

**Molekulare und biochemische Untersuchungen von Mitgliedern
der Phospholipase-A-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* in der
Reaktion auf pflanzliche Hormone sowie biotischen und
abiotischen Stress**

Dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Ing.agr. Steffen Rietz
geboren am 01.07.1972 in Braunschweig

2002

Referent: Prof. Dr. H.J. Jacobsen

Korreferenten: Prof. Dr. G.F.E. Scherer

Tag der Promotion: 20.12.2002

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die *AtPLA*-Genfamilie umfasst zehn Mitglieder und wurde zuvor in dem Genom von *Arabidopsis* über Homologien zu Phospholipase-A₂ (PLA₂)-Proteinen aus dem tierischen System identifiziert (Holk et al., 2002). Die Funktionen der einzelnen Mitglieder sind bisher nicht beschrieben. Für die Phospholipase A (PLA) im pflanzlichen System wird eine Funktion in der auxin- und elicitor-induzierten Signaltransduktion sowie in der Verwundung postuliert.

Drei Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie (*AtPLA I*, *AtPLA IIA* und *AtPLA IVA*) wurden in *Escherichia coli* als rekombinantes Protein überexprimiert und in einem Enzymtest auf Phospholipase-Aktivität hin untersucht. Zwei Varianten des *AtPLA I*-Gens, die sich in der Größe unterschieden, resultierten in der Bildung von schwer löslichen Proteinaggregationen, ohne Enzymaktivität, auch nach chaotroper Lyse und anschließender Rückfaltung. Die Überexpression von *AtPLA IIA* und *AtPLA IVA* hingegen führte zu löslichem, rekombinantem Protein, das als Enzym IIA bzw. Enzym IVA bezeichnet wurde. In Enzymtests mit den gereinigten Proteinen besaßen Enzym IIA und Enzym IVA Phospholipase A₁- sowie Phospholipase A₂-Aktivität. Enzym IIA benötigte neben Calcium ein reduzierendes Agens (z.B. Cystein) im Reaktionspuffer und ließ sich durch die Inhibitoren AACOCF₃, NDGA und PACOCF₃ hemmen. Enzym IVA benötigte ebenfalls Calcium zur Aktivität, aber kein reduzierendes Agens und wurde durch die obigen und zwei weitere Substanzen (ETYA und HELSS) gehemmt. Beide Enzyme hatten in pH 7–8 ihre Aktivitätsoptima. Die Ergebnisse unterstützen Kenntnisse über die Existenz von cytosolischen Phospholipase-A-Enzymen im Genom von *Arabidopsis thaliana* und stehen gleichzeitig im Einklang mit Biotests, in denen hier verwendete Inhibitoren *in vivo* auxin- und elicitor-induzierte physiologische Reaktionen hemmen.

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten *AtPLA*-Gene wurde die transkriptionelle Regulation von *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC* untersucht. Es wurden die zugehörigen 5'-Regionen der Gene (= Promoter) isoliert und in Kombinationen mit dem GUS-Reportergen stabil in *Arabidopsis* transformiert. Die Promotoren wurden in Anlehnung an die Nomenklatur der Gene als PI, PIIA, PIVA und PIVC bezeichnet. Die GUS-Expression unter der Kontrolle von PI beschränkte sich auf die Pollen, die Trichome und die Sprossbasis. PIIA war hingegen in den Blättern, den Stipeln, älteren Bereichen der Wurzel und in der Kalyptra aktiv. In Induktionsexperimenten wurde zudem durch Verwundung, durch Signale der Verwundung und der Pathogenabwehr (SA, Bion, ACC, JA), sowie durch Eisen- und Phosphatmangel die Promoteraktivität von PIIA erhöht. PIVA war sehr stark in dem Cortexgewebe der Wurzel aber nicht in der Wurzelspitze aktiv und, wie PIIA, in den Stipeln. Der vierte Promoter (PIVC) zeigte eine hohe Aktivität im Pistill und ließ sich durch Abscisinsäure und Trockenstress in der Wurzel induzieren. Kombinationen aus PI-GUS und PIVA-GUS ließen sich durch keine der durchgeführten Behandlungen in ihrer Expression verändern.

Für viele Proteine der Signaltransduktion wurde gezeigt, dass die entsprechenden Gene durch die am Anfang stehenden Signale auch in der Transkription hochreguliert werden. Die Ergebnisse von Enzym IIA und PIIA können so interpretiert werden, dass das Protein *AtPLA IIA* eine Funktion vorwiegend in der Pathogenabwehr und in der dabei stattfindenden Signaltransduktion hat. Für die Promoter PI, PIVA und PIVC sind die Daten nicht ausreichend, um eine klare Zuordnung zur auxin- oder pathogen-ausgelösten Signaltransduktion vornehmen zu können. *AtPLA I* hat möglicherweise durch seine Funktion im Gravitropismus eine Unterfunktion in der Auxinwirkung, *AtPLA IVA* könnte eine Funktion in der Wurzel-Elongation oder der Seitenwurzelbildung haben, während *AtPLA IVC* offenbar in der Reaktion der Pflanze auf Trockenstress eine Funktion besitzt.

Stichwörter:

Arabidopsis thaliana, Phospholipase A, Promoter

Abstract

The phospholipase A (PLA) is an acyl hydrolase that uses phospholipids as a substrate to release fatty acid and lysophospholipid, both thought to have second messenger functions in the signal transduction of the auxin and the plant defence responses. Based on amino acid alignments between phospholipase A₂ enzymes from animals and the *Arabidopsis thaliana* data base Holk et al. (2002) identified a gene family of patatin-related phospholipases A, consisting of 10 gene members designated *AtPLAs* and isolated the corresponding cDNAs. So far, little is known about their biological properties and functions. To verify the enzyme activity the three genes *AtPLA IA*, *AtPLA IIA* and *AtPLA IVA* have been overexpressed in *Escherichia coli*. *AtPLA I* resulted in inclusion bodies and did not become active even under certain refolding conditions. *AtPLA IIA* and *AtPLA IVA* were expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* and purification via His-tag yielded large amounts of recombinant protein to prove phospholipase A activity in an enzyme assay with fluorescently labelled phosphatidylcholine. The corresponding recombinant enzymes were named enzyme IIA and enzyme IVA. To become active both enzymes needed mM concentrations of calcium and enzyme IIA, in addition to this, a reducing agent (i.e. cysteine) pointing to yet unknown activation mechanisms of the native enzymes in the plant. The influence of phospholipase A₂ inhibitors from the animal system were tested. Enzyme IIA was inhibited by NDGA, AACOCF₃ and PACOCF₃ and enzyme IVA, additionally, by ETYA and HELSS. These data coincide with results from biotests where auxin- and elicitor-induced reactions were diminished by application of these presently used inhibitors.

To get further insight into the biological function of *AtPLAs*, transgenic *Arabidopsis* plants containing promoter-GUS fusions of four *AtPLAs* (*AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* and *AtPLA IVC*) were generated to visualize their transcriptional regulation in the plant. The corresponding promoters are PI, PIIA, PIVA and PIVC, derived from the gene names. All four *AtPLA*-promoters showed a distinct expression pattern, with PI being active in the pollen, the leaf hairs and at the base of the shoot. PIIA-GUS plants showed GUS activity in the leaves, the primary roots, the stipules and at the root cap. PIIA was also responding to wounding, Fe-/P-deficiency and signals of plant defence (SA, Bion, JA and ACC). PIVA directed the GUS expression to the roots besides the root tip and to the stipules. The PIVC-GUS plants showed GUS activity in the pistil and were transcriptionally up-regulated in the roots by ABA treatment and drought stress. PI and PIVA did not show any alteration in their activities under the experimental conditions.

Knowing that many genes of proteins involved in signalling are also transcriptionally up-regulated in response to signals the data from enzyme IIA and PIIA indicate a role of *AtPLA IIA* in plant defence and corresponding signaling processes. There are not enough information yet to clearly relate *AtPLA I*, *AtPLA IVA* or *AtPLA IVC* to auxin or pathogen induced signal transduction, although the involvement of *AtPLA I* in gravitropism (A. Holk, Hannover; personal communication) may result from a function in auxin signalling. Due to the strong transcription of *AtPLA IVA* in the roots it is possible to envision a function in root elongation and side root formation, while *AtPLA IVC* is obviously involved in the drought stress response. Considering the presented results further investigations of corresponding mutants can resolve the exact functions of the *AtPLA* genes.

Keywords:

Arabidopsis thaliana, phospholipase A, promoter

Abkürzungen

| | |
|---------------------|---|
| AACOCF ₃ | Arachidonyltrifluoromethylketon |
| ABA | Abscisinsäure |
| ABP1 | <i>auxin binding protein 1</i> |
| ACC | 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat |
| AOC | Allenoxid Cyclase |
| AOS | Allenoxid Synthase |
| aqua dest. | aqua destillata |
| BAP | 6-Benzylaminopurin |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serumalbumin) |
| cPLA ₂ | cytosolische Phospholipase A ₂ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonucleinsäure) |
| DTT | 1,4-Dithio- <i>DL</i> -threitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EtOH | Ethanol |
| ETYA | 5,8,11,14-Eicosatetraynoic Säure |
| FA | <i>fatty acid</i> (freie Fettsäure) |
| Gu-HCl | Guanidin-Hydrochlorid |
| HELSS | E-6-(Bromomethylen)tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-on |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure |
| iPLA ₂ | calcium-unabhängige Phospholipase A ₂ |
| IPTG | Isopropyl-β- <i>D</i> -thiogalactopyranosid |
| ISR | <i>induced systemic resistance</i> |
| JA | Jasmonsäure bzw. Jasmonat |
| Kap. | Kapitel |
| LPC | Lysophosphatidylcholin |
| LRR | <i>leucine rich repeat</i> (leucinreiche Wiederholung) |
| LysoPC | Lysophosphatidylcholin |
| dNTP's | Deoxynucleosidtriphosphate |

| | |
|---------------------|--|
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MES | 2-Morpholinoethansulfonsäure |
| Min. | Minuten |
| 4-MUG | 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid-Trihydrat |
| NDGA | Nordihydroguaiaretic Säure |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| NPTII | Neomycin-Phosphotransferase II |
| OPDA | <i>cis</i> -12-Oxophytodiensäure |
| OPR | OPDA-Reduktase |
| PACOCF ₃ | Palmitoyltrifluoromethylketon |
| PAF | <i>platelet activating factor</i> |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Ketten Reaktion) |
| PLA ₂ | Phospholipase A ₂ |
| PNOS | Promoter der Nopalinsynthase |
| <i>Pwo</i> | <i>Pyrococcus woesei</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SA | Salicylsäure |
| SAR | <i>systemic acquired resistance</i> |
| SDS-PAGE | <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| Sek. | Sekunde |
| sPLA ₂ | sekretorische Phospholipase A ₂ |
| Std. | Stunde |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol |
| Vol. | Volumen |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|------|
| 1 | Einleitung | 1-1 |
| 1.1 | Die <i>AtPLA</i> -Genfamilie | 1-8 |
| 1.2 | Zielsetzung der Arbeit | 1-11 |
| 2 | Material und Methoden | 2-12 |
| 2.1 | Molekularbiologische Arbeiten..... | 2-12 |
| 2.1.1 | Polymerase Ketten Reaktion (PCR) | 2-12 |
| 2.1.1.1 | PCR mit <i>Taq</i> -DNA-Polymerase..... | 2-13 |
| 2.1.1.2 | DNA Polymerase mit <i>proof-reading</i> Aktivität..... | 2-15 |
| 2.1.2 | Durchsuchen der Lambda ZAP [®] -II-Phagen-Bank (Stratagene)..... | 2-16 |
| 2.1.3 | Reinigung von Nukleinsäuren ('Minipräp') | 2-20 |
| 2.1.3.1 | Plasmid Mini-Präparation (alkalische Lyse) | 2-20 |
| 2.1.3.2 | Präparation genomischer DNA aus der Pflanze | 2-22 |
| 2.1.3.3 | Nukleinsäure-Reinigung mit Kits..... | 2-23 |
| 2.1.3.4 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 2-23 |
| 2.1.4 | Ethidiumbromid-Agarosegel | 2-24 |
| 2.1.5 | Erstellung der Vektor-Konstrukte | 2-25 |
| 2.1.5.1 | Bakterienstämme | 2-25 |
| 2.1.5.2 | Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 2-26 |
| 2.1.5.3 | Vektoren | 2-27 |
| 2.1.5.4 | Amplifizierung der Promotor-Sequenz | 2-29 |
| 2.1.5.5 | Aufbereitung des Vektorplasmids..... | 2-32 |
| 2.1.5.6 | Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen..... | 2-32 |
| 2.1.5.7 | Ligation..... | 2-34 |
| 2.1.5.8 | Auffüllen von 5' DNA-Überhängen..... | 2-34 |
| 2.1.5.9 | Dephosphorylieren von 5' DNA-Enden..... | 2-35 |
| 2.1.5.10 | Einfügen zusätzlicher Restriktionsschnittstellen | 2-36 |
| 2.1.5.11 | Carrier-Vektor..... | 2-37 |
| 2.1.5.12 | Promoter-Reporter-Konstrukte | 2-38 |
| 2.1.5.13 | Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 2-40 |
| 2.1.5.14 | Transformation von <i>Escherichia coli</i> | 2-42 |
| 2.1.5.15 | Herstellung chemisch kompetenter XL1-Zellen..... | 2-42 |

| | | |
|----------|--|------|
| 2.1.5.16 | Transformation von XL1-Blue-Zellen | 2-43 |
| 2.1.5.17 | Transformation von Top 10-Zellen | 2-44 |
| 2.1.5.18 | Blau/Weiß-Selektion..... | 2-45 |
| 2.2 | Biochemische Arbeiten..... | 2-46 |
| 2.2.1 | Überexpression, Reinigung und Enzymtest rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> | 2-46 |
| 2.2.2 | Überexpression | 2-48 |
| 2.2.3 | Native Reinigung rekombinanten Proteins | 2-49 |
| 2.2.4 | Denaturierende Reinigung rekombinanten Proteins | 2-51 |
| 2.2.5 | Rückfaltung denaturierten Proteins | 2-54 |
| 2.2.6 | SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) | 2-56 |
| 2.2.7 | Dialyse | 2-59 |
| 2.2.8 | Liposomen | 2-60 |
| 2.2.9 | Enzymtest mit rekombinatem Protein | 2-62 |
| 2.2.9.1 | pH-Reihe..... | 2-63 |
| 2.2.9.2 | Inhibitoren | 2-64 |
| 2.2.10 | Dünnschichtchromatographie..... | 2-65 |
| 2.2.11 | Herstellung der Fettsäure- und Lysophosphatidylcholin-Standards..... | 2-66 |
| 2.2.12 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 2-66 |
| 2.2.13 | Quantitative Auswertung..... | 2-67 |
| 2.2.14 | β -Glucuronidase-Test..... | 2-68 |
| 2.2.14.1 | Histologischer GUS-Test | 2-68 |
| 2.2.14.2 | Quantitative GUS-Bestimmung | 2-70 |
| 2.3 | Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> | 2-72 |
| 2.3.1 | Anzucht und Vermehrung im Gewächshaus | 2-72 |
| 2.3.2 | <i>In vitro</i> -Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 2-73 |
| 2.3.3 | Saatgutlagerung..... | 2-76 |
| 2.3.4 | Pflanzenschutz | 2-76 |
| 2.3.5 | <i>Arabidopsis</i> Transformation..... | 2-77 |
| 2.3.5.1 | Stabile Transformation..... | 2-77 |
| 2.3.5.2 | Transiente Transformation..... | 2-82 |
| 2.3.6 | GFP-Detektion..... | 2-83 |
| 2.3.7 | Induktionstests mit <i>AtPLA</i> -Promoter:: <i>uidA</i> -Pflanzen..... | 2-84 |

| | | |
|-----------|---|-------|
| 2.3.7.1 | Induktion durch Hormone und andere biologisch aktive Signalsubstanzen..... | 2-84 |
| 2.3.7.2 | Induktion durch physikalische Einflüsse und Nährstoffmangel | 2-86 |
| 2.4 | Anhang..... | 2-87 |
| 2.4.1 | Software..... | 2-87 |
| 2.4.2 | Programme und Datenbanken im Internet..... | 2-87 |
| 2.4.3 | Geräte..... | 2-88 |
| 2.4.4 | Firmenverzeichnis..... | 2-89 |
| 3 | Ergebnisse..... | 3-93 |
| 3.1 | Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> | 3-93 |
| 3.1.1 | Vektorkonstrukte für die Überexpression rekombinanter Proteine..... | 3-94 |
| 3.1.2 | Überexpression und Reinigung des rekombinanten Enzyms I _{kurz} | 3-95 |
| 3.1.3 | Überexpression und Reinigung der rekombinanten Enzyme IIA und IVA..... | 3-101 |
| 3.1.4 | Enzymaktivität rekombinanter Proteine | 3-102 |
| 3.1.4.1 | Renaturierung des rekombinanten Enzyms I _{kurz} | 3-103 |
| 3.1.4.2 | Enzymaktivität des rekombinanten Enzyms IIA | 3-105 |
| 3.1.4.3 | Enzymaktivität des rekombinanten Enzyms IVA..... | 3-110 |
| 3.2 | Transkriptionelle Regulation von <i>AtPLA</i> -Genen | 3-114 |
| 3.2.1 | Isolierung genomischer Klone aus der Lambda ZAP [®] -II-Bibliothek (Stratagene)..... | 3-115 |
| 3.2.2 | Promoter-Reporter-Konstrukte für die Pflanzentransformation..... | 3-119 |
| 3.2.2.1 | Promoter:: <i>gfp</i> :: <i>uidA</i> -Konstrukte..... | 3-120 |
| 3.2.2.2 | Promoter:: <i>uidA</i> -Konstrukte..... | 3-121 |
| 3.2.3 | Pflanzentransformation | 3-123 |
| 3.2.3.1 | Transiente Pflanzentransformation | 3-123 |
| 3.2.3.2 | Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i> und Transformationseffizienz | 3-124 |
| 3.2.4 | GFP-Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 3-127 |
| 3.2.5 | Histologische Untersuchung der <i>AtPLA</i> -Promoteraktivitäten und Analyse der Promotersequenzen | 3-128 |
| 3.2.5.1 | Der <i>AtPLA</i> I-Promoter PI | 3-131 |
| 3.2.5.1.1 | Entwicklungsabhängige Expression von PI:: <i>uidA</i> | 3-131 |
| 3.2.5.1.2 | Sequenzanalyse von PI..... | 3-134 |
| 3.2.5.2 | Der <i>AtPLA</i> IIA-Promoter PIIA | 3-135 |
| 3.2.5.2.1 | Entwicklungsabhängige Expression von PIIA:: <i>uidA</i> | 3-135 |

| | | |
|-----------|---|-------|
| 3.2.5.3 | Der <i>AtPLA</i> IVA-Promoter PIVA..... | 3-139 |
| 3.2.5.3.1 | Entwicklungsabhängige Expression von PIVA:: <i>uidA</i> | 3-139 |
| 3.2.5.3.2 | Sequenzanalyse von PIVA | 3-142 |
| 3.2.5.4 | Der <i>AtPLA</i> IVC-Promoter PIVC..... | 3-145 |
| 3.2.5.4.1 | Entwicklungsabhängige Expression von PIVC:: <i>uidA</i> | 3-145 |
| 3.2.6 | Induktion der Promotoren | 3-148 |
| 3.2.6.1 | PIIA reagiert auf Signale der Pathogenabwehr, Verwundung und Nährstoffmangel | 3-150 |
| 3.2.6.1.1 | Induktionsanalyse von PIIA mit dem histologischen GUS-Test..... | 3-150 |
| 3.2.6.1.2 | Induktionsanalyse mit dem quantitativen GUS-Test..... | 3-152 |
| 3.2.6.1.3 | Sequenzanalyse von PIIA..... | 3-156 |
| 3.2.6.2 | PIVC reagiert auf ABA und Trockenstress | 3-158 |
| 3.2.6.2.1 | Induktionsanalyse von PIVC mit dem histologischen GUS-Test..... | 3-158 |
| 3.2.6.2.2 | PIVC Sequenzanalyse | 3-160 |
| 4 | Diskussion | 4-162 |
| 4.1 | Enzymaktivität rekombinanter <i>AtPLA</i> -Gene..... | 4-162 |
| 4.1.1 | Enzym IIA/Enzym IVA besitzen Phospholipase A ₁ /A ₂ Aktivität..... | 4-164 |
| 4.2 | Transkriptionelle Regulation von vier Mitgliedern der <i>AtPLA</i> -Genfamilie | 4-167 |
| 4.2.1 | Transkriptionelle Regulation durch den <i>AtPLA</i> I-Promoter (PI) | 4-168 |
| 4.2.2 | Transkriptionelle Regulation durch den <i>AtPLA</i> IIA-Promoter (PIIA)..... | 4-171 |
| 4.2.2.1 | PIIA:: <i>uidA</i> -Expression reagiert auf Verwundung und auf Signale der Pathogenabwehr und Verwundung | 4-172 |
| 4.2.2.2 | Eisen- und Phosphatmangel induzieren organspezifische GUS-Aktivität in PIIA:: <i>uidA</i> Pflanzen..... | 4-176 |
| 4.2.3 | Transkriptionelle Regulation durch den <i>AtPLA</i> IVA-Promoter (PIVA)..... | 4-177 |
| 4.2.4 | Transkriptionelle Regulation durch den <i>AtPLA</i> IVC-Promoter (PIVC) | 4-178 |
| 4.2.4.1 | PVC:: <i>uidA</i> Expression reagiert auf Abscisinsäure und Trockenstress... | 4-180 |
| 5 | Zusammenfassung | 5-182 |
| 6 | Literatur | 6-184 |

1 Einleitung

Die Phospholipasen sind eine Gruppe von Enzymen, die über ihre Aktivität am Substrat Phospholipid definiert werden. Je nach Reaktionsort werden die Phospholipide spaltenden Enzyme als Phospholipase A_{1/2}, C oder D bezeichnet (Abb. 1.1). Phospholipide bestehen aus fünf Komponenten. Das Grundgerüst bildet ein Glycerin-Molekül, mit dessen C₁- und C₂-Atom jeweils eine Fettsäure verestert ist. Mit dem C₃-Atom ist ein Phosphorsäurerest verestert, der wiederum mit einem komplexen Alkohol als Kopfgruppe verestert ist. Der amphiphile Charakter der Phospholipide ermöglicht die Aneinanderlagerung zu Doppellamellen, die in der Zelle das Grundgerüst der Biomembranen bilden. Die Fettsäuren und Kopfgruppen als Komponenten der Phospholipide variieren. Die Fettsäuren unterscheiden sich in der Anzahl der Kohlenstoffatome (Palmitinsäure 16:0, Stearinsäure 18:0) und dem Grad der Sättigung (z.B. Linolsäure 18:2, Linolensäure 18:3). Hinzu kommen die verschiedenen Kopfgruppen (Inositol, Ethanolamin, Cholin, Glycerol, Serin), die zusammen mit den Fettsäuren die Spezifität und damit die Aktivität der einzelnen Phospholipasen für das jeweilige Lipid beeinflussen. Die Gehalte der verschiedenen Phospholipide variieren zwischen den Biomembranen in der Zelle sowie dem tierischen und dem pflanzlichen System.

Neben dem Phospholipid-Umbau im Grundmetabolismus sind die Phospholipasen über die Freisetzung von Lipidmetaboliten an der Regulation zellphysiologischer Prozesse beteiligt. Die Reaktionsprodukte haben dabei die Funktion von sekundären Botenstoffen (*second messenger*), z.B. Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃), das Ca²⁺-Kanäle öffnet. Sie können auch als Ausgangsverbindung für die Biosynthese von Signalmolekülen z.B. Lysophosphatidylcholin dienen (s.u.).

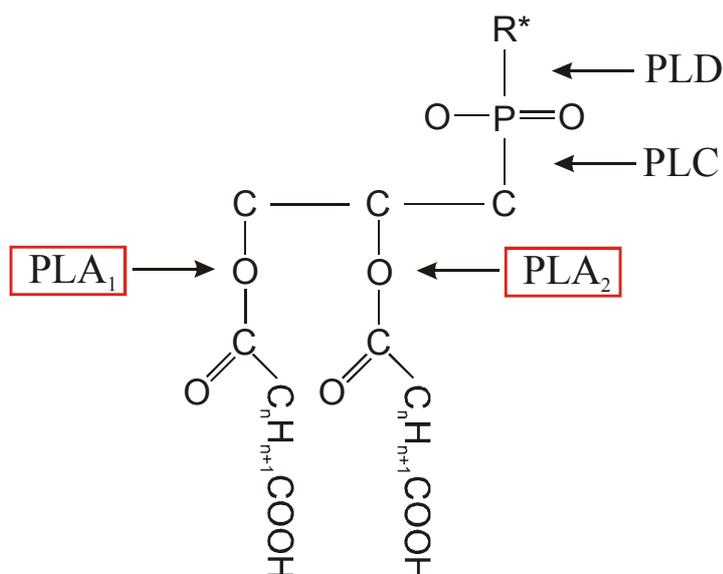


Abbildung 1.1: Schema eines Phospholipids mit den Reaktionsorten verschiedener Phospholipasen. R* = variable Kopfgruppe.

In der vorliegenden Arbeit kommt dem Phospholipase-A-Typ eine zentrale Rolle zu und dies wird im Folgenden näher erläutert.

Die Phospholipase A ist eine Acyl-Hydrolase (o. Carbonsäureesterase) und spaltet die Esterbindung am C₁- oder C₂-Atom des Glycerins im Phospholipid (Abb. 1.1). Als Reaktionsprodukte treten nach dem folgenden Reaktionsschema freie Fettsäure und Lysophospholipid auf:



Als erstes beschrieben und bisher am besten untersucht sind die Phospholipase A-Enzyme aus dem tierischen System. Da sie eine Präferenz für die Spaltung der Fettsäure an der *sn*-2-Position besitzen, werden sie als Phospholipasen A₂ (PLA₂) bezeichnet, für viele Mitglieder wurden aber auch andere Aktivitäten wie PLA₁, Lysophospholipase A₁/A₂, Transacylase oder Acyl-Transferase gezeigt (Tang et al., 1997; Lio und Dennis, 1998). Neben den PLA₂-Enzymen aus dem tierischen System wurden PLA₂-Enzyme in Pilzen (inkl. Hefe), Bakterien und Pflanzen identifiziert (Six und Dennis, 2000). Im tierischen System existiert eine Vielzahl von Proteinen mit Phospholipase-A₂-Aktivität (EC 3.1.1.4), die zu einer Enzym-Familie zusammengefasst sind. Sie lassen sich in vier Gruppen einteilen, die sich untereinander in der Proteingröße, der Aminosäuresequenz, der Lokalisation in der Zelle und den Reaktionsbedingungen unterscheiden. In Tabelle 1.1 sind die Gruppen mit ihren

wesentlichen Charakteristiken dargestellt. Die Regulation der Enzyme erfolgt z.B. über Cytokine (Interleukin, TNF, PAF), die an Membranrezeptoren (G-Protein gekoppelte Tyrosinkinase-Rezeptoren) binden und nach Stimulus PLA₂-Enzyme aktivieren.

Tabelle 1.1: Phospholipase A₂ (PLA₂)-Gruppen; sekretorische PLA₂ (sPLA₂), cytosolische PLA₂, Calcium-unabhängige PLA₂, *platelet-activating factor* hydrolysierende PLA₂ (PAF-PLA₂).

| | Größe (kDa) | aktives Zentrum | Lokalisation | Ca ²⁺ -Bedarf |
|----------------------|-------------|-----------------|--------------|--------------------------|
| sPLA ₂ | 13-15 | His-Asp-Paar | sezerniert | mM |
| cPLA ₂ | 65-114 | GXSGS | cytosolisch | μM |
| iPLA ₂ | 40-90 | GXSXG | cytosolisch | - |
| PAF-PLA ₂ | 29-45 | GXSXG | cytosolisch | - |

In tierischen Zellen wird in Signaltransduktionsreaktionen vorwiegend Arachidonsäure als freie Fettsäure durch die PLA₂-Aktivität abgespalten. Sie dient als Ausgangsverbindung für Eicosanoide, die über den Cyclooxygenase-Weg zu Prostaglandinen und Thromboxanen oder über den Lipoxygenase-Weg zu Leukotrienen umgebaut werden. Eicosanoide sind Mediatoren, die an einer Vielzahl von Prozessen wie Blutdruckregulation, Entzündungsreaktionen oder Thrombozyten-Aggregation beteiligt sind. Freie Fettsäuren aktivieren zudem K⁺-Kanäle, Phospholipase D oder verschiedene Proteinkinase C-Isoformen. Lysophospholipide als zweite Reaktionsprodukte sind Signalmoleküle, die im Zuge von Entzündungsreaktionen oder der Immunantwort an G-Protein-gebundene Rezeptoren binden und somit Folgereaktionen auslösen (Gräler und Goetzl, 2002). Als Vorstufe des *platelet activating factors* (PAF) sind sie auch indirekt an pathologischen Reaktionen (Entzündung, Allergie) beteiligt (Tjoelker und Stafforini, 2000).

Die sekretorischen PLA₂-Enzyme sind am längsten bekannt und wurden in Bienen- und Schlangengift, später auch in Pankreassekret, identifiziert. Sie besitzen 6 bis 8 Disulfidbrückenbindungen und werden über ein Signalpeptid von der Zelle sezerniert, wo sie relativ unspezifisch Phospholipide spalten und Bestandteil des Verdauungsvorganges sind. Aufgrund erhöhter Expression von sPLA₂s in Zellen des Immunsystems und Macrophagen während Infektionen oder Entzündungsreaktionen wird auch eine Funktion in der Pathogenabwehr angenommen (Chaminade et al., 1999; Nevalainen et al., 2000). In dem pflanzlichen System sind aus Ulme (Stähl et al., 1998), Nelke (Kim et al., 1999) und Reis (Stähl et al., 1999) ebenfalls Gene isoliert worden, die in Größe und Phospholipase-A₂-

Aktivität den tierischen sPLA₂-Enzymen ähneln, deren Funktionen aber in der Pflanze nicht bekannt sind. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind auch mögliche sPLA₂s vorhanden, die aber bisher noch nicht isoliert und charakterisiert wurden.

Die cytosolischen PLA₂s (cPLA₂) besitzen ein katalytisches Zentrum vom Serin-Typ (GXSGS) und sind mit 65 bis 114 kDa wesentlich größer als die sPLA₂. Über die Freisetzung von Arachidonsäure sind sie zusammen mit einigen sPLA₂-Enzymen unter anderem an der Eicosanoidsynthese beteiligt (Murakami et al., 1998) und werden durch Hormone und Wachstumsfaktoren transkriptionell und posttranskriptionell (Ca²⁺, Phosphorylierung, G-Proteine) reguliert (Serhan et al., 1996; Balsinde et al., 1999). Mit Ausnahme eines Mitgliedes besitzen die cPLA₂-Enzyme eine C2-Domäne, die Calcium bindet und die Translokation des Enzyms an die Lipidmembran ermöglicht und somit zu einer calcium-abhängigen Aktivierung im mikromolaren Bereich führt. In der Pflanze wurde bisher kein Protein identifiziert, das der humanen cPLA₂ ähnelt (Holk et al., 2002).

Die calcium-unabhängigen Phospholipasen A₂ (iPLA₂) befinden sich ebenfalls im Cytosol, besitzen aber ohne Calcium ihre volle Aktivität. Das katalytische Zentrum stimmt mit dem allgemeinen Lipasemotiv, GX SXG, überein und andere Sequenzbereiche ermöglichen es, die iPLA₂ von allen anderen PLA₂s abzugrenzen (s.u.). Die Funktionen der iPLA₂-Enzyme liegen vermutlich überwiegend in der Umbildung von Phospholipiden, aber auch eine Beteiligung an physiologischen Prozessen und der Signaltransduktion, wie bei den cPLA₂s, wird angenommen (Winstead et al., 2000, Balsinde, 2002). Die vierte PLA₂-Gruppe besitzt ebenfalls das Lipasemotiv als aktives Zentrum und spaltet von PAF die Fettsäure an der *sn*-2 Position ab. PAF ist ein dem Phosphatidylcholin ähnliches Etherlipid, in dem statt einer Fettsäure an der *sn*-1 Position eine aliphatische Kette über eine Etherbindung gebunden ist, während die *sn*-2-Position mit Essigsäure verestert ist. PAF-PLA₂ ist an diversen Krankheitsprozessen wie Entzündungen oder Asthma beteiligt, in denen ihre Aktivität/Expression hoch- oder herunterreguliert wird (Tjoelker und Stafforini, 2000).

Analog zur Vielzahl an Prozessen im tierischen System, an denen PLA₂s beteiligt sind, existieren, wie dargestellt, eine Vielzahl unterschiedlicher Phospholipase A₂-Enzyme, deren Funktionsbereiche sich teilweise überlagern oder deren Bedeutung noch nicht oder unvollständig erforscht ist. Bei den Prokaryoten besitzen einige gram-negative Bakterien eine Phospholipase A in der äußeren Membran, die aber keine Homologien zu den tierischen PLA₂s besitzt (Snijder et al., 2001).

In der Pflanze existieren ebenfalls Enzyme mit Phospholipase A₂-Aktivität, wie zunächst mit biochemischen Methoden gezeigt wurde (Galliard, 1971; Moreau und Morgan,

1988). Parallel zum tierischen System ist eine pflanzliche PLA₂-Aktivität an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. An isolierten Membranvesikeln aus Hypocotylen von Zucchini und Sonnenblume und aus Zellen der Sojabohne wurde eine PLA₂-Aktivierung durch Auxin gemessen (Scherer und André, 1989; Scherer und André, 1993; Scherer, 1995). Die Aktivierung erfolgte im Minutenbereich, bei niedrigen Hormon-Konzentrationen bis 2×10^{-8} M und war spezifisch für aktives Auxin. Diese *in vitro*-Daten wurden bestätigt, indem eine auxin-induzierte PLA₂-Aktivität auch *in vivo* mit Zellkulturen der Petersilie und Sojabohne und in Hypocotyl-Segmenten von Sonnenblume und Zucchini detektiert wurde (Scherer, 1995; Paul et al., 1998; Scherer et al., 2000). Eine physiologische Funktion von Auxin ist die Induktion von Zellstreckungswachstum durch die Zellwandlockerung über die Aktivierung der Protonensekretion. Der erhöhte H⁺-Efflux führt durch die Ansäuerung des Apoplasten dazu, zellwand-lösende Enzyme zu aktivieren (Taiz und Zeiger, 1998). In Übereinstimmung mit diesem Mechanismus konnte gezeigt werden, dass freie Fettsäure (FA) und Lysophosphatidylcholin (LPC) H⁺-ATPasen aktivieren (Palmgren und Sommarin, 1989; Yi et al., 1996) und eine Erhöhung der Zellelongation induzieren können (Yi et al., 1996). In der Umkehrung ließ sich die auxin-induzierte Zellelongation durch PLA₂-Inhibitoren aus dem tierischen System hemmen (Yi et al., 1996; Scherer und Arnold, 1997). Dass die Ansäuerung des Apoplasten auf direkte Regulation von H⁺-ATPasen durch FA oder LPC zurückzuführen ist, wurde nicht gezeigt. Nach neueren Vorstellungen reguliert insbesondere FA Ionen-Kanäle und als Folge der Depolarisation durch deren Aktivierung kommt es zu einer höheren H⁺-ATPase-Aktivität, um das Ionengefälle auszugleichen. Eine weitere Funktion besitzt Auxin im Gravitropismus der Pflanze. Indizien, dass auch dort eine Phospholipase A an der Signaltransduktion beteiligt ist, haben Kato et al. (2002) erbracht. Sie haben eine Mutante identifiziert, dessen defektes Gen (*sgr2*) Homologie zu einer Phospholipase A₁ aus dem Rind besitzt, dessen Enzymaktivität aber noch nicht überprüft wurde. Auf welche Weise die Aktivierung einer Phospholipase A₂-Aktivität in der Auxin-Signaltransduktion abläuft, ist bisher nicht genau bekannt, jedoch deuten einzelne Ergebnisse auf die Beteiligung eines *auxin binding protein 1* (ABP1) hin oder eines G-Proteins auf der Rezeptorseite („oberhalb“) der Phospholipase A₂ (Scherer, 2002). Andererseits haben Van der Hoeven et al. (1996) gezeigt, dass freie Fettsäure Proteinkinasen als Folgeglied einer Signalkette aktiviert.

Neben dem Auxin-Weg sind Phospholipase A-Enzyme auch an der Pathogenabwehr der Pflanze beteiligt. Chandra et al. (1996) haben an Sojazellen gezeigt, dass eine Phospholipase A durch Elicitoren induziert wird und an der Bildung von H₂O₂ und anderen aktivierten Sauerstoffspezies als Abwehrreaktion (*oxidative burst*) beteiligt ist. Elicitor-

induzierte PLA-Aktivität wurde auch an *Eschscholtzia*-Zellen (Roos et al., 1999) gezeigt, mit einem nachfolgenden Efflux von Na⁺-Ionen aus der Vakuole in das Cytoplasma, was über einen Gegenstrom von Protonen zur Auslösung eines pH-Signals führte (Viehweger et al., 2002). An Petersilien-Zellen (Scherer et al., 2000) und in der Tomate 15 und 60 Min. nach Applikation (Narváez-Vásquez et al., 1999) erfolgte ein elicitor-induzierter FA und/oder LPC Anstieg. In Analogie zu dem Eicosanoid-Weg im tierischen System dienen von der Membran abgespaltene freie Fettsäuren (α -Linolensäure) als Substrat für den Octadecanoid-Weg, der zur Biosynthese von Oxylipinen wie 12-Oxo-10,15(Z)-Phytodien Säure (OPDA) oder Jasmonsäure (JA) führt und als Signalmoleküle die Synthese von antibiotischen Substanzen oder die Expression von Abwehrgenen regulieren (Farmer, 1994; Bleichert et al., 1995; León et al., 2000; Ryan, 2000; Schaller, 2001). Möglicherweise ist es eine Phospholipase A, die durch die Reaktion am Phospholipid die Fettsäure freisetzt. So wurde an diversen Pflanzenarten festgestellt, dass nach Verwundung oder Elicitor-Behandlung vermehrt freie Fettsäure und Lysophospholipid gebildet wird, vor oder begleitet von einer Neusynthese des Pflanzenhormons Jasmonat (Mueller, 1993; Bleichert et al., 1995; Conconi et al., 1996; Lee et al., 1997). Dhondt et al. (2000) haben an mit Tabakmosaikvirus infizierten Blättern vor einem Anstieg an OPDA- und JA-Gehalten eine Erhöhung der PLA₂-Aktivität gemessen, was den Zusammenhang von freigesetzter Fettsäure und der Biosynthese von Oxilipiden bekräftigt. In derselben Arbeit wurden zwei Gene mit Homologien zu den Patatinen (Speicherproteine mit Acyl-Hydrolase Aktivität aus der Kartoffel) aus den infizierten Blättern isoliert (*NtPAT1* und *NtPAT3*) und zusammen mit einem dritten Protein (*NtPat2*) deren PLA₂-Aktivität demonstriert. Über RT-PCR wurde zudem gezeigt, dass vor einem Anstieg der PLA₂-Aktivität als Reaktion auf die Infektion mit Tabakmosaikvirus alle drei Gene transkriptionell hochreguliert werden. In Tomatenblättern wurde nach Verwundung ebenfalls ein Anstieg der PLA-Aktivität gemessen, wobei die Reaktion lokal sowie systemisch an unverletzten Blättern der selben Pflanze auftrat (Narváez-Vásquez et al., 1999). Jasmonsäure ist ebenfalls an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Keimung, Expression vegetativer Speicherproteine und der Blütenentwicklung beteiligt (Creelman und Mullet, 1997), wobei in der Blütenentwicklung bereits die Beteiligung einer Phospholipase A nachgewiesen wurde. So haben Ishiguro et al. (2001) eine Phospholipase A₁-Mutante (*dad1*) in *Arabidopsis* identifiziert, die in der Pollenentwicklung, dem Öffnen der Anthere und dem Öffnen der Blüte gestört ist. Die Mutante hatte verringerte Jasmonatgehalte in der Infloreszenz. Der Phänotyp der Mutante ließ sich durch Applikation von Jasmonsäure oder α -Linolensäure revertieren,

woraus geschlossen wurde, dass DAD1 das Substrat für die JA-Biosynthese liefert und somit an der Steuerung der Blütenentwicklung beteiligt ist.

Die Funktion einer Phospholipase A in der pflanzlichen Signaltransduktion ist aber nicht nur auf die mögliche Bereitstellung des Substrates für den Octadecanoid-Weg beschränkt, sondern freie Fettsäure und Lysophospholipid sind wie im tierischen System *second messenger*, die direkt die Funktion von Enzymen oder Kanälen beeinflussen. Lysophosphatidylcholin und freie Fettsäure resultieren in einer Erhöhung von Protonen-ATPasen (Palmgren et al., 1988; Palmgren und Sommarin, 1988). Lysophosphatidylcholin kann ebenfalls über die Aktivierung eines H^+/Na^+ -Antiporters aus der Vakuole pH-Signale induzieren (Viehweger et al., 2002). Freie Fettsäure aktiviert zudem Proteinkinasen (Van der Hoeven et al., 1996), K^+ -Kanäle, NADH-Oxidase (Munnik et al., 1998) und reguliert die Aktivität einer Proteinphosphatase 2C, die wiederum einen MAPK-Signaltransduktionweg beeinflusst (Baudouin et al., 1999).

In der Pflanze sind neben den bereits erwähnten ca. 14 kDa großen PLA_2 s, die homolog zu den sekretorischen PLA_2 s sind eine ganze Reihe von Genen mit Homologien zu den patatin-ähnlichen PLAs isoliert worden, z.B. aus *Cucumis sativus* (May et al., 1998), *Hevea brasiliensis* (Sowka et al., 1998), *Nicotiana tabacum* (Dhondt et al., 2000) und *Vigna unguiculata* (Matos et al., 2001), deren Proteine Phospholipase-A-Aktivität besitzen. Hinzu kommt ein PLA_2 -Enzym aus der Bohne (Jung und Kim, 2000), dessen Gensequenz nicht bekannt ist, aber wie die isolierten Gene mit einer Größe von ca. 48 kDa den Patatinen gleicht. Auch die Patatine aus der Kartoffel wurden als Gene isoliert, und es wurde gezeigt, dass sie Phospholipase-A-Aktivität besitzen (Andrews et al., 1988; Senda et al., 1996; Hirschberg et al., 2001). Die Patatine besitzen ein Signalpeptid und werden als Speicherprotein in die Vakuole transportiert. Für kein PLA -Protein der zuvor genannten Pflanzenarten wurde bisher eindeutig eine cytosolische Lokalisation nachgewiesen. Aus den vorliegenden Daten über die Funktionen von Phospholipase-A-Enzyme in der Pflanze lässt sich das Modell in der Abbildung 1.2 konstruieren. Das Modell simplifiziert vermutlich die tatsächlichen Vorgänge und die durch Pfeile gekennzeichneten Folgeschritte können auch über mehrere Stationen ablaufen, die momentan nicht bekannt sind.

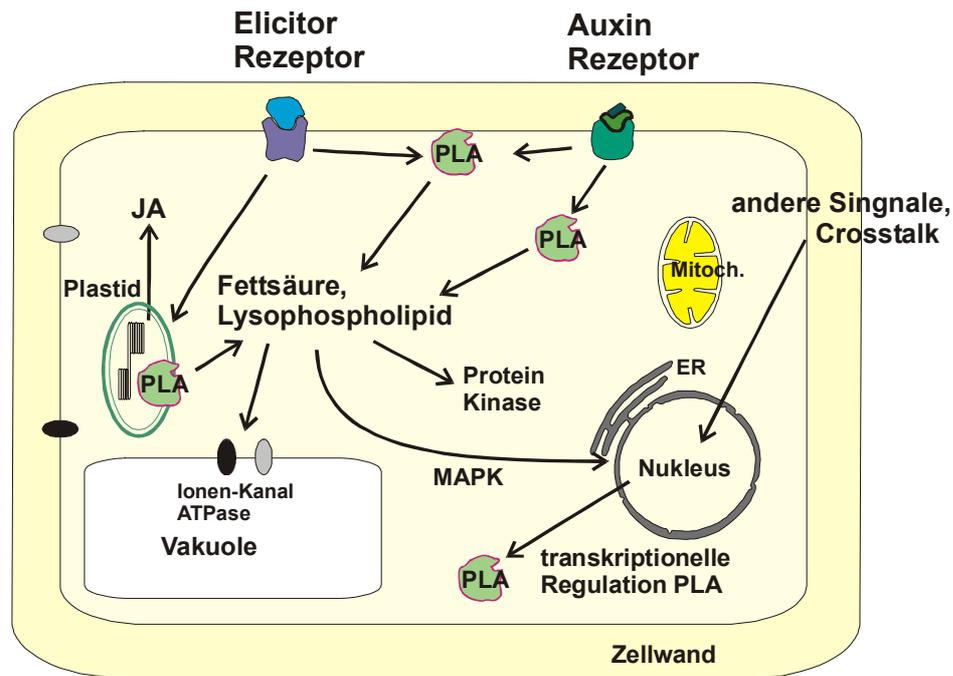


Abbildung 1.2: Modell der Phospholipase A in der pflanzlichen Zelle

Nach dem Modell in Abbildung 1.2 existieren zwei Signalwege, die entweder durch Auxin oder Elicitoren induziert werden. Über einen spezifischen Rezeptor wird das Signal in das Cytosol weitergeleitet, wo verschiedene Phospholipase-A-Proteine an einer Membran oder im Plasma aktiviert werden. Welche Mitglieder der Phospholipase-A-Familie an den unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sind, ist nicht bekannt. Die Reaktionsprodukte freie Fettsäure und Lysophospholipid fungieren als *second messenger* und regulieren weitere Enzyme oder Kanäle, bis hin zur Expression anderer Gene. Die transkriptionelle Regulation der PLAs wird durch verschiedene Signalwege reguliert. Diese Vorgänge sind bisher nicht bekannt und bilden einen Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.1 Die *AtPLA*-Genfamilie

Nachdem auf biochemischem Wege die Existenz einer oder mehrerer pflanzlicher Enzyme mit Phospholipase-A-Aktivität erbracht wurde, begann die Suche nach entsprechenden Genen im Genom von *Arabidopsis thaliana*. In dem zunächst noch unvollständig sequenziertem *Arabidopsis*-Genom wurde mit Hilfe der bekannten Phospholipase-A₂-Proteine aus dem tierischen System nach möglichen PLA₂-Genen in der Internet-Datenbank *Blast Search* (s. Kap. 2.4) gesucht. Da im tierischen System von den verschiedenen Phospholipase-A₂-Gruppen die cPLA₂s maßgeblich an Signaltransduktions-

prozessen beteiligt sind, wurde nach einem äquivalenten Protein in *Arabidopsis* gesucht. Über den Aminosäure-Sequenzvergleich konnte kein hypothetisches cPLA₂-Gen gefunden werden. Statt dessen wurden zu Beginn der Datenbanksuche fünf mögliche PLA-Gene identifiziert, die Homologien zu den calcium-unabhängigen Phospholipase A₂s (iPLA₂) aus dem tierischen System besitzen. Die Homologien sind in der Abbildung 1.3 dargestellt und beziehen sich im wesentlichen auf fünf Bereiche innerhalb der Primärstruktur der Proteine, die es ermöglichen, die iPLA₂ von allen anderen bekannten Phospholipase A₂-Enzymen abzugrenzen.

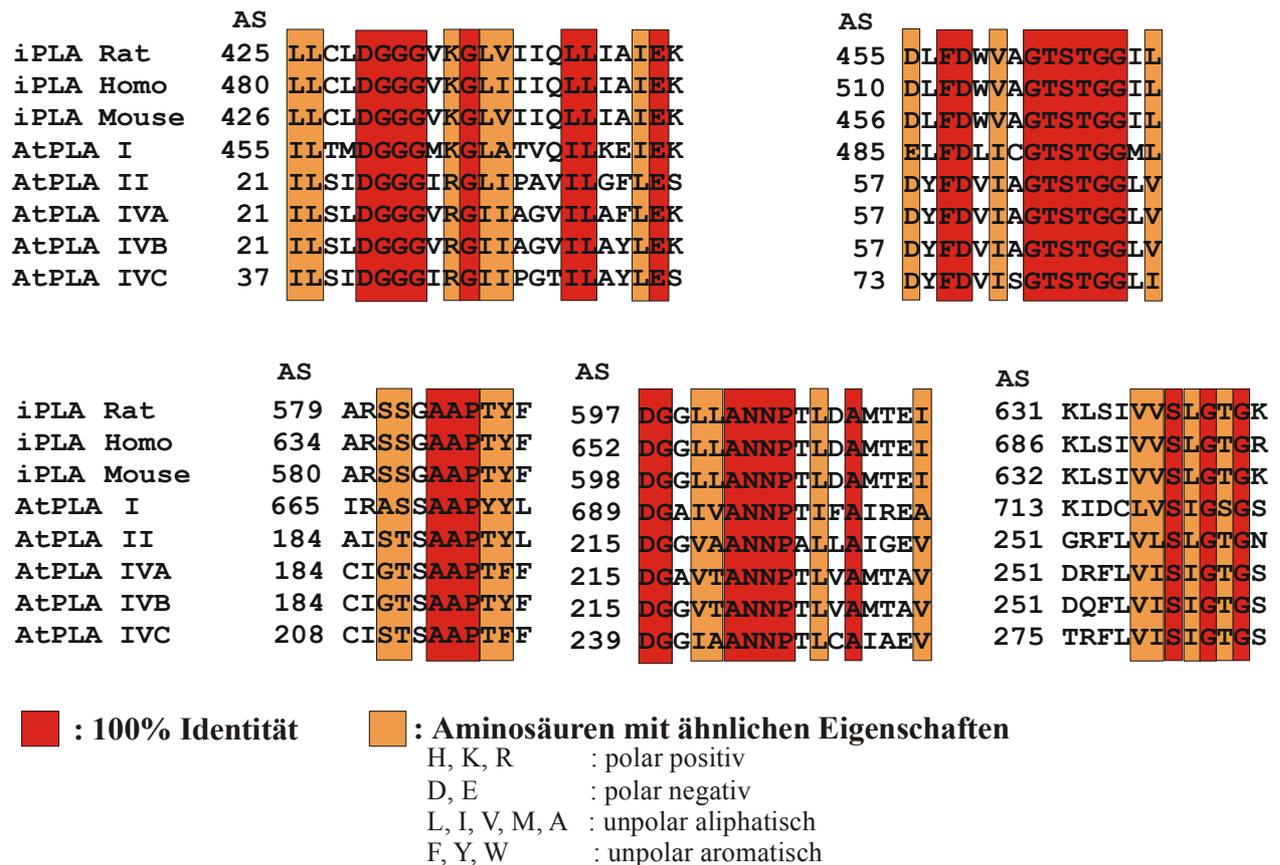


Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz-Vergleich nach PROTOMAT / GIBBS (Henikoff et al., 1995; <http://blocks.fhrc.org>). iPLA *Rattus norvegicus*, Accession P97570 (Ma et al., 1997); iPLA *Homo sapiens*: Accession NP_003551 (Tang et al., 1997); iPLA *Mus musculus*: Accession AAF72651.1, Chiu und Jackowski, unpublished; AtPLA I (At1g61850); AtPLA IIA (At2g26560); AtPLA IVA (At4g37070); AtPLA IVB (At4g37060); AtPLA IVC (At4g37050).

Der zweite Block des Sequenz-Vergleiches enthält das konservierte Lipase-Motiv GX SXG, das ebenfalls über alle hier untersuchten *Arabidopsis*-Sequenzen identisch ist. Die Nomenklatur der identifizierten *Arabidopsis*-Gene beinhaltet die Anfangsbuchstaben des Organismus (A.t.) und eine Abkürzung der Enzymfunktion (PLA), wobei die ersten beiden

Buchstaben (At) kursiv geschrieben werden, wenn das Gen gemeint ist und normal wenn von dem zugehörigen Protein die Rede ist. Die römische Zahl im Namen der Gene steht für das Chromosom, auf dem sich das Gen befindet. Bei Mehrfachbelegung des Chromosoms wird die Zahl durch einen lateinischen Buchstaben ergänzt. Wie die bereits angeführten Phospholipasen A aus anderen Pflanzenarten, besitzen die AtPLA-Proteine Homologien zu den Patatinen. Im Gegensatz zu den Patatinen besitzen sie jedoch kein Signalpeptid, und für vier Mitglieder wurde bereits über GFP-Fusionsproteine die cytosolische Lokalisation nachgewiesen (Holk et al., 2002). Der cytosolische Charakter der AtPLA-Proteine ist von Bedeutung, da nach Genen gesucht wurde, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind.

Nach der vollständigen Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms im Jahr 2000 wurden fünf weitere Mitglieder identifiziert, die sich über alle fünf Chromosomen verteilen. Nach Holk et al. (2002) lässt sich diese AtPLA-Genfamilie in drei Gruppen unterteilen, die sich in der Intron/Exon-Struktur, der Aminosäuresequenz und ihrer Größe unterscheiden (Abb. 1.4).

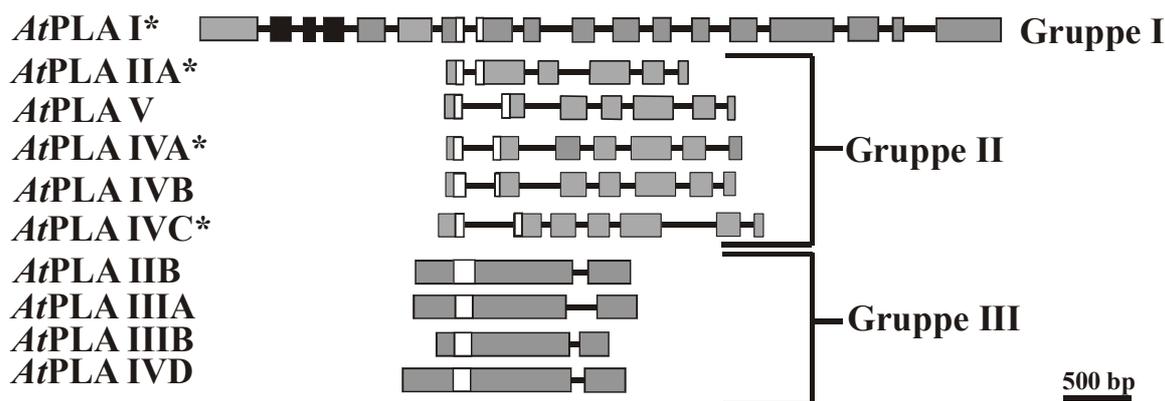


Abbildung 1.4: Intron/Exon Struktur der AtPLA-Genfamilie. Aus Holk et al. (2002). Helle Box = aktives Zentrum, * siehe Text. Zugangs-Nummern in der Datenbank: AtPLA I (At1g61850), AtPLA IIA (At2g26560), AtPLA IIB (Atg39220), AtPLA IIIA (At3g54950), AtPLA IIIB (At3g63200), AtPLA IVA (At4g37070), AtPLA IVB (At4g37060), AtPLA IVC (At4g37050), AtPLA IVD (At4g29800), AtPLA V (At5g43590).

Die erste Gruppe besteht aus einem Gen von Chromosom eins, das neben dem phospholipase-homologen Bereich noch eine leucinreiche Region am N-Terminus (Exons 2 - 4) und eine saure Domäne am C-Terminus besitzt. Die Umgebung des katalytischen Zentrums (GX SXG) ist durch eine weiße Box gekennzeichnet und verteilt sich in den Gruppen I und II auf zwei Exons. Die dritte Gruppe besitzt gegenüber den 6 bis 7 Exons der zweiten Gruppe nur zwei

Exons. Zu Beginn der Datenbanksuche wurden, wie in Abbildung 1.2 gezeigt, zunächst fünf Mitglieder der *AtPLA*-Familie (*AtPLA* I, IIA, IVA, IVB und IVC) identifiziert. Die in der Abbildung 1.4 mit einem Stern markierten Gene wurden in der Folge bearbeitet und nur *AtPLA* IVB wurde auf Grund sehr hoher Homologie zu *AtPLA* IVA ausgelassen, um den zeitlichen Aufwand zu begrenzen.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifizierung der *AtPLA*-Genfamilie basiert auf dem Vergleich von den durch Computerprogrammen interpretierten Leserastern im *Arabidopsis*-Genom mit bekannten PLA₂-Proteinen, anhand dessen auf eine mögliche Funktion geschlossen werden kann. Diese theoretische Überlegung muss aber nicht zwangsläufig mit der postulierten Enzymaktivität und der vermuteten Funktion in der Pflanze übereinstimmen. Die alleinige Detektion eines von genomischer Sequenz abgeleiteten möglichen Proteins lässt keine Aussage darüber zu, ob das Gen tatsächlich exprimiert wird und welche Aufgabe es in der Pflanze hat. Zur Klärung dieser Thematik für die Gene *AtPLA* I, *AtPLA* IIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVC sollten diese mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersucht werden. Dies beinhaltet zunächst die Isolierung der korrespondierenden cDNAs und Promotoren, um darauf aufbauend die Genregulation, Enzymaktivität und Funktion in der Pflanze zu untersuchen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die transkriptionelle Regulation der vier *AtPLA*-Gene zu untersuchen und anhand der bereits vorhandenen cDNAs die enzymatische Phospholipase-A-Aktivität zu überprüfen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Grundlagen zur Durchführung der im Ergebnisteil dargestellten Experimente beschrieben. Die Gliederung der Methoden erfolgt entsprechend den einzelnen Fachgebieten in molekularbiologische und biochemische Arbeiten, sowie in einen *Arabidopsis* bezogenen Teil.

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten stellen im wesentlichen Methoden da, die auf der Bearbeitung von Nukleinsäuren basieren. Es lässt sich nicht vermeiden, in diesem Teil der Arbeit die Schilderung der Methoden und der Resultate, nämlich die Herstellung von neuen Vektorkonstrukten und Bakterienstämmen, gleichzeitig darzustellen. Dies ist in internationalen Publikationen, genau so wie hier, üblicherweise im Methodenteil angeführt.

2.1.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Amplifikation von einzel- oder doppelsträngiger DNA durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wird in dieser Arbeit im wesentlichen für zwei verschiedene Anwendungen genutzt. Erstens dient die PCR dem qualitativen Nachweis eines DNA Fragmentes. Beispiele hierfür sind die Durchsuchung (screening) der Lambda Phagen Bank (s. Kap. 2.1.2) oder die Überprüfung von Klonierungen. Zweitens werden definierte DNA Bereiche mit Hilfe der PCR vermehrt und deren Amplikons als Ausgangsmaterial für die Klonierung in Vektoren genutzt, wie bei der Erstellung der Promoterkonstrukte und der GFP-GUS-Hybridkonstrukte. Auf das Prinzip und die Funktionsweise der Polymerase Ketten Reaktion wird hier nicht weiter eingegangen, da dies Gegenstand zahlreicher Lehrbücher ist (z.B. Twyman, 1999).

2.1.1.1 PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase

Kommerziell erhältliche *Taq*-DNA-Polymerase ist die rekombinante Form des natürlichen Enzyms aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, exprimiert in *Escherichia coli* (*E. coli*). Die *Taq*-Polymerase wird häufig in Standard PCRs eingesetzt und amplifiziert je nach Anbieter Fragmentlängen bis 15 kb. Auf Grund der fehlenden 3' - 5' Exonuklease-Aktivität ist sie nicht für PCR Anwendungen geeignet, in denen es auf eine geringe Fehlerrate ankommt. Nach anfänglichem Wechseln der Anbieter (Boehringer, Quiagen, Eurogentec) wurde die Verwendung der *Gold*-Polymerase der Firma Hybaid im Labor etabliert. Deoxynucleosid-triphosphate (dNTP's) und die 0,2 ml Reaktionsgefäße wurden vom selben Anbieter bezogen. Die verwendeten Primer wurden zu Beginn von der Firma Roth synthetisiert und später auch von Eurogentec. Im Folgenden wird exemplarisch das PCR Protokoll der *Gold*-Polymerase angeführt mit einer anschließenden kurzen Darstellung der einzelnen Komponenten zusätzlich zu den dNTP's und der DNA-Polymerase.

Protokoll:

Reaktionsmix (ein Reaktionsansatz = 30 µl):

| eingesetzt | Endkonzentration |
|---|----------------------|
| 0,6 µl dNTP's (40 mM) | 800 µM |
| 0,6 µl je Primer (10 pmol/µl) | 0,2 pmol/µl = 200 nM |
| 3,0 µl 10x Puffer | 1x Puffer |
| 0,2 µl <i>Gold</i> -Polymerase (5 u/µl) | 1 u/Reaktion |
| 1,0 µl Template (100 ng/µl) | 3,3 ng/µl |
| <u>X µl H₂O</u> | |
| 30 µl | |

Programm im Thermocycler:

1. 2 Min. 94°C
2. 30 Sek. 94°C Denaturierung
3. 30 Sek. 45-65°C Anlagerung
4. 0,5-2 Min. 72°C DNA-Synthese
5. 10 Min. 72°C

Schritte 2 bis 4 werden 25 – 40 mal wiederholt (= Zyklenzahl)

Es folgen Anmerkungen zu Primern, Reaktionspuffer, Template und H₂O, die bei der Durchführung der PCR hilfreich sein können.

- Primer

Die Oligonukleotide (Primer) sind zwischen 20 bp und 25 bp lang und besitzen ein GC-Verhältnis von 40 bis 60 %. Die Primererstellung wurde mit den Programmen *pc gene* und PRIMER3 (s. Kap. 2.4) durchgeführt. Die Voreinstellungen dieser Programme für weitere Parameter wie z.B. inter- und intramolekulare Kompatibilität wurden nicht verändert. Die Distanz zwischen Plus- und Minus-Primer liegt meist in einem Bereich von 250 bp bis 1 kb, da diese Fragmentgrößen effizient in der PCR amplifiziert werden können und sich leicht im Agarosegel auftrennen lassen.

Die synthetisierten Primer (Roth oder Eurogentec) wurden in sterilem aqua dest. in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst. Von dieser Stammlösung wurde ein Aliquot mit der Verdünnung 1:10 für den normalen Gebrauch erstellt.

- 10x-Puffer

Neben dem vollständigen 10-fach konzentrierten Puffer wird von den Firmen ein 10x-Puffer ohne MgCl₂ plus MgCl₂-Stammlösung mitgeliefert. Da Mg²⁺ als Cofaktor der DNA Polymerase wesentlichen Einfluss auf die Spezifität und die Prozessivität hat, kann je nach Anwendung die PCR Reaktion durch verschiedene MgCl₂-Konzentrationen optimiert werden. Höhere MgCl₂-Konzentrationen erhöhen die Spezifität, verringern aber die Leistungsfähigkeit bezüglich der Fragmentlänge. Die übliche Konzentration im vollständigen Puffer ist 1,5 mM MgCl₂ und wurde stets in allen Reaktionen beibehalten.

- Template

Im Idealfall wird das Template (Plasmid oder genomische DNA) als gereinigte DNA in die PCR Reaktion gegeben (ca. 100 ng/Reaktion). Bei der Durchsichtung der Phagenbibliothek (s. Kap. 2.1.2) oder dem Einsetzen von Bakterienkolonien ist dies nicht der Fall. Um die Zellen bzw. Phagen aufzuschließen und die DNA vollständig zu denaturieren, wird der erste 95°C Schritt vor dem Beginn der Zyklen auf 10-15 Min. ausgedehnt. Da die DNA-Polymerase mit jedem Denaturierungsschritt an Qualität verliert, wird sie erst nach Ablauf des ersten Schrittes zu der PCR Reaktion gegeben. Aus Gründen der Handhabbarkeit geschieht dies in einem Mix aus Polymerase, 10x Puffer und aqua dest. zu einem

Gesamtvolumen von 5 µl je Reaktion. Um den Reaktionsansatz von 30 µl nicht zu überschreiten, werden die Komponenten anteilig vom Prämix subtrahiert.

- H₂O

Die Reaktionsansätze wurden mindestens mit sterilem aqua dest. angesetzt oder besser mit sterilem aqua bidest. Ein zu hoher oder zu niedriger pH-Wert kann trotz eingesetztem Puffer die Funktion der DNA-Polymerase stark beeinflussen.

2.1.1.2 DNA Polymerase mit *proof-reading* Aktivität

Mit der PCR lassen sich definierte Sequenzen amplifizieren, die nachfolgend kloniert werden, um bestimmte Funktionen im Vektor zu erfüllen. Da die Funktion maßgeblich von der Nukleotidsequenz abhängt, wird für derartige PCR-Reaktionen eine Polymerase eingesetzt, die ca. um den Faktor 10 weniger Fehler bei der Transkription als die *Taq*-Polymerase verursacht. Eine Anwendung in der vorliegenden Arbeit ist z.B. die Amplifikation der Promotersequenzen für die Klonierung vor das GUS-Reporter-Gen. Zu diesem Zweck wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase der Firma Hybaid eingesetzt. Isoliert wurde das Enzym aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) und wie die *Taq*-Polymerase rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die höhere Genauigkeit geht auf die 3'-5' Exonuklease-Aktivität zurück, die auch als *Proof-Reading*-Aktivität bezeichnet wird. Ein weiteres Merkmal dieser Aktivität ist es, dass die *Pwo*-Polymerase keine Deoxyadenosinmonophosphat-Nukleotide an den 3'-Enden der amplifizierten DNA generiert (*blunt ends*).

In einigen Fällen wurde auch mit einem Enzymmix (*Synergy*) der Firma GeneCraft gearbeitet. Diese besteht aus zwei Polymerasen, wobei eine wiederum *Proof-Reading*-Aktivität besitzt. Nachfolgend sind die PCR-Parameter dargestellt, die für beide Enzymansätze geeignet sind.

Protokoll:

Reaktionsmix: wie unter 2.1.1.1 beschrieben

Programm im Thermocycler:

1. 2 Min. 94°C
2. 30 Sek. 94°C Denaturierung
3. 30 Sek. 45-65°C Anlagerung
4. 1-3 Min. 72°C DNA-Synthese
5. 15 Min. 72°C

Die Zyklenzahl der Schritte 2 – 4 liegt zwischen 30 und 35.

2.1.2 Durchsuchen der Lambda ZAP[®]-II-Phagen-Bank (Stratagene)

Die Lambda ZAP[®]-II-Phagen-Bibliothek beinhaltet die genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* in Form von durchschnittlich 5 kb großen Fragmenten. Das Durchsuchen der Bibliothek nach Phagenklonen wurde mit der PCR nach Watanabe et al. (1997) durchgeführt, wobei über sequenzspezifische Primer ein Teilbereich der gesuchten genomischen DNA in der PCR hochvermehrt wurde. Das Prinzip beruht auf der schrittweisen Verdünnung der Phagenbank, wobei die Existenz des gesuchten Phagenklons in den Verdünnungsstufen mit der PCR überprüft wird (s. Kap. 3.2.1).

Im ersten Schritt des Screenings wurden XL1-Blue MRF'-Zellen von *E. coli*-Zellen mit Verdünnungsstufen der Phagen-Bank infiziert, um den Phagentiter zu bestimmen (s. u.). Auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, ließ sich anhand der *plaque performing units* (pfu) der Phagen Titer bestimmen. Im zweiten Schritt wurden soviel Phagen eingesetzt, dass auf einer Platte ca. 5000 pfu auftraten. Zehn dieser Platten repräsentieren mit einem Sicherheitsfaktor von 2,5 das Genom von *Arabidopsis thaliana*. Jede Platte wurde mit SM-Puffer abgeschwemmt und das so erhaltene Eluat für die PCR-Reaktion eingesetzt. Theoretisch enthielt ein Phagenplaque auf einer der 10 Platten das gesuchte Stück genomische DNA. Dies konnte mit Hilfe der PCR im Phageneluat anhand des auftretenden Amplikons im Ethidiumbromid-Gel identifiziert werden. Mit dem positiven Eluat wurde wie mit der Bank verfahren und erneut die Phagen auf 10 Platten aufgeteilt. In diesem Schritt jedoch nur noch 10 x ca. 1000 pfu/Platte (Sicherheitsfaktor 2) und erneut mit nachfolgender Detektion des Phagenklons über PCR. Diese Verdünnung wurde solange fortgeführt, bis sich der gesuchte Klon unter ca. 20 – 30 anderen befand und eine direkte Identifizierung durch Einsetzen einzelner Plaques in die PCR-Reaktionen möglich wurde. Aus dem selektierten Einzelphagen

(in XL1) wurde durch Co-Infektion mit ExAssist-Helferphagen ein Teil des Phagengenoms (pBluescript SK(-)) über Exzision *in vivo* herausgeschnitten, rezirkuliert und der zweite, komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Der pBluescript SK(-)-Vektor enthält einen Teil der genomischen DNA von *Arabidopsis* als Insert. In Phagenpartikeln verpackt gelangte der pBluescript-Vektor in einen zweiten Stamm von *E. coli*-Zellen (SOLR), in dem sich Lambda- und Helfer-Phagen nicht replizieren konnten, letzterer auf Grund einer Amber-Mutation. Die durch den pBluescript vermittelte Ampicillin-Resistenz ermöglichte es dem SOLR-Stamm auf LB-Agar plus Ampicillin (50 µg/ml) zu wachsen. Auf diese Weise selektierte Einzelkolonien dienten der erneuten Anzucht für die Erstellung von Glycerinkulturen (-80°C) und der Plasmidpräparation. Um das Vorhandensein und die Länge der isolierten genomischen DNA aus überprüfen, wurde das Insert von beiden Seiten im pBluescript-Vektor ansequenziert (SeqLAB, Göttingen).

Mit Ausnahme der Promotersequenz von *AtPLA IIA* konnten auf diese Weise alle Sequenzbereiche der Promotoren isoliert werden. 391 bp vor dem Start-ATG befand sich in der zur PLA auf Chromosom II (IIA) gehörenden Promotersequenz eine Eco RI-Schnittstelle. Über diese Schnittstelle wurden die genomischen Stücke des *Arabidopsis*-Genoms in die Lambdaphagen einligiert, so dass die gesuchte Promotersequenz sich über zwei Phagenklone erstreckte. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine zweite Strategie angewendet, indem die Promotersequenz aus gesamtgenomischer DNA amplifiziert wurde (s. Kap. 2.1.1.1).

Material:

- Lambda ZAP[®]-II-Bibliothek (Stratagene)
- LB-Medium: 10,0 g NaCl
10,0 g Tryptone
5,0 g Hefeextrakt
Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen;
autoklavieren.
- NZY-Agar: 5,0 g NaCl
2,0 g MgSO₄ x 7H₂O
5,0 g Hefeextrakt
10,0 g Trypton
Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und pH 7,5 mit NaOH einstellen;
autoklavieren.

- Material und Methoden -

- SM-Puffer: 5,8 g NaCl
 2,0 g MgSO₄ x 7H₂O
 50,0 ml von 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
 5,0 ml von 2% (w/v) Gelatin
 Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
- NZY-Top-Agar:
 NZY Broth + 0,7% Agarose; autoklavieren
- 10 mM MgSO₄; autoklaviert

Protokoll:

A: Bestimmung des Phagentiters

- Tag 1: 1.) *E. coli* (XL1-Blue MRF[']) für die Phagenvermehrung von Einzelkolonie in 50 ml LB-Medium mit 0,2% Maltose (w/v) und 10 mM MgSO₄ animpfen. Über Nacht bei 30°C schütteln (140 Upm).
- Tag 2: 2.) XL1-Zellen in sterilen SS34 Röhren bei 4000 Upm für 10 Min. abzentrifugieren (4°C). Überstand verwerfen und Sediment in sterilem 10 mM MgSO₄ vorsichtig lösen, bis zu einer OD von 0,5 (Photometer, 600 nm).
- 3.) NZY Top-Agar schmelzen, 4 x 4 ml in 15 ml Röhren aliquotieren und im Wasserbad bei 48°C flüssig halten.
- 4.) Verdünnen der Lambda ZAP-Phagen mit SM-Puffer, Ausgangskonzentration vermutlich 10¹¹ Phagen/μl. Verdünnungsstufen: 10⁻⁴, 10⁻⁵, 5 x 10⁻⁶, 10⁻⁶.
- 5.) 400 μl XL1 plus 1 μl Phagenverdünnungsstufe für 15 Min in ein 37°C Wasserbad stellen (Anlagerung), anschließend zu den 4 ml NZY-Top-Agar geben und auf NZY-Agar-Platten ausplattieren. Platten bei 37°C über Nacht in den Brutschrank stellen. Um ein zu starkes Lysieren der Bakterien zu verhindern, wird der Brutschrank nach 2,5 Std. abgeschaltet (automatisch).
- Tag 3: 6.) Auszählen der *plaque performing units* (pfu) und Berechnung des Titers:
 Anzahl pfu x (Verdünnungsstufe)⁻¹ = Phagen/μl

B: Durchsuchen der Phagenbank mit der PCR

- Tag 1: 1.) Die Lambda ZAP[®]-II-Bank auf die gewünschte Phagenkonzentration verdünnen und wie bei der Bestimmung des Phagentiters beschrieben mit XL-1-Zellen inkubieren. Im ersten Schritt werden 10 Platten mit je ca. 5000 Phagen ausplattiert.
- Tag 2: 2.) Je 5 ml SM-Puffer auf die Platten geben und über Nacht durch leichtes Schütteln die Phagen lösen.
- Tag 3: 3.) Phagensuspension je Platte in 2 x 2 ml Röhrchen pipettieren und auf 5% Chlorophorm einstellen. Nach dem Vortexen 15 Min. bei RT inkubieren und anschließend für 10 Min. bei 10.000 Upm zentrifugieren, um Zellbestandteile zu entfernen. Überstand in sterile 1,5 ml Röhrchen geben, mit 0,3% (v/v) versetzen und bis zum Verwenden für die PCR bei 4°C aufbewahren.
- 4.) PCR der 10 Phageneluat mit sequenzspezifischen Primern wie in Kap. 2.1.1.1 beschrieben. 1 µl Eluat (Phagensuspension) pro PCR Reaktion einsetzen.
- Tag X: 5.) Erneute Titerbestimmung von der Phagensuspension mit Amplikon in der PCR und die neue Phagenpopulation (ca. 5000) auf 5 – 10 Platten aufteilen für die zweite PCR-Runde.
- 6.) Ist die Phagenpopulation mit dem gesuchten Klon auf ca. 300 – 500 Phagen eingegrenzt, wird eine Platte mit entsprechender Anzahl an pfu in 18 Teile geschnitten und die lysierten Bakterien in 2 ml SM-Puffer durch zweiminütiges Vortexen abgespült. Aufbereitung der Proben erfolgt wie unter 3.) beschrieben.
- 7.) Ist der gesuchte Klon unter den letzten 20 pfu, werden die einzelnen Phagen mit einer sterilen Pipettenspitze unter der Sterilbank „gepickt“ und direkt in den PCR Reaktionsansatz gegeben. In der anschließenden PCR wird der Phagenklon mit der gesuchten genomischen *Arabidopsis*-DNA identifiziert.

C: In vivo Exzision des pBluescript SK(-)-Phagmids aus dem Lambda-ZAP-II-Vektor

- Tag 1: 1.) Den positiven Phagenplaque mit der Pipettenspitze aus der Platte ausstechen und in 10 µl SM-Puffer lösen. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C aufbewahren.
- 2.) XL1-Blue-MRF'- und SOLR-Zellen in 30 ml LB + 0,2% (w/v) Maltose + 10 mM MgSO₄ bei 30°C über Nacht anziehen (145 Upm).

- Tag 2:
- 3.) XL1- und SOLR-Zellen bei 1000 g 10 Min. abzentrifugieren (SS34) und in 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 resuspendieren.
 - 4.) 200 µl XL1 + 5 µl Phagensuspension + 1µl ExAssist-Helferphagen in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap geben und 15 Min. bei 37°C inkubieren.
 - 5.) 3 ml LB-Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen geben + Phagenansatz aus 4.) zugegeben und bei 37 °C und 150 rpm im Wasserbad 2,5 – 3 Std. inkubieren.
 - 6.) Ansatz für 20 Min. in ein 65-70°C Wasserbad stellen.
 - 7.) Anschließend in 2 x 2 ml Eppendorfgefäße geben und bei 1000 g (3200 Upm) für 15 Min. abzentrifugieren.
 - 8.) Überstand (“ausgeschnittene“ pBluescript-Phagmiden) in sterile 2 ml Caps geben.
 - 9.) 200 µl SOLR Zellen (OD 1,0) mit 10 µl der Phagenlösung für 15 Min. bei 37°C inkubieren.
 - 10.) 100 µl bzw. 10 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- Tag 3:
- 11.) SOLR-Einzelklon von der Platte aus 10.) in 2,5 ml LB + Ampicillin (50 µg/ml) animpfen.
 - 12.) Plasmid-Präparation des pBluescript und Ansequenzieren des Inserts von beiden Seiten (SeqLAB, Göttingen).
 - 13.) Glycerinkultur des SOLR-Klones erstellen und in –80°C lagern.

2.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren (‘Minipräp’)

2.1.3.1 Plasmid Mini-Präparation (alkalische Lyse) (nach Birnboim und Doly, 1979; verändert)

Zur Reinigung plasmidärer DNA wurde der entsprechende Bakterienklon über Nacht in 2,5 ml LB-Medium unter Zusatz adäquater Antibiotika bei 37°C und 180 Upm im Reagenzglas angezogen. Ein System aus drei Puffern der Fa. Qiagen dient dem RNA-Verdau (P1), der Zell-Lyse (P2) und der Protein-Denaturierung (P3). Die Trennung der genomischen DNA von den Plasmiden erfolgt durch Abzentrifugieren der lysierten Zellbestandteile, inklusive der genomischen DNA, die an die Plasmamembran angeheftet ist. Die Fällung der Plasmide erfolgt durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol bei RT mit anschließendem

Waschschritt mit 70%igem eiskalten Ethanol. Nach dem Waschen muss das Sediment vollständig eintrocknen, da Ethanolreste in folgenden Reaktionen stören könnten. Je nach Plasmid lassen sich mit dieser Methode bis zu 50 µg Plasmid DNA aus 1,5 ml Kultur anreichern. Bei der Plasmidpräparation aus *Agrobacterium* ist der Ertrag hingegen wesentlich geringer.

Material:

- Puffer P1: 50,0 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10,0 mM EDTA
 100 µg/µl RNase A (4°C)
- Puffer P2: 200 mM NaOH
 1,0 % SDS
- Puffer P3: 3,0 M K-Acetat, pH 5,5
- Isopropanol
- 70% Ethanol eiskalt

Protokoll:

1. 1,5 ml einer Übernachtskultur in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß abzentrifugieren, 1 Min. 10.000 g.
2. Überstand verwerfen und Sediment in 300 µl Puffer 1 auf dem Vortex resuspendieren, 2 Min. bei RT inkubieren.
3. 300 µl Puffer 2 zugeben und 5 Min. bei RT inkubieren.
4. 300 µl Puffer 3 zugeben und 10 Min. auf Eis inkubieren.
5. 15 Min. mit 10.000 g bei 4°C zentrifugieren.
6. Überstand abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
7. 0,7 Vol. Isopropanol zugeben und 15 Min. mit 10.000 g bei 4°C zentrifugieren.
8. Überstand verwerfen und Sediment durch leichtes Schütteln in 70% eiskaltem EtOH waschen, anschließend 10 Min. mit 10.000 g bei 4°C zentrifugieren.
9. Überstand verwerfen und Waschschritt eventuell einmal wiederholen, Plasmid Sediment in der Speedvac oder unter der Sterilbank trocknen.
10. Sediment in 50 µl aqua dest. lösen und bis zur weiteren Verwendung in -20°C einfrieren.

2.1.3.2 Präparation genomischer DNA aus der Pflanze

(nach Dolferus, 1991)

Die Präparation von genomischer DNA erfolgt vorzugsweise aus jungen Blättern oder Keimlingen. Gründe hierfür sind, dass die DNA wenig degradiert ist und dass im Verhältnis zur restlichen Zellsubstanz relativ viel DNA vorhanden ist. Zudem sind in älteren Pflanzenteilen mehr phenolische Verbindungen vorhanden, die die Präparation stören. Material und Protokoll sind im Folgenden aufgeführt:

Material:

- 5 M K-Acetat
- 20% SDS-Lösung (w/v)
- 3 M Na-Acetat, pH 5,2
- Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0
50 mM EDTA
500 mM NaCl
10 mM β -Mercaptoethanol
- T_{50E10}-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
- RNase A-Lösung (10 mg/ml)

Protokoll:

1. 0,5 – 2,0 g Frischsubstanz in flüssigem N₂ mörsern und in 15 ml Extraktionspuffer durch starkes Vortexen suspendieren.
2. 1 ml SDS-Lösung (20%) zugeben und 10 Min. bei 65°C inkubieren.
3. 5 ml 5 M K-Acetat zugeben, mischen und für 20 Min. auf Eis stellen.
4. Ansatz in ein SS34 Zentrifugenröhrchen überführen und 20 Min. bei 15.000 Upm (4°C) zentrifugieren.
5. Überstand abnehmen und mit 10 ml Isopropanol versetzen, vortexen und 30 Min. in -70°C stellen.
6. DNA-Präzipitat bei 10.000 Upm für 20 Min. und bei 4°C abzentrifugieren.

7. Überstand verwerfen und Sediment in 1 ml T₅₀E₁₀-Puffer + 10 ml RNase A (10 mg/ml) lösen, 15 Min. bei 37°C inkubieren.
8. DNA-Reinigung durch mehrmaliges (3-4) extrahieren mit 1 Vol. Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1).
9. DNA-Fraktion abnehmen und 0,2 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) + 0,7 Vol. Isopropanol zugeben, 10 Min. bei RT inkubieren zum Fällern der DNA.
10. DNA 10 Min. bei 10.000 Upm abzentrifugieren, mit 5 ml 70% Ethanol waschen und erneut zentrifugieren.
11. Sediment trocknen und in 200 µl TE-Puffer lösen, Lagerung bei 4°C.

2.1.3.3 Nukleinsäure-Reinigung mit Kits

Die verwendeten Kits bieten eine einfache und schnelle Möglichkeit der DNA-Reinigung aus Reaktionsansätzen, um störende Proteine oder Pufferkomponenten für Folgereaktionen zu entfernen. Die Protokolle zur Reinigung sind den jeweiligen Kits beigelegt. Die verwendeten Kits sind im Folgenden aufgelistet:

PeqLab:

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit | B.-Nr.: 12-6493-01 |
| E.Z.N.A. Gel Extraction Kit | B.-Nr.: 12-2501-01 |

Qiagen:

| | |
|------------------------------------|---------------|
| QIAEX® II Gel Extraction Kit (150) | B.-Nr.: 20021 |
|------------------------------------|---------------|

2.1.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der RNA und DNA Konzentration erfolgte mit dem Photometer (Lambda 2, Perkin Elmer). Für die Messung wurde eine 1:100 Verdünnung (H₂O) der Probe erstellt und im Photometer die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Die Extinktion bei 230 nm gibt Aufschluss über Verunreinigungen durch Zucker oder Salze und bei 280 nm durch Proteine. Quotienten der Extinktionen aus 260/230 nm bzw. 260/280 nm sollten dabei für saubere Nukleinsäure zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration aus der gemessenen Extinktion wird die folgende Formel verwendet:

$$\frac{E_{260} \times K \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \mu\text{g Nukleinsäure} / \mu\text{l}$$

E_{260} : Extinktion bei 260nm

K: Extinktionskoeffizient, variiert mit der Nukleinsäureart:

K = 50 für doppelsträngige DNA

K = 40 für einzelsträngige RNA

K = 33 für einzelsträngige DNA

2.1.4 Ethidiumbromid-Agarosegel

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren dient das Agarosegel. Um die einzelnen Fragmente unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid zugegeben, welches sich an die Nukleinsäure lagert und unter UV-Licht fluoresziert. Die Auftrennung erfolgt der Größe nach, wobei Agarosekonzentrationen von 0,8-1% Fragmente größer als 1 kb auftrennen und Konzentrationen bis 2% besser kleinere Fragmente (>250 bp) auftrennen.

Material:

- TAE-Puffer: 40,0 mM Tris-acetat
1,0 mM EDTA
pH 8,0 mit 5 N NaOH
- Ethidiumbromid (10 mg/ml)
- Agarose

Protokoll:

1. 50 ml TAE-Puffer + 0,8-2% Agarose 1 Min. in der Mikrowelle kochen.
2. Gel unter fließendem Wasser etwas abkühlen und 3 µl Ethidiumbromidlösung zugeben.
3. Unter dem Abzug Gel in die abgeklebte Gelform gießen und Kämme einsetzen.
4. Nach dem Aushärten die Klebestreifen entfernen und die Form mit dem Gel in die TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer legen.
5. Kämme entfernen und Proben auftragen.
6. Deckel auf die Gelkammer setzen und Netzgerät einschalten (100 kV, max. 15 mA).

2.1.5 Erstellung der Vektor-Konstrukte

Vektoren sind zirkuläre DNA-Doppelstränge und dienen in der vorliegenden Arbeit der Klonierung von DNA-Fragmenten, der Überexpression von *AtPLA*-Genen in *E. coli*, sowie, im Falle des Pflanzentransformationsvektors, der Übertragung eines DNA Bereiches (T-DNA) in das pflanzliche Genom. Grundlage der Vektoren sind Plasmide, deren Eigenschaften durch das Einfügen bestimmter Gene oder nichtcodierender DNA-Sequenzen verändert wurden, um so eine Grundlage molekularbiologischen Arbeitens zu schaffen. Zum Beispiel beinhalten die Vektoren Resistenzgene, die eine Selektion ermöglichen oder Restriktionsschnittstellen (*multiple cloning sites*), die die Klonierungsreaktion erleichtern. Die Vektoren liegen als Plasmide in *E. coli* Stämmen vor (s. Kap. 2.1.4.1) und werden bei Bedarf über eine Plasmid Mini-Präparation gereinigt (s. Kap. 2.1.3.1). Das Einfügen von DNA Fragmenten in einen Vektor erfolgt über Restriktionsschnittstellen, wobei zunächst durch eine Analyse der DNA-Sequenz geprüft werden muss, welche Restriktionsenzyme im Vektor und im Insert schneiden bzw. nicht schneiden (z.B. mit Vnti oder Webcutter 2.0).

2.1.5.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Bakterienstämme und ihre Resistenzen aufgeführt. Die *E. coli* Stämme werden für die Klonierungen und die rekombinante Überexpression eingesetzt, während die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme der pflanzlichen Transformation

dienten. Die Anzucht aller Stämme erfolgte in LB-Medium plus entsprechende Antibiotika auf dem Schüttler bei 180-200 Upm. Optimale Anzuchttemperatur liegt bei dem *Agrobacterium* bei 28-30°C und bei *E. coli* bei 37°C. Da *Agrobacterium* langsamer als *E. coli* wächst, muss, speziell nach Animpfung aus Glycerinkultur, bis zu 2 Tagen im Schüttler inkubiert werden. Das Animpfen der Stämme erfolgte von einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte (+ Antibiotikum).

Tabelle 2.1: Antibiotikaresistenzen der verwendeten Bakterienstämme.

| | Bakterienstamm | Antibiotikaresistenz | Antibiotika-Konzentration |
|-----------------------|----------------|----------------------|---------------------------|
| <i>E. coli</i> | XL1-MRF' | Tetracyclin | 25 µg/ml |
| | SOLR | Kanamycin | 50 µg/ml |
| | Top 10 | Streptomycin | 250 µg/ml |
| <i>A. tumefaciens</i> | LBA 4404 | Streptomycin | 250 µg/ml |
| | GV 3101 | Rifampicin | 100 µg/ml |

Die genetischen Konstitutionen der *E. coli* Stämme können z.B. den Anhängen der Kataloge NEB und Invitrogen entnommen werden.

2.1.5.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von Bakterienstämmen erfolgt durch Animpfen in LB-Medium (+ Antibiotika) aus der Glycerinkultur (-80°C). Optimale Wachstumsbedingungen für *E. coli* sind 37°C, für *Agrobacterium tumefaciens* 28°C und eine gute Luftversorgung durch Schütteln (200 Upm oder mehr). Die Zelldichte wird mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Gewinnung von Einzelkolonien werden verschiedene Verdünnungsstufen einer Bakterienkultur auf LB-Agar-Platten für *E. coli* oder M9-Agar-Platten für *A. tumefaciens* ausgestrichen, kurz angetrocknet und mit Parafilm verschlossen bei 37°C bzw. 28°C über Nacht inkubiert. Die Verdünnungsstufen werden mit sterilem 10 mM MgSO₄ erstellt.

Um eine Kontamination des Bakterienstammes während der Lagerung zu verhindern, wird die Bakteriensuspension 1:1 mit steril autoklaviertem Glycerin vermischt (1,5 ml Röhrchen) und bei -80°C gelagert. Durch das Glycerin bleibt die Kultur trotz der tiefen Temperatur flüssig und die Bakterien nehmen keinen Schaden.

Material:

- LB-Medium: 10,0 g NaCl
5,0 g Hefeextrakt
10,0 g Tryptone
In 800 ml aqua dest. lösen (pH 7,0 mit 5 N NaOH).
Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und in zwei 0,5 l Schott-Flaschen autoklavieren.
- LB-Agar: LB-Medium + 2 % Bactoagar
- M9-Medium: 10,0 g M9 Minimalsalze (Gibco/BRL)
2,0 g Glukose
15,0 g Bactoagar
in 1 l aqua dest. autoklavieren.
- M9-Agar: M9-Medium + 2 % Bactoagar
- 10 mM MgSO₄, steril

2.1.5.3 Vektoren

Die verwendeten Vektoren und ihre jeweiligen Antibiotikaresistenzen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Antibiotikaresistenzen der verwendeten Vektoren

| Vektor-Plasmid | Vektorgröße (kb) | Antibiotikaresistenz | Antibiotika-Konzentration |
|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------------|
| pBI221 | 5,6 | Ampicillin | 100 µg/ml |
| pBluescript SK (-) | 2,96 | Ampicillin | 100 µg/ml |
| pCR [®] 2.1-TOPO | 3,9 | Ampicillin/Kanamycin | 100/50 µg/ml |
| pQE-30 | 3,6 | Ampicillin | 100 µg/ml |
| pGPTV | 15 | Kanamycin | 50 µg/ml |

Eine kurze Beschreibung der Vektoren sowie deren Anwendung in dieser Arbeit wird im Folgenden gegeben.

pBI221: Der Vektor pBI221 (Clontech-ITC) ist ein pUC19-Derivat und beinhaltet eine Kassetten bestehend aus 35S-Promoter, β -Glucuronidase-Gen und einem Nos-Terminus (Abb. 2.1). Vektor inklusive Kassetten haben eine Größe von 5,6 kb. Auf Grund der geringen Größe ist der Vektor leicht handhabbar und dient als Basisvektor für die Klonierungen der *Arabidopsis*-Promotoren im Austausch gegen den 35S Promoter, sowie als Ausgangsvektor für die GFP::*GUS* Hybridkonstrukte. Ferner eignet sich der pBI221 zur transienten Transformation durch die Partikel-Kanone (s. Kap. 2.3.2.2).

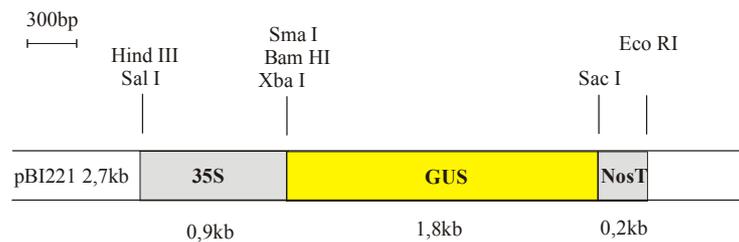


Abbildung 2.1: Kassetten im pBI221 mit Restriktionsschnittstellen.

pBluescript SK (-): Der pBluescript SK(-) ist ein Vektor, in dem das Vorhandensein des Bakteriophagen *fl-origin* die Replikation einzelstängiger DNA ermöglicht (Phagmid). Der Vektor ist Bestandteil der Lambda ZAP[®]-II-Bibliothek (s. Kap. 2.1.2) und beinhaltet die isolierten genomischen DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis* als Insertionen.

pCR[®] 2.1-TOPO: Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde das TA-Cloning-Kit der Fa. Invitrogen verwendet. Die Klonierung erfolgt über T/A-Überhänge in den pCR2.1-TOPO-Vektor, der für Folgereaktionen über eine *multiple cloning site* verfügt sowie an beiden Seiten des Inserts bereits vordefinierte Primerbindungsstellen für die Sequenzierung besitzt. Bei der Erstellung der Konstrukte diente der pCR2.1-TOPO-Vektor teilweise als Carrier-Vektor.

pQE-30: Der Vektor pQE-30 stammt von der Fa. Qiagen und ist Bestandteil des Qiagen Expressionssystems in *E. coli* (*The QIAexpressionist*). Über eine *multiple cloning site* werden die zu exprimierenden Gene in den Vektor ligiert. Die Regulation der Transkription erfolgt über ein T5-Promoter-*lac*-Operator System. Die transkribierte RNA enthält eine ribosomale Bindungsstelle, was

die nachfolgende Translation in *E. coli* ermöglicht. Zur Reinigung des Zielproteins befindet sich am N-Terminus, über den Vektor angefügt, ein so genanntes His-Tag (s. Kap. 2.2.1).

pGPTV: Für die stabile Transformation in *Arabidopsis* dient der pGPTV (Becker et al., 1992). Zwischen der linken und der rechten Grenze (L und R in Abb. 2.3) befindet sich der Sequenzbereich, der in das Pflanzengenom integriert wird. Dieser beinhaltet neben der Kasette vom pBI221 einen PNOS-Promoter, der die Transkription der Neomycinphosphotransferase II steuert. Letztere codiert für ein Kanamycin-Resistenzgen und ermöglicht später die Selektion transgener Pflanzen. Die unterschiedlichen Promoter-Konstrukte (PI – PIVC) aus dem pBI221-Vektor werden durch Austausch einzelner oder mehrerer Elemente in den pGPTV kloniert. Da der pGPTV ein *low-copy* Plasmid ist, ist die Menge nach einer Plasmid Mini-Präparationen nur ca. 1/10 dessen, was mit dem pBluescript erreicht wird.

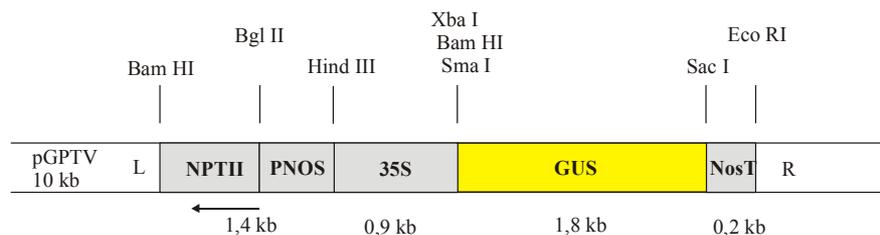


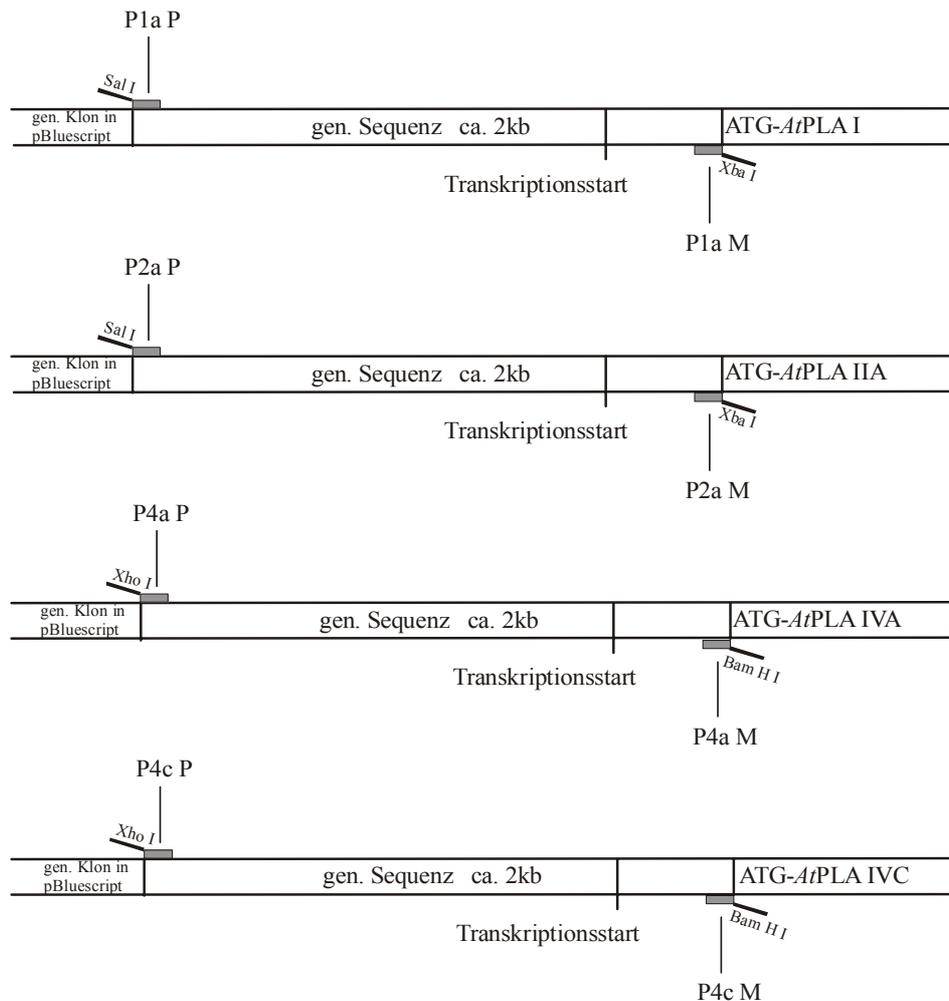
Abbildung 2.3: pGPTV-Kassette mit Restriktionsschnittstellen.

2.1.5.4 Amplifizierung der Promotor-Sequenz

Um die gewünschte Sequenz zu erhalten, wurden Primer hergestellt, mit deren Hilfe in der PCR (*Pwo*-Polymerase) die Promotorregion aus dem isolierten Lambda-ZAP-II-Phagenklon (ausgenommen Promoter IIA, s. Kap. 2.1.2) hochvermehrt wurde. Neben der Primerfunktion dienen die Oligonukleotide dazu, die gewünschten Schnittstellen an die Enden des Amplikons zu setzen. Daher wird der Primer für zunächst mindestens 20 Nukleotide der *Arabidopsis*-Sequenz komplementär gewählt, daran anschließend die Erkennungssequenz der gewünschten Restriktionsendonuklease und darüber hinaus einige Nukleotide, die die Schnitt-Aktivität der Restriktionsendonukleasen an der DNA erhöhen (s. Katalog NEB Kap. 2.4). Für die Bindung am Template genügen in der Regel die ersten 20 komplementären Nukleotide.

Das Amplikon in Form der hochvermehrten Promotersequenz wird über eine Säule (*PeQLab*) gereinigt und mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen an den Enden verdaut, um die Überhänge (*sticky ends*) für die Ligation zu erhalten. Nach erneuter Reinigung über eine Säule wird das Insert für die Ligation eingesetzt.

Eine schematische Übersicht über die amplifizierten Promotoren und die Primersequenzen mit den angefügten Restriktionsschnittstellen gibt Abbildung 2.4.



PI: P1a P (*Sal I*): 5' ttgtcgacat atagttttgt gatgtacc 3'

P1a M (*Xba I*): 5' tctagaccga cgttgagat ccgaatgg 3'

PIIA: P2a P (*Sal I*): 5' cgcgtcgaca gattgatgat ttgccg 3'

P2a M (*Xba I*): 5' gctctagatc ttacagaaca agcaaagc 3'

PIVA: P4a P (*Xho I*): 5' tgactcgag cgacatttaa aattagaacg 3'

P4a M (*Bam HI*): 5' agttggatcc gaatagttga tcgatcttc 3'

PIVC: P4C P (*Xho I*): 5' ccctcgaga ccgaggaaag gaaattaagg 3'

P4C M (*Bam HI*): 5' cgggatccgt cttctccttt acaatctc 3'

Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der amplifizierten Promoterbereiche mit den Plus-(P) und Minus-(M) Primern. In den Klammern der Primer stehen die angefügten Restriktionsschnittstellen.

2.1.5.5 Aufbereitung des Vektorplasmids

Die Vektoren liegen als Plasmide in *E. coli*-Bakterien vor und werden als Klon in einer Glycerinkultur bei -70°C gelagert. Nach Bedarf wird die jeweilige Kultur über Nacht in LB-Medium angezogen und die Plasmid-DNA über eine Minipräparation angereichert (Sambrook et al., 1989). Nach der Präparation liegt das Plasmid in aqua dest. vor und wird bei nicht sofortiger Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Ligation wird der Vektor an der Stelle aufgeschnitten, wo das Insert eingesetzt werden soll. Hierbei wird der Vektor entweder nur an einer Stelle geöffnet oder es wird z.B. durch verschiedene Endonucleasen für das Insert ein den Schnittstellen entsprechendes DNA-Fragment herausgeschnitten. Auf diese Weise entstehen zugleich verschiedene 5'-Überhänge am linearisierten Vektor.

Wird der Vektor lediglich mit einem Enzym geschnitten, so dass an beiden Enden die gleichen Überhänge vorhanden sind, bedarf es einer Dephosphorylierung der 5'-Enden, um während der Ligation eine Rezirkulierung des Vektors ohne Insert zu verhindern. Fällt hingegen durch den Verdau ein Insert heraus, müssen Insert und Vektor im Agarosegel getrennt werden. Nach der Auftrennung im Gel kann der Vektor herausgeschnitten werden und über eine Säule (PeQLab) aus dem Agarosegel gereinigt werden. Nach der Elution in aqua dest. wird die Konzentration bestimmt und der Vektor für die Ligation eingesetzt.

2.1.5.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Eurogentec, MBI, Roche oder Gene Craft bezogen, wobei Enzymkombinationen in einem Verdau immer von einem Hersteller kamen. Ein Restriktionsansatz besteht aus der zu schneidenden DNA, ein oder zwei Restriktionsendonucleasen, einem Reaktionspuffer (vom Hersteller) und sterilem aqua dest. Parameter, die die Menge der einzelnen Komponenten sowie die Reaktionsdauer und Temperatur beeinflussen, sind im Folgenden dargelegt:

Reaktionspuffer: Werden Kombinationen von Enzymen eingesetzt, hat oft eines der Enzyme nur suboptimale Reaktionsbedingungen, woraufhin von dem jeweiligen Enzym größere Mengen eingesetzt werden. Abschätzungen der Effizienz der Enzyme in verschiedenen Puffern werden in den Katalogen angegeben.

DNA-Menge: In 10 μl Reaktionsansatz werden nicht mehr als 1 μg DNA verdaut. Geringere DNA Konzentrationen wirken effizienzsteigernd.

Enzymmenge: Die Restriktionsenzyme werden in einem glycerinhaltigen Puffer gelagert. Wird der Anteil an Enzymmenge zur Gesamtmenge zu hoch, kann das Glycerin die Reaktion beeinträchtigen.

Position der Restriktionsschnittstelle:

Zur optimalen Aktivität benötigen die Restriktionsenzyme neben der Schnittsequenz auch Umgebungssequenzen. Liegen die Schnittstellen an Fragmentenden, fehlt diese Umgebung zu einer Seite oder ist auf wenige Nukleotide reduziert. Unter diesen Bedingungen werden große Mengen an Enzym z.B. in der Form von hoch konzentrierten Enzymen (50 u/ μl) eingesetzt und die Reaktion bei RT über Nacht durchgeführt.

Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei den meisten Enzymen bei 37°C. Bei Standardbedingungen reichen 30 – 60 Min., um den Großteil der eingesetzten DNA zu verdauen. Als Beispiel wird hier ein Verdau von Plasmid-DNA angeführt:

- 1,0 μg Plasmid
- je 1 μl Enzym (=10 u)
- 1,0 μl 10 x Puffer
- X μl aqua dest.
- 10 μl gesamt

Ist es wichtig, einen möglichst vollständigen Verdau zu erreichen, z.B. bei einem Vektor für die Klonierung, wird über Nacht bei RT verdaut.

Restriktionsansatz von Vektor-DNA:

- bis 5 μg DNA
- je 25 – 30 u Enzym
- 8,0 μl 10x-Puffer
- mit aqua dest. auf 80 μl auffüllen

2.1.5.7 Ligation

Das Einligieren von DNA-Fragmenten in aufgeschnittene Vektoren erfolgt mit der T7-DNA-Ligase von Gibco/BRL. Bei Ligationen von *sticky ends* liefert eine Reaktionszeit von einer Stunde und bei RT die besten Ergebnisse. Längere Reaktionszeiten, speziell bei tieferen Temperaturen, führen vermehrt zu falsch positiven *E. coli* Transformanden, die die vektorvermittelte Antibiotikaresistenz besitzen, aber ein mutiertes Plasmid enthalten. Nach Ligationsende sollte direkt mit der Transformation fortgefahren werden. Das Vektor/Insert-Verhältnis kann für jede verschiedene Ligation optimiert werden, liegt aber erfahrungsgemäß in einem Bereich von 1:6 bis 1:12 (Vektor:Insert), wobei sich die Angaben auf die Anzahl an Molekülen beziehen. Der Ligationsansatz folgt im Wesentlichen dem Protokoll des Herstellers:

Ligationsreaktion:

- 1,5 µl Vektor (ca. 100 ng/µl)
- 6,0 µl Insert (ca. 200 ng/µl)
- 4,0 µl 5x-Puffer
- 1,0 µl T4-DNA Ligase von Gibco
- mit aqua dest. auf 20 µl auffüllen
- 1 h, RT

Der Ligationsansatz wird direkt für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.1.5.8 Auffüllen von 5' DNA-Überhängen

Für das Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen wird das Klenow-Fragment verwendet. Dies ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I (*E. coli*) mit DNA-Polymerase und 3'-5'-Exonuklease Funktion. Als Folge dieser Reaktion wird der 5'-DNA-Überhang komplementär aufgefüllt, zu so genannten *blunt ends*. Das Enzym wird von der Fa. Hybaid bezogen und wird wie folgt eingesetzt:

50 µl Ansatz:

- 5,0 µl 10x-Puffer
- 0,75 µl DTT (500 mM)
- 1,6 µl dNTP's (= 80 µM je Nukleotid)
- 5,0 µg Vektor DNA
- 2,0 u Klenow
- X µl aqua dest.

Vor der weiteren Verwendung wird die DNA über eine Säule (Cycle Pure von PeqLab) gereinigt.

2.1.5.9 Dephosphorylieren von 5' DNA-Enden

Die alkalische Phosphatase (Boehringer) hydrolysiert Monophosphatreste an 5'-DNA-Enden. Beiderseitig dephosphorylierte DNA-Enden können nicht miteinander ligiert werden, was zur Unterdrückung der Religation des Vektors mit seinen eigenen Enden in der Klonierungsreaktion ausgenutzt wird. Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von linearisiertem Vektor angeführt:

50 µl Reaktionsansatz:

- 5,0 µg Vektor
- 1,0 u Phosphatase
- 5,0 µl 10x-Puffer
- mit aqua dest. auf 50 µl auffüllen

Die Reaktionsdauer der Dephosphorylierung ist eine Stunde und findet bei 37°C statt. Vor der weiteren Verwendung des dephosphorylierten Vektors wird das Plasmid über eine Säule (Cycle Pure von PeqLab) gereinigt.

2.1.5.10 Einfügen zusätzlicher Restriktionsschnittstellen

Bei der Erstellung der Konstrukte können nur Restriktionsschnittstellen verwendet werden, die weder im Vektor noch im zu legierenden Insert vorhanden sind. Reichen die vorgegebenen Schnittstellen im Vektor nicht aus, müssen neue eingefügt werden. Eine Möglichkeit, dieses zu bewerkstelligen, ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Zwei 30er Oligonukleotide mit phosphoryliertem 5'-Ende werden synthetisiert (Roth). Die Primer sind bis auf die letzten fünf Nukleotide an den 5'-Enden komplementär und bilden dadurch nach ihrer Anlagerung 5'-Überhänge, die den Überhängen einer *Hind-III*-Schnittstelle komplementär sind. Nach Hybridisierung dieser beiden Primer wurde das entstandene Dimer in den mit *Hind III* linearisierten und dephosphorylierten Vektor über *sticky ends* einligiert (Abb. 2.5).

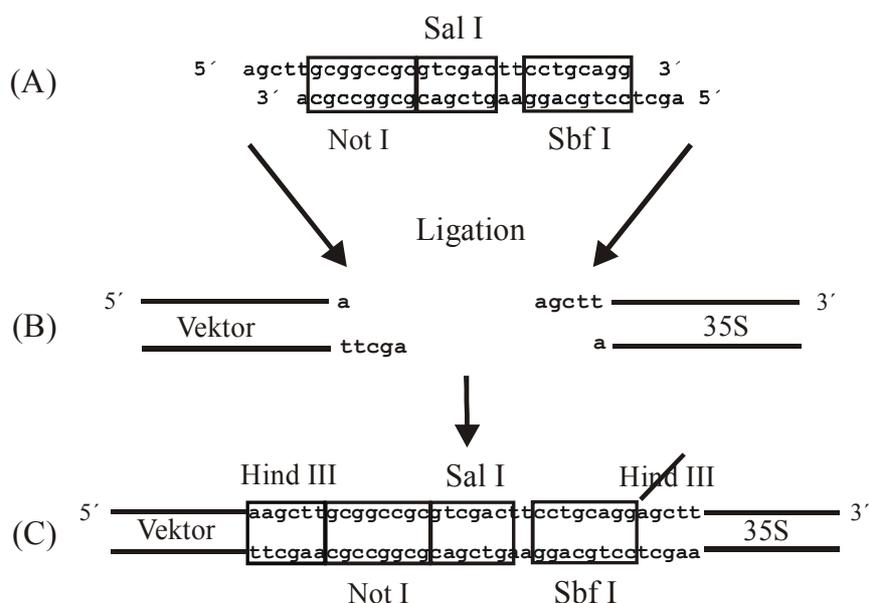


Abbildung 2.5: Einfügen neuer Restriktionsschnittstellen. (A) Primerhybrid als Ausgangssequenz für neue Restriktionsschnittstellen. (B) Über *Hind-III*-Schnittstelle linearisierter und dephosphorylierter Vektor. (C) Fertiger Vektor mit den zusätzlichen Restriktionsschnittstellen *Not I*, *Sal I* und *Sbf I* und wiederum einer *Hind-III*-Schnittstelle.

Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass die *Hind III* Schnittstelle (AAGCTT) am 3'-Ende wegfällt und zusätzlich zu der *Hind III* Schnittstelle am 5'-Ende drei weitere Schnittstellen eingefügt wurden (*Not I*, *Sal I* und *Sbf I*).

Protokoll:

1. 5 μ l (10 pmol/ μ l) je Oligonucleotid zusammen für 10 Min. auf 80°C erhitzen.
2. Oligonucleotidmix auf RT abkühlen lassen (Hybridisierung).
3. Ligation mit dem linearisiertem und dephosphoryliertem Vektor:

| | | |
|------|-------------------|-------------------------------------|
| 30,0 | fmol Vektor-Enden | |
| + | 1500 | fmol Oligohybrid-Enden |
| + | 4,0 | μ l 5x Puffer |
| | | 1 Std. bei RT |
| + | 2,0 | u Ligase |
| + | <u>X</u> | <u>μl aqua dest.</u> |
| | 20 | μ l gesamt |

Anschließend wurde der Ligationsansatz für die Transformation verwendet. Die Orientierung des Primerhybrids wurde mit dem Sinn-Strang-Primer des Primerhybrides als Plus-Primer und einem Minus-Primer aus dem 35S-Promoter an dem transformierten Vektor überprüft.

2.1.5.11 Carrier-Vektor

Carrier-Vektoren werden zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten eingesetzt, bevor diese wieder herausgeschnitten und in den eigentlichen Vektor ligiert werden. Mit den PCR-Primern werden Restriktionsschnittstellen an den Enden des Amplikons angebracht, über die das Fragment kloniert werden soll. Da Restriktionsendonukleasen an den Enden schlecht schneiden (s. Kap. 2.1.4.3), kann das Fragment über eine effiziente TA-Klonierung zunächst in den TOPO-Vektor (s. Kap. 2.1.4.2) ligiert werden. Aufgrund der nun vorhandenen Sequenzumgebung lässt sich das Fragment an den eingefügten Restriktionsschnittstellen ausschneiden und in den Zielvektor über entsprechende *sticky ends* einligieren. Erfolgt die PCR mit einer *Pwo*-Polymerase, fehlen die für die TA-Klonierung notwendigen Adenosin-Nukleotide an den 3'-Enden des Amplikons. Um diese anzufügen, wird das PCR-Produkt über eine Säule gereinigt und erneut mit der *Gold*-Polymerase inkubiert (s. Protokoll). Die *Gold*-Polymerase wird also nicht zur Amplifizierung,

sondern nur zur Schaffung von kurzen *sticky ends* benutzt, die für die Klonierung in den TOPO-Vektor geeignet sind.

Protokoll:

- 20,0 µl PCR-Produkt (Eluat von der Säule)
 - 5,0 u Gold Polymerase
 - 0,6 µl dNTP's
 - 3,0 µl 10x Puffer
 - X µl aqua dest.
- 30,0 µl
15 Min. bei 72°C

Nach dem Anfügen der Adenosin-Nukleotide wird der Reaktionsansatz für die TA-Klonierung eingesetzt.

2.1.5.12 Promoter-Reporter-Konstrukte

Die erste Generation an Promoter-Reporter-Konstrukten bestand aus den *Arabidopsis* Promotersequenzen bzw. dem 35S Promoter und einem GFP-GUS-Reporterhybrid (Abb. 2.6). Das GFP-Gen wurde von dem Vektor psmRSGFP (Davis und Vierstra, 1998) mit der PCR hochvermehrt (s. Kap. 2.1.5.4) und über in den Primern enthaltene Restriktionsschnittstellen in den pBI221 zwischen 35S-Promoter und *uidA*-Gen kloniert. Der entstandene Vektor wurde auf Grund des Doppelkonstruktes von GFP und GUS pGG genannt. Die Primersequenzen zur Amplifizierung des GFP-Gens lauten:

GFP-P: 5' AATTGGATCCAAGGAGATATAACAATGAG 3'
GFP-M: 5' GGGACTCCTTTGTATAGTTCATCCATGCC 3'

Die unterstrichenen Nukleotide in den Primersequenzen dokumentieren die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam* *HI* (p-Primer) und *Sma* *I* (m-Primer). Letzteres schneidet *blunt* die Sequenz CCC GGG, wobei durch den GFP-M Primer nur die erste Hälfte der Schnittsequenz an das 3'-Ende des GFP-Gens angefügt wird. Nach der

Ligation in den pBI221 komplettiert sich die Erkennungssequenz durch den zweiten Teil (GGG) von dem Vektor.

Für die stabile Pflanzentransformation wurde die Promoter-GFP-GUS-Kassette in den pGPTV kloniert, der somit zum pGGPTV wurde.

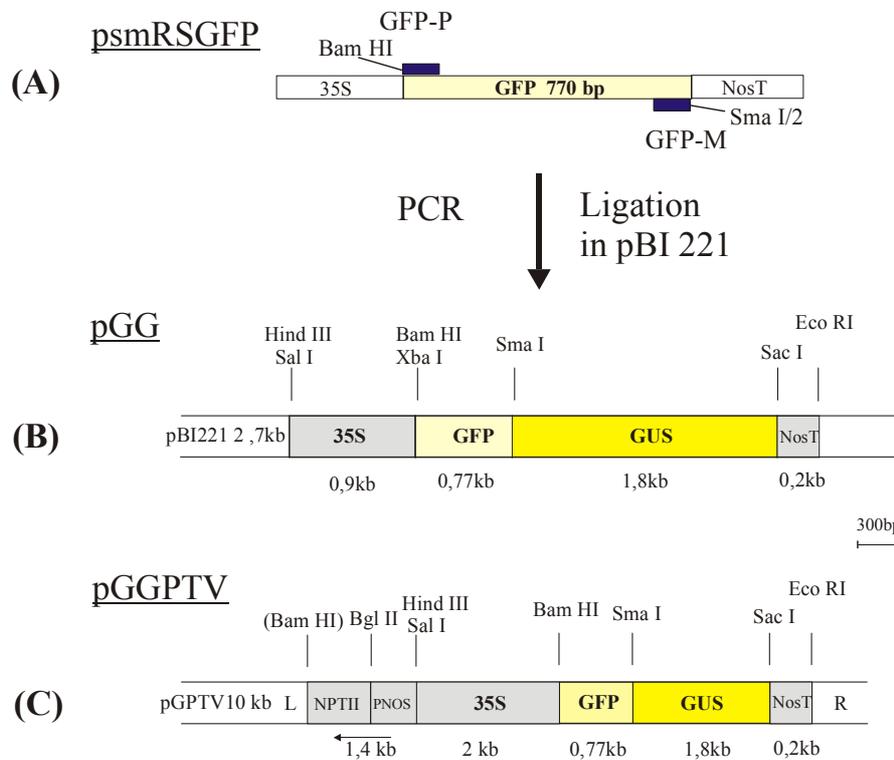


Abbildung 2.6: Herstellung der GFP-GUS-Basisvektoren mit Restriktionsschnittstellen. Aus dem psmRSGFP-Vektor (A) wird das GFP-Gen mit den Primern GFP-P/GFP-M (s. Text) amplifiziert und nach Verdau in den pBI221 (B) und den pGPTV (C) einligiert, die dadurch zu den Vektoren pGG bzw. pGGPTV werden.

Da die vorhandenen Restriktionsschnittstellen nicht ausreichten, wurde am 5'-Ende des 35S-Promoters eine *Sal-I*-Schnittstelle eingefügt (s. Kap. 2.1.5.7). Aus dem selben Grund wurde die *Bam-HI*-Schnittstelle an der linken Grenze der T-DNA-Kassette (pGPTV) entfernt. Nachdem ein pGPTV-Vektor ohne Promoter-GUS-Kassette mit *Bam HI* linearisiert worden war, wurden die überstehenden Enden (*sticky ends*) durch das Klenow-Fragment aufgefüllt (s. Kap. 2.1.5.5) und der Vektor religiert. Auf diese Weise wurde die *Bam-HI*-Schnittstelle zwischen 35S und GFP bzw. GUS für Folgeklonierungen verwendet werden.

Nach der Fertigstellung der 35S::*gfp*::*uidA*-Basisvektoren wurde der 35S-Promoter durch die in Kap. 2.1.5.4 amplifizierten *AtPLA*-Promotoren ausgetauscht. Da die

Klonierungsreaktion mit der Größe des Vektors schwieriger wird und die Ligation von verdauten PCR-Produkten ohnehin problematisch ist, wurden die Promotoren zunächst in den kleineren pGG-Vektor kloniert und später für die Ligation in den pGPTV wieder herausgeschnitten. Ließen sich die amplifizierten Promoter auf Grund der endständigen Restriktionsschnittstellen nicht verdauen, wurde das Amplikon zunächst in einen Carrier-Vektor kloniert (s. Kap. 2.1.5.11), um von dort mit vorhandener Sequenzumgebung effizient herausgeschnitten zu werden.

In einer zweiten Generation der Promoter-Reporter-Konstrukte wurde auf das GFP verzichtet und nur Kombinationen aus PI – PIVC bzw. 35S plus dem *uidA*-Gen erstellt. Die Grundlage für diese Vektoren waren die pGGPTV-Konstrukte, aus denen das Reporter-Hybrid herausgeschnitten und das *uidA*-Gen einligiert wurde (PI und PIVC) oder durch Umklonieren der *AtPLA*-Promoter in den pGPTV (PIIA und PIVA) gelangten. Das *uidA*-Gen wurde zuvor für die Promoter-GUS-Konstrukte aus dem pBI221 herausgeschnitten. Alle Promoter-Konstrukte wurden durch Sequenzierung (SeqLab, Göttingen) verifiziert.

2.1.5.13 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation der *Arabidopsis* Pflanzen wurde zunächst der Stamm LBA 4404 und später der Stamm GV 3101 verwendet (s. Kap. 2.3.2). Beide Stämme wurden mit dem pGPTV über das *triparental mating* (van Haute et al., 1983) transformiert. Die Übertragung des Transformationsvektors (pGPTV) in den *Agrobacterium*-Stamm wird durch die *tra*-Gene des Plasmids pRK2013 (Bevan, 1984) vermittelt. Letzterer befindet sich in dem *E. coli*-Stamm HB101 und wird im Zuge des *triparental mating* zusammen mit dem pGPTV-Donor-Stamm und dem plasmidlosen *Agrobacterium* kultiviert (s. Protokoll).

Material:

- LB-Medium: 10,0 g NaCl
5,0 g Hefeextrakt
10,0 g Tryptone
In 800 ml aqua dest. lösen (pH 7,0 mit 5 N NaOH).
Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und in zwei 0,5 l Schott-Flaschen autoklavieren.

- LB-Agar: LB-Medium + 2 % Bactoagar
- M-9-Minimal: 10,0 g M9 Minimalsalze (Gibco/BRL)

Protokoll:

- Tag 1: 1.) Die drei Bakterienstämme werden über Nacht in je 10 ml LB + Antibiotika angezogen:
- E. coli* HB101 mit pRK2013 (30°C, 50 µg/ml Kanamycin)
 - E. coli* Top10 mit pGPTV (37°C, 50 µg/ml Kanamycin)
 - A. tumefaciens* LBA 4404 (30°C, 250 µg/ml Streptomycin)
 - oder *A. tumefaciens* GV3101 (30°C, 100 µg/ml Rifampicin).
- Tag 2: 2.) Je 2 ml der Übernachtskultur werden bei 3000 g für 5 Min. abzentrifugiert.
- 3.) Den Überstand verwerfen und das Sediment in LB ohne Antibiotika resuspendieren.
- 4.) 200 µl von jedem Stamm in ein Eppendorf-Cap geben, mischen und auf LB-Agar ohne Antibiotika ausplattieren. Zur Kontrolle werden Zweier-Kombinationen der drei Stämme ebenfalls auf LB-Agar ohne Antibiotika ausplattiert.
- 5.) Die Platten werden bei 30°C für 48 Std inkubiert.
- Tag 4: 6.) Auf den LB-Agar Platten sind dichte Bakterienrasen gewachsen. Von jeder Platte wird ein Ausstrich auf M9-Minimal-Agar plus Kanamycin (50 µg/ml) und Streptomycin (250 µg/ml) bei LBA4404 bzw. Rifampicin (100 µg/ml) bei GV3101 gemacht.
- 7.) Die Platten weitere 2 Tage bei 30°C inkubieren.
- Tag 6: 8.) Nur der Ausstrich aller drei Stämme zusammen hat Kolonien ergeben. Mit Einzelkolonien werden die Schritte 6 und 7 wiederholt.
- Tag 8: 9.) 2,5 ml LB-Medium plus Antibiotika (s. 6.) wird mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt (180 Upm).
- Tag 9: 10.) 500 µl der Übernachtskultur werden mit 500 µl sterilem Glycerin vermischt und die Kultur zur Lagerung in -80°C eingefroren.
- 11.) 1,5 ml der Übernachtskultur werden für eine Plasmidpräparation verwendet und das Plasmid nach Restriktion mit geeigneten Endonucleasen im Agarose-Gel überprüfen.

2.1.5.14 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformationen der Ligationsansätze erfolgt in hochkompetente Zellen (Top 10, 10^9 cfu/ μ g) der Firma Invitrogen oder im Falle der Überexpressionsvektoren (pQE-30) in eigens dafür hergestellten kompetenten Zellen (XL1, 10^6 - 10^7 cfu/ μ g).

2.1.5.15 Herstellung chemisch kompetenter XL1-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen basiert auf einem Protokoll von Nishimura et al. (1990) unter Verwendung des *E. coli* Stammes XL1-Blue. Bei der Herstellung sollte möglichst zügig gearbeitet und ab dem 3. Schritt darauf geachtet werden, dass die Zellen sich nicht erwärmen. Zur Bestimmung der Kompetenz der Zellen wurden Testtransformationen mit pBluescript-DNA durchgeführt, die eine Transformationseffizienz von $5 \times 10^6 - 10^7$ cfu/ μ g Plasmid ergaben. Eingefroren in -80°C behalten die Zellen über 3 Monate ihre Kompetenz ohne nennenswerten Verlust an Transformationseffizienz.

Material:

- Medium A: 10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Tryptone
10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,2 % Glukose
in 1 l aqua dest., pH 7,0 mit 5 M NaOH

- Medium B: 10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Tryptone
36 % Glycerin
12 % PEG (MW 7500)
12 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
in 1 l aqua dest., pH 7,0 mit 5 M NaOH

Protokoll:

- Tag 1: 1.) 3 ml LB + 12,5 µg/µl Tetracyclin mit Einzelkolonie von *E. coli* XL1-Blue beimpfen und über Nacht bei 37°C und 160 Upm anziehen.
- Tag 2: 2.) Mit 1 ml der Übernachtskultur 200 ml Medium A animpfen und bei 37°C schütteln (160 Upm).
- 3.) Bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 werden die Zellen für 10 Minuten auf Eis gestellt.
- 4.) Zellen für 10 Min. bei 1500 g und 4°C in SS34-Röhrchen abzentrifugieren.
- 5.) Überstand vorsichtig dekantieren und das Sediment durch leichtes Schwenken in 0,25 ml Medium A (4°C) + 1,25 ml Medium B (4°C) resuspendieren.
- 6.) Bakteriensuspension auf Eis in vorgekühlte, sterile 2 ml Eppendorfgefäße zu 100µl Aliquots pipettiert und sofort in -80°C wegfrieren.
- 7.) Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wird eine Transformation mit z.B. pBluescript Vektor (10 pg – 1 ng DNA) durchgeführt.

2.1.5.16 Transformation von XL1-Blue-Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten XL1-Blue-Zellen erfolgte nach Nishimura et al. (1990). In der vorliegenden Arbeit wurde der XL1-Blue-Stamm mit den angefertigten pQE-30-Konstrukten für die spätere Überexpression von rekombinanten AtPLA-Genen eingesetzt.

Protokoll:

1. Ein Aliquot kompetenter Zellen (100 µl) aus -80°C auf Eis auftauen.
2. 2-4 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen geben und leicht schütteln.
3. Die Zellen 30 Min. im Eis belassen.
4. Den Ansatz für genau 60 Sek. bei 42°C im Wasserbad inkubieren und anschließend im Eis auf 0°C abkühlen (2 Min.).
5. 0,5 ml vorgewärmtes LB-Medium zugeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C und 180 Upm zur Expression der Antibiotikaresistenz schütteln.
6. Je 50 µl und 450 µl auf LB-Agar Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.

Die Wahl von zwei Verdünnungsstufen stellt sicher, dass auch bei schwankender Ligations- oder Transformationseffizienz genügend viele transformierte Zellen erhalten werden, die auf Präsenz des Plasmids getestet werden können. Auf den LB-Agar Platten können aufgrund des Antibiotikums nur Bakterien-Kolonien wachsen, die den zu transformierenden Vektor mit dem Ampicillin-Resistenzgen beinhalten.

2.1.5.17 Transformation von Top 10-Zellen

Die Transformation der Ligationsansätze von pBI221, pCR[®]2.1-TOPO und pGPTV wurden mit hochkompetenten Zellen der Fa. Invitrogen durchgeführt. Auf diese Weise konnten auch bei geringer Transformationsrate aufgrund großer Vektoren oder einer niedrigen Anzahl an Vektor-Insert-Ligationsereignissen erfolgreich neue Konstrukte kloniert werden.

Material:

- SOC-Medium: 2,0 % Bactotryptone
(nach Life Technologies) 0,55 % Hefeextrakt
10,0 mM NaCl
10,0 mM MgCl₂
10,0 mM MgSO₄
20,0 mM Glukose
pH 7,0 mit 5 N NaOH

Protokoll:

1. Kompetente *E. coli* Zellen aus -70°C auf Eis auftauen.
2. 2-8 μl des Ligationsansatzes auf die Zellen (50 μl) geben und vorsichtig durch Anschnippen mischen.
3. Zellen 20 Min. auf Eis inkubieren.
4. Für 30 Sek. einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad aussetzen.
5. 2 Min. auf Eis abkühlen.

6. 250 ml SOC-Medium zu den Zellen geben und Röhrchen horizontal bei 200 Upm und 37°C 30 Min. schütteln (Ampicillin). Zur Ausbildung der Kanamycinresistenz 1 Std. schütteln.
7. 50 und 250 µl des Transformationsansatzes auf je eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) geben und über Nacht bei 37°C inkubieren. Bei Blau/Weiß-Selektion wird zuvor das X-Gal auf den Platten ausgestrichen (s. Kap. 2.1.5.15).

2.1.5.18 Blau/Weiß-Selektion

Einige Vektoren wie z.B. der pCR[®]2.1-TOPO-Vektor haben die Möglichkeit einer Blau/Weiß-Selektion, um somit Zellen mit rekombinantem Plasmid von Zellen mit nicht-rekombinantem Plasmid zu unterscheiden. Die Selektion geht auf eine Enzymreaktion der β -Galactosidase zurück, die durch das *lac Z*-Gen kodiert wird. Die Sequenz des *lac Z*-Gens ist geteilt, mit dem 5'-Ende auf dem Plasmid ($\Delta lac Z$) und dem 3'-Ende im Genom eines passenden Bakterienstammes (z.B. Top 10). Der plasmid-kodierende Teil des *lac Z*-Gens beinhaltet eine *multiple cloning site*, über die DNA-Fragmente eingebaut werden können. Als Konsequenz eines Einbaus verschiebt sich das Leseraster des $\Delta lac Z$ -Gens, die aminoternale Untereinheit der β -Galactosidase kann nicht mehr exprimiert werden und die Enzymfunktion fällt aus. Ist die β -Galaktosidase aktiv, wird ein farbloses Substrat (X-Gal) in seine Reaktionsprodukte gespalten, was zum Blaufärben der gesamten Bakterienkolonie führt. Einige Bakterienstämme exprimieren konstitutiv einen Repressor, der die Expression des $\Delta lac Z$ -Gens unterdrückt. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) wird der Repressor gebunden und die Suppression aufgehoben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Blau/Weiß-Selektion nur in Kombination mit dem TA-Klonierungskit von Invitrogene verwendet. Dazu wurden auf den LB-Platten von 2.1.5.17 40 µl des Substrates X-Gal (10 µg/µl) ausgestrichen und unter der Steril-Bank eingetrocknet. Die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) ist bei den Top-10-Zellen des Kits nicht nötig, da sie keinen Repressor exprimieren.

2.2 Biochemische Arbeiten

Die biochemischen Arbeiten befassen sich hauptsächlich mit der heterologen Expression in *Escherichia coli* und der biochemischen Analyse der daraus resultierenden rekombinanten Proteine. Weiterhin werden die verwendeten β -Glucuronidase-Tests erläutert.

2.2.1 Überexpression, Reinigung und Enzymtest rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Expression der *AtPLA*-Gene und die Reinigung als rekombinante Proteine aus *Escherichia coli* basiert auf einem System der Fa. Qiagen (The *QIAexpressionist*; Januar 2000). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bestandteile dieses Systems sind der Überexpressionsvektor (pQE-30) und zur Reinigung des rekombinanten Proteins die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA). Der pQE-30 ermöglicht die heterologe Expression in *E. coli*, wobei 6 zusätzlich angefügte Histidine am N-Terminus des Zielproteins die spätere Reinigung erleichtern (Abb.2.7).

```

Xho I
1  CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT
                                     Eco RI
51  AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
      Translation                6xHis          Bam HI
101  AGGAGAAATT AACTATGGAGA GGATCGCATC ACCATCACCA TCACGGATCC
      Sac I           Sma I Sal I Pst I Hind III
151  GCATGCGAGC TCGGTACCCC GGGTCGACCT GCAGCCAAGC TTAATTAGCT

```

Abbildung 2.7: Teilsequenz des pQE-30-Vektors mit Translationsstart, 6x Histidin-Codon (je fett und unterstrichen) und *multiple cloning site*.

Zwei der sechs Histidine binden über ihre Imidazolgruppen an ein Nickel-Atom. Das Nickel wiederum ist stabil über vier Ionenbindungen durch Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert. Trägersubstanz der NTA ist Agarose. Die drei Komponenten werden als Ni-NTA-Matrix bezeichnet. Das gebundene 6xHis-Tag-Protein wird, nachdem nicht gebundenes Protein von der Matrix gewaschen wurde, durch hohe Imidazol-Konzentrationen von dem Nickel-Ion verdrängt und kann von der Matrix eluiert werden.

Die *AtPLA*-Gensequenz wird auf der Grundlage der cDNA-Sequenz in der PCR mit einer *Proof-Reading*-Polymerase hochvermehrt. Dabei werden Primer verwendet, die durch zusätzliche 5'-Restriktionsschnittstellen die Ligation in den pQE-30 ermöglichen (s. Kap. 2.1.5.4). Das Start-ATG des *Arabidopsis*-Gens wird dabei ausgeschlossen, damit es in *E. coli* nicht als interner Translationsstart verwendet wird. Bei der Konstrukterstellung ist darauf zu achten, dass das Gen im selben Leseraster wie das Start-ATG im pQE-30 liegt. Auf Grund der langen Gensequenz der *AtPLA* auf Chromosom I (Start-Stop: 3936 bp) wurde zunächst nur der mittlere Bereich, homolog den anderen *AtPLAs*, in den pQE-30 kloniert. Da die Expression dieses Teilfragmentes kein aktives Enzym produzierte, wurde anschließend die gesamte *AtPLA* I-Sequenz rekombinant exprimiert. Die rekombinanten Proteine werden in Anlehnung an die Gene als Enzym I_{kurz}, Enzym I, Enzym IIA und Enzym IVA bezeichnet. Im Folgenden sind die Primer für die Amplifizierungen der einzelnen Gene mit den angefügten Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) dargestellt:

AtPLA I kurz:

E1a P (Bam HI) : 5' cgggatccaa tgaaattctg cgacgttcc 3'
 E1a M (Pst I) : 5' attctgcaga gtagtatgta atgagg 3'

AtPLA I gesamt:

E1a P2 (Sac I) : 5' gcagagctct cttctacatg ttcttctc 3'
 E1a M2 (Sal I) : 5' gcagtcgacc tatacattag gaagatg 3'

AtPLA IIA:

E2a P (Bam HI) : 5' cgggatccca aatggacagc cccaaatc 3'
 E2a M (Pst I) : 5' ttctgcagtt agatcctaata tggagc 3'

AtPLA IVA:

E4a P (Bam HI) : 5' cgggatccga gaacaaatcg ccctcc 3'
 E4a M (Pst I) : 5' attctgcagt tattttatct cttgtg 3'

Restriktion von Vektor und Insert sowie die Ligation und Transformation erfolgte wie in Kap. 2.1.5 beschrieben. Nach der Einklonierung ergibt sich aus dem ATG-Startcodon des pQE-30-Vektors, dem 6x His-Tag und, je nach verwendeter Restriktionsschnittstelle, eine Nukleotidsequenz von 36 – 48 bp, die zusätzlich an die cDNA (ohne ATG) der *AtPLA*-Gene angehängt wurde. Dies entspricht 12 – 16 am N-Terminus der *AtPLA*-Proteine angefügten

Aminosäuren. Um die Anzahl an zusätzlichen Aminosäuren gering zu halten, wurde stets die erst mögliche 5'-Restriktionsschnittstelle nach dem 6x His-Tag für die Klonierung der cDNAs gewählt.

2.2.2 Überexpression

Die Überexpression der einzelnen rekombinanten Proteine erfolgte in XL1-Blue-Zellen. Dieser Stamm besitzt auf seinem F-Epison das Gen für den *lac*-Repressor sowie für die Tetracyclinresistenz. Ersteres ist nötig, um die Transkription des Zielproteins über den *lac*-Operator zu unterdrücken. Erst wenn der Repressor durch IPTG gebunden wird (= Induktion) erfolgt die maximale Transkription bzw. Expression des folgenden Gens. Der pQE-30 besitzt das β -Laktamase Gen (*bla*), welches Ampicillinresistenz verleiht. Die Inokulation der Überexpressionskultur erfolgt mit einer Starterkultur (Übernachtkultur). Die Starterkultur darf die exponentielle Phase (OD_{600} 0,5-0,8) nicht überschritten haben, da die Zellen sonst durch Selbstinduktion in der Expression des Zielproteins dereguliert sind. Die Induktion erfolgt für die native Reinigung (Enzym IIA, Enzym IVA) bei 30°C und für die Reinigung von *inclusion bodies* (Enzym I) bei 37°C jeweils für 30 Min. Die Abzentrifugation der induzierten Zellen erfolgte in zwei SS34-Röhrchen (Sorvall) die jeweils 3 x beladen wurden, um die Zellen in nur zwei Sedimenten zu sammeln. Größere Zentrifugationsgefäße standen nicht zur Verfügung.

Material:

- LB-Medium: 10,0 g NaCl
5,0 g Hefeextrakt
10,0 g Tryptone
In 800 ml aqua dest. lösen (pH 7,0 mit 5 N NaOH).
Mit aqua dest. auf 1 l auffüllen und in zwei 0,5 l Schott-Flaschen autoklavieren.
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; 0,5 M)
- Ampicillin (100 mg/ml)
- Tetracyclin (25 mg/ml)

Protokoll:

- Tag 1: 1.) Anzucht des Bakterienklons aus der Glycerinkultur (-70°C) über Nacht in 20 ml LB + 100 µg/ml Ampicillin + 25 µg/ml Tetracyclin bei 37°C und 180 Upm.
- Tag 2: 2.) Mit 5 ml der Übernachtskultur (OD₆₀₀ 0,5-0,8) 250 ml LB-Medium + Ampicillin (100µg/ml) + Tetracyclin (25µg/ml) animpfen und bei 37°C und 200 Upm auf dem Schüttler inkubieren.
- 3.) Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wird die Kultur auf 0,5 mM IPTG eingestellt und für weitere 30 Min. bei 30°C (Enzym I, Enzym I_{kurz}: 37°C) inkubiert.
- 4.) Die Zellsuspension bei 4°C abzentrifugieren; zwei SS34-Röhrchen je 3 mal beladen und bei 12.000 g für 8 Min. zentrifugieren. Der Überstand wird nach jeder Zentrifugation verworfen. Zellkultur bis zum Zentrifugieren in 4°C stellen.
- 5.) Zell-Sediment für die nachfolgende Lysis bei -20°C einfrieren, wobei das Einfrieren bereits Bestandteil der Lysis ist (s. Kap. 2.2.3) oder zur Lagerung dient.

2.2.3 Native Reinigung rekombinanten Proteins

Die Reinigung des rekombinanten Enzyms IIA und Enzyms IVA erfolgte unter nativen Bedingungen, da ausreichende Mengen an löslichem Protein nach der Expression in *E. coli* vorlagen. Die Expression der beiden Konstrukte für Enzym I führte jeweils zu unlöslichem Protein (s. Kap. 3.1.3). Vor der Reinigung werden die Zellen in drei Schritten lysiert. Nach der Überexpression wird das Sediment aus 2.2.2 über Nacht in -20°C eingefroren. Dieser Schritt kann auch durch dreimaliges Frieren-Tauen in flüssigem Stickstoff ersetzt werden, um somit am selben Tag fortzufahren. Die weiteren Schritte bestehen aus einer chemischen Lyse gefolgt vom Aufschließen der Zellen in einem Potter (Homogenisator), wie im Protokoll beschrieben. Die verwendeten Puffer entstammen dem Handbuch von Qiagen (*The QIAexpressionist*), sind aber teilweise verändert. Zu Beginn der Reinigung liegen die induzierten Zellen aus 250 ml Kultur als zwei Sedimente in SS34 Röhrchen vor.

Material:

- 100 mg/ml Lysozym

- 1 mg/ml DNase I
- Lysis-Puffer: 50,0 mM NaH₂PO₄,
300 mM NaCl
10,0 mM Imidazole
0,1 % Tween-80
10,0 % Glycerol
pH 7,5 mit 5N NaOH
- Wasch-Puffer: 50,0 mM NaH₂PO₄,
300 mM NaCl
20,0 mM Imidazole
pH 8,0 mit 5 N NaOH
- Elution-Puffer: 50,0 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl (nicht bei Enzym IVA)
250 mM Imidazole
pH 8,0 mit 5 N NaOH

Protokoll:

1. Je Sediment (SS34 Röhrchen) werden 5 ml Lysis-Puffer + 1 mg/ml Lysoszym + 10 µg/ml DNase I zugegeben, das Sediment auf dem Vortex resuspendiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert.
2. Beide Lysis-Ansätze werden zusammengegeben und die Zellen auf Eis in einem Homogenisator für ca. 5 Min. mit kräftigen Bewegungen aufgeschlossen.
3. Zur Trennung der löslichen von den festen Bestandteilen wird der Ansatz bei 12.000 g, 4°C und für 12 Min. zentrifugiert (SS34).
4. Überstand in ein steriles SS34-Röhrchen geben und mit 0,5-1 ml Ni-NTA versetzen; auf Eis für 20 Min. bei ca. 160 Upm schütteln (Binden des Enzyms an die Matrix).
5. Suspension in ein Zentrifugenglas (konisch) überführen und die Ni-NTA in der Heraeus Biofuge (Rotor HSA 4100) vom Überstand trennen (2200 Upm für 1 Min. bei 4°C).
6. Überstand verwerfen und die Ni-NTA-Agarose in 5 ml Wasch-Puffer resuspendieren und wie unter 5. zentrifugieren. Überstand verwerfen und einmal wiederholen.

7. Ni-NTA-Agarose in 0,5-1,0 ml Elutions-Puffer resuspendieren (löst das rekombinante Protein von der Matrix). Nach erneutem Zentrifugieren (s. 5.) das Eluat (=Überstand) mit dem Protein in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgesäß füllen.
8. Eluat von Enzym IIA über Nacht gegen 200 Vol. 25 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysieren.

Das Enzym IVA konnte ohne NaCl im Elutions-Puffer von der Matrix eluiert werden und blieb über Monate im Elutionspuffer bei 4°C aktiv geblieben. Enzym IIA wurde mit 300 mM NaCl eluiert und anschließend dialysiert (s. Kap. 2.2.7). Die Lagerung von Enzym IIA erfolgte bei -20°C im Folgenden Puffer:

Enzym IIA Lagerungspuffer (-20°C):

- 20,0 mM Tris, pH 7,5
- 40,0 % Glycerin
- 50,0 mM KCl
- 1,0 mM CaCl₂
- 2,0 mM DTT

Zur Überprüfung der Überexpression und der Reinigung werden von den Zwischenschritten und dem Eluat Aliquots in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteingrößen durch einen mitlaufenden Standard geschätzt.

2.2.4 Denaturierende Reinigung rekombinanten Proteins

Von den rekombinanten Proteinen Enzym I und Enzym Ik konnte nach der Expression in *E. coli* kein lösliches Protein gereinigt werden. Das exprimierte Protein wurde von *E. coli* in *inclusion bodies* verpackt, die sich nach der Zellyse und anschließender Zentrifugation im Zellsediment und nicht, wie in Kap. 2.2.3, im Überstand befinden. Diese Protein-Aggregationen können mit denaturierenden (chaotropen) Reagenzien gelöst und das rekombinante Protein über Ni-NTA gereinigt werden. Zum Lösen von *inclusion bodies* wird 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidin-Hydrochlorid (Gu-HCl) verwendet, wobei das Protein dabei vollständig denaturiert wird und keine Enzymaktivität mehr besitzt. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, über das sukzessive Entfernen der chaotropen Substanz (s. Dialyse) eine Rückfaltung (Renaturierung) des Proteins zu ermöglichen (s. Kap. 2.2.5). Hier wird zunächst auf der Grundlage des Zellsediments aus Kap. 2.2.2 der Aufschluss der Zellen und

die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen dargestellt. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgt im Gegensatz zur nativen Reinigung mit der French-Press, da mit dieser Methode die Zellen nahezu vollständig aufgeschlossen werden und nach der anschließenden Zentrifugation kaum Proteine aus *E. coli* von nicht aufgeschlossenen Zellen im Sediment vorhanden sind. Im Laufe der Arbeit wurden unterschiedliche Puffer zur Lyse und Reinigung der Proteine Enzym I_(kurz) getestet, wobei die zuletzt verwendete Pufferkombination auf einer Publikation von Dennis et al. (1998) basiert und hier beschrieben ist.

Material:

- 100 mg/ml Lysozym
- 1 mg/ml DNase I

- Lysis-Puffer A: 25,0 mM Tris, pH 8,0
100 mM NaCl
5,0 mM EDTA
10,0 mM β -Mercaptoethanol

- Lysis-Puffer B: Lysis-Puffer A + 4 M Gu-HCl

- Puffer-C: 25,0 mM Tris, pH 8,0
500 mM NaCl
20,0 mM Imidazol
10,0 mM β -Mercaptoethanol
1,0 M Gu-HCl

- Puffer-D: 25,0 mM Tris, pH 8,0
500 mM NaCl
250 mM imidazole
10,0 mM β -Mercaptoethanol
4,0 M Gu-HCl

Protokoll:

1. Je Sediment (SS34 Röhrchen) werden 7,5 ml Lysis-Puffer A + 1 mg/ml Lysozym + 10 µg/ml DNase I zugeben, das Sediment auf dem Vortex resuspendiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert.
2. Beide Lysis-Ansätze werden zusammengegeben und in drei Zyklen in der French-Press bei 1000 psi aufgeschlossen.
3. Zur Trennung der löslichen von den festen Bestandteilen wird der Ansatz bei 12.000 g, 4°C und für 12 Min. zentrifugiert (SS34).
4. Überstand verwerfen und das Sediment in 5 ml Lysis-Puffer B resuspendieren und über Nacht bei 4°C die *inclusion bodies* vollständig lösen.
5. Gelöstes Protein bei 12.000 g für 10 Min. bei 4°C zentrifugieren (SS34), um lösliche Bestandteile zu sedimentieren.
6. Überstand in ein SS34-Röhrchen geben und MgSO₄ zu einer Gesamtkonzentration von 10 mM zugeben, um das EDTA zu chelatisieren.
7. Proteinlösung mit 0,5-1 ml Ni-NTA versetzen und auf Eis für 30 Min. bei ca. 160 Upm schütteln (Protein bindet an die Matrix).
8. Suspension in ein Zentrifugenglas (konisch) überführen und die Ni-NTA in der Heraeus Biofuge (Rotor HSA 4100) vom Überstand trennen: 2200 Upm für 1 Min. bei 4°C.
9. Überstand verwerfen und die Ni-NTA-Agarose in 5 ml Puffer C resuspendieren und wie unter 7. zentrifugieren. Überstand verwerfen und einmal wiederholen.
10. Ni-NTA-Agarose in 0,5-1,0 ml Puffer D schwenken, um das rekombinante Protein von der Ni-NTA Matrix zu lösen und wie unter 7. zentrifugieren. Den Überstand mit dem gereinigten Protein aufbewahren und den Elutionsschritt zweimal wiederholen.
11. Das eluierte Protein auf 2 mM EDTA einstellen und bei 4°C lagern.

Zur Überprüfung des Ergebnisses werden von den Zwischenschritten und dem Eluat Aliquots in der SDS-PAGE aufgetrennt (s. Kap. 2.2.6) und die Proteingrößen durch einen mitlaufenden Standard geschätzt.

2.2.5 Rückfaltung denaturierten Proteins

Ausgangsmaterial für die Rückfaltung ist das in Kap. 2.1.3 denaturierend gereinigte Protein oder die lysierten *inclusion bodies* ohne Ni-NTA-Reinigung. Im Prinzip soll die Rückfaltung des Proteins durch langsames Entfernen des Gu-HCl ablaufen, um somit die Ausbildung der natürlichen Tertiärstruktur zu ermöglichen. Der erfolgreiche Ablauf dieses Prozesses hängt aber wesentlich von den Umgebungsbedingungen sowie von der Proteinkonzentration ab. Zu den Randbedingungen zählen die Temperatur, pH, Salze, Red./Ox.-Verhältnis, andere Pufferzusätze (s. u.) und die Dauer der Rückfaltung.

Zur Renaturierung wurden zwei Methoden angewendet. Zunächst wurde versucht, durch Dialyse das Protein in eine aktive Form zu überführen. Das eingesetzte Dialysesystem basiert auf einem Renaturierungsreagenz der Fa. Roth und wird im Folgenden beschrieben.

A. Renaturierung durch Dialyse:

Material:

- Roti[®]-Fold (8x), Fa. Roth, L788.1

- PBS (2x), 1l:
 - 16,0 g NaCl
 - 0,4 g KCl
 - 2,88 g Na₂HPO₄
 - 0,48 g KH₂PO₄
 - pH 7,4

- Roti[®]-Fold (1x), 400ml:
 - 200 ml PBS (2x)
 - 50,0 ml Roti[®]-Fold (8x)
 - 150 ml aqua dest.

- Dialysierschlauch (s. Dialyse Kap. 2.2.7)

- Lysis-Puffer: 25 mM Tris, pH 8,0
- 100 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 10 mM β -Mercaptoethanol
- 4 M Gu-HCl

Protokoll:

1. Konzentration der lysierten *inclusion bodies* bzw. des denaturierend gereinigten Proteins bestimmen (Bradford).
2. Protein mit Lysis-Puffer auf eine Konzentration von 40-100 μ g/ml einstellen, in einem Volumen von 1-2 ml.
3. 1/10 Volumen Roti[®]-Fold (8x) zugeben und mischen.
4. Dialyse gegen 200 Vol. Roti[®]-Fold (1x) über Nacht bei 4°C.
5. 50 Vol. PBS (1x) zugeben (> 2Std., 4°C).
6. Erneut 150 Vol. PBS (1x) zugeben (> 2Std., 4°C).
7. Die Hälfte der Dialysierlösung von 5. verwerfen und 200 Vol. PBS (1x), (> 2Std., 4°C) zu der Dialyse geben.
8. Die Hälfte der Dialysierlösung von 6. verwerfen und 200 Vol. PBS (1x), (> 2Std., 4°C) zu der Dialyse geben.
9. Ansatz gegen 200 Vol. PBS (1x) dialysiert (> 2Std., 4°C).

Nach der Dialyse wurde das Protein in der SDS-PAGE überprüft und für den Enzymtest eingesetzt. Da im Reaktionspuffer (50 mM MES, pH 6,8, 1 mM CaCl₂) keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden eine Reihe von Zusätzen getestet, die auch bei der Renaturierung durch Umpufferung angewendet wurden (s. unten).

B. Renaturierung durch Umpufferung:

Ausgangsmaterial für die Umpufferung sind, wie zuvor, denaturierend lysierte *inclusion bodies* oder zusätzlich über Ni-NTA angereichertes Enzym I_{kurz}. Die Proteinlösung wurde zunächst in einem Puffer (25 mM Tris, pH 8,0) verdünnt (10-40 μ g/ml), der zusätzliche Komponenten zur Förderung der Renaturierung enthielt. Während einer Inkubationszeit von 24-72 Std. bei 4°C oder RT wurde die Probe geschüttelt bzw. gerührt.

Zur Überprüfung des Renaturierungsergebnisses wurde ein Aliquot des Ansatzes für den Enzymtest eingesetzt. Puffer-Komponenten, die eine Renaturierung unterstützen, können geringe Gu-HCl Konzentrationen zur Verhinderung der Reaggregation oder Red./Ox.-Systeme zur Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken sein. Eine weitere Gruppe bilden Komponenten, die der Proteinstabilisierung dienen, wie z.B. Saccharose oder Glycerin, wobei in der Literatur der Erfolg der Renaturierung durch einzelne Bestandteil nicht immer einer bekannten Funktion zugewiesen werden kann. Im folgenden ist eine Liste von Puffer-Komponenten mit beispielhaften Konzentrationen angeführt. Die Komponenten wurden in verschiedenen Konstellationen und unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt:

- β -Mercaptoethanol, 10 mM
- DTT, 1 mM
- Calciumchlorid, 10 mM
- BSA, 50 μ g/ml
- Phosphatidylcholin, 10 mg/ml
- Roti[®]-Fold (8x), 1/10 Vol.
- Tween-80 o. Triton-X 100, 0,05%
- Glutathion GSH/GSSG, 4 mM red. /2 mM ox.
- Cystein, 5 mM
- Gu-HCl, 0,8 M
- Glycerol, 10%
- L-Arginin, 0,5 M
- Saccharose, 20%
- NaCl, 100 mM
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM
- MgSO_4 , 10 mM
- EDTA, 1 mM

2.2.6 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zur Auftrennung von Proteinen in dem Bereich von 40 – 60 kDa wurde ein 10%iges

Acrylamidgel gegossen (Sambrook et al., 1989), bestehend aus einem Trenngel (10 ml-Ansatz) und einem Sammelgel (4 ml-Ansatz). Ammonium-Persulfat wurde erst kurz vor dem Gießen in die Lösung gegeben, um ein vorzeitiges Polymerisieren des Gels zu verhindern.

Von den einzelnen Schritten der Expression wurden 50 µl Aliquots der *E. coli*-Kultur abzentrifugiert und in 1-2 Vol. mit 2 x SDS-PAGE Proben-Puffer resuspendiert. 10 µl von den Reinigungs- und Elutionsschritten wurden 1:1 mit 2 x SDS-PAGE Proben-Puffer verdünnt. Alle Proben wurden vor dem Auftragen drei Minuten lang gekocht. Pro Tasche wurden 20 µl Probe aufgetragen.

Material:

- Trenngel: 4,0 ml aqua dest.
(10ml) 3,3 ml 30%iges Acrylamid-Mix
2,5 ml 1,5 M Tis, pH 8,8
0,1 ml 10% SDS
0,1 ml 10% Ammonium Persulfat
4,0 µl TEMED
- Sammelgel: 2,7 ml aqua dest.
(4ml) 0,67 ml 30%iges Acrylamid-Mix
0,5 ml 1,0 M Tris, pH 6,8
0,4 ml 10% SDS
0,4 ml 10% Ammonium Persulfat
4µl TEMED
- 2 x SDS-PAGE Proben-Puffer:
 - 90 mM Tris/HCl, pH 6,8
 - 20 % Glycerol
 - 2,0 % SDS
 - 0,0 2% Bromphenolblau
 - 0,1 M DTT (kurz vor Gebrauch zugeben)

- 5 x TGE-Puffer: 1,25 M Tris, pH 8,3
1,25 M Glycine
0,5 % SDS

- Proteinleiter : Bibco/BRL, 10 kDa Protein Ladder (10-200 kDa), B.-Nr.:10064-012

- Färbelösung: 0,1 % Coomassie blue R250
25 % Isopropanol
10 % konz. Essigsäure (98%)

- Entfärber: 25 % Isopropanol
10 % konz. Essigsäure (98%)

Protokoll:

1. Das Gel gießen:
 - Gießvorrichtung installieren, = 2 Gele (Biorad).
 - Trenngel in einem Becher mischen und bis ca. 4/5 der Kammer gießen.
 - Mit Isopropanol überschichten und 25 – 30 Min. aushärten lassen.
 - Mit Sammelgel die Kammer auffüllen und Kämme einsetzen; ca. 30 Min. aushärten.
2. Auftrennen von Proben:
 - Gele in den Elektrophorese-Behälter setzen und mit ca. 0,5 l 1 x TGE-Puffer befüllen.
 - 1. und 10. Tasche mit 2 x SDS-PAGE Proben-Puffer füllen; 2 – 9: Marker und Proben.
 - Elektrophorese anschließen und starten: 140 V, 100 mA, 15 W, Dauer ca. 1,5 Std.
3. Anfärben des Gels:
 - Gel aus der Vorrichtung nehmen und das Sammelgel entfernen.
 - Gel in die Färbelösung legen und 30 Min. leicht schütteln.
 - Gel aus der Färbelösung nehmen und einmal mit Wasser abspülen. Die Färbelösung kann 3 – 4 mal wiederverwendet werden.
 - 0,5-1 h in der Entfärbelösung schütteln.
 - Dokumentation des Gels mit Auflicht (Intas).

Proben, die Gu-HCl enthalten, können nicht direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt werden, da sich Präzipitate mit dem SDS bilden. Um das Protein aus der Gu-HCl-Lösung zu bekommen, wird es mit Trichloressigsäure (TCA) nach dem folgenden Protokoll gefällt.

TCA-Fällung:

1. 5 µl Protein (Gu-HCl-Lösung) 1:20 mit Wasser verdünnen + gleiches Volumen 10%iges TCA.
2. 20 Min. auf Eis inkubieren und 15 Min. bei 15.000 Upm zentrifugieren (Tischzentrifuge).
3. Überstand verwerfen und Sediment mit 100 µl eiskaltem EtOH waschen, anschließend 10 Min. bei 15.000 Upm zentrifugieren.
4. Sediment trocknen, in 2 x SDS-PAGE Proben-Puffer lösen und auftragen.

2.2.7 Dialyse

Die zu dialysierende Lösung wird in einen auf einer Seite geschlossenen Dialysierschlauch gegeben, der anschließend mit einer zweiten Klammer auch auf der anderen Seite verschlossen wird. Die Dialyse erfolgt gegen 200 Vol. eines Puffers bei 4°C und unter langsamem Rühren, wobei der Puffer nach 4 Std. oder später gewechselt wird (je nach Anwendung). Der Dialyseschlauch ist durchlässig für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 10.000 – 20.000 (= *cut-off value*). Die Vorbereitung des Dialysierschlauches erfolgt wie im Protokoll beschrieben.

Material:

- Dialysierschlauch: VISKING (Roth), Typ 27/32, 30m, Art.-Nr.: 1784.1
- Dialyseclips

Protokoll:

1. 10-15 cm lange Abschnitte Dialyseschlauch 3 x über Nacht in 10 mM EDTA waschen (4°C).

2. Nach dem Waschen die Schläuche in aqua dest. + 10% EtOH bei 4°C aufbewahren.
3. Vor dem Gebrauch den Schlauch mit doppelt destilliertem Wasser spülen.
4. Den Schlauch auf einer Seite mit eine Dialyseclip verschließen und die zu dialysierende Lösung einfüllen; mit zweiter Klammer Schlauch verschließen.
5. Mindestens 4 Std. gegen den Dialysepuffer bei 4°C dialysieren, evtl. Puffer mehrfach wechseln und die Dialyse durch Rühren unterstützen.
6. Nach Beendigung der Dialyse wird die dialysierte Lösung in ein steriles Gefäß gegeben und für folgende Anwendungen eingesetzt.

2.2.8 Liposomen

Als Substrat für die Enzymtests der überexprimierten Proteine werden Liposomen aus 93,3% Soja-Phosphatidylcholin (Sigma, P3644) und 6,7% 1,2-bis-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (bis-BODIPY-PC, MoBiTec, B-7701) hergestellt. Bis-BODIPY-PC besitzt an beiden Fettsäureresten eine fluoreszierende Gruppe. Bei der Herstellung eines weiteren Liposomensubstrates wird bis-BODIPY-PC gegen β -BODIPY-PC (2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, MoBiTec, D-3793) ausgetauscht, welches nur an der *sn*-2 Position eine fluoreszenzmarkierte Fettsäure besitzt. Aufgrund des Chlorophorms werden alle Arbeiten in Bor-freien Glasbehältern durchgeführt. Lipide werden bei Luftkontakt durch Oxidation zerstört, daher ist die Exposition zu vermeiden und die Substrate sind unter Stickstoffatmosphäre zu lagern.

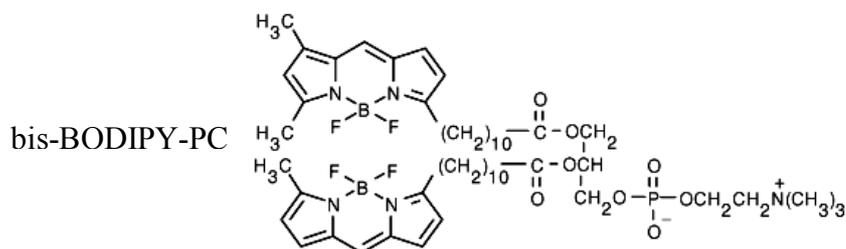
Material:

- 1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora- 3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl) -*sn*-glycero-3-phosphocholine (bis-BODIPY® FL C₁₁-PC)

Molekulare Formel: C₅₂H₇₈B₂F₄N₅O₈P

Molekulargewicht: 1029,80

Struktur:

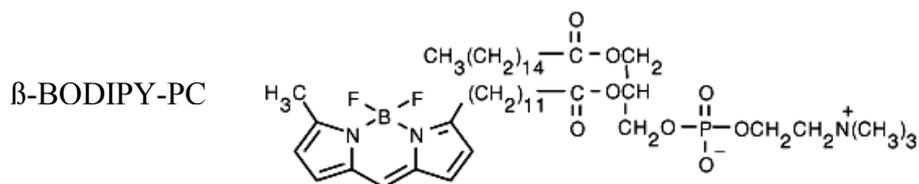


- 2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza- s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- sn-glycero-3-phosphocholine (β -BODIPY® 500/510 C12-HPC)

Molekulare Formel: $C_{46}H_{79}BF_2N_3O_8P$

Molekulargewicht: 881,93

Struktur:



- Phosphatidylcholin aus Soja (Sigma, P3644) 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Chloroform, -20°C , Glasröhrchen
- bis-BODIPY-PC (M_r 1029,8) K.-Nr.: B-7701; 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 98% EtOH absolut
- β -BODIPY-PC (881,93) K.-Nr.: D-3793; 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 98% EtOH absolut
- Puffer A: 50 mM Tris,
100 mM KCl,
0,1 % SDC, pH 8,0
- N_2

Protokoll:

1. 40,45 μl β -bis-BODIPY-PC (=13,35 μg) in einem Glasgefäß unter N_2 eindampfen.
2. 3,73 μl PC (=186,66 μg) + 100 μl CHCl_3 auf das BODIPY-PC geben und durch Vortexen lösen.

3. PC- β /bis-BODIPY-Gemisch unter N₂ vollständig eindampfen.
4. 200 μ l Puffer A hinzugeben, Lipide resuspendieren (vortexen) und für 5 Min. in ein Ultraschallbad setzen. Die Suspension sollte einen opalen Glanz bekommen.
5. Liposomen bei -20°C lagern.

Grundsätzlich gilt es, die Liposomen oder deren Vorstadien möglichst wenig dem Licht und dem Luftsauerstoff auszusetzen. Für die Enzymtests werden 3 μ l der Liposomen pro Reaktion eingesetzt.

2.2.9 Enzymtest mit rekombinantem Protein

Der Enzymtest wird in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l durchgeführt und besteht aus 3 μ l Liposomen, 0,5 μ g rekombinantem Protein und einem Reaktionspuffer, der sich in der Zusammensetzung zwischen Enzym IIA und Enzym IVA unterscheidet (s. unten). Das überexprimierte Protein Enzym IVA ist bereits im Elutionspuffer (ohne NaCl) aktiv und wurde nach der Konzentrationsbestimmung (n. Bradford) direkt für den Enzymtest eingesetzt. Im Elutionspuffer bleibt Enzym IVA bei 4°C mehrere Monate stabil. Enzym IIA wird nach der Reinigung zunächst über Nacht gegen 200 Vol. 25 mM Tris pH 7,6 dialysiert, verliert aber im Dialysepuffer bei 4°C nach zwei Tagen schnell seine Aktivität. Die Experimente mit dem Enzym IIA wurden daher direkt am Tag der Dialyse oder maximal einen Tag später durchgeführt. In dem in Kap. 2.2.3 angeführten Lagerungspuffer bei -20°C bleibt das Enzym für mehrere Wochen aktiv, jedoch in einer abgeschwächten Form im Vergleich zum frisch dialysierten Eluat. Zudem ist Enzym IIA nur mit einem reduzierenden Agens, wie Cystein oder 1,4-Dithio-*DL*-threitol (DTT), aktiv. Die Reaktionsbedingungen wurden durch Variation der Puffer-Bestandteile, sowie der Reaktionsdauer und $-$ temperatur bestimmt.

Reaktionsbedingungen Enzym IIA:

Reaktionspuffer: 25 mM HEPES, pH 7,8
 (= 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure)
 2,0 mM CaCl₂
 5,0 mM Cystein

Der Enzymtest wird mit 0,5 μ g Protein und 3 μ l Liposomen bei 33°C für eine Stunde durchgeführt.

Reaktionsbedingungen Enzym IVA:

Reaktionspuffer: 50 mM MES, pH 6,8
 (= 2-Morpholinoethansulfonsäure)
 1,0 mM CaCl₂

Der Enzymtest wird mit 0,1-0,5 µg Protein und 3 µl Liposomen bei 33°C für 30 Minuten durchgeführt.

Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Stop-Puffers (s. Kap. 2.2.10). Die Reaktionsansätze wurden über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Fettsäuren am Substrat plus den Reaktionsprodukten auf der UV-Bank angeregt (s. Kap. 2.2.13).

2.2.9.1 pH-Reihe

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden die Enzyme in einem Bereich von pH 4,5 – pH 9 getestet (Tab. 2.3). Durch die Verwendung von Enzym IVA im Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) verschob sich der effektive pH-Wert in den Reaktionsansätzen der pH-Reihe. Die Abweichung wurde empirisch bestimmt und ist in der Tabelle 2.3 angeführt.

Tabelle 2.3: Puffer der pH-Reihe und effektiver pH-Wert nach Zugabe von 5% (Vol.) Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0).

| Puffer + 1 mM CaCl ₂ | inklusive 5% (Vol.) pH 8,0 (50mM NaH ₂ PO ₄), pH effektiv |
|---------------------------------|---|
| 50 mM MES pH 4,5 | pH _{eff.} 5,5 |
| 50 mM MES pH 5,5 | pH _{eff.} 6,0 |
| 50 mM MES pH 6,2 | pH _{eff.} 6,6 |
| 50 mM MES pH 6,8 | pH _{eff.} 7,24 |
| 25 mM HEPES pH 6,8 | pH _{eff.} 7,3 |
| 25 mM HEPES pH 7,2 | pH _{eff.} 7,41 |
| 25 mM HEPES pH 7,8 | pH _{eff.} 7,8 |
| 50 mM Tris pH 7,8 | pH _{eff.} 8,0 |
| 50 mM Tris pH 9,0 | pH _{eff.} 9,0 |

Die Zugabe des gegen 25 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysierten Enzms IIA führte zu keinen Veränderungen im effektiven pH-Wert. Die Durchführung der Enzymtests erfolgte wie in Kap. 2.2.9 beschrieben.

2.2.9.2 Inhibitoren

Zur näheren Charakterisierung der rekombinanten Proteine wurde die hemmende Wirkung einer Reihe von Inhibitoren getestet, die überwiegend PLA₂-Enzyme aus dem tierischen System hemmen. Die Kontrollreaktionen (ohne Inhibitor) sowie die verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors sind identisch in der Lösungsmittelkonzentration. Es folgt eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren:

- NDGA (*Nordihydroguaiaretic acid*):
Inhibitor der Lipoxigenase (IC₅₀ = 0,2 µM-30 µM) und Cyclooxygenase (IC₅₀ = 100 µM; Calbiochem, 479975-S).

- HELSS (*E-6-(bromomethylene)tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-one*):
Irreversibler Inhibitor der calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂, IC₅₀ = 60 nM); hemmt um den Faktor 1000 schwächer auch die cPLA₂ (Calbiochem, 374085-S).

- AACOCF₃ (*Arachidonyltrifluoromethyl ketone*):
Arachidonsäure-Analog; hemmt cytosolische PLA₂ beim Menschen (Calbiochem, 100109-S).

- PACOCF₃ (*Palmitoyl trifluoromethyl ketone*):
Reversibler Inhibitor der calcium-unabhängigen iPLA₂ (Calbiochem, 506274-S).

- ETYA (*5,8,11,14-eicosatetraynoic acid*):
Inhibiert PLA₂, Cyclooxygenase und verschiedene Lipoxigenasen (Calbiochem, 434741-S).

2.2.10 Dünnschichtchromatographie

Die Reaktionsansätze aus dem Enzymtest wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ihrer Hydrophobizität nach aufgetrennt. Die Proben werden am unteren Ende der Dünnschichtplatte aufgetragen und die Platte leicht angewinkelt in eine verschließbare Laufkammer gestellt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chlorophorm, Methanol und Wasser verwendet, in dem die hydrophoben Substanzen wie die Fettsäure mit der mobilen Phase auf der Platte nach oben wandern.

Material:

- Stopplösung (Methanol : Chlorophorm, 2:1)
- 0,1 M KCl (+ 4°C)
- Laufmittel (Chlorophorm 130 ml , Methanol 50 ml, H₂O 8 ml)
- Laufkammer mit Deckel
- Dünnschichtplatte: Merck, 20 x 20cm Kieselgel 60, B.-Nr.: 1.05721
- N₂

Protokoll:

1. 2 Vol. Stopplösung (des Reaktionsvolumens) auf den Reaktionsansatz geben und mixen; 20 Min. im Dunkeln stehen lassen.
2. 1 Vol. 0,1 M KCl (des Reaktionsvolumens) hinzugeben, vortexen und für 20 Min. in -20°C stellen.
3. Ansatz 30 Sek. bei 13.000 g zentrifugieren, die Chlorophormphase (unten) abnehmen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß geben.
4. Das Chlorophorm unter N₂-Begasung abdampfen.
5. Rückstand in 10 µl Chlorophorm resuspendieren und mit einer 20 µl Kapillare auf die Dünnschichtplatte auftragen.
6. Platte in die Laufkammer mit dem Laufmittel stellen und sofort Deckel schließen; Dauer ca. 1:20 Std.
7. Platte aus der Laufkammer nehmen und kurz unter dem Abzug abdampfen lassen; Platte mit UV-Licht anregen und dokumentieren.

2.2.11 Herstellung der Fettsäure- und Lysophosphatidylcholin-Standards

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte freie Fettsäure (FA) und Lysophosphatidylcholin (LPC) erfolgte über den Vergleich mit Standardsubstanzen, die durch Hydrolyse von bis-BODIPY-PC mit einer käuflichen PLA₂ (Sigma, P-9279) aus der Biene hergestellt wurden.

Material:

- Reaktionsansatz
 - 750 µl Tris-Puffer, 50 mM, pH 5,6
 - 100 µl Triton X-100, 10%
 - 100 µl CaCl₂, 0,1 M
 - 50,0 µl BODIPY 100 µg/300µl EtOH 70%
 - 2,0 µl PLA₂ 1200 Units/ml in Glycerin (Sigma, P-9279)
- 0,1 M KCl
- N₂

Protokoll:

1. Reaktionsansatz bei 37°C für 30 Min. im Schüttelbad inkubieren.
2. Stoppen der Reaktion mit 4 ml CHCl₃:CH₃OH:HCl (70:150:0,1) und 30 Min. bei RT stehen lassen.
3. Zugabe von 2 ml KCl (0,1 M) und wieder 30 min bei -20°C inkubieren.
4. 15 Min. bei 1500 g zentrifugieren.
5. Abnehmen und Eintrocknen der CHCl₃-Phase mit Stickstoff.
6. Rückstände in 100 µl Ethanol aufnehmen und bei -20°C lagern.

2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). Wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250, der mit Proteinen einen Komplex bildet und dabei sein Absorptionsmaximum von 465 nach

595 nm verschiebt. Die Eichung der Messung erfolgte mit definierten Mengen an Rinder-Serumalbumin (BSA).

Eine weniger exakte Abschätzung der Proteinkonzentration ist möglich, indem die unbekannte Probe zusammen mit definierten BSA-Mengen in der SDS-PAGE aufgetragen und anhand der Stärke der Banden die Menge geschätzt wird.

Material (Bradford):

- Bradfordreagenz, 1l: 100 ml 85% Phosphorsäure
50,0 ml 98% Ethanol
100 mg Coomassie Brillantblau G250
Auf 1 l mit aqua dest. auffüllen und nach dem vollständigen Lösen des Farbstoffes, einmal filtrieren (Papierfilter).
- BSA 10 mg/ml

Protokoll:

1. 5-20 µl Proteinlösung werden in 995-980 µl Bradfordreagenz gegeben. Für die Eichreihe gleiche Volumina von fünf BSA-Konzentrationen erstellen.
2. Proben für 10 – 60 Min. ins Dunkle stellen.
3. Messen der Proben am Photometer bei 595 nm.
4. Eichgerade erstellen und die unbekanntes Konzentrationen berechnen.

2.2.13 Quantitative Auswertung

Nach Beendigung des Enzymtestes wurde der Reaktionsansatz über ein Dünnschichtchromatogramm aufgetrennt (s. Kap. 2.2.10). Die quantitative Auswertung der Enzymaktivität erfolgte über die Integration der Helligkeit aller Pixel einer Bande bzw. eines Fleckes der fluoreszierenden Reaktionsprodukte. Hierzu wurde zunächst unter UV-Anregung

mit der Intas-Dokumentationsanlage ein Videobild der Dünnschichtplatte erstellt. Die Messung der einzelnen Flecke erfolgte mit dem Programm Scan Pack 2.0 (Biometra). Der Vergleich unterschiedlicher fluoreszierender Flecken erfolgte nur innerhalb einer Dünnschichtplatte, um die Unterschiedlichkeit verschiedener Platten zu vermeiden.

2.2.14 β -Glucuronidase-Test

Das Gen für die β -Glucuronidase (*uidA* oder *gusA*) entstammt dem *gus*-Operon aus *E. coli* (Jefferson et al., 1986). In der Pflanze wird dieses Gen für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt, speziell als Reportergen in Kombination mit pflanzlichen Promotoren. Durch Fusion von Promoter und *uidA*-Gen kann nach Transformation in die Pflanze die transkriptionelle Regulation durch den pflanzlichen Promoter über die Enzymaktivität des exprimierten β -Glucuronidase-(GUS)-Proteins untersucht werden. Der Nachweis der GUS-Aktivität läuft über die Umsetzung eines Substrates, welches je nach Anwendung variiert. Im histologischen GUS-Test spaltet das Enzym von dem Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid (X-Gluc) einen Chromophor ab, so dass nach Dimerisierung und Oxidation ein blauer Farbstoff erscheint. Der Farbstoff ist wasserunlöslich und präzipitiert am Ort der Entstehung. Auf diese Weise kann die gewebe- und zellspezifische Aktivität des Promoters detektiert werden.

Eine quantitative Erfassung der GUS-Aktivität ist über die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid messbar. Nach der Hydrolyse dieses Substrates entsteht das Fluorophor 4-Methylumbelliferon, das im Fluorimeter bei 365 nm angeregt wird und bei 455 nm emittiert (s. Kap. 2.2.14.2). Eine endogene β -Glucuronidase Aktivität des Wildtyps konnte unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen (pH 7,0) nicht nachgewiesen werden.

2.2.14.1 Histologischer GUS-Test

Im histologischen GUS-Test wurden ganze Pflanzen oder Pflanzenteile in der X-Gluc-Lösung inkubiert. Das in der Pflanze exprimierte GUS-Protein setzt das Substrat um und das Reaktionsprodukt erscheint als Blaufärbung in den GUS exprimierenden Geweben und Zellen. Zur besseren Identifizierung gefärbter Bereiche wurde nach Beendigung der GUS-

Reaktion das Chlorophyll der Pflanzen mit 70%igem Ethanol extrahiert. Die Lagerung der Explantate erfolgte ebenfalls in 70% Ethanol bei 4°C im Dunkeln.

Die Reaktionszeit variiert je nach Promoter von 20 Min. bis 16 Std. und unterscheidet sich ebenfalls in der Quantität innerhalb einzelner transgener Linien eines Promoterkonstruktes. Die Mindest-Färbedauer der vier verschiedenen Promoter::*uidA* Pflanzen gibt die folgende Liste wieder:

Färbedauer bei 37°C:

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| AtPLA I-Promoter:: <i>uidA</i> | über Nacht, ca. 16-18 Std. |
| AtPLA IIA-Promoter:: <i>uidA</i> | 1:20 Std. |
| AtPLA IVA-Promoter:: <i>uidA</i> | 20 Min. |
| AtPLA IVC-Promoter:: <i>uidA</i> | über Nacht, ca. 16-18 Std. |

Material:

- X-Gluc-Lösung:

- 1,0 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Glucoronic Acid (X-Gluc)
als Cyclohexylammoniumsalz (Duchefa: X 1405, Niederlande)
Stammlösung: 50 mM in 52% DMSO + 48% H₂O in -20°C
- 50 mM NaPO₄ pH 7,0 : Stammlösung 0,1 M erstellt aus 1 M
Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄ nach Sambrock et al. (1989) RT
- 0,5 % Triton-X
- 0,5 mM K-Ferricyanid: Stammlösung 0,5 M bei -20°C (Sigma)
- 0,5 mM K-Ferrocyanid: Stammlösung 0,5 M bei -20°C (Sigma)

- 70% Ethanol

Protokoll:

1. Das Pflanzenmaterial je nach Größe in ein Reaktionsgefäß oder Röhrchen geben und vollständig mit der X-Gluc Lösung bedecken.
2. Zum Infiltrieren des Gewebes mit der Lösung das Röhrchen für 30 Sek. im Exsikkator die Luft entziehen und abrupt den Unterdruck aufheben.

3. Je nach Linie und Promoterkonstrukt für 20 Min. bis 16 Std. bei 37°C inkubieren; evtl. den Fortgang der Färbung beobachten.
4. Nach Beendigung der Reaktion die GUS-Lösung dekantieren (bedingt wiederverwendbar) und Gefäß mit 70%igem Ethanol auffüllen.
5. 70%igen Ethanol wechseln bis das Chlorophyll vollständig extrahiert ist; Lagerung in 70% Ethanol bei 4°C im Dunkeln.

2.2.14.2 Quantitative GUS-Bestimmung

Die quantitative GUS-Bestimmung erfolgt nach einer Methode von Gallagher (1997). Sie ermöglicht die Messung der GUS-Aktivität am Fluorimeter. Zunächst wird das Gesamtprotein aus dem Pflanzengewebe extrahiert, die Proteinkonzentration nach Bradford gemessen und eine definierte Menge an Protein für den Enzymtest eingesetzt. Die β -Glucuronidase spaltet das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid-Trihydrat (4-MUG) und setzt dabei das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU) frei. Durch Anregung im Fluorimeter bei 365 nm kann die Fluoreszenz von 4-MU bei 455 nm gemessen werden. Um die absolute Menge umgesetzten Substrates zu berechnen, wird bei jeder Messung eine definierte Verdünnungsreihe des reinen Produktes 4-MU gemessen und eine Eichgerade erstellt.

Material:

- Extraktionspuffer: 50,0 mM NaHPO₄ (pH 7,0)
= Reaktionspuffer 10,0 mM β -Mercaptoethanol
10,0 mM Na₂EDTA
0,1 % Natrium Lauryl Sarcosin
0,1 % Triton-X 100
- Substrat (4-MUG): 100 mM 4-MUG in DMSO, 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid-Trihydrat
- 4-MU: 1,0 mM in H₂O, 7-Hydroxy-4-methylcoumarin Natrium Salz,
= 4-Methylumbelliferon (Sigma M1508)
- Stop Lösung: 0,2 M Na₂CO₃

- Küvetten: Fa. Sarstedt, 10x10x48mm Acryl (Nr. REF 67.755)

Protokoll:

A: Enzymtest

1. Pflanzenmaterial in fl. Stickstoff mörsern.
2. Pflanzenmaterial in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap geben und wiegen; 2 µl/mg Frischgewicht Extraktionspuffer (ca. 200-300 µl) zugeben und vortexen.
3. 15 Min. bei 15.000 Upm und 4°C zentrifugieren.
4. Überstand abnehmen und Konzentration nach Bradford bestimmen, Proben auf Eis halten.
5. Pro Reaktion 80 µg Protein in 400 µl Reaktionspuffer inklusive 1 mM 4-MUG bei 37°C im Dunkeln inkubieren (Wasserbad).
6. Zum Zeitpunkt 0 Std. sowie in Intervallen von 0,5-1 Std. je 50µl der Reaktion entnehmen und durch Zugabe von 700 µl 0,2 M Na₂CO₃ abstoppen (= 1:15), nach dem Abstoppen sofort am Fluorimeter messen.
7. Messung endet in der Regel nach 3 Std..

Diese Vorschrift liefert eine Zeitkinetik, die es ermöglicht, die maximale Differenz der β-Glucuronidase-Aktivität zwischen zwei Behandlungen zu ermitteln.

B: Messung am Fluorimeter

Die Anregung der Probe erfolgt bei 365 nm und die Emission wird bei 455 nm gemessen. 15 µl der abgestoppten Probe werden mit 1485 µl 0,2 M Na₂CO₃ verdünnt (1:100) und bei einer Sensitivität von 0,1 am Fluorimeter gemessen. Mit Einberechnung der Sensitivität ist das Reaktionsaliquot um 1:15.000 verdünnt. Wird sehr viel des Substrates in der Reaktion umgesetzt, muss erneut 1:10 verdünnt werden. Die Berechnung der umgesetzten Substratmenge erfolgte durch eine Eichreihe mit definierten Mengen des Reaktionsproduktes 4-Methylumbelliferon (4-MU), wie im Folgenden dargelegt.

Erstellung einer Eichreihe mit 4-MU

1. 1 µM Stammlösung von 4-MU in aqua dest. erstellen.
2. Verdünnungsstufen in 1,5 ml Na₂CO₃ : 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM 4-MU.

3. Messung im Fluorimeter wie oben beschrieben.
4. Eichgerade erstellen.

1,5 ml einer 10 nM 4-MU Lösung enthält somit eine absolute Menge von 15 pmol 4-MU.

2.3 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

Die Wildtyp-Linie *Arabidopsis thaliana* 'Columbia-0' stammt von dem Arabidopsis Stock Center Nottingham (N1092) und wurde durch Aussaat im Gewächshaus vermehrt. Bei der Auswahl dieser *Arabidopsis* Linie für die vorliegende Arbeit spielte die häufige Verwendung in der Literatur eine Rolle. Zum anderen war die Tatsache entscheidend, dass die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis* Genoms auf dieser Linie beruht. Anzucht, Transformation und experimentelle Arbeiten mit dem Pflanzenmaterial sind in diesem Kapitel beschrieben.

2.3.1 Anzucht und Vermehrung im Gewächshaus

Die Aussaat und weitere Kultur der Wildtyp-Pflanzen fand in Einheitserde statt. Wenige Tage nach der Aussaat im Kurztag (8 Std. Licht, 16 Std. Dunkel) keimen die Pflanzen und können nach ca. 3 Wochen in 7er Töpfe pikiert werden. Soll die Blüte verzögert werden, bleiben die Pflanzen im Kurztag. Kommen die Pflanzen in den Langtag (16 Std. Licht, 8 Std. Dunkel) wird die Blüte induziert. Ausgenommen in den Sommermonaten wurde das Wachstum der Pflanzen durch Assimilationslampen unterstützt (2000 Lux/m²). Die Temperatur im Gewächshaus unterlag einer halbautomatischen Regelung mit einem Zielwert von 22°C. Während der gesamten Wachstumsperiode wurden die Pflanzen nicht gedüngt.

Die Vermehrung des Wildtyps sowie der transgenen Pflanzen erfolgte über die Saat. Zu diesem Zweck wurden mit Beginn der Blüte sogenannte Aracons (Beta Tech, Belgien) auf die einzelnen Pflanzen gesetzt. Ein Aracon besteht aus einem Basiscontainer in der Form eines umgedrehten Trichters und einer transparenten Röhre mit Lüftungslöchern (Abb. 2.8).

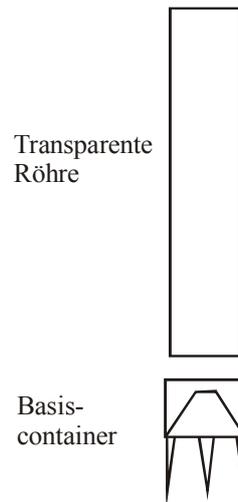


Abbildung 2.8: Aracon zur Samenernte bestehend aus Basiscontainer und transparenter Röhre.

Durch eine Öffnung in der Mitte des Basiscontainers wachsen die Infloreszenzen in die transparente Röhre, die sie vor der Bestäubung mit fremden Pollen schützt. Blütenstände, die aus der Röhre oder durch die Lüftungsöffnungen herauswuchsen, wurden abgeschnitten und von der Ernte ausgeschlossen. Vor der Ernte wurden die Pflanzen für ca. 1 Woche nicht mehr gegossen, um den Reifeprozess zu unterstützen. Das Gießen wurde eingestellt, wenn der Spross zu welken begann und keine neuen Schoten mehr gebildet wurden.

2.3.2 *In vitro*-Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die sterile Aussaat *in vitro* erfolgte für die spätere qualitative Untersuchung der transgenen Promoter-GUS-Pflanzen und lieferte die Ausgangspflanzen für die in Kap. 2.3.5 beschriebenen Experimente. Die Zugabe von Kanamycin in das Wachstumsmedium ermöglichte zudem die Selektion auf Kanamycin resistente Pflanzen. Dies war notwendig, da sich die F₂-Saat der heterozygoten Mutterpflanzen im Idealfall 1:3 (Wildtyp:Resistenz) für die Kanamycin-Resistenz aufspaltet (s. Kap. 2.3.3). Vor dem Ausplattieren werden die Samen zunächst sterilisiert. In der Regel reichen ca. 150-200 Samen aus, die nach dem folgenden Protokoll in einem 1,5 ml Eppendorf-Cap sterilisiert werden.

A: Sterilisation

Material:

- aqua dest. steril
- Sterilisationslösung: 4,0 % Natriumhypochlorit
0,2 ‰ Triton X-100
- 70% Ethanol

Protokoll:

1. 800 µl 70%igen Ethanol in das 1,5 ml Eppendorf-Cap mit den Samen geben und 3 Min. auf dem Vortex schütteln.
2. Ethanol verwerfen und 800 µl Sterilisationslösung zugeben, 3 Min. vortexen.
3. Unter der Sterilbank mindestens 5 mal mit sterilem aqua dest. waschen.
4. Zur Stratifikation werden die Samen nach der Sterilisation im Wasser bei 4°C (dunkel) für 1-2 Tage im Kühlschrank gelagert. Die Stratifikation kann auch auf den Agar-Platten erfolgen, wenn diese für 1-2 Tage bei 4°C gelagert werden.

B: Sterile Aussaat

Nach der Sterilisation und Stratifikation der Saat erfolgt die Aussaat auf MS-Agar-Platten. Die Nährstoffzusammensetzung des Wachstumsmediums basiert auf einer Rezeptur nach Murashige und Skoog (1962) und wurde zumeist in der vollen Konzentration eingesetzt. Hierbei konnte *Arabidopsis* ohne Unterschiede im Wachstum auch mit der halben Nährstoffkonzentration und vollen Vitaminen angezogen werden. Die Zugabe von 2% Glukose entspricht nicht der originalen Zusammensetzung, führt aber zu deutlich besserem Wachstum. Zur Anfertigung des Mediums wurden im Labor Stammlösungen erstellt, deren Zusammenstzung im Folgenden aufgelistet ist:

Murashige und Skoog (MS)-Medium:

| <u>Spurenelemente Stammlösung (100x)</u> | | | | <u>Endkonzentration (1x)</u> | |
|---|--------------------|------|------|------------------------------|------|
| MnSO ₄ x | 1 H ₂ O | 1690 | mg/l | 0,1 | mM |
| H ₃ BO ₃ | | 620 | mg/l | 0,1 | mM |
| ZnSO ₄ x | 7 H ₂ O | 860 | mg/l | 29,91 | mM |
| Na ₂ MoO ₄ x | 2 H ₂ O | 25 | mg/l | 1,03 | µM |
| CuSO ₄ x | 5 H ₂ O | 2,5 | mg/l | 0,1 | µM |
| CoCl ₂ x | 5 H ₂ O | 2,5 | mg/l | 0,11 | µM |
| KJ | | 83 | mg/l | 5,0 | µM |
| <u>Mineralsalze Stammlösung (10x)</u> | | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | | 1,70 | g/l | 1,25 | mM |
| CaCl ₂ x | 2 H ₂ O | 4,40 | g/l | 2,99 | mM |
| NH ₄ NO ₃ | | 16,5 | g/l | 20,61 | mM |
| MgSO ₄ x | 7 H ₂ O | 3,70 | g/l | 1,50 | mM |
| KNO ₃ | | 19,0 | g/l | 18,79 | mM |
| <u>Eisenstammlösung (50x)</u> | | | | | |
| FeSO ₄ x | 7 H ₂ O | 1,40 | g/l | 0,1 | mM |
| Na ₂ EDTA | | 1,90 | g/l | 0,1 | mM |
| <u>Vitaminstammlösung (100x)</u> | | | | | |
| Nicotinsäure | | 50,0 | mg/l | 4,06 | µM |
| Thiamin HCl | | 10,0 | mg/l | 0,30 | µM |
| Pyrodoxol HCl | | 50,0 | mg/l | 2,43 | µM |
| <i>myo</i> -Inositol | | 10,0 | g/l | 0,56 | mM |
| <u>Ansetzen des kompletten Nährmediums:</u> | | | | | |
| Spurenelemente Stammlösung | | 10,0 | ml/l | | |
| Mineralsalze Stammlösung | | 100 | ml/l | | |
| Eisenstammlösung | | 20,0 | ml/l | | |
| Vitaminstammlösung | | 10,0 | ml/l | | |
| Glukose | | 20,0 | g/l | 2,0 | % |
| Glycin | | 2,0 | mg/l | 2,0 | mg/l |
| Bacto-Agar | | 8,0 | g/l | 0,8 | % |

Mit KOH auf pH-5,6-5,7 einstellen und autoklavieren.

MS/2: halbe Nährstoffkonzentration und volle Vitamine.

Protokoll:

1. 20 – 25 Samen werden mit der 100 µl Pipette auf MS oder MS/2 Agar-Platten (ca. 20 ml/Petrischale) in kleinen Tropfen ausgelegt; zur Selektion auf Kanamycin-Resistenz wird dem MS-Medium 50 µg/ml Kanamycin vor dem Gießen zugegeben.

2. Nach ca. 15 minütigem Abtrocknen der Platten unter der Sterilbank werden die Platten mit Parafilm verschlossen und in den Anzuchtschrank gestellt (22°C, 16 h Licht).
3. Nach 12 Tagen sind nichtresistente Pflanzen eingegangen und die transgenen, resistenten Pflanzen können pikiert oder für Experimente eingesetzt werden.
4. Das Pikieren erfolgt in 7er Töpfe mit Einheitserde und je einer Pflanze. Zur Gewöhnung an das Gewächshausklima werden die in Pikierschalen stehenden Töpfe für 2 Tage mit einer transparenten Haube abgedeckt.

2.3.3 Saatgutlagerung

Nach der Ernte werden die Samen in einem offenen 1,5 ml Reaktionsgefäß (je nach Saatmenge) im Brutschrank bei 33°C für 1-2 Tage getrocknet. Die trockenen Samen können dann für min. 2 Jahre im Kühlschrank (4°C) verschlossen aufbewahrt werden. Für eine Langzeitlagerung (>5 Jahre) können die Samen auch in kleinen Portionen bei -70°C aufbewahrt werden, wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermindert jedoch die Keimfähigkeit. Bei der Benutzung der Saatreserven aus dem Kühlschrank muss darauf geachtet werden, dass bei der Entnahme keine Feuchtigkeit an die Samen gelangt. Zu diesem Zweck werden die Samen vor dem Öffnen des Röhrchens auf Raumtemperatur erwärmt und erst dann eine entsprechende Menge entnommen. Auf diese Weise wird verhindert, dass sich Kondenswasser auf den Samen niederschlägt.

2.3.4 Pflanzenschutz

Um einen Befall mit Fäulepilzen (z.B. *Botrytis*) zu vermeiden, dürfen die Pflanzen nicht zu dicht gestellt werden, und es ist auf ausreichende Lüftung bzw. Luftumwälzung zu achten. Die Bewässerung über Gießmatten hat sich auf Grund der hohen Luftfeuchtigkeit als den Pilzbefall fördernd erwiesen. Aphiden wurden durch wöchentliche Spritzungen mit Insektiziden bekämpft. Die Anwendung erfolgte nach Auftreten der Schädlinge und nicht präventiv. Wirksame und pflanzenverträgliche Mittel und die angewendeten Konzentrationen sind im Folgenden aufgeführt:

| | |
|------------------|--------|
| Confidor (Bayer) | 0,035% |
| Perimor (BASF) | 0,05% |
| Tamaron (Bayer) | 0,1% |

2.3.5 *Arabidopsis* Transformation

Die Transformation einer Pflanze beinhaltet das Einbringen von DNA in den Organismus in Form eines Vektors (transient) oder stabil in das Genom integriert über die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*. Letztere Methode wurde in der vorliegenden Arbeit überwiegend angewendet und produzierte das Ausgangsmaterial für die qualitativen und quantitativen GUS-Tests.

2.3.5.1 Stabile Transformation

Das folgende Protokoll stellt eine modifizierte Version der *in planta* Transformation nach Bechtold et al. (1993) dar. Für die Transformation wurden *Arabidopsis thaliana* 'Columbia-0' Pflanzen verwendet. Zunächst wurde der *Agrobacterium*-Stamm LBA 4404 verwendet, da dieser im Labor etabliert war und später wurde auch mit dem Stamm GV3101 transformiert, da dieser von der Mehrzahl anderer Arbeitsgruppen mit Erfolg, speziell in der Vakuumtransformation, eingesetzt wird. Maßgeblich für den Erfolg der Transformation sind die Vitalität der zu transformierenden Pflanzen, der Bakterien-Stamm, sowie das Detergens Tween 80. Für die Vakuum-Transformation ist der Stamm GV3101 bevorzugt geeignet, da der Stamm LBA 4404 mit der Dauer des Vakuums sehr schnell an Transformationseffizienz verliert. Letzterer eignet sich zur Transformation durch Dippen, die Effizienz ist aber grundsätzlich geringer als bei der Vakuum-Infiltration. Das Protokoll für die Transformation durch Dippen ist bis auf die Vakuum-Infiltration mit dem dargestellten Protokoll identisch. Die verwendeten Pflanzen sollten möglichst jung, mit gut ausgebildeter Rosette plus mehrerer Sprosse und frei von Schadsymptomen sein.

Material für eine Transformation:

- 3-4 Töpfe (10er) á 4 Pflanzen mit mehreren Blütenständen (weitgehend Knospenstadium)
- 250 ml Zell-Kultur von *Agrobacterium* in LB + 50mg/l Kanamycin + 100mg/l Rifampicin (GV3101) bzw. 250 mg/l Streptomycin (LBA 4404)
- Infiltrationsmedium:
 - ½ MS-Salze
 - 1 x B5 Vitamine
 - 5,0 % Saccharose
 - 0,044 µM Benzylaminopurin (BAP)
 - 0,15 % Tween 80
 - pH 5,7 (KOH)
 - BAP sowie Tween 80 werden nach dem Autoklavieren zugegeben.
- Selektionsmedium:
 - 1 x MS mit Salzen und Vitaminen
 - 0,8 % Agar
 - kein Zucker
 - pH 5,7 (KOH)
 - Nach dem Autoklavieren auf 45°C abkühlen lassen, 200 µg/ml Cefotaxim (Claforan) oder 100 µg/ml Carbenecillin und 50 µg/ml Kanamycin hinzugeben.
- Exsikkator + Vakuumpumpe
- Sterilisationslösung:
 - 4,0 % Natriumhypochlorit
 - 0,2 ‰ Triton X-100

Protokoll:

Tag 1: Aussaat von *A. t.* 'Columbia-0' in eine Pikierschale im Gewächshaus (Kurztag).

4. Woche: 4 Sämlinge in einen 10 cm Topf setzen. Die Pflanzen bleiben weitere 2 Wochen im Kurztag, um eine dichte Rosette auszubilden. Werden die Pflanzen nicht sofort benötigt, können sie auch für weitere 3 – 4 Wochen im Kurztag stehen bleiben.
- ca. 6. Woche: Umstellen der Pflanzen in den Langtag zur Induktion der Infloreszenz.
- 8.-9. Woche: Der primäre Blütenstengel hat eine Höhe von ca. 10 cm erreicht und wird an der Basis entfernt, um die Bildung von neuen rosettenbürtigen Infloreszenzen zu induzieren.
10. Woche: 6 - 7 (oder 10-15 nach Mengiste et al., 1997) Tage nach der Entfernung der Infloreszenz sind die Pflanzen fertig für die Transformation. Die Blütenstände sind so weit entwickelt, dass die ersten Blütenknospen gerade im Aufbrechen begriffen sind.

Zur Durchführung der *in planta*-Transformation werden größere Mengen an *Agrobacterium tumefaciens* mit dem zu transformierenden Vektor benötigt. Die Anzucht und Präparation der Bakterien ist im Folgenden beschrieben.

Anzucht von *Agrobacterium*:

- Tag 1: 2,5 ml LB + 50 µg/ml Kanamycin + 250 µg/ml Streptomycin (LBA 4404) bzw. 100 µg/ml Rifampicin (GV 3101) von einer Einzelkolonie (Agar-Platte) über Nacht anziehen (180 Upm, 28°C).
- Tag 2: Mit 100 µl Übernachtskultur (ca. 20 Std.) der Agrobakterien 25 ml LB + Antibiotika animpfen (150 Upm, 30°C).
- Tag 3:
1. Mit 20 ml der Vorkultur werden 250 ml LB + Antibiotika inokuliert und bis zu einer OD von ca. 1,2 wachsen gelassen. Bei 130 Upm und 30°C in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane ist dies nach zu ca. 6 h erreicht.
 2. Zentrifugation der 250 ml bei 4000 Upm, 13 Min. und 4°C mit dem Rotor SLA1500 in der Sorvall-Kühlzentrifuge.
 3. Das Sediment wird auf einem Magnetrührer in Infiltrationsmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 resuspendiert.

Statt der 25 ml Vorkultur wurden auch direkt die 250 ml LB abends mit 2 ml Vorkultur inokuliert und am nächsten Morgen die Bakteriensuspension zentrifugiert. Nach der Anzucht der Agrobakterien erfolgt die Vakuum-Infiltration.

Vakuum-Infiltration:

Die 250 ml Bakteriensuspension werden in einen 600 ml Messbecher gegeben. Ein Topf mit 4 Pflanzen wird kopfüber in dem Becher justiert, so dass die Blütenstände komplett in die Suspension eintauchen, der Topfrand aber ca. 1cm über dem Infiltrationsmedium liegt. Um den Topf in dem Becher zu arretieren, wird zwischen Topfrand und Becherinnenwand eine 2,5 ml Eppendorfspitze geschoben, die somit den Topf festkeilt. Becher samt Infiltrationsmedium und Pflanzentopf werden in den Exsikkator gestellt, der Deckel verschlossen und für 2 Min. die Vakuumpumpe angelegt. Während dieses Vorganges sind deutlich aufsteigende Luftblasen an den untergetauchten Blatträndern zu erkennen. Nach Ablauf der 2 Min. wird der Unterdruck ruckartig aufgehoben. Der Becher wird herausgenommen, die Pflanzen aus der Bakteriensuspension geholt und horizontal auf Laborpapier gelegt, damit überschüssiges Medium abtropft. Diese Prozedur ist mit derselben Bakterienlösung 3-mal wiederholbar, ohne dass die Transformationsrate abnimmt (evtl. öfter). Nach der Transformation werden die Pflanzen bei 25°C und Langtag zurück ins Gewächshaus gestellt. Bis zur Ernte wachsen die Blütenstände in die Höhe und werden mit einem Draht pro Topf zusammengehalten, um ein zu starkes Ausladen der Triebe zu verhindern.

13. Woche:

F1-Saat: Die zu erst entwickelten Schoten werden von der Ernte ausgeschlossen, da die Samen zum Zeitpunkt der Transformation bereits zu weit ausgebildet waren und nur zu einem sehr geringen Anteil transgen sind. Somit beginnt die Ernte 23 – 25 Tage nach der Transformation bzw. 3 Tage nach dem Abreifen der ersten Samen und umfasst einen Zeitraum von 5 weiteren Tagen. Für die Ernte werden in kleine Aussaatschalen Din-A4-Blätter gelegt, die an den Enden die Kiste überwallen. Zu Beginn der Ernte werden die Blütenstände eines Topfes umgebogen, so dass sie in der Kiste zum Liegen kommen. Um ein Aufrichten zu verhindern, werden die Stängel an der Basis mit einem Draht an der Schale befestigt. In den folgenden Tagen fallen die reifen Samen in die Schale. Nach der Ernte wird die Saat für genau einen Tag bei 33°C getrocknet und anschließend bei +4°C gelagert. Die Selektion erfolgt auf einem Keimungsmedium unter Verwendung von Kanamycin (50 µg/ml) und Cefotaxim oder Carbenicillin (je 100 µg/ml) als Antibiotika. Kanamycin selektiert auf transgene Pflanzen und Cefotaxim (oder Carbenicillin) verhindert das Wachsen der zur Transformation verwendeten Agrobakterien.

Sterilisation geernteter Saat:

Pro Agar-Platte mit Keimungsmedium werden ca. 25 mg Samen (ca. 1000) in 1 ml H₂O dest. ausplattiert. Je nach Saatmenge können 0,625 g (= 25 Platten) in einem Arbeitsgang sterilisiert werden. Die Sterilisation erfolgt in drei Schritten:

- 1.) Samen in einem 15 ml Röhrchen 5 Min. in 10 ml 70 % EtOH stark vortexen.
- 2.) Ethanol verwerfen und 10 Min. in 10 ml Sterilisationslösung vortexen.
- 3.) Waschen der Samen: An der Sterilbank min. 4 x mit sterilem Wasser in einem 45 ml Falcon-Röhrchen waschen und anschließend in 1 ml sterilem aqua dest. pro Platte ausplattieren. Je nach Sterilbank ca. 1 Std. abtrocknen, aber auf keinen Fall eintrocknen lassen. Schalen mit Parafilm verschließen und in die Klimakammer stellen.

15. Woche: ca. 7-9 Tage nach der Aussaat auf dem Keimungsmedium fallen die transformierten Pflanzen durch ihr stärkeres Wachstum auf, wobei die nichtresistenten Pflanzen anfangen, gelbe Kotyledonen zu bilden, und nicht über dieses Stadium hinauswachsen.

Im weiteren Verlauf überleben nicht alle transgenen Keimlinge auf dem Selektionsmedium, da bei ca. 20–30% der Pflanzen durch den Insertionsort vermutlich elementare Funktionen gestört sind.

Umsetzen ins Gewächshaus:

Haben die transgenen Pflanzen 4 – 5 Blattgenerationen gebildet, können sie in Einheitserde gepflanzt und ins Gewächshaus gestellt werden. Die Pflanzen sind robust, müssen aber im Sommer vor starker direkter Sonnenstrahlung die ersten Tage geschützt werden (Abdeckhaube). Unter Langtagbedingungen fangen die Pflanzen bereits nach ca. 2 - 3 Wochen an, eine Infloreszenz zu schieben. Die Ernte der F₂-Generation erfolgt mit den Aracons (s. Kap. 2.3.1).

F₂-Saat: War die F₁-Pflanze noch heterozygot für die Insertion, ist durch das Selbstn in den Aracons nach Mendel ein Viertel der Saat homozygot für die

Transformation. Dies kann zur Folge haben, dass eine Komplementation wie sie in F_1 durch den zweiten Chromosomensatz noch stattgefunden hat (rezessive Mutation), nicht mehr gegeben ist, und der Insertionsort wiederum zu Vitalitätsproblemen führt. In der F_2 -Generation überleben nicht alle Pflanzen, da durch das Selbsten die Insertion ausgekreuzt wird (ein Viertel).

2.3.5.2 Transiente Transformation

Im Gegensatz zur stabilen Transformation wird bei der transienten Transformation das Zielgen nicht in die Kern DNA integriert, sondern liegt auf einem Plasmid bzw. Vektor extrachromosomal in der Zelle vor. Dies reicht aus, um ein Gen unter Kontrolle eines entsprechenden Promoters (z.B. 35S) zu exprimieren. Die Transformation der Zelle wird durch Beschuss mit plasmid-beladenen Wolframpartikeln durchgeführt. Eine im Institut für Phytomedizin von Dr. Mark Varrelmann angefertigte Partikelkanone diente als Vorrichtung zum Beschuss von Tabakblättern (*Nicotiana benthamiana*) mit Promoter:*uidA*-Konstrukten.

Material:

- Wolframpartikel, M17, Fa. Biorad
- Partikelkanone (Dr. Mark Varrelmann, Institut für Phytomedizin)
- 0,1 M Spermidin
- 2,5 M CaCl_2

Protokoll:

A: Beladen der Wolframpartikel mit Plasmid DNA

1. 1 ml absoluten Ethanol + 100 mg Wolfram in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vortexen.
2. 20 Min. bei RT inkubieren.
3. 10 Min. bei 13.000 Upm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
4. 5 x mit 1 ml aqua bidest. waschen, jeweils Zentrifugation wiederholen.
5. Sediment in 1 ml aqua bidest. aufnehmen und bei 4°C lagern.
6. 5-10 µg Plasmid-DNA in aqua dest. (0,5-1µg/µl) zu den Wolframpartikeln aus 5. geben, so dass es zusammen ein Volumen von 50 µl ergibt.

7. 50 μ l 2,5 M CaCl_2 zugeben und vortexen.
8. Sofortige Zugabe von 20 μ l Spermidin (0,1 M), vortexen und 5 Min. auf Eis inkubieren.
9. Wolframpartikel sind sedimentiert und 90 μ l Überstand werden verworfen.

B: Partikelbombardement

1. 3 μ l der DNA beladenen Wolframpartikel auf das Trägergitter (Spritzenfilter) der Partikelkanone pipettieren.
2. Beschießen der Blätter in 800 mbar Unterdruck für 0,1 Sek. mit 3-4 bar Überdruck.
3. Blätter in eine Petrischale mit feuchtem Papier legen und 2 Tage im Dunkeln bei RT inkubieren.
4. Detektion von GUS gefärbten Zellen (s. Kap. 2.2.14.1)

2.3.6 GFP-Detektion

Neben der β -Glucuronidase wurde das *green fluorescent protein* (GFP) als weiteres Reportergen verwendet. Für die Promoter-Reporter-Konstrukte wurde ein Derivat des natürlichen GFP's ausgewählt (smRS-GFP), das durch seine höhere Löslichkeit und ein verändertes Chromophor besser für die Detektion in *Arabidopsis thaliana* geeignet ist (Davis und Vierstra, 1996). Die Nukleotidsequenz entstammt dem Vektor psmRS-GFP und wurde von dem *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) bezogen. Die einzelnen Komponenten der GFP-Detektionsanlage sind im Folgenden aufgeführt:

| | |
|------------|--|
| Mikroskop: | Zeiss Axioskop |
| Lampe: | Osram, HBO 11 W/2 |
| Filter: | Zeiss Filter 09, Anregung: 450-490 nm, Emission: ab 520 nm |
| Kamera: | Visitron Systems SPOT |
| Software: | Visitron Systems SPOT32 |

2.3.7 Induktionstests mit *AtPLA*-Promoter::*uidA*-Pflanzen

Auf der Basis der erstellten transgenen Promoter::*uidA*-Pflanzen wurde eine Reihe von Chemikalien und Behandlungen getestet, um mögliche Änderungen in der Promoteraktivität zu beobachten. Die Experimente wurden mit *in vitro* angezogenen, 12 Tage alten Keimlingen oder mit im Gewächshaus angezogenen 4-5 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

2.3.7.1 Induktion durch Hormone und andere biologisch aktive Signalsubstanzen

Verschiedene Pflanzenhormone, Elicitoren und andere biologisch aktive Substanzen wurden appliziert, um über die GUS-Expression Einflüsse auf die Promoteraktivität zu detektieren. Tabelle 2.4 zeigt die getesteten Chemikalien in ihrer Stammlösung und in den eingesetzten Konzentrationen. Für die Experimente wurde F₂-Saat der Promoter::*uidA*-Pflanzen auf MS-(MS/2)-Agar + 50 µg/ml Kanamycin + 2% Glukose in der Klimakammer angezogen. 12 Tage nach der Aussaat wurden je 3 Sämlinge für eine Behandlung eingesetzt. Dazu wurden die Pflanzen von der Agar-Platte in sterile 12-*well*-Platten mit 2,5 ml MS-(MS/2)-Medium + 2% Glukose pro Kammer überführt und mit der jeweiligen Induktorkonzentration versetzt. Nach dem Verschließen der 12-Well-Platten wurden die Pflanzen unter den Anzuchtbedingungen in die Klimakammer gestellt. Die Induktionsdauer war bei allen Behandlungen 48 Std. und bei vielen zusätzlich 24 Std. Die Konzentration an MS-Salzen in einem Experiment war zwischen der Agar-Platte und dem Flüssigmedium immer identisch. Bei der Kontrolle und den verschiedenen Konzentrationen einer Behandlung waren die Lösungsmittelkonzentrationen der verwendeten Chemikalie gleich. Nach Ablauf der Induktionszeit wurden die Pflanzen im histologischen GUS-Test auf Unterschiede in der Blaufärbung zwischen den Behandlungen hin untersucht. Für eine quantitative Auswertung der GUS-Aktivität wurden die Pflanzen zunächst in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufbereitung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.4: Biologisch aktive Substanzen im Promoter::*uidA* Induktionstest

| Chemikalie | Stammlösung -20°C | Behandlung | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|------------|-----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) | 100mM in 70% EtOH | 0 | 0,1µM | 1µM | 10µM |
| Abscisinsäure (ABA) | 50mM in Aceton | 0 | 1µM | 10µM | 100µM |
| Aminocyclopropan-Carboxylat (ACC) | 250mM in H ₂ O | 0 | 5µM | 50µM | 500µM |
| 6-Benzylaminopurin (BAP) | 10mM in 1M NaOH | 0 | 1µM | 10µM | |
| Bion* | 100mg/ml in H ₂ O | 0 | 0,1 mg/ml | 1 mg/ml | |
| Cellulase autoklaviert | 10mg/ml in H ₂ O | 0 | 100µg/ml | | |
| Chitin autoklaviert | 1mg/ml in H ₂ O | 0 | 10µg/ml | 100µg/ml | 500µg/ml |
| Gibberilinsäure (GA) | 100mM 70% EtOH | 0 | 1µM | 10µM | 100µM |
| Glukose ** | 4% in MS (MS/2) | 0 | 1% | 2% | 4% |
| Indolessigsäure (IAA) | 100mM in 70 % EtOH | 0 | 0,1µM | 1µM | 10µM |
| Jasmonat (JA) | 50mM in 10% EtOH | 0 | 5µM | 50µM | 500µM |
| Laminarin (β-1,3-Glukan) | 10mg/ml in H ₂ O | 0 | 50µg/ml | 200µg/ml | |
| Methyl-Jasmonat, (M-JA) | 0,5M in 70% EtOH | 0 | 10µM | 100µM | 500µM |
| Methyl-Viologen | 0,5M in H ₂ O | 0 | 0,1µM | 1µM | 5µM |
| Methyl-Viologen an adulten Pflanzen | 0,5M in H ₂ O | 0 | 0,5mM | 5mM | 10mM |
| NaCl | 500mM in MS (MS/2) | 0 | 10mM | 100mM | 500mM |
| Salicylsäure (SA) | 100mM H ₂ O | 0 | 10µM | 50µM | 100µM |

*Bion: 30 g/kg BTH

** Glukose in MS + 1% Saccharose

Zunächst wurde von jedem Promoter-Konstrukt eine Linie für ein Experiment mit einer Substanz verwendet. Konnte ein Effekt auf die GUS-Expression bzw. die Promoteraktivität beobachtet werden, wurde dies mit mindestens vier weiteren Linien desselben Konstruktes wiederholt.

- Applikation auf Gewächshauspflanzen

Einige Chemikalien wurden auch an 4-5 Wochen alten Pflanzen getestet, die unter Gewächshausbedingungen aufgewachsen waren. Die Applikation der Substanzen erfolgte in 20 µl mit der Pipette auf einzelne Blätter. Mit Ausnahme der PIIA::*uidA*-Pflanzen wurde der Induktorlösung 0,05% Triton-X 100 zugegeben, um die Kontaktfähigkeit mit der Blattoberfläche zu verbessern. Nach Ablauf der Induktionszeit wurden die Blätter abgeschnitten und im GUS-Test gefärbt.

2.3.7.2 Induktion durch physikalische Einflüsse und Nährstoffmangel

Zusätzlich zur Applikation von Chemikalien wurde untersucht, ob die Promotoren auf Stress durch Umweltparameter reagieren. Die einzelnen Behandlungen sind im Folgenden aufgeführt, wobei Unterschiede in den Behandlungen durch histologische GUS-Tests beurteilt wurden oder, im Falle der Nährstoffmangel-Experimente, im quantitativen GUS-Test gemessen wurden.

- Kältestress

13 Tage alte Sämlinge aus der *in vitro*-Kultur wurden auf der Agar-Platte in eine beleuchtete Klimabox bei 10°C gestellt. Die Kontrollplatte wurde in eine zweite Klimabox mit gleicher Beleuchtung bei 24°C gestellt. Nach 24 und 48 Std. wurden Pflanzen von den Platten entnommen und auf unterschiedliche GUS-Expression untersucht.

- Trockenstress

15 Wochen alte Pflanzen im Gewächshaus wurden nicht gegossen, bis ca. 4 Tage später die Blätter deutliche Welkesymptome zeigten. Die welken Blätter sowie Blätter von Kontrollpflanzen wurden abgeschnitten und in der GUS-Färbelösung inkubiert.

In einer weiteren Variante wurden Petrischalen (Ø 3,5cm) mit Whatmanpapier ausgelegt und 50 µl aqua dest. zugegeben. Vier *in vitro* angezogene 13 Tage alte Keimlinge wurden in die Petrischalen gelegt, diese mit Parafilm verschlossen und über Nacht in der Klimakammer inkubiert. Die Kontrollpflanzen wurden statt auf Whatmanpapier in 2 ml aqua dest. gelegt. Nach 24 Std. erfolgte der GUS-Test.

- Nährstoffmangel

Ein Mangel an Eisen, Phosphor und Schwefel wurde durch Fehlen der entsprechenden Salze in MS-Agar + 2% Glukose erzeugt. Die Kontrollpflanzen wurden auf dem kompletten MS-Agar angezogen. Da die Keimlinge der Mangelvarianten schlechter wuchsen, wurden die Pflanzen mit den Kontrollen bereits nach 11 Tagen im GUS-Test untersucht.

2.4 Anhang

2.4.1 Software

- pcgene: Software zum Erstellen von Primern.
- Vnti: Software zum Bearbeiten von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen.

2.4.2 Programme und Datenbanken im Internet

Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC:

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrhome.htm>

Allgemeine Informationen zu *Arabidopsis thaliana* und weitere Verbindungen zu anderen Internetseiten.

Dialign2.1: http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign_submit
Software zum Vergleichen von Protein- und DNA-Sequenzen.

NCBI Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>
Nukleotid- und Aminosäuresequenz-Datenbank, in der mit vorhandenen Sequenzen nach ähnlichen Sequenzen aus verschiedenen Organismen gesucht werden kann.

PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>
Datenbank mit Promoter-cis-Elementen und einer Suchfunktion nach diesen Elementen in DNA-Bereichen (Promotoren).

Primer3: http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
Erstellen von Primern

PROTOMAT: <http://blocks.fhrc.org>
Software die auf der Basis von mehreren Proteinsequenzen nach
übereinstimmenden Bereichen sucht.

The Arabidopsis Information Resource, TAIR:
<http://www.arabidopsis.org/>
Informationen zu *Arabidopsis thaliana* und weitere Verbindungen zu
anderen Internetseiten.

Webcutter 2.0: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>
Software zur Restriktionsanalyse von DNA-Sequenzen.

2.4.3 Geräte

- Video-Dokumentation
Intas Digi-STORE

- Kühlzentrifuge
Sorvall RC 5 B Plus
Rotor: SS34, F-20/MICRO, SLA 1500

Heraeus Zentrifuge, Biofuge 23S
Rotor: HSA 4.100

- Luminescence Spectrometer
Perkin-Elmer LS-5B

- Mikroskop
Zeiss Axioskop

- PCR-Cycler
Hybaid „Express“
MWG Primus

- Photometer
 - Perkin-Elmer Lambda 2
 - Hitachi H-3000

- SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
 - Bio-Rad, Model 3000Xi

- Transilluminator
 - Intas MW 312nm
 - Vetter GmbH, UV-Kontaktlampe Typ Chroma mw

- Ultraschallbad
 - Bandlein SONOREX TK52

2.4.4 Firmenverzeichnis

<http://www.duchefa.com/>

- Beta Tech bvba

New-Yorkstraat 4
 B-9000 Gent
 Belgium
 Tel.: +32 9 2517375

- EUROGENTEC
 EUROGENTEC
 Parc Scientifique du Sart Tilman
 4102 Belgium
 Tel. : +32 43660150

- Duchefa

A. Hofmanweg 71
 2031 BH Haarlem
 The Netherlands
 Tel.: +31(0)23 5319093
 Fax: +31(0)23 5318027

EUROGENTEC Deutschland GmbH
 Tel.: 02861 91813
 Fax.: 02861 66686
<http://www.eurogentec.be/hp/hp.htm>

- Fermentas/MBI

Bestellung nur per Internet:

<http://www.fermentas.de/>

e-mail: info@fermentas.de

Bestellung:

Tel.: 0800 0 83 09 02

Fax : 0800 0 83 34 35

Technischer Service:

0800 181 54 50

www.invitrogen.com

- Gene Craft

Gene Craft

Tresckowstr. 10

48163 Munster

Germany

Tel.: +49 251 790275

Mobil: +4 9171 8775164

Fax: +49 251 9709704

E-Mail: mail@GeneCraft.de

<http://www.genecraft.de/>

- MoBiTec

MoBiTec GmbH

Lotzestrasse 22a

37083 Göttingen

Germany

Tel.: ++49 551 707 22 0

Fax: ++49 551 707 2222

Bestellungen:

++49 551 707 22 10

Technischer Service:

++49 551 707 22 70

e-mail: info@mobitec.de

<http://www.mobitec.de>

- Hybaid

Hybaid GmbH

Rischerstr. 12

69123 Heidelberg

Tel.: 06221 828010

Fax: 06221 840610

<http://www.hybaid-gmbh.com/>

- NEB

NEW ENGLAND BIOLABS, INC.

32 Tozer Road

Beverly, MA 01915-5599

Tel.: (978) 927- 5054

- Invitrogen/

[life technologies/Gibco/BRL](http://life-technologies.com)

Deutschland:

New England Biolabs GmbH

Bruningstrasse 50, Geb.G 810
 65926 Frankfurt am Main
 Tel.: (0)69/305 23140
 Free Call: 0800/246 5227 (0800
 BIOLABS)
 Fax : (0)69/305 23149
 Free Fax : 0800/246 5229 (0800
 BIOLABX)
 e-mail: info@de.neb.com

- Roth
 Carl Roth GmbH & Co.
 Schoemperlenstr. 1-5
 76185 Karlsruhe
 Postfach 10 01 21
 76231 Karlsruhe
 Tel: 0721/5606-0
<http://www.carl-roth.de/deutsch/index.htm>

- PeqLab

PeqLab
 Carl-Thiersch-Str. 2 B
 D-91052 Erlangen
 Freecall: 0800/100 2016
 Freefax: 0800/100 9016
 Tel.: 09131/610 7020
 Fax: 09131/610 7099
 e-mail: info@peqlab.de
<http://www.peqlab.de/>

- SEQLAB

SEQLAB Sequence Laboratories
 Göttingen GmbH
 Hannah-Vogt-Straße 1
 D-37085 Göttingen
 Tel.: 0551 3700010
 Fax.: 0551 3700012
<http://www.seqlab.de/>

- Quiagen

QIAGEN GmbH
 Max-Volmer-Straße 4
 40724 Hilden
 Tel.: 02103-29-12000
 Fax: 02103-29-22000
 Technischer Service:
 Tel.: 02103-29-12400
<http://www.qiagen.com/>

- SIGMA-ALDRICH

SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
 Eschenstrasse 5
 82024 Taufkirchen
 Tel.: 0800 / 51 55 000
 Fax: 0800 / 64 90 000
<http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Distributed/HahtShop/HahtShop.htm>

Fax: 0800 100 9918

- Stratagene

Technischer Service:

Tel.: 0699 509 6197

Stratagene Europe Corporate Office

Gebouw California

Hogehilweg 15

1101 CB Amsterdam Zuidoost

The Netherlands

Tel.: 0800 100 9917

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit waren von der Arbeitsgruppe fünf Phospholipase-A-Gene im Genom von *Arabidopsis thaliana* identifiziert worden, die sich auf die Chromosomen I, II und IV verteilen. Die Nomenklatur der Gene besteht zunächst aus den Anfangsinitialen des Organismus und einer Abkürzung der Enzym-Funktion. Ein römischer Buchstabe bezeichnet im weiteren das Chromosom, der bei Doppelbelegung durch einen griechischen Buchstaben ergänzt wurde. Somit entstanden die Gen-Bezeichnungen *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA*, *AtPLA IVB* und *AtPLA IVC*. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themenschwerpunkte bearbeitet. Zunächst war es Ziel, die enzymatische Funktionalität der *AtPLA*-Gene zu überprüfen, um somit auch eine Voraussetzung für die Nomenklatur der Gene als *AtPLAs* zu erfüllen. Dies erfolgte für drei Genmitglieder durch Expression und Reinigung rekombinanten Proteins in *Escherichia coli* und anschließendem Enzymtest (s. Kap. 3.1). Der Hauptschwerpunkt lag in der Untersuchung der transkriptionellen Regulation von vier Phospholipase-A-Genen (PLA) aus *Arabidopsis thaliana* mittels molekularbiologischer Methoden, sowie der stabilen Pflanzentransformation (s. Kap. 3.2).

3.1 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Von den im *Arabidopsis*-Genom identifizierten *AtPLA*-Genen waren neben den vier Promotoren auch die kodierenden Sequenzen in Form von klonierten cDNAs vorhanden. Somit war von den bis dato unveröffentlichten Genen die abgeleitete Aminosäuresequenz und ihre Transkription in der Pflanze bekannt. Um den Nachweis einer Phospholipase-A-Aktivität der Proteine zu führen, sollte ein Enzymtest mit den jeweiligen *AtPLA*-Proteinen durchgeführt werden. Voraussetzung für einen Enzymtest ist das Vorhandensein größerer Mengen des Proteins. Zu diesem Zweck wurden auf Grundlage der cDNAs drei der vier *AtPLA*-Gene (*AtPLA I*, *IIA* und *IVA*) heterolog in *Escherichia coli* überexprimiert (s. Kap. 2.2.1). Zusätzlich an den N-Terminus angefügte sechs Histidine ermöglichten die Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Affinitätsmatrix (s. Kap. 2.2.3). Die rekombinanten Proteine der *AtPLA IIA*- und *AtPLA IVA*-Gene (Enzym *IIA*, Enzym *IVA*) konnten nativ gereinigt werden und zeigten eine enzymatische Aktivität, wohingegen zwei Variationen des *AtPLA I*-Gens als Proteinaggregationen (*inclusion bodies*) exprimiert wurden und keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 3.1.3.1). Die funktionsfähigen Enzyme

wurden durch Variation der Reaktionsparameter sowie durch Testung verschiedener Inhibitoren näher charakterisiert.

3.1.1 Vektorkonstrukte für die Überexpression rekombinanter Proteine

Zunächst wurden auf der Grundlage der vorhandenen cDNAs und des pQE-30-Überexpressionsvektors die Konstrukte für die Expression in *E. coli*-Zellen des Stammes XL-1 erstellt (s. Kap. 2.2.1). Die Abbildung 3.1 zeigt schematisch einen Ausschnitt des pQE-30-Vektors mit den verschiedenen *AtPLA*-Sequenzen zwischen dem T5-Promoter und den t_0 - und T1-Transkriptionsterminatoren. Für jedes der einzelnen *AtPLA*-Gene wurde ein Konstrukt für die Überexpression erstellt.

pQE-30

| | | | | |
|-------------|-----|------------|--------------------|--------------|
| T5 Promoter | ATG | 6xHistidin | <i>AtPLA</i> I-IVA | t_0 und T1 |
|-------------|-----|------------|--------------------|--------------|

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Expressionskassette aus pQE-30 mit den verschiedenen *AtPLA*s ohne das native Start-ATG.

Bestandteile des pQE-30-Vektors sind neben dem Promoter des Bakteriophagen T5 das Start-ATG und sechs Histidine (6xHis-tag), die die spätere Reinigung des rekombinanten Proteins vereinfachen. Je nach verwendeter Restriktionsschnittstelle für die Klonierung wurden somit 12 bis 16 zusätzliche Aminosäuren an den N-Terminus des zu exprimierenden Gens gehängt. Um die Anzahl an zusätzlichen Aminosäuren möglichst gering zu halten, wurde stets versucht, eine 5'-Restriktionsschnittstelle nahe dem His-Tag zu nutzen (s. Kap. 2.2.1). Das Start-Methionin kodierende ATG der nativen *AtPLA*-Gene wurde für die Überexpression entfernt, um zu verhindern, dass das Zielprotein ohne das His-tag translatiert wird. Die exprimierten Proteine werden in Anlehnung an die Nomenklatur der Gene als Enzym I, Enzym IIA und Enzym IVA bezeichnet. Auf Grund der Größe von *AtPLA* I (1312 Aminosäuren) wurde zunächst nur der mittlere, den anderen *PLA*s homologe Bereich, für die Überexpression verwendet (Abb. 3.2). Diese kurze Version des *AtPLA* I Proteins umfasst 459 Aminosäuren statt der ursprünglichen 1312 Aminosäuren und wurde in Kombination mit dem His-Tag als Enzym I_{kurz} bezeichnet.

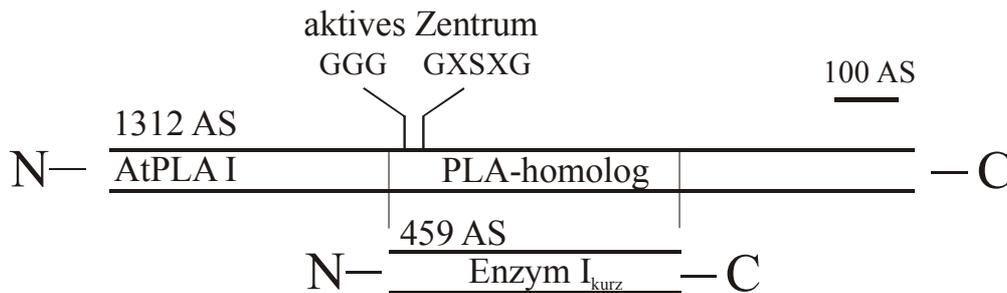


Abbildung 3.2: AtPLA I mit aktivem Zentrum und dem PLA homologen Bereich für die Erstellung des rekombinanten Proteins Enzym I_{kurz}. AS = Aminosäuren.

Die Aminosäuresequenz für Enzym I_{kurz} wurde so gewählt, dass der Abstand des aktiven Zentrums zum N-Terminus sowie die Anzahl an Aminosäuren mit den anderen AtPLAs vergleichbar ist. Enzym I stellt hingegen die gesamte AtPLA-Sequenz ohne Start-ATG dar. Die einzelnen auf Grundlage der Konstrukte exprimierten rekombinanten Proteine und die zu erwartenden resultierenden Größen stellt die Tabelle 3.1 dar.

Tabelle 3.1: Exprimierte rekombinante Proteine und deren Größen vom Start-ATG bis Stop-Codon bzw. vom Start-Methionin bis zum Translationsstop (kalkuliert).

| Gen | rekombinantes Protein | Größe rekombinantes Protein bp (AS) | molekulare Masse kDa |
|-----------|-------------------------|--|-------------------------|
| AtPLA I | Enzym I | 3984 (1328) | 141,6 |
| AtPLA I | Enzym I _{kurz} | 1419 (473) | 52,8 |
| AtPLA IIA | Enzym IIA | 1257 (418) | 45,5 |
| AtPLA IVA | Enzym IVA | 1278 (425) | 47,1 |

Die Expressionsvektoren wurden nach der Ligation in eigens hergestellte chemisch kompetente Zellen transformiert (s. Kap. 2.1.5.15) und mehrere Klone auf die Expression des Zielproteins hin überprüft (s. Kap. 3.1.2). Zusätzlich erfolgte durch Sequenzierung über den Translationsstart in die AtPLA kodierende Sequenz hinein (Fa. SeqLab, Göttingen) eine Überprüfung der Nukleotidsequenz des zu verwendenden Überexpressionsvektors.

3.1.2 Überexpression und Reinigung des rekombinanten Enzyms I_{kurz}

Die Überexpression und Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte nach einem System der Fa. Quiagen (The QIAexpressionist) und ist unter 2.2.1 – 2.2.4 für lösliche und unlösliche rekombinante Proteine beschrieben. Zunächst wurde mit der Expression des

Enzym I_{kurz} -Proteins in XL-1-Zellen begonnen. Nach erfolgreicher Transformation des Ligationsansatzes in chemisch kompetente XL-1-Zellen (s. Kap. 2.1.5.12) wurden mehrere Klone auf die Expression des Zielproteins hin untersucht. Dies erfolgte durch Anzucht der Klone in 2,5 ml LB-Medium plus Antibiotika (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 25 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin) und Induktion durch 1 mM IPTG ab einer Zelldichte von ca. OD_{600} 0,8 für 30 Min. Von den induzierten Zellen wurden 50 μl Aliquots abzentrifugiert, in 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und wie in Kap. 2.2.6 beschrieben in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anhand eines Proteinmarkers und der Größenvorstellung des rekombinanten Proteins, sowie dem Vergleich mit einer Reinigung aus Bakterien ohne Expressionsvektor wurde das Zielprotein detektiert. In der Abbildung 3.3 wurden sieben unterschiedliche Klone aus der Enzym I_{kurz} -Transformation in der SDS-PAGE überprüft. Die starke Bande oberhalb von 50 kDa stimmt mit der errechneten Größe des rekombinante Proteins Enzym I_{kurz} von 52,8 kDa (Tab. 3.1) überein und konnte zudem in dem Klon mit leerem pQE-30-Vektor nicht detektiert werden (Abb. 1.3, 2. Bahn).

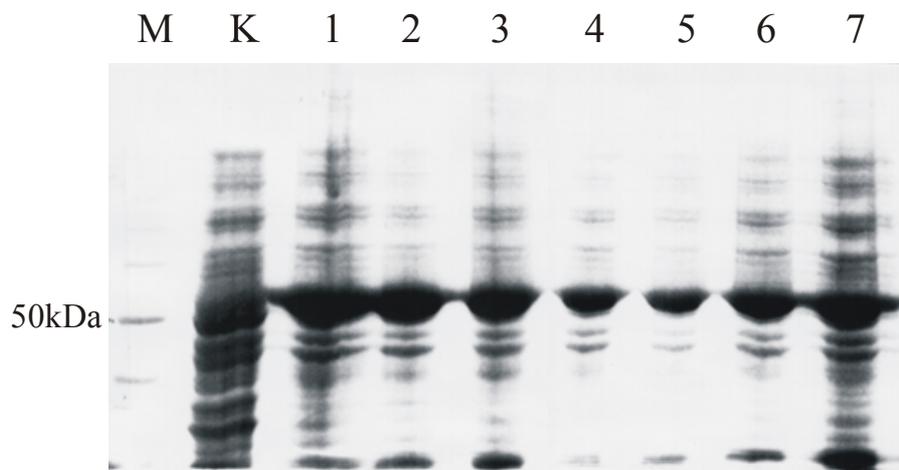


Abbildung 3.3: SDS-PAGE mit sieben Enzym I_{kurz} -Klonen (XL-1) nach der Induktion mit 1 mM IPTG. M = Marker, K = XL-1 ohne Expressionsvektor, 1-7 = Enzym I_{kurz} -Klone.

Der pQE-30-Vektor des ersten Klons aus der Abbildung 3.3 wurde durch Sequenzierung verifiziert und für die Folgeexperimente zur Produktion von Enzym I_{kurz} verwendet. Im weiteren wurde geprüft, ob das exprimierte Protein in den Zellen löslich ist oder ob es als unlösliche Proteinaggregate (*inclusion bodies*) verpackt vorliegt. Nach der Lyse der induzierten Zellen (s. Kap. 2.2.3 und 2.2.4) ließen sich durch Zentrifugation die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen bzw. Proteinen trennen, wobei das entstehende Sediment die unlöslichen Bestandteile sowie unaufgeschlossene Zellen und der Überstand das lösliche

Protein enthielt. Die Überprüfung erfolgte wiederum durch Auftrennen entsprechender Aliquots in der SDS-PAGE (Abb. 3.4).

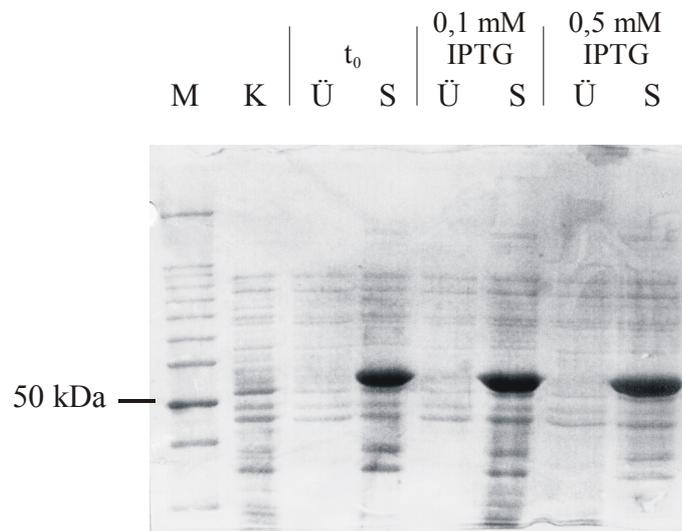


Abbildung. 3.4: SDS-PAGE mit XL-1-Gesamtprotein ohne Expressionsvektor (K), sowie XL-1 + Enzym I_{kurz} vor (t_0) und nach der Induktion mit zwei IPTG Konzentrationen. Die Induktion erfolgte 1 Std. bei 37°C und 200 Upm. M = Marker, Ü = Überstand, S = Sediment.

Die Abbildung 3.4 zeigt das Gesamtprotein eines vektorlosen XL-1-Stammes im Vergleich mit dem Überstand und dem Sediment eines Enzym I_{kurz} exprimierenden Stammes vor und nach der Induktion mit 0,1 mM bzw. 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Vor der Induktion zur Zeit t_0 war eine deutliche Bande zwischen 50 und 60 kDa zu sehen. Somit hatte bereits ohne die Inaktivierung des Repressors durch IPTG eine Expression des Zielproteins in großen Mengen stattgefunden. Weiterhin befand sich das Protein im Zellsediment und war somit nicht unter nativen Bedingung reinigbar. Um auch geringe Mengen an löslichem Protein anzureichern, wurden zunächst die induzierten Zellen mit der French Cell Press aufgeschlossen, da diese Methode wesentlich wirkungsvoller ist als der Aufschluss mit dem Potter (Homogenisator). Nach der Zentrifugation wurde der lösliche Überstand an die Ni-NTA-Matrix gebunden und nach zweimaligem Waschen wurde das gebundene Protein eluiert. Die Abbildung 3.5 zeigt Aliquots der einzelnen Schritte in der SDS-PAGE.

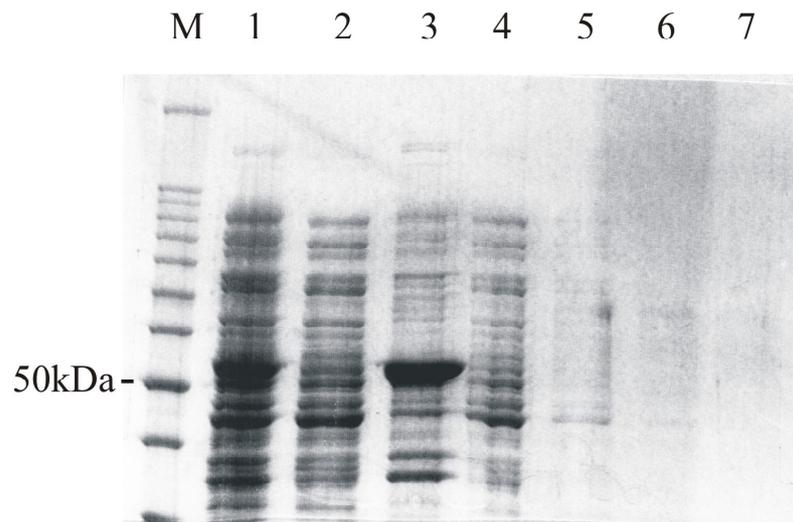


Abbildung 3.5: SDS-PAGE mit einzelnen Schritten aus der Expression (XL-1) und Reinigung von Enzym I_{kurz} . M: Marker; 1: 25 Min. nach Induktion mit 0,05 mM IPTG bei 26°C; 2: Überstand nach French Cell Press; 3: Sediment nach French Cell Press; 4: Überstand nach der Bindung von 2 an Ni-NTA; 5 u. 6: Waschschrift; 7: Elution.

Aus der Abbildung 3.5 Bahn 7 geht hervor, dass keine sichtbaren Mengen an Protein eluiert werden konnten. Über die Ni-NTA-Agarose ließ sich somit kein Enzym I_{kurz} -Protein anreichern, und es wurde gefolgert, dass das gesamte rekombinante Protein als unlösliche *inclusion bodies* vorlag. Als Hauptursache wurde zunächst die sehr hohe Expressionsrate schon im uninduzierten Zustand angesehen. Dies konnte behoben werden, indem die über Nacht angezogene Starterkultur eine OD_{600} von 0,6 nicht überschritt. LB-Medium mit dieser Vorkultur beimpft (1:50), konnte bis OD_{600} 0,6 angezogen werden, ohne eine Selbstinduktion zu verursachen. Durch die Zugabe von IPTG wurde dann die Expression induziert (Abb. 3.6). Der Pfeil in der Abbildung 3.6 deutet auf eine hervortretende Proteinbande, die mit der Größe des Zielproteins (Enzym I_{kurz}) übereinstimmt.

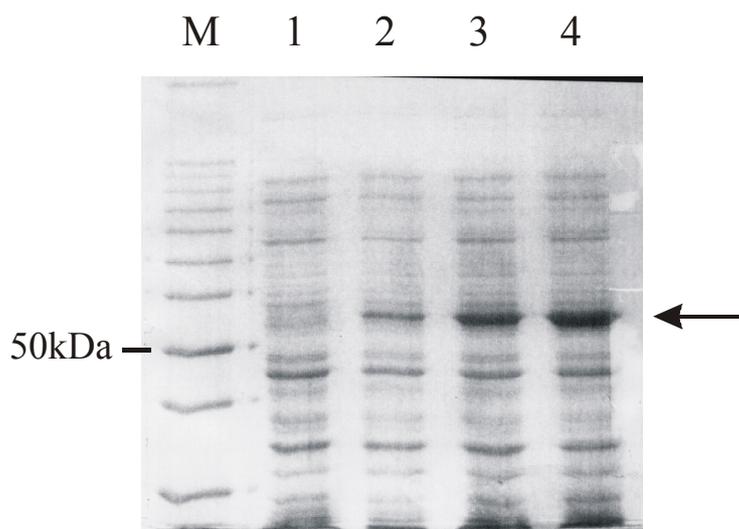


Abbildung 3.6: SDS-PAGE der Expression von ENZYNE I_{kurz} vor und nach der Induktion mit IPTG; bis OD_{600} 0,6 angezogen (37°C , 180 Upm) und dann mit 0,1 mM IPTG induziert (27°C , 180Upm). 1: t_0 ; 2: 0,5 Std.; 3: 1 Std.; 4: 2 Std.

Aber auch eine verminderte Expressionsrate resultierte nicht in der Expression von löslichem Enzym I_{kurz} -Protein. Weitere Experimente, in denen die Induktionsbedingungen wie Induktionsdauer, IPTG-Konzentration, Bakterienstamm und Wachstumstemperatur variiert wurden, führten nicht zum gewünschten Ergebnis.

Um zu überprüfen, dass es sich bei der starken Bande im Sediment (Abb. 3.3 und 3.4) um das rekombinante Protein handelte, wurde das Sediment unter Einsatz von 4 M Guanidin-Hydrochlorid (Gu-HCl) denaturierend gelöst und über die Ni-NTA-Matrix angereichert. Die einzelnen Schritte der denaturierenden Reinigung von Enzym I_{kurz} sind in der SDS-PAGE der Abbildung 3.7 dargestellt. Nach dem Aufschließen der induzierten Zellen mit der French Cell Press befand sich das Zielprotein wie erwartet im Sediment und nicht im Überstand (Abb. 3.7, 2 und 3). Das Sediment wurde über Nacht bei 4°C in 4 M Gu-HCl gelöst und anschließend auf die Ni-NTA-Matrix geladen. Die Probe 4 in der Abbildung 3.7 zeigt den Überstand nach Bindung an die Ni-NTA-Agarose mit einer großen Menge des überexprimierten Proteins, was vermutlich durch eine Überladung der Ni-NTA-Agarose zustande kam. Im anschließenden Waschschrift waren aufgrund der starken Verdünnung im Waschpuffer kaum ausgewaschene Proteine zu erkennen. Die Schritte 6 – 8 zeigen die Elution des überexprimierten Proteins von der Ni-NTA-Säule durch einen Überschuss an Imidazol (250 mM) und bestätigen den Eindruck, dass die Matrix zuvor bis an die Kapazitätsgrenze beladen wurde, da auch noch im dritten Elutionsschritt deutliche Mengen an Protein in der SDS-PAGE zu sehen sind (Abb. 3.7, Bahn 8). Proteine die in Gu-HCl-haltigen Puffern vorlagen mussten vor dem Auftragen

auf die SDS-PAGE mit Trichloressigsäure gefällt und in Wasser resuspendiert werden (s. Kap. 2.2.5).

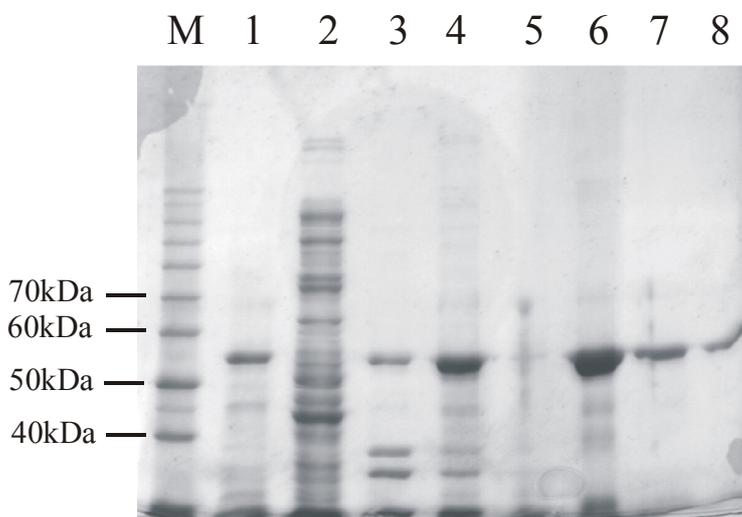


Abbildung 3.7: SDS-PAGE mit einzelnen Schritten der denaturierenden Reinigung von Enzym I_{kurz} über die Ni-NTA-Matrix. M = Marker; 1 = älteres Eluat Enzym I_{kurz} ; 2: Überstand nach French Cell Press; 3: Sediment nach French Cell Press, lysiert; 4: Überstand nach Ni-NTA; 5: Waschschrift (7,5 ml); 6-8: Elutionen 1-3, je mit 1,5 ml.

Das denaturierend gereinigte Protein Enzym I_{kurz} zeigte im Enzymtest keine Aktivität und es wurde durch Rückfaltungsexperimente versucht das Protein in eine aktive Form zu überführen (s. Kap. 2.2.5). Da dies ohne Erfolg blieb, wurde die gesamte Länge der *AtPLA I*-cDNA wie unter 2.2.1 beschrieben in den pQE-30 kloniert und erneut in XL-1-Zellen exprimiert. Der Grundgedanke war, dass vielleicht Proteinbereiche jenseits der verkürzten Enzym I_{kurz} -Aminosäuresequenz maßgeblich an der Faltung und damit an der Funktionalität des *AtPLA I*-Proteins beteiligt sind. Dies gelang insofern nicht, als keine Bande mit dem korrekten Molekulargewicht gefunden werden konnte, sondern statt dessen nach der Induktion ein Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 50 kDa auftrat (nicht gezeigt). Dieses Protein ließ sich erneut über Ni-NTA-Matrix reinigen und war vermutlich durch einen Abbruch der Translation in *E. coli* zustande gekommen.

3.1.3 Überexpression und Reinigung der rekombinaten Enzyme IIA und IVA

Wie bereits in Kap. 2.2.1 dargestellt, wurden neben dem *AtPLA* I-Gen auch die Proteine der Gene *AtPLA* IIA und *AtPLA* IVA rekombinant in *E. coli* überexprimiert. Im Gegensatz zu Enzym I_{kurz} und Enzym I wurden Enzym IIA und Enzym IVA nicht durch *E. coli* in *inclusion bodies* verpackt und konnten unter nativen Bedingungen gereinigt werden. In der Abbildung 3.8 sind die einzelnen Reinigungsschritte für Enzym IIA und Enzym IVA dargestellt. Aus den Erfahrungen mit Enzym I_{kurz} heraus erfolgte die Inokulation der Expressionskulturen mit nicht überwachsenen ($< OD_{600}$ 0,8) Startkulturen und die Induktion der Expression wurde bei ca. OD_{600} 0,5 initiiert, da die Reinigung des Proteins aus Kulturen mit höherer Zelldichte auch größere Mengen an Proteinen aus *E. coli* im Eluat zur Folge hatte (s. auch Kap. 2.2.2). Der Aufschluss für die native Reinigung erfolgte mit dem Homogenisator. Im Vergleich mit dem Aufschluss durch die French Cell Press beinhaltete das Sediment nach dem Aufschluss mit dem Homogenisator einen Großteil nichtaufgeschlossener Zellen, was am breiten Spektrum der Proteinbanden in der Abbildung 3.8 (Bahn 3) deutlich wird. Trotzdem reichte der Anteil an aufgeschlossenen Zellen aus, um Proteinkonzentrationen von 100 – 200 mg/ml von der Ni-NTA-Matrix zu eluieren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (s. Kap. 2.2.12).

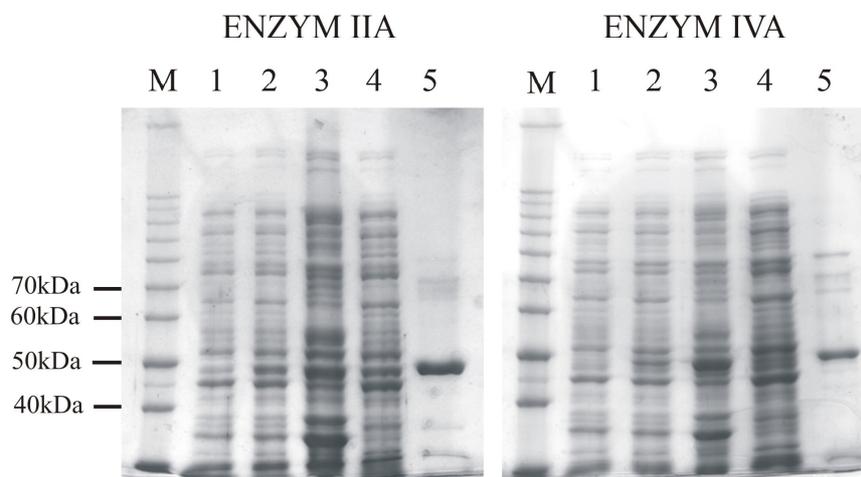


Abbildung 3.8: SDS-PAGE mit Teilschritten aus der Überexpression und Reinigung von Enzym IIA und Enzym IVA. M: Marker; 1: - IPTG; 2: + 0,5 mM IPTG (30 Min. 30°C); 3: Sediment nach Pottern; 4: Überstand nach Pottern; 5: Eluat.

Um sicherzustellen, dass die eluierte Proteinbande nicht zu den nativen Proteinen von *E. coli* gehört und um eine Kontrolle für folgende Enzymtests zu haben, wurde ein XL-1-Stamm mit leerem Expressionsvektor unter den gleichen Bedingungen wie Enzym IIA und

Enzym IVA induziert und gereinigt (Abb. 3.9). In der Kontrolle ist bei keiner Größe eine vergleichbare Proteinbande zu sehen (Abb. 3.9, Bahn 5).

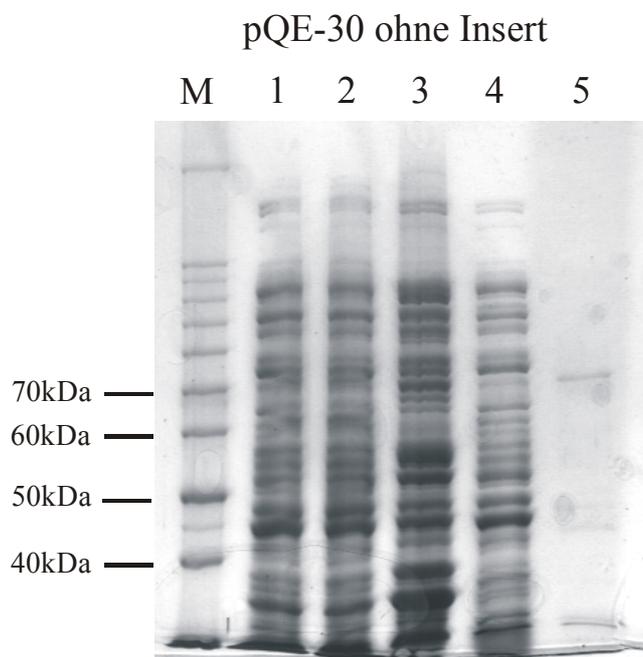


Abbildung 3.9: SDS-PAGE mit Teilschritten aus der Induktion und Reinigung von XL-1-Zellen mit leerem pQE-30-Vektor. M: Marker; 1: - IPTG; 2: + 0,5 mM IPTG (30 Min. 30°C); 3: Sediment nach Pottern; 4: Überstand nach Pottern; 5: Eluat.

Das Eluat der in der Abbildung 3.9 enthält, wie die Enzym IIA- und Enzym IVA-Eluate, Spuren von Proteinen aus *E. coli*. Um in späteren Enzymtests den Einfluss dieser Kontaminationen auf die beobachteten Enzymaktivitäten beurteilen zu können, wurde dieses Eluat unter gleichen Enzymtestbedingungen für Kontrollreaktionen verwendet (s. Kap. 3.1.4).

3.1.4 Enzymaktivität rekombinanter Proteine

Die unter 3.1.2 und 3.1.3 exprimierten und gereinigten rekombinanten Proteine wurden in einem Enzymtest auf ihre Phospholipase-Aktivität hin getestet. Grundlage für den Enzymtest sind zwei fluoreszenzmarkierte Phosphatidylcholine (β - und Bis-BODIPY-PC) der Fa. MoBiTec (s. Kap. 2.2.8). Die beiden Substrate unterscheiden sich in der Anzahl und Position der Fluophore, wobei β -BODIPY-PC eine fluoreszierende Gruppe am Ende der Fettsäure in der *sn*-2 Position besitzt und Bis-BODIPY-PC an beiden Fettsäuren fluoreszenzmarkiert ist. Für den Enzymtest wurde je ein BODIPY-PC-Typ in Liposomen

eingebaut (s. Kap. 2.2.8). Somit liegt das Substrat nicht als Monomer vor, sondern ist in eine artifizielle Lipidmembran integriert und die Phospholipase A lagert sich, ähnlich den Verhältnissen in der Zelle, an die Membranoberfläche an, um die Katalyse durchzuführen. Nach dem Enzymtest wird der Reaktionsansatz über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (s. Kap. 2.2.10) und das BODIPY-PC sowie die fluoreszenzmarkierten Reaktionsprodukte ermöglichen nach Anregung unter UV-Licht deren einfache Detektion. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der Größe der einzelnen Flecken auf der Dünnschichtplatte mit dem Programm Scan Pack 2.0 (s. Kap. 2.2.13).

Die Ergebnisse der Renaturierungs-Experimente mit dem rekombinanten Proteinen Enzym I_{kurz} werden unter 3.1.4.1 geschildert. Die rekombinanten Proteine Enzym IIA und Enzym IVA konnten unter nativen Bedingungen gereinigt werden und wurden als aktive Enzyme in den Enzymtests untersucht (s. Kap. 3.1.4.2 und .3).

3.1.4.1 Renaturierung des rekombinanten Enzyms I_{kurz}

Die Expression der rekombinanten Proteine Enzym I und Enzym I_{kurz} führten zu *inclusion bodies*, die nur unter denaturierenden Bedingungen gelöst und gereinigt werden konnten. Dies führte vermutlich zur Auflösung der natürlichen Proteinstruktur und damit zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Im Falle von Enzym I_{kurz} wurde durch Renaturierungs-Experimente versucht das denaturierte Protein in eine funktionsfähige Form zurück zufalten. Die Rückfaltung des denaturierten Proteins Enzym I_{kurz} aus 3.1.2 wurde durch Dialyse und Umpufferung durchgeführt. Die Protokolle sowie eine Liste der verwendeten Chemikalien und Rückfaltungsbedingungen sind in Kap. 2.2.5 dargelegt. Nach dem Zellaufschluss durch die French Cell Press wurde das Sediment inklusive der *inclusion bodies* in Gu-HCl gelöst und für die Rückfaltung durch Dialyse und/oder Umpufferung eingesetzt. Die selektive Anreicherung des rekombinanten Proteins über die Ni-NTA-Matrix erfolgte entweder direkt aus dem lysierten Sediment oder nach vorheriger Dialyse. Die Ni-NTA-Reinigung wurde der Dialyse teilweise nachgeschaltet, da eventuell Komponenten des Zellsedimentes (z.B. *E. coli* Lipidmembranen) die Rückfaltung während der Dialyse positiv beeinflussen könnten. Die Dialyse des denaturativ gelösten Proteins wurde mit einem Rückfaltungsreagenz der Fa. Roth (Roti[®]-Fold) und zugehörigem Dialysierschema durchgeführt (s. Kap. 2.2.5). Da nach der Dialyse auch in verschiedenen Reaktionspuffern keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, wurden Aliquots des dialysierten Proteins unter Zugabe von die Rückfaltung

unterstützenden Chemikalien für mehrere Tage inkubiert. Bei der Umpufferung wurde denaturierend aufgereinigtes Protein in einer Konzentration von 50 µg/ml ohne Dialyse in verschiedenen Puffern für ein bis vier Tage inkubiert, um so das Protein in eine aktive Form zu bekommen. Keine der angeführten Methoden resultierte in einem funktionsfähigen Phospholipase-Enzym. In der Abbildung 3.10 ist beispielhaft ein Enzymtest mit verschiedenen Rückfaltungsansätzen gezeigt. Ausgangsmaterial für diesen Test war das in Abbildung 3.7 denaturierend gereinigte Protein, das in einer Konzentration von 50 µg/ml in den folgenden Puffern (je 1ml) für 48 Std. bei 4°C inkubiert wurde.

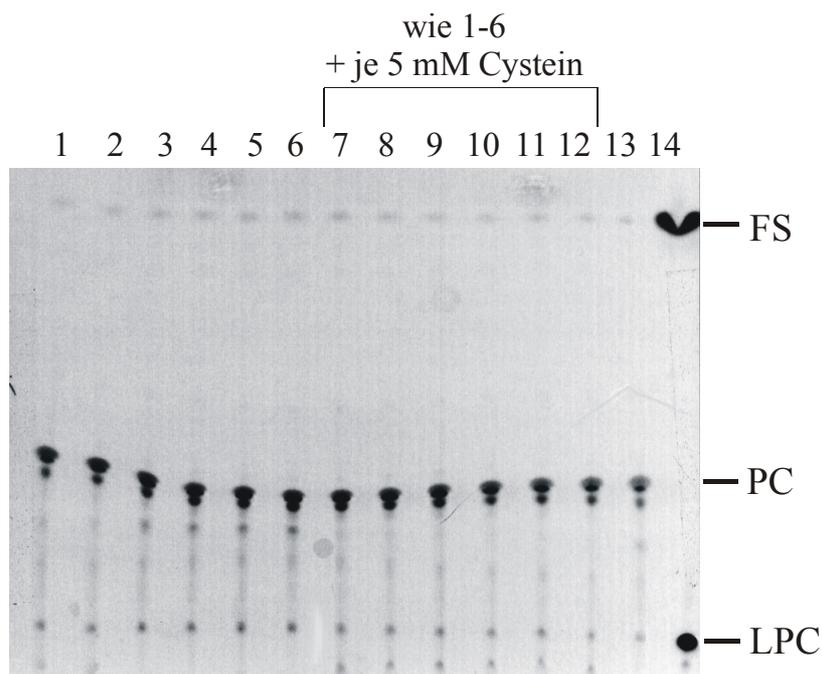


Abbildung 3.10: Enzymtest mit Enzym I_{kurz} nach Umpufferung über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Pro Reaktion (100 µl): 25 mM HEPES pH 6,8, 375 ng Protein, 3 µl Liposomen (bis-BODIPY-PC), 2 Std. 33°C.

alle: 25,0 mM Tris/HCl, pH 8,0

1: + 1,0 M Gu-HCl, 5 mM Cystein, 10 mM CaCl₂

2: + 0,5 M Gu-HCl, 5 mM Cystein, 10 mM CaCl₂

3: + Glutathion 4 mM red. /2 mM ox.

4: + 0,5 M Gu-HCl, Glutathion 4 mM red. /2 mM ox.

5: + 1,0 M Gu-HCl, Glutathion 4 mM red. /2 mM ox.

6: + 0,5 M Gu-HCl, Glutathion 4 mM red. /2 mM ox., 0,05% Tween-80

7-12: wie 1-6 + 5 mM Cystein

13: ohne Protein

14: Standard: FS = Fettsäure, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin.

Die in der Abbildung 3.10 in geringem Maße sichtbaren Reaktionsprodukte Fettsäure und Lysophosphatidylcholin traten auch in der Kontrolle ohne rekombinantes Protein auf

(Bahn 13) und wurden als Degradationsprodukte des Substrates interpretiert. Eine Enzymaktivität von Enzym I_{kurz} wurde nicht beobachtet.

3.1.4.2 Enzymaktivität des rekombinanten Enzyms IIA

Nach der Reinigung (s. Kap. 2.2.3) besaß Enzym IIA im Phospholipase Test keine Aktivität. Daher wurde das eluierte Protein zunächst gegen 200 Vol. 25 mM Tris (pH 7,6) dialysiert (s. Kap. 2.2.7), um NaCl und Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen. Erst durch die Entwicklung eines Reaktionspuffers (s. Kap. 2.2.9) konnte das Protein im Anschluss an die Dialyse in seine aktive Form überführt werden. Wesentliche Bestandteile des Reaktionspuffers waren 2 mM CaCl₂ und ein reduzierendes Agens wie 5 mM DTT oder 5 mM Cystein. Im Enzymtest zeigte Enzym IIA an dem fluoreszenzmarkiertem Phosphatidylcholin (PC) eine Phospholipase-A₁- sowie eine Phospholipase-A₂-Aktivität (Abb. 3.11). Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte sind freie Fettsäure (FA) und Lysophosphatidylcholin (LPC). Durch die Katalyse des an beiden Fettsäuren markierten bis-BODIPY-PCs konnte anhand der Reaktionsprodukte die Phospholipase-A-Aktivität identifiziert werden. Wurde als Substrat das β -BODIPY-PC mit der markierten Fettsäure an der *sn*-2 Position verwendet, traten wiederum beide fluoreszierenden Reaktionsprodukte auf, woraus hervorging, dass das Enzym die Hydrolyse an der *sn*-1- und der *sn*-2-Position durchführen konnte. Neben dem Substrat und den fluoreszierenden Produkten FA und LPC ist auf dem Dünnschichtchromatogramm ein weiterer fluoreszierender Fleck unter der Fettsäure vorhanden (Abb. 3.11). Die Identität dieses Fleckes ist unklar, Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure, Reaktionsprodukte der Phospholipasen C bzw. D können jedoch ausgeschlossen werden, da DAG in dem verwendeten Laufmittel oberhalb der Fettsäure und Phosphatidsäure unterhalb des PCs läuft. Da die Reaktionsprodukte FA und LPC auf dem Dünnschichtchromatogramm in ähnlicher Intensität vorhanden waren, wurde davon ausgegangen, dass keine oder nur eine sehr geringe Lysophospholipase-A-Aktivität vorhanden war. Andernfalls wäre die markierte Fettsäure des LPC abgespalten worden und somit der LPC-Fleck auf dem Dünnschichtchromatogramm schwächer oder gleich der Kontrolle. Der in der Kontrollreaktion mit β -BODIPY-PC auftretende LPC-Fleck (Abb. 3.11, Bahn 2) resultiert aus einer Degradierung des Substrates und ist nicht auf eine enzymatische Reaktion zurückzuführen (Abb. 3.13, Enzym IVA)

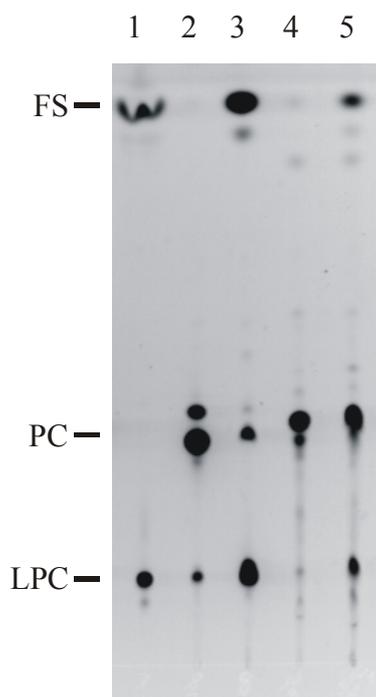


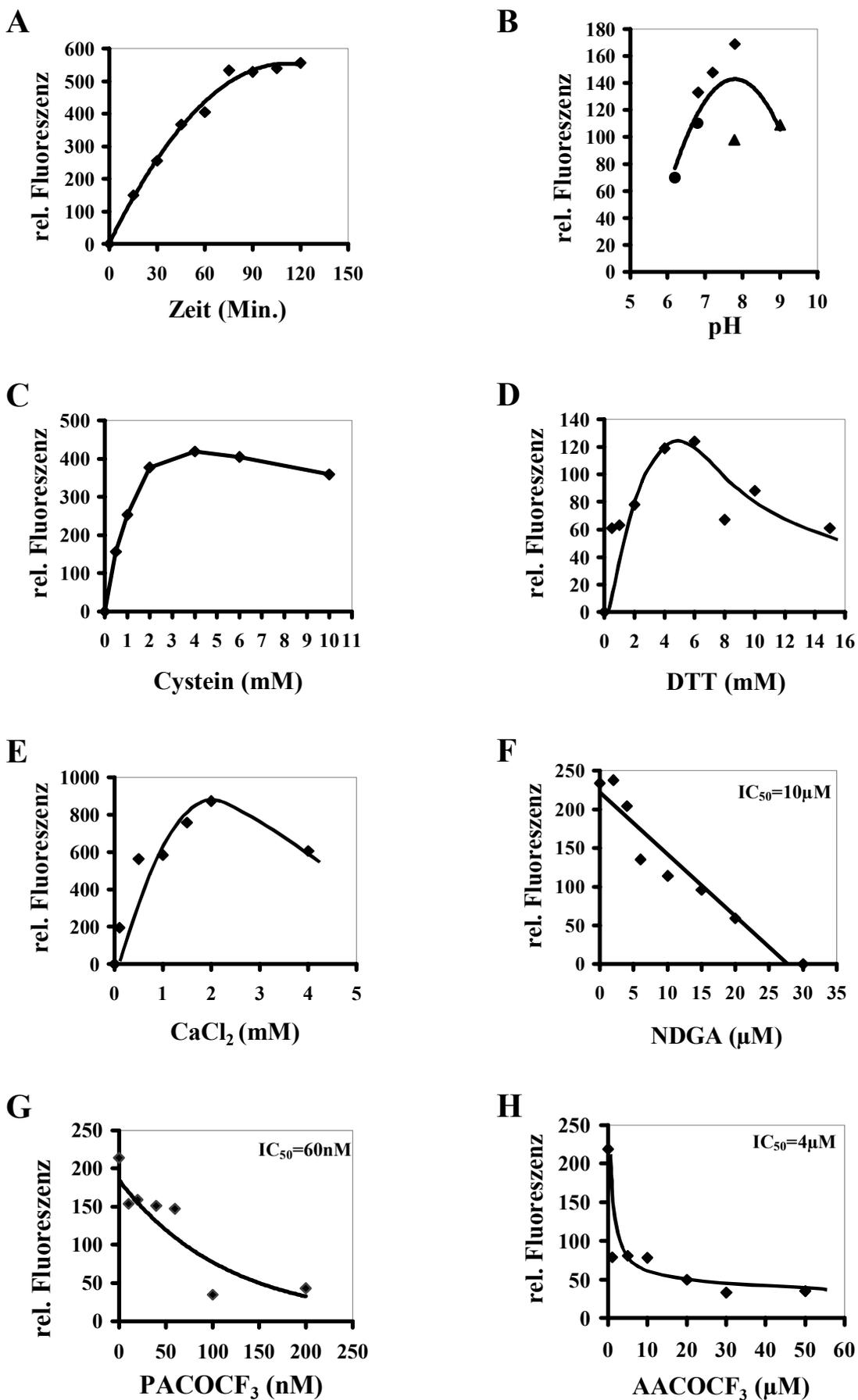
Abbildung 3.11: Dünnschichtchromatogramm eines Enzymtestes mit Enzym IIA oder dem Kontrolleluat aus der Expression und Reinigung des leeren pQE-30-Vektors (= K); 25 mM HEPES pH 7,8, 2 mM CaCl_2 , 5 mM Cystein, 100 ng Enzym IIA, 3 μl Liposomen, 1 Std. 33°C. 1: Standard; 2: 10 μl K + β -BODIPY-PC; 3: 10 μl Enzym IIA + β -BODIPY-PC; 4: 10 μl K + bis-BODIPY-PC; 5: 10 μl Enzym IIA + bis-BODIPY-PC. FS = Fettsäure, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin.

Im Vergleich der beiden BODIPY-PC Substrate in der Abbildung 3.11 ist weiterhin zu erkennen, dass β -BODIPY-PC wesentlich effektiver umgesetzt wurde als das bis-BODIPY-PC. Nach einer Reaktionszeit von 60 Min. unter gleichen Bedingungen waren mehr bis-BODIPY-PC-Substrat und weniger von dessen Produkten vorhanden. Eine vollständige Umsetzung des β -BODIPY-PCs in seine Reaktionsprodukte in 60 Minuten entspräche einer Enzymaktivität von 0,227 nmol/Std. oder 63,1 μkat . Hierbei ist nicht die Umsetzung des Soja-PC Gemisches, das 93,3 % (w/w) der Lipide in den Liposomen ausmacht, berücksichtigt.

Zur Bestimmung der katalytischen Eigenschaften von Enzym IIA wurde eine Zeitkinetik erstellt, sowie die Enzymaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes sowie der Konzentrationen an DTT, Cystein und CaCl_2 bestimmt. Weiterhin erfolgte eine nähere Charakterisierung der Enzymaktivität durch die Testung verschiedener Lipoxigenase- und Phospholipase-A₂-Inhibitoren (s. Kap. 2.2.9.2). Die Auswertung der Enzymtests erfolgte durch Quantifizierung der abgespaltenen Fettsäure über die Größe des fluoreszierenden Fleckes auf dem Dünnschichtchromatogramm (s. Kap. 2.2.13) und wird als relative

Fluoreszenz wiedergegeben. In der Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der durchgeführten Enzymtests graphisch dargestellt.

Abbildung 3.12: Charakterisierung von Enzym IIA. Aktivität ist als relative Fluoreszenz der freien Fettsäure von bis-BODIPY-PC angegeben. Reaktionsbedingungen s. Kap. 2.2.9 falls nicht anders indiziert. **A:** Zeitreihe. **B:** pH-Reihe, ● = 50 mM MES, pH 6,2 und 6,8; ◆ = 25 mM HEPES, pH 6,8, 7,2 und 7,8; ▲ = 50 mM Tris, pH 7,8 und 9,0. **C:** Cystein-Reihe. **D:** 1,4-Dithio-*DL*-threitol (DTT)-Reihe. **E:** CaCl₂-Reihe. **F:** Nordihydroguaiaretic Säure (NDGA)-Reihe. **G:** Palmitoyltrifluoromethyl-ke-ton (PACOCF₃)-Reihe. **H:** Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF₃)-Reihe.



Das pH-Optimum von Enzym IIA liegt in einer mit 25 mM HEPES gepufferten Lösung bei 7,8. In der Zeitkinetik verhält sich der Anstieg der Reaktionsprodukte bis ca. 75 Min. nahezu linear. Nach dem Überschreiten dieser Zeit fällt die Zunahmerate ab und die Kurve bildet ein Plateau. Die Reaktionszeit der Enzymtests mit Enzym IIA wurde mit 60 Minuten so gewählt, dass sich die Katalyse noch in der linearen Phase befindet (Abb. 3.12, A). Für die Aktivität des Enzyms ist Cystein unerlässlich, das bei einer Konzentration 5 mM im Reaktionspuffer die höchste Aktivität hervorruft (Abb. 3.12, C). Cystein lässt sich, vermutlich aufgrund ähnlicher reduzierender Eigenschaften, durch DTT in gleicher Konzentration ersetzen (Abb. 3.12, D). In der Abbildung 3.12 E ist die Calcium-Abhängigkeit der Reaktion aufgetragen. Ohne Calcium ist Enzym IIA nicht aktiv und ab 0,5 mM CaCl_2 ist bereits eine deutliche Aktivität sichtbar, die bei 2 mM CaCl_2 ihr Maximum erreicht.

Von den fünf in Kap. 2.2.9.2 angeführten Inhibitoren hatten HELSS und ETYA keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von Enzym IIA. Die höchsten Konzentrationen in den Tests lagen für HELSS bei 10 μM und für ETYA bei 50 μM . NDGA, PACOCF_3 und AACOCF_3 hingegen resultierten mit unterschiedlicher Effizienz in einer Inhibition der PLA-Aktivität. In der Abbildung 3.12 F-H sind neben den konzentrationsabhängigen Verläufen der Enzymaktivitäten auch die Inhibitorkonzentrationen (IC_{50}) abgetragen, die zu einer Verminderung der PLA-Aktivität um 50 % führten. Den stärksten Effekt hatte der iPLA_2 -Inhibitor PACOCF_3 , der bei einer Konzentration von 60 nM die Enzymaktivität bereits um die Hälfte hemmte. Der gleiche Effekt ließ sich durch Behandlung mit 4 μM AACOCF_3 oder 10 μM NDGA erreichen.

3.1.4.3 Enzymaktivität des rekombinanten Enzyms IVA

Im Gegensatz zu Enzym IIA war Enzym IVA bereits im Elutionspuffer (s. Kap. 2.2.3) aktiv und konnte ohne einen weiteren Dialyseschritt für die Enzymtests eingesetzt werden. Zudem benötigt Enzym IVA kein reduzierendes Agens und bleibt über mehrere Wochen hinweg im Elutionspuffer bei 4°C aktiv. Für den Enzymtest wurden, wie bei Enzym IIA, Liposomen hergestellt, die entweder das einfach markierte β -BODIPY-PC oder das bis-BODIPY-PC mit zwei fluoreszenzmarkierten Fettsäuren enthielten. Im Enzymtest offenbarte Enzym IVA eine Phospholipase-A-Aktivität ohne offensichtlicher Präferenz für die Fettsäure an der *sn*-1- oder *sn*-2-Position (Abb. 3.13) und verhält sich in dieser Beziehung wie Enzym IIA. Wie in der Abbildung 3.11 zeigen auch in der Abbildung 3.13 die Bahnen 2 und 5 die

Enzymtests mit dem gereinigten Protein von dem leeren pQE-30-Vektor keine enzymatische Aktivität. Die auftretenden Flecken, insbesondere beim LPC, erscheinen auch in der Variante ohne eingesetztem Eluat (Abb. 3.13, Bahnen 1 und 4) und sind vermutlich auf chemische Umwandlung des Substrates zurückzuführen. Nach Vergleich der PC- und der LPC-Flecken zwischen den beiden Substrattypen katalysiert auch Enzym IVA das β -BODIPY-PC effektiver.

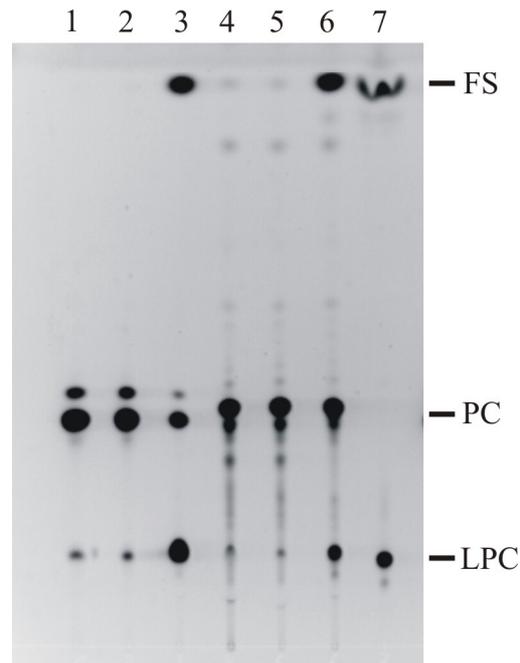
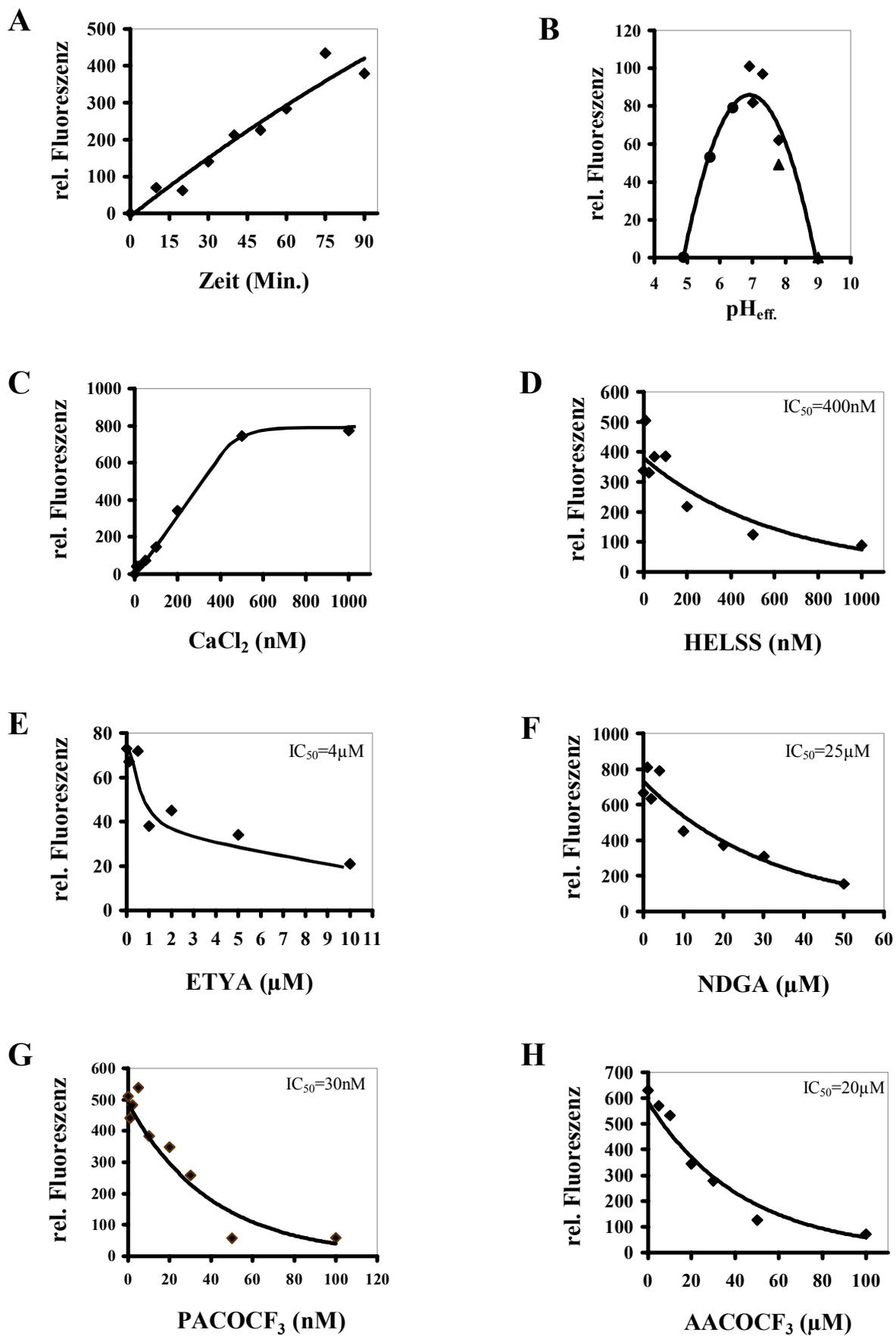


Abbildung 3.13: Enzym IVA-Enzymtest mit β -BODIPY-PC (1-3) und bis-BODIPY-PC (4-6). 50 mM MES, $\text{pH}_{\text{eff.}}$ 7,0, 1 mM CaCl_2 , 500 ng Protein, 3 μl Liposomen, 33°C, 30 Min. 1: ohne Eluat + β -BODIPY-PC. 2: Eluat von leerem Expressionsvektor + β -BODIPY-PC. 3: Eluat mit Enzym IVA + β -BODIPY-PC. 4: wie 1 aber bis-BODIPY-PC. 5: wie 2 aber bis-BODIPY-PC. 6: wie 3 aber bis-BODIPY-PC. 7: Standard; FS = freie Fettsäure, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen und näheren Charakterisierung von Enzym IVA wurden parallel zu Enzym IIA verschiedene Parameter variiert und der Einfluss von Lipoxygenase- und PLA_2 -Inhibitoren (s. Kap. 2.2.9.2) getestet. Die Auswertung der Enzymtests erfolgte wiederum über die Quantifizierung der abgespaltenen freien Fettsäure vom bis-BODIPY-PC. In der Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse der Enzymtests dargestellt.

Abbildung 3.14: Charakterisierung von Enzym IVA. Aktivität ist als relative Fluoreszenz der freien Fettsäure von bis-BODIPY-PC angegeben. Reaktionsbedingungen wie in Kap. 2.2.9 beschrieben, falls nicht anders indiziert. **A:** Zeitreihe. **B:** pH-Reihe mit effektivem pH-Wert resultierend aus Puffer + 5% Eluat (50 mM NaHPO₄, pH 8,0); ● = 50 mM MES, pH 6,2 und 6,8; ◆ = 25 mM HEPES, pH 6,8, 7,2 und 7,8; ▲ = 50 mM Tris, pH 7,8 und 9,0. **C:** CaCl₂-Reihe. **D:** E-6-(bromomethylen)tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-on (HELSS)-Reihe. **E:** (5,8,11,14-Eicosatetraynoic Säure (ETYA)-Reihe. **F:** Nordihydroguaiaretic Säure (NDGA)-Reihe. **G:** Palmitoyltrifluoromethylketon (PACOCF₃)-Reihe. **H:** Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF₃)-Reihe.



Das pH-Optimum lag für Enzym IVA bei einem pH-Wert von 7,0 (50 mM MES). In der Abbildung 3.14 ist der effektive pH-Wert dargestellt, der aus dem Reaktionspuffer und einem 5 %igen Anteil des Proteins im Elutionspuffer (50 mM NaHPO₄) resultierte. Nach einer Reaktionsdauer von 30 Min. war die Katalyse ausreichend fortgeschritten, um die Reaktionsprodukte einfach zu detektieren (Abb. 13), wobei sich die Enzymaktivität bis 90 Min. linear verhielt (Abb. 3.14, A). Parallel zu Enzym IIA war die Katalyse durch Enzym IVA auch calcium-abhängig, wobei wiederum ohne CaCl₂ im Reaktionspuffer keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Ab 100 µM CaCl₂ war eine PLA-Aktivität detektierbar, die bei einer Konzentration von 1 mM ihr Maximum erreichte (Abb. 3.14, C) und sich durch höhere Konzentrationen nicht mehr steigern ließ.

Von den fünf getesteten Inhibitoren (s. Kap. 2.2.9.2) hatten alle eine hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität von Enzym IVA. Obwohl bei Enzym IIA inaktiv, hemmte 400 nM HELSS bzw. 4 µM ETYA die PLA-Aktivität von Enzym IVA um 50 % (Abb. 3.14, D und E). Ähnlich zu Enzym IIA wurde auch Enzym IVA durch PACOCF₃ relativ am stärksten inhibiert und reagierte mit einem IC₅₀-Wert von 30 nM noch empfindlicher als Enzym IIA (Abb. 3.14, G). Der als Lipoxygenase- und Cyclooxygenase- beschriebene Inhibitor NDGA hemmte die PLA-Aktivität von Enzym IVA ab einer Konzentration von 10 µM und hatte einen IC₅₀-Wert von 25 µM (Abb. 3.14, F). Das Arachidonsäure-Analog AACOCF₃ hemmt beim Menschen die cPLA₂ und führte auch bei Enzym IVA zu einer 50%igen Verminderung der Enzymaktivität bei einer Konzentration von 4 µM (Abb. 3.14 H).

3.2 Transkriptionelle Regulation von *AtPLA*-Genen

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die transkriptionelle Regulation von den im Labor anfänglich bekannten *AtPLA*-Genen (außer *AtPLA IVB*) zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der genomische Sequenzbereich am 5'-Ende der jeweiligen Gene isoliert und vor ein bzw. zwei Reportergene gesetzt. Da der gewählte Sequenzbereich maßgeblich für die Regulation des nativen Gens oder des Reportergens verantwortlich ist, wird dieser Bereich im folgenden als Promoter bezeichnet. Die Bezeichnung der vier Promotersequenzen orientiert sich an der Nomenklatur der Gene und ergibt somit die Promotoren PI, PIIA, PIVA und PIVC. Kombinationen der vier Promotoren mit einem

Doppelkonstrukt, bestehend aus den zwei Reportergenen GFP (*green fluorescent protein*) und GUS (β -Glucuronidase) und Kombinationen nur mit GUS wurden in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Die Aktivität der Promotoren wurde über die Expression der gekoppelten Reportergene detektiert, wobei das GFP-Protein nach Blaulicht-Anregung fluoresziert und die β -Glucuronidase eine Enzymreaktion katalysiert, dessen Reaktionsprodukte zu einem blauen Farbstoff polymerisieren. Mit der promoter-vermittelten transkriptionellen Regulation als Initialschritt der Expression der Reportergene sollte somit Aufschluss über die räumliche und zeitliche Aktivität der verschiedenen Promoter erlangt werden, um Hinweise über die biologische Funktion der jeweiligen *AtPLA*-Gene zu bekommen.

3.2.1 Isolierung genomischer Klone aus der Lambda ZAP[®]-II-Bibliothek (Stratagene)

Für die späteren Promoterkonstrukte wurden zunächst die dafür notwendigen Nukleotidsequenzen isoliert. Dies erfolgte durch das Durchsuchen (Screenen) einer genomischen Bibliothek (Lambda ZAP[®]-II, Stratagene) von *Arabidopsis thaliana* 'Columbia' mit Hilfe der PCR-Technik (s. Kap. 2.1.2). Die Bibliothek besteht aus Lambda-Phagen mit einer durchschnittlichen Insertgröße an genomischer *Arabidopsis*-DNA von ca. 5000 bp. Die Insertionen wurden über *Eco RI* Restriktionsschnittstellen in das Phagen genom kloniert. Bei einer angenommenen Genomgröße von *Arabidopsis* von ca. 100×10^6 bp mussten rein rechnerisch 20.000 Phagen gemustert werden, um den Klon mit der richtigen Sequenz zu finden (Abb. 3.15). Die Identifizierung positiver Klone basiert auf dem amplifizieren spezifischer Sequenzen innerhalb der gesuchten genomischen Bereiche mit Hilfe der PCR. Dies ist möglich, da die genomischen Sequenzen, der identifizierten *AtPLAs*, in Datenbanken über das Internet zugänglich sind (z.B. AtDB) und somit anhand der Sequenzen entsprechende Primer für das Screening erstellt werden konnten. Unterstützend beim Primerdesign war das Programm *pc gene*. In der Abbildung 3.15 ist exemplarisch für den genomischen Klon, der die Promotersequenz PIVC enthält, der Verlauf einer schrittweisen Verdünnung der Phagenbank bis zur Isolierung des Einzelklons angeführt. Im ersten Schritt wurden 10 Agar-Platten á 5000 Phagenplaques erstellt, die rechnerisch betrachtet 2,5 Phagenklone mit dem gesuchten Fragment enthielten. Ein Aliquot jeder abgeschwemmten Platte wurde in der PCR eingesetzt und anschließend wurden die PCR-Reaktionen im Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt. Das Ergebnis zeigt im ersten Schritt ein PCR-Signal

in der 1. und 5. Reaktion, die jeweils eine Platte mit 5000 Phagen repräsentierten. Anhand des PCR-Signals wurden so diese beiden Phagenplatten identifiziert, die den gesuchten Phagenklon enthielten. Im zweiten Schritt wurden die Phagen von der 5. Platte erneut auf 10 Platten á ca. 800 Phagenplaques aufgeteilt, und die PCR wie zuvor eingesetzt, um den gesuchten Phagen auf den Platten zu detektieren. Nach mehreren Verdünnungsschritten ließ sich schließlich ein Einzelklon identifizieren, aus dem das genomische Fragment als Bestandteil eines pBluescript SK(-)-Vektors isoliert wurde (s. Kap. 2.1.2).

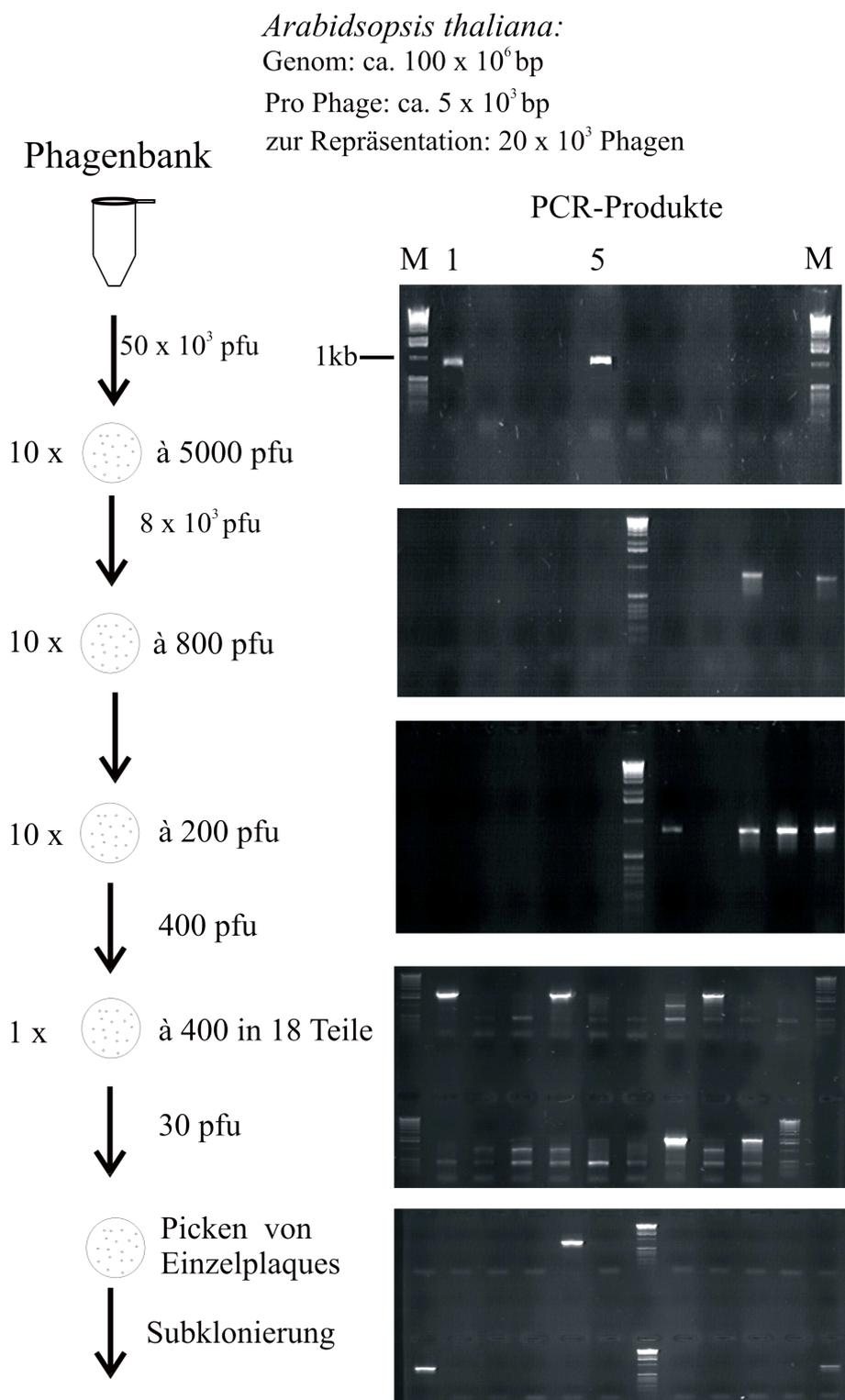


Abbildung 3.15: Durchsuchen der Lambda ZAP[®] II Phagen Bibliothek mit den Primern s 4C P/M (Tab. 3.2) in der PCR; M = DNA-Marker.

Voraussetzung für das Screening waren sequenzspezifische Primer, über die in der PCR Teilbereiche der gesuchten genomischen Sequenz amplifiziert wurden und somit eine Detektion der Phagenklone ermöglichte. Die Primersequenzen, die Größe des Amplikons in

der PCR und die Größen der damit identifizierten genomischen Fragmente sind in der folgenden Tabelle 3.2 dargestellt:

Tabelle 3.2: Primersequenzen zur Identifizierung der genomischen Phagenklone.

| | Primersequenz | Größe Amplikon | Größe genomisches Fragment | enthält Promoter- sequenz |
|---------|-------------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| s1 P: | 5' CCCATAAGATTATCGAGTTACC 3' | 654 bp | 5951 bp | PI |
| s1 M: | 5' AACCGTGTAGAGGTGGAACG 3' | | | |
| s4a P: | 5' AAGCCCAATCGTCTAAAGTCG 3' | 978 bp | 4117 bp | PIVA |
| s4a M: | 5' TGACACATTTCCCTTCTCAATCC 3 | | | |
| s4c P: | 5' TTGCTTGICT TCCTCCTTCG 3' | 818 bp | 4435 bp | PIVC |
| s4c M: | 5' TTTACCGTTGAACTTGGGTCC 3' | | | |
| sPLA P: | 5' AGCCTGTTTACGCATCGCTGG 3' | 2044 bp | 5776 bp | (PsPLA) |
| sPLA M: | 5' TGCTATCAGTTGAAGAGTTCGGC 3' | | | |

Mit der Primerkombination sPLA P/M wurde ein genomisches Fragment von Chromosom II in der Phagenbank identifiziert, auf dem sich eine mögliche sekretorische Phospholipase A (sPLA) befindet. Die Charakterisierung dieses Gens wurde nicht weiter verfolgt, und somit war die enthaltene Promotersequenz nicht Bestandteil der Reporterkonstrukte.

Ansequenzieren von beiden Seiten des Phagenklons und der Vergleich mit der Datenbank gaben Aufschluss über Position und Umfang der genomischen *Arabidopsis*-Sequenz aus den isolierten Phagenklonen.

Das genomische Fragment, das PIIA enthält, wurde nicht über die Phagenbank isoliert, da sich 391 bp vor dem Start-ATG des *AtPLA* IIA Gens eine *Eco*-*RI*-Restriktionsschnittstelle befindet, über die auch die Phagen-Bibliothek erstellt wurde. Die Promoterregion erstreckt sich somit über zwei Phagenklone, woraufhin die Promotersequenz PIIA direkt von präparierter genomischer DNA (s. Kap. 2.1.3.2) amplifiziert wurde. Im Vergleich mit der Isolierung von Phagenklonen kann die direkte Amplifikation von genomischer DNA schneller sein. Die direkte Amplifikation benötigt aber in der PCR sehr gut funktionierende Primer, was durch die angefügten 5'-Restriktionsschnittstellen und die enge Sequenzbreite, speziell bei der Wahl des Minus-Primers (Abb. 2.3), zu Problemen führen kann. Das Durchsuchen der

Phagenbibliothek war zu Beginn der Arbeit im Labor etabliert und nach Amplifikation des PIIA waren bereits alle angeführten Phagenklone isoliert.

3.2.2 Promoter-Reporter-Konstrukte für die Pflanzentransformation

Die Promotoren der vier *AtPLA*-Gene haben eine Größe von je ca. 2 kb und beinhalten neben der nicht transkribierten 5'-Region auch die transkribierte aber nicht translatierte Sequenz bis zum Nukleotid -1 relativ zum Start-ATG (Abb. 3.16). Auf diese Weise war es wahrscheinlich, einen Großteil der für die transkriptionelle Regulation verantwortlichen Promoterelemente (cis-Elemente) zu erfassen. Zudem wurde somit der transkribierte Bereich bis zum nativen Start-ATG mit dem GUS-Gen zu verbinden, was einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität und -Translation des GUS-Gens haben könnte. Zusammen sollte somit ein System geschaffen werden, um möglichst exakt die im wesentlichen transkriptionelle Regulation der *AtPLA*-Gene zu untersuchen.

Arabidopsis thaliana

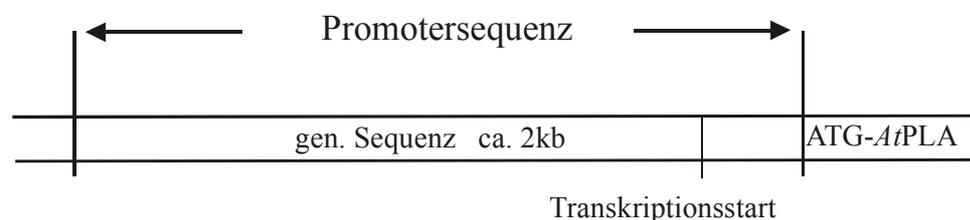


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung eines *AtPLA*-Promoter-Bereiches im Genom von *Arabidopsis thaliana* mit dem möglichen Transkriptionsstart.

Die Promotersequenzen wurden mittels PCR von genomischen Fragmenten aus einer Lambda-Phagen-Bibliothek (s. Kap. 2.1.2) oder direkt von gereinigter genomischer DNA amplifiziert (s. Kap. 2.1.5.4) und vor die Reportergene kloniert. Als Reportergene wurden das *green fluorescent protein* (GFP) und die β -Glucuronidase (GUS) verwendet. Die Erstellung der Promoter-Reporter-Konstrukte ist unter 2.1.5.12 beschrieben.

Als Positivkontrolle wurden die Reporter auch unter der Kontrolle des 35S Promoters aus dem *cauliflower mosaic virus* (CaMV) in *Arabidopsis* exprimiert.

3.2.2.1 Promoter::*gfp*::*uidA*-Konstrukte

Ursprünglich war es geplant, sowohl GFP-Detektion als auch GUS-Detektion zur Messung der Promoteraktivität zu verwenden. Das GFP ermöglicht eine nicht-destruktive Detektion der Reporter-Funktion und somit z.B. eine kontinuierliche Messung der GFP-Fluoreszenz während Induktionsexperimenten mit transgenen Pflanzen. Der GUS-Reporter hingegen ist wesentlich einfacher in den unterschiedlichen Pflanzengewebe zu detektieren. Um die Vorteile beider Reportergene zu nutzen, wurde die Kodierungssequenz für das GFP (*gfp*) an das 5'-Ende des GUS-Gens (*uidA*) ligiert, wodurch die Basis-Vektoren pGG und pGGPTV entstanden (s. Kap. 2.1.5.12). Somit konnten beide Reporter in einem Vektor unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promoters in *Arabidopsis* transformiert werden. Die Funktionalität eines GFP-GUS-Hybridkonstruktes wurde zudem von Quaedvlieg et al. (1998) ebenfalls in *Arabidopsis* gezeigt. Um die Funktionalität des eigenen Hybridkonstruktes zu prüfen, wurde vor dem Erstellen der *AtPLA*-Promoter-Konstrukte der pGG mit dem 35S-Promoter transient in Tabakblättern transformiert und die GUS-Aktivität detektiert (s. Abb. 3.19). Da die β -Glucuronidase am C-Terminus des GFP liegt, wurde aus der GUS-Aktivität nach der transienten Expression geschlossen, dass das *gfp*- und das *uidA*-Gen im gleichen Leseraster liegen und das Hybridkonstrukt intakt ist. In der Abbildung 3.17 sind schematisch die Promoter-GFP-GUS-Kassetten der pGG- und pGGPTV-Vektoren mit den verschiedenen Promotoren dargestellt.

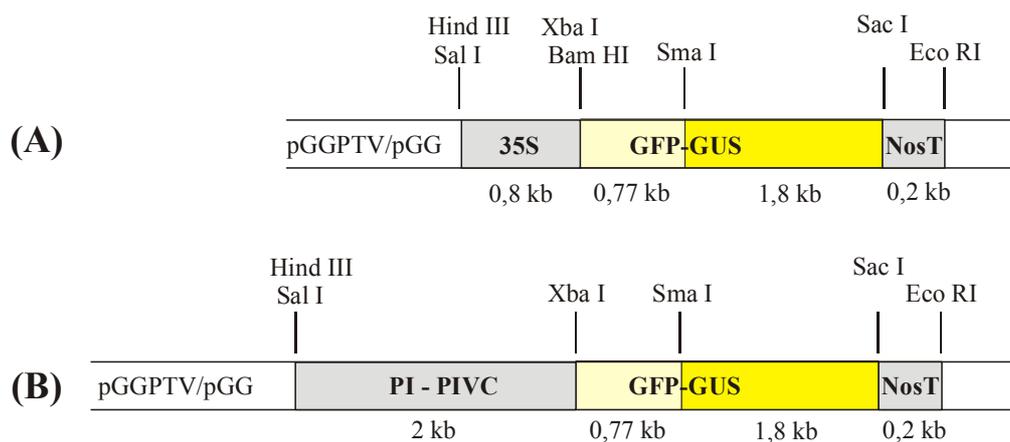


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Promoter-GFP-GUS-Kassetten mit den Größen der einzelnen Elemente. A: 35S-Promoter aus CaMV vor GFP-GUS in pGG und pGGPTV. B: *AtPLA*-Promotoren PI – PIVC als Bestandteile von vier Kassetten in den Vektoren pGG und pGGPTV. NosT = Nos-Terminator.

Neben den dargestellten Kassetten, wurde auch ein Vektor auf der Basis des pGPTV für die stabile Transformation hergestellt, der unter der Kontrolle des 35S-Promoters nur das GFP-Protein exprimiert. Dies diente zur Überprüfung des GFP bzw. der Sensitivität der Dokumentationsanlage zur Detektion der nach Anregung durch das GFP emittierten Fluoreszenz (s. Kap. 3.2.4).

In den später stabil transformierten Pflanzen offenbarten die GFP-GUS-Hybridkonstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promoters nur eine schwache GUS-Aktivität und keine dokumentierbare GFP-Fluoreszenz. GFP (s. 3.2.4), sowie GUS alleine unter der Kontrolle des 35S Promoters zeigten sehr gute Funktionalität. Als Konsequenz daraus wurden neue Konstrukte der *Arabidopsis* Promotoren in Kombination mit dem GUS-Gen (*uidA*) erstellt (s. Kap. 3.2.2.2). Auf Grund der leichteren Detektierbarkeit wurde das GUS-Gen dem GFP-Gen vorgezogen.

3.2.2.2 Promoter::*uidA*-Konstrukte

Nachdem nur eine geringe GUS-Aktivität der GFP-GUS-Hybridkonstrukte festgestellt wurde und dieser Effekt als negative Wechselwirkung zwischen den beiden Reportern interpretiert worden war, wurde eine zweite Generation an Konstrukten ohne GFP-Reportergen erstellt. Dies erfolgte je nach Verwendbarkeit der vorhandenen Restriktionsschnittstellen durch Umklonieren der *AtPLA*-Promotoren in den originären pGPTV im Austausch gegen den 35S-Promoter oder durch Substitution des *gfp::uidA*-Hybrids in den pGGPTVs durch das *uidA*-Gen aus dem pBI221 (s. Kap. 2.1.5.3). Die daraus resultierenden Promoter::*uidA*-Konstrukte sind in der Abbildung 3.18 dargestellt. Alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse in Bezug auf qualitative oder quantitative β -Glucuronidase-Aktivität basieren auf diesen Konstrukten.

- Ergebnisse -

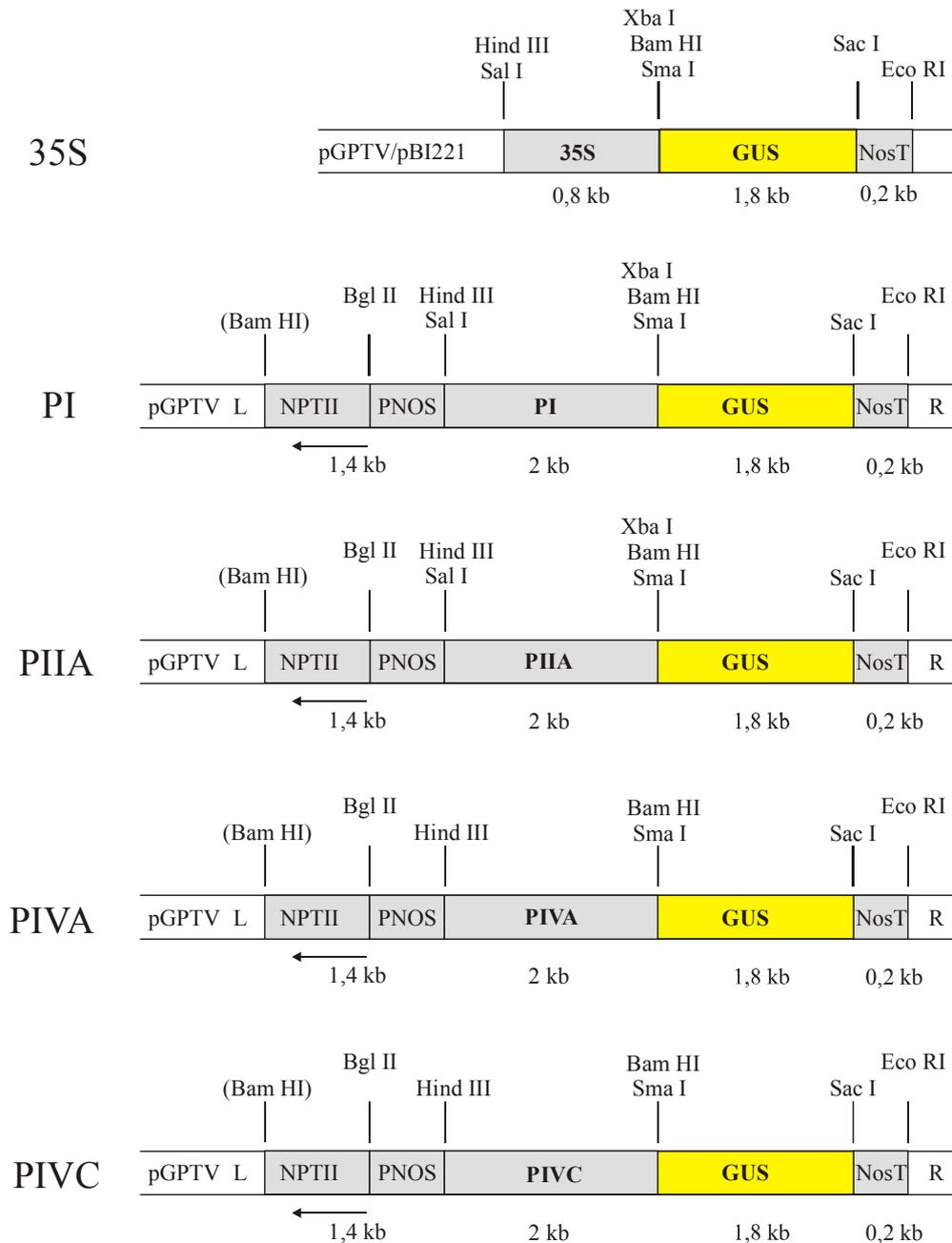


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der 35S-GUS-Kassette im pBI221 und pGPTV, sowie die PI-PIVC-GUS-Kassetten im pGPTV mit Restriktionsschnittstellen. (*Bam HI*) wurde nachträglich entfernt. L und R bezeichnen die linke und rechte Grenze des T-DNA-Inserts.

Alle Vektoren auf der Basis des pGPTV enthalten in der T-DNA das Neomycin-Phosphotransferase II-Gen (NPTII) unter der Kontrolle des Nopalinsynthese-Promoters (PNOS). NPTII ermöglicht, integriert in das pflanzliche Genom, die Selektion transgener Pflanzen auf einem Medium mit dem Antibiotikum Kanamycin (s. Kap. 2.3.5).

3.2.3 Pflanzentransformation

Die Transformation der unter 3.2.2 erstellten Konstrukte erfolgte in *Arabidopsis thaliana* 'Columbia-0' über die stabile Integration in das pflanzliche Genom durch *Agrobacterium tumefaciens* (s. Kap. 3.2.3.2). Eine Ausnahme bildet das GFP-GUS-Reporterhybrid unter der Kontrolle des 35S-Promoters in dem Vektor pBI221 (= pGG), das über Partikelbeschuss transient in Tabakblätter transformiert wurde (s. Kap. 3.2.3.1). Diese Methode wurde gewählt, da sie nach Fertigstellung des pGG-Vektors eine Überprüfung des Konstruktes in der Pflanze in wenigen Tagen ermöglichte, im Gegensatz zur stabilen Transformation, die vom Konstrukt bis zur transgenen Pflanze mindestens drei Monate benötigt. Auf der Basis des Ergebnisses aus der transienten Transformation des pGG wurden die *AtPLA*-Promoter-Reporterhybride wie in 3.2.2.1 dargestellt angefertigt. Eine transiente Transformation mit den *AtPLA*-Promotoren wurde nicht durchgeführt, da zu dem damaligen Zeitpunkt keine Informationen über die Stärke und Gewebespezifität dieser Promotoren vorhanden war und die Detektion nach Partikelbeschuss einen starken Promoter voraussetzt, der zumindest im Blatt aktiv ist, wie der 35S.

3.2.3.1 Transiente Pflanzentransformation

Bevor die PI-PIVC::*gfp::uidA*-Vektoren erstellt und in *Arabidopsis* stabil transformiert wurden, wurde die Funktionalität des Reporterhybrids unter der Kontrolle des 35S-Promoters getestet. Zu diesem Zweck wurde der pGG-Vektor (= pBI221 + 35S::*gfp::uidA*) durch Beschuss mit der Partikelkanone in Tabakblätter transformiert (s. Kap. 2.3.2.2). Dies führte zu einer transienten Expression des GFP-GUS-Proteins in einigen Zellen des Blattes und konnte über einen histologischen GUS-Test nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Chlorophylls unter Anregungslicht und der nur sehr lokalen Expression des Hybridkonstruktes wurde auf eine Detektion der GFP-Fluoreszenz verzichtet.

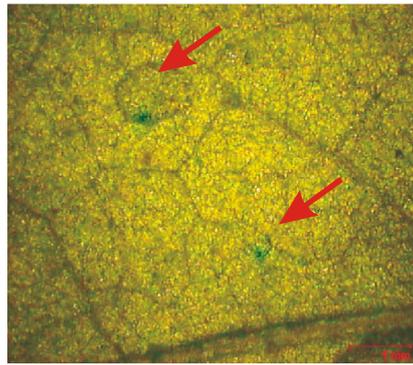


Abbildung 3.19: Histologischer GUS-Test nach transienter Expression von 35S::*gfp::uidA* (pGG) in Zellen eines Tabakblattes zwei Tage nach Beschuss mit einer Partikelkanone.

3.2.3.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis* und Transformationseffizienz

Die stabile Integration in das *Arabidopsis*-Genom erfolgte über eine *Agrobacterium* vermittelte *in planta* Transformation nach Bechtold et al. (1993) (s. Kap. 2.3.5.1). Etabliert wurde die Methode mit dem *Agrobacterium*-Stamm LBA4404, wobei zunächst Vergleichstransformationen zwischen dem einfachen Dippen der *Arabidopsis*-Infloreszenzen in die *Agrobacterium*-Suspension und der vakuumunterstützten Infiltration durchgeführt wurden. Die Abbildung 3.20 zeigt die Transformationseffizienz beider Methoden mit einem pGPTV-Vektor, der die 35S-GFP-Kassette enthielt. Nach der Auffassung des Autors sollten die Kassetten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, keinen Einfluss auf die Transformationseffizienz haben. Die stabile Transformation des GFP-Gens wurde bereits vor den *AtPLA*-Promoter-Reporter-Konstrukten durchgeführt, um die Funktionalität der GFP-Detektion zu prüfen (s. Kap. 3.2.4). Um den Erntezeitraum mit der höchsten Dichte an transgenen Samen herauszufinden, wurde die Ernte in drei Abschnitten vorgenommen. Zum einen zeigte sich, dass die Transformation unterstützt durch die Vakuum-Infiltration effektiver war als das reine Dippen und zum anderen wurde deutlich, dass die Samen mit der höchsten Transformationseffizienz in der Zeit 4 - 8 Tage nach dem Öffnen der ersten Schoten geerntet wurden. In dem gezeigten Experiment fielen die ersten Samen 22 Tage nach der Transformation aus den geöffneten Schoten.

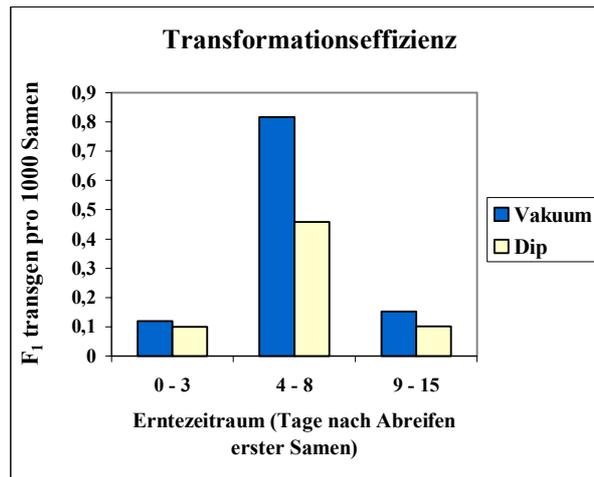


Abbildung 3.20: Vergleich der Dip- und Vakuum-Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit LBA4404 und dem Vektor pGPTV (35S::*gfp*) zu drei Ernteabschnitten.

Durch die spätere Verwendung des Agrobakterien-Stammes GV3101 konnte die Transformationseffizienz auf über 10⁰/₀₀ gesteigert werden.

Die Selektion der transgenen F₁-Pflanzen wurde durch steriles Ausplattieren der Samen auf kanamycinhaltigem MS-Agar bewirkt (s. Kap. 2.3.2.1). Die Abbildung 3.21 zeigt beispielhaft eine Petrischale mit ca. 1000 Samen (= 25 mg) aus einer Transformation mit GV3101. Acht Tage nach der Aussaat sind die transgenen Pflanzen deutlich von der Wildtypsaat zu unterscheiden. Während die nichttransformierten Pflanzen durch das Kanamycin zugrunde gehen, wachsen die transgenen Keimlinge (Pfeile) normal weiter und entwickeln dunkelgrüne Blätter.



Abbildung 3.21: F₁-Saat von *Arabidopsis thaliana* nach der Transformation durch GV3101 (PIVA::*uidA*); 8 Tage nach der Aussaat auf MS-Agar plus 50 µg/ml Kanamycin plus 100 µg/ml Carbenicillin. Pfeile = transgene Pflanzen.

Für jedes Konstrukt wurden mehrere Linien erzeugt, wobei jede Linie (= F₁) auf ein unabhängiges Transformationsereignis zurückzuführen ist und sich somit in der Kopienzahl der T-DNA Insertion sowie in dem Insertionsort von anderen Linien unterscheiden kann. Eine Übersicht der transformierten Konstrukte und der je Konstrukt erzeugten Linien gibt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Promoter-Reporter Kombinationen und die Anzahl transgener Linien nach der Transformation von *Arabidopsis thaliana*.

| | 35S | Promoter I | Promoter IIA | Promoter IVA | Promoter IVC |
|---------|-----|------------|--------------|--------------|--------------|
| GFP | 8 | - | - | - | - |
| GFP-GUS | 12 | 23 | 17 | 17 | 18 |
| GUS | 4 | 23 | 29 | 23 | 24 |

Die F₁-Generation der transgenen Pflanzen wurde im Gewächshaus durch den Einsatz von Aracons (s. Kap. 2.3.1) geselbstet und die Saat jeder Linie (F₂-Generation) für Folgeexperimente verwendet.

Die in der Tabelle 3.3 aufgeführten GFP-GUS-Linien wurden aufgrund der relativ schlechten Detektierbarkeit (s. Kap. 3.2.2.1) in der vorliegenden Arbeit nicht weiter

untersucht. Von den *AtPLA*-Promotoren in Kombination mit dem GUS-Gen wurden die ersten 20 Linien je Konstrukt auf das GUS-Expressionsmuster hin untersucht.

3.2.4 GFP-Expression in *Arabidopsis thaliana*

Die Detektion des smRS-GFP-Reporters war zu Beginn der Arbeit im Labor des Autors nicht etabliert. Um dies zu prüfen wurde das GFP-Gen mit einem starken Promoter (35S) stabil in *Arabidopsis* transformiert. Das Reporter-Hybrid-Konstrukt war zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden und somit wurde auf eine vorhandene Kasette zurückgegriffen. Die Expression des GFP-Gens wurde anhand der Fluoreszenz des Proteins unter Blaulichtanregung detektiert (s. Kap. 2.3.6). Trotz quantitativer Unterschiede zwischen den transgenen Linien war die Fluoreszenz in drei von vier getesteten Linien sehr gut in der Wurzel sichtbar (Abb. 3.22). Gemäß der konstitutiven Transkription durch den 35S-Promoter wurde das GFP auch in den Blättern nachgewiesen, wobei die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls die GFP-Fluoreszenz überlagerte. Durch Subtraktion der Wildtyp-Aufnahme (A) von dem 35S::*gfp*-Bild (B) konnte elektronisch die GFP-Fluoreszenz ohne die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls sichtbar gemacht werden (C).

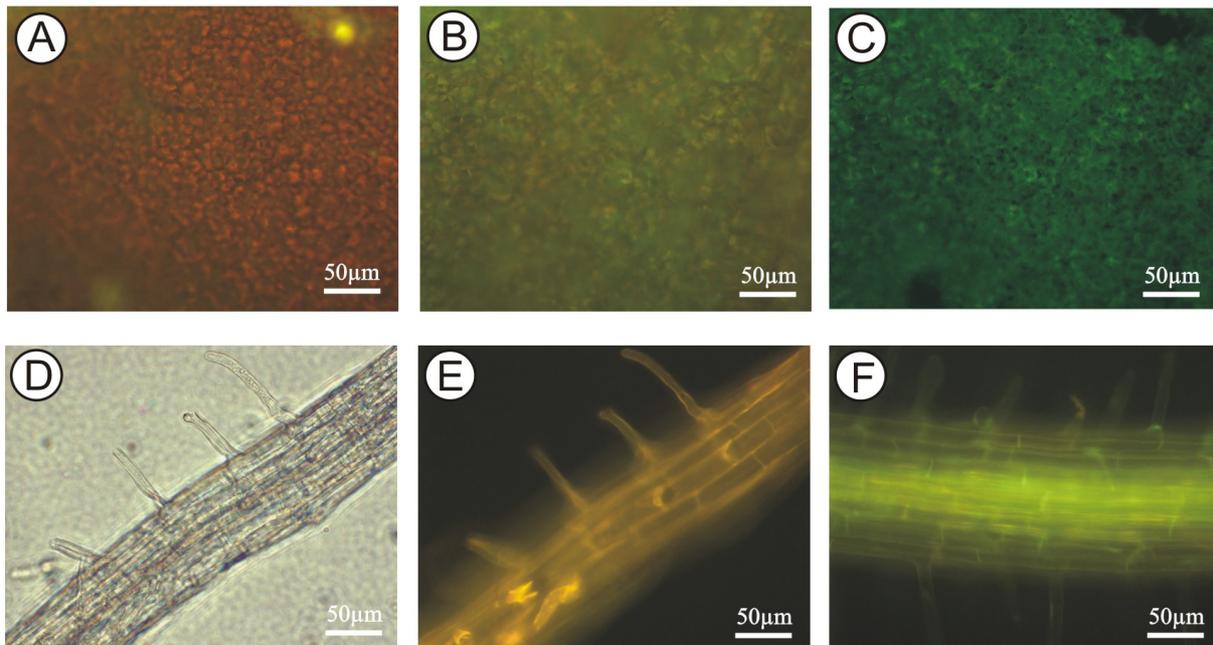


Abbildung 3.22: Wildtyp (WT) und transgene *Arabidopsis* (35S::gfp). A: WT Blatt im Anregungslicht; B: 35S::gfp Blatt im Anregungslicht; C: Subtraktion der Eigenfluoreszenz A von B; D: WT-Wurzel im Breitlicht; E: WT-Wurzel im Anregungslicht; F: 35S::gfp-Wurzel im Anregungslicht.

Somit war die Funktionsfähigkeit der GFP-Detektion nachgeprüft und festgestellt worden, dass die GFP-Fluoreszenz in chlorophylllosen Geweben gut nachweisbar ist, aber auch in den Blättern bei ausreichender Expression möglich ist. Die Idee der *AtPLA*-Promoter-GFP-GUS-Hybridkonstrukte hätte somit sein sollen, zunächst über die GUS-Aktivität die Orte starker Expression zu identifizieren, um dann in Folgeexperimenten gezielt das GFP detektieren zu können. Da mit dem GFP-GUS-Konstrukt keine GFP-Detektion möglich und ebenfalls die GUS-Aktivität beeinträchtigt war, wurde in einem zweiten Satz an Konstrukten nur das leichter zu detektierende *uidA*-Gen in Kombination mit den *AtPLA*-Promotoren hergestellt.

3.2.5 Histologische Untersuchung der *AtPLA*-Promoteraktivitäten und Analyse der Promotersequenzen

Auf der Grundlage der unter 3.1.3 erstellten transgenen *AtPLA*-Promoter-GUS-Pflanzen (F₂) wurden die GUS-Expressionsmuster unter der Kontrolle der Promotoren PI, PIIA, PIVA und PIVC untersucht. Der Nachweis der GUS-Expression und damit der

regulatorischen Aktivität der einzelnen Promotoren erfolgte durch den histologischen GUS-Test (s. Kap. 2.2.14.1). Die Analyse der GUS-Expression umfasst den gesamten Entwicklungszyklus einer Pflanze, vom Samenkorn bis zur adulten und seneszenten Pflanze, sowie die gesamte Pflanze. Da die F₂-Generation nach Mendel für die T-DNA-Insertion aufspaltet (eine Insertion angenommen, 1:2:1) wurden die Samen zunächst auf Selektionsmedium (s. Kap. 2.3.2) *in vitro* ausplattiert, um keine rückgekreuzten Wildtyppflanzen für die GUS-Tests einzusetzen. Verschiedene Linien eines transformierten Konstruktes zeigten, vermutlich aufgrund variierender Kopienzahlen und Insertionsorte, teilweise Unterschiede in der Quantität der GUS-Expression, wobei das Expressionsmuster in der Regel identisch war. Die im Zuge dieses Abschnittes gezeigten Ergebnisse basieren auf mindestens 10 Linien je Promoter::*uidA*-Konstrukt und stellen die Positivergebnisse dar, wohingegen Gewebe ohne Promoteraktivität nur teilweise dokumentiert wurden, um die Unterschiede zwischen den Promotoren hervorzuheben. In GUS-Tests mit Wildtyppflanzen konnte unter keiner der angewendeten Bedingungen eine GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

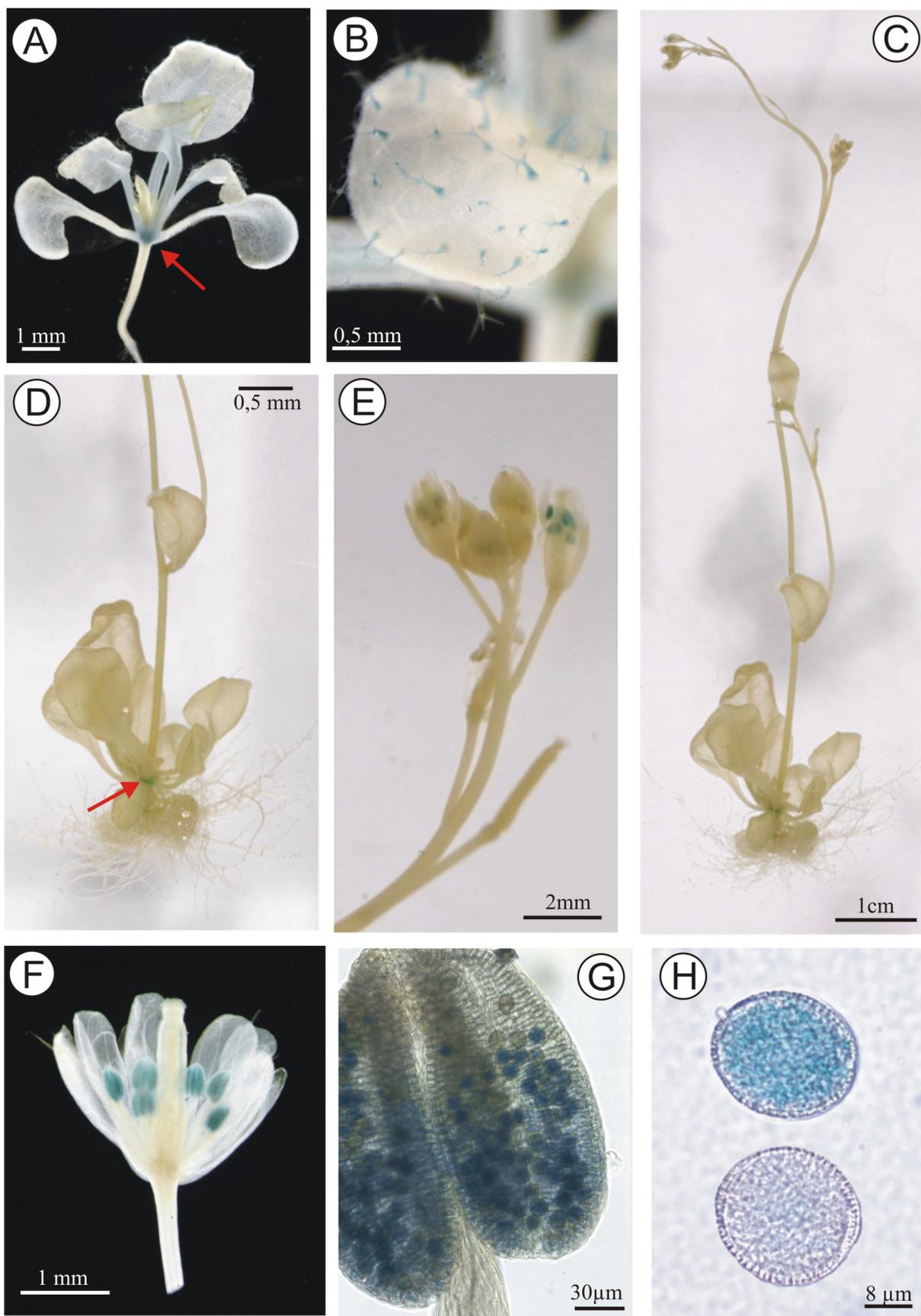
Ergänzt werden die Daten durch Analysen der Nukleotidsequenzen der einzelnen Promotoren sowie deren Vergleich untereinander. Obwohl die *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC*-Gene über ihre Homologien auf Aminosäureebene als eine Genfamilie identifiziert wurden, konnten keine äquivalenten Homologien zwischen den jeweiligen Promotersequenzen identifiziert werden. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen erfolgte mit den Programmen Dialign 2.1 und Genedoc (s. Anhang). In der Tabelle 3.4 sind identische Nukleotide nach einem Vergleich zwischen den einzelnen Promotoren gezeigt. Da homologe Bereiche zwischen den Promotoren am ehesten in der 5'-Region nahe des Transkriptionsstartes zu erwarten sind, wurden nur die ersten 1000 bp relativ zum Translationsstart untereinander verglichen. Die Übereinstimmungen liegen zwischen 9 und 22%, wobei keine zusammenhängenden identischen Bereiche erkennbar waren. Zum Vergleich besitzen zwei nach der selben Methode verglichene Patatin-Promotoren (B24 und B33) eine Identität von 54%, mit einer Übereinstimmung von 90% zwischen den ersten 275 bp relativ zum Translationsstart.

3.2.5.1 Der *AtPLA I*-Promoter PI

3.2.5.1.1 Entwicklungsabhängige Expression von PI::*uidA*

Transgene PI::*uidA*-*Arabidopsis*-Pflanzen wurden über Nacht (ca. 16-22 Std.) in 1 mM X-Gluc Färbelösung inkubiert, um die β -Glucuronidase-Aktivität anhand der Blaufärbung sichtbar zu machen. Mit dem Heranwachsen des Keimlings trat eine schwache, aber deutlich sichtbare GUS-Aktivität an der Sprossbasis auf (Abb. 3.23, A), die sich schwächer werdend in die Leitbündel ausdehnte und bis zur adulten Pflanze erhalten blieb (Abb. 3.23, D). Auf den Blättern sind die Trichome sichtbar, in denen der PI ebenfalls aktiv war (Abb. 3.23, B). Neben den dargestellten Bereichen trat über die gesamte Entwicklung keine PI-Aktivität in den vegetativen Organen auf (Abb. 3.23, C-E). Die stärkste GUS-Aktivität zeigten die sich entwickelnden und reifen Pollen (Abb. 3.23, F-H). Neben den Pollen konnten zum Zeitpunkt der sich entwickelnden Blüte auch im Gewebe der Antheren (3.23, G) und im Konnektiv (3.23, G) eine Blaufärbung beobachtet werden. Pollen von heterozygoten F₂-Pflanzen spalten in Wildtyp und transgenen Pollen auf (Abb. 3.23, H). In der Abbildung 3.23 H ist sichtbar, dass sich die GUS-Aktivität in den Pollen und nicht in der Pollenkornwand befindet.

Abbildung 3.23: Histologischer GUS-Test an transgenen PI::*uidA*-Pflanzen. **A:** 14 Tage nach Aussaat; **B:** Blatt mit Trichomen; **C:** 27 Tage alte Pflanze; **D:** Ausschnitt aus A mit der Blattrosette, Pfeil zeigt GUS-Färbung; **E:** Blütenstand mit gefärbten Pollensäcken; **F:** künstlich geöffnete Blüte mit blauen Pollensäcken (Antheren); **G:** Anthere mit Pollen; **H:** Pollenkörner einer F₂-Pflanze, oben transgen und unten Wildtyp.



Mit den transgenen PI::*uidA*-Pflanzen wurden, wie in 3.2.6 dargestellt, eine Reihe an Induktionsexperimenten durchgeführt, ohne aber eine Änderung in der Promoteraktivität zu beobachten.

3.2.5.1.2 Sequenzanalyse von PI

Eine Analyse der Nukleotidsequenz des *AtPLA I*-Promoters (PI) ergab eine Reihe von regulatorischen Elementen und deren Kombination, die ursprünglich in Promoterregionen von überwiegend pollenspezifisch exprimierten Genen identifiziert wurden (Abb. 3.24). In der Tomate sind die LAT52-, LAT56- und LAT59-Gene in den Pollen und teilweise in den Antheren hochreguliert (Twell et al., 1991). Analysen der LAT52- und LAT56-Promotoren führten zur Identifizierung des PBI-Motivs (TGTGGTT), das für eine erhöhte Promoteraktivität in den Pollen verantwortlich ist. Nach einem Sequenzvergleich (Genedoc) von PI mit dem LAT52-Promoter wurde ein fast identisches Motiv (sechs von sieben Nukleotiden) im PI-Promoter gefunden, das im Alignment direkt komplementär zu einem PBI-Motiv im distalen Bereich des LAT52-Promoters ist. Weiterhin folgt 22 bp abwärts im PI-Promoter ein AGAAA Motiv, welches in Kombination mit dem PB-Kern-Motiv (GTGG) im proximalen Bereich des LAT52-Promoters eine regulatorische Einheit bildet (Bate and Twell, 1998). Eine zweite Kombination von cis-Elementen im PI besteht aus dem fast vollständigen PBII-Motiv (CAACCCACCA) des LAT52-Promoters und erneut einem benachbarten AGAAA Motiv. Auch bei dieser Kombination kommt das PBII-Motiv im PI an der selben Stelle wie im LAT52-Promoter zu liegen, wenn die beiden Sequenzen in einem Alignment miteinander verglichen werden. Wie von Bate und Twell (1998) anhand von Promoter-GUS-Pflanzen gezeigt wurde, reicht die Mutation eines AGAAA Elementes im LAT52-Promoter aus, um die pollenspezifische GUS-Aktivität zu verringern. In der Sequenz des *AtPLA I*-Promoters existieren zu den bereits beschriebenen Elementen fünf weitere AGAAA Motive, die alleine oder in Kombination mit anderen cis-Elementen an den regulatorischen Eigenschaften des PI beteiligt sein könnten.

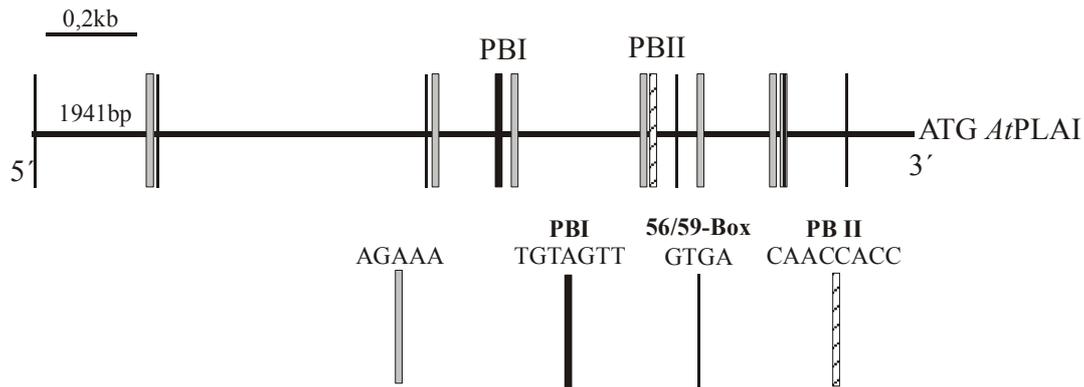


Abbildung 3.24: PI (schematisch) mit möglichen regulatorischen Elementen. Die Elemente sind als vertikale Balken in ihren relativen Positionen zum Translationsstart im Promoter dargestellt. Die Nukleotidsequenzen der Elemente befinden sich den Balken zugeordnet unterhalb des Promoters.

Nach einem Vergleich der LAT56/LAT59-Promotoren identifizierten Twell et al. (1991) die 56/59-Box mit der Sequenz GTGA als Kernmotiv. Mutationen dieses Motivs führten zu einer verminderten pollenspezifischen Promoteraktivität, ebenfalls demonstriert von Rogers et al. (2001) für den Promoter des pollenspezifischen *g10*-Gens aus Tabak. In der PI-Sequenz existiert die Kernsequenz der 56/59-Box sechs mal in plus und 19 mal in der minus Orientierung, aufgrund des mit 4 Nukleotiden aber sehr kurzen Motivs ist es schwierig, alle Elemente als regulatorische Komponenten zu interpretieren. Neben den organspezifischen Elementen konnte keine TATA-Box im 3'-Bereich der PI-Sequenz gefunden werden.

Zusammengefasst reflektieren die auf Nukleotidebene identifizierten regulatorischen Elemente die GUS-Expression der PI::*uidA*-Pflanzen in den Pollen und Antheren.

3.2.5.2 Der *AtPLA IIA*-Promoter PIIA

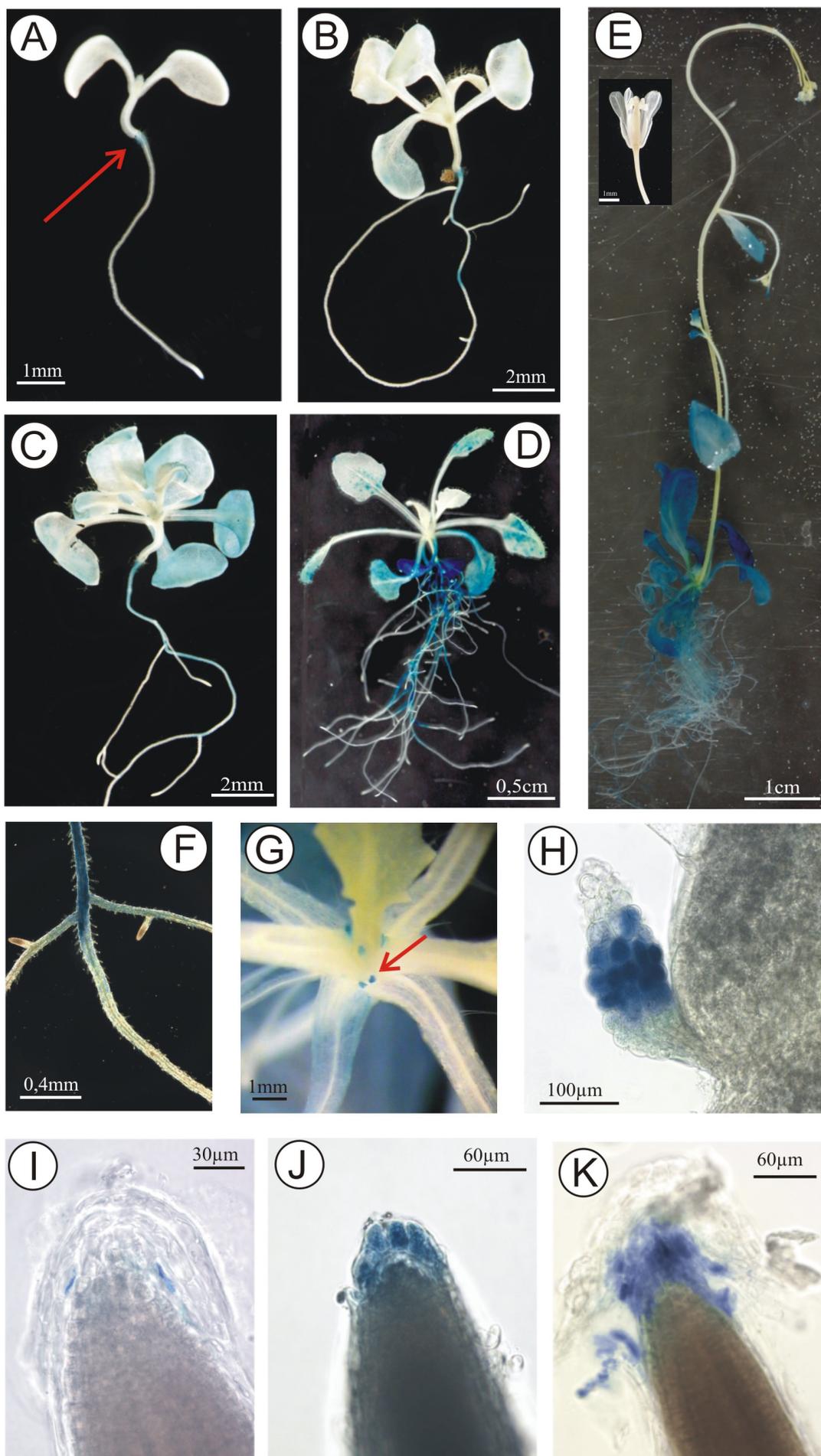
3.2.5.2.1 Entwicklungsabhängige Expression von PIIA::*uidA*

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation des Gens *AtPLA IIA* wurden die ersten 1997 Nukleotide im 5'-Bereich des Start-ATG's vor das β -Glucuronidase-Gen kloniert. Im histologischen GUS-Test wurde in Abhängigkeit von der verwendeten transgenen PIIA::*uidA*-Linie nach 60 – 90 Min. eine erste Blaufärbung sichtbar. Die durchschnittliche Färbedauer zur Bestimmung der qualitativen GUS-Expression lag bei 1:20 Stunden für

Keimlinge und bei 5 Std. für adulte Pflanzen mit Infloreszenz. Längere Inkubationen in der Färbelösung (z.B. über Nacht) hatten keinen Einfluss auf die Qualität der GUS-Expression.

In der Abbildung 3.25 ist das GUS-Expressionsmuster der PIIA::*uidA*-Pflanzen dargestellt. Die erste GUS-Färbung trat bei Keimlingen 6 Tage nach der Aussaat im oberen Bereich der Primärwurzel auf (Abb. 3.25, A). Ab dem 11. Tag fingen die älteren Blätter bzw. die Cotyledonen an sich blau zu färben (Abb. 3.25, B). Auch zu späteren Stadien wurde die stärkste GUS-Aktivität in den älteren Blättern beobachtet, was auf einer höheren Aktivität des PII-Promoters in älteren Blättern basieren könnte, oder durch die Akkumulation des sehr stabilen β -Glucuronidase-Proteins zustande kam (Jefferson et al., 1987). Um den 12. Tag herum entwickelten sich in den Blattachsen die Stipeln, die von Anbeginn eine hohe GUS-Aktivität zeigten (Abb. 3.25, G, H). Die Stipeln wachsen bei den Rosettenblättern nicht aus, sondern bleiben, wie in der Abbildung 3.25 H dargestellt, bis zur adulten Pflanze bestehen. Die Nebenblätter an der Infloreszenz besaßen ebenfalls GUS-Aktivität und ähnelten damit den normalen Rosettenblättern (Abb. 3.25, E). In der adulten Pflanze (26 Tage) war der PIIA-Promoter somit neben den rosettebürtigen Stipeln auch in den Hauptwurzeln und den Blättern aktiv. Im Gegensatz zu PI::*uidA* konnte in der Blüte keine Aktivität beobachtet werden (Abb. 3.25, E). Neben der GUS-Aktivität im oberen Bereich der Hauptwurzel erschien am 12. Tag nach der Aussaat in zwei seitlichen Zellen der Wurzelspitze eine Blaufärbung (Abb. 3.25 I). In den folgenden Tagen weitete sich die GUS-Aktivität über die gesamte Kalyptra aus, bis zum Ablösen einzelner blau gefärbter Zellen von der Spitze (Abb. 3.25, J, K). Dies betraf zunächst nur die Primärwurzel, erst später entwickelten auch auswachsende Seitenwurzeln blau gefärbte Zellen in der Wurzelspitze.

Abbildung 3.25: Histologischer GUS-Test an transgenen PIIA::*uidA* Pflanzen. **A:** 6 Tage alter Keimling; **B:** 11 Tage nach Aussaat; **C:** 14 Tage nach Aussaat; **D:** 18 Tage nach Aussaat; **E:** 26 Tage nach Aussaat; **F:** Primärwurzel mit Seitenwurzeln; **G:** Stipel im Ansatz von Rosettenblättern; **H:** Stipel; **I:** Wurzelspitze von Primärwurzel nach 12 Tagen; **J:** Wurzelspitze von Primärwurzel nach 14 Tagen; **K:** Wurzelspitze von Primärwurzel nach 18 Tagen.



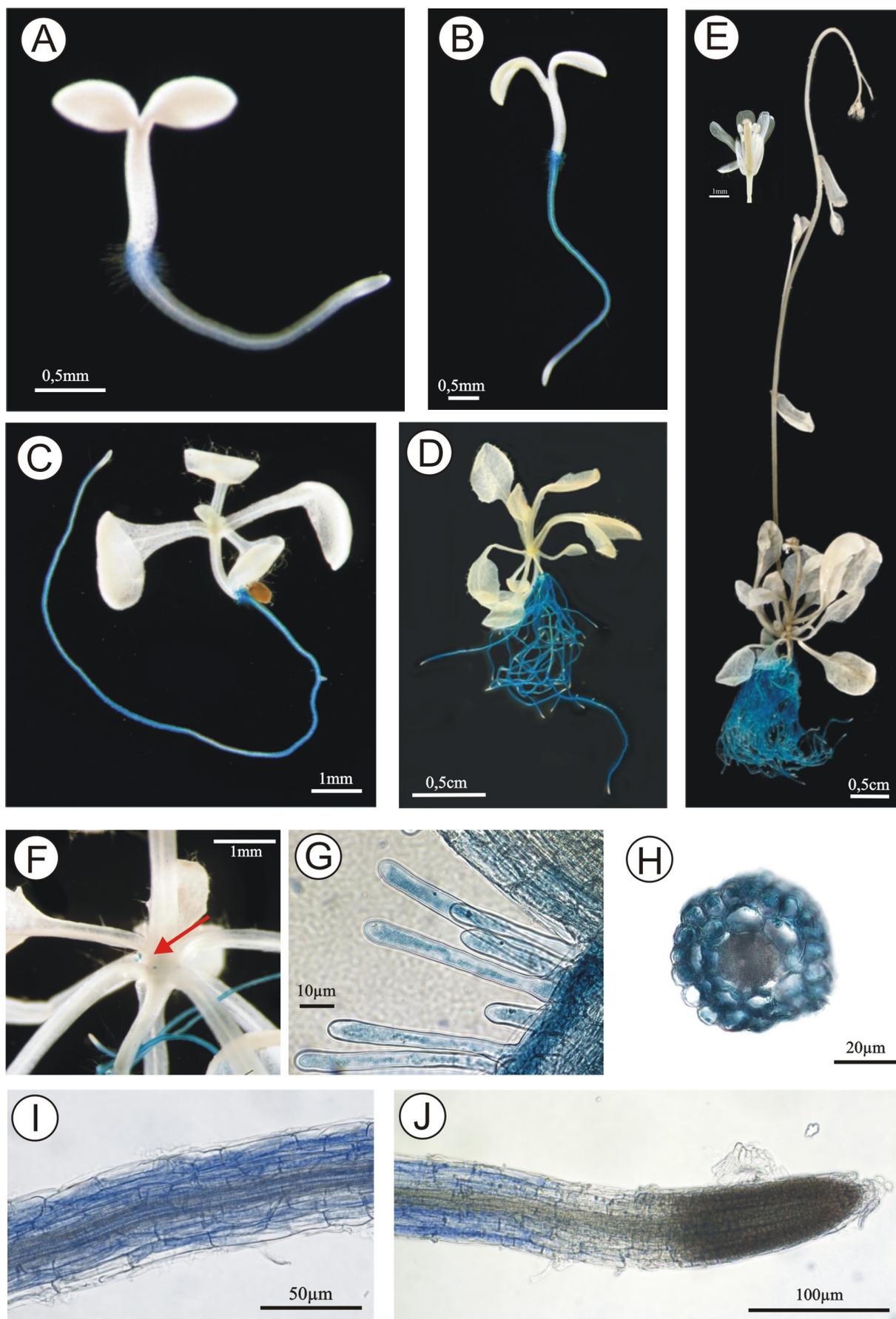
Eine ausführliche Darstellung der PII Sequenzanalyse erfolgt unter 3.2.6.1, da dieser Promoter auf Signalstoffe reagierte.

3.2.5.3 Der *AtPLA IVA*-Promoter PIVA

3.2.5.3.1 Entwicklungsabhängige Expression von PIVA::*uidA*

Die verwendete Promotersequenz PIVA umfasst 1924 bp und reguliert die GUS-Expression in den transgenen PIVA::*uidA*-Pflanzen. Bereits nach 20 Min. unter histologischen GUS-Test-Bedingungen wurde die Aktivität der β -Glucuronidase durch die Blaufärbung sichtbar. Dabei beschränkte sich die GUS-Expression auf die Wurzeln und wie bei den PII::*uidA*-Pflanzen auf die basalen Stipel. Der PIVA-Promoter war von der Keimung bis zur adulten Pflanze sehr stark in der Wurzel aktiv (Abb. 3.26). Wie in Abbildung 3.26 A zu sehen, begann die PI-Aktivität drei Tage nach der Aussaat am Wurzelansatz unter dem Hypocotyl. Bereits einen Tag später war die gesamte Wurzel, bis auf die Wurzelspitze, durch die GUS-Aktivität blau gefärbt (Abb. 3.26, B). Im Laufe der Entwicklung blieb die PIVA-Aktivität auf die Wurzeln beschränkt (Abb. 3.26, C-E) mit Ausnahme der Stipel, die in der GUS-Expression den PIIA::*uidA*-Pflanzen glichen (Abb. 3.26, F). Die Blüten besaßen keine GUS-Aktivität. In der Wurzel erstreckte sich die GUS-Expression vom Wurzelansatz bis kurz hinter die Wurzelspitze (Abb. 3.26, I, J) und schloss dabei auch die Wurzelhaare mit ein (Abb. 3.26, G). Durch Handquerschnitte der Wurzel wurde versucht, Aufschluss über die gefärbten Gewebearten in der Wurzel zu erlangen. Nach der Abbildung 3.26 H waren die Cortex- und die Epidermiszellen die Orte der GUS-Expression und das Leitbündel war nicht oder sehr gering aktiv.

Abbildung 3.26: Histologischer GUS-Test von PIVA::*uidA* Pflanzen. **A:** 3 Tage nach Aussaat; **B:** 4 Tage nach Aussaat; **C:** 10 Tage nach Aussaat; **D:** 22 Tage nach Aussaat; **E:** 35 Tage nach Aussaat; **F:** Stipel an der Basis von Rosettenblättern, 14 Tage nach Aussaat; **G:** Wurzelhaare; **H:** Wurzelquerschnitt; **I:** Wurzel; **J:** Wurzelspitze.



3.2.5.3.2 Sequenzanalyse von PIVA

Die Analyse der Nukleotidsequenz von PIVA ergab neben einer potentiellen TATA-Box eine Reihe von weiteren möglichen regulatorischen Motiven, die als transkriptionsverstärkende Elemente (Enhancer) beschrieben sind (Tab. 3.5). Enhancer stellen, wie andere cis-Elemente auch, Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dar und erhöhen über Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. mit der RNA-Polymerase konstitutiv die Transkriptionsrate des folgenden Gens. Sie vermitteln keine Gewebespezifität, können aber mit entsprechenden Transkriptionsfaktoren interagieren.

Die angeführten Enhancer-Elemente des PIVA Promoters könnten somit für die starke Aktivität verantwortlich sein, ohne aber die organspezifische Transkription zu bedingen.

Tabelle 3.5: Sequenzmotive in PIVA und deren Herkunft. Literatur: 1: Elmayan und Tepfer (1995); 2: Ishiguro and Nakamura (1992); 3: Hamilton et al. (1998); 4: Kagaya et al. (1999); 5: Donald und Cashmore (1990); 6: Weiher et al. (1983); 7: Menkens et al. (1995); 8: Shirsat et al. (1989).

| cis-Elemente | PIVA | beschriebener Promoter | Kontext | Organismus, Gen | Literatur |
|------------------|---|---|------------------------------|--|-----------|
| | Position rel. zum Translations- start, (Orientierung) | Position rel. zum Transkriptions- (Translations-) start, (Orientierung) | | | |
| TTTATATA | 84, (p) | | TATA Box | | |
| ATATT | 128, (p) 299, (p) 619, (p) 757, (p) 982, (p) 1031, (p) 321, (p) | 265 (318) Tandem, (p) 417 (470), (p) 528 (581), (p) 621 (674), (p) 643 (696), (p) | wurzelspezifisch | <i>Agrobacterium rhizogenes</i> rol D | 1 |
| ähnliches Tandem | | | | | |
| TACTATT | 673, (p) | 323 (400), (p) | TF-Bindungsstelle, Wurzel | Süßkartoffel Sporamin, beta-Amylase | 2 |
| AGGTCA | 72, (m) | 107, (p) | Q-Element, Enhancer | Mais, ZM13 | 3 |
| CAACA + CCTG | 1256 (9N) 1241, (p) | CAACA (2-8N) caCCTG * | TF-Bindungsstelle | <i>Arabidopsis</i> , RAV1 | 4 |
| AATCAA | 384, (p) 375, (p) | 123 (151), (p) 393 (421), (p) | Enhancer | <i>Arabidopsis</i> , rbcS-1A | 5 |
| GTGGWWHG | 414, (p) | 121, (p) | Enhancer | SV40 35S | 6 |
| CACGTG | 613, (p) 869, (p) | | G-box, TF Bindungsstelle | <i>Arabidopsis</i> und andere | 7 |
| TGAAACT | 630, (p) | 610 (644), (p) | Enhancer | Erbse, Legumin A | 8 |

p = plus Strang; m = minus Strang; TF = Transkriptionsfaktor

Fußnote *: identifiziert über *binding site selection assay*

Neben den quantitativen Enhancer-Elementen wurde nur ein Motiv gefunden, welches als wurzelspezifisches Element beschrieben ist. Elmayan und Tepfer (1995) identifizierten durch Vergleich zweier Promotoren der vorwiegend in der Wurzel exprimierten Gene *rolD* aus *Agrobacterium rhizogenes* und einer Peroxidase aus Weizen das ATATT-Motiv. In den ersten 1013 bp relativ zum Translationsstart des PIVA-Promoters kommt dieses Motiv sechsmal vor (Abb. 3.27), wobei nach einem direkten Vergleich mit dem *rolD*-Promoter der komplementäre PIVA Bereich in 9 von 18 Nukleotiden mit der publizierten ATATT Region übereinstimmt.

Ein weiteres Motiv (TACTATT) wurde an der Position 673 relativ zum Translationsstart identifiziert. Es ist eine Konsensussequenz aus Bindungsstellen des Kernproteins SP8BF (Ishiguro und Nakamura, 1992), die in den Promoterregionen von drei in der Wurzel der Süßkartoffel exprimierten Genen vorkommen. Inwieweit die Bindung von SP8BF einen Einfluss auf die transkriptionelle Genregulation hat, wurde von den Autoren nicht behandelt.

Ebenfalls unklar ist die Funktion des DNA-Bindeproteins RAV1 aus *Arabidopsis* (Kagaja et al., 1999), das über eine zweiteilige Erkennungssequenz spezifisch an die DNA bindet und dessen Bindemotiv im PIVA-Promoter 1256 bp vor dem Translationsstart liegt. Möglichen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des *AtPLA IVA*-Gens könnten auch die beiden identifizierten G-Box-Motive (Tab. 3.5) haben. Die G-Box wird von bZIP-Proteinen erkannt und ist in Grundfunktionen sowie in der Reaktionsfähigkeit auf Signale (z.B. Licht, Hormone) von verschiedenen Promotoren involviert (Menkens et al., 1995).

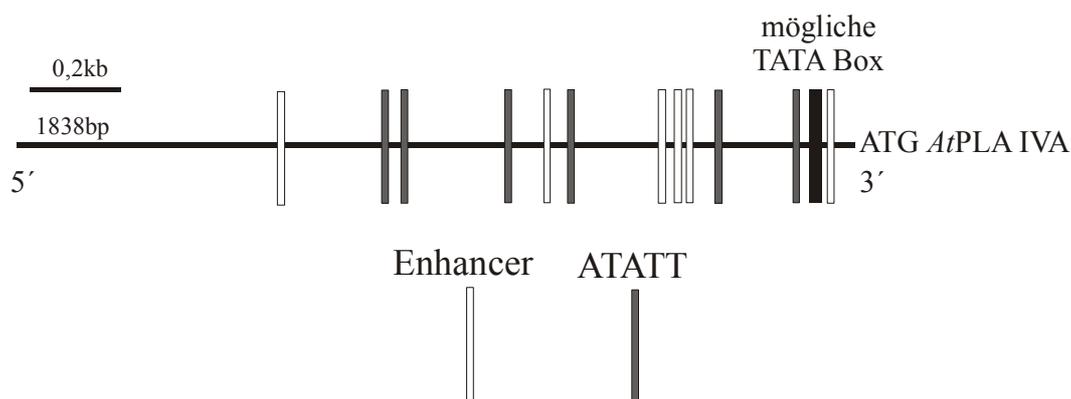


Abbildung 3.27: PIVA (schematisch) mit möglichen regulatorischen Elementen. Die Elemente sind als vertikale Balken in ihren relativen Positionen zum Translationsstart im Promoter dargestellt. Verschiedene verstärkende Motive sind zu einem Balken zusammengefasst (Enhancer); ATATT = wurzelspezifisches Element (s. Text).

Um Sequenzmotive zu identifizieren, die die hohe Wurzelspezifität des Promoters ausmachen könnten, wurden die ersten 1088 bp ab dem Start-ATG der PIVA-Sequenz mit äquivalenten Promoterbereichen von Genen, die überwiegend in der Wurzel exprimiert werden, verglichen. Die deutlichsten Übereinstimmungen konnten im Vergleich des PIVA mit der Promotersequenz des *Pyk10*-Gens, einer wurzel- und hypokotylspezifischen Myrosinase aus *Arabidopsis*, identifiziert werden. Nach dem Vergleich beider Sequenzen ergaben sich 10 Segmente, in denen ein Großteil der 10 bis 30 Nukleotide übereinstimmten. In der Abbildung 3.28 sind drei Motive dargestellt, die mit unterschiedlichem Grad an Homologie auch in anderen vorwiegend wurzelspezifischen Promotoren gefunden wurden. Alle Sequenzen der Abbildung 3.13 befinden sich in 5'-3' Richtung und die Zahlen geben die jeweilige Position relativ zum Transkriptionsstart (Translationsstart) wieder.

Motiv A

| | | | |
|----------|-----------|---|-----------|
| PIVA : | (864) | GAAGACTTGAAG TTGATATGATTACCAATATATC ATCAAA | (823) |
| pyk10 : | (979) | GAAACAT GTGATATGGATTA AGGCG TATCCAGTATCCAC | (939) |
| TobRB7 : | 652 (729) | TGATTTCGTTCT TTAATATGTCCTAC ACAATGTGAATTTGAATTAGTTTGGT | 601 (678) |
| Pmst1 : | (308) | TACATTTGACT TTAGATTGGATTA AGCATGCAACAAATTA | (266) |

Motiv B

| | | | |
|----------|-------|--|-------|
| PIVA : | (744) | TTTGTTG CTTTGATT CGCTAATTAACCC AAAAATTTGAAA ATGACTC | (697) |
| pyk10 : | (640) | TCCATT CTTTCATT TATCGGAGTATGTT AAAAATTTGAAA CAAATACAGACA | (578) |
| ARSK1 : | (225) | AAGCAA ACTTTT TGTATAATA ATAAAATTTGAAA ACTCAAAGGTCGGTCAG | (173) |
| ARSK1 : | (164) | GACACA CAACTACT TATAAATTAGAGG ACTTTGAA CAAGTAGGTTAA | (97) |
| Hrgpnt : | (347) | TAGACAAATAG TTTAGCTGTCCATTGA ATTT TTTGAACA AAACAACAATATT | (281) |

Motiv C

| | | | |
|---------|-------|--|-------|
| PIVA : | (651) | TGCAGAGATACCACAGTTTTT CTGAAA ACTTCAATAT CCGCTGACAAA ACT | (599) |
| pyk10 : | (188) | CGATATCTTGATATATACAAA ATGAAA ACTTAAAA ATGATTAATATGGCCT | (136) |
| ARSK1 : | (289) | ACAATATAAATATATCCACCA AAAAATAACTTCAAC ATTTTATACA ACTAAT | (237) |
| PVNR1 : | (374) | AAGAATTGATTACATGTACAG ATTACTTAAAG ATATGGAAA AG | (330) |
| ARSK1 : | (389) | AAAAGAAA CAACTTGC GTATT TTTCAATAT TATTGTGAGGATTAAT | (341) |

Abbildung 3.28: Homologe Bereiche zwischen Promotersequenzen in der Wurzel exprimierter Gene mit den Abständen relativ zum Transkriptions- (Translations-) start. Über alle Sequenzen identische Nukleotide sind farbig und fett, teilweise identische Nukleotide sind farbig. *pyk10* aus *Arabidopsis* (Nitz et al., 2001), *TobRB7* aus Tomate (Yamamoto et al., 1991), *Pmst1* aus Erbse (Evans et al., 1990), *ARSK1* aus *Arabidopsis* (Hwang und Goodman, 1995), *Hrgpnt* aus Tabak (Keller und Lamb, 1989), *PVNR1* aus Bohne (Hoff et al., 1991).

Das Motiv B enthält fast und das Motiv C vollständig die Sequenz TGAAA**ACT**, beschrieben als ein möglicher Enhancer des Legumin Gens *legA* aus der Erbse (Shirsat et al., 1989). Aufschluss über die regulative Relevanz der identifizierten Sequenzmotive kann aber letztendlich nur eine Promoteranalyse in der Form sukzessiver Nukleotidmutationen der Promotersequenz ergeben.

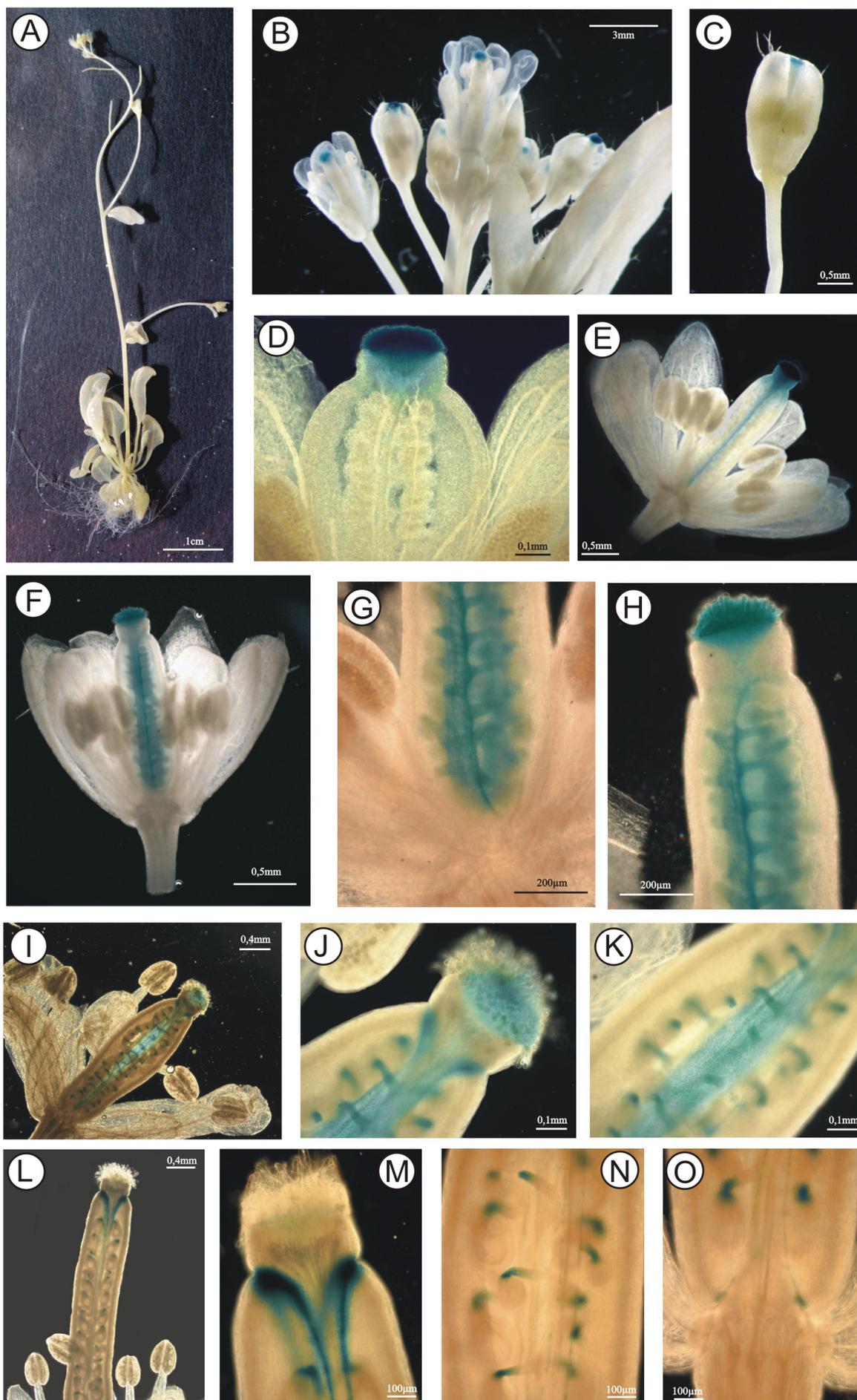
Neben den beschriebenen Enhancer-Elementen enthält PIVA auch Sequenzen die ähnlich oder identisch sind mit regulierenden Motiven aus auxin-induzierbaren Promotoren wie dem GH3-Promoter (Liu et al., 1994) und dem *SAUR 15A*-Promoter (Xu et al., 1997) aus der Sojabohne. Unter den durchgeführten Versuchsbedingungen konnte jedoch bisher keine auxin-abhängige Induktion von PIVA beobachtet werden.

3.2.5.4 Der *AtPLA IVC*-Promoter PIVC

3.2.5.4.1 Entwicklungsabhängige Expression von PIVC::*uidA*

Transgene *Arabidopsis* Pflanzen mit der β -Glucuronidase unter der Kontrolle des PIVC-Promoters zeigten mit Ausnahme der Blüte vom Keimling bis zur adulten Pflanze keine GUS-Aktivität (Abb. 3.29, A). Der histologische GUS-Test erfolgte über Nacht (ca. 16 Std.) und offenbarte eine auf das Pistill begrenzte GUS-Expression (Abb. 3.29, B-K), die sich in Abhängigkeit der Blütenentwicklung änderte. In der noch geschlossenen Blüte beginnt die GUS-Färbung in der Narbe (Stigma) (Abb. 3.29, B-D) und setzt sich noch vor dem Freilassen der Pollen (Anthesis) über den Griffel in den Fruchtknoten fort (Abb. 3.29, E). Innerhalb des Fruchtknotens verläuft die GUS-Färbung entlang der Placenta und in zunehmendem Maße in den Funiceln (Abb. 3.29, F-K), aber nicht in den Samenanlagen selbst. Mit beginnender Welke der Blüte geht die PIVC-Aktivität in der Narbe und der Placenta zurück und in der entwickelnden Schote sind die Funiceln (Abb. 3.29, N) und zwei Punkte an der Schotenbasis (Abb. 3.29, O) sowie ein „Kragen“ am oberen Ende des Fruchtknotens (Abb. 3.29, M) durch die GUS-Aktivität gefärbt. In der reifenden Schote geht schließlich die GUS-Aktivität gänzlich verloren.

Abbildung 3.29: Histologischer GUS-Test von PIVC::*uidA*-Pflanzen. **A:** 27 Tage nach Aussaat; **B:** Blütenstand; **C:** einzelne Blüte; **D:** künstlich geöffnete Blüte mit gefärbter Narbe; **E:** künstlich geöffnete Blüte, zeitlich nach D; **F:** künstlich geöffnete Blüte, zeitlich nach E; **G:** Detail unteres Pistill aus F; **H:** Detail oberes Pistill aus F; **I:** Geöffnete Blüte; **J:** Detail oberes Pistill aus I; **K:** Detail mittleres Pistill aus I; **L:** Welke Blüte mit auswachsender Schote; **M:** Detail obere Schote aus L; **N:** Detail mittlere Schote aus L; **O:** Detail Schotenansatz.



Eine ausführliche Analyse der Nukleotidsequenz von PIVC erfolgt unter 3.2.6.2, da diese im Zusammenhang mit der Induzierbarkeit des Promoters steht.

3.2.6 Induktion der Promotoren

Um weitere Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation der vier *AtPLA*-Gene zu bekommen, wurde untersucht, wie sich die Promoteraktivitäten unter Einfluss verschiedener Behandlungen ändern. Ausgangsmaterial für die Untersuchungen waren erneut die in Kap. 3.1.2.2 erstellten Promoter-GUS-Pflanzen (F_2), die *in vitro* auf Selektionsmedium angezogen und als 12 Tage alte Keimlinge für die Tests eingesetzt wurden. Die Behandlungen beziehen sich auf die Applikation von biologisch aktiven Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen sowie die transgenen Pflanzen speziellen Umweltbedingungen wie Kälte, Trockenstress und Nährstoffmangel auszusetzen. Die Durchführung der Experimente wurde unter 2.3.4 dargelegt und eine Liste der angewendeten Chemikalien mit den Ergebnissen der einzelnen Promoter-Konstrukte ist in der Tabelle 3.6 gezeigt. Die Auswahl der in Tabelle 3.6 getesteten Substanzen umfasst pflanzliche Hormone, die an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt sind, Substanzen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind (z.B. SA) oder diese auslösen (Elicitoren) und hohe Konzentrationen an NaCl zur Erzeugung von Salzstress. Glukose wurde ebenfalls getestet, um einen eventuellen Effekt als Bestandteil des MS-Mediums, wie es in dieser Arbeit verwendet wird, zu testen. Die Induktionszeit aller Substanzen im *in vitro*-Test lag bei 48 Std. Es war nicht das Ziel der Induktionsexperimente eine Aussage über die Aktivierungs-Kinetik der Promotoren zu erlangen, daher wurde eine Induktionsdauer von 48 Std. durchgeführt. Neben den applizierten Substanzen wurden die transgenen Pflanzen auch durch Kälte, Trockenheit und Nährstoffmangel gestresst, um eine Änderung der Promoteraktivität zu untersuchen.

Tabelle 3.6: Bonitierung der Induktionstest mit verschiedenen Chemikalien (48 Std.) an den transgenen Promoter-GUS-Pflanzen. - = keine Aktivierung, + = Aktivierung im histologischen GUS-Test.

| Chemikalie | PI:: <i>uidA</i> | PIIA:: <i>uidA</i> | PIVA:: <i>uidA</i> | PIVC:: <i>uidA</i> |
|------------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 2,4-D ¹ | - | - | - | - |
| Abscisinsäure | - | - | - | + |
| ACC ² | - | + | - | - |
| BAP ³ | - | - | - | - |
| Bion | - | + | - | - |
| Cellulase autoklaviert | - | - | - | - |
| Chitin | - | - | - | - |
| Gibberilinsäure | - | - | - | - |
| Glukose | - | - | - | - |
| Indolessigsäure | - | - | - | - |
| Jasmonat (JA) | - | -/+ | - | - |
| Laminarin | - | - | - | - |
| Methyl-Jasmonat | - | - | - | - |
| Methyl-Viologen | - | - | - | - |
| NaCl | - | - | - | - |
| Salicylsäure | - | + | - | - |

1: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

2: 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat

3 : 6-Benzylaminopurin

Die Bonitierung der Induktionsexperimente erfolgte zunächst visuell über die Stärke der GUS-Färbung und später auch teilweise durch Messen der GUS-Aktivität am Fluorimeter (s. Kap. 2.2.14.2), um eine klarere quantitative Basis zu erhalten. Pflanzen mit den P::*uidA*- und PIVA::*uidA*-Konstrukten ließen sich durch keine der angeführten Behandlungen induzieren oder in ihrer Aktivität mindern. Dies bezieht sich aber auf die angelegten Versuchsbedingungen und schließt nicht aus, dass unter modifizierten Bedingungen, z.B. Verwendung eines älteren physiologischen Stadiums oder anderer Konzentrationen der Induktoren, eine Reaktion des Promoters auf den Reiz stattfinden kann. Die GUS-Expression unter der Kontrolle der PIIA- und PIVC-Promotoren ließ sich, wie im Folgenden dargestellt, durch verschiedene Behandlungen induzieren.

3.2.6.1 PIIA reagiert auf Signale der Pathogenabwehr, Verwundung und Nährstoffmangel

3.2.6.1.1 Induktionsanalyse von PIIA mit dem histologischen GUS-Test

In *Arabidopsis* Pflanzen mit dem *uidA*-Gen unter der Kontrolle des PIIA-Promoters ließ sich die GUS-Expression durch Signale der Pathogenabwehr und Verwundung sowie durch direkte Verwundung und Nährstoffmangel induzieren. Mit Ausnahme der Verwundung wurden die Tests in erster Linie mit 12 Tage alten *in vitro*-Pflanzen und teilweise an adulten Gewächshauspflanzen durchgeführt. Die Verwundung erfolgte durch Ritzen oder Stechen von Blättern mit einer Nadel an 4-5 Wochen alten Pflanzen im Gewächshaus. Nach 24 Std. wurden die Blätter abgeschnitten und in 1 mM X-Gluc Substratlösung inkubiert. Durch die Verwundung wurde die GUS-Expression auf zwei Weisen hochreguliert. Das direkt an die Verwundung grenzende Gewebe zeigt die stärkste GUS-Aktivität und bildet einen Ring um die Verletzung (Abb. 3.30, B,C). Eine etwas abgeschwächte Reaktion geht von der Verwundung konzentrisch in die Blattspreite hinein und fließt mit dem Reaktionsmuster weiterer beschädigter Stellen zusammen.

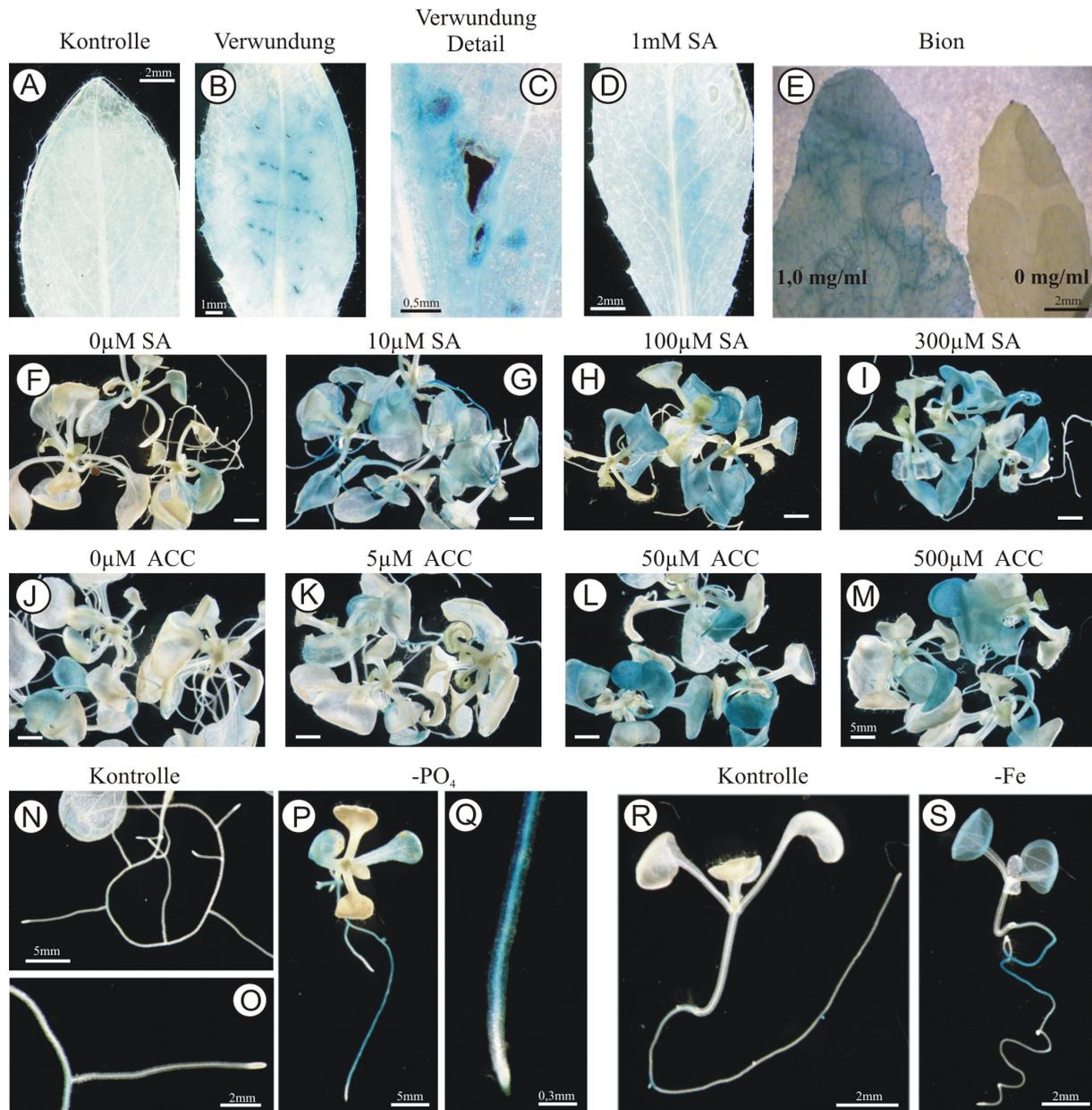


Abbildung 3.30: Histologischer GUS-Test nach Induktion der Promoter-GUS-Aktivität von PIIA::uidA-Pflanzen. **A:** Kontrolle (separate Pflanze) zu den Behandlungen B – D; **B:** Blatt 24 Std. nach Verwundung; **C:** Verwundung aus B im Detail; **D:** Blatt 24 Std. nach Applikation von 20 μ l 1 mM Salicylsäure im Gewächshaus; **E:** Blätter von zwei Pflanzen, 48 Std. nach Behandlung mit 20 μ l H₂O (0 mg/ml Bion) und 1 mg/ml Bion; **F-I:** Salicylsäure-Behandlung (0 μ M – 300 μ M SA) an 12 Tage alten Keimlingen aus *in vitro*, 48 Std. Induktion; **J-M:** Aminocyclopropan-Carboxylat-Behandlung (0 μ M – 500 μ M ACC) an 12 Tage alten Keimlingen aus *in vitro*, 48 Std. Induktion; **N:** 11 Tage alter Keimling auf MS-Medium, Kontrolle zu P und Q; **O:** Detail aus N; **P:** 11 Tage alter Keimling auf MS-Medium ohne Phosphat; **Q:** Detail aus P; **R:** Neun Tage alter Keimling auf MS-Medium, Kontrolle zu S; **S:** Neun Tage alter Keimling auf MS-Medium ohne Eisen.

Experimente mit *in vitro*- und Gewächshauspflanzen zeigten, dass Salicylsäure (SA) und Bion, eine zu 3% Benzothiadiazol (BTH) enthaltende Verbindung, die PIIA-Aktivität induzieren können. Beide Substanzen sind beschrieben als Auslöser der pflanzeigenen Pathogenabwehr, wobei BTH eine künstlich synthetisierte Verbindung ist. Auf ein einzelnes Blatt appliziert verursachte SA bereits nach 24 Std. eine lokale Reaktion (Abb. 3.30, D). Bei einer Inkubationsdauer von 48 Std. nach der Applikation von 1 mg/ml Bion war eine Aktivierung des Promoters über die gesamte Blattspreite zu beobachten (Abb. 3.30, E), während die Kontrolle unter gleichen GUS-Test-Bedingungen keine GUS-Aktivität besaß. Der Einfluss von SA auf die Promoteraktivität im Test mit Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur ist anhand einer SA-Konzentrationsreihe in der Abbildung 3.30 F - I dargestellt. Bereits eine Konzentration von 10 µM SA führte nach einer Inkubation von 48 Std. zu einer Erhöhung der GUS-Aktivität in den Wurzeln und den Blätter. Ebenfalls in der Pathogenabwehr involviert, aber auch in der Verwundung, ist Ethylen, dessen Vorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) bei einer Konzentration von 50 µM und einer Inkubationszeit von 48 Std. zu einer erhöhten GUS-Expression im qualitativen GUS-Test führte (Abb. 3.30, J-M).

In Experimenten zur Untersuchung von Umweltreizen auf die transgenen Pflanzen konnte durch Trockenstress und Kältestress (10°C) keine veränderte Aktivität des PIIA-Promoters festgestellt werden. Die Anzucht von PIIA::*uidA*-Pflanzen ohne Phosphat oder ohne Eisen im Nährmedium führte jedoch zu einer erhöhten PIIA-Aktivität. Phosphatmangel induzierte eine stärkere GUS-Expression überwiegend in der Wurzel (Abb. 3.30, N-Q), wobei Eisenmangel die GUS-Aktivität in Blatt und Wurzel gleichermaßen aktivierte (Abb. 3.30, R und S). Dasselbe Experiment wurde auch mit Sulfat-Mangel durchgeführt, was aber zu keiner Aktivierung der GUS-Expression führte.

3.2.6.1.2 Induktionsanalyse mit dem quantitativen GUS-Test

Um eine genauere Betrachtung der identifizierten Induktoren zu ermöglichen, wurden die induzierenden Eigenschaften quantitativ erfasst, indem die GUS-Enzymaktivität an dem Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid-Trihydrat (4-MUG) am Fluorimeter gemessen wurde (s. Kap. 2.2.14.2). Zusätzlich wurde JA mit in die Messungen aufgenommen, da in Vorexperimenten keine eindeutige Aussage über die Induktionsfähigkeit getroffen werden konnte und der quantitative GUS-Test eine exaktere Methode zur Bestimmung der GUS-Aktivität ist. Die Experimente zur quantitativen GUS-Bestimmung wurden an drei zufällig

ausgesuchten Linien (4, 6 und 19) der PIIA::*uidA*-Pflanzen, wie in Kap. 2.3.4.1 beschrieben, durchgeführt. Nach Beendigung eines Experimentes wurden die Pflanzen bis zur Aufbereitung im quantitativen GUS-Test in flüssigem Stickstoff bzw. bei -70°C eingefroren.

Für Jasmonsäure und Salicylsäure wurde zunächst mit einer transgenen Linie eine Konzentrationsreihe gemessen, um die Konzentration mit dem höchsten Induktionspotential zu ermitteln. Sowohl Jasmonsäure als auch Salicylsäure induzierten die GUS-Enzymaktivität am stärksten bei einer Konzentration von $50\ \mu\text{M}$, wobei niedrigere und höhere Konzentrationen geringere oder keine Induktion hervorriefen. Bei ACC wurde sich an den Ergebnissen aus den histologischen GUS-Tests orientiert (Abb. 3.30, J-M) und ebenfalls eine Konzentration von $50\ \mu\text{M}$ angewendet. Für die Folgetests wurde davon ausgegangen, dass sich die Linien zwar in ihrer quantitativen GUS-Aktivität unterscheiden können, aber die höchste Induktion bei der selben Induktorkonzentration besitzen. Da die Experimente mit Bion von vornherein nur drei Konzentrationen beinhalteten, wurde auch der quantitative GUS-Test an allen drei Linien mit 0, 0,1 und 1 mg/ml Bion durchgeführt.

Die Reaktionszeiten lagen bei sämtlichen GUS-Enzymtests mit 4-MUG bei 2 bis 3 Stunden, wobei in 0,5 – 1 Stunden Intervallen je ein Aliquot des Reaktionsansatzes abgestoppt und am Fluorimeter gemessen wurde. Die Abbildung 3.31 zeigt dies beispielhaft für die Induktion der Linie 4 durch Bion. Die Darstellung der GUS-Aktivität erfolgt in der Abbildung 3.31 in $\text{nmol 4-MU}/\mu\text{gProtein}_{\text{gesamt}}/\text{Stunde}$ und wurde anhand einer Eichreihe mit dem Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon errechnet. Zum Zeitpunkt 0 in der Abbildung 3.31 A wurde am Fluorimeter bei allen Behandlungen eine nahezu gleiche Fluoreszenz gemessen. In der blanko-Variante sind alle Komponenten bis auf das extrahierte, pflanzliche Protein enthalten und gibt somit die Grundfluoreszenz des Reaktionsansatzes wieder, der sich auch nach zweistündiger Inkubation nicht änderte. In den Reaktionen mit pflanzlichem Gesamtprotein stieg hingegen erwartungsgemäß der Umsatz des Substrates an, wobei der Induktionseffekt durch die Differenz zur Kontrolle deutlich wurde. In dem diese einfache Kinetik bei jedem Enzymtest durchgeführt wurde, konnte der Zeitpunkt mit der größten Differenz für die Darstellung im Diagramm ausgewählt werden. Die Abbildung 3.31 B zeigt die relativen Zuwächse der GUS-Aktivität zur Nullkontrolle des selben Experimentes. Der Unterschied in der GUS-Aktivität bereits zum Zeitpunkt 0 reflektiert die Messungenauigkeit der Methode oder basiert auf der β -Glucuronidase-Aktivität zwischen Zugabe des Proteinextraktes und dem Abstoppen der Reaktion für die Messung. Zu allen Zeitpunkten ist die Induktion durch 1 mg/ml Bion höher als die Behandlung 0,1 mg/ml Bion, wobei die größte Steigerung der höheren Konzentration zum Zeitpunkt 1,5 Stunden erreicht wurde.

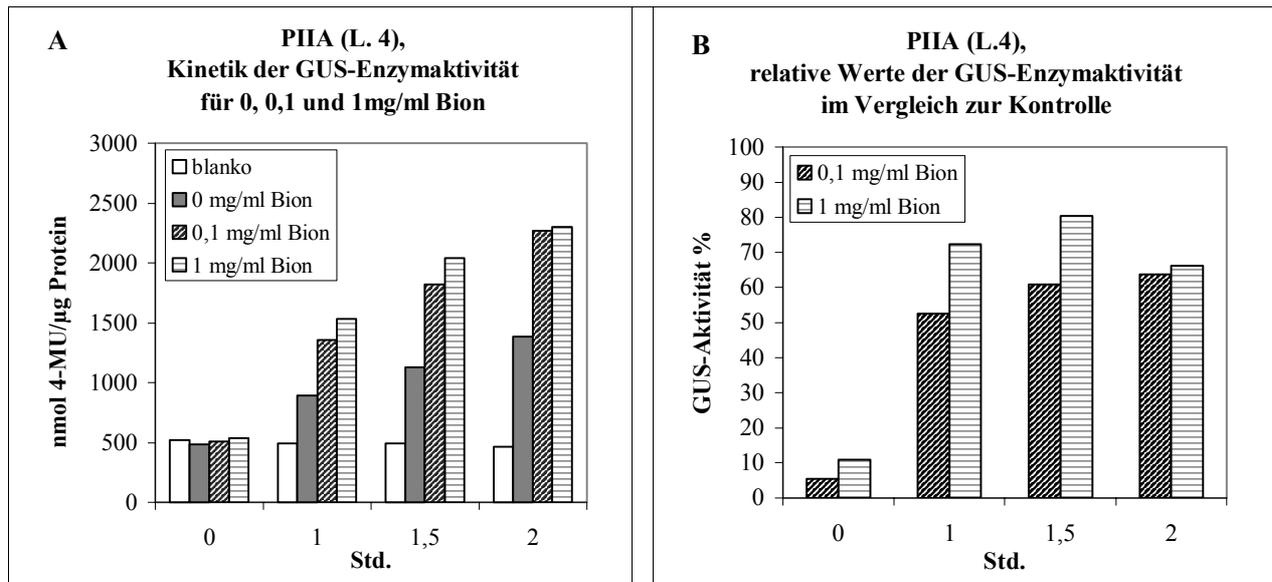


Abbildung 3.31: Bion-Induktionstest an PIIA::*uidA* (L. 4) Pflanzen. A: Kinetik der GUS-Enzymaktivität für drei Bionkonzentrationen an einer Linie. B: Das gleiche Experiment dargestellt als relative Steigerung der GUS-Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse aus den Induktionsexperimenten mit Salicylsäure, Bion, ACC und Jasmonat wurden in gleicher Weise, wie in der Abbildung 3.31 dargestellt, durchgeführt und sind in der Abbildung 3.32 zusammengefasst. Darin zeigte 50 μ M SA nach 48 Std. mit 134 – 517% über der GUS-Enzymaktivität der Kontrolle die stärkste Induktion. 1 mg/ml Bion führte zu einer Steigerung der GUS-Aktivität von 40 – 181% und 50 μ M ACC von 26 – 93%. Jasmonat zeigte mit 30 – 59% die geringste Aktivierung, die aber bei einer höheren Konzentration wieder abnahm und somit nicht auf eine unspezifische Aktivierung bei 50 μ M durch chemischen Stress deutete. Das Induktionspotential der Einzelnen Behandlungen weist somit deutliche Unterschiede auf, die Induktion der drei Linien zueinander verhält sich aber immer gleich.

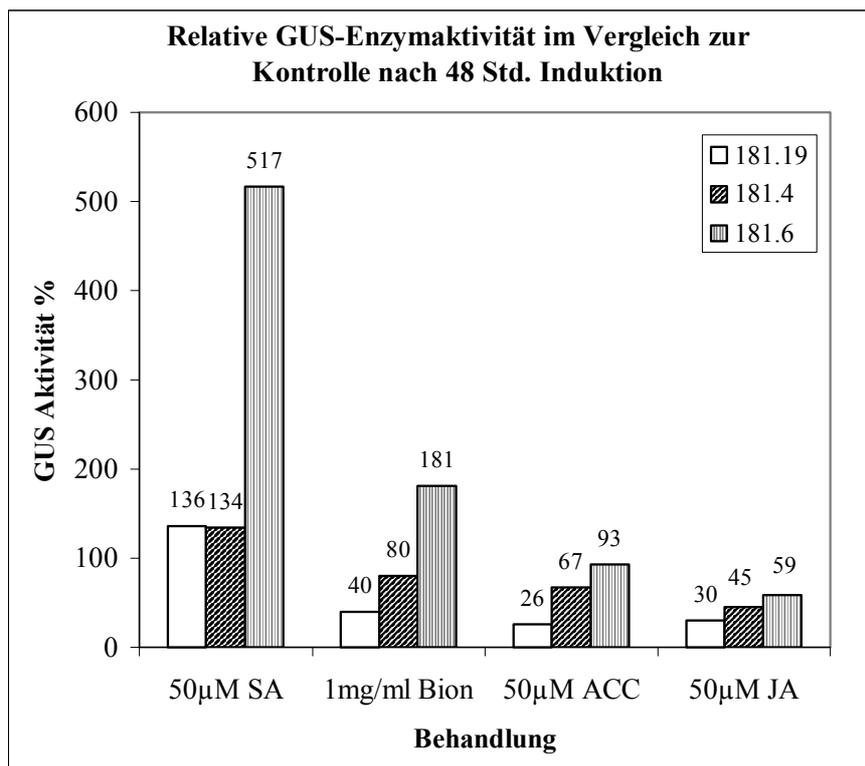


Abbildung 3.32: GUS-Enzymaktivität nach 48 Std. Induktion relativ zur Kontrolle an drei PIIA::*uidA*-Linien (4, 6, 19). Der Kontrollwert wurde als 100% gesetzt und ist in der Graphik bereits subtrahiert. Zahlen über den Säulen geben die exakten Prozentangaben an.

Wie bereits unter 3.2.6.1.1 mit Hilfe des histologischen GUS-Tests dargestellt, führte das Fehlen der Nährstoffe Eisen und Phosphor zu einer Aktivierung der GUS-Expression. Um diese Ergebnisse zu manifestieren, wurde der Versuch wiederholt und neben dem histologischen GUS-Test auch eine Quantifizierung mit 4-MUG durchgeführt (Abb. 3.33). Nach neun Tagen auf MS-Medium ohne Eisen zeigten die transgenen PIIA::*uidA*-Pflanzen eine 380-1480% höhere GUS-Enzymaktivität als die Pflanzen auf MS-Vollmedium. Die Pflanzen ohne Phosphat im MS-Medium zeigten bei der Linie PIIA.19 keine und bei PIIA.4 mit 11% nur sehr geringe Steigerung der GUS-Enzymaktivität. Allein die Linie PIIA.6 reagierte mit einem messbaren Anstieg der GUS-Enzymaktivität auf 136% im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Der Grund für die niedrigen Werte aus der Quantifizierung bei P-Mangel liegen vermutlich in der Aufbereitung der Pflanzenproben. Für die Proteinextraktion wurden die gesamten Pflanzen verwendet, wobei sich die Induktion der GUS-Enzymaktivität unter P-Mangelbedingungen aber weitestgehend auf die Wurzel beschränkte und somit der Effekt durch die Grund-Aktivität in den Blättern verdünnt wurde.

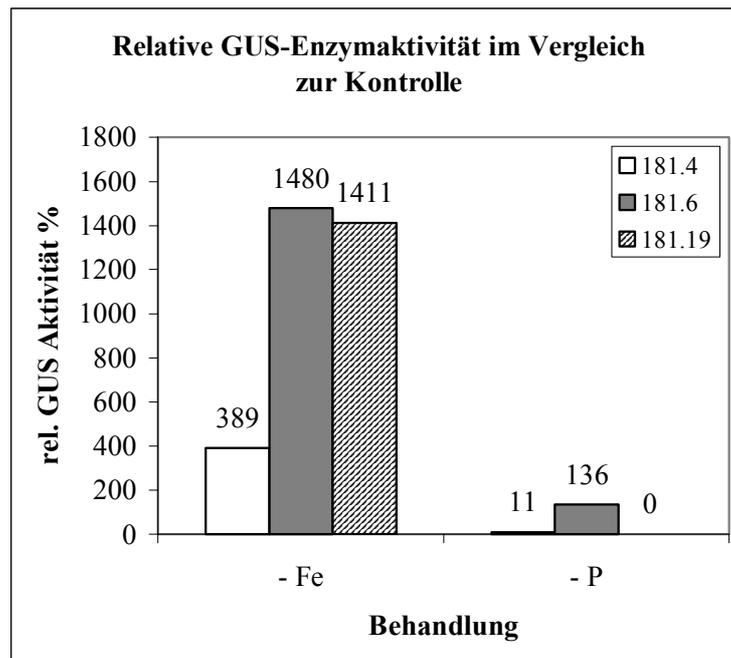


Abbildung 3.33: Relative GUS-Enzymaktivität von 9 Tage alten Pflanzen gewachsen auf MS-Agar ohne Eisen oder ohne Phosphat im Vergleich zu Pflanzen gewachsen auf MS-Vollmedium. Kontrolle = 0%, Zahlen über den Säulen geben den exakten Wert an.

3.2.6.1.3 Sequenzanalyse von PIIA

Die Induktion des PIIA-Promoters durch Signale der Pathogenabwehr und der Verwundung ließ sich auch weitgehend auf Nukleotidebene bestätigen. Eine Analyse der Promotersequenz ergab ein Muster an möglichen regulatorischen cis-Elementen (Abb. 3.34), die als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der WRKY-Familie bekannt sind (Rushton et al., 1996; Eulgem et al., 2000). DNA-Bindeproteine, die die WRKY-Domäne enthalten werden im Zuge der Pathogenabwehr oder nach Salicylsäure-Behandlung vermehrt exprimiert (Chen und Chen, 2000). Sie erkennen verschiedene W-Boxen [(T)TGAC(C)] im 5'-Bereich der codierenden Region und führen durch ihre Bindung zu einer erhöhten Transkription des folgenden Gens. Rushton et al. (1996) haben in den Promoterregionen der *PR-1*- und *PR-2*-Gene aus Petersilie drei unabhängige W-Boxen identifiziert. Die W1-Box besteht aus einem TTGACC-Motiv, das im PIIA getrennt durch zwei Adeninnukleotide als Tandemformation vorkommt. Dieses Doppelmotiv ist zudem nahezu identisch mit einer direkten Wiederholung des W1-Motivs in der Promoterregion einer Proteinkinase (*RLK4*) aus *Arabidopsis*, an die gereinigte sowie durch SA induzierte WRKY-Proteine binden (Du und

Chen, 2000). Neben der W1-Box Wiederholung existieren in der PIIA-Sequenz drei weitere TTGAC-Motive in den ersten 800 bp vor dem Translationsstart. Mutation einer einzelnen TTGAC Sequenz in dem *RLK4*-Promoter resultierte in einer verringerten Anbindung der WRKY-Proteine, was eine mögliche Funktion als regulatorische Einheit im PIIA-Promoter unterstützt. Eines der TTGAC-Sequenzen bildet in Kombination mit einem GTCA-Motiv ein zusätzliches mögliches cis-Element, das mit der von Rushton et al. (1996) beschriebenen W3-Box identisch ist, außer, dass die beiden Motive im PIIA durch acht an Stelle von sechs Nukleotiden, wie im PR1.2 Promoter (Petersilie), getrennt sind.

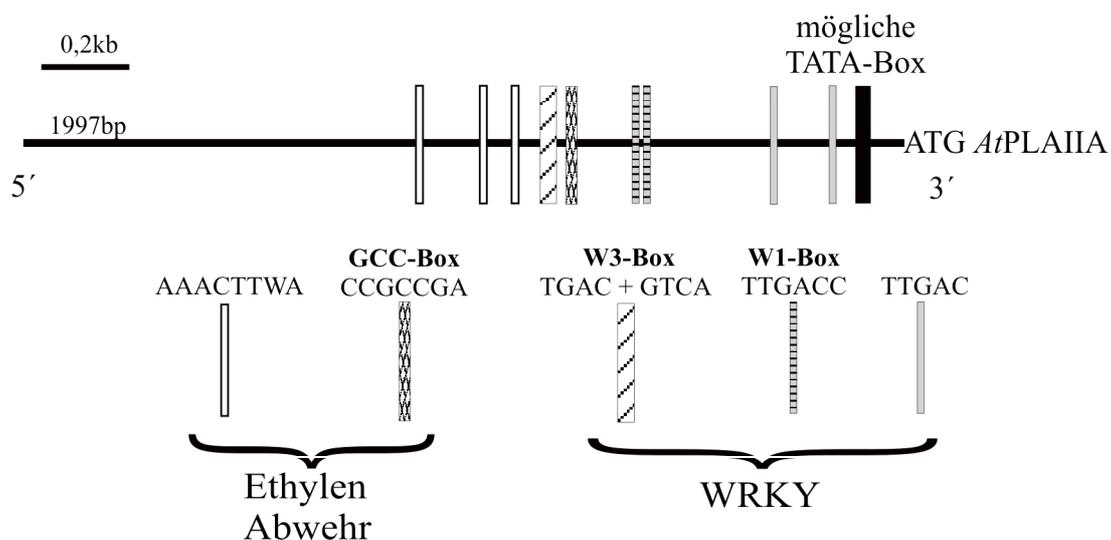


Abbildung 3.34: PIIA (schematisch) mit möglichen regulatorischen Elementen. Die Elemente sind als vertikale Balken in ihren relativen Positionen zum Translationsstart im *AtPLAIIA*-Promoter dargestellt (oben). Unten: Legende der einzelnen Elemente.

In der Induktion durch ACC könnten drei invertierte cis-Elemente (TTTGAT/AA) in der PIIA-Sequenz eine Rolle spielen. Dieses Motiv wurde durch DNase I *footprint*-Analysen der ethylen-sensitiven Region des *E4*-Promoters aus Tomate identifiziert (Montgomery et al., 1993). Mit der selben Methode haben Itzhaki et al. (1994) dieses Motiv in der 5'-Region der ethylen-induzierbaren Glutathion-S-Transferase (*GST1*) aus Nelke entdeckt. Zusätzlich wurde in *gain-of-function*-Experimenten demonstriert, dass die ethylen-sensitive Region mit dem ATTTCAA-Element eine Aktivierung eines 35S-Minimalpromoters durch Ethylen in der normalen, wie in der invertierten Orientierung, hervorruft. Ein zweites aber wiederum invertiertes Element, die GCC-Box, liegt 748 bp vor dem Translationsstart von *AtPLAIIA*. Die GCC-Box ist eine Bindungssequenz für ethylen-hochregulierte Transkriptionsfaktoren

(Fujimoto et al., 2000) und ist in der 5'-Region von Ethylen induzierbaren PR- (*pathogen related*) Genen aus Tabak konserviert (Sato et al., 1996).

3.2.6.2 PIVC reagiert auf ABA und Trockenstress

3.2.6.2.1 Induktionsanalyse von PIVC mit dem histologischen GUS-Test

Im Zuge der unter 2.3.7 beschriebenen Induktionsexperimente konnte an PIVC::*uidA*-Pflanzen eine Induzierbarkeit durch Abscisinsäure (ABA) und Trockenstress beobachtet werden. Zur Detektion der GUS-Aktivität wurden die Pflanzen stets über Nacht in 1 mM X-Gluc-Färbelösung inkubiert. 12 Tage alte Sämlinge aus der *in vitro* Kultur, wie sie für die Experimente eingesetzt wurden, sowie ältere PIVC::*uidA*-Pflanzen zeigten im qualitativen GUS-Test weder in den Wurzeln noch in den Blättern eine β -Glucuronidase-Aktivität. Erst durch die Zugabe von Abscisinsäure konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der GUS-Aktivität in der Wurzel beobachtet werden (Abb. 3.35). Bei einer Induktionszeit von 24 Std. konnte ab 10 μ M ABA (in MS + 2% Glukose) eine GUS-Aktivität in den Wurzeln detektiert werden (Abb. 3.35, C). Nach 48 Std. reichte bereits 1 μ M ABA aus, um die GUS-Expression zu induzieren, die bei höheren ABA-Konzentrationen noch weiter zunahm (Abb. 3.35, E-H). Die Promoteraktivität beginnt in den älteren Bereichen der Seitenwurzeln und dehnt sich mit zunehmender ABA Konzentration auf die gesamten Wurzeln aus, wobei jüngere Wurzelabschnitte inklusive der Wurzelspitze keine sichtbare GUS-Expression zeigen. Aus der Literatur ist bekannt, dass ABA-induzierbare Gene teilweise auch auf Salzstress reagieren. Auch PIVC::*uidA*-Pflanzen wurden für 48 Std. mit 10, 100 und 500 mM NaCl unter gleichen experimentellen Bedingungen wie mit ABA behandelt. Bei keiner NaCl-Konzentration wurde eine Promoteraktivierung sichtbar. Kälte- und Trockenstress stehen ebenfalls mit ABA in Verbindung, woraufhin entsprechende Experimente durchgeführt wurden (s. Kap. 2.3.7.2). Der angelegte Kältereiz von 10°C führte weder nach 24 noch nach 48 Std. zu einer Erhöhung der Promoteraktivität, wohingegen 24 Std. unter Trockenstressbedingungen ausreichten um eine GUS-Expression in der Wurzel zu induzieren (Abb. 3.35, I und J). Die GUS-Färbung in der Wurzel ist nicht so stark ausgeprägt wie in den ABA-Behandlungen höherer Konzentration aber mit dem Expressionsmuster in der Wurzel vergleichbar.

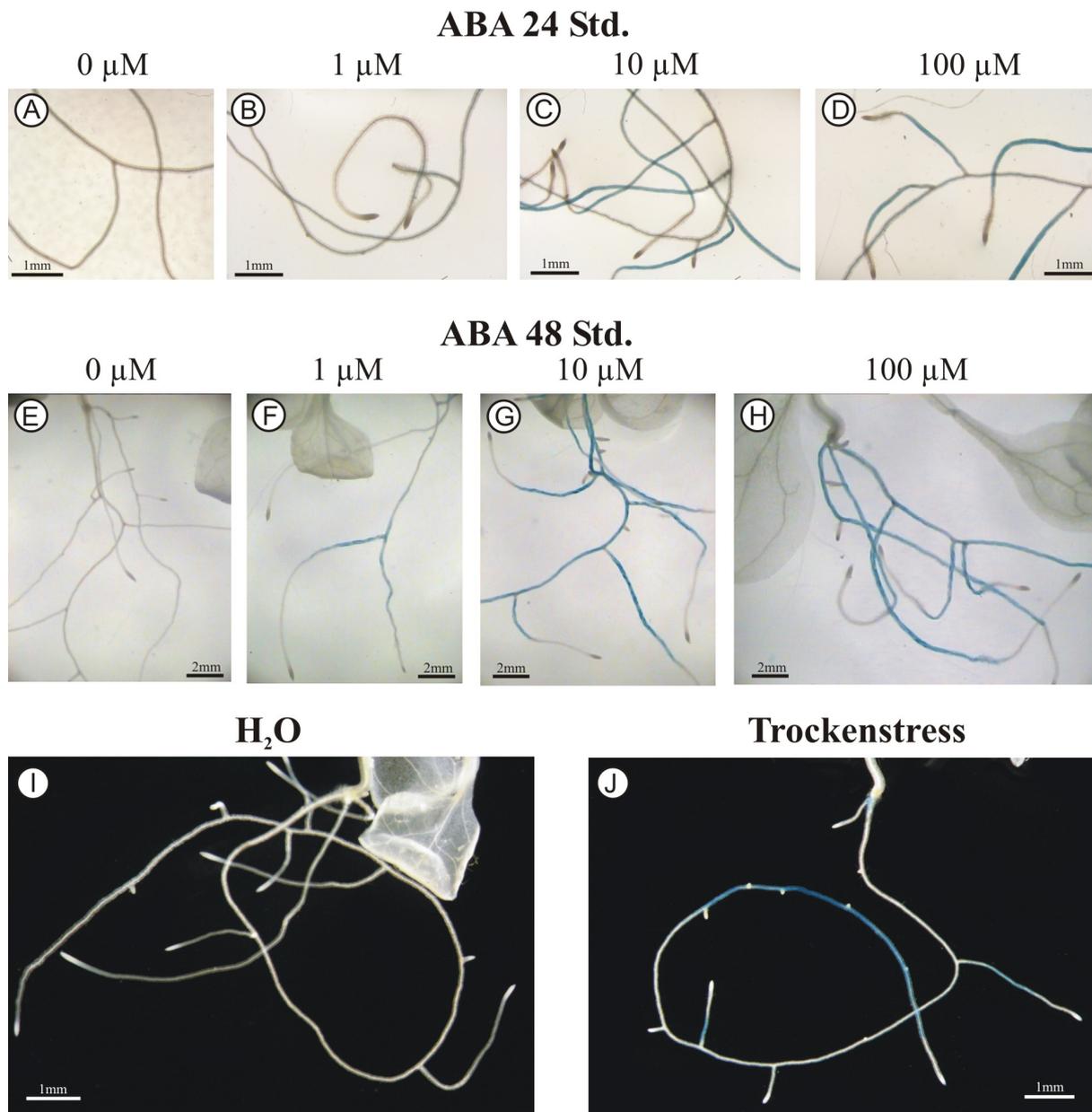


Abbildung 3.35: Histologischer GUS-Test von 12 Tage alten PIVC::*uidA*-Pflanzen nach ABA-Behandlung und Trockenstress. A - D: 24 Std. Inkubation in 0 μM ABA (A), 1 μM ABA (B), 10 μM ABA (C) und 100 μM ABA (D); E - F: 48 Std. Inkubation in 0 μM ABA (E), 1 μM ABA (F), 10 μM ABA (G) und 100 μM ABA (H); I: Kontrolle zu I in H₂O, 24 Std. Inkubation; I: 24 Std. Trockenstress.

Nach den Ergebnissen aus den Induktionsexperimenten wurden auch Blüten von PIVC::*uidA*-Pflanzen im Gewächshaus mit Abscisinsäure behandelt. Durch die ABA-Behandlung wurde weder das Expressionsmuster noch die Expressionsstärke der β -Glucuronidase verändert. Daraus wurde geschlossen, dass die PIVC-Aktivität im Pistill nicht auf erhöhte endogene ABA-Gehalte zurückzuführen ist, sondern einem anderen Mechanismus unterliegt.

3.2.6.2.2 PIVC Sequenzanalyse

Neben der molekularbiologischen Untersuchung des PIVC-Promoters erfolgte wiederum eine Analyse der Nukleotidsequenz nach bekannten cis-Elementen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in der Abb. 3.36 schematisch dargestellt. In einem Abstand von 149 bp vor dem Start-ATG liegt eine mögliche TATA-Box (TATAAAT), an deren Anschluss nach 31 bp ein Adenin-Nukleotid in Pyrimidin-reicher Umgebung folgt, dass den Transkriptionsstart darstellen könnte.

Drei mögliche cis-Elemente aus PIVC wurden in dem ausführlich untersuchten Promoter des Napin-Gens (*napA*), einem Speicherprotein aus *Brassica napus*, identifiziert und gezeigt, dass sie für eine ABA-gesteuerte Transkription von *napA* im Embryo und im Endosperm verantwortlich sind (Ellerström et al., 1996; Stålberg et al., 1996; Ezcurra et al., 1999, 2000). Wie unter 3.2.6.2.1 dargestellt, war PIVC durch ABA in der Wurzel induzierbar, wohingegen keine GUS-Aktivität in entwickelnden Embryos von ABA-behandelten Blüten oder im reifen Samen gefunden werden konnte. Ezcurra et al. (2000) haben im proximalen Bereich des *napA*-Promoters zwei zusammengesetzte Elemente, die B-Box und die RY/G-Box, als Bindungsorte des saatspezifischen Transkriptionsaktivators ABI3 (Abscisinsäure insensitiv 3) aus *Arabidopsis* identifiziert. Mutationen in diesen Boxen führten zum Verlust der Induzierbarkeit durch Abscisinsäure. Im PIVC-Promoter wurden die proxB-Box und die RY-Box ebenfalls identifiziert, wobei die Reihenfolge beider Elemente sowie der Abstand zum möglichen Transkriptionsstart mit dem *napA*-Promoter übereinstimmt. Ein weiteres regulatorisches Element des *napA*-Promoters wurde von Stålberg et al. (1996) als E-Box (CANNTG) bezeichnet. Die E-Box ist eine Konsensussequenz der Bindestellen von bHLH-MYC-ähnlichen DNA-Bindeproteinen die auch durch ABA-Behandlung oder Stress hochreguliert werden (Abe et al., 1997; Busk und Pagès, 1998). In der PIVC-Sequenz taucht dieses Motiv acht mal auf, wobei aufgrund der undefinierten mittleren Nukleotide die Interpretationsfähigkeit eingeschränkt ist.

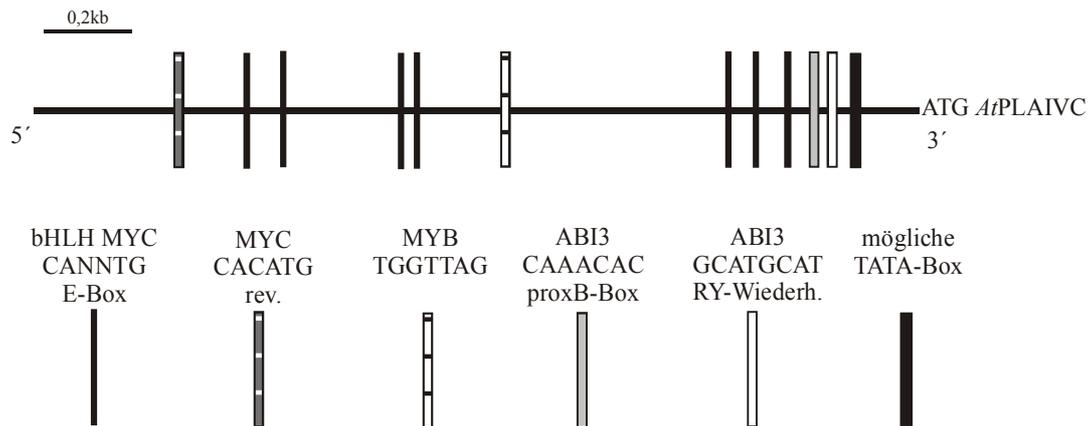


Abbildung 3.36: PIVC (schematisch) mit möglichen regulatorischen Elementen. Die Elemente sind als vertikale Balken in ihren relativen Positionen zum Translationsstart im *AtPLA IVC*-Promoter dargestellt (oben). Unten: Legende der einzelnen Elemente.

Die Motive CACATG und TGGTTAG wurden als Erkennungssequenzen von MYC- bzw. MYB-ähnlichen DNA-Bindeproteinen im Trockenstress induzierbaren Promoter des *rd22* Gens aus *Arabidopsis* identifiziert (Abe et al., 1997). Die Trockenstress-Induktion von *rd22* erfolgt über ABA und durch Mutationen dieser Motive wurde die Induktionsfähigkeit sukzessive aufgehoben. Beide Motive sind auch im PIVC vorhanden (Abb. 3.36), wobei CACATG in reverser Orientierung vorliegt und beide Motive im distalen Bereich liegen, im Gegensatz zum *rd22* Promoter (< -300 bp).

4 Diskussion

In dem Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden nach dessen vollständiger Sequenzierung zehn Gene über ihre Homologie zu calcium-unabhängigen Phospholipase-A₂-Genen aus dem tierischen System identifiziert. Diese pflanzlichen Gene wurden als eine Phospholipase-A (*AtPLA*)-Genfamilie dargestellt (s. Kap. 1) und bilden drei Gruppen, die sich aus Unterschieden in der Exon/Intron-Struktur sowie der Primärstruktur der Proteine herleiten lassen. Um näheren Aufschluss über die Eigenschaften und biologischen Funktionen zu bekommen, wurden Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie in dieser und weiteren Arbeiten im Labor mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersucht. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen aufgrund der unvollständigen Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms fünf Mitglieder der Genfamilie (*AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA*, *AtPLA IVB* und *AtPLA IVC*) vor. Da *AtPLA IVA* und *IVB* sich nur in ca. 5% ihrer Aminosäuren unterscheiden, wurde zunächst aus arbeitstechnischen Gründen auf eine Untersuchung des *AtPLA IVB*-Gens verzichtet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Phospholipase-A-Aktivität einzelner Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie zu überprüfen, um aus den Enzymeigenschaften auf die Homologie zu anderen PLA-Enzymen schließen zu können und Hinweise für ihre Funktion zu erhalten. Vor demselben Hintergrund wurde die transkriptionelle Regulation der vier Gene *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC* untersucht, um aus dem Expressionsmuster und gegebenenfalls aus der Reaktion auf Signale oder Umweltbedingungen weitere Hinweise auf neue Funktionen zu erhalten.

4.1 Enzymaktivität rekombinanter *AtPLA*-Gene

Die Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie wurden zunächst aufgrund ihrer Aminosäuresequenz-Homologie zu tierischen Proteinen als Phospholipase A₂-Proteine identifiziert. Im pflanzlichen System besitzen die *AtPLA*-Proteine Homologien zu den Patatinen (Mignery et al., 1984) und werden dadurch auch als patatin-ähnliche Phospholipasen A bezeichnet (Holk et al., 2002). Die Patatine sind eine Familie von Glykoproteinen, die ca. 40% des löslichen Proteins aus der Kartoffelknolle bilden (Mignery et al., 1984). Diese Speicherproteine besitzen Acyl-Hydrolase-Aktivität an verschiedenen Lipiden wie Phospholipiden, Monoacylglycerolen, Nitrophenylestern und Galaktolipiden sowie Acyl-Transferase-Aktivität

(Andrews et al., 1988; Hirschberg et al., 2001). Die ca. 40-45 kDa großen Patatine haben am N-Terminus ein Signalpeptid und werden in der Zelle in die Vakuole transportiert (Sonnewald et al., 1989, 1990). Dies unterscheidet sie wesentlich von den cytosolischen, patatin-ähnlichen AtPLA-Proteinen (Holk et al., 2002) und lässt sie funktionell ungeeignet als Bestandteil einer cytosolischen Signaltransduktionskette erscheinen. Neben der Kartoffel (40 kDa, Senda et al., 1996; Hirschberg et al., 2001) wurden bereits patatin-ähnliche Proteine mit Phospholipase-A-Aktivität aus Tabak (28 – 46 kDa, Dhondt et al., 2000), Cowpea (48 kDa, Matos et al., 2001) und *Hevea* (43 kDa, Sowka et al., 1998) gereinigt und teilweise die zugehörigen Gene isoliert. Für keines der patatin-ähnlichen Proteine ist eine cytosolische Lokalisation nachgewiesen. In *Arabidopsis thaliana* war gegen Ende dieser Arbeit als patatin-ähnliche PLA bisher nur das STURDY Gen beschrieben worden (Huang et al., 2001), welches mit AtPLA IIIB identisch ist, aber dessen Lokalisation in der Zelle und dessen Enzymaktivität nicht bekannt sind. Somit wurden im Zuge dieser Arbeit erstmalig Mitglieder der cytosolischen AtPLA-Genfamilie aus *Arabidopsis* auf ihre Phospholipase-Aktivität hin untersucht.

Um die Annahme einer enzymatischen Phospholipase A_{1/2} Aktivität der AtPLA-Proteine zu überprüfen, wurden zunächst durch rekombinante Expression in *Escherichia coli* größere Mengen an Protein hergestellt, selektiv gereinigt und für die Etablierung eines Enzymtests verwendet. AtPLA I, AtPLA IIA und AtPLA IVA wurden auf diese Weise untersucht. Aufgrund des mit 1312 Aminosäuren für die Expression in *E. coli* sehr großen AtPLA I-Proteins wurde zunächst nur der PLA-homologe Bereich (Enzym I_{kurz}, 459 AS) in *E. coli* überexprimiert (s. Kap. 2.2.1). Die Expression von Enzym I_{kurz} resultierte in *inclusion bodies*, die sich nur unter denaturierenden Bedingungen reinigen ließen. Unter nativen Reinigungsbedingungen konnte kein rekombinantes Enzym I_{kurz}-Protein erlangt werden. Die Bildung der *inclusion bodies* resultierte vermutlich aus inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, die zwischen Cysteinen gebildet werden (Fischer et al., 1993; Misawa und Kumagai, 1999). Enzym I_{kurz} beinhaltet 10 und das gesamte Protein 27 Cysteine, wobei die Überexpression von Enzym I offenbar nach ca. einem Drittel des Proteins in *E. coli* abgebrochen wurde und ebenfalls in *inclusion bodies* resultierte. Auch nach chemischer Reduktion und Trennung der Disulfidbrücken mit nachfolgender, schrittweiser Renaturierung gelang es nicht, dieses Protein in eine aktive Form zu überführen. Aufgrund der Lokalisation des AtPLA I-Proteins in oder an den Chloroplasten kann nicht ausgeschlossen werden, dass AtPLA I eine Präferenz für Galaktolipide besitzt, die, im Gegensatz zu anderen Lipidmembranen, zu 80 – 90% in der Chloroplastenmembran vorhanden sind. Für eine patatin-ähnliche Acyl-Hydrolase aus *Vigna unguiculata* (VUPAT1) wurde bereits gezeigt,

dass das Protein vornehmlich Galaktolipide und nur sehr langsam Phosphatidylcholin hydrolysiert (Matos et al., 2001), die Lokalisation von VUPAT1 ist jedoch nicht bekannt. Im Vergleich zu AtPLA I besitzen AtPLA IIA nur zwei und AtPLA IVA drei Cysteine, und beide Enzyme ließen sich als rekombinante Proteine Enzym IIA bzw. Enzym IVA unter nativen Bedingungen reinigen. Für die Etablierung eines Enzymtests mit den rekombinanten Proteinen wurde das fluoreszenzmarkierte Substrat mono- oder bis-BODIPY-PC verwendet, mit dem bereits *in vivo* eine schnelle auxin- und elicitor-induzierte PLA-Aktivität gemessen wurde (Chandra et al., 1996; Paul et al., 1998; Roos et al., 1999; Scherer et al., 2000). Neben dem Nachweis einer PLA₁- und PLA₂-Enzymaktivität von Enzym IIA und Enzym IVA wurde der Einfluss von fünf Inhibitoren aus dem tierischen System getestet, um die Natur der PLA-Enzyme näher zu spezifizieren.

4.1.1 Enzym IIA/Enzym IVA besitzen Phospholipase A₁/A₂ Aktivität

In dem Enzymtest wurde anhand der mono- und bis-BODIPY-PC Substrate die Aktivität einer Phospholipase A₁ und A₂ gezeigt und somit die Eigenschaft der Proteine als Phospholipase-A-Enzyme bestätigt. Die Phospholipase-A₁-Aktivität steht nicht im Gegensatz zu den Übereinstimmungen mit der Aminosäuresequenz der tierischen Phospholipase-A₂-Gene, da diese in geringem Ausmaß ebenfalls PLA₁ und/oder andere enzymatische Aktivitäten besitzen (Six und Dennis, 2000). Die Identifizierung der AtPLAs über den Vergleich mit calcium-unabhängigen Phospholipase A₂-Enzymen (iPLA₂) der Tiere führte zunächst zu der Erwartung, dass die pflanzlichen Proteine keine Calciumionen zur Katalyse der Reaktionen benötigen würden. Ohne CaCl₂ im Reaktionspuffer konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden. Erst mit steigender CaCl₂-Konzentration nahm die Enzymaktivität zu (Abb. 3.12 bzw. 3.14) und fiel nach Überschreiten eines Optimums (Enzym IIA: 2 mM, Enzym IVA: 1 mM) wieder ab. Warum Calcium für eine Aktivierung des Enzyms IIA- und Enzyms IVA notwendig ist, ist nicht bekannt. Es wird aber nicht davon ausgegangen, dass wie bei den sekretorischen PLA₂-Enzymen (sPLA) das Calcium Bestandteil des katalytischen Zentrums ist, da sich diese beiden PLA₂-Typen in Größe, Aminosäuresequenz und Bau des katalytischen Zentrums deutlich unterscheiden (s. Kap. 1). Trotz fehlender C2-Domäne in den AtPLAs könnte Calcium bei der Anlagerung des Enzyms an die Liposomenoberfläche eine Rolle spielen, wie es für cPLAs bekannt ist, die ebenfalls Calcium für den katalytischen Mechanismus nicht benötigen (Six und Dennis, 2000).

Letztlich muss berücksichtigt werden, dass es sich um einen *in vitro*-Test handelt und die Aktivität der Enzyme in der Pflanze vermutlich durch zusätzliche Faktoren beeinflusst wird. In *E. coli* exprimiertes oder direkt gereinigtes Patatin aus der Kartoffel (Andrews et al., 1988; Senda et al., 1996; Hirschberg et al., 2001) sowie PLAs aus Bohne (Jung und Kim, 2000) und Gurke (May et al., 1998) besitzen unter zu den hier verwendeten, vergleichbaren Reaktionsbedingungen enzymatische Aktivität ohne Calcium, jedoch führte eine Zugabe von Calcium-Ionen zu einer Erhöhung der Aktivität. Enzymtests anderer pflanzlicher PLA-Enzyme (NtPat1-3) hingegen wurden nur in Gegenwart von Calcium-Ionen durchgeführt (Dhondt et al., 2001). Die Calciumabhängigkeit des Enzyms IIA und Enzyms IVA spricht dafür, dass die cytosolischen AtPLAs in der Zelle durch andere Mechanismen als durch Calcium aktiviert werden, da cytosolische Calciumkonzentrationen über 10 μM auch lokal nicht zu erwarten sind (Buchanan et al., 2002).

Ebenso zeigen Enzym IIA und Enzym IVA trotz ihrer Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz (53% identisch, 70% ähnlich; Genedoc) Unterschiede in den charakteristischen Eigenschaften. Enzym IIA benötigt im Gegensatz zu Enzym IVA ein reduzierendes Agens (5 mM Cystein) im Reaktionspuffer, um in die aktive Form zu gelangen. Durch das Cystein oder DTT werden vermutlich Disulfid-Brücken gelöst, die sich während der Expression in *E. coli* ausbilden und zu einer für die Reaktion ungünstigen Tertiärstruktur des Proteins führen. Die pH-Optima beider Enzyme lagen für Enzym IIA bei 7 – 8 bzw. für Enzym IVA bei ca. 7. Diese Werte liegen im Bereich des cytosolischen pHs (ca. pH 7,4), was mit der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine (Holk et al., 2002) korreliert.

Da es sich bei AtPLA IIA und AtPLA IVA um Phospholipase-A-Enzyme handelt, wurde untersucht, ob sie auch durch PLA₂-Inhibitoren aus dem tierischen System gehemmt werden können. Zu den Inhibitoren zählen Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF₃), Palmitoyltrifluoromethylketon (PACOCF₃), Nordihydroguaiaretic Säure (NDGA), E-6-(Bromomethylene)tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-on (HELSS) und 5,8,11,14-Eicosatetraynoic Säure (ETYA). AACOCF₃ und PACOCF₃ sind Fettsäure-Analoga und konkurrieren durch ihre reversible Bindung an das Enzym mit den natürlichen Fettsäuren. Für AACOCF₃ wurde gezeigt, dass es sowohl cPLA₂- (Street et al, 1993) als auch iPLA₂-Aktivität (Ackermann et al., 1995) hemmen kann. Enzym IIA und Enzym IVA werden ebenfalls durch AACOCF₃ inhibiert und besitzen bei Konzentrationen von 4 bzw. 20 μM nur noch 50% ihrer Aktivität. Eine sekretorische PLA₂ ließ sich hingegen durch AACOCF₃ nicht hemmen (Jung und Kim, 2000). PACOCF₃ hemmt die tierische iPLA₂ mit einem IK₅₀-Wert von 3,8 μM (Ackermann et al., 1995) und erwies sich in den Tests mit Enzym IIA und Enzym IVA als der

potenteste Inhibitor. Bereits bei Konzentrationen von 60 und 30 nM sind Enzym IIA bzw. Enzym IVA auf die halb-maximale Aktivität reduziert und werden somit um ca. den Faktor 100 stärker inhibiert als das tierische Enzym. NDGA wurde ursprünglich als Inhibitor von Lipoxygenase und Cyclooxygenase tierischer Enzyme beschrieben, hemmt aber auch eine Lipoxygenase aus der Sojabohne (Macri et al., 1994) und eine Fettsäure-Hydroperoxidlyase aus Tomate (Suurmeijer et al., 2000). Diese beiden Enzyme verwenden ein Fettsäuremolekül als Substrat. Dass NDGA eine Phospholipase A inhibiert, wurde durch die Hemmung auxin- und elicitor-induzierter PLA-Aktivität in Petersilienzellen demonstriert (Paul et al., 1998; Scherer et al., 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass NDGA auxin-induziertes Streckungswachstum von Zucchini- und *Arabidopsis*-Hypocotylen hemmt (Scherer und Arnold, 1997; Holk et al., 2002). Auch an den isolierten Enzymen IIA und IVA hat NDGA eine inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität, die mit 10 μM (= IK_{50} , Enzym IIA) und 25 μM (= IK_{50} , Enzym IVA) unter den Konzentrationen liegen, die an den Hypocotylen eine 50%ige Minderung des Auxin-Effektes bewirkt haben. Sie bestätigen damit die zuvor gemachte Beobachtung in einem *in vivo* System, dass eine PLA an der Signaltransduktion von Auxin beteiligt ist. Ob *AtPLA* IIA und *AtPLA* IVA die verantwortlichen Gene sind, ist aufgrund der Genfamilie mit 10 Mitgliedern noch nicht klar zu entscheiden. In derselben Arbeit von Scherer und Arnold (1997) ließ sich durch ETYA ebenfalls das auxin-induzierte Streckungswachstum hemmen. ETYA ist ein Inhibitor der tierischen Phospholipase A₂ (Jung und Kim, 2000), hemmt aber auch Cyclooxygenasen und verschiedene Lipoxygenasen. Jung und Kim (2000) haben hingegen in einem Enzym-Test mit einer gereinigten Phospholipase A aus der Bohne durch Zugabe von 25 μM ETYA eine Steigerung der Enzymaktivität um ca. 60% festgestellt. Inwieweit die PLA aus der Bohne Homologien zu den *AtPLAs* besitzt, ist nicht klar, da das entsprechende Gen bzw. die cDNA aus der Bohne nicht bekannt sind. Von den rekombinanten *AtPLA*-Proteinen zeigte nur Enzym IVA eine Hemmung der Enzymaktivität ($\text{IK}_{50} = 4 \mu\text{M}$). Enzym IIA hingegen ließ sich nicht durch Konzentrationen bis 50 μM ETYA hemmen, zeigte aber auch keine Steigerung der Enzymaktivität wie bei der PLA aus der Bohne. In gleicher Weise unterschieden sich Enzym IIA und Enzym IVA in der Reaktion auf HELSS, wobei sich erneut Enzym IIA nicht und Enzym IVA mit einem IK_{50} -Wert von 400 nM hemmen ließ. In der Literatur wird HELSS als spezifischer Inhibitor für calcium-unabhängige PLA_{2s} aus dem tierischen System beschrieben, indem es irreversibel über eine kovalente Bindung an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet (Ackermann et al., 1995). Die cPLA_{2s} werden hingegen durch HELSS um den Faktor 1000 niedriger gehemmt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Sequenzübereinstimmungen von

AtPLA IVA zu den iPLA₂s aus dem tierischen System, aber im Gegensatz zu der Calcium-Abhängigkeit im *in vitro*-Test. Warum Enzym IIA nicht durch ETYA und HELSS inhibiert wird, ist unklar, zumal beide Chemikalien nicht vergleichbare Strukturen besitzen und vermutlich über unterschiedliche Mechanismen die Enzymaktivität hemmen. Da HELSS an das aktive Zentrum bindet, spielen eventuell Unterschiede benachbarter Aminosäuren zwischen AtPLA IIA und AtPLA IVA eine Rolle.

Aufgrund des größtenteils weiten Wirkungsspektrums der Inhibitoren lässt die Verwendung einzelner Substanzen nur bedingt eine Interpretation zu. Die Verwendung mehrerer Inhibitoren bestätigt die Spezifität der Phospholipase-A-Aktivität der rekombinanten AtPLAs, zeigt aber auch Unterschiede auf, die bereits in den Reaktionsbedingungen deutlich wurden (s. Kap. 3.1.4). Mit der Expression und Charakterisierung weiterer Mitglieder der *AtPLA*-Familie könnten sie sich auf der Basis der verschiedenen Inhibitoren zu distinkten Gruppen ordnen, die eventuell in der Pflanze in einem bestimmten funktionellen Kontext stehen.

4.2 Transkriptionelle Regulation von vier Mitgliedern der *AtPLA*-Genfamilie

Die Transkription eines Gens wird maßgeblich durch die genomische Nukleotidsequenz im 5'-Bereich des Transkriptionsstarts reguliert. Dieser Bereich beinhaltet konservierte Sequenzmotive wie die TATA-Box oder GC-reiche Regionen sowie genspezifische cis-Elemente und wird als Promoter bezeichnet. Bei der Untersuchung der transkriptionellen Regulation der vier *AtPLA*-Gene I, IIA, IVA und IVC wurde die Promoterregion der korrespondierenden Gene mit dem Reporter gen β -Glucuronidase verbunden. Auf diese Weise lässt sich über die enzymatische Aktivität des Reporters die transkriptionelle Aktivität der einzelnen Promoter gewebe- und zellspezifisch detektieren (Jefferson et al., 1987). Nachdem sich die zuvor erstellten GFP-GUS-Hybridkonstrukte als nur bedingt funktionsfähig erwiesen hatten, wurde in den Folgekonstrukten auf das GFP verzichtet, da es in der Detektion schwieriger zu handhaben ist als der GUS-Reporter. In dem hier gewählten Ansatz beinhaltet der Nukleotidbereich vor der β -Glucuronidase neben der *AtPLA*-Promotersequenz auch die transkribierte aber nicht translatierte Region der Phospholipase-A-Gene. Der nichttranslatierte Bereich am 5'-Ende der mRNA beeinflusst über die Ausbildung von Sekundärstrukturen oder die Bindung von Proteinen die Anlagerung der 40S-Ribosomeneinheit und damit die Initiation der Translation in das Polypeptid

(Knippers, 1997). Durch die Integration dieses Bereiches in die Promotersequenz wurde versucht, über die transkriptionelle Regulation hinaus ein System zu erstellen, das die native Genregulation der *AtPLA*-Gene am exaktesten wiedergibt.

Die Nomenklatur der vier Promotoren erfolgte in Anlehnung an die Bezeichnung der Gene, z.B. ist PI der Promoter des *AtPLA* I-Gens. Ein Vergleich der Promotersequenzen zu Beginn der Arbeit offenbarte keine homologen Bereiche zwischen allen vier oder einzelnen Sequenzen. In der späteren histologischen Untersuchung der Promoter::*uidA*-Pflanzen (s. Kap. 2.2.14) bestätigte sich dieses Ergebnis durch die heterogenen Expressionsmuster der einzelnen Promotoren (s. Kap. 3.2.5) und die Reaktion der *AtPLA* IIA- und *AtPLA* IVC-Promotoren auf unterschiedliche Behandlungen. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen Mitgliedern der untersuchten *AtPLA*-Gene verschiedene Funktionen in der Pflanze haben.

Die Analyse der transgenen Promoter-GUS-Pflanzen auf deren Induzierbarkeit erfolgte meist an 12 Tage alten Keimlingen aus der *in vitro*-Anzucht. Die Keimlinge haben den Vorteil, dass sie relativ gleichmäßig reagieren, schnell verfügbar sind und leicht mehrere Pflanzen pro Behandlung eingesetzt werden können, um somit bereits einen Mittelwert zu bekommen. Die Inkubationsdauer der Behandlungen lag bei 48 Std. und richtete sich nach vergleichbaren Experimenten in der Literatur. Hierbei stand nicht der Zeitpunkt des ersten Auftretens einer erhöhten Promoteraktivität und damit nachfolgend der GUS-Aktivität im Vordergrund, sondern eine prinzipielle Veränderung in der Promoteraktivität.

4.2.1 Transkriptionelle Regulation durch den *AtPLA* I-Promoter (PI)

AtPLA I ist mit 3936 Nukleotiden (Start-Stop) das längste der 10 *AtPLA*-Gene und einziges Mitglied der Gruppe I (Abb. 1.3). Die zu den anderen *AtPLA*-Proteinen homologe Region liegt in der Mitte von *AtPLA* I und wird am N-Terminus von einem Bereich mit einer repetitiven leucin-reichen Domäne (LRR) flankiert. Die PLA-homologe Region beinhaltet alle Sequenzübereinstimmungen, die zur Identifizierung des *AtPLA* I-Gens als eine Phospholipase A geführt haben (Abb. 1.3). Die zusätzliche LRR-Domäne könnte ein Bindungsort für weitere Proteine sein oder als Rezeptor für Liganden fungieren (Kobe und Deisenhofer, 1995) und somit die Regulation von *AtPLA* I beeinflussen. Als generellen Hinweis für einen solchen Zusammenhang steht die Arbeit von Warren et al. (1998), die eine Mutation in der LRR-Domäne von RPS5, einem Resistenz-Gen aus *Arabidopsis* identifiziert haben. Diese Mutante besitzt eine verminderte Resistenz vermutlich aufgrund unterbrochener

Interaktionen zu anderen Resistenz-Proteinen in der Abwehr-Signaltransduktion. Der C-Terminus von AtPLA I enthält eine saure Domäne, über dessen Funktion es bisher keine Hinweise gibt.

In weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die *atpla I-Knockout*-Mutante sich agravitrop und aphototrop im Spross verhält (A. Holk, persönliche Mitteilung). Über die Signaltransduktion des gravitropen Reizes ist bisher wenig bekannt. Eine zweite Mutante (*sgr2*), dessen defektes Protein Homologie zu einer PLA₁ aus dem Rind besitzt, ist ebenfalls im Gravitropismus des Sprosses gestört (Kato et al., 2002a), was die Funktion einer weiteren Phospholipase A im Gravitropismus nahe legt. Die Orte der gravitropen Perzeption im Spross sind nach Kato et al. (2002b) die Endodermiszellen. An oder in den Leitbündeln wurde eine GUS-Aktivität der PI::*uidA*-Pflanzen detektiert (Abb. 3.23), deren genaue Lokalisation auf Grund der schwachen Expression nicht klar war. Eine Änderung der Richtung der Gravitationskraft oder des Licht-Reizes führt in der Pflanze zu einer ungleichmäßigen Wachstumsbewegung, die u.a. vermutlich durch eine veränderte Auxin-Verteilung gesteuert wird (Taiz und Zeiger, 1998). In diesem Mechanismus kann eine Funktion von AtPLA I liegen, da eine Phospholipase-A-Aktivität in der Auxin-Signaltransduktion vermutet wird (Scherer, 2002). Somit könnte AtPLA I eine Funktion einnehmen, die von beiden Signaltransduktionswegen beansprucht wird. Ob AtPLA I in der Reaktion auf einen gravitropen Reiz auch transkriptionell reguliert wird, ist zur Zeit Gegenstand von Experimenten in der Arbeitsgruppe mit PI::*uidA*-Pflanzen.

Um weiteren Aufschluss über die Funktion von AtPLA I in der Pflanze zu bekommen, haben Holk et al. (2002) mittels RT-PCR die Transkription der *AtPLA I*-mRNA in Wurzel, Spross, Blatt und Blüte untersucht und festgestellt, dass die mRNA in allen Organen vorhanden ist und am stärksten im Spross transkribiert wird. Unter der Kontrolle des PI-Promoters exprimierten die transgenen Pflanzen das GUS-Gen vorwiegend in den Pollen und teilweise im Antheren-Gewebe sowie in den Trichomen und im basalen Bereich der Sprossachse bis in die Leitbündel hinein (Abb. 3.23). Bis auf die Wurzel, in der keine GUS-Expression detektiert wurde, stimmt das Expressionsmuster mit der Analyse aus der RT-PCR überein. Im Vergleich besitzt die RT-PCR vermutlich eine höhere Sensitivität, durch die PI-gesteuerte GUS-Expression ist aber eine detailliertere Analyse möglich. Weder in anderen Pflanzenorganen noch zu anderen Entwicklungsstadien konnte eine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Analyse der PI-Nukleotidsequenz reflektiert dieses distinkte Expressionsmuster durch das Vorhandensein zahlreicher möglicher pollenspezifischer cis-Elemente und deren Kombinationen (Abb. 3.24). Im Vergleich zu den Promotoren PIIA,

PIVA und PIVC beinhaltet PI keine mögliche TATA-Box in den ersten 460 bp relativ zum Translationsstart, was die, abgesehen von den Pollen, insgesamt geringe Expressionsstärke des GUS-Gens erklären könnte.

Holk et al. (2002) haben gezeigt, dass das AtPLA I-Protein an oder in der Chloroplastenmembran lokalisiert ist. In den Chloroplasten laufen auch die ersten Reaktionen des Oktadecanoid-Weges bis zur cis-12-Oxophytodiensäure (OPDA) ab, an dessen Ende die Jasmonat-Biosynthese steht (Schaller, 2001). Am Beginn des Oktadecanoid-Weges steht die Freisetzung von α -Linolensäure aus der Lipidmembran durch eine Phospholipase A oder eine Lipase. Auf Grund der Lokalisation in den Chloroplasten zusammen mit der voraussichtlichen Phospholipase-A-Aktivität könnte AtPLA I an der Bereitstellung des Substrates zur Synthese von Jasmonsäure oder deren Vorstufen wie OPDA beteiligt sein. Zudem ist Jasmonsäure (JA) wesentlich an der Pollenentwicklung beteiligt. Dies wurde an Hand der JA insensitiven *coi-1* Mutante gezeigt, die keine fertilen Pollen produziert (Xie et al., 1998). Bereits stark verminderte Gehalte von 3-fach ungesättigten Fettsäuren in einer Desaturase-Mutante (*fad3-2 fad7-1 fad8*) führten zu einer Fehlentwicklung der Pollen, die aber durch die Applikation von Jasmonsäure verhindert werden konnte (McConn und Browse, 1996). Mutationen in Genen des JA-Biosyntheseweges wie in der Allenoxid-Synthase CYP74A (Park et al., 2002) oder der OPDA-Reduktase OPR3 (Stintzi und Browse, 2000) führten zu männlicher Sterilität, wobei die beiden letztgenannten Gene ebenfalls aus *Arabidopsis* stammen.

Die Verbindung zwischen der Freisetzung von α -Linolensäure, der Synthese von Jasmonat und der Fertilität konnte bereits für eine lipase-ähnliche Phospholipase A₁ (DAD1) aus *Arabidopsis* nachgewiesen werden, deren Expression auf die Filamente der Stamen beschränkt ist (Ishiguro et al. 2001). Die Mutation *DAD1* zeigte Defekte beim Öffnen der Antheren, dem Öffnen der Blüten sowie in der Pollenentwicklung. Trotz fehlender stringenter Homologien zwischen DAD1 und AtPLA I auf der Aminosäureebene besitzen beide Proteine das Lipasemotiv GX SXG und es könnte angenommen werden, dass die Enzyme synergistisch wirken oder in verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung aktiv sind.

Es wurde bereits gezeigt, dass in den Pollen von *Arabidopsis* gemäß der Funktion von Jasmonat diverse Gene der Oktadecanoidsynthese, wie z.B. eine Allenoxid-Synthase (AOS, Kubigsteltig et al. 1998), eine Allenoxid-Cyclase und eine 12-Oxo-Phytodienoic-säure-Reduktase-2 (OPR-2, Biesgen and Weiler 1999), als Bestandteile der Jasmonatbiosynthese exprimiert werden. Die Transkription des genannten AOS-Gens wird durch JA hochreguliert und eine vermehrte Bildung von AOC-2- sowie OPR-2-Transkripten wird durch Verwundung induziert. Weder JA noch Verwundung konnten jedoch unter den experimentellen

Bedingungen zu einer Änderung der PI::*uidA*-Expression führen. Dies schließt nicht aus, dass eine transkriptionelle Aktivierung des PI-Promoters zu anderen Entwicklungsstadien und Organen möglich ist, oder die Aktivität des AtPLA I-Enzyms von dem mRNA-Status in der Zelle unabhängig ist und durch posttranskriptionelle Mechanismen gesteuert wird.

Wie in der Abbildung 3.23 B gezeigt, erscheint die PI-gesteuerte GUS-Expression neben den Pollen auch in den Trichomen. Beide Zelltypen zeichnen sich durch ihr stark polares Wachstum aus, was beim Pollen zum Auswachsen des Pollenschlauches führt und bei den Epidermiszellen zur Bildung von Trichomen. An diesem Prozess ist neben dem Zytoskelett mit den Mikrotubuli und Actin-Filamenten auch ein gerichteter Vesikeltransport beteiligt (Szymanski et al., 1999; Vidali und Hepler, 2001). Krishnakumar und Oppenheimer (1999) haben ein kinesin-ähnliches Gen (*ZWI*) identifiziert, dessen Mutante (*zwi-3*) eine verringerte Trichomverzweigung besitzt. Die Doppelmutante von *zwi-3* und einem *ZWI*-Suppressor-Gen (*suz1*) zeigte zudem männliche Sterilität durch einen Defekt in der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum. Krishnakumar und Oppenheimer (1999) führen dies auf einen gestörten Vesikeltransport in der Pollenschlauchzelle zurück. Es bestehen also grundsätzliche Zusammenhänge in dem polaren Wachstum verschiedener Zelltypen, deren Zellen mit dem sehr distinkten Expressionsmuster des *AtPLA I*-Promoters teilweise übereinstimmen. Ein dritter Zelltyp, der dem selben Mechanismus unterliegt, sind die Wurzelhaare (Bibikova et al., 1999). In den Wurzelhaaren der PI::*uidA*-Pflanzen konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Mitteln keine GUS-Aktivität detektiert werden. Die Polarität oder die Änderung der Wachstumspolarität von der GUS-Lokalisation abgeleitet, könnte auch an der durch die *atpla I-Knockout* identifizierten Funktion im Gravitropismus beteiligt sein. Hinweise auf eine Verbindung zur JA-Biosynthese sind eher schwer in Verbindung zu bringen, da für JA keine Funktion im Gravitropismus bekannt ist, nur für Pollenfertilität. Weitere Untersuchungen, vorzugsweise mit der *atpla I-Knockout* sind hier nötig.

4.2.2 Transkriptionelle Regulation durch den *AtPLA IIA*-Promoter (PIIA)

Transgene Pflanzen, die das PIIA::*uidA*-Konstrukt enthalten, exprimieren die β -Glucuronidase in älteren Bereichen der Wurzel, in rosettenbürtigen Stipeln und in den Blättern (Abb. 3.25). Die GUS-Aktivität in den Blättern nimmt mit dem Blattalter zu, was aus einer erhöhten Expression in älteren Blättern resultieren kann oder, aufgrund der langen Halbwertszeit des GUS-Proteins, durch eine Akkumulation der β -Glucuronidase (Jefferson et

al., 1987) zustande kommen könnte. Im Gegensatz zu PI und PIVC tritt keine GUS-Expression in der Blüte auf. Die weite Verbreitung der Expression von *AtPLA IIA* lässt auf eine allgemeine Funktion z.B. in der Auxinphysiologie oder der Pathogenabwehr schließen.

Neben der Primärwurzel und später auch in älteren Seitenwurzeln führt PIIA zu einer GUS-Expression in der Wurzelhaube, inklusive der Calyptra, aber nicht in der sich anschließenden meristematischen Zone und der Elongationszone. Die in der Wurzelhaube enthaltenen Statolithen gelten als Rezeptoren zur Perzeption der Gravitation und es wurde gezeigt, dass Auxin maßgeblich am Krümmungswachstum der Wurzel als Antwort auf ein gravitropes Signal beteiligt ist (Kaufmann et al., 1991; Chen et al., 2002). Vor diesem Hintergrund und der Funktion einer Phospholipase A in der Auxin-Signaltransduktion (Holk et al., 2002) sowie der nachgewiesenen PLA-Aktivität von *AtPLA IIA* (s. Kap. 3.1.4.2) könnte die auffällig selektive Expression in der Wurzelspitze auf eine mögliche Beteiligung des Enzyms an der gravitropen Reaktion in der Wurzel hindeuten. Außerdem haben Kato et al. (2002a, 2002b) durch eine Insertions-Mutante ein Protein (SGR2) in *Arabidopsis* identifiziert, das Homologie zu einer Phospholipase A₁ besitzt und in den Sprossgravitropismus involviert ist.

Eine zweite Hypothese besteht darin, dass *AtPLA IIA* an dem Ablösen der epidermalen Zellschicht von der Wurzelhaube beteiligt ist, die im Zuge der ständigen Erneuerung nach außen abgegeben wird und dabei die inneren Gewebe während des Wachstums durch den Boden schützt. Eine Funktion des *AtPLA IIA*-Proteins in der Sekretion des Mucigel ist denkbar, wenn eine Phospholipase A an der Verschmelzung von Lipid-Vesikeln beteiligt ist. Die Literatur liefert hierfür jedoch keine Anhaltspunkte.

4.2.2.1 PIIA::*widA*-Expression reagiert auf Verwundung und auf Signale der Pathogenabwehr und Verwundung

Die Behandlung von 12 Tage alten Keimlingen sowie von 4 – 5 Wochen alten Pflanzen im Gewächshaus mit Salicylsäure (SA) oder mit Bion führte nach einer Inkubation von 48 Std. bzw. 24 Std. zu einer Erhöhung der GUS-Aktivität (Abb. 3.30). Im quantitativen Test lag die GUS-Aktivität nach Behandlung mit 50 µM SA bei 517% und nach Behandlung mit 1 mg/ml Bion bei 181% über der Kontrolle. SA wird in der Pflanze in Reaktion auf Pathogenbefall gebildet und dient als Signalmolekül zur Induktion der pflanzeneigenen Pathogenabwehr (Klessig et al., 2000). Bion, eine Benzo-(1,2,3)-thidiazol-7-carbothioic-Säure-S-Methylester (BTH) enthaltende Verbindung, ist eine synthetische Substanz, die über

ihre Fähigkeit hin identifiziert wurde, wie SA die *systemic acquired resistance* (SAR) in der Pflanze auszulösen (Lawton et al., 1995; Lawton et al., 1996). Somit deutet die Induzierbarkeit von PIIA durch SA und Bion auf eine Funktion des *AtPLA IIA*-Gens in der Pathogenabwehr hin. Dieses Resultat deckt sich mit bereits in der Literatur vorhandenen Ergebnissen, wonach eine Phospholipase-A-Aktivität in der Antwort auf Pathogenbefall eine wichtige Rolle einzunehmen scheint (Lee et al., 1992; Mueller et al., 1993; Chandra et al., 1996; Narváez-Vasquez et al., 1999; Roos et al., 1999; Scherer et al., 2000, 2002; Viehweger et al., 2002). Roos et al. (1999) haben gezeigt, dass Zellen von *Eschscholtzia californica* nach Behandlung mit Hefe-Elicitoren eine erhöhte PLA-Aktivität aufweisen und nach dem Applizieren von Oligosaccharid-Elicitoren auf Tomatenblätter konnte ein Anstieg an Lysophosphatidylcholin (ein Produkt der PLA) beobachtet werden (Narváez-Vasquez et al., 1999). Homologe Gene zu den *AtPLA*-Genen aus *Arabidopsis* haben Dhondt et al. (2000) von virusinfizierten Tabakblättern isoliert (*NtPAT1* - *NtPAT3*). Die *NtPAT*-Gene besitzen ebenfalls Homologie zu den Patatinen und eine Phospholipase-A₂-Aktivität. Für *NtPAT2* konnte in derselben Publikation eine Erhöhung der PLA₂-Aktivität im Zuge der Virusinfektion gezeigt werden. Anhand der isolierten Gene konnte zudem gezeigt werden, dass nach Induktion neben der PLA-Aktivität auch zeitlich versetzt die *NtPAT1-3*-Gene transkriptionell heraufreguliert wurden. In *Arabidopsis thaliana* wurde solch ein Zusammenhang bisher nicht beschrieben. Jirage et al. (1999) haben hingegen in *Arabidopsis* das lipase-ähnliche *PAD4*-Gen isoliert, welches entscheidend für die Salicylsäureakkumulation nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ist und dessen Transkription ebenfalls durch SA oder das Pathogen induziert wird. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Lipidmetaboliten an der SA-Signaltransduktion und Pathogenabwehr kam mit der Entdeckung des *EDS1*-Gens, das dieselben Lipasecharakteristika am N-Terminus wie *PAD4* besitzt und notwendig für die SA induzierte Hochregulation des *PRI*- (*PATHOGEN RELATED1*) Transkriptes ist (Falk et al., 1999). *PAD4* hat mit *AtPLA IIA* das Lipase-Motiv (GX SXG) gemeinsam, besitzt aber stärkere Homologie zu den Triacylglycerol-Lipasen und eine Überprüfung der katalytischen Aktivität steht noch aus. Es ist möglich, dass *PAD4*, *EDS1* und *AtPLA IIA* in ähnlicher Weise agieren, entweder über die Regulation der pflanzlichen Pathogenabwehr via freier Fettsäure/Lysophosphatidylcholin-Signale oder direkt auf die Ausbreitung des Pathogens.

Zusätzlich zu SA und Bion führten mechanische Verletzungen des Blattgewebes, sowie die Applikation von 50 µM Jasmonsäure (JA) oder 50 µM 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC, eine chemische Vorstufe des Ethylens) zu einer Induktion der GUS-

Expression in den PIIA::*uidA*-Pflanzen (Abb. 3.30). JA und ACC induzierten die PIIA-GUS-Expression zwar weniger stark als SA, sie lag aber je nach transgener Linie mit 30 – 59% bzw. 26 – 93% über der Kontrolle. Höhere Konzentrationen an JA oder ACC führten zu einer Verminderung der Induktion, was für eine Aktivierung des Promoters durch die verwendete Substanz spricht und dafür, dass die Transkription nicht aufgrund unspezifischer Stressreaktionen verursacht wurde.

Die Induzierbarkeit des PIIA-Promoters durch JA und die Ethylenvorstufe ACC deckt sich mit der Induzierbarkeit durch Verwundung, da beide Verbindungen nach Verwundung in der Pflanze gebildet werden. JA und Ethylen stehen aber auch im Zusammenhang mit der durch SA und Bion repräsentierten Pathogenabwehr. Nach einer Verwundung werden Gene des Octadecanoid-Biosyntheseweges wie die Lipoxygenase1 aus Gerste (Rouster et al., 1997), die Allenoxid-Synthase aus *Arabidopsis* (Laudert und Weiler, 1998) und die 12-Oxophytodienoic-säure Reduktase aus *Arabidopsis* (Biesgen und Weiler, 1999) induziert, und es wird vermehrt Jasmonsäure gebildet.

Jasmonat ist ein Pflanzenhormon und reguliert in der Reaktion der Pflanze auf Verwundung oder Pathogenbefall die Expression verschiedener Gene (Farmer und Ryan, 1992; Titarenko et al., 1997; Penninckx et al., 1998; Manners et la., 1998). Ausgangssubstanz für die JA-Biosynthese ist α -Linolensäure, deren Freisetzung nach einer Verwundung zusammen mit Jasmonat ebenfalls ansteigt (Conconi et al., 1996). Wie zuvor für AtPLA I beschrieben, könnte AtPLA IIA ebenfalls an der Freisetzung der Fettsäure beteiligt sein, nur in diesem Fall eher im Zusammenhang mit einer Antwort auf Verwundung und/oder Pathogenbefall. Unterstützt wird diese These durch die Arbeit von Lee et al. (1996), die nach Verwundung von Tomatenblättern nach 15 Min. einen Anstieg in den verletzten und in den unverletzten Blättern einer Tomatenpflanze beobachtet haben. Narváez-Vásquez et al. (1999) haben einen Anstieg der Phospholipase-A-Aktivität ebenfalls in Tomatenblättern nach Verwundung, Systemin- oder Oligosaccharid-Applikation beobachtet. Hierbei erfolgte die erste Spitze der PLA-Aktivität nach 15 Min. und eine zweite nach 60 Min. Neben JA wird auch Ethylen durch Verwundung und Elicitor-Behandlung vermehrt gebildet (O'Donnel et al., 1996) und ist an der wund- bzw. pathogeninduzierten Genregulation beteiligt (Penninckx et al., 1996; Thomma et al., 1999). Nach Titarenko et al. (1997) und Rojo et al. (1999) dient Ethylen als Signalmolekül für die lokale Reaktion während JA eine systemische Antwort auf Verwundung/Phathogenbefall vermittelt, an dessen Ende jeweils das AtPLA IIA-Gen stehen könnte. Im Gegensatz zur SAR gelten JA und Ethylen als Signalmoleküle der durch nichtpathogene Rhizobakterien ausgelösten induzierten systemischen Resistenz (ISR).

Obwohl SA negativ auf die durch JA/Ethylen regulierte Genexpression wirken kann (Doares et al., 1995; Pieterse und van Loon, 1999; Dangl, 2000), wurden in neueren Arbeiten - neben unterschiedlichen Pathogenspektren von SAR und ISR - auch additive Effekte beider Abwehrstrategien auf einzelne Erreger festgestellt (Devadas et al., 2002; Ton et al., 2002; van Wees et al., 2000). Ob die gesteigerte Resistenz auf einer alleinigen Addition von ISR und SAR beruht oder ob synergistische Effekte eine Rolle spielen, ist nicht klar. Letzteres wird durch eine DNA-Chip Analyse von Schenk et al. (2000) befürwortet, in der 20% von 2375 Genen durch SA, Methyl-JA oder Ethylen induziert wurden und 10 Gene, wie AtPLA IIA, auf alle drei Chemikalien mit einer erhöhten Transkription reagierten.

Die Signalfunktion der freien Fettsäure ist nicht nur an die JA-Biosynthese gekoppelt, sondern beeinflusst direkt Prozesse der Signaltransduktion z.B. durch Aktivierung von Proteinkinasen (Scherer et al., 1993; Van der Hoeven et al., 1996), durch eine MAPK-regulierenden Phosphatase 2C (Baudouin et al., 1999) oder als Elicitor für die Phytoalexin-Biosynthese (Choi et al., 1992).

Ob AtPLA IIA wie NPR1 (van Wees et al., 2000) an der Signaltransduktion der SAR und ISR Reaktion beteiligt ist, kann über die transkriptionelle Regulation nicht beantwortet werden, zunächst scheint es aber, dass AtPLA IIA zumindest am Ende beider Signalwege steht.

Eine Analyse der PIIA-Nukleotidsequenz korreliert mit den Ergebnissen aus den Induktionstests über die Identifikation von in der Literatur beschriebenen cis-Elementen. Wie in der Abbildung 3.34 dargestellt, beinhaltet PIIA Motive, die in der 5'-Region von durch Ethylen induzierbaren Genen gefunden wurden (Montgomery et al., 1993). Weiterhin sind Bindungsstellen für durch pathogen-induzierte Transkriptionsfaktoren (WRKY) enthalten, die in einer vermehrten RNA-Synthese der zu regulierenden Gene resultieren (Chen and Chen, 2000).

Es existieren offenbar diverse Signalwege, die die Reaktion auf Verwundung oder Pathogenbefall in der Pflanze vermitteln und an denen je nach Pflanze, Pathogen und reguliertem Gen verschiedene Proteine/Signale und deren Kombinationen beteiligt sind (siehe Review de Bruxelles und Roberts, 2001; Dangl und Jones, 2001; Dong, 2001; León et al., 2001). Aus den Publikationen der letzten Jahre und auch durch die vorliegende Arbeit erscheint es wahrscheinlich, dass eine Phospholipase A an der durch Verwundung und Pathogenbefall induzierten Signaltransduktion und/oder an Abwehrreaktionen beteiligt ist. Von *Arabidopsis* ist bisher kein einzelnes PLA-Gen beschrieben, das diese Funktionen erfüllt. Ob AtPLA IIA diese Lücke schließt, und ob es an der Signaltransduktion im Minutenbereich

beteiligt ist oder nur von der Pflanze nach Stunden exprimiert wird, um auf die Verbreitung eines Pathogens einzuwirken, oder ob beides der Fall sein könnte, kann aufgrund der vorhandenen Datenbasis nicht entschieden werden. Die Existenz von Crosstalks zwischen den einzelnen Signaltransduktionswegen macht es noch schwieriger das Induktionsmuster der PIIA::*uidA*-Expression in eine distinkte Reaktionsfolge einzuordnen. Es bedarf der weiteren Untersuchung z.B. durch eine *atpla IIA*-Mutante, um die dargestellten Mechanismen zu prüfen.

4.2.2.2 Eisen- und Phosphatmangel induzieren organspezifische GUS-Aktivität in PIIA::*uidA*-Pflanzen

Die *in vitro*-Anzucht von PIIA::*uidA*-Pflanzen unter Fe-Mangel resultierte in einer Erhöhung der GUS-Aktivität innerhalb des Sprosses und in der Wurzel (Abb. 3.30). Unter gleichen Wachstumsbedingungen mit Eisen aber ohne Phosphat erfolgte eine Erhöhung der Promoter-Aktivität, die im wesentlichen auf die Wurzel beschränkt war. Unter Sulfat-Mangel konnte keine Induktion der Promoter-Aktivität festgestellt werden. Eine direkte Verbindung zwischen P- oder Fe-Nährstoffmangel und einem erhöhten Bedarf der Pflanze an einer Phospholipase A konnte auf Grund der existierenden Daten in der Literatur nicht hergestellt werden.

Vermutlich ist die stärkere GUS-Expression als Folge des Nährstoffmangels auf erhöhte Mengen an Ethylen zurückzuführen, wobei Ethylen letztlich, wie mit den Daten von ACC gezeigt, die Promoteraktivität induziert. Borch et al. (1999) haben an der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) gezeigt, dass P-Mangel zur Produktion von Ethylen führt und dass Ethylen an der Ausbildung der P-Mangel-induzierten Wurzelmorphologie beteiligt ist. In ähnlicher Weise gibt es Anzeichen, dass Fe-Mangel zu einer erhöhten Ethylenproduktion führt und für die Anpassung der Pflanze an den Mangel notwendig ist (Romera et al., 1999; Schmidt und Schikora, 2001). In Sorghum wurde ein fünffach höherer Ethylengehalt in der Pflanze nach Eisenmangel-Stress als in der Kontrollvariante mit Eisen gemessen (Morgan und Hall, 1962). Über die Messung der Fe³⁺-Reduktionskapazität als Anpassung der Pflanze an Fe-Mangel konnten Romera und Alcántara (1994) an der Gurke (*Cucumis sativus* L. cv Ashley) zeigen, dass Inhibitoren der Ethylenbiosynthese die Reaktion der Pflanze auf Fe-Mangel hemmen bzw. dass ACC in umgekehrter Weise zur Erhöhung der Reduktionskapazität führt. Schmidt et al. (2000) postulieren nach der Untersuchung von

verschiedenen Hormon-Mangelmutanten, dass Ethylen an der Ausbildung der für Fe-Mangel typischen Wurzelmorphologie beteiligt ist.

Eine weitere Reaktion von so genannten Strategie I-Pflanzen (zu denen auch *Arabidopsis* gehört) auf Fe-Mangel ist die Ansäuerung der Rhizosphäre über eine Aktivierung von ATPasen in der Plasmamembran (Marschner, 1995; Dell'Orto et al., 2000). Da Auxin die Protonensekretion erhöht (Scherer, 2002), könnte sich eine weitere Querverbindung zum Auxin-Signalweg ergeben, in dem die PLA eine Rolle spielt. Es kann spekuliert werden, dass eine Erhöhung der Transkription von *AtPLA IIA* die Auxinsensitivität erhöht. Diese Hypothese ist beim derzeitigen Kenntnisstand sehr vage, da der Auxin-Signalweg noch immer nur lückenhaft bekannt ist (Leyser, 2001; Swarup et al., 2002).

4.2.3 Transkriptionelle Regulation durch den *AtPLA IVA*-Promoter (PIVA)

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus einer Analyse der *AtPLA IVA* mRNA mittels semi-quantitativer RT-PCR (Holk et al., 2002) zeigten die *PIIA::uidA*-Pflanzen neben den basalen Stipeln eine nahezu ausschließliche Expression in den Wurzeln (Abb. 3.26). Die hohe Aktivität von PIVA in den Wurzeln kann vermutlich auf verschiedene Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren, die als Verstärker wirken (s. Kap. 3.2.5.3.2), zurückgeführt werden. In der Literatur sind nur wenige Sequenz-Elemente beschrieben, die eine Wurzel-spezifität verleihen. Eines dieser Elemente (ATATT) befindet sich mehrfach in PIVA und weitere mögliche Sequenzmotive wurden über den Vergleich mit anderen wurzelspezifischen Gen-Promotoren identifiziert (s. Kap. 3.2.5.3.2).

Zusammen mit *AtPLA IIA* wurde auch für rekombinantes *AtPLA IVA*-Protein eindeutig Phospholipase-A-Aktivität nachgewiesen (s. Kap. 3.1.4.3). In der Literatur ist bis dato nichts über eine Phospholipase A in der Wurzel bekannt, und es ist somit schwierig, anhand des Expressionsmusters und der Enzymaktivität dem *AtPLA IVA*-Protein eine bestimmte Funktion zuzuordnen.

Vor dem Hintergrund einer Funktion der Phospholipase A in der Auxin-Signaltransduktion ergeben sich hierfür Ansatzpunkte, da Auxin auch an der Steuerung der Zellelongation und der Seitenwurzelbildung beteiligt ist (Taiz und Zeiger, 1998). Für eine schnelle und intensive Transduktion des Auxin-Signals sollten die ersten Komponenten der Signaltransduktionskette bereits vor dem Signal in ausreichendem Maße vorhanden sein, so wie es das PIVA-Transkriptionsmuster auch für *AtPLA IVA* vermuten lässt. Im Zuge der

Sequenzanalyse von PIVA wurden mehrere cis-Elemente identifiziert, die aus auxin-induzierbaren Promotern bekannt sind. Die PIVA::*uidA*-Pflanzen ließen sich jedoch weder durch Auxin noch durch andere Behandlungen transkriptionell induzieren. Dies muss nicht im Widerspruch zu der zuvor erwähnten Funktion in der Auxin-Signaltransduktion stehen, da eine schnelle Regulation der Enzymaktivität zunächst am Protein erfolgt.

Lagarde et al. (1996) haben mittels transgener Promoter-GUS-Pflanzen die Expression des K⁺-Kanals AKT1 aus *Arabidopsis* untersucht und bis auf die zusätzliche Expression in den Hydathoden ein mit PIVA identisches Expressionsmuster beobachtet. Trotz dieser Kongruenz ergab ein Sequenz-Vergleich des *AKT1*-Promoters mit PIVA keine auffälligen Übereinstimmungen. Eine weitere, Spekulative Funktion der AtPLA IVA könnte im Ionentransport der Wurzel liegen. Zwar ist aus der alleinigen Co-Existenz beider Transkripte kein Zusammenhang abzuleiten, aber an Stomata-Zellen wurde gezeigt, dass freie Fettsäuren (α -Linolensäure, Arachidonsäure) über die Regulation von K⁺-Kanälen ein Öffnen der Stomata induzieren (Lee et al., 1994). Ob ein ähnlicher Mechanismus für die Kalium-Aufnahme in der Wurzel existiert, ist nicht bekannt.

Die Transkription in den basalen Stipeln, wie sie auch für den PIIA-Promoter beschrieben ist (Abb. 3.25 bzw. Abb. 3.26), wurde in der Literatur, meist ebenfalls mit Promoter-GUS-Pflanzen, für verschiedene Gene gezeigt, ohne aber einen übergreifenden Zusammenhang erkennen zu lassen (Igarashi et al., 1998; Kubigsteltig et al., 1999; Passarinho et al., 2001).

Die hohe Spezifität und Transkriptionsrate des PIVA-Promoters über den gesamten Entwicklungszyklus der Pflanze eröffnen interessante Möglichkeiten zur zielgerichteten Expression verschiedenster, ganz anderer Gene mit dem Hintergrund biotechnologischer Optimierung der Pflanze gegenüber wurzelspezifischer Anforderungen wie Nährstoffmangel oder Salzstress.

4.2.4 Transkriptionelle Regulation durch den *AtPLA* IVC-Promoter (PIVC)

Im Gegensatz zu dem *AtPLA* IVA-Promoter zeigte der dritte Promoter der *AtPLA*-Gruppe von Chromosom IV (PIVC) keine Aktivität in der Wurzel. Die GUS-Expression unter der Kontrolle von PIVC beschränkt sich auf die Blüte und dort auf das Pistill. Innerhalb des Pistills durchläuft die PIVC-Aktivität verschiedene Stadien, in denen das GUS-Gen in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird. Kurz vor dem Öffnen der Blüte, wenn die

Petalen noch nicht sichtbar sind, ist die GUS-Expression zunächst auf das Stigma mit den Papillen beschränkt. Bereits vor dem Öffnen der Blüte setzt sich die GUS-Aktivität in den Griffel fort und verlagert sich dann als dünner Schlauch in die Plazenta des Fruchtknotens. Mit dem Öffnen der Blüte verstärkt sich die Promoteraktivität im Gewebe des Fruchtknotens (Abb. 3.29). Gleichzeitig erscheint eine starke Transkriptions-Aktivität von PIVC in den Funikeln, wo sie auch noch nach der Befruchtung und einsetzendem Auswachsen der Schote vorhanden ist. Der räumliche Ablauf der Gen-Aktivität zeichnet den Weg des Pollenschlauches von der Keimung bis zum Erreichen der Eizelle nach. Zeitlich betrachtet, scheint der AtPLA IVC-Promoter vor der Penetration des Pollenschlauches aktiv zu werden. So tritt die anfänglich starke Aktivität im Stigma vor dem Anlanden und Keimen der Pollen auf und verlagert sich dann parallel zum späteren Pfad des Pollschlauchwachstums in den Fruchtknoten bis zu den Funikeln.

Keimung und Wachstum des Pollen bis zum Erreichen des weiblichen Gametophyten wird über Interaktionen des Pollens bzw. des Pollenschlauches mit dem Pistill gesteuert (Cheung, 1995; Wilhelmi und Preuss, 1997; Lush, 1999; Shimizu und Okada, 2000; Lord und Russell, 2002). Damit der Pollen hydratisiert wird und zu keimen beginnt, sind Exudate notwendig, die vom Stigma gebildet werden, oder wie im Fall von *Arabidopsis*, von der Pollenhülle abgegeben werden. Wichtige Bestandteile sind Lipide (Triacylglyceride), deren Vorhandensein die Pollenkeimung und die Penetration des Pollenschlauches in das Stigma ermöglichen (Wolters-Arts et al., 1998). Inwieweit eine PLA hier eine Rolle spielen könnte, ist unklar, da in derselben Arbeit zudem gezeigt wurde, dass freie Fettsäuren wie α -Linolensäure die Lipide nicht ersetzen können. Über die Regulation des gerichteten Pollenschlauchwachstums durch den Griffel in den Fruchtknoten ist bisher wenig bekannt. Es existieren zwei Modelle. Entsprechend dem ersten Modell leiten chemische Verbindungen oder Proteine in der extrazellulären Matrix der Pistillzellen das Wachstum des Pollenschlauches, und durch induzierten Zelltod werden Bahnen im Pistill für den Pollenschlauch vorgebildet (Wang et al., 1996). Es wird angenommen, dass auf diese Weise der Pollenschlauch mit Nährstoffen und energiereichen Verbindungen (Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren) versorgt wird. In einem zweiten Modell werden von der Eizelle oder bestimmten Pistillzellen Locksubstanzen ausgesendet, für die der Pollenschlauch Rezeptoren besitzt und über z.B. einen Konzentrationsgradienten entlang des Pistills den Pollen lenken (Ray et al., 1997; Lush, 1999). Ob AtPLA IVC an der Lenkung des Pollenschlauchwachstums beteiligt ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Auf Grund des Expressionsmusters könnte das Enzym Lipidmetaboliten für die

Versorgung des Pollenschlauches oder sogar Signalsubstanzen liefern. Da freie Fettsäuren auch programmierten Zelltod induzieren (J. Peters, Rutgers Universität; persönliche Mitteilung), kann auch eine solche Funktion entlang des Pollenschlauchwachstums nicht ausgeschlossen werden.

4.2.4.1 PVC::*uidA*-Expression reagiert auf Abscisinsäure und Trockenstress

Unter normalen Wachstumsbedingungen war PIVC nur in der Blüte aktiv. Auch nach einer GUS-Färbedauer von 16 – 20 Std. veränderte sich das GUS-Expressionsmuster nicht. Durch die Applikation von verschiedenen Chemikalien im Induktionstest wurde jedoch zunächst eine Aktivierung in den Wurzeln nach Behandlung mit Abscisinsäure (ABA) festgestellt (Abb. 3.35). Die Induktion der GUS-Expression erfolgte nach 48 bzw. 24 Std. und stieg proportional der ABA-Konzentration von 1 – 100 μ M an. Das Pflanzenhormon ABA ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie Samenentwicklung, Knospen- und Samen-Dormanz und Blattseneszenz beteiligt (Taiz und Zeiger, 1998), sowie in der Reaktion der Pflanze auf abiotischen Stress wie Kälte, Trockenheit und Salinität. Neben der direkten Regulation von physiologischen Prozessen wie der Stomataöffnung resultiert die ABA-Wirkung in der *de novo* Transkription/Expression von vielen Genen, insbesondere während der Embryonalentwicklung und in der Reaktion der Pflanze auf abiotischen Stress (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Busk und Pagès, 1998). Auf Grund der Bedeutung von ABA unter Stressbedingungen wurden die PIVC::*uidA*-Pflanzen Kältestress (10°C, 24 und 48 Std.), Trockenstress (24 Std.) und hoher Salinität (500 mM NaCl) ausgesetzt. In der Kälte- und Salzbehandlung zeigten die Pflanzen keine Reaktion, durch den Trockenstress hingegen wurde in den transgenen Pflanzen, ähnlich der ABA-Induktion, der PIVC-Promoter in den älteren Bereichen der Wurzeln aktiviert (Abb. 3.35). Ähnlich zum AtPLA IVC-Gen konnten Matos et al. (2001) aus *Vigna unguiculata* nach Trockenstress ein patatin-ähnliches Gen (Vupat1) isolieren, welches an Galaktolipiden und schwächer an Phospholipiden eine Acyl-Hydrolase Aktivität besitzt. In *Arabidopsis* wird unter Trockenstress vermehrt ABA synthetisiert (Iuchi et al., 2001), woraus vermutet wird, dass die PIVC-Promoteraktivität unter Trockenstress auf erhöhte endogene ABA-Konzentrationen zurückzuführen ist. Viele Gene, die verstärkt bei Wassermangel exprimiert werden, sind auch durch ABA induzierbar. Hierzu gehören zunächst eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie z.B. die ARFs (ABRE Responsive Factors, Choi et al., 2000), DREB2 (Shinozaki et al., 2000) und MYC/MYB ähnliche Proteine (Urao et al., 1993; Abe et al., 1997). Letztere steuern z.B. die ABA-

abhängige Expression des Trockenstress-Gens rd22 und könnten ebenfalls an mögliche cis-Elemente des PIVC binden (Abb. 3.36). Weitere potentielle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (z.B. ABI3) aus der ABA-Signaltransduktion reflektieren die PIVC-Induktion auf Nukleotidebene. Keiner der beschriebenen Transkriptionsfaktoren ist jedoch auf die Wurzel beschränkt, was die gewebespezifische ABA-Induktion von PIVC erklären könnte. ARSK1, ein wurzelspezifisches Protein aus *Arabidopsis* mit Homologie zu Serin/Threonin-Kinasen, wird durch ABA, NaCl und Trockenstress transkriptionell in der Wurzel hochreguliert (Hwang und Goodman, 1995), aber es konnten keine auffälligen Übereinstimmungen in der ARSK1 Promoterregion zu PIVC gefunden werden. Vermutlich existieren cis-Elemente bisher unbekannter Transkriptionsfaktoren, die aufgrund ihrer geringen Größe (vgl. ACGT als Kern-ABRE) oder Variabilität (vgl. CANNTG) durch Sequenzvergleiche allein nicht identifiziert werden können.

Über die Perzeption des Trockenstress-Signals ist zur Zeit wenig bekannt, jedoch verläuft die intrazelluläre Signaltransduktion vermutlich größtenteils über Proteinkinasen und Lipidmetabolite (Ladyzhenskaya, 2001; Munnik und Meijer, 2001). Zu den beteiligten Enzymen gehören MAPK, Phospholipase C (Sanchez und Chua, 2001) und Phospholipase D (Wang, 1999), die durch ABA und Trockenstress auch transkriptionell hochreguliert werden. Die Reaktionsprodukte der Phospholipasen, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA), gelten als *second messenger* und regulieren z.B. den cytosolischen pH oder die Calcium-Konzentration als Folgeschritte der Stress-Signaltransduktion. Eine Beteiligung von PLA-Produkten konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Unter osmotischem Stress von *Dunaliella salina* konnten Einspahr et al. (1988) eine Änderung des Phospholipidmetabolismus feststellen und Meijer et al. (2001) haben nach Salzstress (NaCl) von *Chlamydomonas* ein Anstieg an Lyso-Phosphatidsäure gemessen. Dass Lysophosphatidylcholin eine Aktivierung eines Na⁺/H⁺-Austausches aus der Vakuole steuert, haben Viehweger et al. (2002) gezeigt, was auf eine Ähnlichkeit in den Signalwegen für Trockenstress und NaCl-Stress deuten könnte. Obwohl viele Gene durch beide Reize hochreguliert werden unterscheidet die Pflanze in der Reaktion auf ionischen Stress und Trockenstress, wie auch an der transkriptionellen Regulation von PIVC deutlich wird, die sich nicht durch hohe NaCl-Konzentrationen induzieren ließ.

Zusammengefasst deuten die Hinweise aus der Literatur auf eine Funktion einer PLA in der Reaktion von Pflanzen auf Trockenstress hin. An Hand der vorliegenden Daten könnte *AtPLA IVC* hierfür ein geeignetes Gen in *Arabidopsis* sein.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die *AtPLA*-Genfamilie umfasst zehn Mitglieder und wurde zuvor in dem Genom von *Arabidopsis* über Homologien zu Phospholipase-A₂ (PLA₂)-Proteinen aus dem tierischen System identifiziert (Holk et al., 2002). Die Funktionen der einzelnen Mitglieder sind bisher nicht beschrieben. Um Aufschluss über die Eigenschaften und mögliche Funktionen der identifizierten *AtPLA*-Gene aus *Arabidopsis* zu erlangen, wurde die enzymatische Aktivität und die transkriptionelle Regulation von verschiedenen Mitgliedern der Genfamilie untersucht. Für die Phospholipase A (PLA) im pflanzlichen System wird eine Funktion in der auxin- und elicitor-induzierten Signaltransduktion sowie in der Reaktion auf Verwundung postuliert.

Drei Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie (*AtPLA I*, *AtPLA IIA* und *AtPLA IVA*) wurden auf der Grundlage vorhandener cDNAs in *Escherichia coli* als rekombinantes Protein überexprimiert und in einem Enzymtest auf Phospholipase-Aktivität hin untersucht. Zwei Varianten des *AtPLA I*-Gens, die sich in der Größe unterschieden, wurden als rekombinante Proteine Enzym I_{kurz} und Enzym I überexprimiert. Beide Versionen resultierten in der Bildung von schwer löslichen Proteinaggregationen, ohne Phospholipase-Aktivität. Auch nach chaotroper Lyse und anschließender Rückfaltung von Enzym I_{kurz} konnte mit diesem Protein keine Enzymaktivität detektiert werden. Die Überexpression von *AtPLA IIA* und *AtPLA IVA* hingegen führte zu löslichem, rekombinantem Protein, das als Enzym IIA bzw. Enzym IVA bezeichnet wurde. In Enzymtests mit den gereinigten Proteinen besaßen Enzym IIA und Enzym IVA Phospholipase A₁- sowie Phospholipase A₂-Aktivität. Die enzymatische Aktivität beider Proteine wurde durch Variation der Reaktionsparameter und durch Applikation von Inhibitoren aus dem tierischen System näher untersucht. Enzym IIA benötigte neben Calcium ein reduzierendes Agens (z.B. Cystein) im Reaktionspuffer und ließ sich durch die Inhibitoren AACOCF₃, NDGA und PACOCF₃ hemmen. Enzym IVA benötigte ebenfalls Calcium zur Aktivität, aber kein reduzierendes Agens und wurde mit zwei weitere Substanzen (ETYA und HELSS), durch insgesamt fünf getestete Inhibitoren gehemmt. Beide Enzyme hatten in pH 7–8 ihre Aktivitätsoptima. Die Ergebnisse unterstützen Kenntnisse über die Existenz von cytosolischen Phospholipase-A-Enzymen im Genom von *Arabidopsis thaliana* und stehen gleichzeitig im Einklang mit Biotests, in denen die hier verwendete Inhibitoren auxin- und elicitor-induzierte physiologische Reaktionen hemmten.

Um weitere Informationen über die biologische Funktion der identifizierten *AtPLA*-Gene zu erhalten, wurde die transkriptionelle Regulation von *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC* untersucht. Es wurden die zugehörigen 5'-Regionen der Gene (= Promoter) isoliert und in Kombinationen mit dem GUS-Reportergen stabil in *Arabidopsis* transformiert. Die Promotoren wurden in Anlehnung an die Nomenklatur der Gene als PI, PIIA, PIVA und PIVC bezeichnet. Die GUS-Expression unter der Kontrolle von PI beschränkte sich auf die Pollen, die Trichome und die Sprossbasis. PIIA war hingegen in den Blättern, den Stipeln, älteren Bereichen der Wurzel und in der Kalyptra aktiv. In Induktionsexperimenten wurde zudem durch Verwundung, durch Signale der Verwundung und der Pathogenabwehr (SA, Bion, ACC, JA), sowie durch Eisen- und Phosphatmangel die Promoteraktivität von PIIA erhöht. PIVA war sehr stark in dem Cortexgewebe der Wurzel aber nicht in der Wurzelspitze aktiv und, wie PIIA, in den Stipeln. Der vierte Promoter (PIVC) zeigte eine hohe Aktivität im Pistill und ließ sich durch Abscisinsäure und Trockenstress in der Wurzel induzieren. Kombinationen aus PI-GUS und PIVA-GUS ließen sich durch keine der durchgeführten Behandlungen in ihrer Expression verändern.

Für viele Proteine der Signaltransduktion wurde gezeigt, dass die entsprechenden Gene durch die am Anfang stehenden Signale auch in der Transkription hochreguliert werden. Die Ergebnisse von Enzym IIA und PIIA können so interpretiert werden, dass das Protein *AtPLA IIA* eine Funktion vorwiegend in der Pathogenabwehr und in der dabei stattfindenden Signaltransduktion hat. *AtPLA I* könnte, aufgrund der transkriptionellen Lokalisation in polaren Zelltypen, in der Pflanze am polaren Zellwachstum beteiligt sein. Seine Funktion könnte auch im Zusammenhang damit stehen, dass es für den Gravitropismus offenbar eine wichtige Funktion hat (A. Holk u. G. Scherer, Hannover, pers. Mitteilung), die sich als Beeinflussung der Polarität interpretieren lässt und die zudem auf einen Zusammenhang mit dem Auxin-Signaltransduktionsweg deutet. Die hohe Transkriptionsrate von *AtPLA IVA* in der Wurzel könnte eine Funktion in der auxin-regulierten Zellelongation und/oder der Seitenwurzelbildung bedeuten und *AtPLA IVC* besitzt offensichtlich eine Funktion in der Reaktion auf Trockenstress. Eine exakte funktionelle Zuordnung der *AtPLA*-Gene kann durch entsprechende Mutanten untersucht werden, die auf den hier erarbeiteten Ergebnissen aufbauen.

6 Literatur

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. und Shinozaki, K. (1997): Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic-acid regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Ackermann, E.J., Conde-Fieboes, K. und Dennis, E.A. (1995): Inhibition of macrophage Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* 270(1): 445-450.
- Andrews, D.L., Beames, B., Summer, M.D. und Park, W.D. (1988): Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem. J.* 252(1): 199-206.
- Balsinde, J. (2002): Roles of various phospholipases A_2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364: 695-702.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A. and Dennis, E.A. (1999): Regulation and inhibition of phospholipase A_2 . *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 175-189.
- Baudouin, E., Meskiene, I. und Hirt, H. (1999): Unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant J.* 20(3): 343-348.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993): *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. III*, 316: 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992): New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197.

- Bibikova, T.N., Blancaflor, E.B. und Gilroy, S. (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17(6): 657-665.
- Biesgen, C., Weiler, E. W. (1999): Structure and Regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 208: 155-165.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-1523.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q. und Zenk, M.H. (1995): The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4099-4105.
- Borch, K, Bouma, T.J., Lynch, J.P. und Brown, K.M. (1999): Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment* 22: 425 – 431.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. und Jones, R.L. (2000): *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville Maryland.
- Busk, P.K. und Pagès, M. (1998): Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37: 425-435.
- Chaminade, B., Le Balle, F., Fourcade, O., Nauze, M., Delagebeaudeuf, C., Gassama-Diagne, A., Simon, M.-F., Fauvel, J. und Chap, H. (1999): New developments in phospholipase A₂. *Lipids* 34, suppl.: 49-55.

- Chandra, S., Heinstein, P.F. and Low, P.S. (1996): Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110: 979-986.
- Chen, C. and Chen, Z. (2000): Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42: 387-396.
- Chen, Y. und Dennis, E.A. (1998): Expression and characterization of human group V phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1394: 57-64.
- Cheung, A.Y. (1995) : Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3077-3080.
- Choi, D., Ward, B.L. und Bostock, R.M. (1992): Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4: 1333-1344.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. und Kim, S.Y. (2000): ARFs, a family of ABA-responsive binding factors. *J. Biol. Chem.* 275(3): 1723-1730.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A. and Ryan, C.A. (1996): Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111: 797-803.
- Creelman, R.A. und Mullet, J.E. (1997): Oligosaccharines, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Davis, S.J. und Vierstra, R.D. (1998): Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36(4): 521-528.

- de Bruxelles, G.L. und Roberts, M.R. (2001): Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20(5): 487-521.
- Devadas, S.K., Enyedi, A. und Raina, R. (2002): The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J.* 30(4): 467-480
- Dolferus, R. (1991): Isolation of DNA and RNA from *Arabidopsis thaliana*. In: *Bio Methods, A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology*. Editor by Negruku, J.; Ghark-Chhetri, G. B. Birkhäuser Verlag 1991: 133-152.
- Donald, R. G. K. and Cashmore, A. (1990): Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *The EMBO J.* 9(6): 1717-1726.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M. and Heitz, T. (2000): Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxilipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.* 23(4): 431-440.
- Dong, X. (2001): Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 309-314.
- Du, L., Chen, Z. (2000): Identification fo genes encoding receptor-like protein kinases as pollible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24(6): 837-847.
- Einspahr, K.J., Maeda, M. und Thompson jr., G.A. (1988): Concurrent changes in *Dunaliella salina* ultrastructure and membrane phospholipid metabolism after hyperosmotic shock. *J. Cell Biol.* 107: 529-538.

- Ellerström, M., Stålberg, K., Ezcurra, I. und Rask, L. (1996): Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol. Biol.* 32: 1019-1027.
- Elmayan, T. and Tepfer, M. (1995): Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. *Transgenic Research* 4: 388-396.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. und Somssich, I.E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5(5): 199-206.
- Evans, I.M., Gatehouse, L.N., Gatehouse, J.A., Robinson, N.J. und Croy, R.R. (1990): A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett.* 262(1): 29-32.
- Ezcurra, I., Ellerström, M., Wycliffe, P., Stålberg, K. und Rask, L. (1999): Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.* 40: 699-709.
- Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerström, M. und Rask, L. (2000): Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different *cis*-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J.* 24(1): 57-66.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J. and Parker, J.E. (1999): *EDS1*, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eucaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3292-3297.
- Farmer, E.E. (1994): Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26: 1423-1437.

- Fischer, B., Sumner, I. und Goodenough, P. (1993): Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 3-13.
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2000): Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393-404.
- Galliard, T. (1971): The enzymatic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato. *Biochem. J.* 121(3): 279-290.
- Gräler, M.H. und Goetzl, E.J. (2002): Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim. Biophys. Acta* 1582: 168-174.
- Hamilton, D. A., Schwarz, Y. H., Mascarenhas, J. P. (1998): A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol* 38: 663-669.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G., Alford, W.J. und Pietrokovski, S. (1995): Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene-COMBIS, Gene* 163: 17-26.
- Higo, K., Ugawa, Y, Iwamoto, M und Korenaga, T, (1999): Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research* 27(1): 297-300.
- Hoff, T., Stummann, B.M. und Henningsen, K.W. (1991): Cloning and expression of a gene encoding a root nitrate reductase in bean *Phaseolus vulgaris* (bean). *Physiol. Plant.* 82: 197-204.
- Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Quader, H. and Scherer, G.F.E. (2002): Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol.* in press.

- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. und Korenaga, T. (1999): Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* 27(1): 297-300.
- Hirschberg, H.J.H.B., Simons, J.-W.F.A., Dekker, N. und Egmond, M.R. (2001): Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* 268: 5037-5044.
- Hwang, I. und Goodman, H.M. (1995): An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* 8(1): 37-43.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001): The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13(10): 2191-209.
- Ishiguro, S. and Nakamura, K. (1992): The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol* 18: 97-108.
- Itzhaki, H., Maxson, J.M., Woodson, W. R. (1994): An ethylene responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (*GST1*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8925-8929.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2001): Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27(4): 325-333.
- Jacqmard, A., Veylder, L. Segers, G., de Almeida Engler, J., Bernier, G., Van Montagu, M. and Inze, D. (1999): Expression of CKS1At in *Arabidopsis thaliana* indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoredublication cycle. *Planta* 207(4): 496-504.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6(13): 3901-7.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M. and Glazebrook, J. (1999): *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *PNAS* 96(23): 13583-13588.
- Jung, K.M. and Kim, D.K. (2000): Purification and characterization of a membrane-associated 48-kilodalton phospholipase A₂ in leaves of broad bean. *Plant Physiol.* 123: 1057-1067.
- Kagaja, Y., Ohmiya, K., Hattori, T. (1999): RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acid Research* 27(2): 470-478.
- Kato, T., Morita, M.T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M. and Tasaka, M. (2002a): SRG2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 33-46.
- Kato, T., Morita, M.T. und Tasaka, M. (2002b): Role of endodermal cell vacuoles in shoot gravitropism. *J. Plant Growth Regul.* 21(2): 113-119.
- Kaufmann, P.B., Wu, L., Brock, T.G., and Kim, D. (1995). Hormones and the orientation of growth. In *Plant Hormones*, P.J. Davies, ed al. (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers): 547-571.
- Kim, J.Y., Chung, Y.S., Ok, S.H., Lee, S.G., Chung, W.I., Kim, I.Y. und Shin, J.S. (1999): Characterization of the full-length sequences of phospholipase A₂ induced during flower development. *Biochim. Biophys. Acta* 1489: 389-392.
- Keller, B. und Lamb, C.J. (1989): Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev.* 3(10): 1639-1646.

- Kobe, B. und Deisenhofer, J. (1995): A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374: 183-186.
- Knippers, R. (1997): *Molekulare Genetik*. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Krishnakumar, S. und Oppenheimer, D.G. (1999): Extragenic suppressors of the *Arabidopsis zwi-3* mutation identify new genes that function in trichome branch formation and pollen tube growth. *Development* 126: 3079-3088.
- Kubigsteltig, I., Laudert, D., Weiler, E. W. (1999): Structure and Regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* 208: 463-471.
- Ladyzhenskaya, E.P. (2001): Pathways of the abscisic acid hormonal signal transduction across the plant plasma membrane. *Membr. Cell Biol.* 14(6): 699-713.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S. and Grignon, C. (1996): Tissue-specific expression of *Arabidopsis AKT1* gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J.* 9(2): 195-203.
- Laudert, D. and Weiler, E.W. (1998): Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15(5): 675-684.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., Ryals, J. (1995): Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis* Requires Salicylic Acid but Not Ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8(6): 863-870.
- Lawton, Kay A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10(1): 71-82.
- Lee S.-S., Kawakita K., Tsuge T. und Doke N. (1992): Stimulation of phospholipase A₂ in strawberry cells treated with AF-toxin 1 produced by *Alternaria alternata* strawberry phenotype. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 41: 283-294.

- Lee, Y., Lee, H.J., Crain, R.C., Lee, A. und Korn, S.J. (1994): Polyunsaturated fatty acids modulate stomatal aperture and two distinct K^+ channel currents in guard cells. *Cell Signal*. 6(2): 181-186.
- Lee, S., Suh, S., Kim, S., Crain, R.C., Kwak, J.M., Nam, H.-G. and Lee, Y. (1997): Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J*. 12(3): 547-556.
- León, J., Rojo, E. and Sánchez-Serrano, J.J. (2001): Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot*. 52(354): 1-9.
- Leyser, O. (2001): Auxin signalling: the beginning, the middle and the end. *Curr. Opin. Plant Biol*. 4(5): 382-386.
- Lio, Y.-C. und Dennis, E.A. (1998): Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 . *Biochim. Biophys. Acta* 1392: 320-332.
- Liu, Z.-B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1994): Soybean *GH3* promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* (6): 645-657.
- Lord, E.M. und Russell, S.D. (2002): The mechanisms of pollination an fertilization in plants. Review in advance; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 18: 81-105.
- Lush, W.M. (1999): Whither chemotropism and pollen tube guidance? *Trends in Plant Science* 4(10): 413-418.
- Ma, Z., Ramanadham, S., Kempe, K., Chi, X.S., Ladenson, J. und Turk, J. (1997): Pancreatic islets express a Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 enzyme that contains a repeated structural motif homologous to the integral membrane protein binding domain of ankyrin. *J. Biol. Chem*. 272(17): 11118-11127.

- Macri, F., Braidot, E., Petrusa, E. und Vianello, A. (1994): Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1215(1-2): 109-114.
- Manners, J.M., Penninckx, I.A.M.A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R.L., Morgan, A., Maclean, D.J., Curtis, M.D., Cammue, B.P.A. und Broekaert, W.F. (1998): The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol. Biol.* 38: 1071-1080.
- Marschner, H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. Second edition, Academic Press.
- Matos, A.R., d'Arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J-C., Zuily-Fodil, Y. und Pham-Thi, A.T. (2001): A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett.* 491: 188-192.
- May, C., Preisig-Müller, R., Höhne, M., Gnau, P. und Kindl, H. (1998): A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1393: 267-276.
- McConn, M. und Browse, J. (1996): The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8: 403-416.
- McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., An Y.Q. und Meagher, R.B. (1996): Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: 587-602.
- Meijer, H.J.G., Arisz, S.A., Himbergen, J.A.J., Musgrave, A. und Munnik, T. (2001): Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 25: 541-548.

- Mengiste, T. Amedeo, P. und Paszkowski, J. (1997): High-efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* with a selected marker gene regulated by the T-DNA 1' promoter. *Plant J.* 12(4): 945-948.
- Menkens, A. E., Schindler, U., Cashmore, A. R. (1995): The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biological Science* 20: 506-510.
- Mignery, G.A., Pikaard, C.S., Hannapel, D.J. und Park, W.D. (1984): Isolation and sequence analysis of cDNAs for the major tuber protein, patatin. *Nucleic Acids Res.* 12(21): 7987-8000.
- Misawa, S. und Kumagai, I. (1999): Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers (Peptide Science)* 51: 297-307.
- Montgomery, J., Goldman, S., Deikman, J., Margossian, L., Fischer, R. L. (1993): Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5939-5943.
- Moreau, R.A. und Morgan, C.P. (1988): Proteolytic activation of a lipolytic enzyme activity in potato leaves. *Plant Sci.* 55: 205-211.
- Morgan, P.W. und Hall, W.C. (1962): Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. *Physiol. Plant.* 15: 420-427.
- Morgenstern, B. (1999): DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 15: 211 – 218.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M. (1993): Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494

- Munnik, T., Irvine, R.F. und Musgrave, A. (1998): Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1389: 222-272.
- Munnik, T. und Meijer, H.J.G. (2001): Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Lett.* 498: 172-178.
- Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M.V., Tischfield, J.A. und Kudo, I. (1998): The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* 273(23): 14411-14423.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Narváez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J. and Ryan, C.A. (1999): Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11: 2249-2260.
- Nevalainen, T.J., Haapamäki, M.M. und Grönroos, J.M. (2000): Roles of secretory phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 83-90.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B. Jr. (1997): GeneDoc, a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author, www.psc.edu/biomed/gendoc.
- Nishimura, A., Morita, M. und Sugino, Y. (1990): A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18(20): 6169.
- Nitz, I., Berkefeld, H., Puzio, P. S., Grundler, F. M. W. (2001): *Pyk10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Journal Plant Sci.* 161(2): 337-346.

- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., Bowles, D. J. (1996): Ethylene is a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Palmgren, M.G. und Sommarin, M. (1989): Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 90: 1009-1014.
- Palmgren, M.G., Sommarin, M., Ulvskog, P. und Jørgensen, P.L. (1988): Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A₂. *Physiol. Plant.* 74: 11-19.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. und Feyereisen, R. (2002): A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 31(1): 1-12.
- Paul, R., Holk, A. and Scherer, G.F.E. (1998): Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A₂ activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J.* 16(5): 601-611.
- Pennickx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Métraux, J.-P., Broekaert, W. F. (1998): Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-2113.
- Pieterse, C.M.J. und van Loon, L.C. (1999): Salicylic acid independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58.
- Prestridge, D.S. (1991): SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *CABIOS* 7, 203-206.

- Quaedvlieg, N.E.M., Schlaman, H.R.M., Admiraal, P.C., Wijting, S.E., Stougaard, J. und Spaijk, H.P. (1998): Fusions between green fluorescent protein and β -glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters. *Plant Mol. Biol.* 37: 715-727.
- Ray, S., Park, S.-S. und Ray, A. (1997): Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development* 124: 2489-2498.
- Rogers, H.J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D.M. and Twell, D. (2001): Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol. Biol.* 45: 577-585.
- Rojo, E., León, J., Sanchez-Serrano, J. J. (1999): Cross-talk between wound-signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 135-142
- Romera, F.J. und Alcántara, E. (1994): Iron-Deficiency Stress Responses in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Roots. *Plant Physiol.* 105: 1133-1138.
- Romera, F.J., Alcántara, E. und de la Guardia, M.D. (1999): Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by strategy I plants. *Annals of Botany* 83: 51-55.
- Roos, W., Dordschbal, B., Steighardt, J., Hieke, M., Weiss, D. and Laalbach, G. (1999): A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochem. Biophys. Acta* 1448: 390-402.
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J. and Cameron-Mills, V. (1997): Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.* 11(3): 513-523.

- Ruchton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1996): Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15(20): 5690-5700.
- Ryan, C.A. (2000): The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 112-121.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, J.-P. und Chua, N.-H. (2001): *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13: 1143-1154.
- Sato, F., Kitajima, S., Koyama, T., Yamada, Y. (1996): Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC cis-sequence. *Plant Cell Physiol.* 37(3): 249-55.
- Schaller, F. (2001): Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* 52(354): 11-23.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. und Manners J.M. (2000): Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(21): 11655-11660.
- Scherer, G.F.E. (1995): Activation of phospholipase A₂ by auxin and mastoparan in hypocotyl segments from zucchini and sunflower. *J. Plant Physiol.* 145: 483-490.
- Scherer, G.F.E. (2002): Secondary messengers and phospholipases A₂ in auxin signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 49: 357-372.

- Scherer, G.F.E. and André, B. (1989): A rapid response to plant hormone: auxin stimulates phospholipase A₂ in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163(1): 111-117.
- Scherer, G.F.E. und Arnold, B. (1997): Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* 202: 462-469.
- Scherer, G.F.E., Hecker, D. und Müller, J. (1993): Ca²⁺ ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membranes and tonoplast purified by free-flow electrophoresis. *J. Plant Physiol.* 142: 432-437.
- Scherer, G.F.E., Paul, R. and Holk, A. (2000): Phospholipase A₂ in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Growth Regulation* 32: 123-128.
- Schmidt, W. und Schikora, A. (2001): Different pathways are involved in phosphate and iron stress induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol.* 125: 2078-2084.
- Schmidt, W., Tittel, J. und Schikora, A. (2000): Role of Hormones in the Induction of Iron Deficiency Responses in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol.* 122: 1109-1118.
- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (1996): A cytosolic phospholipase A₂ from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol.* 37(3): 347-353.
- Serhan, C.N., Haeggström, J. and Leslie, C.C. (1996): Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 10: 1147-1158.
- Shimizu, K.K. und Odada, K. (2000): Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. *Development* 127: 4511-4518.

- Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997): Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217-223.
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R., Boulter, D. (1989): Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 215: 326-331.
- Six, D.A. and Dennis, E.A. (2000): The expanding superfamily of phospholipases A₂ enzymes: classification and characterisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1-19.
- Snijder, H.J., Van Eerde, J.H., Kingma, R.L., Kalk, K.H., Dekker, N., Egmond, M.R. und Dijkstra, B.W. (2001): Structural investigations of the active-site mutant Asn156Ala of outer membrane phospholipase A: Function of the Asn-His interaction in the catalytic triad. *Protein Science* 10: 1962-1969.
- Sowka, S., Wagner, S., Krebitz, M., Arija-Mad-Arif, S., Yusof, F., Kinaciyan, T., Brehler, R., Scheiner, O. und Breiteneder, H. (1998): cDNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b 7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 255: 213-219.
- Ståhl, U., Ek, B. und Stymne, S. (1998): Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A₂ from developing seeds of elm. *Plant Physiol.* 117: 197-205.
- Ståhl, U., Lee, M., Sjö Dahl, S., Archer, D., Cellini, F., Ek, B., Iannaccone, R., MacKenzie, D., Semeraro, L., Tramontano, E. und Stymne, S. (1999): Plant low-molecular-weight phospholipase A₂ (PLA₂) are structurally related to the animal secretory PLA₂ and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol. Biol.* 41: 481-490.

- Stålberg, K., Ellerström, M., Ezcurra, I., Ablov, S. und Rask, L. (1996): Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* 199: 515-519.
- Stintzi, A. und Browse, J. (2000): The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *PNAS* 97(19): 10625-10630.
- Street, I.P., Lin, H.-K., Laliberté, F., Ghomashchi, F., Wang, Z., Perrier, H., Tremblay, N.M., Huang, Z., Weech, P.K. und Gelb, M.H. (1993): Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A₂. *Biochemistry* 32: 5935-5940.
- Suurmeijer, C.N., Perez-Gilabert, M., van Unen, D.J., van der Hijden, H.T., Veldink, G.A. und Vliegthart, J.F. (2000): Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochemistry* 53(2): 177-185.
- Swarup, R., Pary, G., Graham, N., Allen, T. und Bennett, M. (2002): Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol. Biol.* 49: 411-426.
- Szymanski, D.B., Marks, M.D. und Wick, S.M. (1999): Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2331-2347.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (1998): *Plant Physiology*, second edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers; Sunderland Massachusetts.
- Tang, J., Kriz, W., Wolfmann, N., Shaffer, M., Seehra, J. und Jones, S. (1997): A novel calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs. *J. Biol. Chem.* 272(13): 8567-8575.

- Titarenko, E., Rojo, E., León, J. and Sánchez-Serrano, J.J. (1997): Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115: 817-826.
- Tjoelker, L.W. und Stafforini, D.M. (2000): Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 102-123.
- Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C. und Pieterse C.M.J. (2002): Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15(1): 27-34.
- Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R.A., Ushiba, J. and McCormick, S. (1991): Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes and Development* 5: 496-507.
- Twyman, R.M. (1999): *Advanced Molecular Biology. A Concise Reference.* BIOS Scientific Publishers, Springer Verlag.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. und Shinozaki, K. (1993): An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.
- Van der Hoeven, P.C.J., Siderius, M., Korthout, H.A.A.J., Drabkin, A.V. und De Boer, A.H. (1996): A calcium and free fatty acid-modulated protein kinase as putative effector of the fusicoccin 14-3-3 receptor. *Plant Physiol.* 111: 857-865.
- van Haute, Joes, H., Warren, G., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983): Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti-Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2: 411-417.

- van Wees S.C.M., de Swart E.A.M., van Pelt J.A., van Loon L.C., Pieterse C.M.J. (2000): Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8711-8716
- Vidali, L. und Hepler, P.K. (2001): Actin and pollen tube growth. Protoplasma 215 (1-4): 64-76.
- Viehweger, K., Dordschbal, B. and Roos, W. (2002): Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. Plant Cell 14: 1509-1525.
- Wang, H., Wu, H.M und Cheung, A.Y. (1996): Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. Plant J. 9(5): 715-727.
- Wang, X. (1999): The role of phospholipase D in signaling cascades. Plant Physiol. 120: 645-651.
- Warren, R.F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E. und Innes, R.W. (1998): A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. Plant Cell 10: 1439-1452.
- Watanabe, K., Sakai, F. and Orii, H. (1997): Stepwise dilution screening of a cDNA library by polymerase chain reaktion. Analytical Biochemistry 252: 213-214.
- Weiher, H., König, M. und Gruss, P. (1983): Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. Science 219: 626-631.
- Wilhelmi, L.K. und Preuss, D. (1997): Blazing new trails: Pollen tube guidance in flowering plants. Plant Physiol. 113: 307-312.

Winstead, M.V., Balsinde, J. und Dennis, E.A. (2000): Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 28-39.

Wolters-Arts, M., Lush, W.M. und Mariani, C. (1998): Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature Genetics* 392(6678): 818-821.

Xu, N., Hagen, G. und Guilfoyle, T. (1997): Multiple auxin response modules in the soybean *SAUR 15A* promoter. *Plant Science* 126: 193-201.

Yamamoto, Y.T., Taylor, C.G., Acedo, G.N., Cheng, C.L. und Conkling, M.A. (1991): Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell* 3(4): 371-382.

Yi, H., Park, D. and Lee, Y. (1996): In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiol. Plant.* 96: 359-368.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Steffen Rietz
Geburtsdatum: 01.07.1992
Geburtsort: Braunschweig

Schulbildung:

1979 – 1983 Grundschule Wendeburg
1983 – 1985 Orientierungsstufe Wendeburg
1985 – 1989 Realschule Vechelde
1989 – 1992 Lessinggymnasium in Braunschweig
Schulabschluss Abitur

Zivildienst:

1992 – 1993 Diakonisches Werk in Braunschweig

Studium:

1993 – 1998 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Universität Hannover
Diplomarbeit am Institut für Pflanzenernährung der Universität Hannover
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Horst zum Thema:
Möglichkeiten der Verbesserung der Phosphor-Versorgung von Mais
durch Leguminosen als Vorfrucht in Nord-Nigeria.

Promotion:

1999 - 2002 Promotion am Institut für Zierpflanzenbau, Baumschule und
Pflanzenzüchtung, Abteilung Spezielle Ertragsphysiologie, der
Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G.F.E.
Scherer

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen:

Rietz, S., Holk, A. und Scherer, G.F.E.: Crosstalk of the patatin-related phospholipase A-gene *AtPLA IIA* in *Arabidopsis thaliana* to plant defense, wounding and iron and phosphate deficiency. Eingereicht Oktober 2002.

Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M., Quader, M. und Scherer, G.F.E. (2002): Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiology*, in press.

Konferenzbeiträge:

Rietz, S., Holk, A. und Scherer, G.F.E. (2002): Expression of the patatin-related phospholipase A-gene *AtPLA IIA* in *Arabidopsis thaliana* and crosstalk to salicylic acid, wounding, ethylene and iron and phosphate deficiency. Deutsche Botanikertagung, Freiburg.

Rietz, S., Holk, A. und Scherer, G.F.E. (2002): Patatin-like phospholipase A genes from *Arabidopsis* are involved in auxin signal transduction and their transcription responds to biotic and abiotic signals. In: *Plant Biology 2002*, annual meeting of the American Society of Plant Biologists, Denver: p. 176.

Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M., Quader, H., Martinek, J. und Scherer, G.F.E. (2001): Genes of phospholipase A₂ (PLA₂) in auxin signal transduction. 17th International Conference on Plant Growth Substances. Brno, Czech Republic

Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M., Quader, H. und Scherer, G.F.E. (2001) Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung der cytosolischen PLA₂-Genfamilie in der Auxin-Signaltransduktion. 14. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen

Scherer, G.F.E., Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M. und Paul, R. (2000): Molecular identification of the phospholipase A₂ activated by auxin and elicitor. American Society of Plant Physiologists, San Diego

Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M., Paul, R. und Scherer, G.F.E. (2000): Molekulare Betrachtung der auxin- und elicitor-aktivierten Phospholipase A₂. Botanikertagung in Jena

Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M., Paul, R.U., Martinek, J. und Scherer, G.F.E. (2000): Molecular identification of the phospholipase A₂ activated by auxin and elicitor. In: 12th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Vol. 38, s. 72.

Paul, R., Holk, A., **Rietz, S.**, Zahn, M. und Scherer, G.F.E. (1999): Auxin stimulation of phospholipase A₂. In: *Biologia Plantarum* 42 (suppl.), s. 34.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.F.E. Scherer für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein Interesse und die stets freundliche Unterstützung während der Durchführung.

Herrn Dr. André Holk danke ich für zahlreiche Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitgliedern des Instituts für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung sowie Herrn Dr. C. Zeilinger (Institut für Biophysik) und Herrn Dr. A. Gau (Institut für Botanik) danke ich für die nette Zusammenarbeit und für die technische Unterstützung.

Hiermit erkläre ich, bei der Ausfertigung der vorliegenden Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Hannover,