JA-Ile nicht allein über das COI1-Protein. Der eigentliche Phytohormonrezeptor ist vielmehr ein Proteinkomplex, der sich unter Beteiligung eines IP_5 -Moleküls aus COI1 und einem JAZ-Protein zusammensetzt (Sheard *et al.*, 2010; Mosblech *et al.*, 2011) (siehe Abb. 4.3). In diesem Co-Rezeptorkomplex wird JA-Ile in einer von der LRR-Domäne von COI1 ausgebildeten hydrophoben Tasche auf der Oberfläche des Proteins gebunden (Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). Außerdem erfolgt die Bindung des Phytohormons an den Rezeptorkomplex durch eine etwa 20 AS umfassende Teilsequenz der Jas-Domäne des JAZ-Proteins (E200 bis E220 bei JAZ1 aus *A. thaliana*) (Sheard *et al.*, 2010) (siehe Abb. 4.2 und 4.3). Diese als Degron-Peptid bezeichnete Teilsequenz bildet in der Sekundärstruktur im N-terminalen Bereich eine Schleife aus (E200 bis E206 bei JAZ1 aus *A. thaliana*). Diese interagiert direkt mit JA-Ile und verschließt gleichzeitig die Bindetasche von COI1 mit dem darin gebundenen Hormon deckelartig. Die C-terminale Hälfte (E207 bis E220 bei JAZ1 aus *A. thaliana*) hingegen besteht aus einem α -Helix-Motiv und ist über mehrere AS (L209, F212, L213) an der Interaktion mit COI1 beteiligt.

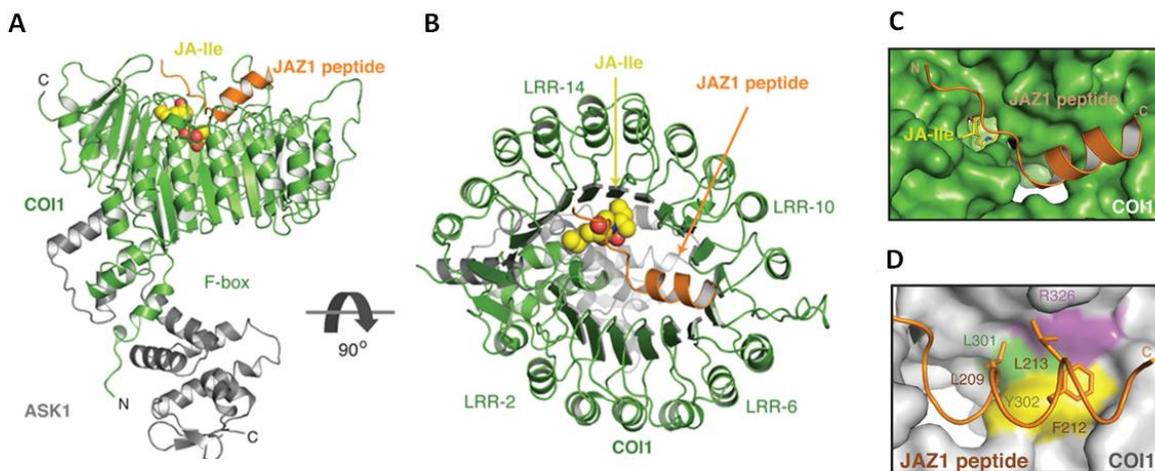


Abb. 4.3: Struktur des Co-Rezeptorkomplexes für JA-Ile.

In A und B sind jeweils verschiedene Ansichten der Kristallstruktur des ASK-COI1-Komplexes (grau bzw. grün) mit dem an COI1 gebundenen JAZ1-Degron-Peptid (orange) und JA-Ile (bioaktive Form; gelb) in der Ribbon-Darstellung gezeigt. Die N-terminal lokalisierte F-Box-Domäne von COI1, die die Interaktion mit der SCF-E3-Ubiquitinligase vermittelt, ist nur in Darstellung A zu sehen. Die Sekundärstrukturen der 18 LRR-Sequenzen (LRR-1 bis LRR-18) von COI1 bestehen jeweils aus einem Faltblatt-Turn-Helix-Motiv und lagern sich hufeisenförmig zur LRR-Domäne zusammen (B). Dabei sind die α -Helices und die β -Faltblätter parallel zueinander angeordnet und bilden so einen hydrophoben Kernbereich aus, in den die Leucin-Seitenketten hinein ragen. Sowohl das Degron-Peptid als auch JA-Ile werden in einer von der LRR-Domäne ausgebildeten hydrophoben Tasche an der Oberfläche des F-Box-Proteins gebunden. Über das Degron-Peptid erfolgt die Bindung des JAZ-Proteins an COI1 und JA-Ile. Die Sekundärstruktur des Degrons setzt sich aus einem N-terminalen Loop und einem C-terminalen α -Helix-Motiv zusammen. In C und D ist eine Aufsicht der von COI1 ausgebildeten Bindetasche für das Phytohormon und das Degron-Peptid zu sehen. Das N-terminale Loop deckt im Co-Rezeptorkomplex die sonst offene Hormonbindetasche von COI ab (C). Die C-terminale α -Helix hingegen interagiert über mehrere AS-Reste mit der LRR-Domäne von COI1. Alle Abbildungen wurden aus Sheard *et al.* (2010) entnommen.

Die von Sheard *et al.* (2010) präsentierte Kristallstruktur des Co-Rezeptorkomplexes für JA-Ile ermöglicht ein gutes Verständnis der innerhalb des Molekülkomplexes ausgebildeten Interaktionen und räumlichen Anordnung der beteiligten Komponenten zueinander. Über den konkreten Perzeptionsmechanismus ist jedoch noch wenig bekannt. In Ligandbindungsstudien wurde gezeigt, dass COI1 auch alleine JA-Ile binden kann, jedoch erfolgt eine Verstärkung der Bindung um das 50-fache, wenn JAZ1 bzw. JAZ6 als Co-Rezeptoren eingesetzt wurden (Yan *et al.*, 2009). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass zunächst die Anbindung von JA-Ile an COI1 erfolgt, was die sofortige Rekrutierung des JAZ-Proteins und die Ausbildung des Rezeptorkomplexes zur Folge hat (Pauwels & Goossens, 2011). Die Bindung des Phytohormons könnte dabei einerseits durch die zusätzlich ausgebildeten Interaktionen zwischen JA-Ile und dem JAZ-Protein und andererseits durch den Verschluss der von COI1 ausgebildeten Hormonbindetasche verstärkt werden (Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010; Pauwels & Goossens, 2011).

4.1.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) als klassische Methode zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktion

Wie das Beispiel des COI1-JAZ-Rezeptorkomplexes für JA-Ile verdeutlicht (siehe Punkt 4.1.1), erfüllen viele Proteine ihre physiologische Funktion in der Zelle nicht in isolierter Form. Vielmehr bilden sie mit anderen Proteinen transiente oder auch stabile (Multi)Protein-komplexe aus. Aus der Vielzahl an intrazellulären Interaktionspartnern ergibt sich ein hochkomplexes Wechselwirkungsnetzwerk, das auch als Interaktom bezeichnet wird (Plewczynski & Ginalski, 2009). Für das Verständnis molekularer Zusammenhänge in der Zelle ist die Entschlüsselung von Proteinnetzwerken von großer Bedeutung. Eine klassische Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern ist die Co-Immunopräzipitation, die jedoch nur einen *in vitro*-Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Ransone, 1995). Mittlerweile wird verstärkt auf Techniken zurückgegriffen, die in lebenden Zellen anwendbar sind und dort auch zur Analyse des zellspezifischen Auftretens und der subzellulären Lokalisation der Protein-Protein-Wechselwirkungen herangezogen werden können (Kerppola, 2006). Eine Methode ist die FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Analyse, bei der der abstandsabhängige strahlungsfreie Übergang von Energie von einem angeregten Donorprotein auf ein interagierendes Akzeptorprotein genutzt wird (Mátyus, 1992). Häufig wird für den *in vivo*-Nachweis von Protein-Interaktionen jedoch auch die Technik der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) angewendet (Ventura, 2011). Das Prinzip der Komplementation wurde erstmals 1967 für das Enzym β -Galactosidase beschrieben (Ullmann *et al.*, 1967). Dieses Enzym kann in zwei funktionsunfähige Hälften gespalten werden, die sich spontan zum funktionellen Protein zusammenlagern können. Für die BiFC wurde dieses Prinzip auf Fluorophore übertragen (siehe Abb. 4.4A). Dabei wird ein Fluoreszenzprotein in zwei Teilfragmente gespalten, die jeweils an den N-Terminus bzw. C-Terminus der zu untersuchenden potentiellen Interaktionspartner fusioniert werden (siehe Abb. 4.4B). Die Hälften des Fluoreszenzproteins können alleine nicht fluoreszieren; kommen sie jedoch in räumliche Nähe, so erfolgt eine Rückfaltung zum intakten Fluorophor (siehe Abb. 4.4A). Über das auftretende BiFC-Signal kann somit eine Interaktion zwischen Proteinen *in vivo* sichtbar gemacht werden.

Ursprünglich wurde die BiFC-Methode in *E. coli* unter Verwendung des Fluoreszenzproteins GFP (*Green Fluorescent Protein*) etabliert, welches dafür N-terminal an der AS in Position 158 in die beiden Teilfragmente GFP^N und GFP^C zerlegt wurde (Ghosh *et al.*, 2000). Die BiFC-Technik wurde später auf weitere Fluoreszenzproteine übertragen, wobei der prominenteste Vertreter das YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) ist (Hu *et al.*, 2002). Die Spaltung von YFP in YFP^N und YFP^C kann dabei vom N-Terminus ausgehend sowohl an Position 155 als auch 173 erfolgen (Kerppola, 2009). Die BiFC-Methode kann für jedes mit einem Fluorophor fusionierbare Protein angewendet werden. Sie fand bereits für den Nachweis einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen Anwendung und ermöglicht deren Lokalisation in den verschiedenen Kompartimenten sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Zellen

(Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2006; Ohad *et al.*, 2007; Kerppola, 2009; Ventura, 2011). Durch die bei der Assoziation zwischen den Fluorophorhälften ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen wird der durch die Protein-Protein-Interaktion ausgebildete BiFC-Komplex zudem stabilisiert. Bei der Interaktion verschiedener TFs aus der Klasse der bZIP-Familie konnten Halbwertszeiten des BiFC-Komplexes von bis zu 24 h nachgewiesen werden (Hu *et al.*, 2002).

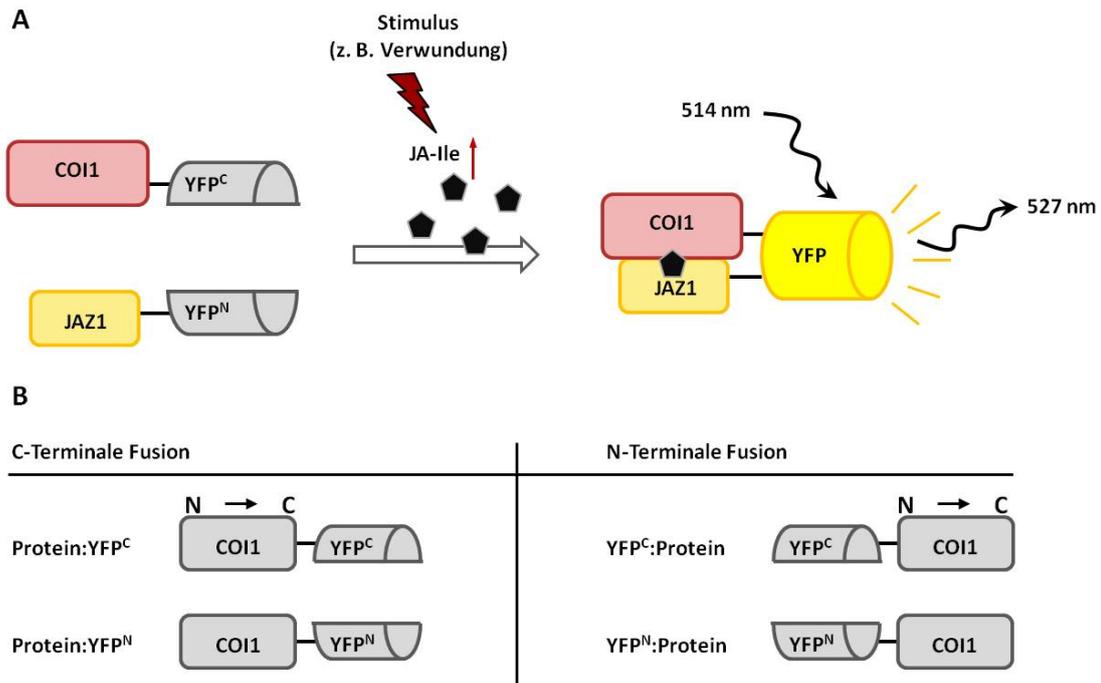


Abb. 4.4: Das BiFC-System.

In A ist das Funktionsprinzip des BiFC-Systems dargestellt. Die Interaktionspartner (COI1 und JAZ1) werden jeweils mit einer der nicht-fluoreszierenden Hälften des YFP-Reporterproteins fusioniert (C-terminale Hälfte = YFP^C bzw. N-terminale = YFP^N). Durch Wechselwirkung der Proteine (bei COI1 und JAZ1 induziert durch einen Anstieg im endogenen JA-Ile-Gehalt) kommen die YFP-Hälften in räumliche Nähe und falten sich in das native fluoreszierende Protein zurück. Somit kann die Interaktion der Proteine über die YFP-Fluoreszenz (527 nm) nachgewiesen werden. Zur Durchführung von BiFC-Versuchen müssen die Interaktionspartner sowohl C-terminal als auch N-terminal mit der C-terminalen bzw. N-terminalen Hälfte des Reportergens fusioniert werden (B). Damit ergeben sich für jeden Interaktionspartner vier BiFC-Konstrukte.

Da die BiFC-Methode auch eine nicht-invasive *in vivo*-Lokalisation von Protein-Protein-Wechselwirkung in mehrzelligen pflanzlichen Organismen erlaubt (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004; Ohad *et al.*, 2007), sollte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit mit Hilfe dieser Technik eine Methode zum zell- und gewebespezifischen Nachweis des bioaktiven Jasmonats JA-Ile etabliert werden. Dabei sollte die Lokalisation von JA-Ile *in vivo* über die spezifisch durch das Phytohormon induzierte Interaktion der Proteine COI1 und JAZ1 aus *A. thaliana* erfolgen. Das JAZ1-Protein aus *A. thaliana* gehört zu den ersten charakterisierten JAZ-Proteinen, für das die physische Interaktion mit COI1 im Hefe-Zwei-

Hybrid (Y2H)-System bzw. mittels eines *Pulldown-Assays* nachgewiesen wurde (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Außerdem lagen Strukturdaten zum COI1-JAZ1-Co-Rezeptorkomplex für JA-Ile vor (Sheard *et al.*, 2010), auf die für die Versuchsplanung und -durchführung zurückgegriffen werden konnte.

Das Grundprinzip der zu etablierenden Methode ist in Abb. 4.5 dargestellt. Zur Visualisierung der JA-Ile-vermittelten Interaktion von COI1 und JAZ1 sollten beide Interaktionspartner jeweils mit der C-terminalen (YFP^C) bzw. N-terminalen (YFP^N) Hälfte des YFP-Proteins gekoppelt werden (siehe Abb. 4.4B). Diese Fusionskonstrukte könnten dann über stabile Transformation in *A. thaliana* eingebracht werden. Kommt es in diesen Pflanzen infolge eines abiotischen oder biotischen Stresses zu einem Anstieg im endogenen JA-Ile-Gehalt, würde dies über die Interaktion der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes in einem BiFC-Signal resultieren (siehe Abb. 4.5). Auf diese Weise kann mikroskopisch untersucht werden, in welchen Organen, Geweben und Zelltypen infolge des einwirkenden Stresses eine Akkumulation von JA-Ile auftritt.

Das BiFC-System war vor der Anwendung in stabil transformierten Pflanzen zunächst in Zellkulturprotoplasten zu etablieren, welche zu diesem Zweck mit den generierten BiFC-Konstrukten transient transformiert werden sollten (siehe Punkt 2.7.1). Die Fusion von Proteinen kann zu einer gegenseitigen Beeinflussung ihrer räumlichen Struktur führen. Daher kann die Kopplung der Hälften des YFP-Reporterproteins an die Interaktionspartner COI1 und JAZ1 eine Proteinfehlfaltung verursachen, welche die Verdeckung der an der Interaktion beteiligten Jas-Domäne von JAZ1 bzw. der für JA-Ile und das Degron-Peptid von COI1 ausgebildeten Bindetasche zur Folge haben könnte. Auch die Struktur der YFP-Hälften kann durch die gekoppelten Proteine beeinflusst werden, so dass im BiFC-Experiment eine Störung der Rückfaltung zum nativen fluoreszierenden Volllängenprotein auftreten kann. Daher waren vor Durchführung der BiFC-Versuche Vorversuche mit Fusionsproteinen durchzuführen, bei denen an die Interaktionspartner C-terminal und N-terminal das native YFP-Reporterprotein gekoppelt werden sollte. In die BiFC-Versuche sollten sowohl C- als auch N-terminal mit den jeweiligen Hälften des Reporterproteins fusionierte Interaktionspartner einbezogen werden (siehe Abb. 4.4B).

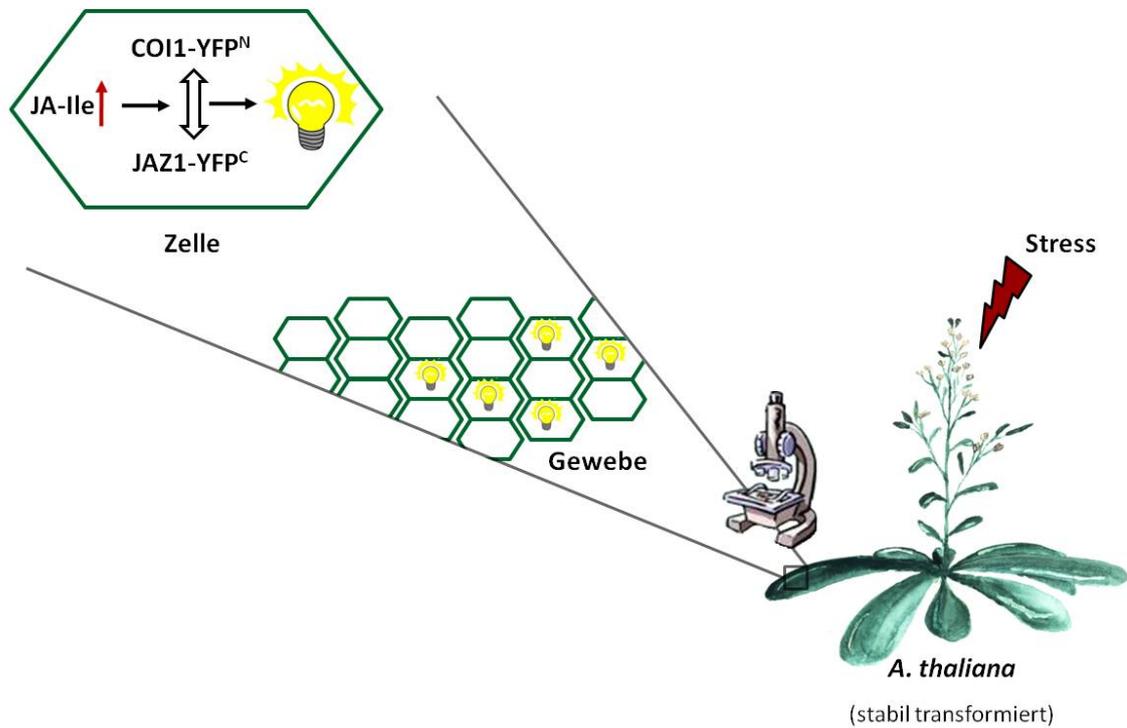


Abb. 4.5: Grundprinzip der BiFC-Methode zum nicht-invasiven *in vivo*-Nachweis von JA-Ilc.

Kommt es in *A. thaliana*-Pflanzen, die stabil mit COI1- und JAZ1-BiFC-Fusionskonstrukten transformiert wurden, zum Anstieg des endogenen JA-Ilc-Gehaltes (z. B. infolge eines abiotischen/biotischen Stresses), so kann die Wechselwirkung der BiFC-Partner über das BiFC-Signal nachgewiesen werden. Da die Bindung von JAZ1 an COI1 spezifisch durch JA-Ilc induziert wird, dient das BiFC-Signal dem zellspezifischen Nachweis des bioaktiven Isoleucin-Konjugates von JA.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Etablierung des BiFC-Systems für COI1 und JAZ1 in Zellkulturprotoplasten

4.2.1.1 Klonierung von YFP- und BiFC-Fusionskonstrukten und Lokalisation von COI1 und JAZ1 in Zellkulturprotoplasten

Die Etablierung des BiFC-Systems für den Nachweis der spezifisch durch JA-Ile vermittelten Interaktion von COI1 und JAZ1 erfolgte in Zellkulturprotoplasten von *A. thaliana*. Da die Fusion von Proteinen zu einer Proteinfehlfaltung und damit möglicherweise zu einem Verlust der YFP-Fluoreszenz oder zu einem Proteinabbau führen kann (siehe Punkt 4.1.2), erfolgten vor Durchführung der BiFC-Versuche Untersuchungen mit YFP-Fusionsproteinen. Bei diesen wurden an die Interaktionspartner COI1 und JAZ1 das vollständige native YFP-Reporterprotein jeweils C-terminal (COI1:YFP; JAZ1:YFP) bzw. N-terminal (YFP:COI1; YFP:JAZ1) gekoppelt. Für die BiFC-Versuche wurde die C-terminale (YFP^C) bzw. N-terminale (YFP^N) Hälfte des YFP-Proteins mit dem C-Terminus (COI1:YFP^{C/N}; JAZ1:YFP^{C/N}) bzw. N-Terminus (YFP^{C/N}:COI1; YFP^{C/N}:JAZ1) der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes fusioniert.

In Punkt 8.3 im Anhang sind die vollständigen kodierenden Gensequenzen (CDS) von *COI1* (1779 bp) und *JAZ1* (762 bp) dargestellt. Diese wurden der Arabidopsis-Datenbank TAIR entnommen (TAIR-Code: AT1G19180 bzw. AT2G39940) und dienten als Matrize zur Ableitung genspezifischer Primer (siehe Punkt 8.1 Tab. 8.1 im Anhang). Nach Amplifikation der CDS und Subklonierung der Konstrukte in die *Gateway*-kompatiblen Eingangsvektoren wurden *JAZ1* und *COI1* zur Fusion mit dem Reporter gen in die YFP-Zielvektoren und für die späteren BiFC-Versuche in die BiFC-Zielvektoren eingebracht (siehe Punkt 8.2 Tab. 8.3 im Anhang). Die entsprechenden Vektorkarten sind in Punkt 8.11 im Anhang dargestellt. Um die Lokalisation der YFP-Fusionsproteine zu untersuchen, wurden Protoplasten mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und mikroskopisch analysiert (siehe Punkte 2.7.1 und 2.12). Zur Kontrolle der Transfektionsrate wurden die Protoplasten mit dem CFP (*Cyan Fluorescent Protein*)-exprimierenden Plasmid pENSG:CFP co-transfiziert. Die Durchführung der Klonierung und mikroskopischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit J. Schimmel im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Schimmel, 2009).

Abb. 4.6 zeigt Aufnahmen der mit den generierten YFP-Konstrukten transfizierten Zellkulturprotoplasten. In den mit *COI1:YFP* transformierten Protoplasten konnte ein deutliches YFP-Fluoreszenzsignal beobachtet werden (siehe Abb. 4.6A). Für das YFP:COI1-Fusionsprotein war hingegen keine YFP-Fluoreszenz nachweisbar, obwohl in allen untersuchten Transfektionsansätzen etwa $\geq 10\%$ der Protoplasten ein deutliches CFP-Signal aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Expression der Konstrukte *JAZ1:YFP* und *YFP:JAZ1* wurde vorwiegend in Protoplasten beobachtet, die 90 min vor der mikroskopischen Analyse mit dem Proteasom-inhibitor MG-132 (Carbobenzoxyleucyl-leucyl-leucinal) ($10\ \mu\text{M}$) behandelt wurden (siehe Abb. 4.6B und C). Ohne diese Behandlung zeigten zwar etwa $\geq 10\%$ der Protoplasten eine CFP-Fluoreszenz, jedoch wiesen nur etwa 3 % der Protoplasten zusätzlich ein YFP-Signal auf.

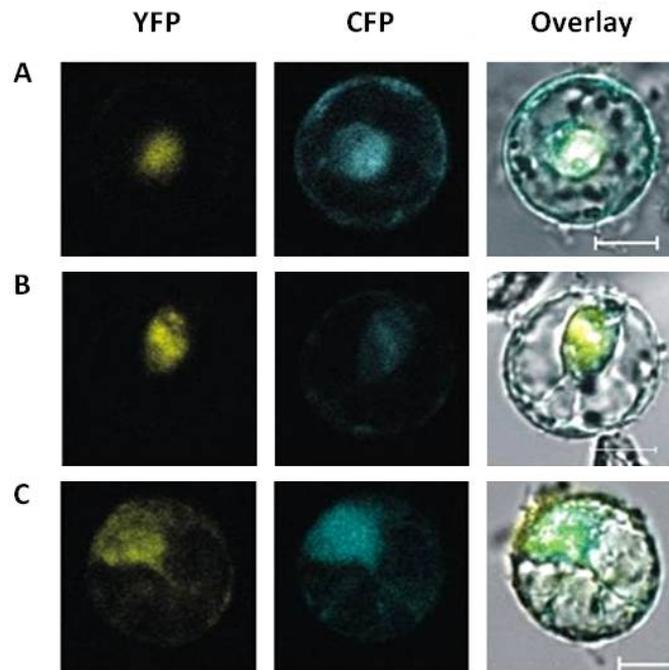


Abb. 4.6: Aufnahmen von mit YFP-Fusionskonstrukten transfizierten Zellkulturprotoplasten.

Abgebildet sind Protoplasten, die mit *COI1:YFP* (A), *JAZ1:YFP* (B) bzw. *YFP:JAZ1* (C) transfiziert wurden. Die Expression von *JAZ1:YFP* und *YFP:JAZ1* wurde 90 min nach Zugabe von MG-132 (10 μ M) untersucht, da ohne diese Behandlung kaum YFP-Signal nachweisbar war. Zur Kontrolle der Transfektion wurden die Protoplasten mit *pENSG:CFP* co-transfiziert. Die Aufnahmen zeigen von links nach rechts die YFP-Fluoreszenz (gelb), CFP-Fluoreszenz (blau) und die Überlagerung dieser Fluoreszenzsignale mit der Hellfeldaufnahme des Protoplasten. Die mikroskopische Analyse erfolgte ca. 40 h nach Transfektion (Anregungswellenlänge YFP = 514 nm bzw. CFP = 458 nm; Detektionsbereich YFP = 515 bis 550 nm bzw. CFP = 470 bis 510 nm). Die Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit J. Schimmel. Die Maßstab-balken entsprechen einer Größe von 20 μ m.

Ursache für die geringe YFP-Fluoreszenz von JAZ1 ohne Proteasominhibitorbehandlung war vermutlich der während der Transfektionsprozedur auf die Protoplasten einwirkende osmotische Stress. Osmotischer Stress kann zu einer Akkumulation von JA-Ile führen (Kramell *et al.*, 1995), welche dann wiederum die Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes und den Abbau der JAZ1-Fusionsproteine durch das 26S-Proteasom bewirkt (siehe Punkt 4.1). Dieser Proteinabbau kann durch den Einsatz sogenannter Proteasominhibitoren verhindert werden, welche die Aktivität des Proteasoms hemmen. Da in Folge der Behandlung von Zellen mit MG-132 jedoch eine Akkumulation von ROS und damit eine Zellschädigung eintritt (Han & Park, 2010), mussten zunächst in Vorversuchen die optimale Konzentration und Inkubationszeit für den Einsatz des Proteasominhibitors zur Inhibition des Abbaus der JAZ1-YFP-Fusionsproteine ermittelt werden. Dazu wurden Protoplasten nach MG-132-Behandlung zur Vitalitätsbestimmung mit Fluoresceindiacetat (FDA) angefärbt. Die Inkubation der Protoplasten mit einer 10 μ M MG-132-Lösung über einen Zeitraum von 90 min beeinflusste die Vitalität der Protoplasten nicht signifikant. Sowohl in den unbehandelten Transfektionsansätzen als auch nach MG-132-Applikation betrug der Anteil an lebenden Protoplasten etwa 70 % (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.2 BiFC-Analysen in Zellkulturprotoplasten von *A. thaliana*

Die sich aus den Versuchen mit den YFP-Fusionsproteinen für die BiFC-Analysen ergebenden Kombinationen der komplementären Interaktionspartner sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Da für das Fusionsprotein YFP:COI1 kein Fluoreszenzsignal nachweisbar war, wurden die N-terminalen Fusionskonstrukte $YFP^N:COI1$ und $YFP^C:COI1$ nicht in die BiFC-Analysen einbezogen.

Tab. 4.1: Kombinationen der Interaktionspartner für die BiFC-Versuche.

Grau unterlegt sind nicht untersuchte Kombinationen, bei denen die Interaktion der Fusionsproteine nicht zur Komplementation des YFP führen würde.

	COI1:YFP ^C	COI1:YFP ^N
JAZ1:YFP ^C		
YFP ^C :JAZ1		
JAZ1YFP ^N		
YFP ^N :JAZ1		

Um die Interaktion von COI1 und JAZ1 und dadurch das BiFC-Signal auszulösen, waren die Protoplasten mit Coronatin zu behandeln. In Vorversuchen wurde getestet, ob in Protoplasten die für das Y2H-System bestimmte Coronatin-Konzentration von 30 µM ausreichen würde, um die Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes zu induzieren (Thines *et al.*, 2007).

Für die Vorversuche zur Coronatin-Applikation wurden Zellkulturprotoplasten ausgewählt, die nach der Transfektion mit $YFP:JAZ1$ auch ohne MG-132-Behandlung eine deutliche YFP-Fluoreszenz aufwiesen (siehe Punkt 4.2.1.1). Auf diese Weise sollte die mögliche Coronatin-induzierte Interaktion des JAZ1-Fusionsproteins mit dem in den Protoplasten vorhandenen endogenen COI1 durch die Abnahme des YFP-Signals verdeutlicht werden. Die Protoplasten wurden mit 30 µM Coronatin behandelt, Kontrollprotoplasten blieben unbehandelt. Über einen Zeitraum von 60 min wurde eine Zeitserie der YFP-Fluoreszenz aufgenommen (siehe Abb. 4.7). Aus der zu beobachtenden Abnahme des YFP-Signals, die bei unbehandelten Protoplasten nicht auftrat (nicht gezeigt), konnte geschlossen werden, dass die eingesetzte Konzentration für die Induktion der Interaktion von COI1 und JAZ1 ausreichend und somit geeignet für die BiFC-Analysen war. Für die Stabilisierung des Signals wurde bei den BiFC-Analysen der Proteasominhibitor MG-132 wie oben beschrieben eingesetzt (siehe Punkt 4.2.1.1).

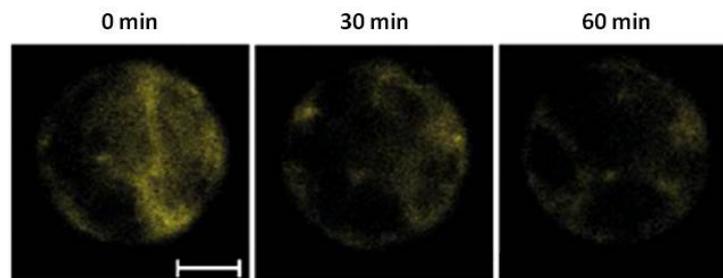


Abb. 4.7: Abnahme der YFP-Fluoreszenz eines mit *YFP:JAZ1* transfizierten Zellkulturprotoplasten nach Applikation von Coronatin (30 µM).

Gezeigt ist ein mit *YFP:JAZ1* transfizierter Protoplast, der mit 30 µM Coronatin behandelt wurde. Über einen Zeitraum von 60 min nach der Behandlung wurde die YFP-Fluoreszenz dokumentiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte bei der Anregungswellenlänge 514 nm und im Detektionsbereich von 515 bis 550 nm. Die Zeitserie wurde in Zusammenarbeit mit J. Schimmel erstellt. Die Maßstabballen entsprechen einer Größe von 20 µm.

Die Ergebnisse der durchgeführten BiFC-Versuche sind in Abb. 4.8 repräsentativ dargestellt. Für alle getesteten Kombinationen der BiFC-Fusionsproteine konnte ein deutliches Coronatin-induziertes YFP-Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Die aus der Interaktion von COI1 und JAZ1 resultierenden BiFC-Signale traten vorrangig im Zellkern auf. Ohne die Applikation von MG-132 und/oder Coronatin war in keinem der Transfektionsansätze der vier Kombinationen eine YFP-Fluoreszenz nachweisbar (nicht gezeigt).

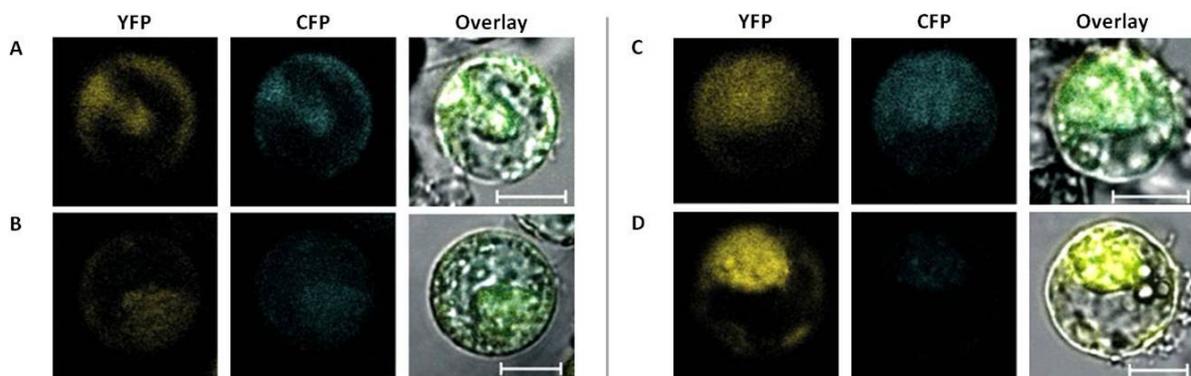


Abb. 4.8: Coronatin-induzierte BiFC-Signale durch Interaktion von COI1 und JAZ1 in transfizierten Zellkulturprotoplasten.

Zellkulturprotoplasten wurden mit den BiFC-Konstrukten *COI1:YFP^C* und *YFP^N:JAZ1* (A), *COI1:YFP^C* und *JAZ1:YFP^N* (B), *YFP^C:COI1* und *YFP^N:JAZ1* (C) oder *YFP^C:COI1* und *JAZ1:YFP^N* (D) transfiziert und für 40 h inkubiert. Alle Protoplasten wurden zusätzlich mit dem pENSG:*CFP*-Kontrollplasmid co-transfiziert. Zur Induktion der Interaktion von COI1 und JAZ1 erfolgte 2 h vor der Analyse die Applikation von Coronatin (30 µM). Um den Abbau von JAZ1 durch das Proteasom zu verhindern, erfolgte 1 h vor Untersuchung der Proben die Zugabe von MG-132 (10 µM). Die mikroskopische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit J. Schimmel durchgeführt (Anregungswellenlänge YFP = 514 nm bzw. CFP = 458 nm; Detektionsbereich YFP 515 bis 550 nm bzw. CFP = 470 bis 510 nm). Die Maßstabballen entsprechen einer Größe von 20 µm.

4.2.2 Stabilisierung von JAZ1 ohne Einsatz eines Proteasominhibitors

Bei Anwendung der nativen Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes führte das BiFC-System in Zellkulturprotoplasten nur durch den Einsatz des Proteasominhibitors MG-132 zu sichtbaren YFP-Signalen (siehe Punkt 4.2.1.2). Ohne die Blockade des Proteasoms war kein BiFC-Signal nachweisbar, da infolge der Interaktion von COI1 und JAZ1 der Abbau des JAZ-Proteins eintrat (siehe Punkt 4.2.1). Wegen der Schädigung von MG-132 ist das System in dieser Form jedoch für einen nicht-invasiven *in vivo*-Nachweis von JA-Ile ungeeignet. Deshalb sollte eine alternative Stabilisierung des JAZ1-COI1-Komplexes gefunden werden. Einen Ansatz dafür stellte die gezielte Modifizierungen der Interaktionspartner mit Hilfe molekularbiologischer Methoden dar, so dass

- (i) eine Interaktion von COI1 mit der ASK1-Untereinheit des SCF-Komplexes unterbunden wird (siehe Abb. 4.9A) oder
- (ii) eine nicht-ubiquitinierbare und damit stabile Variante von JAZ1 erzeugt wird (siehe Abb. 4.9B).

In beiden Fällen kann keine Übertragung von Ubiquitineinheiten auf JAZ1 erfolgen, so dass das Protein nicht mehr für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert werden würde.

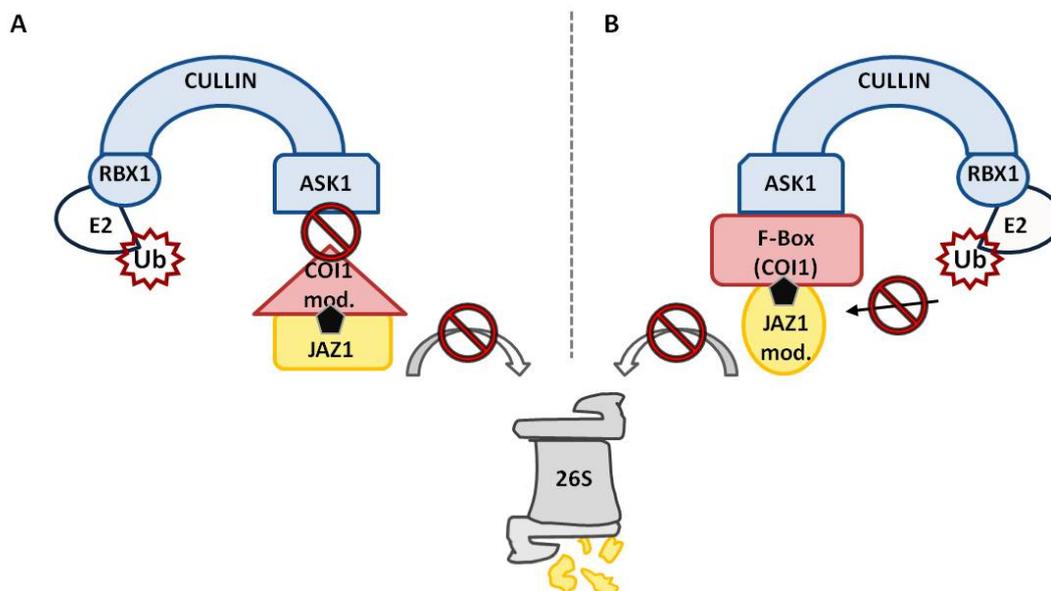


Abb. 4.9: Strategien für eine Stabilisierung des JAZ1-COI1-Komplexes.

Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken sollten die Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes so verändert werden, dass keine Übertragung von Ubiquitin auf JAZ1 erfolgen kann. Dazu sollte durch Modifikation von COI1 (COI1 mod.) dessen Wechselwirkung dem SCF-Komplexes verhindert werden (A) bzw. eine Variante von JAZ1 (JAZ1 mod.) erzeugt werden, die nicht ubiquitinierbar und damit stabil ist (B).

Um ausschließen zu können, dass die vorgenommenen Modifikationen an COI1 und JAZ1 zur Mislokalisierung der Proteine führen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Lokalisationsstudien mit YFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Für die Untersuchung der

Lokalisation wurde ebenfalls das Protoplastensystem genutzt. Da die bis dahin für die Gewinnung von Protoplasten verwendeten Zellkulturen jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht mehr verfügbar waren, wurden die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen in Mesophyll-protoplasten aus Blättern von *A. thaliana* durchgeführt (siehe Punkte 2.7.2). Auf eine Co-Transfektion mit dem pENSG:CFP-Kontrollplasmid wurde hier verzichtet.

4.2.2.1 Klonierung von modifizierten Varianten des Interaktionspartners COI1 und Lokalisation in Mesophyllprotoplasten

Wie in Punkt 4.1.1 beschrieben, wird die Interaktion von COI1 mit der ASK1-Untereinheit des SCF-Komplexes durch die N-terminal lokalisierte F-Box-Domäne vermittelt. In Abb. 4.10 sind die ersten 60 N-terminalen AS des COI1-Proteins mit der 45 AS umfassenden F-Box-Domäne dargestellt. In einem Y2H-System wurde nachgewiesen, dass eine Deletion der F-Box-Domäne zum Verlust der Interaktion zwischen COI1 und ASK1 führt (Devoto *et al.*, 2002). Der gleiche Effekt konnte durch den Austausch der sauren AS Glutamat an Position 22 (E22) im F-Box-Motiv gegen eine unpolare AS erzielt werden (Xu *et al.*, 2002). Folglich dürfte eine JA-Ile-induzierte Bindung von JAZ1 an diese COI1-Varianten nicht mehr zur Ubiquitinierung und damit auch nicht mehr zum Abbau des JAZ-Proteins führen. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation folgende Strategien verfolgt: Es wurde jeweils

- (i) eine am N-Terminus um 55 AS verkürzte Variante des COI1-Proteins (COI1 Δ 1-55; siehe Abb. 4.10) und
- (ii) eine durch den Austausch der AS E22 gegen Valin (V) erzeugte Mutante des COI1-Proteins (COI1_{E22V}, siehe Abb. 4.10)

kloniert und hinsichtlich ihrer Eignung als möglicher Interaktionspartner für JAZ1 zur Stabilisierung des YFP-Signals im BiFC-System bewertet.

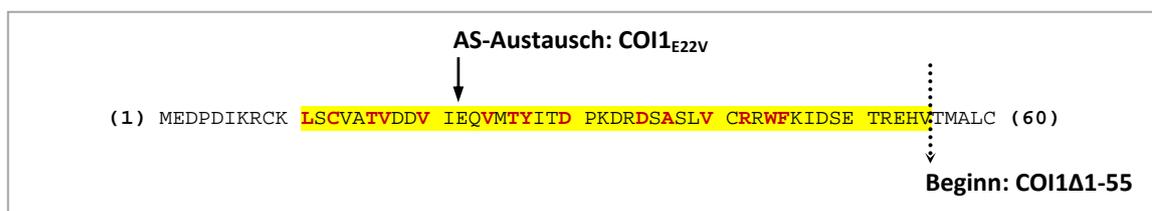


Abb. 4.10: Darstellung der F-Box-Domäne von COI1.

Abgebildet sind die ersten 60 N-terminalen AS des COI1-Proteins, wobei die F-Box-Domäne des Proteins gelb unterlegt ist. Die AS, die mit der ASK1-Untereinheit des SCF-Komplexes interagieren, sind rot hervorgehoben. Zur Erzeugung der um die F-Box verkürzten Mutante COI1 Δ 1-55 wurden die AS bis zum gestrichelten Pfeil deletiert. Der durchgezogene Pfeil markiert die AS Glutamat an Position 22 (E22), die zur Erzeugung der Mutante COI1_{E22V} gegen Valin (V) ausgetauscht wurde.

Zur Erzeugung der Deletionsmutante COI1 Δ 1-55 wurde mittels PCR unter Verwendung der spezifischen Primer COI1 Δ 1-55_fw und COI1_rev (siehe Punkt 8.1 Tab. 8.1 im Anhang) ein gegenüber der CDS des nativen *COI1* um 165 bp verkürztes DNA-Fragment (siehe Punkt 8.1

Tab. 8.2 im Anhang) generiert. Dieses wurde anschließend in einen *Gateway*-kompatiblen Eingangsvektor subkloniert und zur C-terminalen Fusion mit dem *YFP*-Reporter gen in den entsprechenden Zielvektor eingebracht (siehe Punkt 8.2 Tab. 8.3 im Anhang). Für die Generierung der Mutante $COI1_{E22V}$ wurde ein 235 bp langes Teilfragment der CDS von *COI1* (Basen von Position 6 bis 240) abgeleitet, in welchem das für E22 kodierende Triplet GAG gegen das für Valin (V) kodierende Triplet GTC ausgetauscht wurde (siehe Punkt 8.3 im Anhang). Die abgeleitete Teilsequenz TS_COI1_{E22V} (siehe Punkt 8.1 Tab 8.2 im Anhang) wurde *de novo* von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die weiteren Klonierungsschritte zur Erzeugung von $COI1_{E22V}$ wurden in Zusammenarbeit mit S. Mielke im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt (Mielke, 2012). Der Austausch der nativen Teilsequenz von *COI1* gegen das mutierte DNA-Konstrukt erfolgte dabei unter Verwendung von $pDONOR:COI1$ (siehe Punkt 4.2.1) als Eingangsvektor und der Schnittstellen für die *REN BamHI* und *HindIII*. Anschließend erfolgte die C-terminale Fusion von $COI1_{E22V}$ mit dem *YFP*-Reporter gen durch Umklonieren in den entsprechenden *Gateway*-kompatiblen Zielvektor (siehe Punkt 8.2 Tab. 8.3 im Anhang). Da für das native *COI1*-Protein bei N-terminaler Fusion mit dem *YFP*-Reporterprotein keine Fluoreszenz nachweisbar war (siehe Punkt 4.2.1), wurde sowohl für $COI1\Delta1-55$ als auch $COI1_{E22V}$ nur die C-terminale Fusion vorgenommen.

Abb. 4.11 zeigt die Ergebnisse der mit den generierten Konstrukten $COI1\Delta1-55:YFP$ und $COI1_{E22V}:YFP$ durchgeführten Lokalisationsstudien. Als Positivkontrolle wurden in einem Parallelansatz Mesophyllprotoplasten mit dem $COI1:YFP$ -Konstrukt, welches das native *COI1* exprimiert, transfiziert. In Zellkulturprotoplasten war für das Fusionsprotein $COI1:YFP$ wie in Punkt 4.2.1 beschrieben ein kernlokalisiertes *YFP*-Signal zu beobachten. Auch in Mesophyllprotoplasten lässt die Überlagerung der nach Transfektion mit $COI1:YFP$ aufgenommenen *YFP*-Fluoreszenz mit dem Hellfeldbild des Protoplasten auf eine Kernlokalisierung des Proteins schließen (siehe Abb. 4.11A). Während für das Fusionsprotein $COI1_{E22V}:YFP$ ebenfalls ein kernlokalisiertes Fluoreszenzsignal nachweisbar war (siehe Abb. 4.11C), trat die *YFP*-Fluoreszenz des $COI1\Delta1-55:YFP$ -Fusionsproteins nur im Zytosol auf (siehe Abb. 4.11B). Die punktförmige Verteilung des Fluoreszenzsignals deutet dabei auf eine Aggresombildung der $COI1\Delta1-55:YFP$ -Fusionsproteine hin. Bei Aggresomen handelt es sich um zytosolische Proteinzusammenlagerungen, die infolge der Überlastung der zellulären Wege zum Abbau geschädigter bzw. fehlgefalteter Proteine auftreten. Das Auftreten von Aggresomen ist somit ein Hinweis darauf, dass die Deletion der F-Box-Domäne eine Fehlfaltung von *COI1* zur Folge hatte. Die Deletionsmutante $COI1\Delta1-55$ wurde deswegen als möglicher Interaktionspartner für *JAZ1* im BiFC-System ausgeschlossen. Demgegenüber deuten die Ergebnisse zur Lokalisation der *COI1*-Variante $COI1_{E22V}$ darauf hin, dass der Austausch einer einzelnen AS im F-Box-Motiv keine bzw. keine so drastische Auswirkung auf die Proteinstruktur hat wie deren vollständige Deletion. Es war weder eine Bildung von Aggresomen zu beobachten, noch trat im Vergleich zum nativen *COI1* eine Mislokalisierung des $COI1_{E22V}:YFP$ -Fusionsproteins auf.

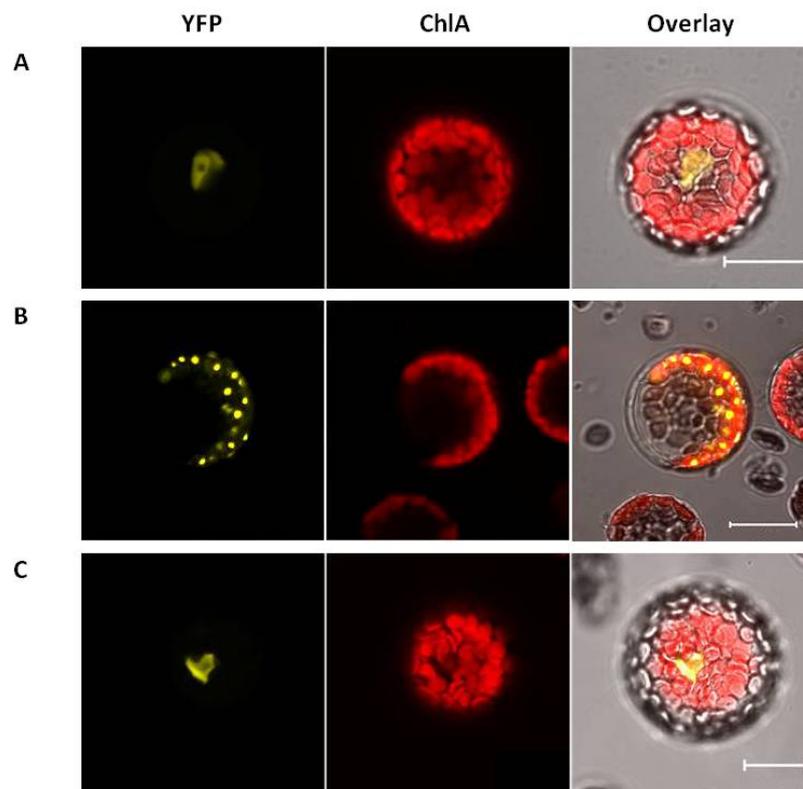


Abb. 4.11: Darstellung von Mesophyllprotoplasten, die mit den verschiedenen Varianten des *COI1*:YFP-Fusionskonstruktes transfiziert wurden.

Mesophyllprotoplasten wurden mit *COI1*:YFP (A), *COI1* Δ 1-55:YFP (B) *COI1*_{E22V}:YFP (C) transfiziert und für 16 h inkubiert. Von links nach rechts sind jeweils die Aufnahmen der YFP-Fluoreszenz (gelb), der Chlorophyll a (ChlA)-Fluoreszenz (rot) und der Überlagerung beider Fluoreszenzbilder mit einer Hellfeld-Aufnahme des Protoplasten dargestellt. Die mikroskopische Analyse erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm (YFP) und einem Detektionsbereich von 515 bis 550 nm (YFP) bzw. 646 bis 715 nm (ChlA). Die Aufnahmen in A und C entstanden in Zusammenarbeit mit S. Mielke. Die Maßstab Balken entsprechen einer Größe von 20 μ m.

Auf Grund der Ergebnisse der Lokalisationsstudien im Mesophyllprotoplastensystem kann *COI1*_{E22V} als potentieller Interaktionspartner für JAZ1 in Betracht gezogen werden. Um zu untersuchen, ob dabei die Ausbildung eines stabilen JA-induzierten BiFC-Signals erfolgt, müsste *COI1*_{E22V} zunächst mittels *Gateway*-Klonierung in die entsprechenden BiFC-Vektoren eingebracht werden. In Vorversuchen im transienten System wäre dann in Applikationsexperimenten mit Coronatin auszutesten, ob ohne Zugabe eines Proteasominhibitors ein BiFC-Signal nachweisbar ist und ob dieses über die Zeit erhalten bleibt. Sollte dies der Fall sein, könnten die entsprechenden Fusionskonstrukte über stabile Transformation von *A. thaliana* in Pflanzen eingebracht und getestet werden. Die Klonierung der BiFC-*COI1*_{E22V}-Konstrukte und Durchführung der BiFC-Analysen wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit aus Zeitgründen nicht mehr vorgenommen, stehen jedoch im Fokus der weiterführenden Arbeiten.

4.2.2.2 Klonierung von modifizierten Varianten des Interaktionspartners JAZ1, Überprüfung der Proteinstabilität und Lokalisationsstudien mit YFP-Fusionen dieser Varianten in Protoplasten

Neben der Klonierung von COI1-Varianten mit defekter oder fehlender F-Box-Domäne war ein weiterer Ansatz, eine nicht ubiquitinierbare und daher stabile Variante des JAZ1-Proteins zu generieren. Zu Beginn der Arbeit waren keine Informationen darüber verfügbar, auf welches der insgesamt 17 in JAZ1 vorkommenden Lysine (K) die Ubiquitineinheiten nach der Interaktion des JAZ-Proteins mit dem COI1-Protein übertragen werden. Daher wurden zunächst basierend auf der JAZ1-Proteinsequenz unter Anwendung der Bioinformatik-Tools CKSAAP_UbSite (Chen *et al.*, 2011) und UbPred (Radivojac *et al.*, 2010) die wahrscheinlichen Ubiquitinierungsstellen des JAZ1-Proteins berechnet (siehe Punkt 8.4 im Anhang). Dabei wurden K85, K105, K110 oder K119 als die AS ermittelt, an deren Seitenkette eine Ankopplung der Ubiquitineinheiten wahrscheinlich ist (siehe Abb. 4.12).

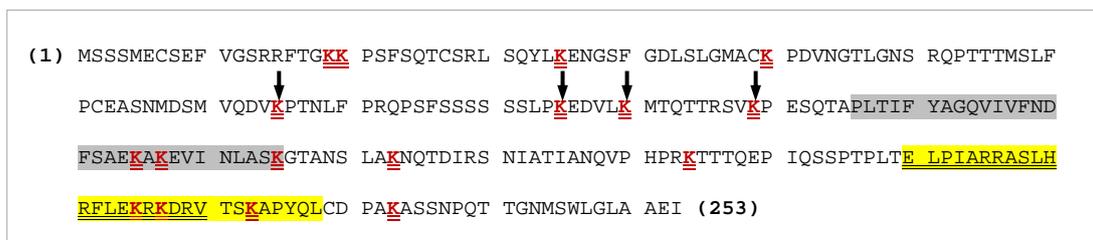


Abb. 4.12: JAZ1-Degron und potentielle Ubiquitinierungsstellen.

Gezeigt ist die AS-Sequenz von JAZ1. In dieser ist die c-terminal lokalisierte Jas-Domäne gelb markiert. Darin doppelt unterstrichen sind die 20 zum JAZ1-Degron gehörenden AS (E200 bis V220). Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die ZIM-Domäne. Rot hervorgehoben und unterstrichen sind die 17 im Protein vorkommenden Lysine, wobei die mit schwarzen Pfeilen markierten Lysine als potentielle Ubiquitinierungsstellen identifiziert wurden. Zur Erzeugung der Mutante JAZ_{4xR}:YFP wurden diese gegen Arginin ausgetauscht.

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Generierung einer Variante des JAZ1-Proteins, die auch bei erhöhten intrazellulären JA-Ile-Gehalten stabil ist, wäre die Mutation der potentiellen Ubiquitinierungsstellen. Damit würde keine Markierung von JAZ1 für den proteasomalen Abbau mehr erfolgen.

Für die Erzeugung dieser putativ nicht ubiquitinierbaren JAZ1-Variante wurde von der nativen JAZ1-CDS (siehe Punkt 8.3 im Anhang) eine 228 bp lange Teilsequenz abgeleitet, in der die für die genannten Lysine kodierenden Tripletts (AAA bzw. AAG) gegen Arginin-kodierende Tripletts (AGG) ausgetauscht wurden (siehe Punkt 8.1 Tab. 8.2 im Anhang). Die mutierte Teilsequenz *TS_JAZ1_{K85/105/110/119R}* wurde von MWG Eurofins Operon *de novo* synthetisiert. Für den Austausch der nativen Teilsequenz im zuvor bereits klonierten JAZ1-Gen gegen das mutierte Fragment *TS_JAZ1_{K85/105/110/119R}* wurden die REN-Schnittstellen für *NcoI* und *BclI* genutzt. Für diesen Klonierungsschritt diente der Gateway-kompatible Vektor pENTR:JAZ1 (siehe Punkt 4.2.1) als Eingangsvektor, von dem aus das mutierte

*JAZ1*_{K85/105/110/119R} zur C-terminalen Fusion mit *YFP* in den entsprechenden *Gateway*-kompatiblen Zielvektor (siehe Punkt 8.2 im Anhang) umkloniert wurde.

Um zu testen, ob durch die Mutation der potentiellen Ubiquitinierungsstellen der Coronatin-induzierte Abbau von JAZ1 blockiert wird, wurden Mesophyllprotoplasten mit dem generierten YFP-Fusionskonstrukt transfiziert und anschließend die Stabilität des Fusionsproteins *JAZ1*_{K85/105/110/119R}:YFP in Applikationsexperimenten mit Coronatin (30 µM) analysiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Protoplasten mit dem *JAZ1*:YFP-Konstrukt transfiziert und derselben Behandlung unterzogen. Die zuvor in Zellkulturprotoplasten beobachtete Abnahme der YFP-Fluoreszenz bei Nutzung des nativen JAZ1 (siehe Punkt 4.2.1.1) wurde auch in den Mesophyllprotoplasten festgestellt (Abb. 4.13A). Demgegenüber blieb das YFP-Signal mit dem modifizierten Fusionsprotein *JAZ1*_{K85/105/110/119R}:YFP über den untersuchten Zeitraum konstant. So konnte auch 60 min nach der Zugabe von Coronatin ein deutliches, kernlokalisierendes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.13B). Das untermauert die Hypothese, dass es sich bei mindestens einem der mit CKSAAP_UbSite und UbPred berechneten Lysine um eine Ubiquitinierungsstelle handelt und keine weiteren im JAZ1-Protein vorkommen.

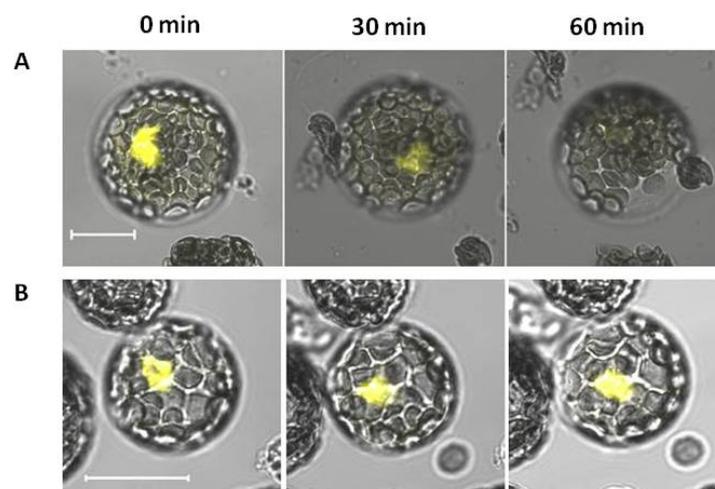


Abb. 4.13: Nach Coronatin-Applikation aufgenommene Zeitserien von *JAZ1*:YFP- und *JAZ*_{K85/105/110/119R}:YFP-transfizierten Mesophyllprotoplasten.

Gezeigt sind Zeitserien nach Coronatin-Behandlung von mit *JAZ1*:YFP (A) bzw. *JAZ*_{K85/105/110/119R}:YFP (B) transfizierten Protoplasten. Diese wurden 16 h nach der Transfektion mit 30 µM Coronatin behandelt. Die mikroskopische Analyse der YFP-Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm (YFP) und einem Detektionsbereich von 515 bis 550 nm. Die Maßstabablen entsprechen einer Größe von 20 µm

Problematisch bei der *in vivo*-Anwendung dieser stabilen JAZ1 Variante wäre jedoch die duale Rolle der JAZ-Proteine als

- (i) Repressoren JA-responsiver Gene bei niedrigen intrazellulären JA-Gehalten und
- (ii) Co-Rezeptoren für die JA-Perzeption bei z. B. durch abiotischen und/oder biotischen Stress verursachten erhöhten JA-Gehalten (siehe Punkte 1.2 und 4.1.1).

Daraus resultierend würde die Überexpression der JAZ1-Variante JAZ1_{K85/105/110/119R}, die nicht mehr dem Abbau durch das 26S-Proteasom zugeführt werden kann, vermutlich zu einer dauerhaften Blockade der Expression JA-respoviver Gene und damit zu einer JA-Insensitivität der Pflanze führen. Wie in den Punkten 1.2 und 4.1.1 beschrieben, werden die Co-Repressoren NINJA und TPL über die ZIM-Domäne der JAZ-Proteine rekrutiert, wogegen das Andocken von COI1 bei Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes über das in der Jas-Domäne liegende JAZ-Degron erfolgt (siehe Abb. 4.12). Dieses 21 AS umfassende Peptid ist bei JAZ1 am C-Terminus lokalisiert und erstreckt sich von AS E200 bis V220 (siehe Abb. 4.12). Demnach liegen alle als potentielle Ubiquitinierungsstellen identifizierten AS im JAZ1-Protein außerhalb der JAZ1-Degron-Sequenz. Da das JAZ1-Degron-Peptid allein somit nicht ubiquitinierbar und damit stabil sein müsste, wäre ein vielversprechender Versuchsansatz, das JAZ1-Degron-Peptid anstelle des JAZ1-Volllängenproteins als möglichen Interaktionspartner für COI1 im BiFC-System einzusetzen. Daher sollte das JAZ1-Degron-Peptid, das als Andockstelle für COI1 fungiert aber nicht die Co-Repressoren NINJA und TPL bindet, in Hinblick auf seine Stabilität auch bei erhöhten intrazellulären Coronatin-Gehalten getestet werden.

Da die Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes von JAZ1 mit COI1 über das in der Jas-Domäne liegende JAZ-Degron erfolgt, das keine potentiellen Ubiquitinierungsstellen enthält (siehe Abb. 4.12), wäre die Nutzung der Degron-Sequenz ein weiterer Ansatzpunkt zur Generierung einer stabilen JAZ-Variante. Zur Erzeugung des *JAZ1-Degron*-Konstruktes wurde zunächst auf Grundlage der vollständigen CDS von *JAZ1* (siehe Punkt 8.3 im Anhang) das 157 bp lange DNA-Fragment *TS_JAZ1-Degron* abgeleitet, das sich aus der 63 bp langen Degron-Sequenz (Basen in der CDS von Position 598 bis 660), einem 30 bp langen Linker (Basen in der CDS von Position 661 bis 690) und den *attB*-Stellen zusammensetzt (siehe Punkt 8.1 Tab. 8.2 im Anhang). Dieses DNA-Fragment wurde von Eurofins MWG Operon *de novo* synthetisiert und in Zusammenarbeit mit S. Mielke im Rahmen seiner Bachelorarbeit (Mielke, 2012) zunächst in den Eingangsvektor pDONR221 (siehe Punkt 8.2 im Anhang) subkloniert und zur C-terminalen YFP-Fusion in den entsprechenden YFP-Zielvektor (siehe Punkt 8.2 im Anhang) eingebracht.

Ebenso wie für die JAZ1-Mutante JAZ1_{K85/105/110/119R} wurde die Stabilität des JAZ1-Degrone im Mesophyllprotoplastensystem in Coronatin-Applikationsversuchen untersucht. Auch hier wurden zur Kontrolle Protoplasten mit *JAZ1:YFP* transfiziert und derselben Behandlung unterzogen. In den mit *JAZ1:YFP* transfizierten Protoplasten trat, wie erwartet, eine Coronatin-induzierte Abnahme des YFP-Signals auf (siehe Abb. 4.14 A2). In Protoplasten, die mit dem JAZ1-Degron:YFP-Konstrukt transfiziert wurden, war hingegen ein starkes im Zellkern und Zytoplasma lokalisiertes Fluoreszenzsignal noch 60 min nach Applikation von Coronatin vorhanden (siehe Abb. 4.14 B2). Dieses Signal war hinsichtlich seiner Intensität vergleichbar mit dem in unbehandelten Protoplasten aufgenommenen YFP-Signal (siehe Abb. 4.14 B1).

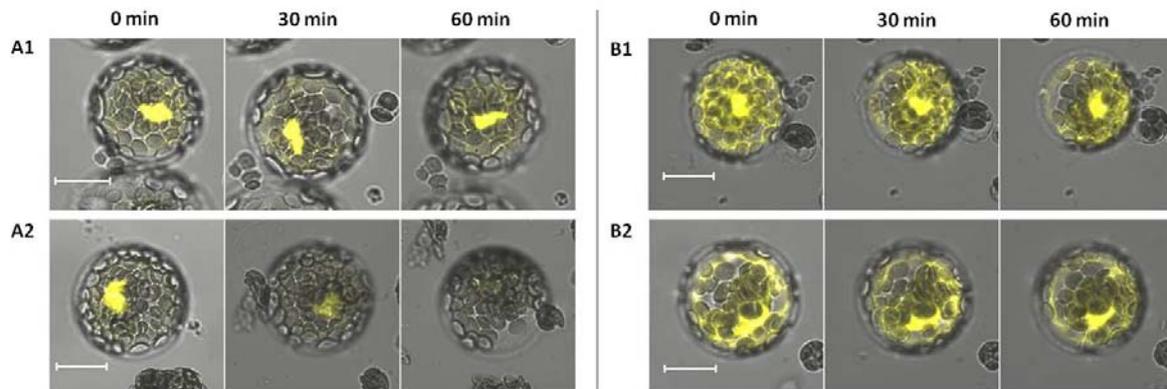


Abb. 4.14: Zeitserien von Mesophyllprotoplasten, die mit den Fusionskonstrukten *JAZ1:YFP*- und *JAZ1-Degron:YFP* transfiziert wurden.

Gezeigt sind Abbildungen von mit *JAZ1:YFP* (A) und *JAZ1-Degron:YFP* (B) transfizierten Protoplasten, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Coronatin-Behandlung (30 μm Coronatin appliziert 16 h nach Transfektion) aufgenommen wurden (A2, B2). Zusätzlich wurden zum Vergleich Zeitserien von unbehandelten Protoplasten (A1, B1) aufgenommen. Die mikroskopische Analyse der YFP-Fluoreszenz (gelb) erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm und einem Detektionsbereich von 515 bis 550 nm. Die Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit S. Mielke. Die Maßstabballen entsprechen einer Größe von 20 μm .

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass das JAZ1-Degron-Peptid auch bei erhöhten Coronatin-Gehalten stabil war und somit als potentieller Interaktionspartner für COI1 im BiFC-System verwendet werden kann. Als Kontrollen für eine mögliche Fehlfaltung des isolierten JAZ1-Degrone sollten in diese Versuche auch die BiFC-Konstrukte des mutierten JAZ-Proteins $\text{JAZ1}_{\text{K85/110/115/119R}}$ einbezogen werden. Die Klonierung der entsprechenden Konstrukte und Durchführung der BiFC-Analysen wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit aus Zeitgründen nicht mehr vorgenommen, stehen jedoch im Fokus der weiterführenden Arbeiten. Sowohl das isolierte JAZ1-Degron, wie auch die COI1-Variante $\text{COI1}_{\text{E22V}}$ bieten einen vielversprechenden Ansatz, um auch unter hohen JA-Gehalten eine stabile Interaktion beider Partner zu ermöglichen und damit ein stabiles BiFC-Signal zur Visualisierung erhöhter JA-Gehalte in der Pflanze zu erhalten.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Lokalisations- und BiFC-Analysen

Im Folgenden sind die in den Punkten 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Ergebnisse noch einmal kurz tabellarisch zusammengefasst. In Tab. 4.2 sind dabei die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit allen generierten *YFP*-Fusionskonstrukten aufgelistet. Eine Übersicht über die Ergebnisse der bisher durchgeführten BiFC-Analysen findet sich in Tab. 4.3.

Tab. 4.2: Überblick über die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit den generierten YFP-Fusionsproteinen von COI1, JAZ1 bzw. deren modifizierten Varianten.

YFP-Lokalisationsstudien			
Proteinvariante	Definition	Lokalisation	besondere Anmerkungen
Fusionsproteine aus COI1 bzw. den generierten COI1-Varianten und Vollängen-YFP:			
YFP:COI1	natives COI1; YFP am N-Terminus	nicht detektierbar	für BiFC-Analysen nicht geeignet
COI1:YFP	natives COI1; YFP am C-Terminus	Zellkern	
COI1 Δ 1-55:YFP	Deletion der F-Box; YFP am C-Terminus	Zytoplasma	Fehllokalisierung und deutliche Aggresombildung
COI1 _{E22V} :YFP	AS-Austausch E22V; YFP am C-Terminus	Zellkern	
Fusionsproteine aus JAZ1 bzw. den generierten JAZ1-Varianten und Vollängen-YFP:			
YFP:JAZ1	natives JAZ1; YFP am N-Terminus	Zellkern	MG-132 Applikation erforderlich
JAZ1:YFP	natives JAZ1; YFP am C-Terminus	Zellkern	MG-132 Applikation erforderlich
JAZ1 _{K85/105/110/119R} :YFP	Mutation der putativen Ubiquitinierungsstellen; YFP am C-Terminus	Zellkern	ohne MG-132-Behandlung stabil nach Applikation von Coronatin
JAZ1-Degron:YFP	JAZ1-Degron-Peptid; YFP am C-Terminus	Zellkern und Zytosol	ohne MG-132-Behandlung stabil nach Applikation von Coronatin

Tab. 4.3: Überblick über die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit den generierten BiFC-YFP-Fusionsproteinen von COI1, JAZ1 bzw. deren modifizierten Varianten.

BiFC-Analysen			
BiFC-Kombination	BiFC-Signal nach Coronatin-Applikation	Lokalisation	Anmerkung
YFP ^C :JAZ1 + COI1:YFP ^N	ja	Zellkern	MG-132 Applikation notwendig
YFP ^N :JAZ1 + COI1:YFP ^C	ja	Zellkern	MG-132 Applikation notwendig
JAZ1:YFP ^C + COI1:YFP ^N	ja	Zellkern	MG-132 Applikation notwendig
JAZ1:YFP ^N + COI1:YFP ^C	ja	Zellkern	MG-132 Applikation notwendig

4.3 Diskussion

4.3.1 Die Lokalisationsstudien mit den YFP-Fusionskonstrukten weisen auf eine Kernlokalisierung der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes hin

Die Jasmonatperzeption erfolgt durch einen Proteinkomplex, der aus dem F-Box-Protein COI1 und einem JAZ-Protein besteht (Sheard *et al.*, 2010) (siehe Punkt 4.1.1). Die Bindung von JAZ an COI1 gehört zu den ersten physiologischen Reaktionen pflanzlicher Zellen auf einen Anstieg im endogenen Jasmonatgehalt und wird spezifisch durch ein Stereoisomer von JA-Ile, das (+)-7-*iso*-JA-Ile, induziert (Fonseca *et al.*, 2009) (siehe Punkt 4.1.1). Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Phytohormonen ist die Untersuchung ihres räumlichen und zeitabhängigen Vorkommens notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher eine geeignete Methode entwickelt werden, die einen direkten zell- und gewebespezifischen Nachweis von JA bzw. ihrem bioaktiven Konjugat JA-Ile ermöglicht. Da Protein-Protein-Interaktionen durch die BiFC *in vivo* sichtbar gemacht werden können (Ventura, 2011), bot die Anwendung dieser Technik auf die JA-Ile vermittelte Ausbildung des COI1-JAZ-Rezeptorkomplexes einen interessanten Ansatz für die Etablierung einer Methode zum nicht-invasiven Nachweis des bioaktiven Jasmonats *in vivo* (siehe Punkt 4.1.2). Die physische Interaktion von COI1 und JAZ1 aus *A. thaliana* wurde bereits im Y2H-System bzw. mit *Pulldown-Assays* nachgewiesen (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007), daher wurden diese beiden Proteine für die Etablierung des BiFC-Systems verwendet. Als Testsystem dienten Protoplasten, die aus einer Suspensionskultur bzw. aus Blättern von *A. thaliana* isoliert wurden.

In Vorversuchen mit Vollängen-YFP-Fusionsproteinen (YFP:COI1, COI1:YFP, YFP:JAZ1, JAZ1:YFP) war zunächst zu testen, ob sich die Fusion des Reporterproteins an die Komponenten des Rezeptorkomplexes möglicherweise nachteilig auf die Faltung des YFP auswirken könnte. Für alle Konstrukte, mit Ausnahme von *YFP:COI1*, konnte nach Transfektion der Protoplasten ein deutliches YFP-Signal nachgewiesen werden. Die beobachteten Fluoreszenzsignale traten dabei sowohl für JAZ1 wie auch COI1 vorrangig im Zellkern auf (siehe Abb. 4.6). Eine Kernlokalisierung verschiedener JAZ-Proteine, darunter auch JAZ1, wurde in Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionen in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen bereits demonstriert (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Vermutlich spielt dabei ein in der Jas-Domäne lokalisiertes PY (Prolin-Tyrosin)-NLS eine Rolle (Grunewald *et al.*, 2009). In *H. sapiens* und *S. cerevisiae* werden Proteine mit diesem Motiv unter Beteiligung von Karyopherin $\beta 2$, einem Kernimportprotein, in den Zellkern eingeschleust (Lee *et al.*, 2006; Pauwels & Goossens, 2011). Die Bedeutung des PY-Motivs für den Transport der JAZ-Proteine in den Zellkern ist jedoch noch nicht vollständig gesichert. So werden die JAZ10-Spleissevarianten JAZ10.3 und JAZ10.4, deren Jas-Domänen verändert sind und die das PY-Motiv nicht besitzen, ebenfalls in den Zellkern transportiert (Chung *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass zumindest die JAZ10-Proteine über einen alternativen Mechanismus transportiert werden (Pauwels & Goossens, 2011). Für JAZ9 wurde mittlerweile gezeigt, dass dessen Kernlokalisierung abgesehen vom PY-Motiv

zusätzlich von der über die Jas-Domäne vermittelten Interaktion mit dem TF MYC2 abhängt (Withers *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zu den JAZ-Proteinen liegen für die Lokalisation von COI1 bisher nur wenige Referenzdaten vor. Auf Grundlage der Kernlokalisierung von JAZ wurde auch ein kernlokalisiertes Auftreten von COI1 postuliert (Withers *et al.*, 2012). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit, die ebenfalls das Auftreten des COI1:YFP-Fusionsproteins im Zellkern zeigte. COI1 hat ein Molekulargewicht von 67,7 kDa und kann daher nicht passiv durch die Kernporen diffundieren, da diese nur für Proteine bis zu einer Größe von etwa 50 kDa durchlässig sind (Moore, 1998). Der Transport in den Zellkern muss somit auf anderem Wege erfolgen, z. B. aktiv vermittelt durch Importine, die mit den zu transportierenden Proteinen über die NLS interagieren. In pflanzlichen Proteinen kann es sich dabei um kurze einfache (monopartite) oder zweigeteilte (bipartite) Zielsequenzen handeln, die reich an basischen AS sind (Wagstaff & Jans, 2009). Bisher konnte jedoch noch keine klassische NLS in COI1 identifiziert werden. Generell wird für monopartite NLS die KK/R-X-K/R-Konsensussequenz postuliert (Chelsky *et al.*, 1989). So wurde für das F-Box-Protein Cdc4 (*Cell division cycle protein 4*) aus *S. cerevisiae* am N-Terminus ein in die Klasse der c-myc-NLS (Dang & Lee, 1988) gehörendes KRVK-Motiv als für den Kerntransport essentiell identifiziert (Blondel *et al.*, 2000). Am N-Terminus von COI1 befindet sich ein c-myc-ähnliches KRCK-Sequenzmotiv (AS-Position 7 bis 10, siehe auch COI1-Sequenz in Abb. 4.1). Die Deletion der ersten zehn N-terminalen AS führt jedoch nicht zur Delokalisation des Proteins, so dass dieses Motiv als funktionelle NLS ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt; siehe Mielke, 2012).

Untersuchungen mit Met30 (*Methionine-requiring protein 30*), einem anderen F-Box-Protein aus *S. cerevisiae*, zeigten, dass die F-Box-Domäne nicht nur für die Integration des Proteins in den SCF-Komplex essentiell ist, sondern auch für dessen Transport in den Zellkern (Brunson *et al.*, 2003). Somit ist nicht auszuschließen, dass auch COI1 über eine in der F-Box-Domäne lokalisierte atypische Zielsequenz in den Zellkern importiert wird. Die Anreicherung von COI1 im Zytosol bei Deletion des kompletten F-Box-Motivs (COI1 Δ 1-55) (siehe Punkt 4.2.2.1 stützt diese Hypothese. Zudem lag die Anzahl der Mesophyllprotoplasten, die eine YFP-Signal zeigten, bei dem COI1 Δ 1-55:YFP-Konstrukt mit durchschnittlich 2 % deutlich unter der mit dem COI1:YFP-Konstrukt erzielten (≥ 30 %) (Daten nicht gezeigt; siehe Mielke, 2012). Diese Beobachtung deutet auf einen verstärkten Abbau des um die F-Box-Domäne verkürzten COI1-Proteins hin, der möglicherweise auf eine Proteinfaltung infolge der Deletion zurückzuführen sein könnte. Durch N-terminale Fusion des um die F-Box-Domäne verkürzten COI1-Deletionsproteins mit dem monopartiten SV40 (*SV40 large T-Antigen from Semian Virus 40*)-NLS (PKKKRKV) (Kalderon *et al.*, 1984) konnte die Relokalisation dieses Proteins in den Zellkern erzwungen werden (Daten nicht gezeigt; siehe Mielke, 2012). Jedoch lag auch in den mit SV40:COI1 Δ 1-55:YFP transfizierten Mesophyllprotoplasten nur bei etwa 2 % der Protoplasten ein YFP-Signal vor. Wie erst kürzlich demonstriert wurde, wird COI1 durch die Interaktion mit dem SCF-Komplex, die

über die F-Box-Domäne von COI1 erfolgt ((siehe Abb. 4.3)), stabilisiert (Yan *et al.*, 2013). Freies COI1, das nicht an ASK1 gebunden ist, wird demnach selbst Ziel einer Ubiquitinierung und somit über das 26S-Proteasom abgebaut. Dies könnte auch erklären, warum bei Fusion des YFP-Reporter-proteins an den N-Terminus von COI1 (YFP:COI1) kein Fluoreszenzsignal in transfizierten Protoplasten nachweisbar war (siehe Punkt 4.2.1.1). Die N-terminale Fusion des Reporter-proteins könnte durch Verdeckung der F-Box-Domäne eine sterische Behinderung der Bindung an den SCF-Komplex und dadurch den Abbau des COI1:YFP-Fusionsproteins zur Folge haben. Die Ergebnisse von Yan *et al.* (2013) lassen im Zusammenhang mit den Ergebnissen der eigenen Lokalisationsstudien daher fraglich erscheinen, ob die Delokalisation von COI1 Δ 1-55 auf Grund der Deletion einer putativen NLS innerhalb der F-Box-Domäne erfolgte oder ob sie eher Folge einer Fehlfaltung der Deletionsmutante war und/oder wegen der Dissoziation des modifizierten COI1-Proteins vom SCF-Komplex eintrat. Die Lokalisation von COI1 und der mögliche Transportmechanismus in den Zellkern sind demnach noch nicht eindeutig geklärt. Relevant wäre insbesondere die Identifizierung der möglichen NLS von COI1 bzw. über welchen Mechanismus das Protein alternativ in den Zellkern gelangt. Die vermutete Funktion von COI1 im Zellkern könnte durch Komplementationsexperimente gestützt werden. So wäre interessant zu prüfen, ob mit dem nachweislich kernlokalisierten COI1:YFP-Fusionsprotein die im *COI1*-Gen defekte *A. thaliana*-Mutante *coi1-1* (Feys *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1998) funktionell komplementiert werden kann. Die Experimente dazu werden aktuell am IPB durchgeführt.

4.3.2 Für ein stabiles BiFC-Signal muss der infolge der Interaktion mit dem SCF^{COI1}-Komplex eintretende Abbau des JAZ1-Proteins unterdrückt werden

4.3.2.1 Bei Anwendung der nativen Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes kann ein BiFC-Signal nur nach Applikation eines Proteasominhibitors detektiert werden

Bei allen getesteten Kombinationen von COI1- und JAZ1-Fusionsproteinen für die BiFC war nach Applikation von Coronatin ein kernlokalisiertes Fluoreszenzsignal zu beobachten (siehe Punkt 4.2.1.2). Das YFP-Signal trat jedoch nur auf, wenn zusätzlich zur Coronatin-Applikation eine Behandlung der Protoplasten mit dem Proteasominhibitor MG-132 erfolgte. Bereits bei den Vorversuchen mit YFP:JAZ und JAZ:YFP war zu beobachten, dass nach Zugabe des Proteasominhibitors eine höhere Anzahl an Protoplasten eine YFP-Fluoreszenz aufwiesen (siehe Punkt 4.2.1.1). Das Peptidalddehyd MG-132 hemmt die proteolytische Aktivität des 26S-Proteasoms (Lee & Goldberg, 1998). Es unterdrückt so den infolge der Interaktion mit dem SCF^{COI1}-Komplex eintretenden Abbau des ubiquitinierten JAZ1-Proteins und ermöglicht dadurch die Ausbildung eines stabilen, detektierbaren YFP-Signals. Problematisch bei Anwendung des Proteasominhibitors ist jedoch, dass seine Applikation in lebenden Zellen zur Akkumulation von ROS führt (Han & Park, 2010; Han *et al.*, 2011), welche eine Schädigung der Zellen zur Folge hat. Dies konnte im Protoplastensystem anhand einer in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis und der Einwirkzeit auftretenden Abnahme der

Anzahl an vitalen Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt, (Schimmel, 2009)). Auch in Pflanzen wurde ein negativer Einfluss von MG-132 auf verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse nachgewiesen. So wirkt sich eine MG-132-Behandlung unter anderem negativ auf den Zellzyklus (Yanagawa *et al.*, 2002), das Wurzelwachstum von *A. thaliana*-Keimlingen und das Pollenschlauchwachstum in *Picea wilsonii* (Sheng *et al.*, 2006) aus. Auf Grund der Schadwirkung von MG-132 auf lebende Zellen/Organismen, ist das auf Basis der nativen COI1- und JAZ1-Proteine etablierte BiFC-System letztlich für den nicht-invasiven Nachweis von JA-Ile *in vivo* ungeeignet. Obwohl ein deutliches BiFC-Signal in Protoplasten erzielt wurde, kann das System in dieser Form nicht auf stabil transformierte Pflanzen für eine zell- und gewebespezifische Detektion von JA-Ile übertragen werden.

4.3.2.2 Das nicht in den SCF-Komplex integrierte COI1_{E22V}-Protein kann als potentieller Interaktionspartner zur Ausbildung eines stabilen BiFC-Komplexes dienen

Um eine *in vivo*-Anwendung der BiFC-Methode zum Nachweis von JA-Ile zu ermöglichen, waren Strategien zu entwickeln, die ohne den Einsatz eines schädigenden Proteasom-inhibitors zu einer Stabilisierung des Co-Rezeptorkomplexes und dadurch des BiFC-Signals führen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Vorgehensweisen getestet, um die Übertragung von Ubiquitin auf das JAZ-Protein zu unterbinden und damit vor dem Abbau zu schützen. Hierfür wurden unter anderem Varianten des COI1-Proteins generiert, deren Integration in den SCF-Komplex (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002) durch Deletion der F-Box-Domäne (COI1 Δ 1-55) bzw. durch deren Mutation (COI1_{E22V}) unterbunden werden sollte (siehe Punkt 4.2.2.1).

Wie bereits in Punkt 4.3.1 diskutiert, geht aus den Ergebnissen der mit den generierten YFP-Fusionsproteinen durchgeführten Lokalisationsstudien hervor, dass die Deletion des kompletten F-Box-Motivs zur Akkumulation von COI1 Δ 1-55:YFP im Zytoplasma und zum verstärkten Abbau des Proteins führt. Diese modifizierte COI1-Variante musste somit als Interaktionspartner für das BiFC-System ausgeschlossen werden. Demgegenüber hatte der an der AS-Position 22 im F-Box-Motiv vorgenommene Austausch der sauren AS Glutamat gegen die basische AS Valin keinen nachteiligen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins (siehe Abb. 4.11). Unklar ist jedoch, ob die Anwendung von COI1_{E22V} tatsächlich zu einem stabilem BiFC-Signal führt und so die Visualisierung von JA-Ile *in vivo* ermöglichen könnte. Zum Zeitpunkt der Versuchsplanung und -durchführung lagen keine Informationen zum *Turnover* des COI1-Proteins vor, so dass der von Yan *et al.* (2013) nachgewiesene Abbau von freiem, nicht in den SCF-Komplex integriertem COI1 durch das Proteasom (siehe Punkt 4.3.1) nicht berücksichtigt werden konnte. Dieser könnte zur Folge haben, dass kein detektierbares BiFC-Signal erzielt werden kann. Allerdings konnte in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien kein verstärkter Abbau von COI1_{E22V}:YFP beobachtet werden. Es war ein deutliches Fluoreszenzsignal nachweisbar. Zudem war die Transfektionsrate der mit COI1_{E22V}:YFP transfizierten Protoplasten vergleichbar mit der bei Verwendung des COI1:YFP-Konstruktes ($\geq 30\%$) (Daten nicht gezeigt; siehe

Mielke, 2012) und auch die Intensität des aus der Expression von *COI1_{E22V}:YFP* resultierenden kernlokalisierten YFP-Signals wies keinen merklichen Unterschied zu dem des nativen Konstruktes auf. Die Bindung von COI1 an die ASK1-Untereinheit des SCF-Komplexes erfolgt unter Beteiligung von 15 AS des F-Box-Proteins (Devoto *et al.*, 2002). Es wäre somit denkbar, dass der einzelne AS-Austausch entgegen der Ergebnisse von Xu *et al.* (2002) die Integration des COI1-Proteins in den SCF-Komplex nicht beeinträchtigt. Die von Xu *et al.* (2002) mit COI1 bzw. der COI1-Mutante und ASK1 durchgeführten Co-Immuno-präzipitationsversuche wiesen jedoch auf eine Störung hin. Dieses Ergebnis wurde zudem durch Komplementationsexperimente in der JA-defizienten *A. thaliana*-Mutanten *coi1-1* verifiziert.

Im Gegensatz zu *coi1-1*-Pflanzen, die mit dem *COI1:YFP*-Konstrukt komplementiert werden konnten, waren die *COI1_{E22V}:YFP* exprimierenden Pflanzen weiterhin JAME-intolerant. Da die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit erzeugten *YFP*-Konstrukte unter der Kontrolle des CaMV 35S (35S)-Promotors exprimiert wurden, wäre es auch denkbar, dass durch die starke Überexpression von *COI1_{E22V}:YFP* der Abbau des Fusionsproteins ausgeglichen wurde und so das YFP-Signal detektierbar war. Auch in den BiFC-Vektoren stehen die Konstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors, so dass *COI1_{E22V}* als potentieller Interaktionspartner für JAZ1 angenommen werden kann. Das *COI1_{E22V}*-Konstrukt müsste in weiterführenden Experimenten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden konnten, zunächst im transienten Protoplastensystem in Hinblick auf die Stabilität des JA-Ile-Co-Rezeptorkomplexes bei der BiFC getestet werden. In Protoplasten wäre zunächst unter Coronatin-Applikation zu prüfen, ob auch ohne Zugabe des Proteasominhibitors MG-132 ein stabiles BiFC-Signal infolge der Interaktion von JAZ1 mit *COI1_{E22V}* nachweisbar ist. Sollte dies der Fall sein, könnten die BiFC-Fusionskonstrukte über stabile Transformation in *A. thaliana* eingebracht und hinsichtlich ihrer Eignung für den *in vivo*-Nachweis von JA-Ile getestet werden. Andernfalls könnte der Co-Rezeptorkomplex durch eine zusätzliche Modifikation des *COI1_{E22V}*-Proteins stabilisiert werden. Der Abbau von nicht in den SCF-Komplex gebundenem COI1 erfolgt über Ubiquitinierung an der AS K279 (Yan *et al.*, 2013). Folglich könnte durch eine gezielte Mutation dieser AS (z. B. durch Austausch gegen Arginin) die Übertragung von Ubiquitin auf das COI1-Protein verhindert und damit der Abbau unterdrückt werden.

4.3.2.3 Das stabile JAZ1-Degron-Peptid kann als potentieller Interaktionspartner für ein stabiles BiFC-Signal dienen

Neben der Modifikation von COI1 sollte in einem parallelen Versuchsansatz eine JAZ1-Variante generiert werden, die nicht ubiquitinierbar und folglich stabil ist (siehe Punkt 4.2.2.2). Der JA-Ile-induzierte Abbau der JAZ-Repressorproteine spielt eine wesentliche Rolle in der durch das Phytohormon ausgelösten Signaltransduktionskette. Dennoch liegen bisher kaum Informationen zum Mechanismus der Ubiquitinierung dieser Proteine vor. So war bislang unklar, auf welches der 17 Lysinreste von JAZ1 die Ubiquitineinheiten nach

Interaktion mit der SCF^{COI1}-E3-Ubiquitinligase übertragen werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit konnten die AS K85, K105, K110 und K119 als putative Ubiquitinierungsstellen des JAZ1-Proteins identifiziert werden (siehe Abb. 4.12). Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von Ubiquitineinheiten auf diese vier Lysine wurde zunächst mit Hilfe der Bioinformatik-Tools CKAAPS-UbSite und UbPred aufgezeigt. Anschließend wurde von JAZ1 die mutierte Variante JAZ1_{K85/105/110/119R} generiert, bei der diese vier Lysine gegen Arginin ausgetauscht wurden, und YFP-Fusionskonstrukte generiert. In transient transformierten Protoplasten wurde nachgewiesen, dass im Gegensatz zu JAZ1:YFP kein Coronatin-induzierter Abbau von JAZ1_{K85/105/110/119R}:YFP erfolgte (siehe Abb. 4.13). Damit konnten die Ergebnisse der *in silico*-Berechnung bestätigt werden. Mit den Protoplastenversuchen wurde außerdem sichergestellt, dass neben den vier möglichen Ubiquitinierungsstellen K85, K105, K110 und K119 keine weiteren im Protein vorkommen. Welches der vier Lysine ubiquitiniert wird, kann anhand der durchgeführten Versuche nicht genauer definiert werden. Um genauere Aussagen dazu treffen zu können, wären im transienten Protoplastensystem entsprechende Analysen mit JAZ1-Proteinen durchzuführen, bei denen jeweils nur eines der putativ ubiquitinierten Lysine mutiert wurde (JAZ1_{K85R}:YFP, JAZ1_{K8105R}:YFP, JAZ1_{K110R}:YFP, JAZ1_{K119R}:YFP).

Obwohl mit JAZ1_{K85/105/110/119R} eine stabile Variante von JAZ1 vorliegt, die auf Grund der intakten Jas-Domäne theoretisch noch zur Interaktion mit dem COI1-Protein befähigt sein sollte, ist das mutierte Protein nicht für den angestrebten *in vivo*-Nachweis von JA-Ile anwendbar. Dies lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen ableiten, die bei Analysen der JAZ10-*Splice*-Variante JAZ10.4 erzielt wurden. Durch alternatives Spleißen fehlt diesem Protein die Jas-Domäne vollständig (Wasternack & Hause, 2013). Infolge dessen kann es nicht mit dem SCF^{COI1}-Komplex interagieren und wird somit nicht bei einem Anstieg im JA-Gehalt abgebaut. Da JAZ10.4 jedoch trotz fehlender Jas-Domäne den TF MYC2 binden kann (Moreno *et al.*, 2013) und auch die Co-Repressoren NINJA und TPL rekrutiert werden (siehe Punkte 1.2 und 4.1.1), führt die Überexpression dieser Spleiß-Variante in *A. thaliana* zu einem JA-insensitiven Phänotyp (Yan *et al.*, 2007; Chung & Howe, 2009; Chung *et al.*, 2010). Folglich würde vermutlich auch eine Überexpression der nicht mehr abbaubaren JAZ1_{K85/105/110/119R}-Mutante zur dauerhaften Blockade der Expression JA-regulierter Gene führen. Als Alternative zu dieser Mutante wurde daher die mögliche Anwendbarkeit des JAZ1-Degron-Peptids für das zu etablierende BiFC-System getestet. Das Degron-Peptid ist, wie beschrieben, Teil der Jas-Domäne. Es ist der für die Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes maßgebliche Bereich des JAZ-Proteins, da hier sowohl die Interaktion mit COI1 als auch die Bindung von JA-Ile erfolgt (Sheard *et al.*, 2010) (siehe Punkt 4.1.1). Alle vier als potentielle Ubiquitinierungsstellen identifizierten Lysine sind in der N-terminalen Hälfte des JAZ1-Proteins lokalisiert (siehe Abb. 4.12) und liegen somit außerhalb des etwa 20 AS langen JAZ1-Degron-Peptids. Um sicherzustellen, dass das JAZ1-Degron-Peptid auch unter erhöhten JA-Ile-Gehalten stabil ist und nicht durch das 26S-Proteasom abgebaut wird, wurden in transient mit JAZ1-Degron:YFP transfizierten Protoplasten Applikationsversuche mit

Coronatin durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zum Vollängen-JAZ1 kein Coronatin-induzierter Abbau des Degron-Peptids erfolgte.

Strittig bleibt jedoch die Frage, ob nicht auch die Überexpression des isolierten JAZ1-Degron-Peptids zu einer dauerhaften Blockade JA-regulierter Gene und somit einem JA-insensitiven Phänotyp führen könnte. In *Pulldown-Assays* wurde für das JAZ1-Protein zwar gezeigt, dass die Jas-Domäne nicht für die Bindung an MYC2 essentiell ist. Selbst nach Deletion der kompletten Jas-Domäne interagiert JAZ1 mit MYC2 (Withers *et al.*, 2012). Für einige der JAZ-Proteine aus *A. thaliana*, wie z. B. JAZ3 (Chini *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008) und JAZ9 (Withers *et al.*, 2012), wurde allerdings nachgewiesen, dass die Jas-Domäne essentiell für die Bindung an den TF MYC2 ist. Für JAZ9 wurde dabei kürzlich das im Degron-Bereich der Jas-Domäne an Position 17 lokalisierte Arginin (R^{Jas17}) als kritische Komponente für diese Interaktion identifiziert (Withers *et al.*, 2012). Die AS R^{Jas17} ist in den JAZ-Proteinen hochkonserviert und kommt auch in JAZ1 vor (siehe Abb. 4.12). Demnach ist unklar ob im Fall von JAZ1 nur außerhalb der Jas-Domäne lokalisierte AS die Bindung an MYC2 vermitteln, oder ob zusätzlich auch R^{Jas17} in diese Interaktion *in vivo* involviert ist. Zudem ist in Betracht zu ziehen, dass die Repression der JA-regulierten Gene nicht allein durch die Bindung des TF durch ein JAZ-Protein erfolgt. Vielmehr ist sie Resultat der Rekrutierung von Histondeacetylasen durch den Co-Repressor TPL, der wiederum durch das an das JAZ-Protein gebundene Adapterprotein NINJA mobilisiert wird (Wasternack & Hause, 2013) (siehe Punkt 1.2). Da NINJA über die ZIM-Domäne mit den JAZ-Proteinen interagiert, wäre denkbar, dass selbst im Falle einer Bindung des JAZ1-Degron über R^{Jas17} an MYC2 keine Inhibition der Genexpression erfolgt.

Abgesehen von der Möglichkeit der Induktion eines JA-insensitiven Phänotyps durch Überexpression des JAZ1-Degrans könnte es bei Verwendung des isolierten Degrans zudem zu einer Fehlfaltung des Peptids und/oder sterischen Behinderungen bei der BiFC mit COI1 kommen. Das Degron besitzt eine charakteristische zweigeteilte Sekundärstruktur. Der schleifenförmige N-Terminus interagiert einerseits selbst mit JA-Ile, verschließt gleichzeitig aber auch die vom COI1-Protein ausgebildete Bindetasche für JA-Ile, so dass das Hormon darin fixiert wird (Sheard *et al.*, 2010) (siehe Punkt 4.1.1). Das C-terminale α -Helix-Motiv des Degrans ist hingegen vor allem an der Interaktion mit COI1 involviert. Erst auf Grundlage dieser Eigenschaften kann die Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes erfolgen. Kommt es zu einer Fehlfaltung des isolierten Peptids, würde demnach kein BiFC-Komplex ausgebildet werden können. Darüber hinaus ist das JAZ1-Degron mit einer Größe von etwa 2,6 kDa sehr klein (entspricht etwa 1/10 der Größe des nativen JAZ1-Proteins). Zum einen könnte dies dazu führen, dass bei Fusion mit einer der YFP-Hälften das Degron-Peptid durch das Reporterprotein verdeckt wird und folglich die Interaktion mit dem COI1-Protein behindert wird. Zum anderen wäre möglich, dass die YFP-Hälften der Interaktionspartner bei der Ausbildung des Co-Rezeptorkomplexes nicht mehr in räumliche Nähe gelangen und so kein BiFC-Signal nachweisbar ist. Die verwendeten BiFC-Vektoren sind jedoch so konzipiert, dass zwischen YFP^N bzw. YFP^C und dem damit zu fusionierenden Protein/Peptid jeweils ein etwa

30 AS umfassendes Linkerpeptid integriert wird. Zudem wurde bei der Klonierung des Degrons ein weiteres 10 AS umfassendes Linkerpeptid am C-Terminus eingefügt (siehe Punkt 4.2.2.2). Zumindest für die C-terminalen Fusionsproteine JAZ1-Degron:YFP^{C/N} werden damit die im Vergleich zum nativen Protein am C-Terminus fehlenden 33 AS durch die Kombination der Linkerpeptide wieder aufgefüllt. Da die YFP^{C/N}-Fusionen mit dem nativen JAZ1 bei BiFC-Studien mit COI1 ein YFP-Signal zeigten (siehe Punkt 4.2.1.2 und 4.3.2.1), müssten somit auch die JAZ1-Degron:YFP^{C/N}-Fusionen, sofern keine Fehlfaltung des JAZ1-Degrons vorliegt, zu einem detektierbaren BiFC-Signal führen können. In weiterführenden Experimenten wäre nach Erzeugung der entsprechenden BiFC-Konstrukte im Protoplastensystem zu testen, ob das Degron ohne Einsatz des Inhibitors MG-132 zu einem detektierbaren Coronatin-induzierten BiFC-Signal führt. Sollte dies der Fall sein, müsste untersucht werden, ob auch eine *in vivo*-Anwendung der Konstrukte für den zell- und gewebe-spezifischen Nachweis von JA-Ile möglich ist. Wichtig hierbei wäre zu klären, ob die Überexpression des Degrons einen JA-insensitiven Phänotyp zur Folge hat.

Das JAZ1-Degron-Peptid und die COI1_{E22V}-Mutante bieten vielversprechende Ansätze, um in Zellen mit hohem Jasmonatgehalt einen stabilen BiFC-Komplex zu erhalten und so die Visualisierung von JA-Ile zu ermöglichen. Die aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit nicht mehr vorgenommene Klonierung der verschiedenen BiFC-Konstrukte von COI1_{E22V} und JAZ1-Degron und die Durchführung der BiFC-Analysen stehen im Fokus der weiterführenden Arbeiten. In Tab. 4.4 sind alle im weiteren Verlauf zu klonierenden BiFC-Konstrukte und die daraus resultierenden Kombinationen der komplementären Interaktionspartner zusammengefasst. Die Interaktion von COI1 und JAZ1 wird hochspezifisch nur durch (+)-7-*iso*-JA-Ile induziert (Fonseca *et al.*, 2009), da mit Ausnahme des Phytotoxins Coronatin kein anderes Molekül in die Bindetasche passt (Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). Somit würden bei Anwendung dieser Methode andere in pflanzlichen Geweben auftretende JA-Derivate, wie z. B. OPDA und 12-OH-JA, deren Gehalt ebenfalls stressinduziert ansteigt und die eigene Signaleigenschaften besitzen (Hause *et al.*, 2000; Stenzel *et al.*, 2003b; Miersch *et al.*, 2008) (siehe auch Punkt 1.1), nicht zu unspezifischen Signalen führen. Zwar wurde mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten polyklonalen Anti-JA-AK aus Kaninchen bereits ein wertvolles Werkzeug für den spezifischen Nachweis von JA/JA-Ile in pflanzlichen Geweben zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel I), jedoch ermöglicht dieser keinen non-invasiven Nachweis des Phytohormons.

Tab. 4.4: Kombinationen der Interaktionspartner für die BiFC-Versuche mit dem modifizierten COI1-Protein COI1_{E22V} bzw. den modifizierten JAZ-Proteinen JAZ1_{K85/105/110/119R} und JAZ-Degron.

Grau unterlegt sind die Kombinationen, bei denen die Interaktion der Fusionsproteine nicht zum fluoreszierenden YFP führen würde. Als Kontrollen für mögliche Fehlfaltung des isolierten JAZ1-Degrone werden in diese Versuche auch die BiFC-Konstrukte des mutierten JAZ-Proteins JAZ1_{K85/110/115/119R} einbezogen.

Kombination der Interaktionspartner für die BiFC mit COI1 _{E22V}		
	COI1 _{E22V} :YFP ^C	COI1 _{E22V} :YFP ^N
JAZ1:YFP ^C		
YFP ^C :JAZ1		
JAZ1YFP ^N		
YFP ^N :JAZ1		
Kombination der Interaktionspartner für die BiFC mit JAZ1 _{K85/105/110/119R} und JAZ1-Degron		
	COI1:YFP ^C	COI1:YFP ^N
JAZ1 _{K85/105/110/119R} :YFP ^C		
YFP ^C : JAZ1 _{K85/105/110/119R}		
JAZ1 _{K85/105/110/119R} :YFP ^N		
YFP ^N : JAZ1 _{K85/105/110/119R}		
JAZ1-Degron:YFP ^C		
YFP ^C : JAZ1-Degron		
JAZ1-Degron :YFP ^N		
YFP ^N : JAZ1-Degron		

5. KAPITEL III

Herstellung eines synthetischen Promotors zur zell- und gewebespezifischen Visualisierung von JA/JA-Ile

5.1 Einleitung

5.1.1 Die Rolle von *cis*-Elementen für die Regulation der Genexpression

Die exakte Steuerung biologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Zellteilung, Apoptose und Alterung ist essentiell für die Entwicklung eines morphologisch korrekten und funktionsfähigen Organismus. Dabei spielt die Regulation der Genexpression eine zentrale Rolle. Zu allen Zeitpunkten müssen in den verschiedenen Zelltypen bzw. Geweben genau die Gene exprimiert vorliegen, deren Genprodukte gerade benötigt werden. Eine der ersten Steuerungsebenen der Genexpression ist die Transkriptionsregulation. Eukaryotische Gene bestehen aus zwei großen Hauptabschnitten: dem offenen Leserahmen (ORF) und dem Promotor (siehe Abb. 5.1). In dem als ORF bezeichneten DNA-Abschnitt liegt die Proteinkodierende Information vor. Von dieser DNA-Region wird während der Transkription eine RNA-Kopie generiert, wobei die RNA-Synthese bei Genen, deren Genprodukte Proteine darstellen, von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (Pol II) katalysiert wird (Adie *et al.*, 2007). Der ORF beginnt in Eukaryoten mit dem für Methionin kodierenden Startcodon ATG. Sein Ende wird durch eines der Stopcodons TGA, TAG oder TAA markiert, die als *nonsense*-Tripletts für keine AS kodieren und somit zum Translationsabbruch führen. Die ORFs eukaryotischer Gene werden oft von nicht kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen, die im Verlauf der RNA-Reifung während des Spleißens herausgeschnitten werden. Die Enden des ORF werden jeweils von den sogenannten untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert. Diese werden ebenfalls transkribiert, enthalten jedoch keine Proteininformation. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Translation und zur Stabilisierung der mRNA (Misquitta *et al.*, 2001; Pickering & Willis, 2004; Araujo *et al.*, 2012). Die 3'-UTR enthält zudem eine Polyadenylierungs-Signalsequenz [Poly(A)], die in Eukaryoten auf der RNA-Kopie die Bindestelle für den CPF (*Cleavage Adenylation Factor*) und damit das Ende des Transkripts markiert (Kuehner *et al.*, 2011; Proudfoot, 2011). In einem Abstand von ca. 10 bis 30 Basen hinter dem Polyadenylierungssignal wird das Transkript geschnitten und ein bis zu 250 Basen langer Poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende der RNA gehangen (Kuehner *et al.*, 2011; Proudfoot, 2011).

Zusätzlich zu den transkribierten DNA-Abschnitten besteht ein Eukaryotengen aus dem als Promotor bezeichneten DNA-Abschnitt (siehe Abb. 5.1). Der Promotor ist am 5'-Ende des Gens lokalisiert und enthält für die Initiation und Regulation der Transkription essentielle DNA-Sequenzen. Diese als *cis*-regulatorische Elemente bezeichneten DNA-Sequenzen dienen als Andockstelle für korrespondierende *trans*-aktive Elemente [Transkriptions-

faktoren (TFs)] und können, je nach Lokalisation und Funktion, in zwei Klassen unterschieden werden: die *cis*-Elemente des Kernpromotors und die regulatorischen *cis*-Elemente (Griffith *et al.*, 2000).

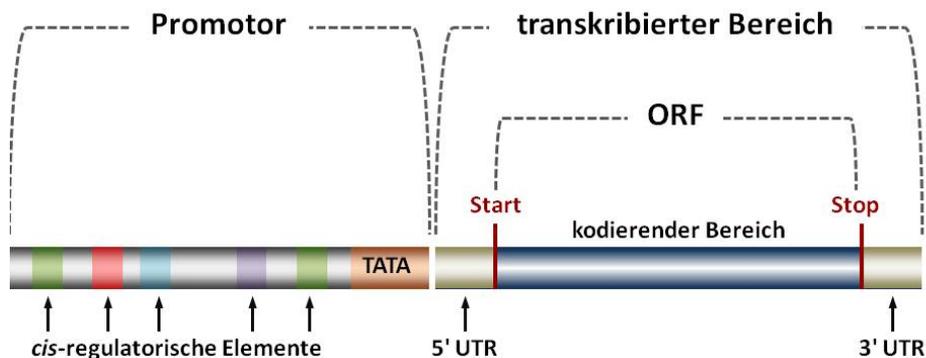


Abb. 5.1: Der Aufbau von Genen.

Ein Gen besteht aus dem transkribierten Bereich, von dem, katalysiert durch die Pol II, eine RNA-Kopie erstellt wird, und dem als Promotor bezeichneten regulatorischen DNA-Abschnitt. Die eigentliche Erbinformation liegt verschlüsselt in den Codons des ORF (blau) vor. Dieser wird von den UTRs (oliv) flankiert, die mit transkribiert werden. Diese sind wichtig für die Translation bzw. Stabilität der mRNA, enthalten jedoch keine Erbinformation. Der Promotor liegt im 5' Bereich des Gens und enthält verschiedene, für die Transkription essentielle *cis*-regulatorische Elemente, die als Andockstelle für die *trans*-aktiven Elemente dienen. Im Kernpromotorbereich (orange) sind für die Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC) notwendige *cis*-Elemente wie die TATA-Box lokalisiert. Im oberhalb des Kernpromotors lokalisierten Promotorabschnitt befinden sich *cis*-Elemente, die für die Regulation der Genexpression bedeutend sind. Diese wirken im Zusammenspiel mit den entsprechenden TFs als Verstärker (*Enhancer*) bzw. Repressoren (*Silencer*) der Transkription.

Zu den ersten in eukaryotischen Organismen identifizierten *cis*-Elementen gehört die Goldberg-Hogness-Box, die auf Grund der Konsensus-Sequenz TATAA meist als TATA-Box bezeichnet wird (Lifton *et al.*, 1978). Sie ist in den meisten eukaryotischen Promotoren konserviert, etwa 23 bis 30 Basen vor dem Transkriptionsstart lokalisiert und essentiell für die Ausbildung eines stabilen Transkriptions-Präinitiationskomplexes (PIC) (Smale & Kadonga, 2003). Der Promotor-bereich, in dem die TATA-Box liegt, wird daher als Kernpromotor bezeichnet. Er enthält oft zusätzlich zur TATA-Box weitere in die Ausbildung des PIC involvierte *cis*-Elemente, wie z. B. ein *TFIIB Recognition Element* (BRE) und/oder ein *Downstream Promoter Element* (DPE) (Butler & Kadonaga, 2002). Der PIC ist ein Multiproteinkomplex, dessen Ausbildung mit der Anlagerung des TATA-bindenden Proteins (TBP), einer Untereinheit des TFIID, an das entsprechende basale *cis*-Element beginnt (Smale & Kadonga, 2003). An TFIID binden anschließend fünf weitere zu den GTFs (*General Transcription Factors*) gehörende basale TFs (TAFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE und TFIIH) sowie der Pol II-Komplex (Smale & Kadonga, 2003). Die Zusammenlagerung der Komponenten des PIC erfolgt dabei in vorgegebener Reihenfolge und dient dazu, die Pol II am Transkriptionsstart zu positionieren. Der PIC allein ist jedoch nicht ausreichend für eine effektive Transkription (Smale & Kadonga, 2003). Für die Transkriptionsrate entscheidend sind *cis*-Elemente, die

außerhalb des Kernpromotors lokalisiert sind. Diese regulatorischen *cis*-Elemente treten meist verteilt in dem Promotorabschnitt bis zu mehreren hundert Basen oberhalb des Transkriptionsstarts auf. Sie können aber auch in einem Abstand von bis zu einigen tausend Basen entfernt davon vorkommen und dabei sowohl vor als auch hinter dem Gen, das sie kontrollieren, lokalisiert sein bzw. sich sogar in den Intronsequenzen des ORF befinden (Griffiths *et al.*, 2000). Da jedes Gen eine individuelle Zusammensetzung an regulatorischen *cis*-Elementen besitzt, werden diese auch als genspezifische *cis*-Elemente bezeichnet. Die Aktivität eines Promotors ergibt sich unter anderem daraus, welche Art von *cis*-Elementen dieser enthält und in welcher Anzahl und Anordnung die einzelnen Elemente auftreten. Je nachdem, ob ein regulatorisches *cis*-Element eine Verstärkung oder Verminderung der Transkriptionsrate induziert, spricht man von *Enhancern* oder *Silencern* (Maston *et al.*, 2006). Das Vorliegen genspezifischer *cis*-Elemente allein ist hierbei jedoch nur eine Voraussetzung für die Beeinflussung der Promotoraktivität. Ebenso wie die *cis*-Elemente des Kernpromotors wirken die regulatorischen Elemente zusammen mit TFs, für die sie als Andockstelle dienen. Dabei können die TFs eingeteilt werden in die Klasse der Aktivatoren, die an *Enhancer*-Elemente binden und in Repressoren, die *Silencer*-Elemente erkennen (Maston *et al.*, 2006). Für die Transkriptionsrate eines Gens ist somit nicht nur das individuelle *cis*-Elementmuster seines Promotors entscheidend, sondern sie resultiert auch daraus, ob die spezifisch an die Promotorelemente bindenden TFs zum entsprechenden Zeitpunkt im jeweiligen Zell- bzw. Gewebetyp vorliegen (Maston *et al.*, 2006). Konstitutiv aktive TFs sind zu allen Zeitpunkten in (fast) allen Zelltypen vorhanden (Ranish & Hahn, 1996) und in die Expression von Haushaltsgenen involviert, deren Genprodukte für den zellulären Grundstoffwechsel bedeutend sind. Demgegenüber treten die induzierten TFs nur in bestimmten Zelltypen auf und/oder werden nur unter bestimmten Bedingungen von der Zelle exprimiert (Ranish & Hahn, 1996). Sie sind somit wichtige Schlüsselkomponenten bei der Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen, aber auch für die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen. In Pflanzen unterliegen induzierte TFs meist der Kontrolle von Phytohormonen. Einer der auf Grund seiner Schlüsselrolle in der pflanzlichen Jasmonatantwort prominentesten Vertreter JA-regulierter TFs ist MYC2 (Dombrecht *et al.*, 2007; Kazan & Manners, 2013; Wasternack & Hause, 2013), der in den Promotoren JA-regulierter Gene an *cis*-regulatorischen G-Box-Elemente bindet (Boter *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007) (siehe auch Punkt 1.2).

5.1.2. Synthetische Promotoren als Werkzeuge der Zellbiologie

Spezifisch durch JA-regulierte Promotoren, die mit einem Reportergen fusioniert werden, bieten eine Möglichkeit das zell- und gewebespezifische Auftreten des Phytohormons *in vivo* zu untersuchen. Native Promotoren enthalten allerdings eine Vielzahl an *cis*-regulatorischen Elementen, die zusammen mit den daran bindenden *trans*-aktiven Elementen steuern, wann und wo ein Gen exprimiert wird (siehe Punkt 5.1). Daraus ergeben sich für den Einsatz von nativen Promotoren als Werkzeuge für die spezifische

Visualisierung von JA verschiedene Nachteile. Zum einen können native Promotoren *cis*-regulatorische Elemente enthalten, die zu einer Beeinflussung der Promotoraktivität durch zusätzliche Faktoren (z. B. andere Phytohormone) führen und somit keinen spezifischen Nachweis von JA ermöglichen. Zum anderen können in den Promotorsequenzen *cis*-regulatorische Elemente vorliegen, die die Expression des Reporters nur in bestimmten Zelltypen und/oder Spezies zulassen. Diese Nachteile können durch die Verwendung synthetischer Promotoren umgangen werden. Diese bestehen im Gegensatz zu nativen Promotoren aus ausgewählten *cis*-regulatorischen Elementen, die in multimerer Form mit dem Reporter gen fusioniert werden (Rushton *et al.*, 2002) (siehe Abb. 5.2). Weitere Elemente eines funktionellen synthetischen Promotors sind zudem der Kernpromotor und die Poly(A)-Signalsequenz. Als Kernpromotor wird in dikotylen Pflanzen meist der Minimalpromotor (MP)-Bereich von -46 bis +8 des 35S-Gens des *Cauliflower Mosaic Virus* (35S MP) verwendet. Er enthält basale *cis*-Elemente wie die TATA-Box und ist für die Ausbildung des PIC nötig. Die für die Transkriptionstermination essentielle Poly(A)-Signalsequenz stammt meist aus dem *Nopalinsynthase*-Gen von *A. tumefaciens*.

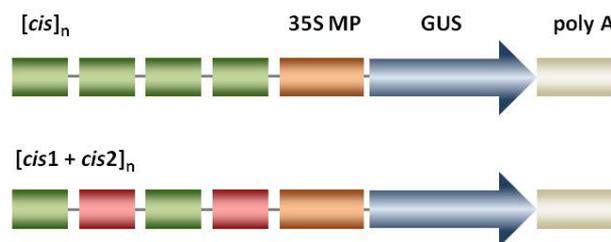


Abb. 5.2: Aufbau synthetischer Promotoren.

Multimere und/oder Kombination spezifischer *cis*-Elemente (grün und rot) werden mit dem 35S MP (orange), der für die Ausbildung des PIC essentielle basale *cis*-Elemente enthält (z. B. TATA-Box) und einem Reporter gen (z. B. das *GUS*-Gen; blau) fusioniert. Die funktionelle Promotorkassette enthält zudem eine Poly(A)-Signalsequenz (weiß), die für die Transkriptionstermination notwendig ist.

Ein bereits etablierter phytohormonspezifischer synthetischer Promotor ist der DR5-Promotor. Dieser Promotor wurde 1997 für den spezifischen *in vivo*-Nachweis von Auxin generiert (Ulmasov *et al.*, 1997) und bestand ursprünglich aus einem Undecamer des im *GH3*-Promotor von *Glycine max* identifizierten auxinregulierten Elementes (AuxRE) D1-4, das mit dem *GUS*-Reporter gen fusioniert wurde (Ulmasov *et al.*, 1995; Ulmasov *et al.*, 1997). Basierend darauf wurden weitere geringfügig modifizierte Varianten des DR5-Promotors abgeleitet, wie z. B. das von Friml *et al.* (2003) erzeugte DR5:*GFP*-Konstrukt, das ein in inverser Orientierung mit dem *GFP*-Reportergen gekoppeltes Nonamer des AuxRE enthält. Die DR5-Promotoren sind hoch responsiv gegenüber Auxin (Ulmasov *et al.*, 1997; Friml *et al.*, 2003) und wurden bereits intensiv für die Analyse des spezifischen Vorkommens dieses Phytohormons in *A. thaliana* angewendet (Friml *et al.*, 2003; Ottenschläger *et al.*, 2003; Lampugnani *et al.*, 2013). DR5 ermöglicht jedoch auch eine spezieübergreifende Anwendung und wurde unter anderem in *S. lycopersicum* (Nishio *et al.*, 2010) und *Z. mays*

(Gallavotti *et al.*, 2008) eingesetzt. Ein vergleichbarer synthetischer Promotor, der sich für eine nicht-invasive *in vivo*-Untersuchung des spezifischen Vorkommens von JA eignet, ist bisher nicht verfügbar. Zwar wurde das Jasmonat- und Elicitor-responsive Element (JERE) aus dem Promotor des TFs ORCA2 aus *Catharanthus roseus* (Menke *et al.*, 1999) bereits für die Herstellung eines synthetischen JA-responsiven Promotors verwendet (Rushton *et al.*, 2002), jedoch erwies sich dieser in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen nicht nur als responsiv gegenüber JA, sondern auch gegenüber SA (persönliche Mitteilung Z. Hossain). Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, einen JA/JA-Ile-spezifischen synthetischen Promotor zu generieren, der zur Visualisierung dieses Phytohormons verwendet werden kann. Dazu sollten zunächst JA-responsive *cis*-Elemente (JAREs) in den Promotoren JA-regulierter Gene identifiziert werden. Multimere und/oder Kombinationen der selektierten *cis*-Elemente sollten anschließend mit einem geeigneten Reportergen (*GUS* oder *GFP*) fusioniert werden, um so putativ JA-responsive synthetische Promotoren zu generieren. Das Funktionsprinzip der zu entwickelnden Methode ist in Abb. 5.3 erläutert. Kommt es in Pflanzen, die mit den generierten Promotorkonstrukten stabil transformiert wurden, auf Grund eines abiotischen und/oder biotischen Stresses zu einem Anstieg im endogenen JA/JA-Ile-Gehalt, so kann dieser über die Expression des Reportergens visualisiert werden. Je nach verwendetem Reporter, kann entweder nach histochemischer *GUS*-Färbung oder mittels GFP-Fluoreszenz mikroskopisch analysiert werden, in welchen Organen, Geweben oder Zelltypen eine Akkumulation von JA/JA-Ile erfolgt. Um zu testen, ob sich die erzeugten synthetischen Promotoren für einen zell- und gewebespezifischen Nachweis von JA/JA-Ile eignen, sollten diese zunächst im transienten Testsystem hinsichtlich ihrer Responsivität und Spezifität gegenüber JA charakterisiert werden. Anschließend sollte in mit den Promotorkonstrukten stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen untersucht werden, ob diese *in planta* funktionell sind und entsprechend eine JA/JA-Ile-induzierte Expression des Reporters und Visualisierung des Phytohormons ermöglichen.

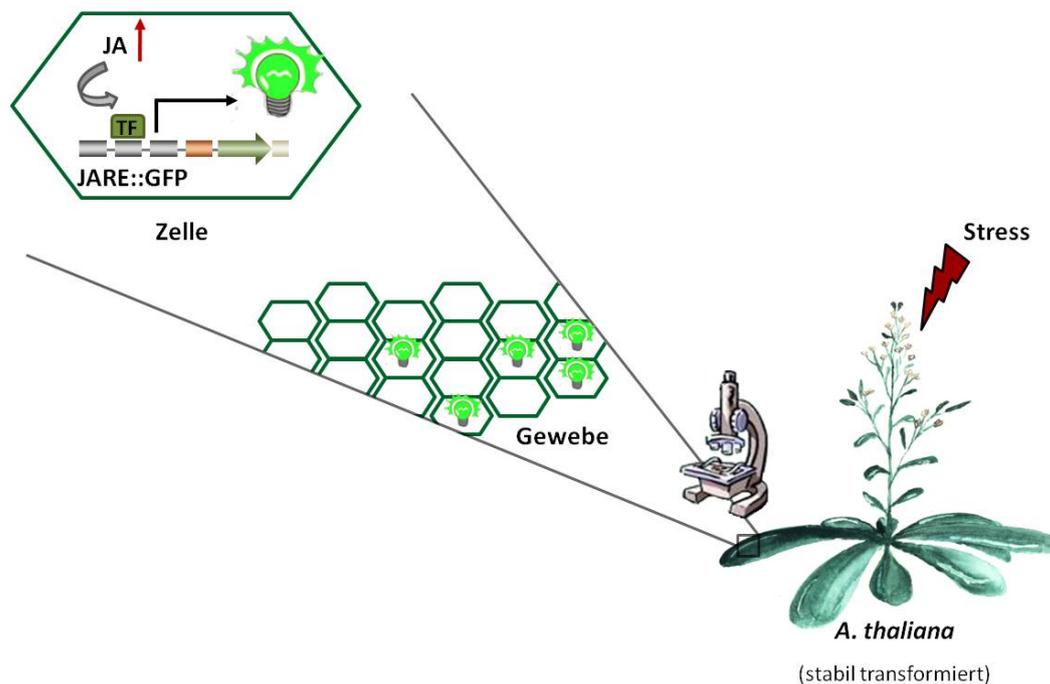


Abb. 5.3: Funktionsprinzip eines synthetischen Promotors zum nicht-invasiven *in vivo*-Nachweis von JA/JA-Ile.

Kommt es in *A. thaliana*-Pflanzen, die stabil mit den Promotorkonstrukten (z. B. *JARE::GFP*) transformiert wurden, zum Anstieg im endogenen JA/JA-Ile-Gehalts infolge eines abiotischen und/oder biotischen Stresses, so kann das Auftreten des Phytohormons durch die JA-induzierte Expression des Reportergens nachgewiesen werden.

5.1.3 Vorarbeiten zur Selektion JA-responsiver Elemente

Den Ansatzpunkt für die Suche nach geeigneten JA-responsiven Elementen (JAREs) lieferten am IPB Halle durchgeführte Arbeiten von S. Gürtler und Z. Hossain zur Transkriptakkumulation bzw. Promotoraktivität der AOCs aus *A. thaliana*. In *A. thaliana* liegen vier AOC-Gene (*AOC1* bis *AOC4*) vor (Stenzel *et al.*, 2003b). Wie alle Gene, die für Enzyme der JA-Biosynthese kodieren, sind auch die AOCs aus *A. thaliana* selbst durch JA induzierbar (Wasternack, 2007). Nach Applikation von JAME zu einer *A. thaliana*-Zellkultur zeigte die *AOC2* die stärkste Transkriptakkumulation innerhalb der AOC-Gene (Gürtler, 2006, 2007). Zudem wurde die Promotorresponsivität der vier AOCs in transient mit *Promotor::GUS*-Konstrukten transfizierten Protoplasten getestet, wobei auch für den *AOC3*-Promotor (*AOC3P*) eine hohe JA-Responsivität nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung Z. Hossain). Die *in vitro*-Analysen von Z. Hossain identifizierten außerdem sowohl im Promotor der *AOC2* (*AOC2P*) als auch in dem der *AOC3P* Abschnitte, die putativ JA-responsive Elemente enthalten. Für diese Analysen wurden die *AOC2*- und *AOC3*-Vollängenpromotoren sowie mehrere von beiden Promotoren abgeleitete 5'-Deletionsfragmente (siehe Punkt 8.5 im Anhang) mit dem *GUS*-Reportergen fusioniert und im transienten Protoplastensystem (isoliert aus einer Zellkultur von *A. thaliana*)

getestet. Die nachfolgende GUS-Analyse zeigte, dass beide Promotoren am 3'-Ende Abschnitte besitzen, deren Deletion zu einer signifikanten Abnahme der relativen GUS-Aktivität führten (Abb. 5.4). Dies deutete auf das Vorliegen eines oder mehrerer JA-responsiven/r Elemente(s) in diesen Promotorabschnitten hin.

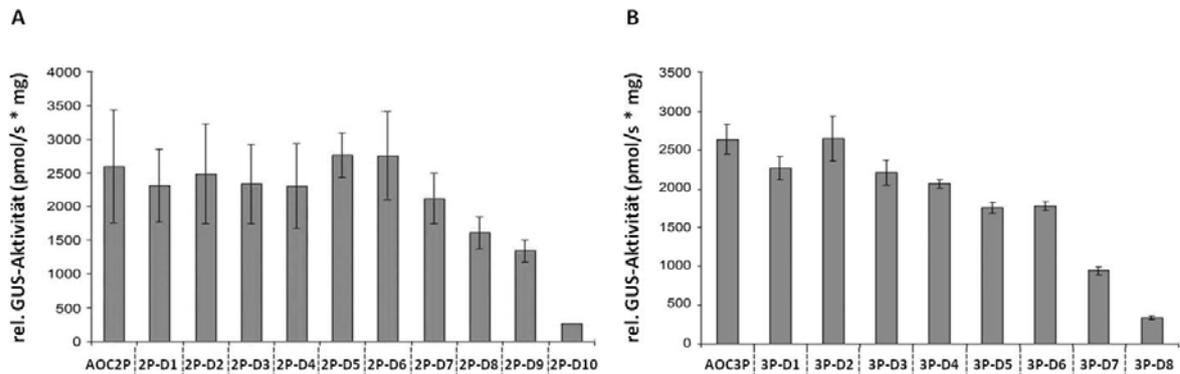


Abb. 5.4: Darstellung der über AOC2P:*GUS*- und AOC3P:*GUS*-Fusionen und verschiedenen Promotordeletionskonstrukten erzielten relativen GUS-Aktivitäten.

Gezeigt sind die basalen relativen (rel.) GUS-Aktivitäten, die nach Transfektion von *A. thaliana*-Zellkulturprotoplasten mit Fusionskonstrukten aus dem AOC2P (A), dem AOC3P (B) bzw. deren 5'-Deletionsfragmenten (2P-D1 bis 2P-D10 bzw. 3P-D1 bis 3P-D8) mit dem *GUS*-Reporter gen gemessen wurden. Die Aktivierung der Promotorkonstrukte erfolgte vermutlich durch eine Jasmonatakkumulation auf Grund des bei der Transfektion auftretenden osmotischen Stresses und konnte durch zusätzliche JA-Applikation nicht gesteigert werden (persönliche Mitteilung von Z. Hossain). Die Daten wurden von Z. Hossain aufgenommen und ausgewertet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Z. Hossain zur Verfügung gestellt. Für weitere Informationen siehe Punkt 8.5 im Anhang.

5.2. Ergebnisse

5.2.1 Selektion putativ JA-responsiver *cis*-Elemente aus Promotoren JA-regulierter Gene

Zur Erzeugung von spezifischen JA-responsiven synthetischen Promotoren waren zunächst JAREs aus JA-regulierten Zielpromotoren zu selektieren. Anhand der Versuche von S. Gürtler und Z. Hossain (siehe Punkt 5.1.3) wurden zunächst die *A. thaliana* *AOC2*- und *AOC3*-Promotoren für eine Analyse ausgewählt. Die Identifizierung von *cis*-Elementen in diesen Promotoren erfolgte mit Hilfe der PLACE- (Higo *et al.*, 1999) und PlantCare-Datenbank (Lescot *et al.*, 2002). In die Sequenzanalyse wurden die etwa 1870 Basen (*AOC2P*) bzw. etwa 1410 Basen (*AOC3P*) langen DNA-Abschnitte oberhalb des Startcodons (ATG) einbezogen (siehe Anhang 8.5). Die Sequenzen wurden der TAIR-Datenbank entnommen (siehe Abb. 8.4 bzw. 8.5) und für die Analyse in die PLACE- bzw. PlantCARE-Datenbank eingespeist.

Tab. 5.1: Identifizierte JAREs in den Promotoren der *AOC2* und *AOC3* von *A. thaliana*.

Die Tabelle listet die in den beiden *AOC*-Promotoren mit der PLACE- und PlantCARE-Datenbank identifizierten JAREs auf. Zudem ist die jeweilige Lokalisation der *cis*-Elemente angegeben (Position der ersten Base der Kernsequenz) und in den Promotoren (grauer Balken) graphisch dargestellt. Die Kernsequenz (unterstrichen) des entsprechenden JAREs inklusive ihrer flankierenden Sequenzen ist der letzten Spalte zu entnehmen.

Promotor	<i>cis</i> -Element	Position im Promotor (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')
<i>AOC2P</i>	T/G-Box	T/G-Box 1602 Basen ↓ 5'  3'	TTAGAT <u>CAC GTT</u> CCGACC
	G-Box	G-Box 1682 Basen ↑	TTTACG <u>CAC GTG</u> CTACTT
<i>AOC3P</i>	G-Box	G-Box 1290 Basen ↓ 5'  3'	TATACG <u>CAC GTG</u> TTACTT

Die Ergebnisse der *in silico*-Analysen sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Sowohl der *AOC2P* als auch der *AOC3P* enthalten am 3'-Ende (etwa 100 bis 300 Basen vor dem Startcodon) ein bzw. zwei JA-responsive Elemente. Bereits die *AOC2P*- und *AOC3P*-Deletionsstudien von Z. Hossain (siehe Punkt 5.1.3 Abb. 5.4) deuteten darauf hin, dass in diesen Bereichen der Promotorsequenzen JAREs lokalisiert sein könnten. Während beide Promotoren jeweils ein G-Box-Element (5'-CACGTG-3') enthalten, deren flankierende Sequenzen sich voneinander unterscheiden, wurde im *AOC2P* mit der T/G-Box (5'-CACGTT-3') ein zusätzliches JA-responsives Element identifiziert.

Um zu verifizieren, dass G-Boxen und T/G-Boxen auch in anderen JA-responsiven Promotoren von *A. thaliana* vorkommen, wurden die Sequenzanalysen mit der PLACE- und PlantCARE-Datenbank auf die Promotoren von 19 weiteren JA-induzierten Genen ausgedehnt. Dazu gehörten neben den Promotoren weiterer JA-Biosynthesegene (z. B. AOS und LOX) auch die Promotoren der 12 JAZ-Gene (siehe Punkt 8.6 im Anhang). Die entsprechenden Sequenzen wurden ebenfalls der TAIR-Datenbank entnommen (TAIR-Codes siehe Tab. 8.4), wobei für die Promotorstudien jeweils 2.000 Basen oberhalb des Startcodons des entsprechenden Gens genutzt wurden. Zusätzlich zu den Promotorstudien wurden mit Hilfe der Genevestigator-Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004; Hruz *et al.*, 2008) Analysen zu den Expressionsmustern der Gene durchgeführt. In dieser Datenbank sind unter anderem Informationen zur Genexpression nach Behandlung von pflanzlichem Probenmaterial (u. a. Keimlinge, Wurzeln, Sprosse, Zellkultur) mit verschiedenen Phytohormonen bzw. verschiedenen abiotischen Stressoren verfügbar. Durch Analyse dieser sollte ein Eindruck davon gewonnen werden, ob Gene, deren Promotoren G-Boxen und/oder T/G-Boxen enthalten, spezifisch durch JAME-Behandlung bzw. abiotische Stimuli, die zu einem sogenannten endogenen „JA-Burst“ führen (osmotischer Stress, Salzstress und mechanische Verwundung) (Wasternack, 2007), aktiviert werden, oder ob auch unspezifische Kreuzaktivierungen dieser Gene durch andere Phytohormone (OPDA, ABA, IAA, ACC, Ethylen, Zeatin) auftreten. Eine Übersicht über die Ergebnisse der *in silico*-Analysen zum Vorkommen der *cis*-Elemente und zu den Genexpressionsanalysen findet sich in Tab. 8.6 unter Punkt 8.6 im Anhang. Die daraus gewonnen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (i) Mit Ausnahme der Promotoren der AOC4 und LOX5 enthalten alle betrachteten Promotorbereiche der in die Analyse einbezogenen Gene von *A. thaliana* eine oder mehrere G-Boxen und/oder T/G-Boxen. Dabei war hinsichtlich der Anzahl, Kombination, Reihenfolge und des Abstandes der Elemente zueinander kein sich wiederholendes Muster erkennbar (nur in Teilen in Tabelle 8.5 aufgezeigt).
- (ii) Die Expression der Gene, deren Promotoren G-Boxen enthalten, wird durch Behandlung mit OPDA und JAME bzw. durch das Einwirken der betrachteten abiotischen Stressoren meist stark induziert.
- (iii) Bei Genen, deren Promotoren zusätzlich zu der/den G-Box(en) auch ein oder mehrere T/G-Boxen enthalten, ist eine verstärkte Responsivität gegenüber anderen Phytohormonen (z. B. ABA, ACC und IAA) zu vermerken, wobei einige Phytohormone auf die Genexpression induzierend und andere eher reprimierend wirken.
- (iv) Nach JAME-Behandlung und dem Einwirken von abiotischen Stressoren zeigen Gene, deren Promotoren keine G-Box, sondern nur eine oder mehrere T/G-Box-Elemente enthalten, meist keine Induktion ihrer Expression, z. T. kommt es sogar zu einer Repression.

Demnach handelt es sich am ehesten bei den G-Box-Elementen um JA-responsive *cis*-Elemente, die für die Herstellung eines putativ JA-spezifischen synthetischen Promotors als gut geeignet erschienen. Dabei sollten neben den beiden in den Promotoren der AOC2

und *AOC3* identifizierten G-Boxen auch einige der G-Boxen aus *JAZ*-Promotoren (*JAZP*) in die weiteren Versuche einbezogen werden, da die *JAZ*-Gene mit G-Boxen meist eine starke Induzierbarkeit durch JAME, OPDA, Verwundung und Salzstress zeigen. Zur Auswahl geeigneter Kandidaten aus den insgesamt 19 in den *JAZ*-Promotoren gefundenen G-Box-Elementen (siehe Punkt 8.6 Tab. 8.5 im Anhang) wurden zunächst die flankierenden Sequenzen dieser *cis*-Elemente miteinander verglichen, um gegebenenfalls häufig darin auftretende Sequenzmuster identifizieren zu können. Wie von Williams *et al.* (1992) beschrieben, können diese einen Einfluss darauf haben, welche TFs ein *cis*-Element erkennen und wie fest diese binden. Diese vergleichende Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des Bioinformatik-Tools WebLogo (Crooks *et al.*, 2004). In die Analyse wurden dabei jeweils die zehn Basen ober- und unterhalb der G-Box-Kernsequenz eingeschlossen. Das Ergebnis ist in Abb. 5.5 dargestellt. In den flankierenden Sequenzen der untersuchten *JAZ*-G-Boxen konnten keine Basen gefunden werden, die in allen flankierenden Bereichen konserviert auftreten. Jedoch besitzen die flankierenden Sequenzen einen AT-reichen Charakter (siehe Tab. 8.5 im Anhang), wobei an Position 4 und 18 am ehesten Thymin und an Position 3, 17 und 20 Adenin häufig vorkommen.

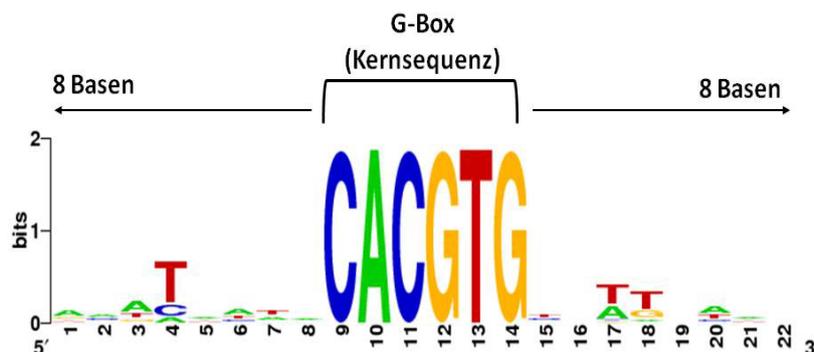


Abb. 5.5: Flankierende Sequenzen der 19 identifizierten G-Boxen aus den *JAZ*-Promotoren.

Die Graphik zeigt das Ergebnis des mit WebLogo erstellten Vergleichs der flankierenden Sequenzen der 19 in den Promotoren der *JAZ*-Gene identifiziert G-Boxen. In die Analysen wurden jeweils die 8 Basen ober- und unterhalb der jeweiligen G-Box einbezogen, so dass die analysierten Sequenzbereiche insgesamt jeweils 22 Basen umfassten. Die Größe der für die Basen stehenden Buchstaben ist repräsentativ für deren Häufigkeit an der jeweiligen Position.

In Tab. 5.2 sind die G-Box-Sequenzen aufgelistet, die auf Grundlage der durchgeführten *in silico*-Analysen neben denen aus dem *AOC2P* und *AOC3P* für die Herstellung von putativ JA-spezifischen synthetischen Promotoren ausgewählt wurden. Dabei handelt es sich unter anderem um eine der beiden G-Boxen aus dem *JAZ2P*, da die Expression von *JAZ2* scheinbar spezifisch durch JAME-Behandlung bzw. abiotische Stressoren aktiviert wird (siehe Punkt 8.6 Tab. 8.6 im Anhang). Außerdem besitzt die ausgewählte G-Box in den flankierenden Sequenzen einen AT-reichen Charakter und wurde zudem bereits als das die JA-Antwort vermittelnde *cis*-Element dieses Promotors identifiziert (J. Bowse, persönliche Mitteilung). Weiterhin wurde eine der G-Boxen des *JAZ7P* und eine der G-Boxen des *JAZ8P*

ausgewählt. Die Expressionsmuster beider Gene deuten darauf hin, dass spezifisch nach Behandlung mit JAME bzw. abiotischen Faktoren eine Induktion auftritt (siehe Tab. 8.6 im Anhang). Die flankierenden Sequenzen dieser G-Boxen sind ebenfalls AT-reich, besitzen in den flankierenden Bereichen einige der oben genannten Basen, unterscheiden sich jedoch ansonsten deutlich voneinander. Daher wurden beide *cis*-Elemente ebenfalls mit in die weiteren Versuche einbezogen, um einen möglichen Einfluss der flankierenden Basen auf die Spezifität und/oder Responsivität eines daraus generierten synthetischen Promotors zu testen.

In den Promotorsequenzen der untersuchten JA-responsiven Gene traten häufig sowohl G-Boxen als auch T/G-Boxen auf. Da somit nicht auszuschließen war, dass für die Aktivierung dieser Gene in Antwort auf eine JA-Akkumulation nicht ein *cis*-Element allein, sondern ein Zusammenspiel von G-Box und T/G-Box von Bedeutung sein könnte, wurde für die Erzeugung eines JA-responsiven synthetischen Promotors auch die Kombination der beiden im *AOC2P* identifizierten *cis*-Elemente (siehe Tab. 5.2) mit berücksichtigt. Zur Kontrolle sollte dabei außerdem ein synthetischer Promotor aus der T/G-Box des *AOC2P* allein, ohne weiteres G-Box-Element generiert werden.

Tab. 5.2: Für die Herstellung putativ JA-responsiver synthetischer Promotoren ausgewählte G-Boxen aus den Promotorsequenzen der JAZ-Gene von *A. thaliana*.

Auf Grund der im weiteren Verlauf der Arbeit ausgewählten Klonierungstechnik wurden neben der Kernsequenz jeweils nur sechs Basen aus den flankierenden Bereichen der G-Boxen bei der Herstellung der synthetischen Promotoren einbezogen (siehe Punkt 5.2.2).

Gen	G-Box-Kernsequenz mit je 6 Basen der flankierenden Sequenzen (5' → 3')	Anmerkung
JAZ2	ATAAAA <u>CAC GTG</u> TTTTAT	<ul style="list-style-type: none"> • Genexpression spezifisch durch JAME bzw. abiotischen Stress induziert • flankierende Sequenz enthält fast alle der dort häufig auftretenden Basen • bereits als das JA-responsive <i>cis</i>-Element des <i>JAZ2P</i> identifiziert
JAZ7	ATTTCC <u>CAC GTG</u> GATTTA	<ul style="list-style-type: none"> • Genexpression spezifisch durch JAME bzw. abiotischen Stress induziert
JAZ8	ATTTTC <u>CAC GTG</u> AGAGAA	<ul style="list-style-type: none"> • Genexpression spezifisch durch JAME bzw. abiotischen Stress induziert

5.2.2 Erzeugung putativ JA-responsiver Promotoren unter Verwendung der selektierten *cis*-Elemente

5.2.2.1 Erzeugung synthetischer Promotoren und Analyse ihrer Induzierbarkeit in

A. thaliana-Zellkulturprotoplasten

Für die Erzeugung putativ JA-spezifischer Promotoren wurden sechs *cis*-Elemente aus den Promotorsequenzen verschiedener JA-regulierter Gene selektiert (siehe Punkt 5.2.1). Dazu gehörten die G-Boxen des *AOC2*-, *AOC3*-, *JAZ2*-, *JAZ7*- und *JAZ8*-Promotors, sowie die T/G-Box des *AOC2*-Promotors. Alle zu testenden putativen JAREs, ihre Multimere und/oder Kombinationen wurden hinter den 35S MP geschaltet. Die so erzeugten synthetischen Promotoren wurden mit dem *GUS*-Gen fusioniert und die Fusionskonstrukte in *A. thaliana*-Zellkulturprotoplasten eingebracht. Die erhaltenen GUS-Aktivitäten (siehe Punkt 2.9.2) in den Protoplasten spiegeln die Aktivität der zu testenden synthetischen Promotoren wieder. Zur Erzeugung leistungsfähiger synthetischer Promotoren wird sich in der Regel der synergistische Effekt mehrerer hintereinander geschalteter *cis*-Elemente zu Nutze gemacht. So besteht der JA- und SA-responsive synthetische Promotor 4xJERE aus einem Tetramer des JERE-Elementes (Rushton *et al.*, 2002) (siehe Punkt 5.1.2). In Vorversuchen wurde zunächst die Auswirkung einer Multimerisierung der selektierten *cis*-Elemente auf die Expression eines damit fusionierten Reportergens getestet. Als Test-Element wurde dafür die G-Box aus dem *AOC3P* (siehe Tab. 5.1) verwendet. Von diesem Element wurden jeweils *sense* (*fw*)- und *antisense* (*rev*)-Oligonukleotide abgeleitet, die aus einem Monomer (1xG-AOC3), Dimer (2xG-AOC3) bzw. Tetramer (4xG-AOC3) dieses Elementes bestehen. Nach Synthese durch Eurofins MWG Operon wurden die komplementären DNA-Einzelstränge zunächst hybridisiert (siehe Punkt 2.8.1) und die ds-Oligonukleotide mit dem 35S MP und dem *GUS*-Reportergen fusioniert. Die Klonierung der Konstrukte 1xG-AOC3:*GUS*, 2xG-AOC3:*GUS* und 4xG-AOC3:*GUS* wurde von Z. Hossain vorgenommen, wobei dieser den *high copy*-Vektor pGEM-T Easy als Zielvektor für die *Promotor:GUS*-Kassetten verwendete. Die Funktionsfähigkeit der generierten Promotoren wurde in Zellkulturprotoplasten nach PEG-vermittelter Transfektion getestet. Hierbei wurde der basale Level der GUS-Aktivität, also die GUS-Aktivität in unbehandelten Protoplasten, bestimmt (siehe Punkt 5.1.3). Dieser basale Level der GUS-Aktivität ist auf die infolge des osmotischen Stresses eintretende Akkumulation von JA-Ile in den Protoplasten zurückzuführen und konnte bei den von Z. Hossain durchgeführten Vorversuchen mit den Vollängen- und Deletionskonstrukten der beiden *AOC*-Promotoren (*AOC2P*, 2P-D1 bis 2P-D10, *AOC3P* und 3P-D1 bis 3P-D8) nicht durch eine Behandlung der Protoplasten mit JA (50 μ M) gesteigert werden (Daten nicht gezeigt, persönliche Mitteilung).

Um abzusichern, dass der Minimalpromotor keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat, wurden als Negativkontrolle zusätzlich Protoplasten mit dem Plasmid pBT10:35SMP:*GUS* transfiziert. Als Positivkontrolle diente das von Z. Hossain generierte Fusionskonstrukt bestehend aus dem Vollängenpromotor der *AOC3* und dem *GUS*-Reportergen (*AOC3P:GUS*).

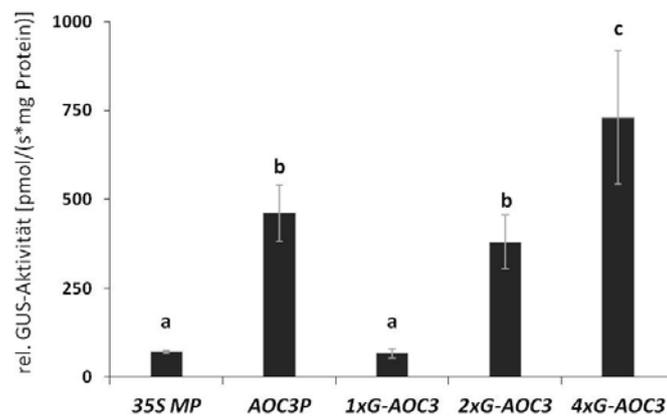


Abb. 5.6: Einfluss einer Multimerisierung der *AOC3P*-G-Box auf die Aktivität synthetischer Promotorkonstrukte.

Gezeigt sind die nach Transfektion von *A. thaliana*-Zellkulturprotoplasten mit den GUS-Fusionskonstrukten des 35S MP, *AOC3P* und der monomeren (1xG-AOC3), dimeren (2xG-AOC3) und tetrameren (4xG-AOC3) G-Box des *AOC3P* gemessenen relativen (rel.) GUS-Aktivitäten. Gezeigt ist der basale Level der GUS-Aktivität in Protoplasten, die durch die Transfektionsprozedur osmotischem Stress ausgesetzt waren und nicht zusätzlich mit exogener JA behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 6$). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede mit $P \leq 0,05$ bei multiplere Vergleiche mittels Student-t-Test mit Bonferoni-Korrektur.

Die Multimerisierung der *AOC3*-G-Box wirkte sich synergistisch auf die Aktivität aus (siehe Abb. 5.6). Mit einer einfachen G-Box konnte gegenüber dem reinen 35S MP keine Steigerung der erhaltenen GUS-Aktivität erzielt werden. Im Gegensatz dazu resultierte der 2xG-AOC3-Promotor in einer ähnlichen Aktivität wie der von Z. Hossain klonierte *AOC3*-Volllängenpromotor. Mit dem Tetramer der *AOC3*-G-Box konnte diese Aktivität noch übertroffen werden.

Die Versuchsergebnisse zur Multimerisierung der *AOC3*-G-Box dienten als Grundlage für die Erzeugung weiterer putativ JA-respoviver synthetischer Promotoren aus den zuvor ausgewählten *cis*-Elementen. Eine Liste und Beschreibung aller im Rahmen dieser Arbeit generierten synthetischen Promotoren findet sich in Tab. 5.3. Durch Eurofins MWG Operon wurde die Synthese von ss-Oligonukleotiden bis zu einer Länge von 120 Basen angeboten. Daher wurden für die weiteren zu generierenden G-Box- und T/G-Box-basierten synthetischen Promotoren Pentamere der jeweiligen *cis*-Elemente als fw- und rev-Oligonucleotid abgeleitet (5xG-AOC2, 5xT/G-AOC2, 5xG-JAZ2, 5xG-JAZ7 und 5xG-JAZ8). Außerdem wurden fw- und rev-Oligonukleotide abgeleitet, die sich aus jeweils zwei im Wechsel angeordneten G-Boxen und T/G-Boxen des *AOC2P* zusammensetzen (siehe Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Auflistung und Beschreibung der generierten synthetischen Promotoren.

Gen	synthetischer Promotor	Beschreibung
AOC3	4xG-AOC3	Tetramer der G-Box aus dem <i>AOC3P</i>
AOC2	5xG-AOC2	Pentamer der G-Box aus dem <i>AOC2P</i>
	5xT/G-AOC2	Pentamer der T/G-Box aus dem <i>AOC2P</i>
	K-GT	Dimer einer Kombination aus der T/G-Box und der G-Box aus dem <i>AOC2P</i> ; diese liegen im synthetischen Promotor hintereinander geschaltet vor [2x(T/G-Box + G-Box)]
JAZ2	5xG-JAZ2	Pentamer der G-Box aus dem <i>JAZ2P</i>
JAZ7	5xG-JAZ7	Pentamer der G-Box aus dem <i>JAZ7P</i>
JAZ8	5xG-JAZ8	Pentamer der G-Box aus dem <i>JAZ8P</i>

Die vollständigen Sequenzen aller abgeleiteten *fw*- und *rev*-Oligonukleotide können dem Anhang (siehe Tab. 8.2) entnommen werden. Den Multimeren der *cis*-Elemente wurden an den Enden jeweils die Schnittstellen für die *REN HindIII* und *XbaI* sowie Adenosin (A)-Überhänge angefügt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch Eurofins MWG Operon. Auf Grund des AT-reichen Charakters (72 %) und der Ausbildung intramolekularer Basenpaarungen infolge der palindromischen Nukleotidsequenz (siehe Punkt 8.7 Abb. 8.6 im Anhang) war das Pentamer 5xG-JAZ2 nicht von Eurofins MWG Operon synthetisierbar und konnte daher in die weiteren Experimente nicht mit einbezogen werden. Nach Hybridisierung der verbliebenen komplementären ss-Oligonukleotide (siehe Punkt 2.8.1) wurden diese mit Hilfe der A-Überhänge über „A-T“-Klonierung in den Eingangsvektor pGEM-T Easy eingebracht (siehe Punkt 2.8.7.1). Die Funktionsfähigkeit und Aktivität der synthetischen Promotoren wurde mit dem GUS-Reporter überprüft. Zur Fusion der Multimere mit dem 35S MP und dem *GUS*-Gen wurden diese mit *HindIII* und *XbaI* aus dem Eingangsvektor herausgeschnitten und in den zuvor ebenfalls geschnittenen Zielvektor pBT10:35SMP:*GUS* (siehe Tab. 8.3) umklont. Zellkulturprotoplasten wurden mit den generierten *Promotor:GUS*-Konstrukten transient transformiert und anschließend die GUS-Aktivitäten bestimmt. Zur Kontrolle wurden Protoplasten mit dem Plasmid pBT10:35SMP:*GUS* (Negativkontrolle) und den Vollängenpromotorkonstrukten *AOC2P:GUS* und *AOC3P:GUS* (Positivkontrollen) transformiert. Um die Induzierbarkeit der synthetischen Promotoren besser bewerten zu können, wurde zusätzlich zum basalen Level auch die GUS-Aktivität nach Behandlung der Protoplasten mit Coronatin (10 µM) quantifiziert (siehe Punkt 2.7.1.3). Das JA-Ile-Analogen Coronatin vermittelt die pflanzliche Jasmonatantwort 100 bis 1.000 mal stärker als JA-Ile (Katsir *et al.*, 2008b). Daher wurde getestet, ob eine Coronatin-Applikation zu einer Steigerung der GUS-Aktivität führt.

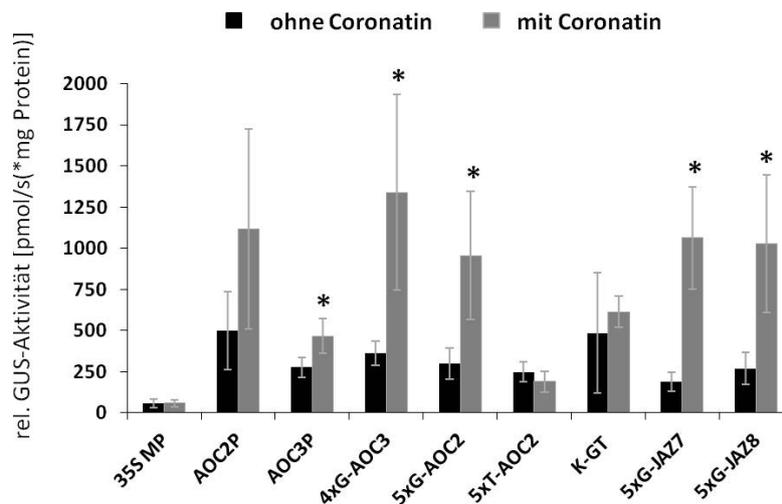


Abb. 5.7: Durch putativ JA-responsive synthetische Promotoren hervorgerufene GUS-Aktivitäten.

Gezeigt sind die nach Transfektion von *A. thaliana*-Zellkulturprotoplasten mit den GUS-Fusionskonstrukten des 35S MP, der beiden AOC-Volllängenpromotoren, sowie der aus den multimerisierten (Tetramer = 4x, Pentamer = 5x) *cis*-Elementen generierten synthetischen Promotoren gemessenen relativen (rel.) GUS-Aktivitäten. Die schwarzen Säulen repräsentieren die basalen Level der GUS-Aktivität in unbehandelten Protoplasten; die grauen Säulen die gemessenen GUS-Aktivitäten nach Applikation von Coronatin zu den Protoplasten (10 μ M, 4 h). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD (n = 6). * $P \leq 0,05$ (paarweiser Vergleich unbehandelter und behandelter Protoplasten je Promotorkonstrukt mit dem Student-t-Test).

Für alle generierten synthetischen Promotoren konnte im Vergleich zum 35S MP-Konstrukt ein erhöhter basaler Level der GUS-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.7). Dieser lag im Fall der synthetischen Promotoren 4xG-AOC3 und 5xG-AOC2 etwa auf dem selben Niveau wie der der entsprechenden Volllängenpromotorkonstrukte (AOC2P und AOC3P). Eine Behandlung der Protoplasten mit Coronatin führte nur im Fall der aus den G-Box-Multimeren bestehenden synthetischen Promotoren zu einer gegenüber dem Grundlevel signifikant erhöhten GUS-Aktivität. Weder mit dem 5xT/G-AOC2:*GUS*-Konstrukt, noch mit dem Kombinationskonstrukt K-GT:*GUS* war ein Coronatin-induzierter Anstieg der GUS-Aktivität zu beobachten.

5.2.2.2 Charakterisierung der putativ JA-spezifischen Promotoren in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana*

Im Protoplastensystem wurde die allgemeine Fähigkeit der synthetischen Promotoren, die Expression eines Repotergens in Reaktion auf einen Anstieg im JA-Gehalt aktivieren zu können, überprüft. Zusätzlich war jedoch die Spezifität, mit der die Promotoren aktiviert werden, ein wichtiger Aspekt für ihre Nutzung zum Nachweis von JA auf Zell-/Gewebeebene. Für diese Anwendung darf keine Kreuzaktivierung der Promotoren durch andere Phytohormone auftreten. Um dies experimentell abzusichern, war eine Charakterisierung der generierten Promotoren vorzunehmen. Diese erfolgte zunächst im transienten *N. benthamiana*-System (siehe Punkt 2.6.2.1), da auf Grund des hohen basalen Levels der GUS-

Aktivität im Protoplastensystem dieses für die Charakterisierung der generierten synthetischen Promotoren hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber JA ungeeignet war. Für eine bessere Visualisierbarkeit der Promotoraktivität in den transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern wurde statt des GUS-Reporters ein an das Histon HTA6 gekoppeltes GFP (Zhang *et al.*, 2005) als Reporter genutzt. Nach Expression des Reporter-gens tritt HTA6:GFP konzentriert im Zellkern und nicht verteilt im Zytoplasma auf und ist damit besser detektierbar.

Für die Fusion der verschiedenen synthetischen Promotoren mit dem *HTA6:GFP*-Reporter-gen wurden diese zunächst unter Anwendung der spezifischen Primer pGEM-GW_fw (fw-Primer für 4xG-AOC3) bzw. pBT10-GW_fw (fw-Primer für alle anderen Konstrukte) und pGW_rev (siehe Tab. 8.1) amplifiziert. Der rev-Primer wurde so abgeleitet, dass zusammen mit den multimeren *cis*-Elementen auch der, die TATA-Box enthaltende, 35S MP mit amplifiziert wurde. Als Template-DNA dienten die zuvor generierten *Promotor:GUS*-Vektoren (siehe Punkt 5.2.2.1). Als Positivkontrolle wurde neben den im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten synthetischen Promotoren auch das 4xJERE-Element an das *HTA6:GFP*-Reporter-gen gekoppelt. Als Negativkontrolle wurde der 35S MP mitgeführt. Alle Promotoren wurden zur Fusion mit *HTA6:GFP* in den *Gateway*-kompatiblen Vektor pCGTAG:35S:*HTA6:GFP* subkloniert und anschließend unter Anwendung der Schnittstellen für die *REN* *SacI* und *SbfI* in den binären Zielvektor pBINPLUS eingebracht. Agrobakterien wurden mit den generierten Plasmiden transformiert und Blätter von *N. benthamiana* mit diesen transgenen Zellen infiltriert (siehe Punkt 2.6.2.1). Für die Charakterisierung der Promotoren hinsichtlich ihrer Spezifität wurden die transient transformierten Blätter auf Wasser bzw. 50 μ M-Lösungen verschiedener Phytohormone (JAME, OPDA, 12-OH-JA, ABA, ACC, IAA, SA und GA) flотиert und anschließend Blattscheiben für die mikroskopische Analyse ausgestanzt (siehe Punkt 2.6.3). Um zusätzlich zu testen, ob auch endogen gebildetes JA die Promotoren aktiviert, wurden zusätzlich zu den Applikationsversuchen Verwundungsexperimente durchgeführt (mehrmaliges Quetschen über die Mittelrippe und Blattspreite). Als weitere Kontrolle wurden nicht nur auf Wasser flотierte Blätter analysiert, sondern auch unbehandelte transformierte Blättern, d. h. Blätter, die nach Infiltration bis zur Analyse an der Pflanze verblieben. Dies diente dazu, unspezifische Hintergrundsignale ausschließen zu können. Teile der Klonierung und mikroskopischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit F. Haufe im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Haufe, 2010).

Tab. 5.4: Zusammenfassung der nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion von *N. benthamiana*-Blättern mit den putativ JA-spezifischen synthetischen Promotoren beobachteten Fluoreszenzsignale.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der transient mit den generierten synthetischen Promotoren transformierten *N. benthamiana*-Blätter in vereinfachter Form zusammengestellt. Für die Analyse der Spezifität der synthetischen Promotoren wurden die Blätter 24 h nach Infiltration mit den transgenen Agrobakterien für 12 h auf Wasser bzw. der entsprechenden Phytohormonlösung (jeweils 50 µM) flotiert und anschließend das Fluoreszenzsignal unter Verwendung von GFP-spezifischen Filtern (Anregung BP 470/40; Strahlenteiler FT 485; Emission BP 525/50) mikroskopisch analysiert. Die Erläuterung des verwendeten Farbcodes ist der Legende unter der Tabelle zu entnehmen. Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgte die Analyse von drei biologischen Replikaten. Die Analyse des 35S MP, 4xJERE, 5xG-AOC2, 5xT/G-AOC2 und K-GT erfolgte in Zusammenarbeit mit F. Haufe. (n. a.: nicht analysiert).

	35S MP	4xJERE	5xT/G-AOC2	5xG-AOC2	K-GT	4xG-AOC3	5xG-JAZ7	5xG-JAZ8
unbehandelt								
H ₂ O								
Verwundung		n. a.						
JAME		n. a.						
OPDA		n. a.						
12-OH-JA		n. a.						
ABA		n. a.						
ACC		n. a.						
IAA		n. a.						
SA		n. a.						
GA		n. a.	n.a.	n.a.	n.a.			

Legende:

	nicht analysiert		kein Signal		schwaches Signal		starkes Signal
---	------------------	---	-------------	---	------------------	---	----------------

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analysen sind vereinfacht in Tab. 5.4 zusammengefasst. Die mikroskopischen Aufnahmen zu den durchgeführten Analysen sind dem Punkt 8.8 im Anhang zu entnehmen. Unter Kontrolle des 35S MP war weder nach Phytohormonapplikation, noch nach Verwundung eine Expression des Reportergens detektierbar. Im Gegensatz dazu wurde *HTA6:GFP* unter Kontrolle des 4xJERE-Promotors scheinbar konstitutiv exprimiert. Bereits in unbehandelten und auf Wasser flotierten Blättern war ein deutliches GFP-Signal zu beobachten. Alle anderen synthetischen Promotoren waren weder in den unbehandelten Blättern, noch in den Wasserkontrollen aktiv, wurden jedoch durch Verwundung und JAME-Behandlung induziert. Ein schwaches Fluoreszenzsignal trat außerdem bei allen sechs, im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten, putativ JA-responsiven Promotoren nach Inkubation mit OPDA auf. Dabei war jedoch nicht auszuschließen, dass das von den Zellen aufgenommene OPDA in die JA-Biosynthese eingespeist wurde und somit die Promotoraktivierung auf JA zurückzuführen war. Bei vier der sechs Promotoren wurde eine GFP-Fluoreszenz nach Inkubation mit ABA beobachtet; in mit 5xT/G-AOC2 transformierten Blättern war sogar eine starke Fluoreszenz nachweisbar. Während die Promotoren 5xG-AOC2 und 4xG-AOC3 durch keines der anderen getesteten Phytohormone aktiviert wurden, zeigten die anderen synthetischen Promotoren eine

Induzierbarkeit durch mindestens ein weiteres Phytohormon neben Jasmonaten. Die T/G-Box enthaltenen Promotoren 5xT/G-AOC2 und K-GT zeigten dabei die stärkste Unspezifität. Sie wurden neben JAME auch durch OPDA, ABA, SA und zusätzlich im Falle des 5xT/G-AOC2 durch 12-OH-JA und im Falle des K-GT durch IAA induziert.

5.2.2.3 Analyse der Aktivität ausgewählter synthetischer Promotoren in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen

Die Ergebnisse der Infiltrationsversuche mit Blättern von *N. benthamiana* deuteten darauf hin, dass die synthetischen Promotoren 5xG-AOC2 und 4xG-AOC3 für einen spezifischen *in vivo*-Nachweis von JA geeignet sein könnten. Beide Promotoren wiesen in den transient transformierten Blättern eine gute Induzierbarkeit durch eine JAME-Behandlung bzw. durch Verwundung auf. Zwar war auch ein schwaches Fluoreszenzsignal nach ABA-Applikation zu beobachten, jedoch war dieses für diese beiden synthetischen G-Box-basierten Promotoren nur sehr schwach ausgeprägt (siehe Abb. 8.7). Um die Spezifität des 5xG-AOC2- und 4xG-AOC3-Promotors besser bewerten zu können, sollten die *HTA6:GFP*-Fusionskonstrukte beider Promotoren mittels Agrobakterien-vermittelter Transfektion stabil in *A. thaliana*-Pflanzen eingebracht, und anschließend die Responsivität der Promotoren getestet werden. Sowohl die Erzeugung der stabil transformierten Pflanzen als auch die anschließend mit den Transformanten durchgeführten Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit F. Haufe (Haufe, 2010). Zur Kontrolle wurden Pflanzen mit dem 35S MP und dem synthetischen Promotor 4xJERE:*HTA6:GFP* transformiert. Zunächst wurde getestet, ob die synthetischen Promotoren *in planta* funktionell waren, d. h. ob eine Induktion durch JA bzw. Coronatin erfolgte. Dazu wurden Blätter transgener *A. thaliana*-Pflanzen auf Wasser und Coronatin (10 µM) floriert bzw. durch Quetschen des Blattes über Mittelrippe und Blattspreite verwundet und anschließend 60 min, 6 h bzw. 12 h nach der Behandlung mikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle erfolgte auch die Analyse unbehandelter Blätter. Pflanzen, die das *HTA6:GFP* unter Kontrolle des 4xJERE-Promotors exprimierten, wiesen bereits in unbehandelten Pflanzen ein deutliches Fluoreszenzsignal auf, welches die vermutete konstitutive Aktivität des Promotors bestätigte (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber konnte für den 5xG-AOC2- und den 4xG-AOC3-Promotor weder in Blättern von Pflanzen der T1-Generation, noch der T2-Generation eine Induktion der Promotoren durch Verwundung oder Coronatin-Behandlung nachgewiesen werden. Selbst die Stimulation des Blattmaterials durch eine Kombination aus Verwundung und Flotieren auf JAME-Lösung für bis zu 12 h führte nicht zu einem GFP-Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Transkriptanalysen von F. Haufe deuteten für 4xG-AOC3 und 5xG-AOC2 zwar auf eine leichte wundinduzierbare, aber im Vergleich zum 4xJERE-Promotor insgesamt sehr geringe Transkriptakkumulation des Reportergens hin (siehe Punkt 8.9 im Anhang). Da die Promotoren somit zwar putativ spezifisch durch JA aktiviert werden (siehe Punkt 5.2.2.2), gleichzeitig jedoch in stabil transformierten Pflanzen nur zu einer geringen JA-induzierten Expression des Reportergens

führen, sind sie in der vorliegenden Form für einen zell- und gewebespezifischen *in vivo*-Nachweis des Phytohormons ungeeignet.

5.2.3 Erzeugung einer neuen Generation putativ JA-responsiver synthetischer Promotoren

5.2.3.1 Identifizierung putativer *Enhancer*-Elemente der G-Box aus dem *AOC3*-Promotor

In *A. thaliana*-Pflanzen, die mit den aus den G-Boxen des *AOC2P* und *AOC3P* generierten synthetischen Promotoren stabil transformiert wurden, war im Gegensatz zum 4xJERE weder nach Verwundung, noch nach Applikation von JAME ein auf die Expression des Reportergens zurückzuführendes Fluoreszenzsignal nachweisbar. Eine mögliche Ursache für die zu niedrige Promotoraktivität könnte sein, dass zusätzlich zum G-Box-Element ein weiteres *cis*-Element notwendig ist, welches die Rekrutierung eines unbekanntes Co-Aktivators der Transkription vermittelt (siehe Punkt 5.1.1). Somit könnte die G-Box in JA-responsiven Promotoren zwar als qualitatives Element essentiell für die spezifische Aktivierung der Transkription durch einen Anstieg im JA-Gehalt sein. Jedoch würde erst durch das Zusammenwirken der G-Box mit einem *Enhancer*-Element eine wirksame Induktion der Genexpression ermöglicht werden. Für den Promotor des Transkriptionsfaktors *ORCA3* (*ORCA3P*) aus *Catharanthus roseus* wurde gezeigt, dass das JA-responsive Element aus zwei Einheiten besteht: einem G-Box-ähnlichen Element und einem etwa 12 Basen oberhalb davon lokalisierten AT-reichen Element (5'-CAATAAAATATT-3') (Vom Endt *et al.*, 2007). Daher wurden die unter Punkt 5.2.1 betrachteten Promotoren JA-responsiver *A. thaliana*-Gene auf das Vorliegen eines vergleichbaren AT-reichen Elementes mit der Bioinformatik-Software Clone Manager (Sci-Ed Software) untersucht. Dabei wurden nur die Promotoren betrachtet, in deren Sequenzen ein oder mehrere G-Box-Elemente identifiziert wurden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Tab. 5.5 aufgelistet. In etwa der Hälfte der 12 analysierten Promotoren konnten Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu dem AT-reichen Element des *ORCA3P* identifiziert werden. Diese waren mit Ausnahme vom putativ AT-reichen Element des *JAZ7P* oberhalb der G-Box mit variierendem Abstand lokalisiert. Der *AOC3P* wies eine dem *Enhancer* des *ORCA3P* sehr ähnliche AT-reiche Sequenz (5'-CAATAAAATATT-3') mit vergleichsweise geringem Abstand (ca. 120 Basen) zur G-Box auf. Die Rolle dieser AT-reichen Sequenz als putativer *Enhancer* für das G-Box-Element des *AOC3P* sollte daher näher untersucht werden.

Tab. 5.5: Übersicht über Sequenzbereiche JA-regulierter Promotoren, die Ähnlichkeiten zum AT-reichen Element des *ORCA3P* aufweisen.

Gezeigt sind Sequenzbereiche in JA-regulierten Promotoren, die eine Ähnlichkeit zu dem AT-reichen *Enhancer*-Element aus dem *ORCA3P* aufweisen. Die Sequenz dieses Elementes ist zum Vergleich im Tabellenkopf aufgeführt.

5'-CAATAAAATATT-3'		
Gen	Putatives AT-reiches Element	Basenabstand zur nächsten G-Box (in 5'→3' Richtung)
<i>AOC2</i>	CAATAAAAATAA	ca. -1470 Basen
<i>AOC3</i>	CAATAAATATT	ca. -120 Basen
<i>AOS</i>	keines	
<i>JAZ1</i>	keines	
<i>JAZ2</i>	CAATAAAATAAC	ca. -210 Basen
<i>JAZ3</i>	keines	
<i>JAZ5</i>	keines	
<i>JAZ6</i>	CAATAAAATGA	ca. -380 Basen
<i>JAZ7</i>	CAATAAAATACT	ca. +120 Basen
<i>JAZ8</i>	CAATTAATATA	ca. -680 Basen
<i>JAZ9</i>	keines	
<i>JAZ10</i>	CAATAAAATGTT	ca. +710 Basen (<i>antisense</i> -Orientierung)

Um die Rolle der AT-reichen Sequenz 5'-CAATAAATATT-3' als putativer *Enhancer* der G-Box des *AOC3P* zu prüfen, wurden verschiedene interne Deletionsfragmente des *AOC3P* generiert (siehe Abb. 5.8A). Dabei handelte es sich unter anderem um ein etwa 170 bp langes Fragment (3P-Int1), das aus der G-Box plus etwa 160 bp oberhalb des *cis*-Elementes bestand. Dieses 3P-Int1-Fragment wurde zudem für die Erzeugung weiterer interner Deletionen in zwei Unterkonstrukte geteilt (3P-Int2 und 3P-Int3). Während das 3P-Int3-Fragment das G-Box-Element enthielt, lag im 3P-Int2-Fragment das AT-reiche Element vor. Die Klonierung der Fragmente, die Fusion mit dem 35S MP und dem *GUS*-Gen und die Transformation der Pflanzen erfolgte durch Z. Hossain (siehe Tab. 8.1 und Abb. 8.5). Nach Selektion transgener Pflanzen auf entsprechendem Selektionsmedium wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Blätter der *A. thaliana*-Pflanzen (T1-Generation) für 3 h auf Wasser und einer JAME-Lösung (50 µM) flotiert und die *in vivo*-Aktivität des Reporterenzym mittels histochemischer GUS-Färbung analysiert. Für alle drei Konstrukte wurden ≥ 7 transgene *A. thaliana*-Pflanzen selektiert. In 15 von 18 Blättern 3P-Int1-transformierter Pflanzen war nach JAME-Behandlung eine deutliche GUS-Färbung zu beobachten (siehe Abb. 5.8B). Bei sechs der Transformanden trat dabei bereits nach dem Flotieren auf Wasser eine leichte bis deutliche GUS-Färbung auf, die jedoch im Vergleich zu den mit JAME behandelten Proben deutlich schwächer ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu konnte in Blättern der mit den beiden Unterfragmenten 3P-Int2 und 3P-Int3 transformierten *A. thaliana*-Pflanzen nach JAME-Behandlung keine Aktivität des Reporterenzym nachgewiesen werden. Dies stützt die These, dass für die Induktion des *AOC3*-Promotors ein Zusammenspiel der G-Box mit dem etwa 120 Basen oberhalb davon lokalisierten AT-reichen Elementes erforderlich ist.

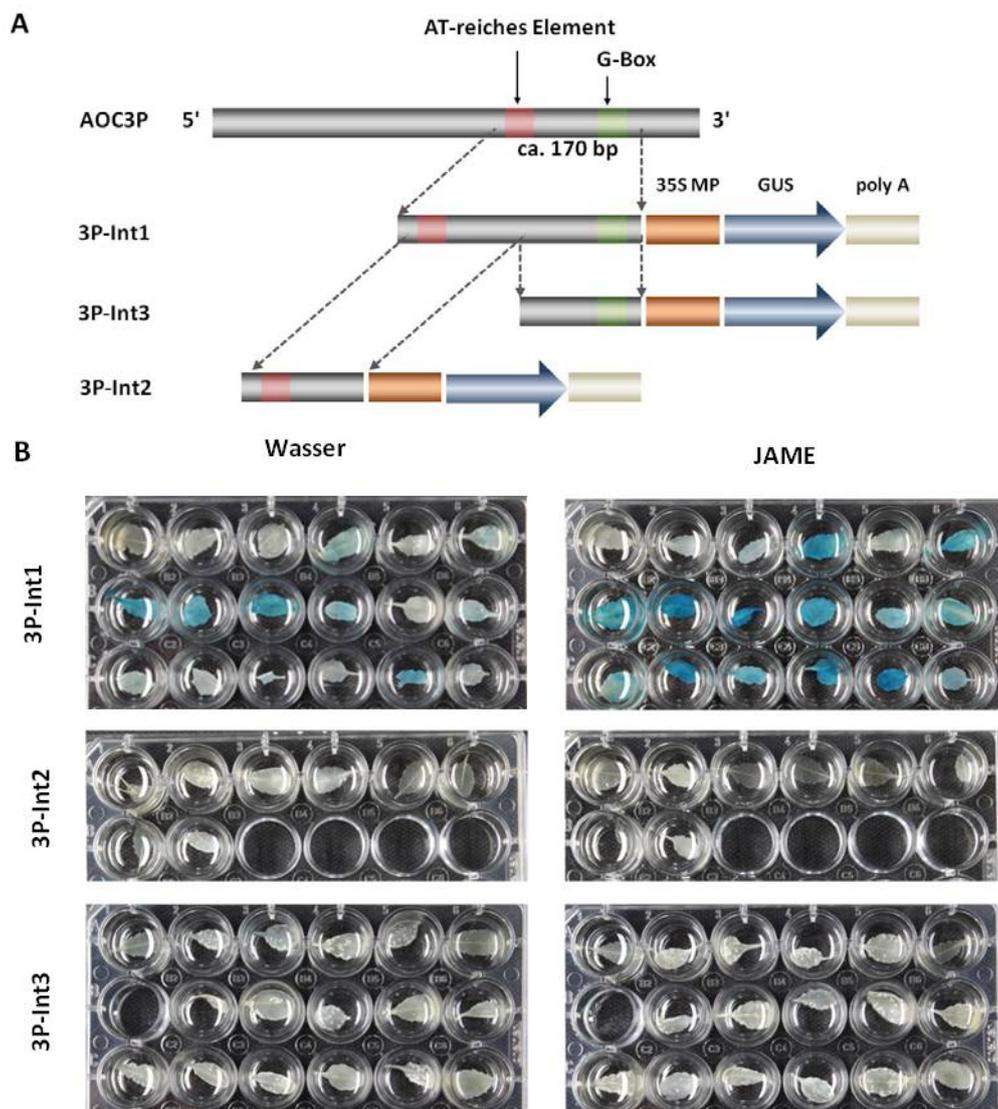


Abb. 5.8: Histochemische GUS-Färbung der mit GUS-Konstrukten interner Deletionsfragmente des AOC3P stabil transformierten Pflanzen.

Um zu prüfen, ob es sich bei dem AT-reichen Element 120 Basen oberhalb der AOC3P-G-Box um ein putatives *Enhancer*-Element handelt, wurden von Z. Hossain drei interne Deletionen des AOC3P (3p-Int1 bis 3P-Int3) generiert und mit dem 35S MP und GUS-Reportergen fusioniert (A). Nach stabiler Transformation von *A. thaliana* wurden mit den Transformanten der T1-Generation histochemische GUS-Färbungen durchgeführt. Um die Responsivität der Deletionsfragmente für JA zu testen, wurden Blätter vor der Färbung für 3 h auf Wasser bzw. JAME (50 µM) floriert. Die Pflanzen wurden zuvor auf Selektionsmedium angezogen und unter Verwendung GUS-spezifischer Primer mittels PCR auf Transgenität überprüft.

5.2.2.4 Erzeugung und Charakterisierung eines neuen putativ JA-responsiven synthetischen Promotors aus dem AT-reichen Element und der G-Box des AOC3P

Die Ergebnisse zur Untersuchung der internen Deletionen des AOC3P deuten zusammen mit den Ergebnissen der *in silico*-Analysen darauf hin, dass die Sequenz 5'-CAATAAATATT-3' ein für die G-Box des AOC3P bedeutender *Enhancer* zur Regulation der JA-Antwort darstellt. Daher sollte im nächsten Schritt getestet werden, ob die Kopplung der G-Box aus dem

AOC3P mit dem putativen *Enhancer*-Element zu einem funktionellen und gleichzeitig JA-spezifischen synthetischen Promotor führt. Zur Erzeugung des synthetischen Promotors wurde das 331 bp lange DNA-Fragment *TS_4x(AT+G)-AOC3* abgeleitet (siehe Tab. 8.2). Dieses enthielt neben dem 35S MP jeweils vier alternierend angeordnete AT-reiche Elemente und G-Boxen (siehe Abb. 5.9). Um ausschließen zu können, dass das AT-reiche Element selbst zu einer unspezifischen Induktion führt, wurde desweiteren ein 213 bp langes Kontrollfragment (*TS-2xAT-AOC3*) abgeleitet, bestehend aus dem 35S MP und einem oberhalb davon angeordneten Dimer des putativen *Enhancers* (siehe Abb. 5.8). Die DNA-Fragmente wurden durch Eurofins MWG Operon synthetisiert und anschließend mit Hilfe der zusätzlich an den jeweiligen Enden eingebauten *Gateway*-Überhänge (siehe Tab. 8.2) zur Fusion mit dem Reporter gen *HTA6:GFP* in den *Gateway*-kompatiblen Vektor pCGTAG:35S:*HTA6:GFP* subkloniert. Die *Promotor:HTA6:GFP*-Kassetten wurden unter Verwendung der Schnittstellen für die REN *SacI* und *SbfI* in den binären Zielvektor pBINPLUS umkloniert und in Agrobakterien eingebracht.

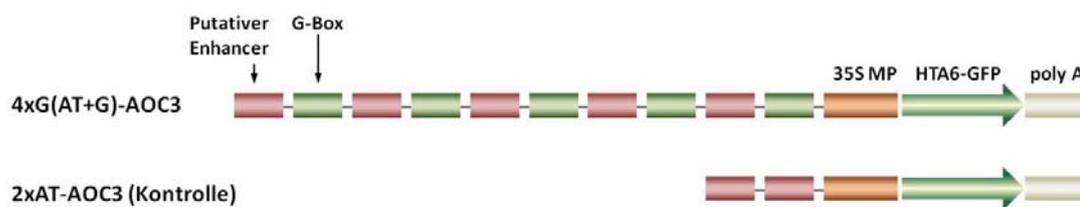


Abb. 5.9: Aufbau des neuen putativ JA-responsiven Promotors *4x(AT+G)-AOC3* und des Kontrollpromotors *2xAT-AOC3*.

Eine erste Charakterisierung der generierten Konstrukte erfolgte in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* (siehe Punkt 2.6.2.1). Wie bereits für die erste Generation der synthetischen Promotoren beschrieben (siehe Punkt 5.2.2.2), wurden die Blätter zur Analyse der Promotoraktivität 24 h nach Infiltration für 2 h auf Wasser bzw. 50 μ M Phytohormonlösungen floriert, anschließend Blattscheiben daraus ausgestochen und das Auftreten des HTA6:GFP-Signals mikroskopisch untersucht (siehe Punkt 8.10 Abb. 8.9 im Anhang). Zusätzlich dazu erfolgte auch die Untersuchung von Blattmaterial 12 h nach mechanischer Verwundung des Blattgewebes bzw. von unbehandeltem Blattmaterial (36 h nach Transfektion geerntet). Als weitere Kontrollen wurden die mit dem *HTA6:GFP* fusionierten 35S MP (Negativkontrolle) und 4xJERE-Promotor (Positivkontrolle) in die Experimente einbezogen. Eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der mikroskopischen Analysen ist in Tab. 5.6 gezeigt. Die vollständigen mikroskopischen Aufnahmen finden sich im Anhang 8.10. Während in keiner der analysierten Blattproben eine Aktivität des Kontrollelementes *2xAT-AOC3* nachgewiesen werden konnte, trat nach Verwundung, JAME- und OPDA-Behandlung ein starkes kernlokalisiertes GFP-Fluoreszenzsignal auf. In Blattscheiben aus unbehandelten bzw. auf Wasser florierten

Blättern war bereits ein schwaches Fluoreszenzsignal zu beobachten. Das Signal wurde jedoch nicht durch eine Behandlung mit den anderen getesteten Phytohormonen (12-OH-JA, ABA, ACC, IAA, SA, GA) verstärkt.

Tab. 5.6: Zusammenfassung der nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion von *N. benthamiana*-Blättern mit dem neuen putativ JA-spezifischen Promotor und den Kontrollkonstrukten beobachteten Fluoreszenzsignalen.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der transient mit den generierten synthetischen Promotor:*HTA6:GFP*-Konstrukten transformierten *N. benthamiana*-Blättern in vereinfachter Form zusammengestellt. Für die Analyse der Spezifität der synthetischen Promotoren wurden die Blätter 24 h nach Infiltration mit den transgenen Agrobakterien für 12 h auf Wasser bzw. der entsprechenden Phytohormonlösung (jeweils 50 µM) floriert und anschließend das Fluoreszenzsignal unter Verwendung von GFP-spezifischen Filtern (Anregung BP 470/40; Strahlenteiler FT 485; Emission BP 525/50) mikroskopisch analysiert. Die Erläuterung des verwendeten Farbcodes ist der Legende unter der Tabelle zu entnehmen. Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgte die Analyse von drei biologischen Replikaten. (n. a. = nicht analysiert).

	35S MP	4xJERE	4x(AT+G)-AOC3	2xAT-AOC3
unbehandelt				
H ₂ O				
Verwundung		n. a.		n. a.
JAME		n. a.		
OPDA		n. a.		n. a.
12-OH-JA		n. a.		n. a.
ABA		n. a.		n. a.
ACC		n. a.		n. a.
IAA		n. a.		n. a.
SA		n. a.		n. a.
GA		n. a.		n. a.

Legende:

nicht analysiert
 kein Signal
 schwaches Signal
 starkes Signal

Die nach transienter Transformation gemachten Beobachtungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass eine Kombination der selektierten *cis*-Elemente zu einem synthetischen Promotor führt, der zwar spezifisch durch JA induziert wird, jedoch bereits eine geringe basale Aktivität besitzt. Um dies zu überprüfen und um zu testen, ob der Promotor 4x(AT+G)-AOC3 auch in stabil transformierten Pflanzen funktionell wäre, wurde das Konstrukt durch Agrobakterien-vermittelte Transfektion in das Genom von *A. thaliana*-Pflanzen eingebracht. Zur Kontrolle wurden auch Pflanzen mit dem Kontrollkonstrukt 2xAT-AOC3 transformiert. Nach Selektion transgener Pflanzen wurde mit den Transformanten der T1-Generation ein erstes Test-Experiment zur Analyse der Promotorresponsivität durchgeführt. Dazu wurden Blätter für 12 h auf Wasser bzw. Coronatin (30 µM) floriert und anschließend mikroskopisch analysiert.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse sind in Abb. 5.10 gezeigt. Zum besseren Vergleich ist auch eine Aufnahme von zuvor auf Wasser flotierten Blättern, die das *HTA6:GFP* konstitutiv unter Kontrolle des 4xJERE-Promotors exprimierten, dargestellt. Bei diesen trat in allen Zellen ein deutliches GFP-Signal auf. Für den Kontrollpromotor 2xAT-AOC3 wurden 15 transgene Linien selektiert. In keiner der Transformanden war, auch nicht nach Applikation von Coronatin, eine Aktivität des Promotors nachweisbar. Dies deckt sich mit den in den Infiltrationsversuchen gemachten Beobachtungen. Die Ergebnisse, die für die mit 4x(AT+G)-AOC3:GFP transformierten Pflanzen erzielt wurden, waren demgegenüber heterogen. Es wurden insgesamt 24 transgene Linien selektiert und getestet. In keiner der Transformanden trat nach Flotieren des Probenmaterials auf Wasser ein Fluoreszenzsignal auf. Nach Behandlung mit Coronatin waren in 9 der 24 untersuchten transgenen Pflanzen schwache bis deutliche GFP-Fluoreszenzsignale nachweisbar. Diese traten dabei jedoch nicht wie bei dem unter Kontrolle des 4xJERE-Promotors exprimierten Reporterprotein in allen Zellen des analysierten Blattes auf. Meist war das GFP-Signal nur in vereinzelt Zellen bzw. Zellgruppen nachweisbar. Abb. 5.10 zeigt repräsentative Aufnahmen von zwei der analysierten Transformanden [4x(AT+G)-AOC3 A und B]. Somit führte die Kombination des AT-reichen Elementes mit der G-Box nicht zu einem starken synthetischen Promotor, der sich für einen zell- und gewebespezifischen Nachweis von JA eignen würde. Die beschriebenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Promotor 4x(AT+G)-AOC3 im Vergleich zur ersten Generation der synthetischen Promotoren, die sich nur aus multimerisierten G-Boxen und/oder T/G-Boxen zusammensetzen, scheinbar eine höhere Aktivität aufweist. In weiterführenden Experimenten müsste daher untersucht werden, was zu den beobachteten Unterschieden in der Coronatin-induzierten Expression führte. So wären die Pflanzen der folgenden Generation daher auf Kopienzahl und Zygotie zu testen, um so gegebenenfalls eine Korrelation zwischen der Signalstärke und dem Genotyp zu finden. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit jedoch aus Zeitgründen nicht mehr vorgenommen werden und steht im Fokus der weiterführenden Arbeiten.

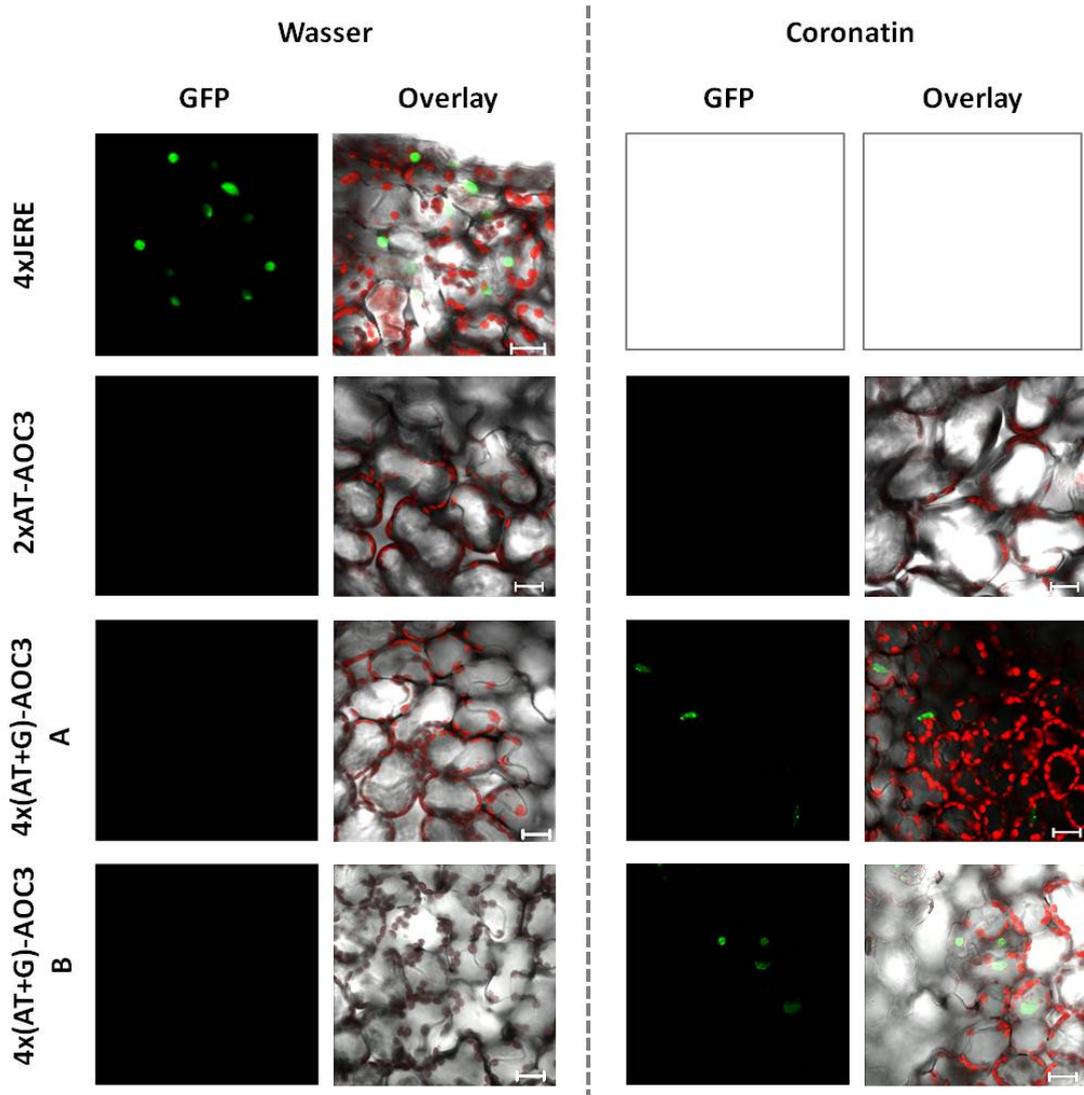


Abb. 5.10: Mikroskopische Aufnahmen von Blättern von *A. thaliana*-Pflanzen, die *HAT6:GFP* unter Kontrolle der synthetischen Promotoren 4xJERE, 2xAT-AOC3 und 4x(AT+G)-AOC3 exprimieren.

Um die Responsivität der neuen synthetischen Promotoren zu testen, wurden nach stabiler Transformation von *A. thaliana* Blätter der T1-Generation für 12 h auf Wasser (links dargestellt) bzw. 30 μ M Coronatin (rechts dargestellt) floriert. Die Pflanzen wurden zuvor auf Selektionsmedium angezogen und unter Verwendung *HTA6:GFP*-spezifischer Primer mittels PCR auf Transgenität überprüft. Für den Promotor 4x(AT+G)-AOC3 sind Aufnahmen von Blättern zwei verschiedener Linien gezeigt (A und B). Die mikroskopische Analyse der GFP-Fluoreszenz (grün) erfolgte am LSM bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Im Overlay ist neben der GFP-Fluoreszenz auch die Chlorophyllfluoreszenz (rot) im Hellfeldbild (grau) zu sehen. Grau umrahmte Kästchen stehen für nicht in die Experimente einbezogene Analysen. Die Maßstab Balken entsprechen einer Größe von 20 μ m.

5.3 Diskussion

5.3.1 Die G-Box als putativ JA-spezifisches Element

Native Promotoren enthalten eine Vielzahl verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente. Ihre Aktivität wird von diversen Faktoren beeinflusst, was zu einem komplexen räumlichen und zeitlichen Expressionsprofil führt (Rushton *et al.*, 2002). Demgegenüber können durch Kombination ausgewählter *cis*-regulatorischer Elemente mit einem Kernpromotor (Minimalpromotor) synthetische Promotorkassetten generiert werden, deren Aktivitäten nur durch definierte Parameter kontrolliert werden (Rushton *et al.*, 2002; Venter, 2007) (siehe Punkt 5.1.2). Die Herstellung eines synthetischen Promotors, der spezifisch über eine Aktivierung durch JA/JA-Ile die Expression eines Reportergens steuert, bot somit einen interessanten methodischen Ansatz, auf nicht-invasivem Weg das zell- und gewebespezifische Auftreten von JA/JA-Ile zu visualisieren. Eine Herausforderung bei der Erzeugung spezifischer synthetischer Promotoren ist die Selektion geeigneter *cis*-Elemente (Venter, 2007). Diese müssen nicht nur zu einer spezifisch durch JA/JA-Ile induzierten Expression des Reportergens führen, sondern darüber hinaus unabhängig vom Zell- und Gewebetyp aktivierbar bzw. auch speziesübergreifend für den Nachweis von JA/JA-Ile anwendbar sein.

JA bzw. das Isoleucinkonjugat JA-Ile sind an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt (Wasternack, 2007; Wasternack & Hause, 2013) (siehe Punkte 1.1 und 1.2). Dies zeigt sich unter anderem in den JA-induziert ablaufenden umfassenden Änderungen der Genexpressionsprofile verschiedener pflanzlicher Spezies (Pauwels *et al.*, 2009). Wie alle JA-Biosynthesegene, sind auch die AOC-kodierenden Gene JA-responsiv (Sasaki *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). Von den vier in *A. thaliana* identifizierten AOCs (*AOC1* bis *AOC4*) erwiesen sich die *AOC2* und *AOC3* als am stärksten responsiv gegenüber JA bzw. JAME (Gürtler, 2006, 2007; Stenzel *et al.*, 2003b; Z. Hossain persönliche Mitteilung). *In vitro*-Analysen zeigten zudem, dass unidirektionale Deletionen vom 5'-Ende des *AOC2P* und *AOC3P* aus zu einer signifikanten Abnahme der Promotorresponsivitäten gegenüber JA führten (siehe Punkt 5.1.3). In Kombination mit Datenbank-gestützten *in silico*-Analysen konnte gezeigt werden, dass beide Promotorsequenzen ein putativ JA-responsives G-Box Element (5'-CACGTG-3') enthalten und im *AOC2P* außerdem ein weiteres G-Box-ähnliches Element in Form einer T/G-Box (5'-CACGTT-3') vorliegt. G-Boxen und G-Box-ähnliche Elemente wurden bereits zuvor in einigen Promotoren als JA-responsive *cis*-regulatorische Elemente identifiziert (Guerineau *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 1993; Xu & Timko, 2004; Figueroa & Bowse, 2012). Dem gegenwärtigen Modell zur JA-Signaltransduktion zufolge dienen G-Boxen dabei als Erkennungssequenz für den TF MYC2 und spielen somit eine wichtige Schlüsselrolle bei der Regulation früher JA-induzierter Gene (Dombrecht *et al.*, 2007) (siehe Punkt 1.2). Um die Hypothese zu stützen, dass G-Boxen und/oder T/G-Boxen für die Erzeugung JA-responsiver synthetischer Promotoren geeignet sind, wurden im Rahmen der vorliegenden Promotion die Promotorsequenzen von 21 ausgewählten frühen JA-responsiven Genen aus *A. thaliana* auf das Auftreten dieser *cis*-

regulatorischen Elemente untersucht und zudem deren Expressionsmuster unter Nutzung der Genevestigator-Datenbank analysiert (siehe Punkt 5.2.1).

Die Gene, in deren Promotoren mindestens eine G-Box identifiziert wurde, erwiesen sich als besonders JAME- und stressresponsiv. Dies wies darauf hin, dass sich G-Boxen gut für die Erzeugung synthetischer JA-regulierter Promotorkonstrukte eignen könnten. Zudem wurden JA-responsive G-Boxen auch in den Promotoren JA-regulierter Gene anderer Pflanzenspezies identifiziert, wie z. B. im *VspB*-Promotor aus *Glycine max* (Mason *et al.*, 1993) und im Promotor des für den Proteinaseinhibitor II kodierenden Gens aus *S. tuberosum* (Kim *et al.*, 1992). Daher könnte die Verwendung JA-regulierter G-Boxen zu synthetischen Promotoren führen, die speziesübergreifend für den *in vivo*-Nachweis von JA/JA-Ile angewendet werden können. Jedoch haben auch die flankierenden Sequenzen einen Einfluss darauf, welche *trans*-aktiven Elemente wie stark an ein *cis*-regulatorisches Element binden (Dombrecht *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1992). Deshalb erfolgte zur Selektion geeigneter G-Box-Elemente zusätzlich ein Vergleich der flankierenden Basen (siehe Punkt 5.2.1). Hierbei zeigte sich, dass die flankierenden Sequenzen der G-Boxen aus den JAZ-Promotoren einen AT-reichen Charakter besitzen (siehe Tab. 8.6). In der Literatur ist belegt, dass einige der darin konserviert auftretenden Adenine bzw. Thyminen einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsstärke von MYC2 an ein G-Box-Element besitzen (Dombrecht *et al.*, 2007). Deswegen wurden zusätzlich zu den G-Boxen aus dem *AOC2P* und *AOC3P* drei weitere G-Box-Elemente aus den Promotoren von JAZ-Genen (*JAZ2*, *JAZ7* und *JAZ8*) für die Erzeugung putativ JA-spezifischer synthetischer Promotoren ausgewählt. Die flankierenden Sequenzen dieser G-Boxen waren AT-reich, enthielten (fast) alle der entsprechenden konservierten Basen (*JAZ2P*, *JAZ7P*) bzw. wenige dieser Basen (*JAZ8P*) und unterschieden sich ansonsten deutlich voneinander. Frühere Studien belegten, dass MYC2 nicht nur an die G-Box-Consensussequenzen binden kann, sondern auch an G-Box-ähnliche *cis*-Elemente wie den T/G-Boxen (Yadav *et al.*, 2005). Die Expressionsmuster der Gene, in deren Promotoren nur T/G-Boxen nachgewiesen wurden (*JAZ4*, *JAZ12*, *AOC1*, *LOX1* und *LOX2*), deuten jedoch darauf hin, dass dieses *cis*-Element allein nicht ausreichend für eine JA-induzierte Promotoraktivierung ist (siehe Punkt 5.2.1). Da jedoch in den Promotorsequenzen einiger Gene, die eine starke Responsivität auf JAME und abiotische Stressfaktoren aufweisen, zusätzlich zur G-Box auch ein oder mehrere T/G-Box-Elemente identifiziert wurden, war nicht auszuschließen, dass eine Kombination beider Elemente für eine JA-vermittelte Aktivierung der Promotoren notwendig sein könnte. Deshalb wurden auch synthetische Promotoren aus dem mit der G-Box kombinierten T/G-Box-Element aus dem *AOC2P* generiert. Bei dem als transkriptionelle Synergie bezeichneten Mechanismus binden mehrere Aktivatoran an ihre korrespondierenden *cis*-regulatorischen Elemente und können sich so gegenseitig verstärken (Chi *et al.*, 1995).

Ein solcher synergistischer Effekt mehrerer hintereinander geschalteter *cis*-regulatorischer Elemente wird prinzipiell auch für die Erzeugung synthetischer Promotoren genutzt, indem statt Monomere, Multimere der selektierten *cis*-Elemente verwendet werden (Rushton *et*

al., 2002). Im transienten Protoplastensystem wurden daher verschiedene Hetero- und Homomultimere der G- und T/G-Boxen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Tetra- bzw. Pentamerisierung der G-Box-Elemente aus dem *AOC2P* und *AOC3P* zu synthetischen Promotoren führte, deren basale Aktivität etwa der der nativen Promotoren entspricht (siehe Punkt 5.2.2.1). Die hohe basale Promotoraktivität ist dabei vermutlich auf den bei der Transfektionsprozedur auf die Protoplasten einwirkenden osmotischen Stress zurückzuführen, der unter anderem zu einer Akkumulation von JA/JA-Ile führt (Kramell, 1995). Da jedoch in der Literatur belegt ist, dass in pflanzlichen Zellen, induziert durch einen osmotischen Stress, auch das an der Regulation des Wasserhaushalts beteiligte Phytohormon ABA akkumuliert (Denekamp & Smeekens, 2003), kann der gemessene Grundlevel nur als indikativ für eine Induzierbarkeit der synthetischen Promotoren durch JA angesehen werden. Um die Funktionalität der generierten Promotorkonstrukte besser bewerten zu können, wurde die Aktivität nach Behandlung der Protoplasten mit Coronatin quantifiziert. Das Phytotoxin Coronatin ist ein strukturelles und funktionelles Analogon von JA-Ile (siehe auch Kapitel II) und induziert die pflanzliche Jasmonatantwort allerdings etwa 100 bis 1.000 mal stärker (Katsir *et al.*, 2008). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es im Vergleich zu JA-Ile vom Co-Rezeptorkomplex fester in der Bindetasche fixiert wird (Sheard *et al.*, 2010) und so die Interaktion von COI1 mit den JAZ-Proteinen effektiver vermittelt (Katsir *et al.*, 2008). Während die Aktivität der Promotoren, die aus den G-Box-Multimeren bestehen (5xG-AOC2, 4xG-AOC3, 5xG-JAZ7 und 5xG-JAZ8) durch die Coronatin-Applikation signifikant gegenüber dem Grundlevel gesteigert werden konnte, zeigten die T/G-Box-basierten synthetischen Promotoren (5xT/G-AOC2 und K-GT) im Protoplastensystem keine erhöhte Responsivität gegenüber Coronatin. Bei der Charakterisierung der generierten synthetischen Promotoren in transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern zeigte sich zwar, dass die beiden T/G-Box-basierten synthetischen Promotoren durch JAME-Behandlung und Verwundung aktiviert wurden, jedoch traten im Vergleich zu den G-Box-basierten Promotoren die meisten unspezifischen Kreuzaktivierungen durch andere Phytohormone auf (siehe Punkt 5.2.2.2). Diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen der *in silico*-Analysen zeigen, dass die aus der T/G-Box hergestellten synthetischen Promotoren 5xT/G-AOC2 und K-GT ungeeignet für einen effektiven und spezifischen Nachweis von JA/JA-Ile sind.

Im Gegensatz zu den T/G-Box enthaltenen synthetischen Promotoren erwiesen sich im transienten System vor allem die G-Box-Multimere 5xG-AOC2 und 4xG-AOC3 nicht nur als responsiv gegenüber Coronatin, JAME und Verwundung, sondern auch als am spezifischsten. Eine leichte Kreuzaktivierung der Promotoren war nach Flotieren der transfizierten Blätter auf OPDA- und ABA-Lösung zu beobachten, wobei OPDA eine Biosynthesestufe von JA/JA-Ile ist (siehe Punkt 1.1). Somit ist nicht auszuschließen, dass die Induktion der Expression des Reportergens daraus resultierte, dass das verabreichte OPDA in den JA-Biosyntheseweg eingespeist und zu JA/JA-Ile metabolisiert wurde. OPDA besitzt jedoch auch eigene, JA-unabhängige Signaleigenschaften (Ribot *et al.*, 2008; Mueller

& Berger, 2009; Stintzi, 2001; Taki *et al.*, 2005), und in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Pflanzenspezies wurde bereits ein stressinduzierter Anstieg im OPDA-Gehalt nachgewiesen (Buseman *et al.*, 2006; Miersch *et al.*, 2008; Stelmach *et al.*, 2001). Zur Charakterisierung der Promotoren hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit durch OPDA wären diese z. B. in die *A. thaliana*-Mutante *opr3* einzubringen, die durch einen Defekt im für die OPR3 kodierenden Gen OPDA nicht in JA/JA-Ile umwandeln kann (Stintzi, 2000). Ebenso wäre eine mögliche unspezifische Aktivierung der Promotoren durch ABA näher zu untersuchen. In der Literatur ist belegt, dass G-Boxen als ABA-responsives Element (ABRE) auch in die Vermittlung der ABA-induzierten Genexpression involviert sein können (Maracotte *et al.*, 1989, Shen & Ho, 1995). Die im Vergleich zur JAME-Behandlung bzw. Verwundung relativ geringe Aktivierung der G-Box-Multimere durch ABA in den transient transformierten Blättern könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch das Flotieren auf ABA-Lösung ein Verschluss der Stomata eintrat (Hsiao, 1973) und somit weniger Phytohormon aufgenommen wurde. Der an der ABA-Antwort beteiligte ABF (ABRE *Binding Factor*) gehört im Gegensatz zu dem bHLH-Protein MYC2 zu den TFs aus der Klasse der bZIP (*basic Leucine Zipper Domain*)-Proteine, die mit hoher Affinität an das G-Box-Motiv 5'-CACGTGGC-3' binden (Choi *et al.* 2000). Die zur Erzeugung der synthetischen Promotoren verwendeten G-Box-Elemente besitzen jedoch davon abweichende flankierende Sequenzen (siehe Punkt 5.2.1). Daher wäre auch denkbar, dass der beteiligte ABF mit geringerer Bindungsaffinität an die putativ JA-responsiven G-Boxen bindet. Um die Spezifität und JA-Responsivität der synthetischen Promotoren 5xG-AOC2 und 4xG-AOC3 *in planta* zu testen, wurden die Konstrukte stabil in *A. thaliana* eingebracht. In den Transformanten war jedoch weder nach Verwundung, noch nach Flotieren auf JAME- bzw. Coronatin-Lösung eine Fluoreszenz des HTA6:GFP-Reporters erkennbar (siehe Punkt 5.2.2.3). Die generierten synthetischen Promotoren resultierten selbst in verwundeten Blättern in geringeren HTA6:GFP-Transkriptakkumulationen als der 4xJERE-Promotor (siehe Punkt 8.9). Jedoch zeigte sich in Blättern der 4xG-AOC3-Transformanten eine etwa 10-fache Steigerung der HTA6:GFP-Transkriptmenge nach Verwundung. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der synthetische Promotor 4xG-AOC3 zwar durch JA-induzierbar ist, jedoch *in planta* nur schwache Aktivität besitzt, so dass die geringe Expression des Reportergens zu keiner für die Visualisierung ausreichenden Akkumulation des HTA6:GFP-Proteins führt. Trotz der putativen Spezifität für JA sind die generierten G-Box-Multimere daher in der vorliegenden Form nicht für einen Nachweis des Phytohormons geeignet.

5.3.2 Ein AT-reiches Element als putatives Kopplungselement für die JA-spezifische G-Box

Für eine Induktion der Transkription kann auch das synergistische Zusammenwirken verschiedener *cis*-Elemente und ihrer korrespondierenden Aktivatoren eine Rolle spielen (Chi *et al.*, 1995). Wie bereits angesprochen sind G-Boxen unter anderem auch in die Regulation der pflanzlichen ABA-Antwort involviert (Maracotte *et al.*, 1989; Shen & Ho, 1995). Shen & Ho (1995) zeigten dabei, dass die als ABRE identifizierte G-Box allein nicht ausreicht um die

ABA-Antwort zu vermitteln, sondern zusätzlich zur G-Box ein als *Coupling Element* (CE) bezeichnetes *cis*-regulatorisches Element notwendig ist. Daher wäre denkbar, dass auch für die Regulation der JA-Antwort ein Zusammenspiel zwischen G-Box und einem bzw. mehreren anderen *Enhancern* erforderlich ist. Die genauen Details der Transkriptionsregulation durch MYC2 sind bisher noch nicht vollständig geklärt. An der Aktivierung JA-regulierter Gene ist unter anderem das MED25-Protein beteiligt (Çevik *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012), das eine Untereinheit des Mediatorkomplexes ist und dadurch die Interaktion von MYC2 mit dem PIC vermittelt (siehe Abb. 5.11). Zudem ist belegt, dass an der Regulation JA-responsiver Gene Chromatin-modifizierende Enzyme beteiligt sind. Während bei niedrigem zellulären JA-Gehalt das Chromatin durch die Histondeacetylasen HDA6 und HDA19 in den geschlossenen Zustand (Heterochromatin) überführt wird (Wasternack & Hause, 2013) und somit die Bindung von TFs verhindert, induziert ein Anstieg im JA-Gehalt eine Rekrutierung von Histonacetyltransferasen, welche die Öffnung des Chromatin zum Euchromatin katalysieren (Kazan & Manners, 2013).

Es wäre somit denkbar, dass Kopplungselemente eine Rolle bei der Rekrutierung von Histonacetyltransferasen spielen. Dies wäre zumindest eine mögliche Erklärung dafür, dass die Promotoren zwar im transienten Protoplastensystem, nicht aber in stabil transformierten Pflanzen induzierbar waren (siehe Punkt 5.2.2.1 und 5.2.2.2). Die in die Protoplasten eingebrachte ringförmige Plasmid-DNA ist prokaryotischen Ursprungs, nicht an Histone gebunden und kann somit unabhängig von Histonacetyltrasen abgelesen werden. Da bei den *in silico*-Analysen beobachtet wurde, dass die in den untersuchten JA-responsiven Promotoren identifizierten G-Boxen häufig gemeinsam mit T/G-Box-Elementen auftraten, wurde zunächst vermutet, dass eine Kombination dieser beiden *cis*-regulatorischen Elemente für eine effektive Aktivierung der Promotoren durch JA von Bedeutung sein könnte. Die generierten T/G-Box-basierten synthetischen Promotoren 5xT/G-AOC2 und K-GT erwiesen sich jedoch nicht nur als unspezifisch gegenüber JA (siehe Punkt 5.2.2.2), sondern zeigten zudem – ebenso wie die aus den G-Boxen generierten Promotoren – nur eine geringe Promotoraktivität in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen (Daten nicht gezeigt; Haufe, 2010). Damit schied die T/G-Box als putatives Kopplungselement für die JA-responsiven G-Boxen des *AOC2P* aus.

Literaturrecherchen ergaben, dass als mögliche Kopplungselemente AT-reiche Sequenzbereiche des Promotors in Frage kommen (Xu & Timko, 2004; Vom Endt *et al.*, 2007). Ähnliche Sequenzabschnitte zu dem publizierten AT-reichen Element des *ORCA3*-Promotors aus *C. roseus* (5'-CAATAAAATATT-3') (Vom Endt *et al.*, 2007) konnten auch in einigen der untersuchten JA-regulierten Promotoren gefunden werden (siehe Punkt 5.2.3.1). Unter anderem wurde im *AOC3P* etwa 120 Basen oberhalb der G-Box die AT-reiche Sequenz 5'-CAATAAATATT-3' identifiziert. Versuche mit internen Deletionsfragmenten des *AOC3P* zeigten, dass JAME-Behandlung stabil mit den Deletionskonstrukten transformierter *A. thaliana*-Pflanzen nur bei Kombination von G-Box und AT-reicher Sequenz eine Expression des Reporters induzierte (siehe Punkt 5.2.3.1). Dies unterstrich die mögliche

Bedeutung des AT-reichen Sequenzabschnitts für die JA-Antwort. In der Literatur ist belegt, dass AT-reiche Elemente unabhängig vom Gewebetyp als quantitative *Enhancer* fungieren können und bei Fusion mit einem Minimalpromotor bereits zu einer verstärkten basalen Expression eines Reportergens führten (Sandhu *et al.*, 1998). Für einen JA/JA-Ile spezifischen synthetischen Promotor wäre dies von erheblichem Nachteil, da die Kombination der putativ JA-spezifischen G-Box mit dem AT-reichen *cis*-Element zu einer unspezifischen Promotoraktivität führen könnte. In einigen der mit der internen Deletion 3P-Int1 transformierten Pflanzen trat bereits ohne JAME-Behandlung eine deutliche GUS-Färbung auf, welche auf eine unspezifische basale Aktivität des Promotorfragmentes hinweisen könnte. Der aus dem AT-reichen Element und der G-Box generierte synthetische Promotor 4x(AT+G)-AOC3 zeigte zudem in transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern bereits ohne Behandlung eine schwache Grundaktivität. Allerdings spiegelte sich dies nicht in den Versuchen mit den stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen wider (siehe Punkt 3.2.3.2): Während in Coronatin-behandelten Blättern über die Expression des GFP-Reporters eine Aktivierung des synthetischen Promotors nachgewiesen werden konnte, war weder in unbehandelten Blättern, noch nach Flotieren auf Wasser eine Promotoraktivität zu verzeichnen. Dies belegt, dass im Fall des synthetischen Promotors 4x(AT+G)-AOC3 die Integration der AT-reichen Sequenz nicht zu einer unspezifischen basalen Promotoraktivität führt. Problematisch für die Anwendung dieses synthetischen Promotors zum JA/JA-Ile Nachweis ist jedoch, dass das Reportersignal nach der Coronatin-Behandlung nur in vereinzelt Zellen bzw. Zellgruppen zu beobachten war. Da bei der Versuchsdurchführung die Behandlung mit Coronatin durch Flotieren der Blätter erfolgte, wurde ein Auftreten des Signals in allen Zellen erwartet. Da weder AT-reiche Elemente noch G-Boxen eine zell- bzw. gewebetypabhängige Expression vermitteln, ist dieses lokale Auftreten der Fluoreszenz schwer zu erklären. Möglicherweise ist trotz Kombination aus G-Box und AT-reichem Element der Promotor noch zu schwach, um in Zellen, die während des Flotierens wenig Coronatin aufgenommen haben, eine für die Visualisierung des Reporters ausreichende Expressionsrate zu erzielen. Abgesehen davon trat das Signal mit unterschiedlicher Stärke nur in 38 % der Transformanten auf. Daher wäre in den nachfolgenden Generationen zu testen, ob ein Zusammenhang zwischen Signalstärke und der Anzahl der in das Genom eingebauten Kopien des Promotors besteht.

Der generierte putativ JA-spezifische Promotor 4x(AT+G)-AOC3 ist zumindest in seiner derzeitigen Form für die zell- und gewebespezifische Visualisierung von JA/JA-Ile noch nicht geeignet. Da die Anzahl der für die Erzeugung eines synthetischen Promotors verwendeten *cis*-Elemente die Promotoraktivität beeinflussen kann (Rushton *et al.*, 2002), steht im Fokus der weiteren Arbeiten die Überprüfung, ob eine Verdopplung des Promotors zu einer Verstärkung der Promotoraktivität führen könnte. Mit 4xJERE liegt ein Beispiel für einen starken synthetischen Promotor bestehend aus gerade einmal vier mit dem 35S MP verknüpften *cis*-Elementen vor. Demgegenüber ist mindestens ein Heptamer des AuxRE für einen starken, zum Auxinnachweis verwendbaren DR5-Promotor notwendig (Ulmasov *et al.*,

1997). Gemeinsam mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeiten durchgeführten Experimenten verdeutlichen die genannten Beispiele der bereits etablierten synthetischen Promotoren noch einmal die Aspekte, die bei der Erzeugung eines spezifischen synthetischen Promotors beachtet werden müssen. Während 4xJERE nachweislich bereits eine hohe Grundaktivität besitzt, die zur Expression des Reportergens führt (siehe Punkt 5.2.2.2 und 5.2.3.2), wurde für den auxinresponsiven DR5-Promotor eine unspezifische Induzierbarkeit durch Brassinolid demonstriert (Nakamura *et al.*, 2003). Sollte durch eine Erhöhung der Anzahl der beiden *cis*-regulatorischen Elemente aus dem *AOC3P* ein funktioneller synthetischer Promotor generiert werden, so wäre in weiterführenden Experimenten unter anderem die Spezifität des Promotors für JA/JA-Ile abzuklären. Trotz der vielen Herausforderungen in der Generierung stellt ein JA/JA-Ile-spezifischer synthetischer Promotor ein vielversprechendes Werkzeug für einen sensitiven, räumlich aufgelösten Nachweis bioaktiven Jasmonats dar, mit dem die pflanzliche Stressantwort gezielt auf nicht-invasivem Wege analysiert werden könnte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Jasmonsäure (JA) und ihre Derivate gehören zu der ubiquitär im Pflanzenreich verbreiteten Phytohormonklasse der Jasmonate. Diese niedermolekularen Botenstoffe sind an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt. Sie steuern den Ablauf pflanzlicher Wachstums- und Entwicklungsvorgänge und sind außerdem bedeutend für die Adaptation der Pflanzen an sich ändernde Umwelteinflüsse. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei biotischen Interaktionen. So begünstigen sie die Ausbildung symbiotischer Wechselwirkungen der Pflanzen mit Mykorrhizapilzen und sind außerdem in die Abwehr von pathogenen Pilzen und Bakterien aber auch von Phytophagen involviert. Viele Funktionen der JA wurden mit Hilfe von Untersuchungen an Mutanten, die JA-insensitiv bzw. JA-defizient sind, aufgeklärt. Diese bieten die Möglichkeit, Gewebe und Prozesse zu identifizieren, in denen JA eine Rolle spielt. Bis zum Beginn der Arbeit waren jedoch keine Techniken verfügbar, die einen direkten zell- und gewebespezifischen Nachweis des Phytohormons erlaubten. Die Entwicklung von Methoden, die dies ermöglichen, war Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit. Hierfür wurden drei gegensätzliche, sich jedoch ergänzende Strategien verfolgt:

Im ersten Teil der Arbeit wurden für den histochemischen Nachweis von JA gegen das an BSA gekoppelte Phytohormon gerichtete polyklonale Antikörper in Kaninchen generiert. Mittels kompetitivem ELISA wurde nachgewiesen, dass die gewonnenen Anti-JA-AKs spezifisch JA, ihren Methylester und das Isoleucin-Konjugat (JA-Ile) binden, nicht jedoch 12-Oxophytodiensäure, 12-Hydroxy-JA und Coronatin erkennen. In Kombination mit der im Rahmen der Arbeit etablierten Methode zur Gewebefixierung mit EDC, konnten die Anti-JA-AKs für den spezifischen *in situ*-Nachweis von JA und ihrer bioaktiven Form JA-Ile in verwundeten Blättern von *S. lycopersicum* angewendet werden. Hierbei zeigte sich, dass in dem direkt der Verwundung ausgesetzten Blatt sowohl in Nähe der Verwundungsstelle, als auch in Geweben, die weiter entfernt davon lagen (3 cm) JA/JA-Ile rasch und gleichmäßig in allen Zelltypen auftrat. Im systemischen Blatt war mit Hilfe der generierten Anti-JA-AKs hingegen kein histochemischer Nachweis von JA/JA-Ile möglich. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass hier die Jasmonatgehalte unter der Nachweisgrenze der AKs lagen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugte Anti-JA-AK ein wertvolles Werkzeug für einen zell- und gewebespezifischen Nachweis von JA/JA-Ile im Verlauf von pflanzlichen Stressreaktionen ist, die zu einem starken Anstieg im JA-Gehalt („JA-Burst“) führen.

Da es sich bei der Immunhistochemie um eine invasive Technik handelt, wurde außerdem an der Etablierung von Methoden gearbeitet, die einen *in vivo*-Nachweis von JA in pflanzlichen Geweben ermöglichen. Die Jasmonatperzeption erfolgt durch einen Co-Rezeptorkomplex, der aus dem F-Box-Protein COI1 und einem JAZ-Protein gebildet wird. Die Interaktion von COI1 und JAZ wird dabei spezifisch durch (+)-7-*iso*-JA-Ile induziert. Protein-Protein-Interaktionen können *in vivo* durch die BiFC-Methode sichtbar gemacht werden.

Unter Anwendung dieser Technik sollte die JA-Ile vermittelte Interaktion der Proteine COI1 und JAZ1 aus *A. thaliana* für die nicht invasive Lokalisation des bioaktiven Jasmonates ausgenutzt werden. Als Testsystem dienten aus einer Zellkultur bzw. den Blättern von *A. thaliana* isolierte Protoplasten. Da das JAZ-Protein infolge der Bindung an COI1 durch den SCF-Ligase-Komplex ubiquitiniert und anschließend proteolytisch abgebaut wird, konnte jedoch nur durch Applikation des Proteasominhibitors MG-132 ein stabiles BiFC-Signal erzielt werden. Es wurden daher verschiedene Strategien getestet, um durch Modifikation der Interaktionspartner die Übertragung von Ubiquitin auf JAZ1 zu unterbinden und das Protein somit vor dem Abbau durch das 26S-Proteasom zu schützen. Dazu sollte unter anderem durch Veränderungen im Bereich der F-Box-Domäne des COI1-Proteins die Interaktion mit dem SCF-Komplex verhindert werden. Während die Deletion der kompletten F-Box-Domäne zu einer Fehllokalisierung des COI1-Proteins und Bildung von zytosolischen Aggresomen führte, hatte der Austausch einer einzelnen AS im F-Box-Motiv (E22V) keinen Einfluss auf die Proteinlokalisierung. In weiterführenden Experimenten wäre somit zu untersuchen, ob COI1_{E22V} als Interaktionspartner von JAZ1 zur Ausbildung eines stabilen BiFC-Signals führt. Als alternative Strategie dazu war eine nicht-ubiquitinierbare Variante des JAZ-Proteins zu generieren. Die Interaktion von JAZ1 mit dem COI1-Protein und JA-Ile wird über das am C-Terminus des Proteins lokalisierte Degron-Peptid vermittelt. Als potentielle Ubiquitinierungsstellen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation vier außerhalb der Degron-Sequenz lokalisierte Lysine identifiziert. Im Protoplastensystem wurde zudem nachgewiesen, dass das Degron im Gegensatz zum nativen JAZ-Protein auch nach Applikation von Coronatin, dem strukturellen und funktionellen Analogon von JA-Ile, stabil bleibt. Damit bietet neben der COI1_{E22V}-Mutante auch die Anwendung des JAZ1-Degrone einen vielversprechenden Ansatz, um bei erhöhtem JA-Ile-Gehalt ein stabiles BiFC-Signal zu erhalten. Dieser Ansatz müsste zunächst im transienten Protoplastensystem getestet werden. Sollte COI1_{E22V} und/oder JAZ1-Degron dabei zu einem stabilen BiFC-Komplex führen, wären die entsprechenden Fusionskonstrukte über stabile Transformation in *A. thaliana* einzubringen und auf ihre Anwendbarkeit zum zell- und gewebespezifischen *in vivo*-Nachweis von JA-Ile zu testen.

Der dritte Ansatz, der zur Etablierung einer Methode für die *non-invasive* Visualisierung von JA in pflanzlichen Geweben verfolgt wurde, war die Erzeugung eines JA-responsiven synthetischen Promotors. Zu diesem Zweck wurden aus den Promotorsequenzen JA-regulierter Gene von *A. thaliana* JA-responsive Elemente (JAREs) selektiert und Multimere dieser Elemente zur Erzeugung eines spezifischen Reporters mit Reportersequenzen (*GUS/HTA6:GFP*) fusioniert. Alle generierten Konstrukte erwiesen sich bei Versuchen im transienten Testsystem als JA-responsiv. Dabei wiesen die aus den G-Boxen des *AOC2P* (5xG-AOC2) und *AOC3P* (4xG-AOC3) die höchste Spezifität für JA auf. In stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen war jedoch nur eine sehr schwache JA- bzw. Coronatin-induzierte Expression des unter der Kontrolle dieser synthetischen Promotoren stehenden Reportergens zu beobachten. Durch *in vitro*-Analysen verschiedener interner Deletions-

konstrukte des *AOC3P* wurde ein AT-reicher Sequenzabschnitt oberhalb der G-Box identifiziert, der als putatives *Enhancer*-Element der G-Box fungieren könnte. Ein synthetischer Promotor bestehend aus einer Kombination beider Elemente führte jedoch nach Coronatin-Behandlung nur in einem Teil der mit dem Konstrukt stabil transformierten Pflanzen zu einem mikroskopisch nachweisbaren Vorkommen des Reporterproteins. Hierbei trat das Fluoreszenzsignal zudem nicht in allen Zellen des analysierten Blattes auf, sondern war nur in vereinzelt Zellen bzw. Zellgruppen nachweisbar. In weiterführenden Experimenten mit Pflanzen der nachfolgenden Generationen (T2/T3) wäre daher zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der in das Genom von *A. thaliana* integrierten Promotorkonstrukte und der Expressionsstärke des Reportergens besteht. Dabei sollte zudem auch der Einfluss der Zygotie (hetero- und homozygot) auf die Expressionsstärke analysiert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde neben der Etablierung eines invasiven JA-Detektionssystems die Voraussetzung geschaffen, nicht-invasive Verfahren zur Sichtbarmachung von JA auf zell- und gewebespezifischer Ebene zu entwickeln. Die Anwendung dieser *in vivo*-Detektionssysteme würde nicht nur klären, in welchen Zellen einer Pflanze Jasmonate akkumulieren, sondern sie könnten auch dazu verwendet werden, JA-responsive Zellen und Gewebe zu isolieren und für Transkriptomanalysen zu nutzen. Damit wäre es möglich, neue Komponenten der JA-Signaltransduktion und/oder JA-responsive Gene zu identifizieren und einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkungsweise von Jasmonaten in Entwicklung und Stressantwort der Pflanze zu leisten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adie, B., Chico, J.M., Rubio-Somoza, I. & Solano, R.** (2007) Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 160-177.
- Albrecht, T., Kehlen, A., Stahl, K., Knöfel, H., Sembdner, G. & Weiler, E.** (1993) Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta* 191: 86-94.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I. & Ellerström, M.** (2006) Oxylinin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid containing galactolipid, arabidopside E. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 31528-31537.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Araujo, P.R., Yoon, K., Ko, D., Smith, A.D., Qiao, M., Suresh, U., Burns, S.C. & Penalva, L.O.** (2012) Before it gets started: regulating translation at the 5' UTR. *Comparative and Functional Genomics* 2012: 475731.
- Avrameas, S.** (1972) Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immuno-histochemistry. *Histochemical Journal* 4: 321-330.
- Avrameas, S. & Ternynck, T.** (1971) Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8: 1175-1179.
- Bahassi, E.M., O'Dea, M.H., Allali, N., Messens, J., Gellerti, M. & Couturier, M.** (1999) Interactions of CcdB with DNA Gyrase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10936-10944.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. & Elledge, S.J.** (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86: 263-274.
- Balcke, G.U., Handrick, V., Bergau, N., Fichtner, M., Henning, A., Stellmach, H., Tissier, A., Hause, B. & Frolov, A.** (2012) An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8: 47.
- Berger, S.** (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* 214: 497-504.
- Bhat, R., Lahaye, T. & Panstruga, R.** (2006) The visible touch: *in planta* visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* 2: 12.
- Blondel, M., Galan, J.-M., Chi, Y., Lafourcade, C., Longaretti, C., Deshaies, R. & Peter, M.** (2000) Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *The EMBO Journal* 19: 6085-6097.
- Blume, B. & Grierson, D.** (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *The Plant Journal* 12: 731-746.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. & Prat, S.** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18: 1577-1591.
- 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. *The Plant Journal* 40: 419-427.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brunson, L.E., Dixon, C., Kozubowski, L. & Mathias, N.** (2003) The amino-terminal portion of the F-box protein Met30p mediates its nuclear import and assimilation into an SCF complex. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 6674-6682.

- Buseman, C., Tamura, P., Sparks, A., Baughman, E., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M., Esch, S., Shah, J., Williams, T. & Welti, R. (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 142: 28-39.
- Butler, J.E.F. & Kadonaga, J.T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development* 16: 2583-2592.
- Carter, C.H. & Leise, J.M. (1958) Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin. *Journal of Bacteriology* 76: 152-154.
- Carver, R.K. & Goldman, M. (1959) Staining toxoplasma-gondii with fluorescein-labeled antibody. III. The reaction in frozen and paraffin sections. *American Journal of Clinical Pathology* 32: 159-164.
- Çevik, V., Kidd, B.N., Zhang, P., Hill, C., Kiddle, S., Denby, K.J., Holub, E.B., Cahill, D.M., Manners, J.M., Schenk, P.M., Beynon, J. & Kazan, K. (2012) MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 160: 541-555.
- Chadwick, C.S., McEntegart, M.G. & Nairn, R.C. (1958) Fluorescent protein tracers; a trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein. *Immunology* 1: 315-327.
- Chelsky, D., Ralph, R. & Jonak, G. (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Molecular and Cellular Biology* 9: 2487-2492.
- Chen, R., Jiang, H. & Li, L. (2012) The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant Cell* 24: 2898-2916.
- Chen, Z., Chen, Y.Z., Wang, X.F., Wang, C., Yan, R.X. & Zhang, Z. (2011) Prediction of ubiquitination sites by using the composition of k-spaced amino acid pairs. *PLoS ONE* 6: e22930.
- Chi, T., Lieberman, P., Ellwood, K. & Carey, M. (1995) A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature* 377: 254-257.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernández-Calvo, P. & Solano, R. (2009) The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *The Plant Journal* 59: 77-87.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. & Ponce, M. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666-671.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. & Kim, S. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 1723-1730.
- Chung, H.S. & Howe, G.A. (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*. *The Plant Cell* 21: 131-145.
- Chung, H.S., Niu, Y.J., Browse, J. & Howe, G.A. (2009) Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* 70: 1547-1559.
- Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D. & Howe, G.A. (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* 146: 952-964.
- Chung, H.S., F. Cooke, T.F., DePew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y. & Howe, G.A. (2010) Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *The Plant Journal* 63: 613-622.
- Clough, S. & Bent, A. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.
- Cohen, S. & Milstein, C. (1967) Structure of antibody molecules. *Nature* 214: 449-541.
- Conconi, A., Mique, M., Browse, J.A. & Ryan, C.A. (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* 111: 797-803.

- Coons, A.H. & Kaplan, M.H.** (1950) Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 91: 1-13.
- Coons, A.H., Kaplan, M.H. & Deane, H.W.** (1950) The histochemical detection of antigens. *Journal of the National Cancer Institute* 10: 1344-1345.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. & Berliner, E.** (1942) The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Journal of Immunology* 45: 159-170.
- Creelman, R. & Mullet, J.** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4114-4119.
- Creelman, R. & Mullet, J.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology* 48: 355-381.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. & Mullet, J.E.** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 4938-4494.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. & Brenner, S.E.** (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188-1190.
- Csaba, G., Kovács, P. & Pállinger, E.** (2006) Influence of paraformaldehyde and EDAC fixation on the demonstrability of hormones (histamine, endorphin, triiodothyronine) in rat immune cells: an immunocytochemical comparative analysis. *Cell Biology International* 30: 412-515.
- Daie, J. & Wyse, R.** (1982) Adaptation of the enzyme-linked immunoabsorbent-assay (ELISA) to the quantitative analysis of abscisic acid. *Analytical Biochemistry* 119: 365-371.
- Dang, C.V. & Lee, W.M.F.** (1988) Identification of the human *c-myc* protein nuclear translocation signal. *Molecular and Cellular Biology* 8: 4048-4054.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV-light and fungal elicitor. *The EMBO Journal* 6: 2551-2556.
- Dathe, W., Ronsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G. & Schreiber, K.** (1981) Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 153: 530-535.
- 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. *Helvetica* 45: 675-685.
- Denekamp, M. & Smeekens, S.C.** (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the *AtMYB102* transcription factor gene. *Plant Physiology* 132: 1415-1423.
- Deng, A.X., Tan, W.M., He, S.P., Liu, W., Nan, T.G., Li, Z.H., Wang, B.M. & Li, Q.X.** (2008) Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of jasmonates in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1046-1052.
- Deshaies, R.J.** (1999) SCF and Cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 15: 435-467.
- Deveto, A. & Turner, J.G.** (2005) Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum* 123: 161-172.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. & Turner, J.** (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32: 457-466.
- Dewitte, W. & Van Onckelen, H.** (2001) Probing the distribution of plant hormones by immunocytochemistry. *Plant Growth Regulation* 33: 67-74.
- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, D. & Onckelen, H.V.** (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* 119: 111-121.

- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. & Estelle, M.** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. & Ryan, C.A.** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92: 4095-4098.
- Dombrecht, B., Xue, G., Sprague, S., Kirkegaard, J., Ross, J., Reid, J., Fitt, G., Sewelam, N., Schenk, P. & Manners, J.** (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 19: 2225-2245.
- Duhamel, R.C., Schur, P.H., Brendel, K. & Meezan, E.** (1979) pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *Journal of Immunological Methods* 31: 211-217.
- Eberle, J., Arnscheidt, A., Klix, D. & Weiler, E.W.** (1986) Monoclonal antibodies to plant growth regulators. III. Zeatinriboside and dihydrozeatinriboside. *Plant Physiology* 81: 516-521.
- Edelman, G.M., Heremans, J.F., Heremans, M.T. & Kunkel, H.G.** (1960) Immunological studies of human γ -globulin. *Journal of Experimental Medicine* 112: 203-223.
- Eisen, H.N. & Siskind, G.W.** (1964) Variations of affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3: 996-1008.
- Estelle, M. & Somerville, C.** (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered morphology. *Molecular Genomics and Genetics* 206: 200-206.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. & Jenkin, C.R.** (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436.
- Farmer, E. & Ryan, C.** (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7713-7716.
- Farmer, E.E. & Ryan, C.A.** (1992) Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends in Cell Biology* 2.
- Feussner, I. & Wasternack, C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53: 275-297.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. & Turner, J.G.** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* 6: 751-759.
- Figuroa, P. & Browse, J.** (2012) The *Arabidopsis* JAZ2 promoter contains a G-box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins. *Plant and Cell Physiology* 53: 330-343.
- 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. *Nature Chemical Biology* 5: 344-350.
- Forner, S.** (2009) Zellspezifität der lokalen Wundantwort in Tomate. Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 113 S.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. & Jürgens, G.** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426: 147-153.
- Gallavotti, A., Yan Yang, Y., Schmid, R.J. & Jackson, D.** (2008) The relationship between auxin transport and maize branching. *Plant Physiology* 147: 1913-1923.
- Ghosh, I., Hamilton, A.D. & Regan, L.** (2000) Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society* 122: 5658-5659.
- Gilardoni, P.A., Schuck, S., Jüngling, R., Rotter, B., Baldwin, I.T. & Bonaventure, G.** (2010) SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. *Bmc Plant Biology* 10: 66.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. & Wolfender, J.** (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 16400-16407.

- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S., Rudaz, S., Wolfender, J. & Farmer, E.** (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 34506-34513.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., McCaig, B., Hause, G., Miersch, O., Wasternack, C. & Hause, B.** (2012) Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiology* 158: 1715-1727.
- Goldman, M.** (1957) Staining toxoplasma-gondii with fluorescein-labelled antibody. II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *Journal of Experimental Medicine* 105: 557-573.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. & Estelle, M.** (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Natural Product Communications* 414: 271-276.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. & Estelle, M.** (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 13: 1678-1691.
- Griffiths, A.J., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M.** (2000) Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes. In: *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman, New York, 7. Auflage, ISBN-10: 10-7167-3520-7162.
- Grun, C., Berger, S., Matthes, D. & Mueller, M.J.** (2007) Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Functional Plant Biology* 34: 65-71.
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G. & Goossens, A.** (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signalling repressor *JAZ1/TIFY10A* is stimulated by auxin. *EMBO Reports* 10: 923-928.
- Guerineau, F., Benjdia, M. & Zhou, D.X.** (2003) A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana vsp1* promoter. *Journal of Experimental Botany* 54: 1153-1162.
- Gürtler, S.** (2006) Analyse der Expression Jasmonsäure-responsiver Gene in Zellkulturen und Protoplasten von *A. thaliana*. Unveröffentlichter Praxissemesterbericht, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 38 S.
- Gürtler, S.** (2007) Analyse der Jasmonsäure-induzierten AOC-Transkriptakkumulation in Zellkulturen, Protoplasten und Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 79 S.
- Hamberg, M. & Hughes, M.** (1988) Fatty acid allene oxides. III. Albumin-induced cyclization of 12,13(s)-epoxy-9(Z),11-octadecadienoic acid. *Lipids* 23: 469-475.
- Hamberg, M. & Gardner, H.W.** (1992) Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1165: 1-18.
- Han, Y. & Park, W.** (2010) The changes of reactive oxygen species and glutathione by MG132, a proteasome inhibitor affect As4.1 juxtaglomerular cell growth and death. *Chemico-Biological Interactions* 184: 319-327.
- Han, Y.H., Bai, Y., Xiao, Y.L., Du, F.Y., Liang, Y., Tan, Z.J., Zhao, M.P. & Liu, H.W.** (2011) Simultaneous discrimination of jasmonic acid stereoisomers by CE-QTOF-MS employing the partial filling technique. *Electrophoresis* 32: 2693-2699.
- Hanly, W.G., Artwohl, J.E., Bennett, B.T.** (1995) Review of polyclonal antibody production in mammals and poultry
- Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M.A.** (2000) DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788-1795.
- Haufe, F.** (2010) Verwundungsreaktion in *A. thaliana* – Analyse von Kern-RNA und Charakterisierung JA-responsiver Elemente. Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 102 S.
- Hause, B. & Schaarschmidt, S.** (2009) The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* 70: 1589-1599.

- Hause, B., Frugier, F. & Crespi, M.** (2006) Immunolocalization. In: *Medicago truncatula Handbook*, U. Mathesius, E.P. Journet & L.W. Summer (Eds.), ISBN 0-9754303-1-9, <http://www.noble.org/medicagohandbook/>.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S. & Strack, D.** (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68: 101-110.
- Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O. & Wasternack, C.** (2003) Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiology* 44: 643-648.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J. & Wasternack, C.** (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *The Plant Journal* 24: 113-126.
- Heil, M., Ibarra-Laclette, E., Adame-Álvarez, R.M., Martínez, O., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. & Herrera-Estrella, L.** (2012) How plants sense wounds: damaged-self recognition is based on plant-derived elicitors and induces octadecanoid signaling. *PLoS ONE* 7: e30537.
- Heussner, A.H., Moeller, I., Day, B.W., Dietrich, D.R. & O'Brien, E.** (2007) Production and characterization of monoclonal antibodies against ochratoxin B. *Food and Chemical Toxicology* 45: 827-833.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. & Korenaga, T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* 27: 297-300.
- Hlavinka, J., Nožková-Hlaváčková, V., Floková, K., Novák, O. & Nauš, J.** (2012) Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient *sitiens* mutants and *sitiens* pre-treated by ABA. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 89-96.
- Hober, S., Nord, K. & Linhult, M.** (2007) Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B* 848: 40-47.
- Howe, G.** (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 223-237.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. & Zimmermann, P.** (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008: 420747.
- Hsiao, T.C.** (1973) Plant responses to water stress. *Plant Physiology* 24: 519-570.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y. & Kerppola, T.K.** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* 9: 789-798.
- Huala, E., Dickerman, A., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, J., Huang, W., Mueller, L., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B., Beavis, B., Somerville, C. & Rhee, S.** (2001) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research* 29: 102-105.
- Huang, X., Hsu, K.-H. & Chu, F.S.** (1996) Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin and neosaxitoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1029-1035.
- Jacinto, T., McGurl, B., Franceschi, V., Delano-Freier, J. & Ryan, C.A.** (1997) Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta* 203: 406-412.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. & Smith, A.E.** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39: 499-509.
- Kaplan, M.H., Coons, A.H. & Deane, H.W.** (1950) Localization of antigen in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. *Journal of Experimental Medicine* 91: 15-30.
- Katsir, L., Chung, H., Koo, A. & Howe, G.** (2008a) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 428-435.

- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y. & Howe, G.A.** (2008b) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7100-7105.
- Kazan, K. & Manners, J.M.** (2013) MYC2: the master in action. *Molecular Plant* 6: 686-703.
- Kepinski, S. & Leyser, O.** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- Kerppola, T.K.** (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 449-456.
- Kerppola, T.K.** (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society Reviews* 38: 2876-2886.
- Khalfan, H., Abuknesha, R., Rand-Weaver, M., Price, R. & Robinson, D.** (1986) Aminomethyl coumarin acetic acid: a new fluorescent labelling agent for proteins. *The Histochemical Journal* 18: 497-499.
- Kiernan, J.A.** (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 00-1: 8-12.
- Kim, S.R., Choi, J.L., Costa, M.A. & An, G.H.** (1992) Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor-II promoter. *Plant Physiology* 99: 627-631.
- Knöfel, H., Brueckner, C., Kramell, R., Sembdner, G. & Schreimer, K.** (1984) A radioimmunoassay for jasmonic acid. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 179: 317-325.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences* 19: 415-421.
- Kondo, S. & Tomiyama, A.** (2000) Changes of endogenous jasmonic acid and methyl jasmonate in apples and sweet cherries during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 282-287.
- Koo, A.J.K., Gao, X.L., Jones, A.D. & Howe, G.A.** (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59: 974-986.
- Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., Brunnström, Å., Göbel, C., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner, I. & Ellerström, M.** (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in *Arabidopsis*: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiology* 145: 1658-1669.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B. & Wasternack, C.** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* 123: 177-188.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brückner, C., Schmidt, J., Sembdner, G. & Parthier, B.** (1995) Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino-acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 29-36.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee J. & Scheel, D.** (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 2256-2264.
- Kuehner, J.N., Pearson, E.L. & Moore, C.** (2011) Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 283-294.
- Kuhlmann, W.D. & Avrameas, S.** (1971) Glucose oxidase as an antigen marker for light and electron microscopic studies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 19: 361-368.
- Kuo, J.** (2007) Processing plant tissues for ultrastructural study. *Methods in Molecular Biology* 369: 35-45.
- Lampugnani, E.R., Kilinc, A. & Smyth, D.R.** (2013) Auxin controls petal initiation in *Arabidopsis*. *Development* 140: 185-194.
- Lang, G.** (2006) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer, Wien, 427 S.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Süel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z. & Chook, Y.M.** (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by Karyopherin β 2. *Cell* 126: 543-558.

- Lee, D.H. & Goldberg, A.L.** (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* 8: 397-403.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. & Rombauts, S.** (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30: 325-327.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G., Bauer, P., Ling, H., Ganai, M. & Howe, G.** (2003) The tomato *Suppressor of prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Cell* 15: 1646-1661.
- Li, C., Schillmiller, A., Liu, G., Lee, G., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J., Yagi, K., Kobayashi, Y. & Howe, G.** (2005) Role of β -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell* 17: 971-986.
- Lifton, R., Goldberg, M., Karp, R. & Hogness, D.** (1978) The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 42: 1047-1051.
- Llewellyn, M.B., Hawkins, R.E. & Russell, S.J.** (1992) Discovery of antibodies. *British Medical Journal* 305: 1269-1272.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. & Solano, R.** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1938-1950.
- Mandel, M. & Higa, A.** (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* 53: 159-162.
- Maraschin, F.D., Memelink, J. & Offringa, R.** (2009) Auxin-induced, SCF^{TIR1}-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant Journal* 59: 100-109.
- Marciel, R.** (1985) Standard curve fitting in immunodiagnosics: a primer. *Journal of Clinical Immunoassay* 8: 98-106.
- Marcotte, W.R.J., Russell, S.H. & Quatrano, R.S.** (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *The Plant Cell* 1: 969-976.
- Mason, H., DeWald, D. & Mullet, J.** (1993) Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter. *The Plant Cell Online* 5: 241-251.
- Maston, G.A., Evans, S.K. & Green, M.R.** (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7: 29-59.
- Matsuura, H., Takeishi, S., Kiatoka, N., Sato, C., Sueda, K., Masuta, C. & Nabeta, K.** (2012) Transportation of *de novo* synthesized jasmonoyl isoleucine in tomato. *Phytochemistry* 83: 25-33.
- Mátyus, L.** (1992) Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 12: 323-337.
- McKay, I.C., Forman, D. & White, R.G.** (1981) A comparison of fluorescein isothiocyanate and lissamine rhodamine (RB 200) as labels for antibody in the fluorescent antibody technique. *Immunology* 43: 591-602.
- McKinney, R.M., Spillane, J.T. & Pearce, G.W.** (1964) Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. *The Journal of Immunology* 93: 232-242.
- McKinney, R.M., Spillane, J.T. & Pearce, G.W.** (1966) A simple method for determining the labeling efficiency of fluorescein isothiocyanate products. *Analytical Biochemistry* 14: 421-428.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P. & Browse, J.** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal* 55: 979-988.
- Memelink, J.** (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70: 1560-1570.

- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W. & Memelink, J.** (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal* **18**: 4455-4463.
- Mersereau, M., Pazour, G.J. & Das, A.** (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* **90**: 149-151.
- Mertens, R., Deusneumann, B. & Weiler, E.W.** (1983) Monoclonal-antibodies for the detection and quantification of the endogenous plant-growth regulator, abscisic acid. *FEBS Letters* **160**: 269-272.
- Mertens, R., Eberle, J., Arnscheidt, A., Ledebur, A. & Weiler, E.W.** (1985) Monoclonal-antibodies to plant-growth regulators. II. Indole-3-acetic-acid. *Planta* **166**: 389-393.
- Micheli, L., Di Stefano, S., Moscone, D., Palleschi, G., Marini, S., Coletta, M., Draisci, R. & delli Quadri, F.** (2002) Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**: 678-684.
- Mielke, K., Forner, S., Kramell, R., Conrad, U. & Hause, B.** (2011) Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and Arabidopsis leaves using jasmonate-specific antibodies. *New Phytologist* **190**: 1069-1080.
- Mielke, S.** (2012) Lokalisation von Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes für JA-IIe in Mesophyll-Protoplasten von *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 51 S.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. & Wasternack, C.** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**: 114-127.
- Misquitta, C., Iyer, V., Werstiuk, E. & Grover, A.** (2001) The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Molecular and Cellular Biochemistry* **224**: 53-67.
- Moffett, J.R., Namboodiri, M.A.A. & Neale, J.H.** (1993) Enhanced carbodiimide fixation for immunohistochemistry - application to the comparative distributions of n-acetylaspartylglutamate and n-acetylaspartate immunoreactivities in rat-brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **41**: 559-570.
- Moore, M.S.** (1998) Ran and nuclear transport. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 22857-22860.
- Moreno, J.E., Shyu, C.S., L. Campos, M.L., Patel, L., Chung, H.S., Yao, J., He, S.H. & A. Howe, G.A.** (2013) Negative feedback control of jasmonate signaling by an alternative splice variant of JAZ10. *Plant Physiology* **162**: 1006-1017.
- Mosblech, A., Feussner, I. & Heilmann, I.** (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 511-517.
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I. & Heilmann, I.** (2011) Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **65**: 949-957.
- Mueller, M.J. & Brodschelm, W.** (1994) Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **218**: 425-435.
- Mueller, M.J. & Berger, S.** (2009) Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* **70**: 1511-1521.
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y. & Yoshida, S.** (2003) Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19*, and *DR5*, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiology* **133**: 1843-1853.

- Nakane, P.K. & Pierce, G.B.** (1966) Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 14: 929-931.
- Narvárez-Vásquez, J. & Ryan, C.A.** (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* 218: 360-369.
- Nishio, S., Moriguchi, R., Ikeda, H., Takahashi, H., Takahashi, H., Fujii, N., Guilfoyle, T., Kanahama, K. & Kanayama, Y.** (2010) Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* 232: 755-764.
- Ohad, N., Shichrur, K. & Yalovsky, S.** (2007) The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiology* 145: 1090-1099.
- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M. & Palme, K.** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100: 2987-2989.
- Page, M. & Thorpe, R.** (2009) Purification of IgG using affinity chromatography on antigen-ligand columns. In: *The Protein Protocols Handbook*, J. Walker (Ed.), Humana Press, New York, ISBN-10-0896033384.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F., Leung, W.-Y. & Haugland, R.P.** (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47: 1179-1188.
- Patton, E.E., Willems, A.R. & Tyers, M.** (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends in Genetics* 14: 236-243.
- Pauwels, L. & Goossens, A.** (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell* 23: 3089-3100.
- Pauwels, L., Inze, D. & Goossens, A.** (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science* 14: 87-91.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A.C., Chico, J.M., Vanden Bossche, R., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J., De Jaeger, G., Solano, R. & Goossens, A.** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464: 788-791.
- Pena, J.T.G., Sohn-Lee, C., Rouhanifard, S.H., Ludwig, J., Hafner, M., Mihailovic, A., Lim, C., Holoch, D., Berninger, P., Zavolan, M. & Tuschl, T.** (2009) miRNA *in situ* hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nature Methods* 6: 139-141.
- Pickering, B.M. & Willis, A.E.** (2004) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 16: 39-47.
- Plewczynski, D. & Ginalski, K.** (2009) The interactome: predicting the protein-protein interactions in cells. *Cellular and Molecular Biology Letters* 14: 1-22
- Porter, R.** (1958) Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature* 182: 670-671.
- Pozo, M., Van Loon, L. & Pieterse, C.** (2005) Jasmonates—signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 211-222.
- Proudfoot, N.J.** (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & Development* 25: 1770-1782.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G. & Lakoucheva, L.M.** (2010) Identification, analysis and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78: 365-380.
- Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G.K. & Iwahashi, H.** (2002) Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 1041-1045.
- Ranish, J.A. & Hahn, S.** (1996) Transcription: basal factors and activation. *Current Opinion in Genetics & Development* 6: 151-158.

- Ransone, L.J.** (1995) Detection of protein-protein interactions by coimmunoprecipitation and dimerization. *Methods in Enzymology* 254: 491-497.
- Rath, S., Stanley, C.M. & Steward, M.W.** (1988) An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. *Journal of Immunological Methods* 106: 245-249.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E.E., Reymond, P. & Poirier, Y.** (2008) Induction of the Arabidopsis *PHO1;H10* gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiology* 147: 696-706.
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W. & Sagen, H.E.** (1930) Studies on infectious hairy-root of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research* 41: 507-540.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J. & Estelle, M.** (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* 12: 198-207.
- Rushton, P., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B. & Somssich, I.** (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *The Plant Cell* 14: 749-762.
- Ryan, C.A.** (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 112-121.
- Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J. & Nelis, S.** (2012) The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist* 196: 13-28.
- Sambrook, J. & Russel, D.W.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 213 S.
- Sandhu, J.S., Webster, C.I. & Gray, J.C.** (1998) A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Molecular Biology* 37: 885-896.
- Saniewski, M., Nowacki, J. & Czapski, J.** (1987) The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *Journal of Plant Physiology* 129: 175-180.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, X., Ohta, H. & Tabata, S.** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research* 8: 153-161.
- Sato, C., Aikawa, K., Sugiyama, S., Nabeta, K., Masuta, C. & Matsuura, H.** (2011) Distal transport of exogenously applied jasmonoyl-isooleucine with wounding stress. *Plant Cell Physiology* 52: 509-517.
- Schillmiller, A. & Howe, G.** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 369-377.
- Schimmel, J.** (2009) Analyse der Interaktion von Proteinen der Jasmonat-Signaltransduktion *in planta* durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 82 S.
- Schlicht, M., Strnad, M., Scanlon, M.J., Mancuso, S., Hochholdinger, F., Palme, K., Volkmann, D., Menzel, D. & Baluska, F.** (2006) Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signaling and Behavior* 1: e1-e12.
- Schraut, D., Ullrich, C.I. & Hartung, W.** (2004) Lateral ABA transport in maize roots (*Zea mays*): visualization by immunolocalization. *Journal of Experimental Botany* 55: 1635-1641.
- Schulman, B., Carrano, A., Jeffrey, P., Bowen, Z., Kinnucan, E., Finnin, M., Elledge, S., Harper, J., Pagano, M. & Pavletich, N.** (2000) Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 408: 381-386.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H.B., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A. & Zheng, N.** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400-405.

- Shen, Q. & Ho, T.H.** (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *The Plant Cell* 7: 295-307.
- Sheng, X., Hu, Z., Lü, H., Wang, X., Baluška, F., Šamaj, J. & Lin, J.** (2006) Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant Physiology* 141: 1578-1590.
- Smale, S.T. & Kadonga, J.T.** (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry* 72: 449-479.
- Sossountzov, L., Sotta, B., Maldiney, R., Sabbagh, I. & Miginiac, E.** (1986) Immunoelectron-microscopy localization of abscisic acid with colloidal gold on Lowicryl-embedded tissues of *Chenopodium polyspermum* L. *Planta* 168: 471-481.
- Sossountzov, L., Maldiney, R., Sotta, B., Sabbagh, I., Habricot, Y., Bonnet, M. & Miginiac, E.** (1988) Immunocytochemical localization of cytokinins in Craigella tomato and a sideshootless mutant. *Planta* 175: 291-304.
- Southwick, P., Ernst, L., Tauriello, E., Parker, S., Mujumdar, R., Mujumdar, S., Clever, H. & Waggoner, A.** (1990) Cyanine dye labeling reagents: carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* 11: 418-430.
- Stelmach, B., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavec, M. & Weiler, E.** (2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 12832-12838.
- 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: 1859-1869.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A. & Wasternack, C.** (2003a) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *The Plant Journal* 33: 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 Molecular Biology* 51: 895-911.
- Stintzi, A. & Browse, J.** (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. & Farmer, E.** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 12837-12842.
- Stork, W., Diezel, C., Halitschke, R., Gális, I. & Baldwin, I.T.** (2009) An ecological analysis of the herbivory-elicited JA burst and its metabolism: plant memory processes and predictions of the moving target model. *PLoS ONE* 4: e4697.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P. & Schaller, A.** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal* 32: 585-601.
- Suárez-Pantaleón, C., Mercader, J.V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A.** (2008) Production and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to forchlorfenuron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11122-11131.
- Suza, W.P., Rowe, M.L., Hamberg, M. & Staswick, P.E.** (2010) A tomato enzyme synthesizes (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* 231: 717-728.

- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y. & Ohta, H.** (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1268-1283.
- Tamogami, S., Rakwal, R. & Agrawal, G.K.** (2008) Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376: 723-727.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C.X., Robinson, C.V., Estelle, M. & Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Taylor, P.E., Spuck, K., Smith, P.M., Sasse, J.M., Yokota, T., Griffiths, P.G. & Cameron, D.W.** (1993) Detection of brassinosteroids in pollen of *Lolium perenne* L. by immunocytochemistry. *Planta* 189: 91-100.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G.H., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. & Browse, J.** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665.
- Thorpe, M.R., Ferrieri, A.P., Herth, M.M. & Ferrieri, R.A.** (2007) ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* 226: 541-551.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. & Steinbiss, H.** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 15: 5890.
- Turner, J., Ellis, C. & Devoto, A.** (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* 14: S153-S164.
- Ueda, J. & Kato, J.** (1980) Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* 66: 246-249.
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J.** (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the betagalactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 24: 339-343.
- Ulmasov, T., Liu, Z.-B., Hagen, G. & Guilfoyle, T.J.** (1995) Composite structure of auxin response elements. *The Plant Cell* 7: 1611-1623.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. & Guilfoyle, T.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.
- van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A. & Stiekema, W.J.** (1995) pBINPLUS – an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* 4: 288-290.
- van Pelt-Verkuil, E. & Emeis, J.J.** (1981) The use of a carbodiimide-containing fixative for the immunohistochemical demonstration of coagulation factor VIII in rat vascular tissue. *Histochemistry* 71: 187-194.
- Venter, M.** (2007) Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in Plant Science* 12: 118-124.
- Ventura, S.** (2011) Bimolecular fluorescence complementation: illuminating cellular protein interactions. *Current Molecular Medicine* 11: 582-598.
- Verdier, J., Dessaint, F., Schneider, C. & Abirached-Darmency, M.** (2013) A combined histology and transcriptome analysis unravels novel questions on *Medicago truncatula* seed coat. *Journal of Experimental Botany* 64: 459-470.
- Vick, B.A. & Zimmerman, D.C.** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 111: 470-477.
- Vick, B.A. & Zimmerman, D.C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* 75: 458-461.
- Vierstra, R.D.** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8: 135-142.

- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* 33: 949-956.
- Vom Endt, D., Silva, M.S., Kijne, J.W., Pasquali, G. & Memelink, J.** (2007) Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* *ORCA₃* transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins. *Plant Physiology* 144: 1680-1689.
- von Dahl, C.C. & Baldwin, I.T.** (2004) Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*. *Physiologia Plantarum* 120: 474-481.
- Wager, A. & Browse, J.** (2012) Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science* 3: 41.
- Wagstaff, K.M. & Jans, D.A.** (2009) Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* 10: 1188-1198.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. & Kudla, J.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40: 428-438.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. & Wang, X.** (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 2237-2246.
- Wang, L., Halitschke, R., Kang, J.-H., Berg, A., Harnisch, F. & Baldwin, I.T.** (2007) Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta* 226: 159-167.
- Wasternack, C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697.
- Wasternack, C. & Hause, B.** (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165-221.
- Wasternack, C. & Kombrink, E.** (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* 5: 63-77.
- Wasternack, C. & Hause, B.** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111: 1021-1058.
- 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. *Journal of Plant Physiology* 163: 297-306.
- Weiler, E.W.** (1980) Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148: 262-272.
- Weiler, E.W.** (1981) Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable [¹²⁵I]- and [³H]IAA derivatives as radiotracers. *Planta* 153: 319-325.
- Weiler, E.W.** (1982) An enzyme-immunoassay for *cis*-(+)-abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 54: 510-514.
- Werblin, T.P., Kim, Y.T., Quagliata, E. & Siskind, G.W.** (1973) Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology* 24: 477-492.
- Wikgren, M.C. & Reuter, M.** (1985) Neuropeptides in a microturbellarian – whole mount immunocytochemistry. *Peptides* 6: 471-475.
- Wilbert, S.M., Ericsson, L.H. & Gordon, M.P.** (1998) Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 257: 186-194.
- Williams, M., Foster, R. & Chua, N.** (1992) Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *The Plant Cell* 4: 485-496.

- Withers, J., Yao, J., Mecey, C., Howe, G., Melotto, M. & He, S. (2012) Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 20148-20153.
- Wu, J., Wang, L. & Baldwin, I.T. (2008) Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta* 227: 1161-1168.
- Wydro, M., Kozubek, E. & Lehmann, P. (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* 53: 289-298.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. & Turner, J.G. (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094.
- Xu, B.F. & Timko, M.P. (2004) Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine N-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. *Plant Molecular Biology* 55: 743-761.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W., Ma, H., Peng, W., Huang, D. & Xie, D. (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 1919-1935.
- Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S., Bhatia, S. & Chattopadhyay, S. (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* 17: 1953-1966.
- Yamane, H., Sugawara, J., Suzuki, Y., Shimamura, E. & Takahashi, N. (1980) Synthesis of jasmonic acid related compounds and their structure-activity relationship on the growth of rice seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry* 44: 2857-2864.
- Yamane, H., Takagi, H., Abe, H., Yokota, T. & Takahashi, N. (1981) Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiology* 22: 689-697.
- Yan, J., Li, H., Li, S., Yao, R., Deng, H., Xie, Q. & Xie, D. (2013) The *Arabidopsis* F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 is stabilized by SCF^{COI1} and degraded via the 26S proteasome pathway. *The Plant Cell* 25: 486-498.
- Yan, J.B., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z.Y., Zhang, W.G., Qi, T.C., Cheng, Z.W., Peng, W., Luo, H.B., Nan, F.J., Wang, Z. & Xie, D.X. (2009) The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant Cell* 21: 2220-2236.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. & Farmer, E. (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* 19: 2470-2483.
- Yanagawa, Y., Hasezawa, S., Kumagai, F., Oka, M., Fujimuro, M., Naito, T., Makino, T., Yokosawa, H., Tanaka, K., Komamine, A., Hashimoto, J., Sato, T. & Nakagawa, H. (2002) Cell-cycle dependent dynamic change of 26S proteasome distribution in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 43: 604-613.
- Yokota, T., Watanabe, S., Ogino, Y., Yamaguchi, I. & Takahashi, N. (1990) Radioimmunoassay for brassinosteroids and its use for comparative analysis of brassinosteroids in stems and seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 151-159.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. & Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565-1572.
- Yoshihara, T., Omer, E.A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y. & Koda, Y. (1989) Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 2835-2837.
- Zavala, M.E. & Brandon, D.L. (1983) Localization of a phytohormone using immunocytochemistry. *Journal of Cell Biology* 97: 1235-1239.
- Zhang, C., Gong, F.C., Lambert, G.M. & Galbraith, D.W. (2005) Cell type-specific characterization of nuclear DNA contents within complex tissues and organs. *Plant Methods* 1: 7.

- Zhu, L., Chen, M. & Liu, X.** (2011) Changes in phytohormones and fatty acids in wheat and rice seedlings in response to Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) infestation. *Journal of Economic Entomology* *104*: 1384-1392.
- Zimmermann, P., Hoffmann, M.H., Hennig, L. & Griessem, W.** (2004) Genevestigator. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* *136*: 2621-2632.

8. ANHANG

8.1 Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit genutzten synthetischen Oligo- und Polynukleotide

In den folgenden Tabellen sind alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligo- und Polynukleotide sowie deren Verwendungszweck zusammengefasst. Tab. 8.1 enthält eine Auflistung aller genutzten PCR-Primer. Alle weiteren Nukleotide sind der Tab. 8.2 zu entnehmen. Die Synthese aller Nukleotide erfolgte durch Eurofins MWG Operon.

Tab. 8.1: Auflistung aller PCR-Primer und deren Verwendungszweck.

Die Nukleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer sind in 5' → 3' Richtung dargestellt. Die bei einigen Primern angefügten *Gateway*-Überhänge sind durch einfaches Unterstreichen markiert. REN-Schnittstellen sind gelb hervorgehoben.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendung
AOC2P_fw	CAGTAG <u>GT</u> CGACAATAAAAATTAGTCTTATCTTTCTC	71	fw PCR-Primer für Klonierung des AOC2P gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D1_fw	CAGTAG <u>GT</u> CGACCTAGGAAGATTATAAGG	64	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D1 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D2_fw	ATACAG <u>GT</u> CGACGAATATTTAGAAGTCAAGTC	64	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D2 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D3_fw	AATAAG <u>GT</u> CGACACTTCGAACCCAACACCTCTA	67	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D3 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D4_fw	AATAAG <u>GT</u> CGACAAAGCTTGGTCTAAGCTATC	64	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D4 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D5_fw	ATCAA <u>GT</u> CGACCAGTGTTCATCCTTTAAG	64	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D5 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D6_fw	TAAAG <u>TC</u> GACAAGCTTGCCTTATCCGTTTATG	66	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D6 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D7_fw	AAGCA <u>GT</u> CGACTCAATTTTACATACATGTATC	63	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D7 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D8_fw	ATAAT <u>GT</u> CGACAATCCAAGACCAATGCTTAG	66	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D8 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D9_fw	TATAAG <u>GT</u> CGACGTAATTTACGCACGTGCTACT	66	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D9 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D10_fw	ACATA <u>GT</u> CGACGAGATATTTTCGTAGAACT	62	fw PCR-Primer für Klonierung der 2P-D10 gelb = <i>Sall</i> -Schnittstelle
2P-D_rev	ATAAA <u>CAATTG</u> CCCCGCTTTCTTTGTAAGC	64	rv PCR-Primer für Klonierung der zehn Deletionsfragmente des AOC2P gelb = <i>MunI</i> -Schnittstelle
AOC3P_fw	TTATT <u>AAGCTT</u> GTTTTAAGTCGTTTGGACGTTGGTACAC	68	fw PCR-Primer für Klonierung des AOC3P gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D1_fw	ACGATA <u>AAGCTT</u> TATGAGTCTTCATCGAATAC	62	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D1 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D2_fw	AATTG <u>AAGCTT</u> AGTTACCAATCGTAGCCTATGAC	66	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D2 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D3_fw	ACGAC <u>AAGCTT</u> AGATCAAGAATTAACTCATAC	63	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D3 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D4_fw	AATCT <u>AAGCTT</u> CCATGCAATCAAGAATGTTGGAGTC	67	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D4 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D5_fw	ACGAT <u>AAGCTT</u> GTGATTGTAGTGTATTATGTG	65	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D5 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D6_fw	AATGT <u>AAGCTT</u> AAGACCTGCAGGCTACGTTTATATC	67	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D6 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D7_fw	ACGATA <u>AAGCTT</u> TCTCTAGCTAACGTTTTAGAC	66	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D7 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-D8_fw	AATCG <u>AAGCTT</u> ACTTCATCATCGTCCAATATAAATAG	65	fw PCR-Primer für Klonierung der 3P-D8 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle

(Fortsetzung Tab. 8.1: Auflistung aller PCR-Primer und deren Verwendungszweck.)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendung
3P-D_rev	TATCTCCATGGCATAGAGATGGATTCAAGAGACATAG	68	rv PCR-Primer für Klonierung der acht Deletionsfragmente des <i>AOC3P</i> gelb = <i>NcoI</i> -Schnittstelle
3P-Int1_fw	AGCATAAGCTTAGTATGTTCCATTACTTTG	63	fw PCR-Primer für Klonierung der Internen Deletionen 3P-Int1 und 3P-Int2 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-Int3_fw	AGCATAAGCTTATACATAAAATTCCTAGCTAAC	63	fw PCR-Primer für Klonierung der Internen Deletion 3P-Int3 gelb = <i>HindIII</i> -Schnittstelle
3P-Int1_rev	AGTTATCTAGAGATGAAGTAACACGTGCGTATATG	67	rev PCR-Primer für Klonierung der Internen Deletionen 3P-Int1 und 3P-Int3 gelb = <i>XbaI</i> -Schnittstelle
3P-Int2_rev	AAGTTTCTAGATCAAAAGATGCTTTGTGTAGTTTC	64	rev PCR-Primer für Klonierung der Internen Deletion 3P-Int2 gelb = <i>XbaI</i> -Schnittstelle
<i>COI1</i> _fw	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcgATGGAGGATCCTGATATCAAGAGGTG	77	fw PCR-Primer für Klonierung von <i>COI1</i> ATG = Start-Codon
<i>COI1</i> _rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTATTGGCTCCTTCAGGACTCT	77	rev PCR-Primer für Klonierung von <i>COI1</i> und <i>COI1Δ1-55</i>
<i>COI1Δ1-55</i> _fw	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcgATGACTATGGCGCTTTGCTACTACT	75	fw PCR-Primer für Klonierung von <i>COI1Δ1-55</i> ATG = Start-Codon
<i>JAZ1</i> _fw	caccATGTCGAGTTCTATGGAATGTTCTG	65	fw PCR-Primer für Klonierung von <i>JAZ1</i> ATG = Start-Codon
<i>JAZ1</i> _rev	TATTCAGCTGCTAAACCGAGCCACGA	65	rev PCR-Primer für Klonierung von <i>JAZ1</i>
pBT10-GW_fw	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcgGAGCTCAGTGAGCTGATACCGCTCG	63	fw_PCR-Primer für Fusion der Multimere (außer 4xG-AOC3) mit <i>HTA6:GFP</i> ; aus pBT10-Vektorsequenz abgeleitet gelb = <i>SacI</i> -Schnittstelle
pGEM-GW_fw	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcgGAGCTCTGGAGCTCTCCCATATGGTC	64	fw_PCR-Primer für Fusion 4xG-AOC3 mit <i>HTA6:GFP</i> ; aus pGEM-T Easy-Vektorsequenz abgeleitet gelb = <i>SacI</i> -Schnittstelle
pGW_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGGTGCCACTCGAGCGTG	67	rev_PCR-Primer für Fusion der Multimere mit <i>HTA6:GFP</i> ; aus 35S MP-Sequenz abgeleitet

Tab. 8.2: Auflistung aller weiteren im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligo- und Polynukleotide.

Alle Nukleotidsequenzen sind in 5' → 3' Richtung dargestellt. Die bei einigen Nukleotiden eingefügten Gateway-Überhänge sind durch einfaches Unterstreichen markiert. Der Verwendungszweck der Nukleotide ist in der letzten Spalte erläutert. Besondere Eigenschaften, wie eingefügte Gateway-Überhänge, REN-Schnittstellen, Startcodons oder *cis*-Elemente sind farbig und/oder durch Unterstreichen in der Nukleotidsequenz markiert und in der rechten Spalte erläutert.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Eigenschaften/Anmerkungen
1xG-AOC3_fw	AATGATACTAGTTACG <u>CACGTG</u> TTACTCTAGACCTTAA	Monomer der G-Box aus dem <i>AOC3</i> -Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = <i>SpeI/XbaI</i> -Schnittstellen
1xG-AOC3_rev	TTAAGGTCTAGAGTAA <u>CACGTG</u> CGTAACTAGTATCAAT	Monomer der G-Box aus dem <i>AOC3</i> -Promotor; rev-Strang rot = G-Box gelb = <i>SpeI/XbaI</i> -Schnittstellen
2xG-AOC3_fw	AATGATACTAGTTACG <u>CACGTG</u> TTACTACG <u>CACGTG</u> TTACTCTAGACCTTAA	Dimer der G-Box aus dem <i>AOC3</i> -Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = <i>SpeI/XbaI</i> -Schnittstellen
2xG-AOC3_rev	TTAAGGTCTAGAGTAA <u>CACGTG</u> CGTAGTAA <u>CACGTG</u> CGTAACTAGTATCATT	Dimer der G-Box aus dem <i>AOC3</i> -Promotor; rev-Strang rot = G-Box gelb = <i>SpeI/XbaI</i> -Schnittstellen

(Fortsetzung Tab. 8.2: Auflistung aller weiteren im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligo- und Polynukleotide.)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Eigenschaften/Anmerkungen
4xG-AOC3_fw	AATGATACTAGTTACGCACGTGTTACTACGCACGTG TTACTCTAGTTACGCACGTGTTACTACGCACGTGTT ACTCTAGACCTTAA	Tetramer der G-Box aus dem AOC3-Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = SpeI/XbaI-Schnittstellen
4xG-AOC3_rev	TTAAGGTCTAGAGTAAACACGTGCGTAGTAAACACGTG CGTAACTAGAGTAAACACGTGCGTAGTAAACACGTGCCG TAACTAGTATCATT	Tetramer der G-Box aus dem AOC3-Promotor; rev-Strang rot = G-Box gelb = SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-AOC2_fw	GACTAAAGCTTACTAGTTTTACGCACGTGCTACTTTT TTACGCACGTGCTACTTTTTACGCACGTGCTACTTTT TTACGCACGTGCTACTTTTTACGCACGTGCTACTTTT CTAGATAGACa	Pentamer der G-Box aus dem AOC2-Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-AOC2_rev	GTCTATCTAGAAAGTAGACACGTGCGTAAAAAGTAGC ACGTGCGTAAAAAGTAGACACGTGCGTAAAAAGTAGC ACGTGCGTAAAAAGTAGACACGTGCGTAAAAAGTAGTA AGCTTTAGTCa	Pentamer der G-Box aus dem AOC2-Promotor; rev-Strang rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xT/G-AOC2_fw	GCGCCAAGCTTACTAGTTTAGATCACGTTCCGACCT TAGATCACGTTCCGACCTTAGATCACGTTCCGACCT TAGATCACGTTCCGACCTTAGATCACGTTCCGACCT CTAGACGTTGa	Pentamer der G-Box aus dem AOC2-Promotor; fw-Strang grün = T/G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xT/G-AOC2_rev	CAACGTCTAGAGGTTCGGAACGTGATCTAAGGTCGGA ACGTGATCTAAGGTCGGAACGTGATCTAAGGTCGGA ACGTGATCTAAGGTCGGAACGTGATCTAAGGTCGGA AGCTTGGCGCa	Pentamer der T/G-Box aus dem AOC2-Promotor; rev-Strang grün = T/G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
K-GT_fw	GCGCCAAGCTTACTAGTTTAGATCACGTTCCGACCT TTACGCACGTGCTACCTTAGATCACGTTCCGACCT TTACGCACGTGCTACCTTAGATCACGTTCCGACCTCa	Tetramer bestehend aus einer Kombination der G-Box und T/G-Box aus dem AOC2-Promotor; cis-Elemente hierbei im Wechsel angeordnet; fw-Strang (Synthese: Eurofins MWG Operon) rot = G-Box grün = T/G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
K-GT_rev	GAACGTCTAGAAAGTAGACACGTGCGTAAAGGTCGGA ACGTGATCTAAGGTCGGAACGTGCGTAAAGGTCGGA ACGTGATCTAAGGTCGGAACGTGCGTAAAGGTCGGA AGCTTGGCGCa	Tetramer bestehend aus einer Kombination der G-Box und T/G-Box aus dem AOC2-Promotor; cis-Elemente hierbei im Wechsel angeordnet; rev-Strang (Synthese: Eurofins MWG Operon) a = A-Überhang für „A-T“-Klonierung rot = G-Box grün = T/G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-JAZ2_fw	GCGCCAAGCTTACTAGTTATAAAACACGTGTTTTATA TAAAAACACGTGTTTTATATAAAACACGTGTTTTATA TAAAAACACGTGTTTTATATAAAACACGTGTTTTATA CTAGACGTTGa	Pentamer der G-Box aus dem JAZ2-Promotor; fw-Strang (Syntheseauftrag konnte nicht ausgeführt werden) rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-JAZ2_rev	CAACGTCTAGAAATAAAACACGTGTTTTATATAAAAC ACGTGTTTTATATAAAACACGTGTTTTATATAAAAC ACGTGTTTTATATAAAACACGTGTTTTATATAAAAC AGCTTGGCGCa	Pentamer der G-Box aus dem JAZ2-Promotor; rev-Strang (Syntheseauftrag konnte nicht ausgeführt werden) a = A-Überhang für „A-T“-Klonierung rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-JAZ7_fw	GACTAAAGCTTACTAGTTATTCCACGTGGATTTAA TTTCCACGTGGATTTAATTCCACGTGGATTTAA TTTCCACGTGGATTTAATTCCACGTGGATTTAA CTAGACGTTGa	Pentamer der G-Box aus dem JAZ8-Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen

(Fortsetzung Tab. 8.2: Auflistung aller weiteren im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligo- und Polynukleotide.)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Eigenschaften/Anmerkungen
5xG-JAZ7_rev	CAACG TCTAGA TAAATC CACGTG GGAAATTAAATC C ACGTG GGAAATTAAATC CACGTG GGAAATTAAATC C ACGTG GGAAATTAAATC CACGTG GGAAAT ACTAGTA AGCTT TAGTCa	Pentamer der G-Box aus dem JAZ8-Promotor; rev-Strang rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-JAZ8_fw	GACTAA AGCTTACTAGT ATT TTC CACGTG GAGAGAAA TTT TTC CACGTG GAGAGAAAATT TTC CACGTG GAGAGAAA TTT TTC CACGTG GAGAGAAAATT TTC CACGTG GAGAGAA T CTAGA CGTTG a	Pentamer der G-Box aus dem JAZ7-Promotor; fw-Strang rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
5xG-JAZ8_rev	CAACG TCTAGA TTCTCT CACGTG GGAAATTTCTCT C ACGTG GGAAATTTCTCT CACGTG GGAAATTTCTCT C ACGTG GGAAATTTCTCT CACGTG GGAAAT ACTAGTA AGCTT TAGTCa	Pentamer der G-Box aus dem JAZ7-Promotor; rev-Strang a = A-Überhang für „A-T“-Klonierung rot = G-Box gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
TS_4x(AT+G)-AOC3	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcg AAGCT TGAGCTC tctcgtagtactcaataaatattacacgg tt TACGCACGTGTTAC tctcgtagtactcaataaat attacacggtt TACGCACGTGTTAC tctcgtagtac tcaataaatattacacggtt TACGCACGTGTTAC tc tctcgtagtactcaataaatattacacggtt TACGCAC GTGTTACTCTAGA GTTCGACCCGAAGACCC TTCTCT ATATAAGGAAGTT CATTTCATTTCGAGAGGACACGC TCGAGTGGCCACC gaccagctttcttgtacaaagt gggtcccc	Tetramer aus dem AT-reichen Element und der G-Box des AOC3-Promotors fusioniert mit dem 35S MP (Synthese/Subklonierung in pCR2.1) rot = G-Box + 4 bp der flankierenden Sequenzen grau = AT-reiches Element + flankierenden Sequenzen schwarz = 35S MP gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
TS_2xAT-AOC3	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcg AAGCT TGAGCTC tctcgtagtactcaataaatattacacgg tttctcgtagtactcaataaatattacacggtt TCT AGA GTTCGACCCGAAGACCC TTCTCT ATATAAGGAA GTTTCATTTCATTTCGAGAGGACACGCTCGAGTGGCC ACC gaccagctttcttgtacaaagtgggtcccc	Dimer des AT-reichen Elements aus dem AOC3-Promotor fusioniert mit dem 35S MP (Synthese/Subklonierung in pEX-A) grau = AT-reiches Element + flankierenden Sequenzen schwarz = 35S MP gelb = HindIII/SpeI/XbaI-Schnittstellen
TS_JAZ1-Degron	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctcg ATGGA ACTTCTAT TGCTAGAAGAGCTT CACCTCACC GGTT CTTGGAGAAGAGAAAGGACAGAGTT ACGTC AAAGGC ACCATA CCAATTATGCGATgaccagctttcttgtac caaagtgggtcccc	JAZ1-Degron (Synthese/Subklonierung in pCR2.1) ATG = Start-Codon gelb = Sequenz des JAZ1-Degrons grau = Sequenz des Linkers
TS_COI1 _{E22V}	GGATCC TGATATCAAGAGGTGTAAT TGAGCT GCCT CGCGACGGTTGATGATGTCATC GTC CAAGTCATGAC CTATATAACTGACCCGAAAGATCGCGATT TCGGCTTC TTTGGTGTGTCGGAGATGGTCAAGATTGATTCCGAG ACGAGAGAGCATGTGACTATGGCGCTTTGCTACACT GCGACGCCTGATCGTCTTAGCCGTCGATTCCCGAAC TTGAGGTCGCTC AAGCTT	mutierte Teilsequenz von COI1 (Synthese/Subklonierung in pEX-A) gelb = BamHI/HindIII-Schnittstellen GTC = für V kodierendes Triplett (native CDS enthält GAG)
TS_JAZ1 _{K85/105/110/119R}	ATGGATT CCATGG TTCAAGATGTT AGG CCGACGAAT CTGTT TCT AGGCAACCAAGCTTT TCT CCTCATCT TCTCTCTTCCA AGC GAAGATGTT TG AG AGC ATGACA CAGACTACCAGATCTGTG AGC CCAGAGTCTCAA ACT GCACCAT TGACT TAT TCT ACGCCGGGCAAGT GATT GTAT TCAAT GACTTT TCT GTGAGAAAGCCAAAGAA TGATCA ACT TGGCG	mutierte Teilsequenz von JAZ1 (Synthese/Subklonierung in pEX-A) gelb = NcoI/BclIII-Schnittstellen rot = für R kodierende Triplets (native CDS enthält AAA bzw. AAG)

8.2 Auflistung aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Vektoren

In Tabelle 8.3 findet sich eine alphabetische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit genutzten Vektoren, sowie Angaben zu deren Eigenschaften.

Tab. 8.3: Auflistung der verwendeten Vektoren.

Amp = Ampicillin; Km = Kanamycin; Cm = Chloramphenicol; Hygro = Hygromycin; R = Resistenzmarker; CaMV 35S = *Cauliflower Mosaic Virus* 35S-Promotor; 35S MP = -46/+8 CaMV 35S-Minimalpromotor.

Bezeichnung	R	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Konventionelle Vektoren			
pBINPLUS	Km ^r	binärer <i>low copy</i> -Vektor, genutzt für stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> und Infiltrationsexperimente mit Blättern von <i>N. benthamiana</i>	van Engelen <i>et al.</i> (1995)
pBT10:35S MP:GUS	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält <i>GUS</i> -Gen unter der Kontrolle des 35S MP	Z. Hossain (IPB Halle)
pBT10:4xJERE:GUS	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält <i>GUS</i> -Gen unter der Kontrolle des Tetramer des JERE-Elements fusioniert mit dem 35S MP	Rushton <i>et al.</i> (2002)
pGEM-T Easy	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor zur „A-T“-Klonierung von PCR-Produkten und Oligonukleotiden	Promega GmbH
pRT100:LUC ⁺	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält das <i>LUC</i> -Gen unter Kontrolle des CaMV 35S	Töpfer <i>et al.</i> (1987)
Gateway-Vektoren			
pDONR221	Km ^r , Cm ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält das <i>ccdB</i> -Gen, Eingangsvektor für alle mit Gateway-System klonierten Konstrukte (außer <i>JAZ1</i>)	Invitrogen
pENSG:CFP	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält das <i>CFP</i> -Gen	G. Bethke (IPB Halle)
pENTR/SD/S/TOPO	Km ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält <i>attB</i> -Stellen wurde für Klonierung von <i>JAZ1</i> als Eingangsvektor benötigt	Invitrogen
pENSG:YFP	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur N-terminalen Fusion mit <i>YFP</i> -Gen	G. Bethke (IPB Halle)
pEXSG:YFP	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur C-terminalen Fusion mit <i>YFP</i> -Gen	G. Bethke (IPB Halle)
pUC-SPYCE	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur C-terminalen Fusion mit C-terminaler Hälfte des <i>YFP</i> -Gens	Walter <i>et al.</i> (2004)
pUC-SPYNE	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur C-terminalen Fusion mit N-terminaler Hälfte des <i>YFP</i> -Gens	Walter <i>et al.</i> (2004)
pE-SPYCE	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur N-terminalen Fusion mit C-terminaler Hälfte des <i>YFP</i> -Gens	Walter <i>et al.</i> (2004)
pE-SPYNE	Amp ^r	<i>high copy</i> -Vektor, enthält CaMV 35S, zur N-terminalen Fusion mit N-terminaler Hälfte des <i>YFP</i> -Gens	Walter <i>et al.</i> (2004)
pCGTAG:35S:HTA6:GFP	Km ^r ,	binärer Vektor, enthält CaMV 35S, das <i>HTA6</i> - und <i>GFP</i> -Gen	Zhang <i>et al.</i> (2005)

8.3 Vollständige CDS von *JAZ1* und *CO1* und Darstellung der im Rahmen der Arbeit erzeugten Varianten der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes

In Abb. 8.1 und 8.2 sind die vollständigen CDS von *JAZ1* und *CO1* aus *A. thaliana* dargestellt. Diese wurden der Arabidopsis-Datenbank TAIR entnommen (TAIR-Code: AT1G19180 bzw. AT2G39940) und dienen als Matrize zur Ableitung genspezifischer Primer für die Erzeugung und Amplifikation der nativen Gesamtlängenkonstrukte. Neben den nativen Gensequenzen von *CO1* und *JAZ1* wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Varianten der Komponenten des Co-Rezeptorkomplexes kloniert. Die für *CO1* und *JAZ1* erzeugten Varianten und die für deren Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen sind in den nachfolgenden beiden Abbildungen farbig gekennzeichnet.

<p>1 ATGTCGAGTT CTATGGAATG TTCTGAGTTC GTCGGTAGCC GGAGATTTAC</p> <p>51 TGGGAAGAAG CCTAGCTTCT CACAGACGTG TAGTCGATTG AGTCAGTATC</p> <p>101 TAAAAGAGAA CGGTAGCTTT GGAGATCTGA GCTTAGGAAT GGATGCAAG</p> <p>151 CCTGATGTCA ATGGAACCTT AGGCAACTCA CGTCAGCCGA CAACAACCAT</p> <p>201 GAGTTTATTC CCTTGTGAAG CTTCTAACAT GGATTCCATG GTTCAAGATG</p> <p>251 TTAAACCGAC GAATCTGTTT CCTAGGCAAC CAAGCTTTTC TTCTCATCT</p> <p>301 TCCTCTCTTC CAAGCGAAGA TGTTTGAAA ATGACACAGA CTACCAGATC</p> <p>351 TGTGAAACCA GAGTCTCAAA CTGCACCATT GACTATATTC TACGCCGGGC</p> <p>401 AAGTGATTGT ATTCAATGAC TTTTCTGCTG AGAAAGCCAA AGAAGTGATC</p> <p>451 AACTTGCGA GCAAAGGCAC CGCTAATAGC TTAGCCAAGA ATCAAACCGA</p> <p>501 TATCAGAAGC AACATCGCTA CTATCGCAA CCAAGTTCCT CATCCAAGAA</p> <p>551 AAACCACAAC ACAAGAGCCA ATCCAATCCT CCCCAACACC ATTGACABAA</p> <p>601 CTTCTATTG CTAGAAGAGC TTCACTTAC CGTTCTTGG AGAAGAGAAA</p> <p>651 GGACAGAGTT ACGTCAAAGG CACCATACCA ATTATGCGAT CCAGCCAAAG</p> <p>701 CGTCTTCAAA CCCTCAAACC ACAGGCAACA TGTCTGGCT CGGTTTAGCA</p> <p>751 GCTGAAATAT GA</p>	<p>AAA/G potentielle Ubiquitinierungsstellen (Triplets für Lysine kodierend)</p> <p> JAZ1-Degron (E₂₀₀ bis V₂₂₀)</p> <p> Linker-Peptid (T₂₂₁ bis D₂₃₀)</p> <p> REN-Schnittstellen, über die <i>JAZ1_{4xR}</i> erzeugt wurde</p>
--	--

Abb. 8.1: Vollständige CDS von *JAZ1*.

In rot hervorgehoben sind die Triplets, die für die als potentielle Ubiquitinierungsstellen identifizierten Lysine kodieren. Diese wurden in der mutierten Variante *JAZ1_{4xR}* gegen Arginin-kodierende Triplets (AGG) ausgetauscht. Die Klonierung von *JAZ1_{K85/105/110/119R}* erfolgte mit Hilfe der gelb markierten REN-Schnittstellen. In grün ist der für das Degron-Peptid kodierende Bereich unterlegt. Grau gekennzeichnet ist der als Linker verwendete Teilabschnitt von *JAZ1*.

BamHI

1 ATGGA**GGATC** CTGATATCAA GAGGTGTAAG TTAGAGCTGCG TCGCGACGGT

51 TGATGATGTC ATCG**GAG**CAAG TCATGACCTA TATAACTGAC CCGAAAGATC

101 GCGATTCGGC TTCCTTTGGTG TGTCGGAGAT GGTTCGAAGT TGATTCCGAG

151 ACGAGAGAGC ATGTG**ACT**AT GGCCTTTTGC TACACTGCGA CGCCTGATCG

201 TCTTAGCCGT CGATTCCCGA ACTTGAGGTC GCTC**AAGCTT** AAAGGCAAGC

251 CTAGAGCAGC TATGTTTAACT CTGATCCCTG AGAACTGGGG AGGTTATGTT

301 ACTCCTTGGG TTAGCTGAGAT TTCTAACAACT CTTAGGCAGC TCAAATCGGT

351 GCACTTCCGA CGGATGATG TCAGTGACTT AGATCTAGAT CGTTTAGCTA

401 AAGCTAGAGC AGATGATCTT GAGACTTTGA AGCTAGACAA GTGTTCTGGT

451 TTTACTACTG ATGGACTTTT GAGCATCGTT ACACACTGCA GGAAAATAAA

501 AACTTTGTTA ATGGAAGAGA GTTCTTTTAG TGAAAAGGAT GGTAAGTGGC

551 TTCATGAGCT TGCTCAGCAC AACACATCTC TTGAGGTTTT AACTTCTAC

601 ATGACGGAGT TTGCCAAAAT CAGTCCCAA GACTTGAAA CCATAGCTAG

651 AAATTGCCGC TCTCTGGTAT CTGTGAAGGT CGGTGACTTT GAGATTTTGG

701 AACTAGTTGG GTTCTTTAAG GCTGCAGCTA ATCTTGAAGA ATTTTGTGGT

751 GGCTCCTTGA ATGAGGATAT TGGAATGCCT GAGAAGTACA TGAATCTGGT

801 TTTTCCCGA AAACATATGTC GGCTTGGTCT CTCTTACATG GGACCTAATG

851 AAATGCCAAT ACTATTTCCA TTCGCGGCC AAATCCGAAA GCTGGATTTG

901 CTTTATGCAT TGCTAGAAAC TGAAGACCAT TGTACGCTTA TCCAAAAGTG

951 TCCTAATTTG GAAGTTCTCG AGACAAGGAA TGTAATCGGA GATAGGGGTC

1001 TAGAGGTCTT TGCACAGTAC TGTAAGCAGT TGAAGCGGCT GAGGATTGAA

1051 CCGCGTGACG ATGAACAAGG AATGGAGGAC GAAGAAGGCT TAGTCTCACA

1101 AAGAGGATTA ATCGCTTTGG CTCAGGGCTG CCAGGAGCTA GAATACATGG

1151 CGGTGTATGT CTCAGATATA ACTAACGAAT CTCTTGAAAG CATAGGCACA

1201 TATCTGAAA ACCTCTGTGA CTTCCGCCTT GTCTTACTCG ACCGGGAAGA

1251 AAGGATTACA GATCTGCCAC TGGACAACGG AGTCCGATCT CTTTTGATTG

1301 GATGCAAGAA ACTCAGACGA TTTGCATTCT ATCTGAGACA AGGCGGCTTA

1351 ACCGACTTGG GCTTAAGCTA CATCGGACAG TACAGTCCAA ACGTGAGATG

1401 GATGCTGCTG GGTACGTAG GTGAATCAGA TGAAGGTTTA ATGGAATTCT

1451 CAAGAGGCTG TCCAAATCTA CAGAAGCTAG AGATGAGAGG TTGTTGCTTC

1501 AGTGAGCGAG CAATCGCTGC AGCGGTTACA AAATGCCTT CACTGAGATA

1551 CTTGTGGGTA CAAGGTTACA GAGCATCGAT GACGGGACAA GATCTAATGC

1601 AGATGGCTAG ACCGTAAGTGG AACATCGAGC TGATTCCATC AAGAAGAGTC

1651 CCGGAAGTGA ATCAACAAGG AGAGATAAGA GAGATGGAGC ATCCGGCTCA

1701 TATATTGGCT TACTACTCTC TGGCTGGCCA GAGAACAGAT TGTTCAACAA

1751 CTGTTAGAGT CCTGAAGGAG CCAATATGA

ACT Tripletts, das für AS 56 kodiert (Beginn von COI1Δ1-55)

GAG Tripletts, das für E₂₂ kodiert; in der Punktmutante COI1_{E22V} gegen das Tripletts GTC (für V kodierend) ausgetauscht

REN-Schnittstelle, die für die Erzeugung von COI1_{E22V} verwendet wurde

Abb. 8.2: Vollständige CDS von COI1.

Rot markiert ist das Tripletts, das für die 56 AS im COI1-Protein kodiert. Ab diesem wurde der spezifische Primer zur Generierung der um die F-Box-Domäne verkürzten Mutante COI1Δ1-55 abgeleitet. Das grün hervorgehobene Tripletts kodiert für die AS E₂₂. Zur Erzeugung der Punktmutante COI1_{E22V} wurde dieses gegen das Tripletts GTC (für V kodierend) ausgetauscht. Die gelb gekennzeichnete REN-Schnittstelle wurde für die Erzeugung dieser Punktmutante verwendet.

8.4 Berechnung der wahrscheinlichen Ubiquitinierungsstellen mit CKSAAP_UBSITE und UbPred

Die Berechnung der wahrscheinlichen Ubiquitinierungsstellen von JAZ1 erfolgte auf Basis der Proteinsequenz unter Anwendung der Bioinformatik-Tools CKSAAP_UbSite und UbPred. Wie der Abb. 8.3 zu entnehmen ist, wurde ermittelt, dass die Ubiquitin-Einheiten vom SCF-Komplex wahrscheinlich auf das Lysin K85, K105, K110 oder K119 übertragen werden. Diese AS liegen oberhalb der 20 AS umfassenden JAZ1-Degron Sequenz.

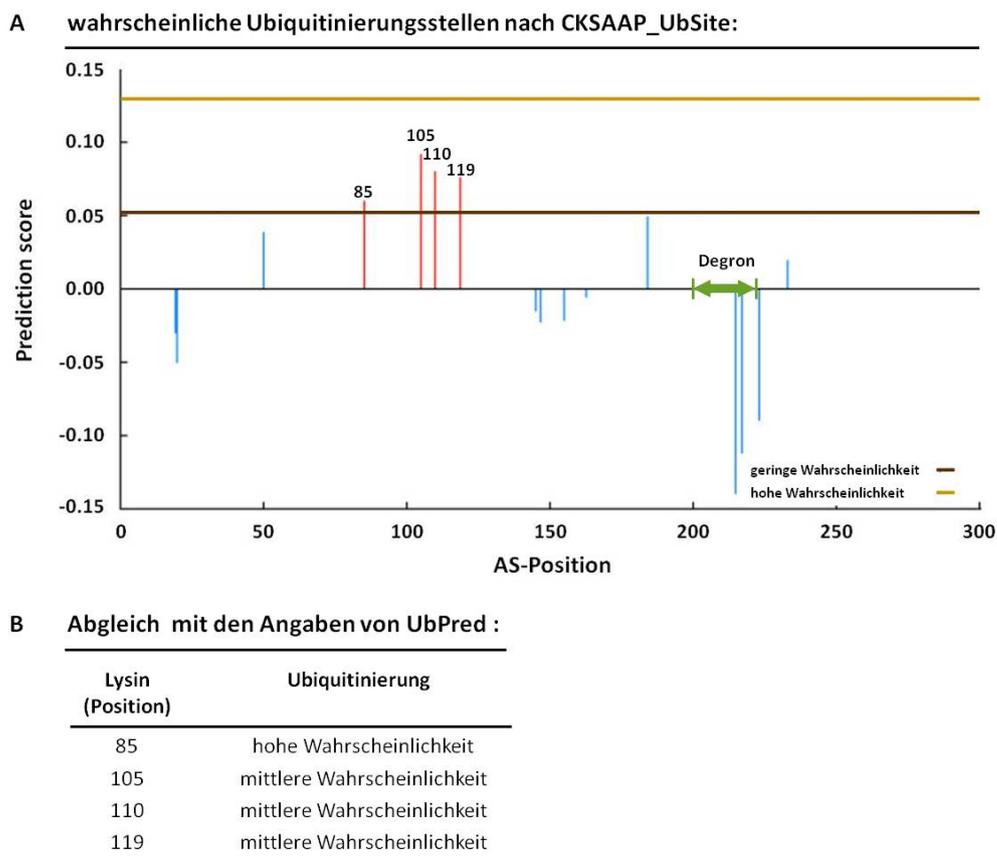


Abb. 8.3: Wahrscheinliche Ubiquitinierungsstellen in JAZ1.

Anhand der AS-Sequenz wurde unter Anwendung von Bioinformatik-Tools berechnet, an welches der 17 Lysine des JAZ1-Proteins wahrscheinlich die Ankopplung von Ubiquitin erfolgt. A zeigt eine grafische Darstellung der für das jeweilige Lysin (Position in Proteinsequenz in x-Achse) von CKSAAP_UBSITE berechneten *Prediction Scores* (y-Achse). Die blauen Peaks repräsentieren dabei Lysine, für die ein Score $\leq 0,052$ bestimmt wurde, und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht ubiquitiniert werden. Die roten Peaks hingegen repräsentieren Lysine, für die ein Score $> 0,052$ ermittelt wurde, und auf die dementsprechend eine Übertragung von Ubiquitineinheiten wahrscheinlich ist. Demnach erfolgt die Ubiquitinierung wahrscheinlich an Lysin K85, K105, K110 oder K119. Im Diagramm ist der C-terminale Bereich von JAZ1, in dem das Degron (AS 200 bis 220) lokalisiert ist, mit einem grünen Pfeil markiert. Wie aus der Abbildung ersichtlich, liegen alle vier als potentielle Ubiquitinierungsstellen identifizierten Lysine von JAZ1 oberhalb der Degron-Sequenz. Zur Absicherung der Daten wurde eine weitere Berechnung von möglichen Ubiquitinierungsstellen mit UbPred vorgenommen (B). Die Ergebnisse dieser Berechnung bestätigten, dass es sich bei einem der von CKSAAP_UBSITE angegebenen Lysine um die wahrscheinliche Ubiquitinierungsstelle handelt. Die Abbildung A wurde in leicht abgewandelter Form von CKSAAP_UBSITE übernommen.

8.5 Promotorsequenzen der AOC2 und AOC3 aus *A. thaliana*

In Abb. 8.4 und 8.5 sind die der Arabidopsis-Datenbank TAIR entnommenen Sequenzen des AOC2- (TAIR-Code: AT3G26770) und AOC3-Promoters (TAIR-Code: AT3G25780) dargestellt. Sie wurden als Matrize zur Ableitung spezifischer Primer für die Erzeugung und Amplifikation von Vollängenkonstrukte und verschiedenen Deletionskonstrukten der beiden Promotoren verwendet. Alle erzeugten Konstrukte sind in den Abbildungen farbig gekennzeichnet. Darüber hinaus sind alle für die Arbeit relevanten *cis*-Elemente hervorgehoben.

1	AATAAAATTA	GTCTTATCTT	TCTCGTGTC	TGTATATATA	ATAATCTTTT	
51	TCATAGAGAA	TTTTATATTC	TTATACTTGT	AATCAAATAA	TTTGTATGGA	
101	TCTTAGTATC	CTTGTGAATG	CAGTATGTTT	GAGTTGAAAA	ATACTTGTAA	
151	TCGAATCTTT	AGTTTTGAGT	TGTCCCTTTT	TGGGGAGTAA	AATATCTTCT	CACGTT JA-responsive T/G-Box
201	TCTTATTTTT	ATTGGGTTGA	AAATAGGTTT	TTGCATAGTT	TTTTTTATCG	
251	ACCTTTCAAA	TACGTCACAA	TTACATTTAT	AGGAGTTAGG	GTTGGTGTG	CACGTG JA-responsive G-Box
301	TAATCCATAT	ACATTACCAC	TATGAAACTT	TCAGCGAATA	CAAGCATATA	
351	CTATCAAAC	CCAAGCGAAA	TAAATACTCA	CAAAGGCTC	ACCATGGTCC	
401	TAAAGTGAGG	ATTGAAGAAA	AATGATCATG	TTGATGGATC	AAATAAATCT	
451	TCCATCGCCT	GATTTTCATCA	TGATGTACAC	TCATCTCAAG	ACAAGAAAA	
501	TGATACTAAG	AAGAAAAAAG	ATAAGCTGGA	TTAGGCACGA	AGGTTTGGAA	
551	GAAACCCAAA	CTCTAACCCA	AATATTGTGG	ATAAATAAAA	ACAATCAAC	
601	TTTCGAGTTC	CTTCTCCAGC	CAACTTATGG	GTTGCAAAGA	TACTTTTACA	
651	TATAAAGGG	ATGCTGACCT	AGTGCGAATA	TCAAGAAATT	GTGTGTGTTT	
701	TATGTGTCTC	GGGTTCAATC	TCTATTTGGT	ATACAAATGA	CTGTTTTTTA	
			2P-D1			
751	AATCCGGATA	TCTAAAGTCT	AACTTTGAGT	ACTAGGAAGA	TTATAAGGCA	
801	AAGATCTAGA	ACTCTTATAG	CTTAAATAAA	AAATGATTTT	ACATGTAAAA	
851	GACAGAAATT	ACCTAATATT	AGTTAAGAGA	TGATATATTT	TCAAGAAATA	
				2P-D2		
901	ATGATTCTAG	TTGTATAAAA	TACCTAGTTT	TTTTTTTGTG	TTTTTTTTTG	
951	AATATTAGA	AGTGCAAGTC	CGAAGGCCAT	ACATTTCCCTA	GAGATATGAT	
1001	CCACACCAGG	TTAAATTCAT	TTCTTTTGGA	GAAGAGATCC	CTCCCAACAG	
			2P-D3			
1051	ACTTCGAACC	CAACACCTCT	A	CCTGCGAGA	TTTTTTTTTT	GTTATTGTA
1101	TTAGATGTGA	TTTTGGTGCA	CCACGCTAGC	GTTGGAGATG	AAACTCCCAC	
			2P-D4			
1151	ATTTTCGCAC	TGAATCGACT	ATTAAAGCTT	GGTCTAAGCT	ATCAATTTAT	
1201	TACAGTCTAT	GCCAGAAATT	TATGGCATCC	TACCTGATAT	AAAAAGCTTT	
			2P-D5			
1251	ATGGCATCCT	ACCTGATATA	AAAAT	CAGTG	TTCIATCCTT	TAAGTTGTTT
					2P-D6	
1301	ATGTATTTTC	ATTCCAAGAG	CAGCCAATGT	TGAGACAGAT	TCTCTTGTCT	A
1351	AGCTTGCTT	ATCCGTTTAT	GCTGAAAACA	TTGTTAGTTA	ATCCAAGTAT	
1401	TGCGGTTTCA	AAAAAGAAGT	GATTTTGGTG	CAAATATCTT	TTCACAGAAT	
			2P-D7			
1451	ATAAAATAAT	TTTTAA	TCAA	TTTTACATAC	ATGTAT	CGG
1501	TAGTTAGATT	CATTACATTT	AGAAGGTTTT	TTATTTTATT	TTTGTAGTTT	
			2P-D8			
1551	AGGGACCGGC	CAAAAGTATT	TCAACTTAAA	TCCAAGACCC	AATGCTTAGA	
1601	TCAAGTT	CCG	ACCATGGAAA	CCAAATCCAA	ATTCTCCCA	AAGCATCTTT
			2P-D9			
1651	TTAGTTTGAG	ACCCACTTTT	G	STAATTTAC	GCAGTG	CTA
					2P-D10	
1701	CATCCCCAT	CATCACTCAT	CCAACATGTC	TATCTATAAA	TAGACGGAGA	
1751	TATTCGTTAG	AACTCAAATC	ACTCACCACA	TAAAGTAAAA	GTCTCATCTC	
1801	TTCATAAAAT	AGCTTTAAAC	CAATCAAGTA	GAGTTTCTTC	TCAAGTCTTT	
1851	TTATTTTAT	TTTATCA				

Abb. 8.4: Promotorsequenz der AOC2 aus *A. thaliana*.

Dargestellt ist die vollständige Sequenz des AOC2-Promotors (5' → 3'). Der Beginn der von Z. Hossain erzeugten Deletionsfragmente des Promotors (2P-D1 bis 2P-D10) ist gelb markiert. Die Sequenzen der dafür genutzten Primer sind der Tab. 8.1 zu entnehmen. Rot bzw. grün hervorgehoben sind die beiden identifizierten JA-responsiven *cis*-Elemente (G-Box bzw. T/G-Box).



Abb. 8.5: Promotorsequenz der AOC3 aus A. thaliana.

Dargestellt ist die vollständige Sequenz des AOC3-Promotors (5' → 3'). Der Beginn der von Z. Hossain erzeugten Deletionsfragmente des Promotors (3P-D1 bis 2P-D8) ist jeweils gelb markiert. Das Start- und Endnukleotid der zusätzlich erzeugten internen Deletionen 3P-Int1 bis 3P-Int3 sind durch farbige Pfeile und gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die entsprechenden Primersequenzen zu den Deletionen sind der Tab. 8.1 zu entnehmen. Rot hervorgehoben ist das identifizierte JA-responsive cis-Element (G-Box).

8.6 Identifizierung von G-Boxen und T/G-Boxen in den Promotoren verschiedener JA-induzierter Promotoren von *A. thaliana* und Analyse der Genexpressionsmuster dieser Gene mit der Genevestigator-Datenbank

Die Promotorsequenzen für die Suche nach putative JA-responsiven G-Boxen und T/G-Boxen in den Promotoren verschiedener JA-responsiver Gene von *A. thaliana* wurden der TAIR-Datenbank entnommen. Eine Liste der entsprechenden TAIR-Codes ist in Tab. 8.4 zu finden. Diese TAIR-Codes wurden desweiteren auch für die Analyse der Genexpressionsmuster mit Hilfe der Datenbank Genevestigator herangezogen. Die Ergebnisse der Promotoranalysen und der Analysen der Genexpression sind in der Tab. 8.6 (Hinweis: Tabelle reicht über zwei Seiten) zusammengefasst. Am Ende der Tabelle findet sich eine Erläuterung zu den verwendeten Abkürzungen und Farbcodes. Die 19 in den JAZ-Promotoren gefundenen G-Boxen sind zudem in Tab. 8.5 aufgelistet.

Tab. 8.4: TAIR-Codes der verschiedenen in die Promotor- und Genexpressionsanalysen einbezogenen JA-responsiven Gene aus *A. thaliana*.

Gen	TAIR-Code
JAZ1	At1G19180
JAZ2	At1G74950
JAZ3	At3G17860
JAZ4	At1G48500
JAZ5	At1G17380
JAZ6	At1G72450
JAZ7	At2G34600
JAZ8	At1G30135
JAZ9	At1G70700
JAZ10	At5G13220
JAZ11	At3G43440
JAZ12	At5G20900
AOC1	At3G25760
AOC2	At3G25770
ACO3	At3G25780
AOC4	At1G13280
AOS	At5G42650
LOX1	At1G55020
LOX2	At3G45140
LOX3	At1G17420
LOX5	At3G22400

Tab. 8.5: Auflistung der in den JAZ-Promotoren gefundenen G-Boxen und ihrer flankierenden Sequenzen.

Gen	G-Box plus je 8 Basen der flankierenden Sequenzen (5' → 3')
JAZ1	TGATAAAA CACGTG TCATATCG
	AAATAAAA CACGTG TTTTATAT
JAZ2	AAGTTAGA CACGTG TAAGGTCG
	AATTAAAA CACGTG TTTTAAAT
JAZ3	TTCTCTTG CACGTG CTTTCATC
	AAATAGCG CACGTG CCTCGCCA
	CGACGATG CACGTG CCTTTTTA
JAZ5	ATTTAAAC CACGTG TTTTAATC
JAZ6	GATTCCGA CACGTG TTGACATC
	CAATACTT CACGTG TCCTTAAA
JAZ7	GCATTTCC CACGTG GATTTAAC
	AAGTGAAA CACGTG GTTGATAA
	GCATTTTA CACGTG CGTGAAGA
JAZ8	ACTCAATC CACGTG CTTTACTG
	ACATTTTC CACGTG AGAGAATT
JAZ9	AAAAATTT CACGTG TTATGAAA
	AGAATAAA CACGTG TGAATTAA
JAZ10	TAGCTCTT CACGTG GAATCGGA
	GCTCCCAA CACGTG AAAGACAT

Tab. 8.6: Ergebnisse der mit den JA-regulierten JAZ-Genen aus *A. thaliana* durchgeführten Promotoranalysen und der Analysen ihrer Genexpressionsmuster.

Dem oberen Abschnitt der Tabelle (Zeile 1-3) kann die Anzahl der in den Promotoren der 12 JAZ-Gene gefundenen G-Boxen und T/G-Boxen entnommen werden. Der untere Tabellenabschnitt enthält die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen dieser Gene. Rot bedeutet, dass nachdem die biologische Probe (erste Spalte ganz links) mit einem bestimmten Phytohormon bzw. einem definierten abiotische Stimulus (siehe zweite und dritte Spalte) behandelt wurde, im Vergleich zur unbehandelten Probe eine Induktion der Genexpression auftrat, wohingegen grün bedeutet, dass eine Repression vorlag. Die Definition der verwendeten Abkürzungen und genaue Aufschlüsselung des Farbcodes findet sich am Ende der Tabelle (siehe nächste Seite).

Gen			JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ4	JAZ5	JAZ6	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
Anzahl G-Boxen			2	2	3	0	1	2	3	2	2	2	0	0
Anzahl T/G-Boxen			4	1	4	1	4	3	0	2	2	3	1	2
Versuch mit Phytohormon bzw. abiotischem Stimulus			Einfluss der Behandlung auf die Genexpression											
Probe (Alter)	Stimulus	Versuchsbedingungen												
Kl	OPDA	4 h / 75 µM	si	si	i	0	si	i	si	si	si	si	n. a.	0
Kl	ABA	1 h und 3 h / 10 µM	i	0	0	sr	0	r	0	0	0	0	n. a.	i
Kl (4 d)		2 d auf 0,5 µM ABA-MS	r	r	0	0	0	r	0	0	r	0	n. a.	0
Kl	ACC	1 h und 3 h / 10 µM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
Pfl	Ethylen	3 h / 5 ppm	i	0	0	0	r	0	r	0	0	0	n. a.	0
Kl	GA	1 h und 3h / 1 µM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
Kl	IAA	1 h und 3h / 1 µM	0	0	0	r	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
Kl (7 d)		2 h / 5 µM	0	0	0	sr	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
ZK	JAME	0,5 h / 50 µM	si	si	0	0	si	si	si	si	si	si	n. a.	0
ZK		2 h / 50 µM	si	si	i	0	si	si	si	si	si	si	n. a.	0
ZK		6 h / 50 µM	si	si	i	0	si	si	si	si	si	si	n. a.	0
Kl		1 und 3 h / 10 µM	si	si	si	0	si	si	si	si	si	si	n. a.	0
Kl	SA	1 und 3 h / 10 µM	0	0	0	0	r	0	0	0	r	0	n. a.	0
Kl	Zeatin	1M; 1 und 3 h / 1 M	0	0	0	r	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
Pfl		Sprühversuch / 20 µM	i	0	0	r	0	0	0	0	0	i	i	n. a.
Pfl	Starklicht	7d Weißlicht + 3 h Starklicht	i	0	0	0	si	0	i	r	i	0	n. a.	0
Sp (16 d)	osmotischer Stress (0,3 M Mannitol)	0,5 h, 1 h und 3 h	i	0	0	0	i	0	0	0	0	0	n. a.	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	si	0	0	si	0	0	si	0	0	0	n. a.	i
W (16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	0	0	0	r	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	i	i	0	0	i	0	i	0	i	i	n. a.	0
Sp (16 d)	Salzstress (0,15 M NaCl)	0,5 h, 1 h und 3 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n. a.	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	si	0	0	0	i	0	si	0	0	0	n. a.	0
W (16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	si	i	0	r	si	i	si	si	si	si	n. a.	i
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	si	si	i	r	si	si	si	si	si	si	n. a.	i
Sp (16 d)	Verwundung (punktieren)	0,5 h, 1 h und 3 h	si	si	i	0	si	i	si	si	si	si	n. a.	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	si	0	0	0	i	0	si	0	0	i	n. a.	0
W (16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	0	0	0	0	i	0	0	0	i	i	n. a.	0
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	i	i	0	0	i	i	i	i	si	i	n. a.	0

Fortsetzung Tab. 8.6: Ergebnisse der mit weiteren JA-regulierten Genen aus *A. thaliana* durchgeführten Promotoranalysen und der Analysen ihrer Genexpressionsmuster.

Dem oberen Abschnitt der Tabelle (Zeile 1-3) kann die Anzahl der in den Promotoren der analysierten Gene gefundenen G-Boxen und T/G-Boxen entnommen werden. Der untere Tabellenabschnitt enthält die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen dieser Gene. Die Definition der verwendeten Abkürzungen und genaue Aufschlüsselung des Farbcodes findet sich am Ende der Tabelle.

Gen			AOC1	AOC2	AOC3	AOC4	AOS	LOX1	LOX2	LOX3	LOX5
Anzahl G-Boxen			0	1	1	0	1	0	0	0	0
Anzahl T/G-Boxen			1	1	0	0	1	1	2	2	0

Versuch mit Phytohormon bzw. abiotischem Stimulus			Einfluss der Behandlung auf die Genexpression								
Probe (Alter)	Stimulus	Versuchsbedingungen									
Kl	OPDA	4 h / 75 µM	si	n. a.	i	0	si	si	sr	si	0
Kl	ABA	1 h und 3 h / 10 µM	0	n. a.	0	0	0	0	0	i	0
Kl (4 d)		2 d auf 0,5 µM ABA-MS	0	n. a.	0	0	r	sr	r	0	n. a.
Kl	ACC	1 h und 3 h / 10 µM	0	n. a.	0	0	0	0	0	0	0
Pfl	Ethylen	3 h / 5 ppm	i	n. a.	0	0	0	0	r	0	0
Kl	GA	1 h und 3h / 1 µM	0	n. a.	0	r	0	0	0	i	0
Kl	IAA	1 h und 3h / 1 µM	0	n. a.	0	r	0	0	0	0	0
Kl (7 d)		2 h / 5 µM	0	n. a.	0	r	0	0	i	0	0
ZK	JAME	0,5 h / 50 µM	r	n. a.	si	0	n. a.	n. a.	si	si	n. a.
ZK		2 h / 50 µM	sr	n. a.	si	0	si	n. a.	0	si	n. a.
ZK		6 h / 50 µM	0	n. a.	i	0	si	0	0	i	n. a.
Kl	SA	1 und 3 h / 10 µM	i	n. a.	i	0	si	i	0	si	i
Kl	Zeatin	1M; 1 und 3 h / 1 M	0	n. a.	0	0	0	0	0	i	0
Pfl		Sprühversuch / 20 µM	0	n. a.	0	0	i	0	0	i	0
Pfl	Starklicht	7d Weißlicht + 3 h Starklicht	0	n. a.	i	0	0	0	0	si	0
Sp (16 d)	osmotischer Stress (0,3 M Mannitol)	0,5 h, 1 h und 3 h	0	n. a.	i	0	0	0	0	i	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	0	n. a.	0	0	0	i	0	0	0
W (16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	0	n. a.	0	0	0	0	0	si	0
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	0	n. a.	0	0	0	i	0	0	0
Sp (16 d)	Salzstress (0,15 M NaCl)	0,5 h, 1 h und 3 h	0	n. a.	0	i	0	0	0	0	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	0	n. a.	0	0	0	0	0	0	0
W(16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	i	n. a.	i	0	si	0	0	si	0
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	i	n. a.	si	0	si	i	0	0	si
Sp (16 d)	Verwundung (punktieren)	0,5 h, 1 h und 3 h	si	n. a.	si	0	si	0	i	si	0
Sp (16 d)		6 h, 12h und 24 h	i	n. a.	i	0	0	0	0	0	0
W (16 d)		0,5 h, 1 h und 3 h	0	n. a.	0	0	0	0	0	0	0
W (16 d)		6 h, 12h und 24 h	i	n. a.	0	0	i	0	0	0	0

Erläuterung der in der Tab. 8.5 verwendeten Farbcodes und Abkürzungen:

Legende zum Farbcode:

Farbe	Definition
si	stark induziert
i	leicht induziert
0	kein Effekt
r	leicht reprimiert
sr	stark reprimiert

Definiton der Abkürzungen:

Abkürzung	Definition
n. a.	keine Daten vorliegend
Kl	Keimlinge
Pfl	ganze Pflanze
Sp	Spross
W	Wurzel
ZK	Zellkultur

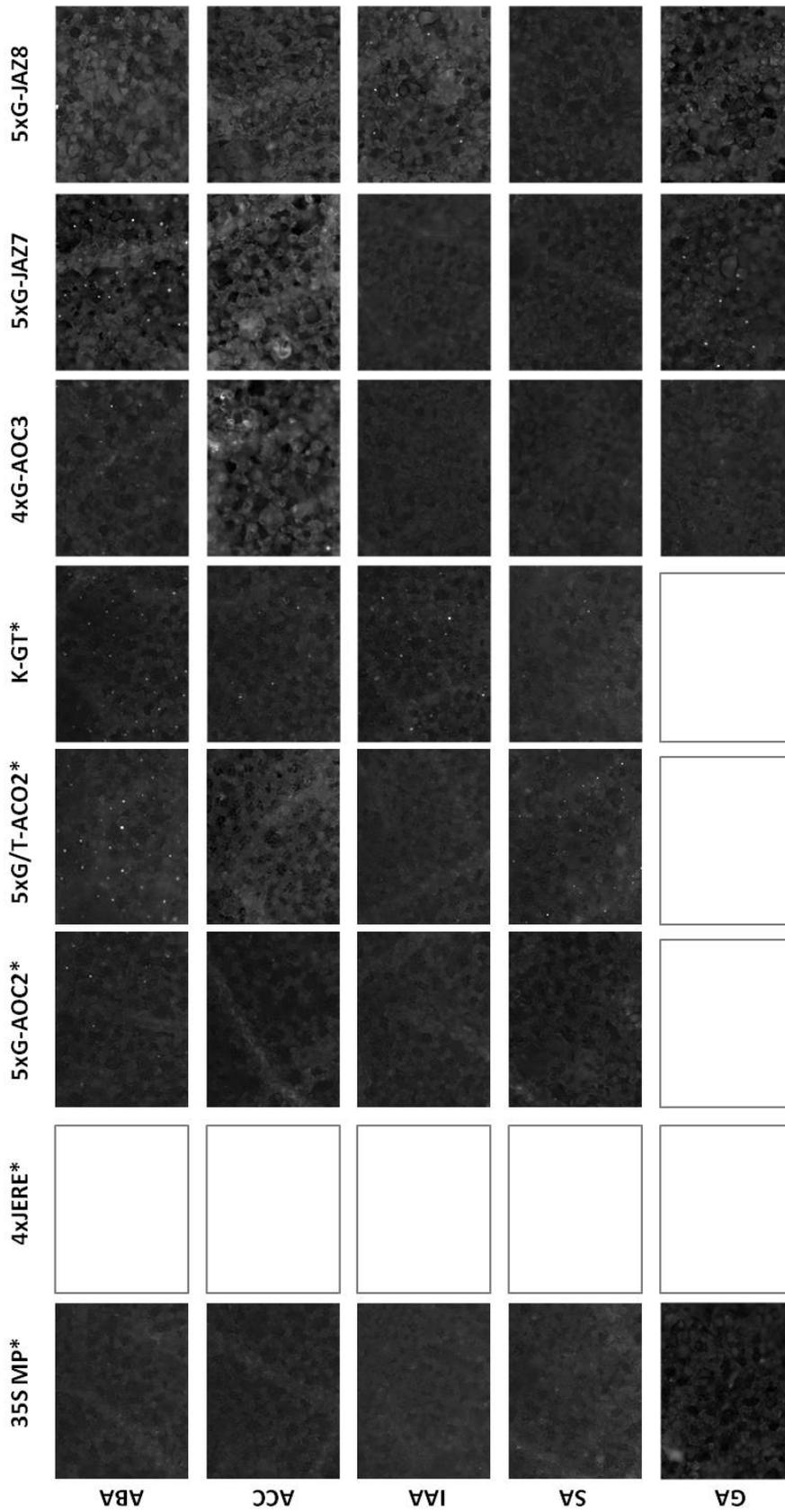


Abb. 8.7: Mikroskopische Aufnahmen der mit den synthetischen Promotoren transient transformierten *N. benthamiana*-Blätter.

Für die Charakterisierung der synthetischen Promotoren hinsichtlich ihrer Spezifität für JA, wurden *N. benthamiana*-Blättern transient mit Promotor:HTA6:GFP-Fusionskonstrukten transformiert. 24 h nach der Transformation wurden die Blätter für 12 h auf Wasser nbzw. einer Phytohormonlösung (JAME, OPDA, 12-OH-JA, ABA, ACC, IAA, SA und GA) floriert bzw. durch mehrmaliges Quetschen über die Mittelrippe und Blattspreite verwundet und anschließend Blattscheiben ausgestochen und mikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle wurden auch aus transformierten Blättern analysiert, die nach der Transformation über einen Zeitraum von 36 h belassen wurden (= unbehandelt). Die mikroskopische Analyse erfolgte unter Verwendung von GFP-spezifischen Filtern (Anregung BP 470/40; Strahlenteiler FT 485; Emission BP 525/50). Die Aufnahmen für das 35S MP, 4xJERE, 5xG-AOC2, 5xT/G-AOC2 und K-GT wurden von F. Haufe. Zur Absicherung der Versuchsergebnisse wurden ≥ 3 biologische Replikate angefertigt.

8.9 Transkriptanalysen in T2-Pflanzen

Um zu prüfen, ob es in den stabil transformierten Pflanzen zu einer wundinduzierten Akkumulation von *HTA6:GFP*-Transkript kommt, extrahierte F. Haufe RNA aus je 100 mg unverwundetem und verwundetem (60 min nach Quetschen der Mittelrippe) Blattmaterial (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Da von den Transformanden bereits viel Blattmaterial für die mikroskopischen Analysen geerntet wurde, wurde zur RNA-Isolation das verbliebene Blattmaterial mehrerer transgener Pflanzen gepoolt. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA wurde diese für die Quantifizierung der Transkripte eine qPCR. Die Ergebnisse der von F. Haufe durchgeführten Versuche sind in Abb. 8.8 dargestellt.

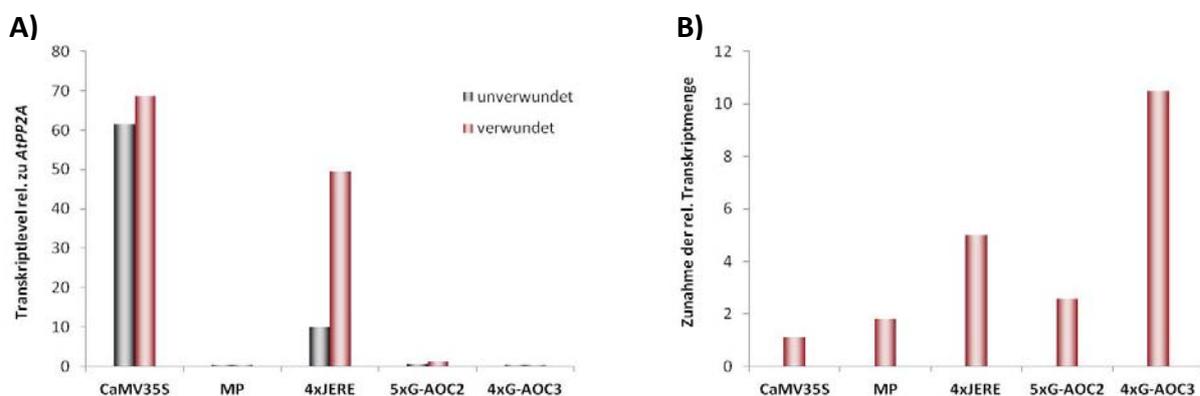


Abb. 8.8: Untersuchung der Transkriptakkumulation von *HTA6:GFP* in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen vor und nach Verwundung.

Dargestellt sind die *HTA6:GFP*-Transkriptleveln vor (grau) und 60 min nach mechanischer Verwundung (orange) der Blätter stabil transformierter *A. thaliana*-Pflanzen (T2-Generation) relativ zum *Housekeeping*-Gen *AtPP2A* (A). Zudem wurde die Zunahme der relativen (rel.) Transkriptlevel nach Verwundung bestimmt (B). Hierfür wurde der Quotient aus dem relativen Transkriptlevel 60 min nach Verwundung und dem relativen Transkriptlevel in unverwundetem Blattmaterial berechnet. Die Daten wurden von F. Haufe aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2.

8.10 Charakterisierung des synthetischen Promotors 4x(AT+G)-AOC3 in transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Um die Spezifität des aus den multimerisierten *cis*-Elementen generierten synthetischen Promotors für JA zu überprüfen, wurde dieser mit dem Reporter gen *HTA6:GFP* fusioniert und mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation transient in Blätter von *N. benthamiana* eingebracht. Zur Kontrolle wurden der 35S MP (Negativkontrolle) und das JA- und SA-responsive Element 4xJERE (Positivkontrolle) verwendet. Um auszuschließen, dass durch das putative *Enhancer*-Element unspezifische Kreuzreaktionen hervorgerufen werden, wurde auch ein synthetischer Promotor bestehend aus dem Dimer dieses Elements fusioniert mit dem *HTA6:GFP*-Reporter gen (2xAT-AOC3) mit in die Versuche einbezogen. Die Behandlung der Blätter erfolgte wie beschrieben. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 8.9 dargestellt (siehe nächste Seite).

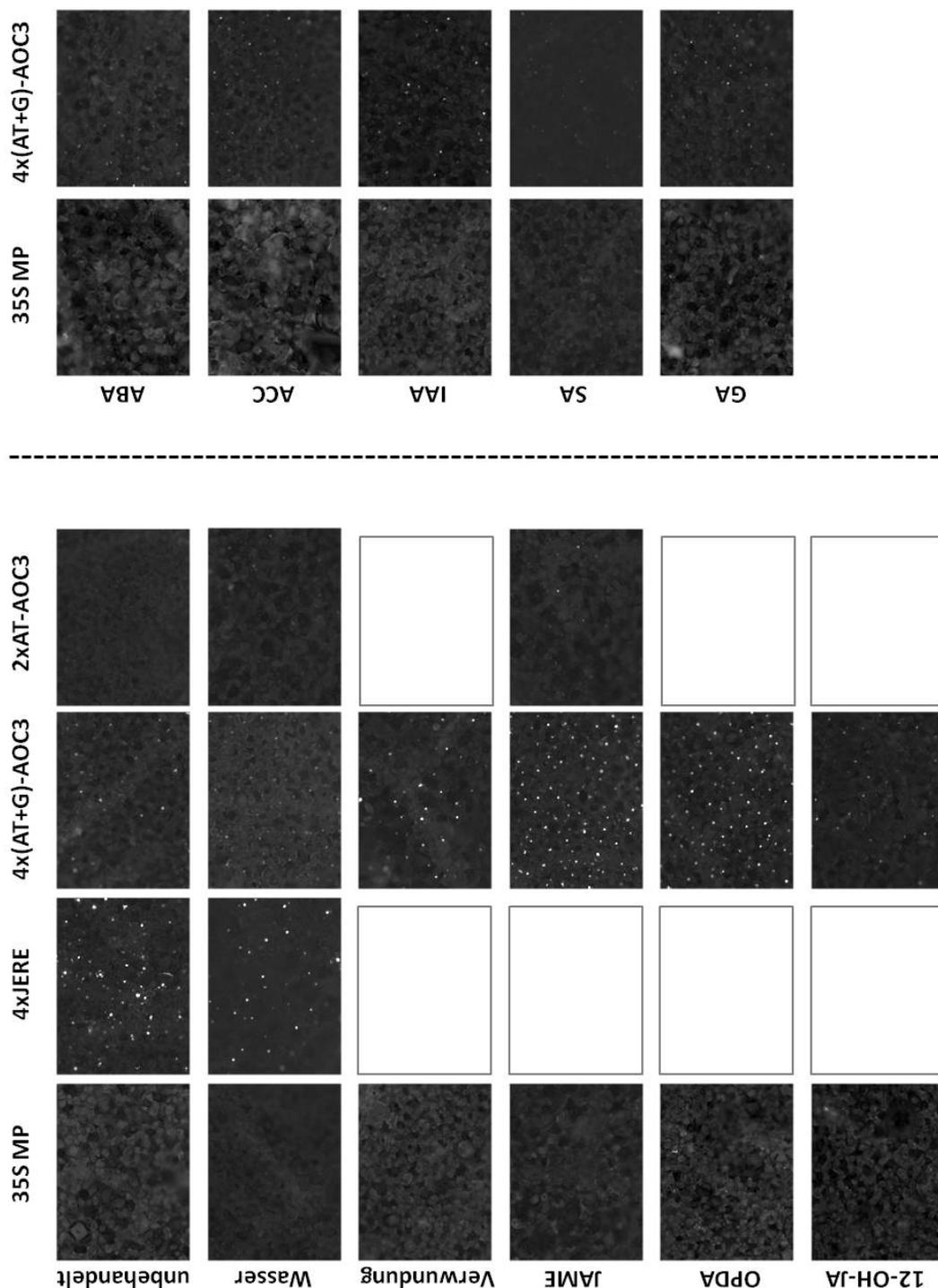
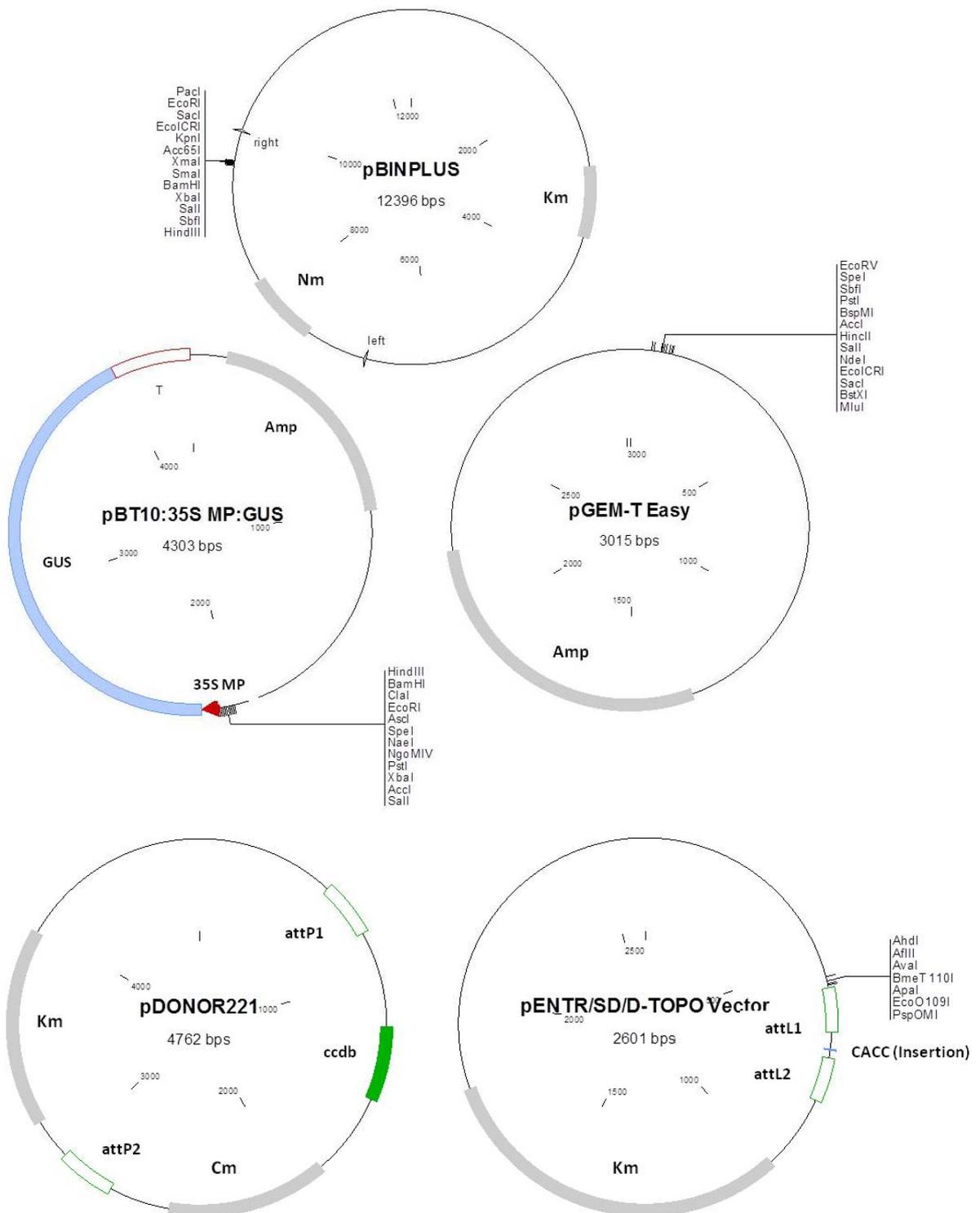


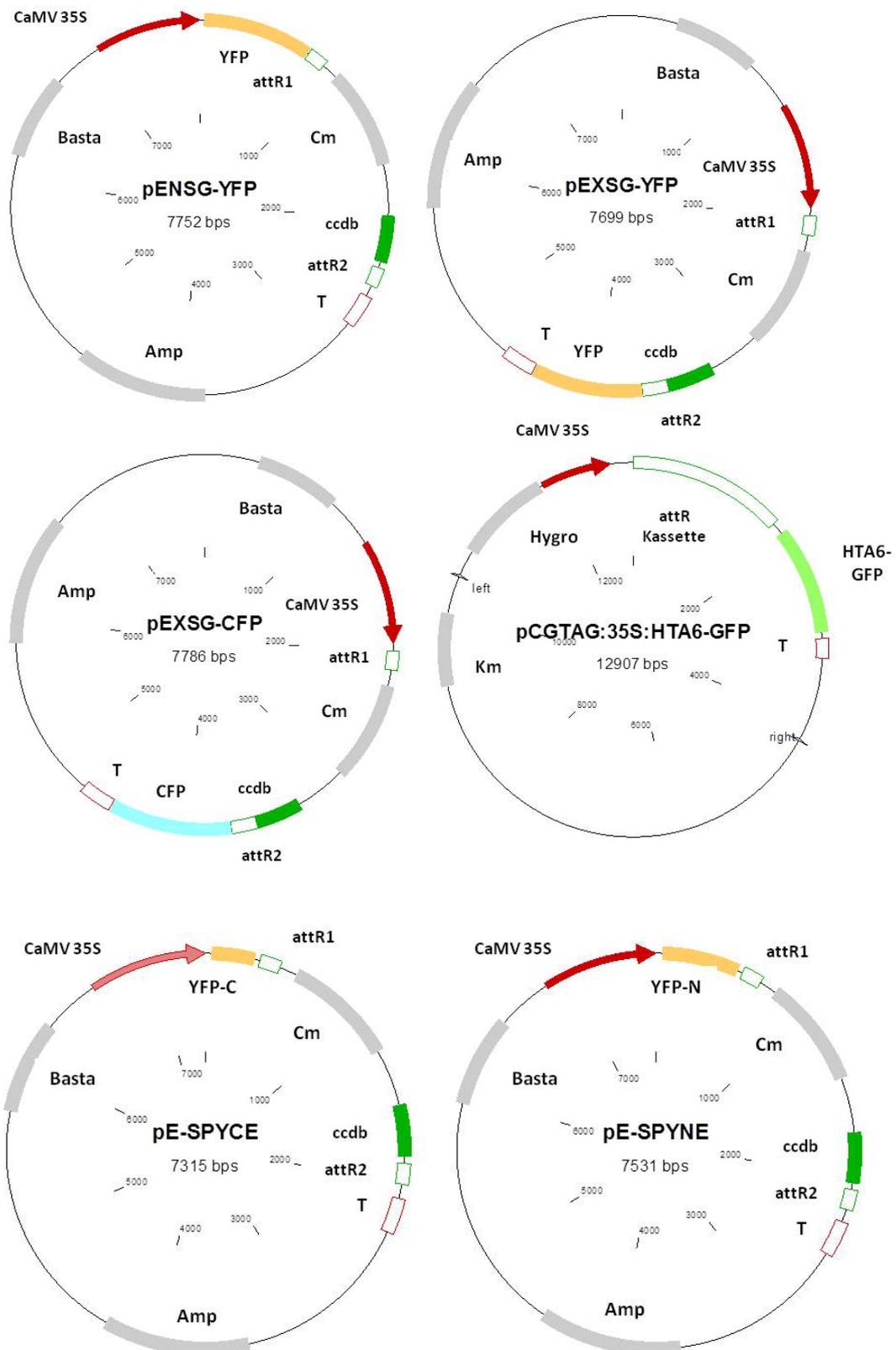
Abb. 8.9: Mikroskopische Aufnahmen der mit den synthetischen Promotoren transient transformierten *N. benthamiana*-Blätter.

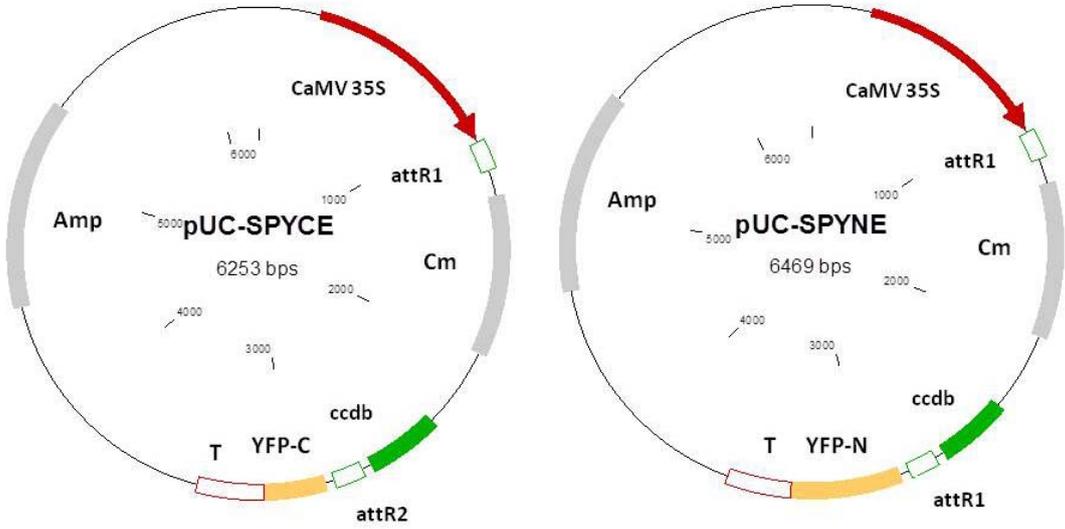
Für die Charakterisierung der synthetischen Promotoren hinsichtlich ihrer Spezifität für JA wurden *N. benthamiana*-Blättern transient mit den *Promotor:HTA6:GFP*-Fusionskonstrukten transformiert. 24 h nach der Transformation wurden die Blätter für 12 h auf Wasser bzw. einer Phytohormonlösung (JAME, OPDA, 12-OH-JA, ABA, ACC, IAA, SA und GA) floriert bzw. durch mehrmaliges Quetschen über die Mittelrippe und Blattspreite verwundet und anschließend Blattscheiben ausgestochen und mikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle wurden auch transformierte Blättern analysiert, die nach der Transformation über einen Zeitraum von 36 h an der Pflanze belassen wurden (= unbehandelt). Die Mikroskopische Analyse erfolgte unter Verwendung von GFP-spezifischen Filtern (Anregung BP 470/40; Strahlenteiler FT 485; Emission BP 525/50). Die Aufnahmen für das 35S MP, 4xJERE, 5xG-AOC2, 5xT/G-AOC2 und K-GT wurden von F. Haufe gemacht. Zur Absicherung der Versuchsergebnisse wurden ≥ 3 biologische Replikate angefertigt.

8.11 Vektorkarten

Im Folgenden sind die Karten aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Ausgangsvektoren dargestellt (leere Vektoren, ohne Insert). Nähere Informationen zu den Vektoren können der Tab. 8.3 entnommen werden.







DANKSAGUNG

Kein Mensch ist eine Insel und so haben viele Personen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen – bei all diesen Menschen möchte ich mich herzlich bedanken!

Allen voran gilt mein Dank Frau **Prof. Dr. Dr. Bettina Hause**, die mir die Möglichkeit gab, in ihrer Arbeitsgruppe zu einem sehr interessanten und vielfältigen Thema meine Dissertation anzufertigen. Vielen Dank für die hervorragende fachliche Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die Offenheit gegenüber allen Fragen, die konstruktive Kritik, aber auch für all die Freiheiten, die mir bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie der Umsetzung eigener Ideen gewährt wurden.

Für die Übernahme der weiteren Gutachten bedanke ich mich sehr bei Herrn **Prof. Dr. Jörg Degenhardt** von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Herrn **Prof. Dr. Thomas Schmülling** von der Freien Universität Berlin.

Prof. Dr. Claus Wasternack danke ich dafür, dass er als mein Mentor stets Interesse für den Fortschritt meiner Promotionsarbeit gezeigt hat. Danke für die rege Beteiligung an allen Diskussionen und für Ihre Anmerkungen und Ratschläge.

Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der **Arbeitsgruppe „Jasmonatfunktion und Mykorrhiza“** für die gute Zusammenarbeit und die familiäre Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorzuheben wäre hier **Frau Dr. Sara Schaarschmidt**, die während unserer Zusammenarbeit nicht nur eine geschätzte Kollegin, sondern auch gute Freundin wurde – und das obwohl ich sie selbst über ihre Zeit am IPB hinaus mit meinen Fragen und Problemen belästigt habe 😊.

Dank an dieser Stelle auch an **Dr. Zakir Hossain**, der wichtige Vorarbeiten für die Durchführung der Experimente zur Erzeugung eines JA-responsiven Promotors geleistet hat. Zudem bedanke ich mich für die Zusammenarbeit zu Beginn meiner Promotionszeit und dafür, dass er die Klonierung einiger im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Promotor:GUS*-Konstrukte übernahm.

Bei unseren „guten Laborgeistern“ **Ulrike Huth** und **Hagen Stellmach** möchte ich mich für die Hilfe bei allen Fragen des Laboralltags bedanken. Hagen danke ich zudem für die Unterstützung bei den mikroskopischen Arbeiten.

Außerdem vielen Dank an alle Studenten, die ich die Freude hatte während meiner Promotionszeit zu betreuen. Mein Dank gilt neben allen Praktikanten und wissenschaftlichen Hilfskräften besonders den Diplomandinnen **Susanne Forner**, **Jette Schimmel** und **Franziska Haufe**, sowie dem Bachelorstudenten **Stefan Mielke** – ihr habt durch euren Fleiß und Lernwillen einen wichtigen Betrag geleistet und musstet dabei auch noch als Versuchskaninchen für mein didaktisches Talent herhalten 😊.

Auch über meine Arbeitsgruppe hinaus habe ich am IPB viele hilfsbereite Kollegen kennen und schätzen gelernt:

Dr. Justin Lee, Leiter der Arbeitsgruppe „Zelluläre Signaltransduktion“, möchte ich dafür danken, dass er mir für meine Arbeit alle YFP- und BiFC-Vektoren sowie den pRT100:*LUC*⁺-Vektor zur Verfügung stellte. Zudem bedanke ich mich bei seiner technischen Assistentin **Sylvia Krüger** dafür, dass sie die Anzucht und Vermehrung der Zellkultur übernahm.

Dr. Lennart Eschen-Lippold half mir bei der Etablierung der Methode zur Isolation von Protoplasten aus Arabidopsis-Blättern und hatte zudem immer ein offenes Ohr für meine Fragen zur Protoplastentransfektion – dafür vielen Dank.

Mein Dank geht ausserdem an die Mitarbeiter der **Abteilung „Administration und Infrastruktur“**, wobei besonders **Holger Bartz**, **Sabine Voigt** und **Andrea Piskol** hervorzuheben wären.

Dank auch an unsere Kooperationspartner, ohne die die Erzeugung und Charakterisierung des Anti-JA-AK nicht möglich gewesen wäre. **Dr. Robert Kramell** (IPB Halle) unterstützte uns mit seinen Fachkenntnissen bei der Herstellung des JA-BSA-Konjugates und **PD Dr. Udo Conrad** (IPK Gatersleben) übernahm die Immunisierung der Kaninchen sowie die Ernte des Antiserums. Zudem ermöglichte er es mir unter seiner fachlichen Anleitung die Aufreinigung des Antiserums durchzuführen und die Technik des kompetitiven ELISA zu erlernen.

Für die fachliche und menschliche Unterstützung möchte ich mich außerdem bei all den Doktoranden/innen und Postdoktoranden/innen des IPBs bedanken die ich mittlerweile zu meinen Freuden zähle. Dazu gehören **Ramona Landgraf**, **Dr. Michaela Kopischke**, **Dr. Christin Fellenberg**, **Pascal Pecher**, **Dr. Martin Dippe**, **Dr. Markus Otto**, **Dr. Mieder Palm-Foster** sowie **Dr. Lennart Eschen-Lippold** und **Dr. Sara Schaarschmidt**. Danke für die anregenden Diskussionen, den Ideenaustausch, die aufmunternden Worte und all die unvergesslichen Momente!

Auch meinen „Nicht-IPB“-Freunden ;) **Maren Kinszorra**, **Dr. Astrid Szilagy** und **Anne Görisch** möchte ich für ihr Interesse danken und dafür, dass sie immer da waren, auch wenn ich sie vor allem in letzter Zeit leider häufig vernachlässigt habe.

Ein besonders großes und herzliches Dankeschön geht nicht zuletzt auch an meine Familie! Meinen Eltern **Christine** und **Volkhard Mielke** und meiner Schwester **Steffi Garcia Chantes** danke ich für den liebevollen Beistand während meiner Promotionszeit! Auch bei Oma **Edith Winter** möchte ich mich für ihr Interesse, die Anteilnahme und die Unterstützung bedanken.

Die Finanzierung des Projektes erfolgte dankenswerterweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP1212 „**Mikrobielle Umprogrammierung der Pflanzenzellentwicklung**“.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich erkläre weiterhin, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), den

Kati Mielke

LEBENS LAUF

Persönliche Informationen:

Name: Kati Mielke
 Geburtsdatum: 17.07.2014
 Geschlecht: weiblich
 Nationalität: deutsch

Werdegang:

07/2000: Abitur am Altmärkischen Gymnasium, Tangerhütte

10/2000 – 10/2006: Studium der Biochemie an der Universität Postdam
Thema der Diplomarbeit:
„Einfluss von Licht- und Temperaturstress auf die Protein- und Pigmentzusammensetzung der Thylakoidmembranen von Blättern und Kallus der Zuckerrübe“
Betreuung:
 Prof. Guido Baumann

10/2006/03/2007: Praktikum in der Arbeitsgruppe „Biochemie der Pflanzen“ unter der Betreuung von Prof. Guido Baumann

07/2007 – 10/2013: Beschäftigung am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) als Doktorandin und nachfolgend als wissenschaftliche Mitarbeiterin (Post-Doktorandin), Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie (AG „Jasmonatfunktion und Mykorrhiza“), Halle/Saale
Projekt:
„Zell- und gewebespezifische Detektion von Jasmonaten“
Betreuung:
 Prof. Dr. Dr. Bettina Hause

Publikationen:

Hause, B., Mielke, K. and Forner, S. (2013) Cell-specific visualization of jasmonates by means of immunocytological approach, *Methods in Molecular Biology*. **2011**, 135-144

Mielke, K., Forner, S., Kramell, R., Conrad, U. and Hause, B. (2011) Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and Arabidopsis leaves using jasmonate-specific antibodies. *Nem Phytologist*. **190**, 1069-1080