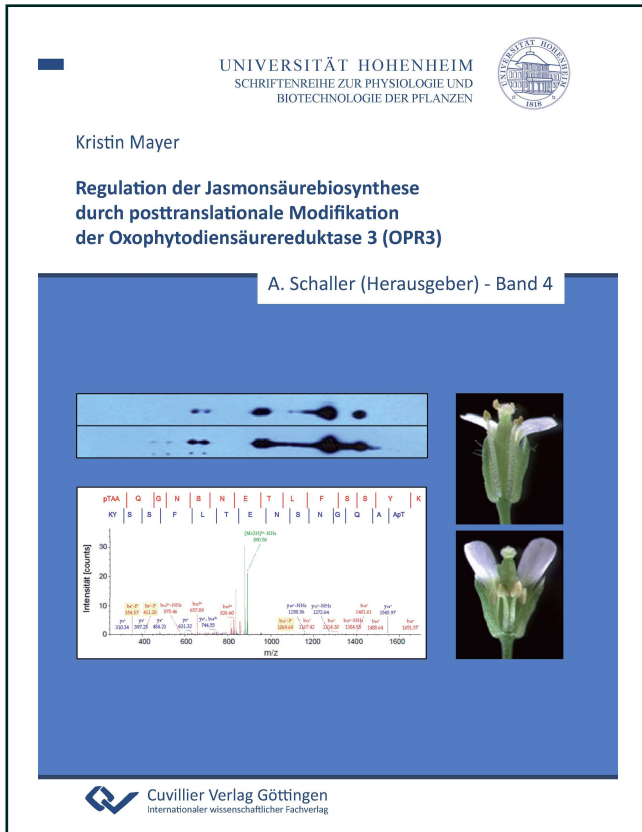




Kristin Mayer (Autor)
**Regulation der Jasmonsäurebiosynthese durch
posttranslationale Modifikation der
Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3)**



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

Copyright:

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

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



INHALTSVERZEICHNIS

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



INHALT UND VERZEICHNISSE

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



INHALT UND VERZEICHNISSE

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



INHALT UND VERZEICHNISSE

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



INHALT UND VERZEICHNISSE

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