

Funktionelle Diversifizierung in Auxin-gesteuerten Wurzelfunktionen bei einer
Tandem-Duplikation in der Genfamilie der Phospholipase A von
Arabidopsis thaliana

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

von

Dipl. - Biol. Esther Oppermann
geboren am 01.05.1976 in Walsrode

2004

Referent: Prof. Dr. G. Scherer

Korreferent: Prof. Dr. H. Jacobsen

Tag der Promotion: 08. Februar 2005

Zusammenfassung

Patatin-ähnliche Phospholipasen haben in der Pflanze unter anderem Funktionen in der Pathogenabwehr und der Auxinsignaltransduktion. Zudem sind sie verwandt mit den Ca^{2+} -unabhängigen Phospholipasen A_2 des Tierreichs. Für eine Funktionsanalyse von vier der zehn Patatin-ähnlichen PLAs (*AtPLAs*) aus *Arabidopsis* erfolgte die Isolierung von je zwei T-DNA Insertionsmutanten. Da nach Anzucht der isolierten Insertionsmutanten keine Korrelation zwischen den morphologischen Eigenschaften und der Transkription der Gene in einzelnen Organen bestand, waren aufwändigere morphologische und physiologische Analysen notwendig. Es wurde der Schwerpunkt der Funktionsanalysen auf *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* gelegt, die in Tandem-Position im Genom vorliegen und höchst wahrscheinlich aus einer Genduplikation hervorgegangene Gene sind. Eine von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte, dass *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* zu 88 % identisch sind, wobei nur fünf Aminosäuren physikochemisch andere Eigenschaften aufweisen. Da beide in der Wurzel transkribiert werden, wurde das Hauptmerkmal der Untersuchungen auf die Wurzelmorphologie gelegt. Die isolierten Insertionsmutanten *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* zeigten bei Wachstum auf Minimalmedium eine Reduktion der Seitenwurzelanzahl von 50 % gegenüber dem Wildtyp. Zudem reagierten die Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp sensitiver auf Eisenmangel. Dabei war die Hauptwurzel- und Hypokotyllänge gegenüber dem Wildtyp reduziert und die Seitenwurzelanzahl erhöht. Die transkriptionelle Untersuchung von vorliegenden Promotor::*uidA* Pflanzen von *AtPLA IVA* zeigte eine Erhöhung der β -Glucuronidase-Aktivität bei Eisenmangel. Sowohl die reduzierte Seitenwurzelanzahl, als auch die Sensitivität gegenüber Eisen stehen im Zusammenhang mit der Auxinsignalkette. Auf eine exogene Auxinzugabe reagierten die Insertionslinien von *AtPLA IVB* mit Ausbildung einer höheren Anzahl von Seitenwurzeln gegenüber dem Wildtyp. Um *AtPLA IVB* näher zu untersuchen, wurden *PIVB::uidA* Pflanzen generiert. Die β -Glucuronidase-Aktivität von *PIVB::uidA* war entwicklungsabhängig und insbesondere in jungen, sich entwickelnden Geweben zu beobachten. Diese wurde bei exogener Auxinzugabe bei zehn Tage alten Pflanzen reduziert. Die Daten sprechen für eine Funktion von *AtPLA IVB* in der Auxinwirkung. Um *AtPLA IVB* auch enzymatisch einzuordnen wurde das Protein von *AtPLA IVB* heterolog in *E. coli* exprimiert. Eine enzymatische Charakterisierung von *AtPLA IVA* lag bereits vor (RIETZ 2002). *IVB* hatte Phospholipase A-Aktivität und ließ sich durch die Inhibitoren AACOCF₃, ETYA und PACOCF₃ hemmen. Die Aktivität des Enzyms *IVB* wurde von dem Hemmstoff HELSS gar nicht, und von dem Inhibitor NDGA nur schwach gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde das Enzym *IVA* durch alle aufgeführten Inhibitoren gehemmt. Der Reaktionsmechanismus von NDGA ist unklar, während bekannt ist, dass HELSS kovalent an das Serin im aktiven Zentrum von Ca^{2+} -unabhängigen PLA_2 s bindet. Die meisten Abweichungen in der Aminosäuresequenz von *IVA* und *IVB* sind im C-Terminus der Enzyme zu finden, während der Bereich um das aktive Zentrum identisch ist. Deshalb wurde der C-Terminus von *IVB* direkt hinter den hoch konservierten Aminosäuren „YLRID“ entfernt, und das so entstandene Enzym *IVB_{CT}* charakterisiert. Die Hemmung von *IVB_{CT}* durch AACOCF₃, ETYA und PACOCF₃ ist der von *IVB* sehr ähnlich. *IVB_{CT}* wird jedoch durch HELSS gehemmt und reagiert empfindlicher auf NDGA als *IVB*. Damit unterscheidet es sich deutlich von dem ursprünglichen Enzym *IVB* und zeigt zudem dieselbe Sensitivität auf die einzelnen Hemmstoffe wie *IVA*. Um dies noch genauer zu untersuchen, wurden die fünf Aminosäuren, die bei *IVB* von *IVA* abwichen, durch *Site Directed Mutagenesis* so verändert, dass sie der Aminosäuresequenz von *IVA* entsprachen. Von diesen fünf Aminosäuren lagen vier in der bei *IVB_{CT}* entfernten C-terminalen Region von *IVB*. Jede Mutation änderte eine stark polare Aminosäure in eine hydrophobe oder umgekehrt, was zu einer Konformationsänderung führen könnte. Im Enzymtest zeigte das mutagenisierte Enzym bei Zugabe von NDGA eine ähnliche Hemmbarkeit wie *IVA* und *IVB_{CT}*. Bei Verwendung von HELSS konnte die Inhibitor-Sensitivität von *IVB_{mut}* nicht vollständig umgekehrt werden. Schlussfolgernd könnte der C-Terminus bei den Patatin-ähnlichen Phospholipasen eine regulatorische Funktion und die Tandem-Gene *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* trotz ihrer hohen Homologie eine andersartige Funktionsweise haben, wenn auch beide anhand der ermittelten Daten in der Auxinsignalkette verankert sind.

Abstract

Patatin-like phospholipases A₂, a gene family in plants, are related to animal kingdom Ca²⁺-independent phospholipases A₂ and are thought to have functions in the plant defence response and auxin signalling (Holk et al. 2002).

To analyse the function of four members of this gene family, knockout mutants of *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA and *AtPLA* IVB were isolated. The expression pattern of each of these genes were distinct and no obvious phenotype was observed. *AtPLA* IVA and *AtPLA* IVB were chosen to be functionally analyzed. Two different insertion lines for each gene were isolated (*Atpla* IVA-1 and *Atpla* IVA-2, *Atpla* IVB-1 and *Atpla* IVB-2). As both genes were expressed in roots as demonstrated by RT-PCR and Promoter::GUS transformed plants, the search for phenotypic differences was started with a root screening program.

The lateral roots of the knockout mutants of *AtPLA* IVA-1 and *Atpla* IVA-2 were 50 % reduced in comparison to the wildtype lateral roots and the knockout plants showed morphological defects in response to iron deficiency. After histological analysis and quantification of PIVA::GUS it was evident that *AtPLA* IVA was more active under iron deficiency. *Atpla* IVB-1 and *Atpla* IVB-2 responded to exogenous auxin by developing more side roots. To investigate the function in more detail, promoter::GUS plants of *AtPLA* IVB were generated and analyzed. The results showed that auxin repressed the β-glucuronidase activity. The involvement of both genes in side root development suggested a regulatory function of *AtPLA* IVB and also *AtPLA* IVA in the auxin response.

To verify the enzyme activity, *AtPLA* IVB cDNA was expressed as a recombinant protein in *E. coli*. The PLA activity of *AtPLA* IVA was already described (RIETZ 2002). Both enzymes exhibited PLA₁ and PLA₂ activity in vitro and were inhibited by several inhibitors of PLA₂, known from the mammalian system. HELSS, a specific inhibitor of mammalian calcium-independent PLA₂ which are related to the cytosolic plant Patatin-like PLAs, did not inhibit *AtPLA* IVB. Further, the inhibition by another inhibitor - NDGA - was very weak. In contrast to *AtPLA* IVB, *AtPLA* IVA was strongly inhibited by HELSS and NDGA. The predicted amino acid sequence of both enzymes was 88 % identical, with the strongest dissimilarities residing in the C-terminus. Therefore, the C-terminal region of *AtPLA* IVB was removed and also modified by Site Directed Mutagenesis. Interestingly, the enzyme with C-terminal deletion confers restored sensitivity to HELSS and NDGA. Using NDGA the mutated enzyme showed a similar inhibition like the enzyme of wildtype *AtPLA* IVA. Moreover, HELSS sensitivity of the mutated enzyme was 10-fold lower than wildtype *AtPLA* IVA. Since HELSS inhibits this enzyme class by binding covalently to the active-center serine, it is concluded that the C-terminus in enzyme *AtPLA* IVB obstructs access to HELSS and that removal or modification of critical amino acid residues may indicate that a regulatory function of the C-terminus, perhaps bearing a to be identified mechanism of post-translational up-regulation.

Stichwörter: *Arabidopsis*, Auxin, Phospholipase A

key words: *Arabidopsis*, auxin, phospholipase A

1	EINLEITUNG	1
	<i>Phospholipasen</i>	2
	<i>Phospholipase D</i>	2
	<i>Phospholipase C</i>	3
	<i>Phospholipase A₁</i>	3
1.1	PHOSPHOLIPASE A ₂	4
	<i>Sekretorische Phospholipase A₂.....</i>	4
	<i>Cytosolische PLA₂.....</i>	5
	<i>Ca²⁺-unabhängige Phospholipase A₂</i>	6
1.2	NOMENKLATUR DER PATATIN-ÄHNLICHEN PLAS VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	9
	<i>Ziel der Arbeit</i>	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1	ANZUCHT UND SAMENERNTE VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	12
2.2	TRANSFORMATION VON <i>A. THALIANA</i> PROMOTOR:: <i>UIDA</i> PFLANZEN.....	13
2.2.1	<i>Stabile in planta Transformation</i>	14
2.2.1.1	<i>Vakuum Infiltration.....</i>	15
2.2.1.2	<i>Isolierung von Promotor::<i>uidA</i> Pflanzen</i>	16
2.3	BEZUG UND SELEKTION DER INSERTIONSMUTANTEN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	17
2.3.1	<i>In vitro Anzucht von Arabidopsis thaliana.....</i>	18
2.4	FUNKTIONSANALYSE DER INSERTIONSMUTANTEN	20
2.4.1	<i>Minimal-Medium.....</i>	22
2.4.1.1	<i>Eisenmangel-Medium</i>	22
2.4.1.2	<i>Phosphatmangel-Medium</i>	23
2.4.1.3	<i>Sulfatmangel-Medium</i>	24
2.4.1.4	<i>Auxinkonzentrationsreihe</i>	24
2.4.1.5	<i>Nitratkonzentrationsreihe.....</i>	25
2.5	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN.....	27
2.5.1	<i>Separation genomischer DNA von Arabidopsis thaliana</i>	27
2.5.2	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Arabidopsis thaliana</i>	28
2.5.3	<i>cDNA-Synthese.....</i>	29
2.6	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION.....	30
2.6.1	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....</i>	32
2.6.2	<i>Erhöhung der Reinstkonzentration von Nukleinsäuren</i>	33
2.7	KLONIERUNG MITTELS GATEWAY SYSTEM.....	34
2.7.1	<i>Klonierung in den Eingangsvektor pENTR/D-TOPO</i>	35
2.7.2	<i>Klonierung in den Zielvektor pKGWFS7.....</i>	36
2.8	HERSTELLUNG KOMPETENTER AGROBAKTERIEN (<i>A. TUMEFACIENS</i>).....	37
2.8.1	<i>Transformation von Agrobacterium tumefaciens.....</i>	38
2.9	KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN MITTELS TOPO TA CLONING KIT	39
2.9.1	<i>Transformation von One Shot E. coli-TOP 10-Zellen.....</i>	40
2.10	KLONIERUNG IN EIN EXPRESSIONSSYSTEM	40
2.10.1	<i>Restriktionsanalyse</i>	41
2.10.2	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	41
2.10.3	<i>Herstellung kompetenter Escherichia coli.....</i>	42
2.10.4	<i>Transformation von Escherichia coli XLI-Blue</i>	43
2.11	GERICHTETE MUTAGENISIERUNG (<i>SITE DIRECTED MUTAGENESIS</i>)	44

Inhaltsverzeichnis

2.12	ANLEGEN VON BAKTERIEN-DAUERKULTUREN	46
2.12.1	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	47
2.13	HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	48
2.13.1	<i>Enzymisolierung</i>	48
2.13.2	<i>Esen-Test</i>	49
2.13.3	<i>Bradford-Assay</i>	50
2.14	SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	51
2.15	HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN	52
2.16	BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT	54
2.16.1	<i>Enzymtest I mit Liposomen</i>	54
2.16.2	<i>Eindimensionale Dünnschichtchromatographie</i>	56
2.16.3	<i>Enzymtest II nach VIEHWEGER</i>	58
2.16.4	<i>Auswertung der Chromatogramme</i>	59
2.17	NACHWEIS DER PROMOTORAKTIVITÄT DURCH β -GLUCURONIDASE	59
2.17.1	<i>Histologischer GUS-Assay</i>	60
2.17.2	<i>Quantitativer GUS-Assay</i>	61
2.18	RESISTENZ-GEN-EIGENSCHAFTEN	63
2.19	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	64
3	ERGEBNISSE	67
3.1	ISOLIERUNG DER INSERTIONSMUTANTEN	67
3.1.1	<i>Allgemeine Vorgehensweise</i>	67
3.1.2	<i>T-DNA Insertionsnachweis von Atpla IIA-1 und Atpla IIA-2</i>	69
3.1.3	<i>T-DNA Insertionsnachweis von Atpla IIIA-1 und Atpla IIIA-2</i>	71
3.1.4	<i>T-DNA Insertionsnachweis von Atpla IVA-1 und Atpla IVA-2</i>	74
3.1.5	<i>T-DNA Insertionsnachweis von Atpla IVB-1 und Atpla IVB-2</i>	77
3.1.5.1	<i>Zusammenfassung</i>	78
3.2	NACHWEISE DES TRANSKRIPTS DER GESUCHTEN GENE	80
3.2.1	<i>cDNA-Analyse von Atpla IIA-1 und Atpla IIA-2</i>	81
3.2.2	<i>cDNA-Analyse von Atpla IIIA-1 und Atpla IIIA-2</i>	82
3.2.3	<i>cDNA-Analyse von Atpla IVA-1 und Atpla IVA-2</i>	83
3.2.4	<i>cDNA-Analyse von Atpla IVB-1 und Atpla IVB-2</i>	84
3.3	ANZUCHT DER INSERTIONSMUTANTEN.....	86
3.4	FUNKTIONSANALYSE DES GENS <i>AtPLA IVA</i> (At4G37070).....	88
3.4.1	<i>Morphologie von Atpla IVA-1 und Atpla IVA-2</i>	88
3.4.2	<i>Histologischer und quantitativer Nachweis der Regulation von PIVA::uidA bei Eisenmangel</i>	93
3.5	FUNKTIONSANALYSE DES GENS <i>AtPLA IVB</i> (At4G37060).....	95
3.5.1	<i>Morphologische Untersuchung von Atpla IVB-1 und Atpla IVB-1</i>	95
3.5.2	<i>Erstellung von PIVB::uidA Linien</i>	98
3.5.2.1	<i>Stabile Transformation von Arabidopsis thaliana mit PIVB::uidA</i>	98
3.5.3	<i>Histologischer Nachweis der Regulation von PIVB::uidA</i>	100
3.5.4	<i>Histologischer und quantitativer Nachweis der Regulation von PIVB::uidA bei Auxinzugabe</i>	102
3.6	PROTEINANALYSE	106
3.7	KLONIERUNG IN DAS EXPRESSIONSSYSTEM	108
3.7.1	<i>Konstruktherstellung von AtPLA IVB_{CT}</i>	109
3.7.2	<i>Mutagenisierung von IVB</i>	111

Inhaltsverzeichnis

3.8	HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	113
3.9	ENZYMATISCHE EIGENSCHAFTEN VON IVB, IVB _{CT} UND IVB _{MUT}	116
3.9.1	<i>Analyse der Enzymeigenschaften von IVB</i>	117
3.9.2	<i>Analyse der Enzymeigenschaften von IVB_{CT}</i>	123
3.9.3	<i>Analyse der Enzymeigenschaften von IVB_{mut}</i>	126
3.10	POTENTIELLER AKTIVIERUNGSMECHANISMUS DER PROTEINE IVA UND IVB..	128
3.11	VERGLEICHENDES STRUKTURMODELL VON IVB	130
4	DISKUSSION	132
4.1	ISOLIERUNG DER INSERTIONSMUTANTEN	132
4.2	MÖGLICHE FUNKTIONELLE ZUORDNUNG VON <i>ATPLA IVA</i> UND <i>ATPLA IVB</i> . 134	
4.2.1	<i>Morphologieänderung in Bezug auf exogene und endogene Faktoren ..</i>	135
4.2.2	<i>Atpla IVA-1 und Atpla IVA-2 haben eine verminderte Seitenwurzelanzahl und reagieren sensitiv auf Eisenmangel</i>	142
4.2.3	<i>Atpla IVB-1 und Atpla IVB-2 reagieren auf exogene Auxinapplikation.</i>	146
4.3	ENZYMCHARAKTERISTIK VON IVB, IVB _{CT} UND IVB _{MUT}	150
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG	154
5	LITERATUR	157
6	ANHANG	172

Abkürzungsverzeichnis

AACOCF ₃	Arachidonyltrifluoromethyl ketone
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AS	Aminosäure(n)
B5	GAMBORG B5 Medium
β-BODIPY-PC	2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
bis- BODIPY-PC	1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (Bis- Bodipy - Fl C ₁₁ -PC)
BODIPY-FL DHP E	N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt
bp	Basenpaar(e)
cDNA	<i>copy</i> - DNA
Columbia 0	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Columbia 0
cPLA ₂	cytosolische PLA ₂
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eff.	effektiv
ETYA	5,8,11,14-eicosatetrayonic acid
FerroZine	3-(2-pyridil)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine sulfonate
ff.	folgende
g	gramm
gfp	green fluorescent protein
GUS	β-Glucuronidase
GLB	Gel- Ladungspuffer
HELSS	(E)-6-(bromomethylene)tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-one, Bromenollacton (= Haloenollacton Suicide Substrat)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
h	Stunde(n)
IAA	β-Indol-3-Essigsäure
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
iPLA ₂	Ca ²⁺ - unabhängige PLA ₂
IPTG	Isopropyl-β-D-thioglaktosid
kBp	Kilobasen

kDa	Kilo Dalton; ein Da ist definiert als 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ¹² C
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Lurient Broth
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
M _r	molekulare Masse
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	MURASHIGE und SKOOG -Medium
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NDGA	Nordihydrogaiaretic acid
Ni ²⁺ -NTA	Nickel- <i>Nitrioltriacetic-Acid</i>
OD	Optische Dichte
PIVB	Promotor IVB
PA	Phosphatidsäure
PACOCF ₃	Palmitoyltrifluoromethylketon
PAF	platelet activating factor = <i>1-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
Phenollösung	Phenol / Chloroform / Isoamyl-Mischung, 25:24:1
PL	Phospholipase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	<i>ribosomale</i> RNA
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkription mittels Polymerase- Ketten- Reaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sPLA ₂	sekretorische PLA ₂
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	Enzym- Einheiten [Units]
ÜN	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl β-D-glucuronid-Trihydrat
V	Volumen
WT	Wildtyp
X- Gal	5-Brom-4-chlor-indoxyl-β-galactopyranosid
g	mal Erdbeschleunigung (9,80655 m/s ²)

1 Einleitung

Biologische Membranen setzen sich aus amphipatischen Molekülen zusammen, deren Hauptbestandteile zu Doppellamellen aneinandergelagerte Phospholipide sind. Das Grundgerüst der Phospholipide besteht aus Glycerin, dessen C₁- bzw. C₂-Atom mit je einer Fettsäure verestert ist. Diese Fettsäure ist variabel in der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome und ihrem Sättigungsgrad. Mit dem C₃-Atom ist ein Phosphorsäurerest kovalent verbunden, welcher wiederum mit einem Alkohol als Kopfgruppe verestert ist (ALBERTS et al. 1997). Der Aufbau und die variablen Kopfgruppen eines Phospholipids sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Der Anteil der unterschiedlichen Phospholipide in der Zelle variiert zwischen den Biomembranen der Kompartimente, den Tieren und Pflanzen.

Zusätzlich zu ihrer strukturellen Rolle wirken Phospholipide als Mediatoren in zellulären Signalen und sind zudem Substrate und/oder Endprodukte im Lipidmetabolismus (MUNNIK et al. 1998). Enzyme, wie Phospholipasen hydrolysieren Phospholipide. Im Folgenden beschränkt sich der Text auf die Schilderung der Funktionen von Phospholipasen in der Signaltransduktion.

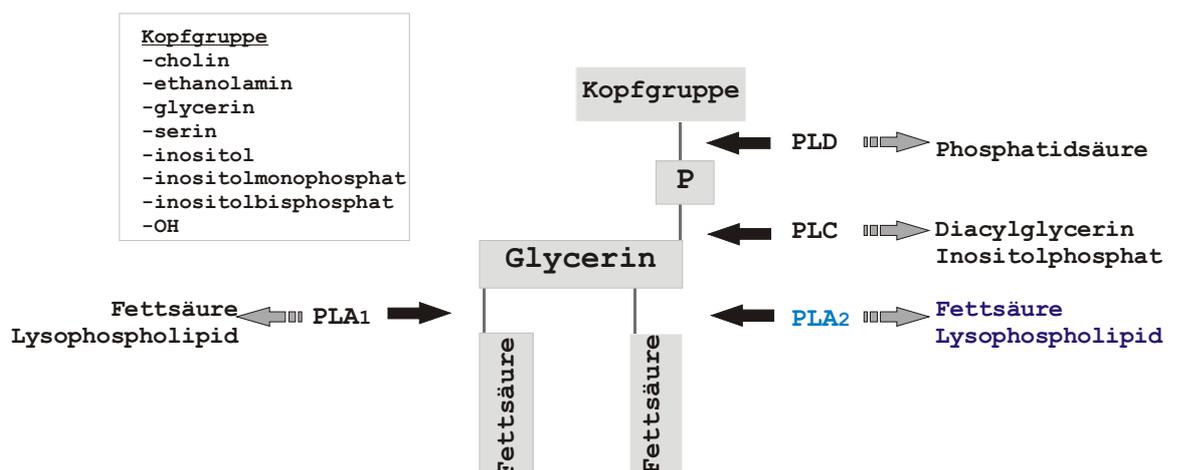


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung eines Phospholipids und der möglichen Phospholipase-Aktivitäten. Die Reaktionsprodukte der verschiedenen Phospholipasen sind angegeben. Links oben befindet sich eine Auflistung der möglichen Kopfgruppen und somit ebenso eine Auflistung des zweiten Reaktionsprodukt von PLD. PLD: Phospholipase D, PLC: Phospholipase C, PLA₁: Phospholipase A₁, PLA₂: Phospholipase A₂

Phospholipasen

Phospholipasen sind Enzyme, die unter anderem in der Signaltransduktion der Zelle eine Funktion haben können. Die Aktivität der Phospholipasen an den Zellmembranen trägt zur Regulation vieler zellulärer Funktionen bei, stört jedoch weder die Struktur noch die Funktion derselben. Dabei ist die Aktivierung der Phospholipasen oft der erste Schritt für die Entstehung von lipiden- und aus Lipiden hervorgegangen- sekundären Botenstoffen.

Die Klasse der Phospholipasen wird in die Gruppen D, C, A₁ und A₂ unterteilt (WANG 2001). Diese Gruppeneinteilung entspricht der bevorzugten Spaltungsstelle des Phospholipids durch die jeweiligen Phospholipasen (Abb. 1.1). Jede Gruppe ist wiederum in Untergruppen unterteilt, deren Einteilung auf der Sequenzverwandtschaft, den biochemischen Eigenschaften oder einer Kombination beider beruht.

Phospholipase D

Phospholipase D (PLD) bevorzugt Phosphatidylcholin als Substrat, welches durch PLD zu Phosphatidsäure und Cholin hydrolysiert wird. Phosphatidsäure ist ein sekundärer Botenstoff, welcher unter verschiedensten Stressbedingungen freigesetzt wird (vgl. Phospholipase C, MUNNIK et al. 1996, WANG et al. 2002). Durch PLD katalysierte Hydrolyse von Phospholipiden wurde unter anderem bei der Samenentwicklung, der Alterung, der Seneszenz und auch bei einem breiten Spektrum von Stressbedingungen wie Frost, Trockenheit oder Verwundung beobachtet (WANG 2000, 2002, WANG et al. 2000). Das Phytohormon Auxin hat keinen nachgewiesenen Effekt auf pflanzliche Phospholipasen D (SCHERER 2002).

Phospholipase C

In der Signaltransduktion werden Phosphatidylinositol-spaltende Phospholipase C (PI-PLC) und Phosphatidylcholin-spaltende Phospholipase (PC-PLC) beschrieben. Bei dem Lipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat führt PI-PLC-Aktivität zur Entstehung des sekundären Botenstoffes Inositoltrisphosphat (InsP_3) und Diacylglycerin (MUNNIK et al. 1998). Diacylglycerin verbleibt im tierischen System in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, welche Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren und Enzyme phosphorylieren kann. Momentan ist noch unklar, ob eine der Proteinkinase C der Tiere äquivalente pflanzliche Proteinkinase existiert. In Pflanzen wird Diacylglycerin durch eine Diacylglycerinkinase sofort in Phosphatidsäure phosphoryliert (TAIZ und ZEIGER, 2000). Bei Phosphatidsäure handelt es sich um einen pflanzlichen sekundären Botenstoff, der wie erwähnt auch durch die Aktivität von PLD freigesetzt wird (MUNNIK 2001). So resultiert die PLC-Aktivität in Pflanzen in der Entstehung von Phosphatidsäure und InsP_3 . Die PI-PLC-Aktivität ist in die Reaktionen der Pflanzen auf verschiedene Stimuli, wie z. B. osmotischen Stress oder Pathogeninteraktion eingebunden (MEIJER und MUNNIK 2003). Ein erster Nachweis für eine Rolle von Phosphatidylcholin spaltender PC-PLC in der pflanzlichen Signaltransduktion wurde an Petersilienzellkulturen gezeigt (SCHERER et al. 2002).

Phospholipase A₁

Phospholipasen A₁ (PLA₁) hydrolysieren bevorzugt die *sn1*-Position eines Phospholipid in freie Fettsäure und Lysophospholipid. PLA₁-Enzyme konnten aus unterschiedlichen Tieren kloniert werden (z. B. NAGAI et al. 1999). In der Pflanze konnten aus *Arabidopsis* bisher zwei PLA₁s identifiziert werden, von denen bei einer eine Funktion im Gravitropismus nachgewiesen wurde (KATO et al. 2001, NOIRIEL et al. 2004). Eine genauere physiologische Funktion von PLA₁ in Pflanzen ist jedoch bisher nicht bekannt (WANG 2001).

1.1 Phospholipase A₂

Die enzymatische Aktivität einer Phospholipase A₂ wurde bereits Ende des 19. Jahrhundert bei Kobravonin beschrieben (STEPHENS et al. 1898). Die PLA₂s sind eine Enzymklasse, welche die Hydrolyse der *sn*2-Acylester des Glycerins der Phospholipide katalysieren. Dabei entstehen Lysophospholipide (LysoPC) und freie Fettsäuren (MUNNIK et al. 1998). Durch den Einfluss von LysoPC auf Proteinkinasen werden Ionenkanäle reguliert (WATSON und GOLD 1997). Das zweite Hydrolyseprodukt der PLA₂-Aktivität ist im tierischen System vor allem Arachidonsäure, welche eine wichtige Funktion als Vorläufer der Eicosanoide hat (SMITH et al. 2000). Die Menge an Arachidonsäure in den Membranen höherer Pflanzen ist vernachlässigbar, lediglich in einigen Moosen liegen höhere Konzentrationen vor (TAIZ und ZEIGER 2000). Eine analoge Funktion scheint bei Pflanzen jedoch die Linolensäure zu haben (SCHERER 2002).

Die Phospholipasen A₂ (PLA₂) können aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in vier Hauptgruppen eingeteilt werden, die als sekretorische PLA₂ (sPLA₂), cytosolische PLA₂ (cPLA₂), Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂) und *Platelet Activating Factor*-hydrolysierende Phospholipase A₂ (PAF-PLA₂) bezeichnet werden (BALSINDE et al. 2002). Auf eine detaillierte Darstellung von letzterer wird an dieser Stelle verzichtet, da sie für diese Arbeit nicht relevant ist.

Sekretorische Phospholipase A₂

Die im Tierreich vorkommende sekretorische PLA₂ (sPLA₂) hat fünf bis acht Disulfidbrücken und eine Größe von 13 bis 15 kDa. sPLA₂s sind extrazellulär lokalisiert und benötigen für ihre optimale Aktivität Calciumionen im millimolaren Bereich (BALSINDE et al. 1999). Sie wurden im tierischen System z. B. im Pankreassekret, dem Schlangengift, und dem Bienengift gefunden (MUNNIK et al. 1998). Während Entzündungsreaktionen und Infektionen kommt es zu einer erhöhten sPLA₂-Expression in den Zellen des Immunsystems. Aufgrund dessen wird der sPLA₂ eine Funktion in den entzündungsbedingten und allergischen Reaktionen zugeschrieben (NEVALAINEN et al. 2000, GRANATA et al. 2003).

Die pflanzliche sPLA₂ benötigt ebenso wie die tierische sPLA₂ millimolare Calciumkonzentrationen für ihre Aktivität, hat eine Größe von etwa 14 kDa und eine Präferenz für Hydrolyse an der *sn2*-Position am Glycerin des Phospholipids (LEE et al. 2003). Sequenzanalysen zeigten, dass sPLA₂-ähnliche PLA₂s ebenso wie die sPLA₂ aus dem tierischen Reich mehrere Disulfidbrücken und ein mögliches Signalpeptid für die Sekretion haben (KIM et al. 1999, STÄHL et al. 1999, BAHN et al. 2003). Die erste sPLA₂-ähnliche PLA₂s in Pflanzen wurde aus der Ulme isoliert (STÄHL et al. 1998). Des Weiteren konnten aus Nelke, Reis und *Arabidopsis* (KIM et al. 1999, STÄHL et al. 1999, BAHN et al. 2003) ebenfalls sPLA₂-homologe Enzyme isoliert werden, deren Funktion in der Pflanze jedoch bisher weitgehend unbekannt sind. Das Transkript einer sekretorischen PLA₂ aus *Arabidopsis thaliana* wird nach Auxinzugabe heraufreguliert und diese sPLA₂ hat eine Funktion in der Zellstreckung und im gravitropem Verhalten der Blütenstände (LEE et al. 2003).

Cytosolische PLA₂

Die cytosolischen Phospholipasen A₂ (cPLA₂) sind mit 65 bis 115 kDa wesentlich größer als sPLA₂s. Sie sind in Tierzellen im Cytosol zu finden und werden durch eine physiologische Ca²⁺-Konzentration im mikromolaren Bereich reguliert. Hier hydrolysieren cPLA₂s spezifisch Arachidonsäure von den Phospholipiden (DESSEN et al. 1999) und sind somit direkt an der Eicosanoidsynthese beteiligt (MURAKAMI et al. 1998). cPLA₂ wird durch Kinasen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) Kaskade phosphoryliert. Im Allgemeinen haben cPLA₂s eine Calcium bindende (C2)-Domäne, welche die Translokation des Enzyms durch erhöhte intrazelluläre Calciumionen-Konzentration zu den Zellmembranen ermöglicht. Es wurden bislang noch keine Proteine in Pflanzen gefunden, welche den cPLA₂s der Tiere ähneln (WANG 2001, HOLK et al. 2002).

Ca²⁺-unabhängige Phospholipase A₂

Die intrazellulär vorkommenden Ca²⁺-unabhängige Phospholipasen A₂ (iPLA₂) haben eine Größe von durchschnittlich 85 kDa und weisen neben der Lipasenkonsensussequenz GX SXG ein mögliches ATP-bindendes Motiv auf. Die iPLA₂ benötigt keine Calciumionen für ihre Aktivität und wird durch Calmodulin oder durch die Ca²⁺-Konzentration reguliert (AKIBA und SATO 2004).

iPLA₂ induziert, ebenso wie cPLA₂, die Freisetzung von Arachidonsäure und Lysophospholipid für die Eicosanoidproduktion, für eine Immunantwort oder auch z. B. für die Insulinausschüttung nach Glukoseinduktion (MAGGI et al. 2002, AKIBA und SATO 2004)

In Pflanzen weisen die heute bekannten intrazellulären PLAs in der Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit Patatinen und Ca²⁺-unabhängigen PLA₂s der Tiere auf. Patatine sind eine Gruppe eng verwandter Speicherproteine in der Kartoffellknolle, welche Acylhydrolaseaktivität besitzen (HIRSCHBERG et al. 2001, SHEWRY 2003). Die Patatin-ähnlichen Phospholipasen konnten auch in dem Kautschukbaum, dem Tabak und der Augenbohne identifiziert werden (SOWKA et al. 1998, DHONDT et al. 2000, MATOS et al. 2001). Die Größe dieser Proteine liegt zwischen 40 und 48 kDa, wobei lediglich ein Enzym dieser Gruppe ein Molekulargewicht von 142 kDa hat (RIETZ 2002). Weitere Patatin-ähnliche PLAs wurden in einem Latexallergen, einem Gurkenprotein und einem nach Elicitorwirkung induziertem cytosolischem Enzym aus Kartoffel gefunden (SENDA et al. 1996, KOVAR et al. 1998, MAY et al. 1998).

Nach Isolierung der cDNA von vier Patatin-ähnlichen PLAs aus *Arabidopsis* (*AtPLA IA*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA*, *AtPLA IVC*, vgl. Abb. 1.3) wurden diese PLAs im Cytosol lokalisiert. Für das Enzym von *AtPLA IVA* und *AtPLA IIA* wurde zusätzlich die PLA-Aktivität nachgewiesen. Dabei führte die Verwendung von PLA₂-spezifischen Inhibitoren zur Hemmung des Enzyms. Bei Zusatz von zwei dieser Hemmstoffe wurde das Hypokotyl von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen verkürzt, was für eine Funktion der *AtPLA*-Familie in der Auxinsignaltransduktion spricht (HOLK et al. 2002).

Es gibt Hinweise, dass Patatin-ähnliche PLAs eine Funktion im Auxinsignaltransduktionsweg (SCHERER und ARNOLD 1997, PAUL et al. 1998, HOLK et al. 2002) und in der Signaltransduktion der pflanzlichen Pathogenabwehr haben (LEE et al. 1997, NARVÁEZ-VÁSQUEZ et al. 1999, ROOS et al. 1999, SCHERER et al. 2000, VIEHWEGER et al. 2002, NARUSAKA et al. 2003, RIETZ et al. 2004).

In der Pflanzen-Pathogen-Abwehr spielen unter anderem Oxylipine eine Rolle. Die Pflanze nutzt im sogenannten Octadecanoidweg vor allem aus PLA₂-Aktivität hervorgegangene Linolensäure als Substrat zur Synthese von Oxylipinen wie Jasmonsäure und deren Vorstufe 12-Oxophytodiensäure (BLECHERT et al. 1995, TURNER et al. 2002). Welche PLA-Isoform(en) die Linolensäure freisetzt, ist noch nicht eindeutig geklärt, es gibt aber Hinweise, dass es sich hierbei um eine Patatin-ähnliche PLA₂ handelt (DHONDT et al. 2000, 2002).

Nach Auxinzugabe konnte eine Aktivierung der *in vitro* PLA₂-Aktivität an isolierten Membranvesikeln der Sojabohne und des Hypokotyls von Zucchini und Sonnenblume festgestellt werden (SCHERER und ANDRÉ 1989, 1993, SCHERER 1995). Zudem erfolgt bei Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Phospholipids zu Petersilien- und Sojabohnenzellkulturen, sowie Zucchini- und Sonnenblumenhypokotylsegmenten nach der Auxinzugabe eine Erhöhung der PLA-Aktivität *in vivo*. Diese PLA-Aktivierung war für aktives Auxin spezifisch und erfolgte je nach Methode ein bis fünf Minuten nach der Auxinzugabe (PAUL et al. 1998, SCHERER et al. 2000). Zudem sind Inhibitoren tierischer PLA₂s unter anderem auch selektive Hemmstoffe für Auxin-abhängiges Wachstum der Hypokotylsegmente von etiolierten Zucchinikeimlingen (SCHERER und ARNOLD 1997). Die Hydrolyseprodukte der PLA₂ stimulieren des Weiteren die Ansäuerung des Apoplasten und das Wachstum von Maiskoleoptilen. Diese Stimulation wird durch PLA₂-Inhibitoren aus dem Tierreich gehemmt (YI et al. 1996).

Wie die Aktivität der PLA₂ in die Auxinsignaltransduktion eingebunden ist, ist bisher weitestgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass der nächste Schritt in der Auxinsignaltransduktion eine Proteinkinase ist (SCHERER 1996, 2002). Abbildung 1.2 gibt dem aktuellen Kenntnisstand entsprechend eine schematische Darstellung der potentiellen Funktion pflanzlicher PLAs auf zellulärer Ebene wieder. Es handelt sich hierbei um ein vereinfachtes Modell, welches keinesfalls weitere Zwischenschritte zwischen den einzelnen Elementen ausschließt.

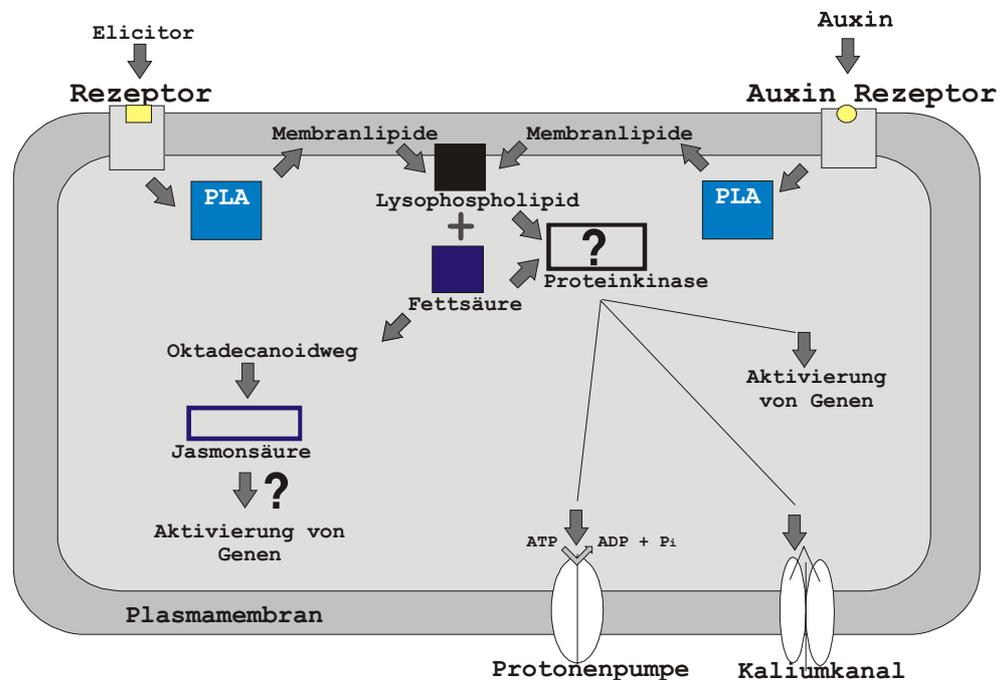


Abbildung 1.2. Vereinfachte Darstellung einer potentiellen Phospholipase A Funktion in der Pathogeninteraktion und Auxinsignaleinwirkung in der pflanzlichen Zelle (abgeändert nach BUCHANAN et al. 2000). Der aus der Stimulierung von PLA₂ resultierende Anstieg von Lysophospholipiden und freien Fettsäuren induziert die Zellwand-Ansäuerung durch Aktivierung der Plasmamembran H⁺-ATPase direkt, oder durch Lysophospholipid- und / oder Fettsäure abhängige Proteinkinasen. Die Ansäuerung kann zu Zellwachstum führen (YI et al. 1996). Die Enzyme der Jasmonsäurebiosynthese sind im Chloroplasten lokalisiert (CREELMAN und MULLET, 1997).

1.2 Nomenklatur der Patatin-ähnlichen PLAs von *Arabidopsis thaliana*

Heute sind zehn verschiedene Isoformen Patatin-ähnlicher PLAs in *Arabidopsis thaliana* (*AtPLA*) bekannt, deren Mitglieder in die Untergruppen A, B und C eingeteilt werden (Abb. 1.3). Die Gruppenunterteilung erfolgte aufgrund der Aminosäuresequenzhomologien, der Größe und der Intron-Exonsequenzen der Gene (HOLK et al. 2002).

Die Nomenklatur erfolgt nach MEINKE und KOORNNEEF (1997). Sie ergibt sich aus der Reihenfolge der entdeckten PLA-Sequenzen auf den fünf Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*, so ist z. B. *AtPLA IVA* die erste entdeckte potentielle Phospholipasesequenz auf Chromosom vier. Die Bezeichnung *At* bezieht sich auf die Anfangsbuchstaben des Organismus (*A. t.* = *Arabidopsis thaliana*), während PLA die Enzymfunktion (PLA = Phospholipase A) kennzeichnet. Untergruppe A und B haben ein Intron im aktiven Zentrum, wobei Untergruppe A nur ein Mitglied der potentiellen Phospholipasen A_2 beinhaltet, welches sich aufgrund seiner Größe von den anderen differenziert. Untergruppe B weist fünf Mitglieder auf, die fünf bis sechs Introns beinhalten. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen zeigt Untergruppe C jeweils nur ein Intron in der Nukleotidsequenz und besitzt eine etwas andere Sequenz im katalytischen Zentrum der PLA_2 (Abb. 1.3). Abbildung 1.4 zeigt die zehn potentiellen Phospholipasen im Vergleich mit Patatinen, Patatin-ähnlichen Proteinen und $iPLA_2$ -Sequenzen anderer Organismen. Des Weiteren wurden in den Vergleich alle bekannten Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* einbezogen. Die Sequenzen wurden phylogenetisch mit Hilfe des Programms TreeView eingegliedert (PAGE 1996).

Die Insertionsmutanten erhalten die Namen ihrer funktionsunfähigen Gene (z. B. *Atpla IVA*). Die Kennzeichnung der Phospholipase ist hier in Kleinbuchstaben angegeben. Je nach Linie erfolgt die Bezeichnung *Atpla IVA-1* oder *Atpla IVA-2*. Die Proteinsequenzen werden ihres zugehörigen Gens entsprechend als IIA, IIIA, IVA und IVB bezeichnet. Die Benennung der mutagenisierten Enzyme erfolgt aufgrund ihrer Eigenschaften, wie z. B. IVB_{mut} , und wird in den zugehörigen Kapiteln näher erläutert.

Promotorsequenzen der potentiellen PLA_2 werden z. B. als PIVB abgekürzt. In dieser Arbeit wurden *AtPLA IIA*, *AtPLA IIIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* untersucht.

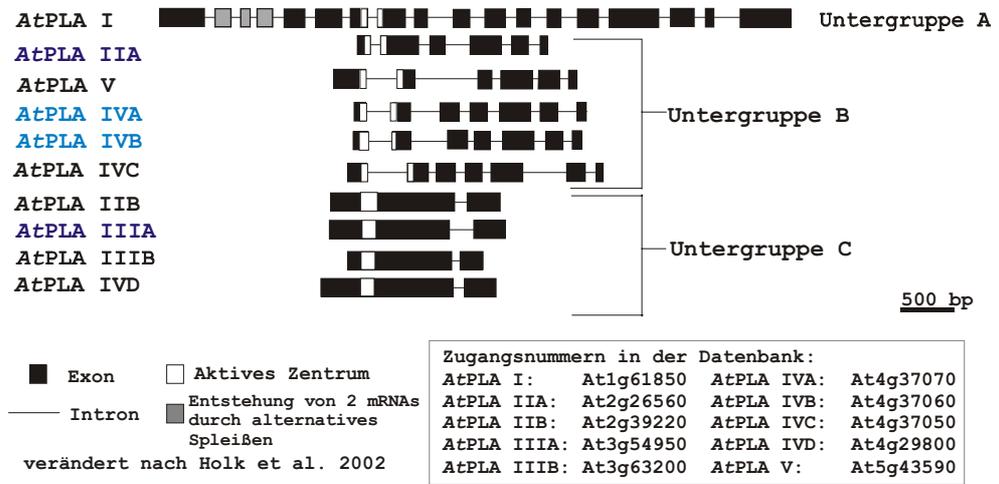


Abbildung 1.3. Exon-Intronstruktur der Patatin-ähnlichen Phospholipase A-Familie in *A. thaliana*. Die PLAs dieser Arbeit, sind blau unterlegt, wobei *AtPLA IVA*, *AtPLA IVB* als Schwerpunkte hellblau hervorgehoben sind.

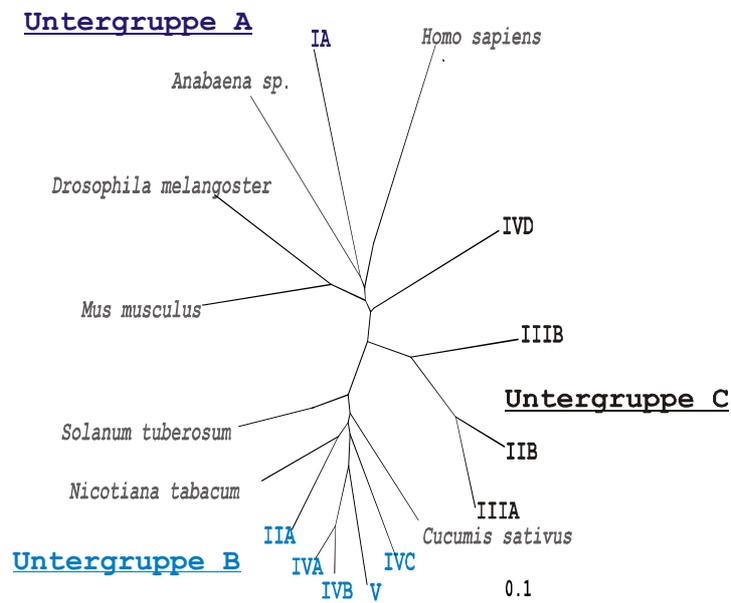


Abbildung 1.4. Phylogenetischer Baum der Aminosäuresequenzen erstellt mit TreeView (PAGE 1996). Nomenklatur s. Anhang Tab. 1.

Ziel der Arbeit

Um weitere Fakten zur hypothetischen Funktion der Patatin-ähnlichen PLA₂s in der Auxinsignaltransduktion zu ermitteln, werden die Eigenschaften der *At*PLAs durch Insertionsmutanten und zugehörigen Promotor::*GUS*-Pflanzen charakterisiert. Dies beinhaltet in dieser Arbeit zunächst die Isolierung der Insertionslinien von vier verschiedenen Genen (*At*PLA IIA, *At*PLA IIIA, *At*PLA IVA, *At*PLA IVB). Da keine sichtbaren morphologischen Veränderungen beobachtet wurden, wurde der Schwerpunkt auf *At*PLA IVA und *At*PLA IVB gelegt. Die in Tandem-Orientierung vorliegenden *At*PLA IVA und *At*PLA IVB zeigen bei Vergleich der Aminosäuresequenz von IVA und IVB eine Übereinstimmung von 88 %, wobei physikochemisch nur fünf Aminosäuren wesentlich voneinander abweichen (s. 3.1). Diese Daten führten zu der Annahme, dass ein Gen aus der Duplikation des anderen hervorgegangen ist (KAUL et al. 2000, LYNCH und CONERY 2000, MOORE und PURUGGANAN 2003). Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionen der Patatin-ähnlichen PLAs durch morphologische Analyse der Wurzel zu ermitteln, da von beiden bekannt war, dass sie in der Wurzel exprimiert werden. Hinzu kam auch eine Promotor::*GUS*-Analyse und eine enzymatische Charakterisierung des heterolog exprimierten Proteins von *At*PLA IVB, um dieses mit dem Enzym IVA zu vergleichen. Die enzymologischen Eigenschaften des Enzyms IVA waren bereits analysiert (HOLK et al. 2002).

2 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die Durchführungsgrundlagen der im Ergebnisteil vorgestellten Experimente beschrieben. Die Benennung der Einheiten, Symbole und Abkürzungen folgt PLANTA 2001.

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) gehört zu der Familie der *Brassicaceae* und hat mit circa 125 Megabasenpaaren eines der kleinsten der bekannten Pflanzengenome. Dieses wurde als erstes pflanzliches Genom vollständig entziffert und setzt sich aus fünf Chromosomen mit ungefähr 25000 Genen zusammen (KAUL et al. 2000). *Arabidopsis thaliana* hat für die Forschung günstige Eigenschaften wie eine kurze Generationszeit, Anspruchslosigkeit in Zucht und Vermehrung, aber auch Verfügbarkeit vieler Mutanten. Die verwendete Wildtypelinie *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia 0 stammt aus dem *Arabidopsis Stock Center Nottingham* (N1092). Diese Linie wurde zur vollständigen Sequenzierung des Pflanzengenoms von *A. thaliana* benutzt und findet sich häufig in der Literatur. Des Weiteren wurden *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 Pflanzen zur Transformation der verwendeten Insertionsmutanten und der Promotor::*uidA* Linien verwendet.

2.1 Anzucht und Samenernte von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wurden in Einheitserde P ausgesät und im Kurztag (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) kultiviert. Innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen konnten die gekeimten Pflanzen in 7er Töpfe pikiert werden. Zur Verzögerung der Blütenbildung verblieben die Pflanzen im Kurztag, ansonsten erfolgte eine Überführung der Pflanzen in Klimakammern (25° C, 65 % relative Luftfeuchtigkeit, 9600 lx / m² Lichtstärke, 16 h Licht / 8 h Dunkelheit). Während der gesamten Wachstumsperiode wurden die Pflanzen nicht gedüngt.

Die Vermehrung von *A. thaliana* erfolgte durch Selbstung, wobei ein Aracon (Fa. Beta tech, Belgien) die Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Pflanzen und die Freisetzung transgener Samen verhinderte. Blütenstände, die aus dem Aracon herausragten, wurden entfernt und von der Ernte ausgeschlossen.

Die Pflanzen wurden unter ständiger Ventilation separiert voneinander angezogen, um einen Befall mit Fäulepilzen zu vermeiden (ABRC 2004). Bei Befall mit Schädlingen wurden die Pflanzen durch Einspülung von Nematoden in die Einheitserde P oder mit Schädlingsbekämpfungsmitteln behandelt.

Tabelle 2.1. Verwendete Schädlingsbekämpfungsmittel

Confidor 0,035 % (Fa. Bayer)
Perimor 0,05 % (Fa. BASF)
Tamaron 0,10 % (Fa. Bayer)

Wenn der Spross keine neuen Schoten ausbildete, waren die Pflanzen vollentwickelt und wurden eine Woche vor der Ernte nicht mehr gewässert, um den Reifungsprozess zu unterstützen. Nach der Ernte wurden die Samen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und 24 Stunden bei 37° C getrocknet. Eine dreijährige Lagerung bei Raumtemperatur vermindert die Keimfähigkeit der getrockneten Samen nicht. Zur Langzeitlagerung von mehr als fünf Jahren wurden die Samen bei -70° C eingefroren, wobei durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren die Keimfähigkeit verringert wird.

2.2 Transformation von *A. thaliana* Promotor::*uidA* Pflanzen

Arabidopsis thaliana kann durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA Insertion stabil transformiert werden.

Tumorinduzierende Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* enthalten sehr große Plasmide (circa 200 kBp), genannt Ti-Plasmide. Das Ti-Plasmid trägt viele Funktionen für die Mobilisierung der T-DNA. Etwa 10 % der DNA (circa 20 kBp) wird Transfer-DNA (T-DNA) genannt, da dieses DNA-Fragment die Bakterien verlassen und in das Genom der Pflanzenzelle integrieren kann.

Die T-DNA wird von circa 25 bp langen direkten Wiederholungen (*border*-Sequenzen) flankiert, welche je nach Lage als *left* oder *right border* bezeichnet werden. Außerhalb der T-DNA liegt die *vir*-Region mit den Virulenz-Genen, welche 30 bp umfasst und für Proteine kodiert, die für die Übertragung der T-DNA in das Pflanzengenom essentiell sind. Für die Mobilisierung der T-DNA sind, neben der *vir*-Region auch die *border*-Sequenzen erforderlich, zwischen denen beliebige genetische Informationen inseriert werden können.

2.2.1 Stabile *in planta* Transformation

(abgeändert nach BECHTOLD et al. 1993)

Arabidopsis thaliana (L.), Columbia 0 wurden wie unter 2.1 beschrieben im Kurztag angezogen und in 7er Töpfe mit je vier Pflanzen pikiert. Sie verblieben weitere zwei bis fünf Wochen im Kurztag, um eine dichte Rosette auszubilden, da dies für die Vakuuminfiltration essentiell war. Anschließend wurden die Pflanzen zur Blüteninduktion in den Langtag überführt. Zur Transformation waren vitale Pflanzen geeignet, die frei von Schadsymptomen waren und deren Blütenstände weitestgehend im Knospstadium waren. Die erste Infloreszenz wurde bei einer Höhe von 10 cm entfernt, um die Bildung neuer und verstärkter Blütenstände zu induzieren. Nach 10 bis 15 Tagen (nach MENGISTE et al. 1997) wurden die Pflanzen transformiert, da sich zu diesem Zeitpunkt ausreichend viele Blütenstände gebildet hatten. Es wurde ausschließlich der Agrobakterien Stamm GV3101 verwendet.

Eine Einzelkolonie des Agrobakteriumstamms GV3101, welche den Vektor *pKGWSF7* enthielt, wurde von einer 1,2 % LB-Agarplatte (Tab. 2.17) gepickt und in 2,5 ml LB-Medium (100 µg / ml Rifampicin, 100 µg / ml Spectinomycin) über Nacht angezogen (28° C, 180 UpM, Rundschüttler). Nach 20 Stunden wurden 100 µl der Kultur in 25 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht geschüttelt (150 UpM, 30° C).

20 ml dieser Kultur wurden in 250 ml LB-Medium (100 µg / ml Spectinomycin) in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 inokuliert. Nach ungefähr sechs Stunden bei 28° C und 150 UpM war die gewünschte Optische Dichte erreicht. Die Bakterien wurden sedimentiert (4000 UpM, 13 min, 4° C, Sorvall SLA1500 Rotor) und anschließend im Infiltrationsmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 resuspendiert (entspricht circa 250 ml). Die Resistenz-Gen-Eigenschaften des Agrobakteriumstamms sind in Tabelle einzusehen, die Vektorkarte ist im Anhang, Abbildung 2 dargestellt.

Tabelle 2.2. Infiltrationsmedium

<u>Anteile pro l</u>	
MS-Makroelementestammlösung (10 x) → Tab. 2.4:	100,0 ml
MS-Mikroelementestammlösung (100 x) → Tab. 2.4:	10,0 ml
B5-Vitaminestammlösung (100 x) → Tab. 2.5:	10,0 ml
Saccharose:	50,0 g
→ pH 5,7 (NaOH)	
Nach dem Autoklavieren Zugabe von:	
Benzylaminopurin (0,044 mmol):	1,0 ml
Tween 80:	1,5 ml

2.2.1.1 *Vakuum Infiltration*

Der Gesamtansatz der Bakteriensuspension mit der OD₆₀₀ 0,8 (s. vorheriger Abschnitt) wurde in einen 600 ml Messbecher gefüllt. In die Suspension wurde ein 7er Pflanztopf mit vier zuvor angezogenen *A. thaliana* (s. 2.1) kopfüber eingetaucht und unter Zuhilfenahme von zwei 2,5 ml Pipettenspitzen so justiert, dass keine Erde mit der Bakteriensuspension in Berührung kam. Der Ansatz wurde 2 Minuten unter Vakuum gestellt, welches nach Ablauf der Zeit ruckartig aufgehoben wurde. Aufsteigende Luftblasen an den untergetauchten Blatträndern kennzeichneten den Unterdruck. Die überschüssige Suspension wurde abgetropft, die Pflanzentriebe zusammengebunden und anschließend wie unter 2.1 beschrieben weiter angezogen. Dieser Prozess war mit derselben Bakteriensuspension drei- bis viermal wiederholbar.

Um eine Kreuzung der Pflanzen mit anderen Linien zu vermeiden wuchsen die Pflanzen separiert weiter. Für die Samenernte wurden DinA4 Blätter in kleine Aussaatschalen gelegt. Die Blütenstände eines Topfes wurden so justiert, dass sie in der Schale zu liegen kamen. In den folgenden Tagen fielen die reifen Samen in die Schale, welche geerntet und bei 37° C für einen Tag getrocknet wurden.

2.2.1.2 Isolierung von Promotor::*uidA* Pflanzen

Für die Isolierung der T₁-Generation (Nomenklatur folgt FELDMANN 1992) erfolgte die Aussaat der Samen auf Selektionsmedium unter Verwendung von Kanamycin (50 µg / ml).

Die Sterilisation entsprach bis auf wenige Ausnahmen der unter 2.3.2 beschriebenen. Hier wurden die Samen jedoch aufgrund ihrer Menge in 15 ml Reaktionsgefäßen 8 Minuten in 10 ml 70 %igem Ethanol und anschließend für 8 Minuten mit 10 ml Sterilisationslösung vermengt. Die Waschung der Samen erfolgte mindestens fünfmal in sterilem, destilliertem Wasser in einem 45 ml Reaktionsgefäß. Anschließend wurden jeweils 1 ml des Wassers mit den Samen auf vorbereitete Selektionsagarplatten mit maximal 300 Samen ausplattiert getrocknet, bis das überschüssige Wasser abgedampft war. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und die Pflanzen bei 23° C unter Langtagbedingungen (35 % Luftfeuchte) angezogen.

Tabelle 2.3. Lösungen

<u>Sterilisationslösung</u> <u>(Anteile pro 10 ml)</u>	
Natriumhypochlorid (12 %)	5,000 ml
steriles, dest. H ₂ O	5,000 ml
Triton X-100	0,003 ml

Selektionsmedium für transformierte Pflanzen

(Anteile pro l)

MS-Makroelementestammlösung (10 x) → Tab. 2.4	100,0 ml
MS-Mikroelementestammlösung (100 x) → Tab. 2.4	10,0 ml
MS-Vitaminstammlösung (100 x) → Tab. 2.4	10,0 ml
MS-Eisenstammlösung (50 x) → Tab. 2.4	20,0 ml
Glukose	20,0 g
Bakto-Agar	10,0 g
→ pH 5,7 (NaOH)	
Nach dem Autoklavieren Zugabe von:	
Kanamycin (50 mg/ml)	1,0 ml

Nach der Aussaat bildeten die Pflanzen ohne inserierte T-DNA innerhalb von sieben bis neun Tage gelbe Kotyledonen aus und wuchsen nicht über dieses Stadium hinaus. Transgene Pflanzen gediehen auf dem Selektionsmedium, wobei auch hier bis zu 30 % aufgrund elementarer Funktionsstörungen durch den Insertionsort nicht überlebten. Bei Ausbildung von vier bis fünf Blattgenerationen wurden die transgenen Pflanzen in Einheitserde P umgesetzt und zum weiteren Wachstum in Klimakammern gestellt. Die Ernte der T₂-Generation erfolgte wie unter 2.1 beschrieben. Durch Selbstung wurden bei 25 % der Pflanzen die Insertion herausgekreuzt. Im Idealfall kam es zu einer Spaltung bei der bis zu 75 % Transformanten entstanden.

2.3 Bezug und Selektion der Insertionsmutanten *Arabidopsis thaliana*

Die Insertionsmutanten wurden entweder über das *Arabidopsis* Stock Center Nottingham aus der Alonso/Crosby/Ecker-Sammlung des Salk-Institute for Biological Studies (ALONSO et al. 2003) oder im Fall von *Atpla* IIA-1 von dem Max Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln bezogen (STRIZHOV et al. 2003). *Atpla* IIA-1 wurde mit dem Vektor *pAC161*, basierend auf dem Vektor *pS001* (REISS et al. 1996) transformiert, während die übrigen Pflanzen mit dem Vektor *pROK2* (BAULCOMBE et al. 1986), einem *pBIN19* Derivat, transformiert wurden. Alle Linien wurden aus *A. thaliana* Columbia 0 generiert. Die Liste der Insertionsmutanten mit ihren Resistenz-Gen-Eigenschaften ist in Tabelle 2.37 einzusehen.

Die Selektion der Insertionsmutanten erfolgte nach Aussaat auf Selektionsmedium, DNA-Isolierung (s. 2.5.1) und anschließender PCR (s. 2.6), bei welcher die definierten *left border* Sequenzen der T-DNA und ein sequenzspezifisches Oligonukleotid genutzt wurden (s. 3.1). Diese genspezifisches Oligonukleotidpaar wurden mittels des Programms Primer3 (ROZEN und SKALETSKY 1998) erstellt und durch das Programm BLAST des National Center for Biotechnology Information (ALTSCHUL et al. 1997) überprüft (Tab. 2.44). Es folgte eine Sequenzierung der erhaltenen PCR Produkte (Fa. SeqLab, Göttingen), um festzustellen ob es sich um Insertionsmutanten handelt. Abschließend folgte ein Nachweise der Transkript Null-Eigenschaften der Insertionslinien mittels RT-PCR (s. 2.5.2f.).

2.3.1 *In vitro* Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die sterile Aussaat wurde für Isolierung und Funktionsanalyse der Insertionsmutanten angewandt. Die Zugabe entsprechender Antibiotika ermöglichte die Selektion von transgenen Pflanzen. Die auszuplattierenden Samen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt, wobei 1000 Samen 20 mg entsprachen. Die *A. thaliana* Samen wurden mit 1,0 ml 70%igem Ethanol versetzt und der Ansatz für 8 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde der Ethanol verworfen und durch 1,0 ml Sterilisationslösung ersetzt. Im Folgenden wurden die Samen fünfmal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht im Dunkeln bei 4° C feucht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine erneute Waschung mit sterilem, destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Samen zum Ausplattieren in sterilem Wasser aufgenommen. Es folgte eine zweitägige Lagerung bei 4° C in Dunkelheit. Im Folgendem wurden die Samen auf Petrischalen mit 25 ml 1,2 % MS-Agar (s. u.) mittels einer 10 µl Pipette verteilt, ohne den Agar zu verletzen. Anschließend wurden die Oberflächen getrocknet, bis sämtliche Wassertropfen abgedampft waren. Die Petrischalen wurden mittels Parafilm verschlossen und die Pflanzen in einer Klimakammer bei 23° C und 35 % relative Luftfeuchtigkeit unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) angezogen. Alternativ wurden die Samen nach der Sterilisation in steriler 0,1 % Agaroselösung aufgenommen, da dies eine flächige Verteilung der Samen ermöglichte.

Tabelle 2.4. Lösungen

Murashige und Skoog (MS) Medium(nach MURASHIGE und SKOOG 1962)

<u>100 x Mikroelementestammlösung [mg / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [mmol / l]</u>
2,5 CoCl ₂ x 5H ₂ O	0,11
2,5 CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,10
620,0 H ₃ BO ₃	0,10
83,0 KJ	5,00
1690,0 MnSO ₄ x 1H ₂ O	0,10
25,0 Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	1,03
860,0 ZnSO ₄ x 7H ₂ O	29,91

<u>10 x Makroelementestammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [mmol / l]</u>
4,4 CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,99
1,7 KH ₂ PO ₄	1,25
19,0 KNO ₃	18,79
3,7 MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,50
16,5 NH ₄ NO ₃	20,61

<u>50 x Eisenstammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [mmol / l]</u>
1,4 FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
1,9 Na ₂ EDTA	0,1

<u>100 x Vitaminstammlösung [mg / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [µmol / l]</u>
10 000 <i>myo</i> -Inositol	560,00
50 Nicotinsäure	4,06
50 Pyrodoxol HCl	2,43
10 Thiamin HCl	0,30

Anteile pro l:

MS-Mikroelementestammlösung (100 x)	10 ml
MS-Makroelementestammlösung (10 x)	100 ml
MS-Eisenstammlösung (50 x)	20 ml
MS-Vitaminstammlösung (100 x)	10 ml
Saccharose	20 g
Bakto-Agar	12 g

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 5,7 bis 5,8 eingestellt.

Zur Anfertigung des MS / 2 Mediums wurde die Konzentration der MS-Salze halbiert.

<u>Sterilisationslösung,</u>	
<u>Anteile pro ml</u>	
Natriumhypochlorit (12 %)	500 µl
steriles, dest. H ₂ O	500 µl
Triton X-100	0,003 µl

2.4 Funktionsanalyse der Insertionsmutanten

Um die Insertionsmutanten zu charakterisieren wurden auf verschiedenen Mangel- oder hormoninduzierten Medien Versuchsreihen durchgeführt, die im Folgendem aufgelistet sind.

Die Sämlinge wurden wie unter 2.3.2 beschrieben sterilisiert und zum Vorkeimen auf quadratischen 100 cm² Petrischalen ausgesät, die 65 ml Medium enthielten. Es wurden so viele Samen wie möglich (ca. 15) auf parallelen Linien ausgebracht und mit 3M Tape (Fa. Micropore) verschlossen. Dabei handelte es sich um ein Baumwollband, dass vor Austrocknung schützt, aber dennoch luftdurchlässig ist, um einem Ethyleneffekt entgegenzuwirken. Die Petrischalen wurden senkrecht unter einer Neonröhre (TLD 36 W/830, Fa. Philips) platziert, sodass das Licht nur von oben einstrahlen konnte. Nach drei bis vier Tagen hatten sich die Wurzel ausgebildet und es erfolgte der Umsatz gleichartig gewachsener Keimlinge auf neue Platten (s. 2.4.1.1-6). Dabei wurden die Keimlinge im Abstand von 1 cm auf eine 3 cm vom oberen Rand entfernten Linie positioniert, sodass insgesamt neun Keimlinge auf einer Petrischale Platz fanden. Wildtyp und Mutante wurden abwechselnd ausgebracht, um sicher zu stellen, dass es sich bei einer Phänotypveränderung nicht um einen Positionseffekt handelte. Das Wachstum der Keimlinge erfolgte bis zur Wachstumseinstellung.

Die Anzucht erfolgte unter standardisierten Bedingungen und verschiedenen Lichtstärken in einer Klimakammer (23° C, 35 % relative Luftfeuchte, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit).

Für die Auswertung wurden die Petrischalen in regelmäßigen Zeitabständen bei 400 dpi vor einem schwarzen Hintergrund abgebildet (Fa. Epson, Perception 1650). Einzelbilder von Keimlingen wurden bei 600 dpi dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mittels dhs-Bildvermessungsprogramm V4.01, Version 5.0.

Tabelle 2.5. Medium

<u>Gamborg B5 Original Medium</u> (nach GAMBORG et al. 1968)	
<u>1000 x Mikroelementestammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [μmol / l]</u>
0,025 CoCl ₂ x 5H ₂ O	0,10
0,025 CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,11
3,000 H ₃ BO ₄	48,52
0,75 KJ	4,52
10,000 MnSO ₄ x 1H ₂ O	59,16
0,250 Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	1,03
2,000 ZnSO ₄ x 7H ₂ O	6,96
<u>10 x Makroelementestammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [mmol / l]</u>
1,50 CaCl ₂	1,02
25,00 KNO ₃	24,73
2,50 MgSO ₄	1,01
1,50 NaH ₂ PO ₄	1,09
1,30 (NH ₄) ₂ SO ₄	1,01
<u>100 x Eisenstammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [mmol / l]</u>
3,671 Fe-NaEDTA	0,1
<u>100 x Vitaminstammlösung [g / l]</u>	<u>1 x Endkonzentration [μmol / l]</u>
0,1 Nikotinsäure	8,12
1,0 Thiamin HCl	29,65
0,1 Pyrodoxyl HCl	4860,00
10,0 Myo-Inositol	560,00
<u>Anteile pro l:</u>	
B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	1 ml
B5-Makroelementestammlösung (10 x)	100 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10 ml
B5-Vitaminstammlösung (100 x)	10 ml
Saccharose:	20 g
Bakto-Agar:	12 g

2.4.1 Minimal-Medium

(abgeändert nach ZHANG und FORDE 1998)

Das Minimal-Medium beruht auf einer fünfzigfachen Verdünnung von B5 Salzen und einem verminderten Saccharose-Gehalt im Vergleich zum B5-Medium. Zugleich wurde ein MES-Puffer mit einer Endkonzentration von 23 mmol / l verwendet, um pH-Wert Schwankungen auszuschließen. Das Medium enthielt keine Vitamine. Die 100 cm² Petrischalen wurden wie unter 2.4 beschrieben mit 65 ml Medium gefüllt und die Keimlinge in einem Abstand von 1 cm 3 cm unterhalb der Linie ausgelegt. Es wurde mit einer Lichtstärke von 1100 lx / m².

Die Anzucht, Auswertung und Dokumentation erfolgte wie oben beschrieben.

Tabelle 2.6. Minimal-Medium

<u>Anteile pro l:</u>	
B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	0,02 ml
B5-Makroelementestammlösung (10 x)	2,00 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10,00 ml
MES-Puffer (115 mmolar, pH 5,7)	200,00 ml
Saccharose	5,00 g
Bakto-Agar	12,00 g

2.4.1.1 Eisenmangel-Medium

(abgeändert nach GOERINOT et al. 1994)

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für drei bis vier Tage auf 1,2 % B5-Medium (Tab.2.5). Daran schloss sich ein Umsatz der Pflanzen auf das Minimal-Medium und das Eisenmangel-Medium an, wobei ersteres als Kontrolle diente. Anzucht und Dokumentation sind beschrieben unter 2.4. Für das Eisenmangel-Medium wurde Minimal-Medium ohne FeNaEDTA-Lösung angefertigt und dem Medium stattdessen 100 µmol / l Ferrozine, einem Eisen-Komplexbildner, zugesetzt (SCHMIDT et al. 2001).

Die Dokumentation, Anzucht und Auswertung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

Tabelle 2.7. Eisenmangel-Medium

<u>Anteile pro l:</u>	
B5-Mikroelementestammlösung (1000 x):	0,02 ml
B5-Makroelementestammlösung (10 x):	2,00 ml
FerroZine:	0,025 g
MES-Puffer (115 mmolar, pH 5,7):	200,00 ml
Saccharose:	5,00 g
Bakto-Agar:	12,00 g

2.4.1.2 *Phosphatmangel-Medium*

(abgeändert nach WILSON et al. 1990)

Drei bis vier Tage nach Aussaat der Samen wurden die Pflanzen von B5-Medium auf Minimal-Medium und Phosphatmangel-Medium überführt. Da dieser Test sehr sensitiv ist, wurde die Glasware grundsätzlich nur mit phosphatfreiem Detergenz gewaschen (Neodisher LM3, Fa. Roth). Statt Natriumdihydrogenphosphat wurde der Makroelementestammlösung Natriumchlorid zugesetzt.

Anzucht, Dokumentation und Auswertung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

Tabelle 2.8. Phosphatmangel-Medium

<u>Anteile pro l:</u>	
B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	20 µl
Phosphat-freie-Makroelementestammlösung (10 x)	2 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10 ml
MES-Puffer (115 mmolar, pH 5,7)	200 ml
Saccharose	5 g
Bakto-Agar	12 g

2.4.1.3 Sulfatmangel-Medium

(abgeändert nach KUTZ et al. 2002)

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für drei bis vier Tage auf B5-Medium. Anschließend erfolgte der Umsatz auf Minimal-Medium (als Kontrolle) und Sulfatmangel-Medium. In dem Sulfatmangel-Medium wurde in der Makroelementestammlösung das Magnesiumsulfat durch Magnesiumchlorid und das Ammoniumsulfat durch Ammoniumchlorid ersetzt. Anzucht, Dokumentation und Auswertung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

Tabelle 2.9. Sulfatmangel-Medium

<u>Anteile pro l:</u>	
B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	0,02 ml
Sulfat-freie-Makroelementestammlösung (10 x)	2,00 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10,00 ml
MES-Puffer (115 mmolar, pH 5,7)	200,00 ml
Saccharose	5,00 g
Bakto-Agar	12,00 g

2.4.1.4 Auxinkonzentrationsreihe

Für die Auxinkonzentrationsreihe wurde MS-Medium (Tab. 2.4) verwendet. Dazu wurden Stammlösungen von 1-Naphtylelessigsäure (NAA) in 99,8 %igen Ethanol angefertigt und vor dem Autoklavieren dem Medium zugefügt (Tab. 2.10). Nachdem sich die Wurzeln ausgebildet hatten, erfolgte der Umsatz der Keimlinge (nach ungefähr drei Tagen). Alle Ansätze enthielten dieselbe Ethanolkonzentration von 0,09 %. Es wurde bei einer Lichtstärke von 8000 lx / m² gearbeitet.

Dokumentation und Auswertung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

Tabelle 2.10. Auxinkonzentrationsreihe

<u>NAA-Stammlösungen</u> (Anteile pro l)	<u>1 x Endkonzentration NAA</u> [$\mu\text{mol} / \text{l}$]
Ethanol (99,8 %)	0
NAA (0,1 mmol) in EtOH (10 %)	0,03
NAA (0,1 mmol) in EtOH (10 %)	0,10
NAA (1,0 mmol) in EtOH (99,8 %)	0,30
NAA (1,0 mmol) in EtOH (99,8 %)	1,00

2.4.1.5 Nitratkonzentrationsreihe

(nach ZHANG und FORDE 1998)

Unter der Verwendung des Minimal-Mediums wurde mit verschiedenen Nitratkonzentrationen gearbeitet. Es wurden 24,81 mmol / l Kaliumchlorid anstelle von Kaliumnitrat und Ammoniumsulfat in der Makroelementstammlösung eingesetzt. Die sterilisierten Sämlinge wuchsen drei bis vier Tage auf einem Transfermedium mit Nitratveränderter-Makroelementelösung und 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$ Ammoniumnitrat. Es folgte ein Umsatz der Pflanzen auf eine KNO_3 -Konzentrationsreihe.

Die Anzucht, Dokumentation und Auswertung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

KNO_3 -Konzentrationsreihe (1 molar)

<u>Anteile pro l:</u>	
[mmol]	[ml]
0,01	0,01
0,10	0,10
1,00	1,00
10,00	10,00
50,00	50,00

Tabelle 2.11. Medium für Nitrat-KonzentrationsreiheAnteile für Transferagarplatten pro l:

B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	0,02 ml
Nitrat-veränderte-Makroelementestammlösung (10 x)	2,00 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10,00 ml
1 molare NH_4NO_3 -Lösung	0,01 ml
MES-Puffer (115 mmolar, pH 5,7)	200,00 ml
Saccharose	5,00 g
Bakto-Agar	12,00 g

Anteile für KNO_3 -Konzentrationsreihe pro l:

B5-Mikroelementestammlösung (1000 x)	0,02 ml
Nitrat-veränderte-Makroelementestammlösung (10 x)	2,00 ml
B5-Eisenstammlösung (100 x)	10,00 ml
KNO_3 -Lösung (1 molar)	0,01-50 ml
MES Puffer (115 mmolar, pH 5,7)	200,00 ml
Saccharose:	5,00 g
Bakto-Agar:	12,00 g

Molekularbiologische Untersuchungen

Im Folgenden werden die Methoden vorgestellt, welche auf molekularbiologischen Grundlagen basieren.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Separation genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgt mittels Phenolextraktion. Phenol und Chloroform haben eine denaturierende Wirkung auf Proteine, die in der Interphase zwischen der Phenol- und der wässrigen Phase mit der Nukleinsäure ausfallen. Da DNA in Phenol löslich ist, wurde mit Tris-HCl pH 7,5 gesättigtes Phenol verwendet. Chloroform hat eine zusätzlich stabilisierende Wirkung auf die Grenze der wässrigen und der phenolhaltigen Phase. Um ein Aufschäumen zu verhindern wurden geringe Mengen Isoamylalkohol eingesetzt.

Die Pflanzenprobe (50-100 mg) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter flüssigem Stickstoff zerstoßen. Anschließend wurden sofort 700 µl Extraktionspuffer und 100 µl RNase A (10 mg / ml) zugegeben, der Ansatz vermengt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 5minütige Zentrifugation. Ungefähr 500 µl des klaren Überstands wurden in 550 µl Phenollösung (Phenol / Chloroform / Isoamyl-Mischung, 25: 24: 1) überführt, 10 Sekunden vermengt, und anschließend 10 Minuten auf Eis gestellt. Es schloss sich eine Zentrifugation über 5 Minuten bei Raumtemperatur an. 475 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit vorgelegten 550 µl Phenollösung überführt und für 10 Sekunden vermengt. Eine weitere 5minütige Zentrifugation folgte. Der DNA-haltige Überstand wurde anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol gefällt, und für 10 Minuten sedimentiert. Das Isopropanol wurde verworfen und das DNA-haltige Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 15000 UpM in einer Heraeus Biofuge 15 durchgeführt.

Nach dem Trocknen der Proben erfolgte die Aufnahme der DNA in 35 µl sterilem, destilliertem Wasser und eine Dokumentation mittels Agarosegel-Elektrophorese (s. 2.6.1). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert. Nach geeigneter Verdünnung wurde die Extinktion [E] bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration errechnete sich nach folgender Formel:

$$(E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}) / 1000 = y \text{ µg DNA} / \text{µl}$$

Die Quotienten $[E_{260}/E_{230}]$ und $[E_{260}/E_{280}]$ gaben Auskunft über eine Verunreinigung mit Polysacchariden oder Proteinen. Werte zwischen 1,8 und 2,0 belegten eine ausreichend hohe Reinheit der DNA.

Tabelle 2.12. Extraktionspuffer

<u>Anteile pro l:</u>	
0,20 mol	Tris / HCl, pH 9,0
0,40 mol	LiCl
0,25 mol	EDTA
1,00 % v / V	SDS (10 %)

2.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Gesamt-RNA wurde mittels des NucleoSpin RNA II Plant-Kit (Fa. Machery-Nagel) aus den Keimlingen oder der Wurzel der Pflanze isoliert. Hierzu wurden 50 bis 100 mg Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zerstoßen und sofort mit 400 µl Puffer RA1 versetzt. Die Viskosität der Suspension wurde mittels einer Membranfiltration (NucleoSpinFilter, 1 min, 15000 g) reduziert. Das Filtrat wurde in eine neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 96 % Ethanol behandelt. Das Lysat wurde auf ein NucleoSpinCup geladen (30 s, 8000 g), der Durchfluss verworfen und der NucleoSpinCup in einem neuen Reaktionsgefäß platziert. Nach Trocknung der Membran (1 min, 15000 g) wurden 90 µl des DNase-Reaktionsmix auf die Membran pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Puffer RA2 hinzugefügt und bei 8000 g für 30 Sekunden zentrifugiert.

Der NucleoSpinCup wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 600 µl Puffer RA3 gewaschen. Nach erneuter Trocknung der Membran (2 min, 15000 g), wurde der NucleoSpinCup in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Nuklease-freies-Wasser zupipettiert. Durch Zentrifugation wurde die RNA von der Säule gelöst und sofort bei -70° C gelagert. Eine Dokumentation der RNA erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese.

Nach geeigneter Verdünnung wurde die Extinktion [E] bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Die RNA-Konzentration errechnete sich nach folgender Formel:

$$(E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}) / 1000 = y \text{ } \mu\text{g RNA} / \mu\text{l}$$

Die Quotienten $[E_{260}/E_{230}]$ bzw. $[E_{260}/E_{280}]$ gaben Aufschluss über die Verunreinigung der RNA mit Polysacchariden bzw. Proteinen. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 lag die RNA in ausreichend reiner Form vor.

2.5.3 cDNA-Synthese

RNA-Sequenzen werden durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA-Sequenzen überführt, welche als cDNA bezeichnet werden. Die meisten eukaryontischen mRNAs tragen eine Folge von Adenin-Resten am 3' Ende (polyA-Ende). An dieses Ende wird ein komplementäres Oligonukleotid aus Deoxythimidin-Nukleotiden gebunden, welches als Start für die Reverse Transkriptase dient, die dann mit Deoxynukleosid-Triphosphaten die sogenannte Erststrang-Synthese durchführt. Nach Degradierung der Transkriptase wird RNase H zugesetzt, um die RNA in DNA / RNA-Hybriden abzubauen.

Mittels des Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit für Einstrang-cDNA-Synthese (Fa. MBI Fermentas) wurde aus Gesamt-RNA cDNA synthetisiert. In 0,2 ml Reaktionsgefäßen wurden 1-5 µg der Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 ng / µl) versetzt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Damit keine Sekundärstrukturen in der RNA gebildet wurden, wurde die Proben jeweils 10 Minuten bei 70° C inkubiert und anschließend für mindestens 1 Minute auf Eis belassen.

Folgender Ansatz wurde in der vorgegebenen Reihenfolge zusammengefügt und je 7 μl mit dem RNA / Oligonukleotid-Mix versetzt:

5 x Reaktionspuffer 4 μl

Ribonuklease Inhibitor (20 U / μl) 1 μl

10 mmolarer dNTP Mix 2 μl

Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37° C.

Dem Reaktionsansatz wurde mit 1 μl (200 U) der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reversen Transkriptase inkubiert (60 min, 42° C). Die Reaktion wurde durch eine 10minütige Erhitzung auf 70° C abgestoppt. Abschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und mit 1 μl RNase H versetzt (20 min, 37° C), um die verbliebene RNA abzubauen. Die cDNA wurde bei -20° C gelagert.

Die cDNA-Extinktion [E] wurde im Photometer bei 260 nm ermittelt und die Konzentration durch folgende Formel bestimmt:

$$(E_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}) / 1000 = y \text{ } \mu\text{g cDNA} / \mu\text{l}$$

Eine Dokumentation der Ergebnisse erfolgte in einer Agarosegel-Elektrophorese (s. 2.6.1). Der Reinheitsgrad wurde der RNA-Isolierung (s. 2.5.2) entsprechend ermittelt.

2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

(nach MULLIS et al. 1987)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) steht eine Methode zur Verfügung, welche die Vermehrung spezifischer DNA mit Hilfe von bekannten Sequenzfragmenten (Oligonukleotiden) erlaubt. Im ersten Schritt der PCR erfolgt eine Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 94° C in Einzelstränge. Es folgt der Prozess der Anlagerung (*Annealing*), welches die Bindung der Oligonukleotide an die komplementären Bereiche der einzelsträngigen Ziel-DNA beinhaltet.

Während der anschließenden Elongation, werden diese partiellen Doppelstränge von einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Substrat genutzt und ein komplementärer DNA-Strang aufgebaut. Auf diese Weise wird die DNA-Menge innerhalb eines solchen Zyklus verdoppelt. So wird durch Wiederholung der Zyklen eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA Fragmente erreicht.

Für die Isolierung der Insertionsmutanten war es notwendig die TaKaRa Ex Taq (Fa. TaKaRa) einzusetzen, welche sich durch eine höhere Genauigkeit und eine effizientere Amplifikation als gewöhnliche Taq-Polymerasen auszeichnet. Für andere Reaktionen wurde die Eppendorf Taq DNA Polymerase (Fa. Eppendorf) verwendet. Für spezifische Anwendungen, wie der PCR für die Proteinexpression in *Escherichia coli* (s. 2.13) oder für *Site Directed Mutagenesis* (s. 2.11) war es notwendig eine *proof reading*-Polymerase zu verwenden. Neben ihrer 5'-3'-Polymerisationsaktivität besitzen *Pfu*-Polymerasen auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Des Weiteren erzeugen *Pfu*-Polymerasen keine Deoxyadenosinmonophosphat-Nukleotide an den 3'-Enden, was eine *blunt end* Klonierung, wie bei dem *pENTR/TOPO*-Vektor (s. 2.7.1, und Anhang Abb.1) erforderlich, möglich macht. Es fanden *proof reading*-Polymerasen der Firmen Stratagene (*Pfu*-Turbo) und Biometra (Dynazyme Ex Taq) Verwendung.

Die Oligonukleotide wurden durch Nukleinsäuren-Sequenzvergleich oder mit Hilfe des Programms Primer3 (ROZEN and SKALETSKY 1998) erstellt. Zur Überprüfung diente das Programm Oligonucleotide Properties Calculator (www.basic.nwu.edu). Die Spezifität der Oligonukleotide wurde mir dem Programm BLAST überprüft. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen im Nanomaßstab synthetisiert.

Tabelle 2.13. Beispiel für einen PCR-Ansatz

<u>Anteile pro 50 µl</u>	
Komplettpuffer (10 x)	5 µl
dNTP's (10 mmol pro Nukleotid)	4 µl
5' Oligonukleotid (10-12 pmol / µl)	1 µl
3' Oligonukleotid (10-12 pmol / µl)	1 µl
DNA-Matrize (0,1-100 ng / µl)	y µl
DNA Polymerase (1 U)	0,5 µl
steriles dest. H ₂ O	> 50 µl

Tabelle 2.14. Grundeinstellung des verwendeten Thermozyklers

<u>Hot Start</u>	95° C	5 (2) min	} 30-40 Zyklen
Denaturierung	94° C	0,5 min	
Anlagerung	51-65° C	0,5 min	
Elongation	72° C	1,5-2,5 min	
<u>Extension</u>	72° C	4 (15) min	

Die Anlagerungstemperatur für die jeweiligen Oligonukleotidkombinationen wurde entsprechend angepasst und lag 5° C unter dem entsprechenden T_m-Wert. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Synthese mit einer *Pfu*-Polymerase. Es fand ein Thermozykler der Firma Hybaid Verwendung.

2.6.1 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung in einer Agarosegel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden und durch den Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert werden.

Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in Nukleinsäuren interkaliert. Dabei interagieren seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen von Nukleinsäuren. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). DNA verstärkt die Fluoreszenz, sodass die Färbung der Nukleinsäuren auch in Gegenwart des freien Ethidiumbromids im Gel zu sehen ist. Der Nachweis erfolgt ab 10 ng doppelsträngiger DNA.

DNA-Fragmente wurden in Gelen von 0,8-1,2 % Agarose und 1 x TAE als Puffersystem aufgetrennt. Zur späteren Erkennung der DNA war der verflüssigten Agarose Ethidiumbromid (0,05 g / ml) beigemischt worden. Als Größenstandard diente eine 1 kBp DNA-Leiter der Firma GeneCraft. Die aufzutrennende DNA-Präparation wurde zuvor mit mindestens 1/6 Volumen Gel-Ladungspuffer versetzt. Die für eine optimale Trennung erforderliche Spannung lag zwischen 100 V und 120 V. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das DNA-Trennmuster im UV-Licht (Transilluminator) auf einer Gel-Dokumentationsanlage (Fa. Intas) dokumentiert.

Tabelle 2.15. Gelladungspuffers und TAE-Puffer

<u>6 x Gelladungspuffer</u>		<u>50 x TAE</u>	
<u>(Anteile pro l)</u>		<u>(Anteile pro l)</u>	
0,25 % v / V	Bromphenolblau	2,00 mol	Tris / Acetat, pH 8,0
0,25 % v / V	Xylencyanol	0,05 mol	EDTA
7,50 mmol	EDTA, pH 8,0		
50,00 % v / V	Glycerin		

2.6.2 Erhöhung der Reinstkonzentration von Nukleinsäuren

Nach Fraktionierung der DNA in einer Agarosegel-Elektrophorese, wurden die DNA-Produkte, welche Weiterverwendung fanden (z.B. für Ligation) mittels verschiedener Kits gereinigt. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Folgende Kits wurden für die direkte Reinigung der Proben verwendet:

- E.N.Z.A. Cycle Pure Kits (Fa. Peqlab)
- Qiaquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen)

Für die Elution der Proben aus dem Agarosegel wurden folgende Kits verwendet:

- Qiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen)
- Ultrafree-DA (Fa. Millipore)

Bei unzureichender Konzentration der Proben erfolgte eine Fällung mit Isopropanol und einem anschließendem Waschschrift mit eiskaltem 70 %igem Ethanol. Die Aufnahme der Proben erfolgte in einer geringeren Menge (35-50 µl) sterilem, destilliertem Wasser.

Sämtliche DNA Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt.

2.7 Klonierung mittels Gateway System

Das System nutzt zum einen die Fähigkeiten der Topoisomerase I und zum anderen die des Phagen Lambda (λ) (PTASHNE 1992). Im Folgenden werden die Grundlagen des Systems erläutert. Die einzelnen Abschnitte der Arbeit gliedern sich in: Klonierung in den Eingangsvektor (s. 2.7.1) und Klonierung in den Zielvektor (s. 2.7.2).

Die Topoisomerase I des Vacciniavirus bindet sich an Doppelstrang-DNA der Nukleotidfolge „CCCTT“ und spaltet die Phosphodiester-Brücke eines Strangs (SHUMAN 1991). Die Energie der gespaltenen Phosphodiester-Brücke wird in der kovalenten Bindung des 3'Phosphats des geschnittenen Strangs und dem Tyrosil-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Dieser Phospho-Tyrosil Bindung zwischen DNA und Enzym kann durch den 5'Hydroxyl-Rest des Originalstrangs angegriffen werden, was eine Umkehrung der Reaktion und Freisetzung der Topoisomerase I zur Folge hat (SHUMAN 1994). Das 5'Ende der TOPO geladenen DNA wurde durch den Anhang von vier Nukleotiden modifiziert und an den Eingangsvektor *pENTR/D-TOPO* adaptiert, so dass durch den Anhang von vier Basen (CACC) an das 5'Oligonukleotid das PCR-Produkt gerichtet kloniert wird. Der Gateway TOPO Cloning Kit nutzt durch Anhängen eines 3'Einzelstrang-Ende an den Eingangsvektor diese Reaktion zur effizienten, gerichteten Klonierung (CHENG und SHUMAN 2000).

Das *E. coli* Chromosom und die λ -DNA enthalten homologe DNA-Sequenzen. Dieser Bereich wird als Anheftungsstelle (*attachment site, att*) bezeichnet. Die Anheftungsstelle des Bakteriums wird *attB*, die des Phagen *attP* genannt. Über einen sequenzspezifischen Rekombinationsvorgang, an denen neben den beiden *att*-Bereichen die Proteine Int (Integrase, λ -codiert) und IHF (*integration host factor*, *E. coli*-codiert) beteiligt sind, kommt es zur Integration der zirkulären λ -DNA in das *E. coli* Chromosom (LANDY 1989). Der Austritt der λ -DNA stellt die Rückreaktion der Rekombination dar und verlangt zwei zusätzliche Proteine (Xis [λ -codiert] und Fis [*E.coli* codiert]). Die Proteine für die Rekombination sind im Gateway Clonase Enzym Mix enthalten. Jedoch wurden im Gateway System die Anheftungsstellen (*att*) modifiziert, um Spezifität und Effizienz zu sichern und Stopcodons zu eliminieren (BUSHMAN et al. 1985).

2.7.1 Klonierung in den Eingangsvektor *pENTR/D-TOPO*

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 4 µl des frischen PCR Produkts mit 1 µl Salzlösung und 0,5 µl *pENTR/D-TOPO* versetzt (Genkarte, s. Anhang Abb.1). Der Reaktionsansatz wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Auf Eis wurden 100 µl chemisch kompetente One ShotTOP10 *E. coli* Zellen angetaut, um dann vorsichtig mit 2 µl der TOPO Klonierungsreaktion vermennt zu werden. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden der Reaktionsansatz für 30 Sekunden bei 42° C Hitzeschock behandelt und abschließend sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Auf Zimmertemperatur erwärmtes SOC-Medium (250 µl) wurde dem Reaktionsansatz zugefügt und dieser wurde für 60 Minuten auf einem Rundschtüttler inkubiert (180 UpM, 37° C).

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf zwei vorbereitete Petrischalen mit LB-Agar (50 µg / ml Kanamycin) ausplattiert. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion auf die Plasmid-DNA überprüft (s. 2.6). Die Plasmid-DNA wurde isoliert (s. 2.12.1), sequenziert (Fa. Seqlab) und von den geprüften Bakterien-Kolonien wurden Dauerkulturen angelegt (s. 2.12).

2.7.2 Klonierung in den Zielvektor *pKGWFS7*

Für die stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana* wird der binäre Vektor *pKGWFS7* (Genkarte, s. Anhang Abb. 2) verwendet, wobei es zur Integration des T-DNA Bereichs in das Pflanzengenom kommt (s. auch 2.2). Die Klonierung in den Zielvektor findet durch eine konservative Rekombination statt, wodurch es zu keinem Verlust oder Zusatz von Nukleotiden kommt (s. 2.7). Der Zielvektor wurde aus dem VIB Institut der Universität in Ghent, Belgien bezogen (KARIMI et al. 2002). Er enthielt ein GFP-GUS Konstrukt zur transkriptionellen Promotoranalyse (s. Genkarte im Anhang Abb.1). Das Konzentrationsverhältnis des Eingangsvektors *pENTR/D-TOPO* und des Zielvektors *pKGWFS7* lag bei $\frac{1}{4}$ zu $\frac{3}{4}$.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert und vorsichtig vermenegt:

Reaktionspuffer (5 x)	1 μ l
Eingangsvektor mit Insert (<i>pENTR/D-TOPO</i>)	1 μ l
Zielvektor (<i>pKGWFS7</i>)	3 μ l
Gateway LR Clonase Enzym Mix	1 μ l
steriles dest. H ₂ O	> 5 μ l

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Zum Abbruch wurden dem Reaktionsansatz 2 μ l Proteinase K-Lösung zugefügt und für 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde sofort in 100 μ l kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert (s. 2.10.4). Anschließend wurden die Kolonien mittels PCR (s. 2.6) auf das Plasmid geprüft, die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.12.1) und bei -20° C aufbewahrt. Von den auf das inserierte DNA-Fragment geprüften Kolonien wurden Dauerkulturen angelegt (s. 2.12).

2.8 Herstellung kompetenter Agrobakterien (*A. tumefaciens*)

(nach HÖFGEN und WILLNITZER 1988)

Durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA Insertion kann *Arabidopsis thaliana* stabil transformiert werden (s. auch 2.2). Agrobakterien sind Bodenbakterien, welche Pflanzenzellen durch Insertion eines Stücks bakterieller DNA in das pflanzliche Genom in tumorbildende Zellen, genannt Wurzelhalsgallen, transformieren (SCHLEGEL 1992).

Für die spätere stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* durch Vakuum Infiltration (s. 2.2.1.1) war es notwendig den binären Vektor *pKGWFS7* in Agrobakterien zu transformieren (s. 2.8.1). Dadurch konnten gewünschte DNA-Fragment, wie Promotor::*uidA* Sequenzen (s. 2.7.2), mittels T-DNA Insertion (s. 2.2) in das Genom von *A. thaliana* inseriert werden.

Zellen einer Glycerinkultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurden auf eine 1,2 % LB-Agarplatte (100 µg / ml Rifampicin) ausgestrichen und ein bis zwei Tage bei 28° C inkubiert. Eine Einzelkolonie der Bakterien wurde in 2,5 ml LB-Medium (100 µg / ml Rifampicin) über Nacht bei 28° C und 150 UpM angezogen. Von der Übernachtskultur wurden 10 ml mit 200 ml LB-Medium bis zu einer OD von 0,6-0,8 angezogen (28° C, 150 UpM Rundschüttler), wobei jede 30 Minuten die Optische Dichte bei 550 nm bestimmt wurde. Die Kultur wurde bei 5000 UpM in SS34 Röhrchen für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit sterilem TE-Puffer gewaschen und in 1/10 (= 2 ml) des Ausgangsvolumen mit LB-Medium (Tab. 2.17) resuspendiert. Die Zellen wurden in 250 µl Fraktionen in 2,0 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und sofort bei -70° C eingefroren. Die kompetenten Agrobakterien wurden freundlicherweise von Dipl.-Biol. Melanie Schröder, Institut für Botanik der Universität Hannover, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.16. TE-Puffer und LB-Medium

<u>TE-Puffer</u> (Anteile pro l)		<u>Lurient Broth (LB)-Medium</u> (Anteile pro l)	
Tris / HCl, pH 8,0	10,0 mmol	Hefeextrakt	5 g
Tris / EDTA, pH 8,0	1,0 mmol	NaCl	10 g
		Trypton	10 g
		→ pH 7,5, NaOH	

2.8.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

(nach WEIGEL und GLAZEBROOK 2001)

Eine Fraktion der kompetenten Agrobakterien-Zellen (s. 2.8) wurde auf Eis aufgetaut und 5 µl der zuvor gereinigten Plasmid-DNA (s. 2.12.1) zugefügt. Es folgte eine 5minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in flüssigem Stickstoff für 5 Minuten schockgefroren. Es schloss sich eine Inkubation des Ansatzes für 5 Minuten bei 37° C im Wasserbad an. Zur Expression der Antibiotikumresistenz wurde der Reaktionsansatz mit 1 ml LB-Medium (s. Tab 2.16) versetzt und für 24 Stunden inkubiert (28° C, 130 UpM, Rundschüttler). Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten bei 10000 g sedimentiert und in 250 µl LB-Medium aufgenommen. Die Proben wurden auf 1,2 % LB-Agarplatten mit Antibiotika, welches den Resistenz-Gen-Eigenschaften des Bakterienstamms und des entsprechenden Vektors entsprach, ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 28° C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf 1,2 % LB-Agarplatten (Tab. 2.16) vereinzelt und mittels PCR (s. 2.6), Isolierung von Plasmid-DNA (s. 2.12.1) und Sequenzierung (Fa. SeqLab, Göttingen) überprüft. Von den geprüften Kolonien wurden Dauerkulturen angelegt (s. 2.12), die bei -80° C über mehrere Monate stabil waren.

2.9 Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TOPO TA Cloning Kit

Das TA Cloning System beruht auf der terminalen Transferaseaktivität einer thermostabilen Enzyms wie der DNA-abhängigen Taq-DNA-Polymerase. Diese Transferase fügt am 3' Ende der PCR-Produkte ein Desoxyadenin an. Um eine vollständige Verlängerung des zu amplifizierenden Bereiches und der damit verbundenen Adenin-Überhänge zu gewährleisten, erfolgt als letzter PCR-Schritt eine Extension bei 72° C für 10 Minuten.

Der pCR2.1-TOPO-Vektor (Genkarte, s. Anhang Abb. 3) liegt bereits in einer geöffneten und linearisierten Form vor und besitzt zur Aufnahme der PCR-Produkte komplementäre Desoxythymidin-Überhänge, sodass eine direkte Ligation der DNA-Fragmente ermöglicht wird. Bei diesem Plasmid liegt der Polylinker in einem lacZ-Gen (Abb. 2.1), welches den aminoterminalen Teil der β -Galaktosidase kodiert. Der Polylinker unterbricht das lacZ-Leseraster nicht. In einem geeigneten *Escherichia coli*-Wirtsstamm, der auf einem Episom das lacZ-Gen für den carboxyterminalen Teil der β -Galaktosidase besitzt, führt die Expression dieser Fragmente zur Synthese der aktiven β -Galaktosidase. Diese Bakterien bilden in Gegenwart des Farbstoffes X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoxyl- β -galaktopyranosid) und des Induktors IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid) blaue Kolonien, da X-Gal durch β -Galaktosidase in 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl überführt wird, welches nach enzymatischer Spaltung zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Der Einbau der Fremd-DNA in die Polylinker-Region zerstört das Leseraster des lacZ-Gens. Die betreffenden rekombinaten Bakterienkolonien bleiben somit in Gegenwart von X-Gal und IPTG farblos. Dieses Verfahren wird als Blau-Weiß-Selektion bezeichnet. Der Ligationsansatz wurde wie folgt angesetzt:

frisches PCR Produkt: 4 μ l

Salz-Lösung: 1 μ l

pCR2.1-TOPO 1 μ l

Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.9.1 Transformation von *One Shot E. coli*-TOP 10-Zellen

Ein Reaktionsgefäß mit *One Shot E. coli*-TOP 10-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Von dem Reaktionsansatz wurden 2 µl hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42° C behandelt und mit 250 µl SOC-Medium versetzt. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37° C (180 UpM).

Von jedem Transformationsansatz wurden 100 µl auf 1,2 % LB-Agarplatten (s. 2.16) ausgestrichen, die 40 µl des Farbstoffs X-Gal (Stammlösung: 40 mg / ml DMF) und 50 µg / ml Kanamycin enthielten.

Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert, um anschließend die farblosen Kolonien zur Analyse zu verwenden.

2.10 Klonierung in ein Expressionssystem

Zur späteren Exprimierung der Proteine wurden die durch PCR amplifizierten cDNA-Nukleotidfolgen in ein Expressionssystem transformiert.

Der Expressionsvektor *pQE-30* (Fa. Qiagen, Genkarte, s. Anhang Abb. 4) hat neben einer Ampicillinresistenz, vermittelt durch das β-Lactamasegen, auch einen lac-Operator, der die regulierte Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* erlaubt. Die Proteinsynthese wird durch hohe Level an lac-Repressoren reprimiert und kann gezielt durch Zugabe des Induktors IPTG reguliert werden. Am 5'Ende der Polylinker-Region befindet sich eine 6 x His-Tag codierende Sequenz (s. Anhang, Abb. 4), die eine spätere Reinigung des Proteins über Ni²⁺-NTA (s. 2.13.1) ermöglicht. Unmittelbar vor dem 6 x His-Tag liegt das Startcodon, welches während der Translation durch den genetischen Kode in die Aminosäure Methionin umgeschrieben wird. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Nukleinsäuresequenzen im Leseraster des Vektors liegen, wenn sie mit diesem legiert werden.

2.10.1 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse wird zur Charakterisierung, Isolierung und Identifizierung doppelsträngiger DNA eingesetzt. Die Grundlage bildet die Aktivität von Restriktionsenzymen bakteriellen Ursprungs, welche an spezifischen Erkennungsstellen doppelsträngiger DNA binden und die Phosphodiesterbindungen hydrolytisch spalten. Bei der Restriktion können je nach verwendetem Enzym stumpfe (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen.

In einem Restriktionsansatz wurde die zu analysierende DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym unter definierten Pufferbedingungen eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die entstandenen Restriktionsfragmente haben eine definierte Länge und konnten durch Agarosegel-Elektrophorese (s. 2.6.1) identifiziert werden.

Tabelle 2.17. Standardmäßiger Restriktionsansatz. Alternativ wurden 10 U Enzym bei der Restriktion von Vektor-DNA eingesetzt.

Puffer (10 x)	1 µl
Restriktionsenzym (1 U)	je 0,1 µl
Nukleinsäure (1 µg):	y µl
steriles dest. H ₂ O :	> 10 µl

Es fanden Restriktionsendonukleasen der Firmen GeneCraft, Eurogentec oder MBI Fermentas Anwendung.

2.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden DNA-Abschnitte legiert, indem Phosphodiesterbrücken zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxy-Ende der doppelsträngigen DNA von zwei DNA-Abschnitten entstehen. Die Randabschnitte müssen dabei zueinander komplementär sein, welches durch Verwendung identischer Restriktionsendonukleasen gewährleistet ist. Hauptkomponente der Ligation ist die T4-Ligase, welche die Ligation initiiert.

Tabelle 2.18. Standard Ligationsansatz.

Vektor-DNA (3-30 fmol / l)	y μ l
Insert-DNA (9-30 fmol / l)	y μ l
Ligase-Reaktionspuffer (5 x)	2 μ l
T4-Ligase (1 U)	1 μ l
steriles dest. H ₂ O (max. 15 μ l)	> 20 μ l

Der Ansatz wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Anteil der DNA-Abschnitte war von der vorliegenden Nukleotidlänge des Vektors und des zu konjugierenden Inserts abhängig. Das Verhältnis von Vektor zu Insert lag im Allgemeinen bei 1:3. Es fanden Ligationssysteme der Firmen New England Biolabs und Invitrogen Verwendung.

2.10.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

(nach NISHIMURA et al. 1990)

Zellen einer Glycerinkultur von *E. coli* XL1-Blue wurden auf eine Agarplatte (LB-Medium, 12,5 μ g / ml Tetracyclin) ausgestrichen. Eine Einzelkolonie wurde in 2,5 ml LB-Medium (12,5 μ g / ml Tetracyclin) über Nacht bei 37° C und 180 UpM angezogen. In einem Erlenmeyerkolben wurden 1 ml dieser Übernachtskultur mit 200 ml Medium A (Tab. 2.20) überführt und die Zellen bei 37° C unter Schütteln bis zur mittleren logarithmischen Phase hochgezogen. Dabei wurde jede Stunde die Optische Dichte bei 600 nm im Photometer bestimmt. Bei einer OD₆₀₀ 0,4-0,5 war die gewünschte Zelldichte erreicht. Die Zellkultur wurde nun für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde anschließend in sterile SS34-Zentrifugenröhrchen überführt und die Bakterien für 10 Minuten bei 1500 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Sediment sanft durch leichtes Schwenken im Eisbad in 0,25 ml Medium A (4° C) und 1,25 ml Medium B (4° C) resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf Eis in sterile und vorgekühlte 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (0,1 ml pro 2,0 ml Gefäß) und sofort bei -70° C eingefroren.

Die Kompetenz der Bakterien wurde mit dem Vektor pCR2.1-TOPO überprüft und lag bei 10⁶-10⁷ Zellen / μ g DNA.

Tabelle 2.19. Medien für die Herstellung kompetenter Zellen.

<u>Medium A (4° C)</u>		<u>Medium B (4° C)</u>	
<u>Anteile pro l LB-Medium, pH 7,0</u>		<u>Anteile pro l LB-Medium, pH 7,0</u>	
<u>(Tab. 2.16)</u>		<u>(Tab. 2.16)</u>	
10,0 ml	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	12 ml	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	(1 molar)		(1 molar)
0,2 % w / V	Glukose	36 % v / V	Glycerin
<u>SOC-Medium</u>			
<u>(Anteile pro l)</u>			
20,0 g	Trypton		
15,0 g	Hefeextrakt		
0,5 g	NaCl		
10,0 ml	KCl (250 mmolar)		
	→ pH 7,0, NaOH		
Nach dem Autoklavieren Zugabe von:			
5,0 ml	MgCl ₂ (2 molar)		
20,0 ml	Glukose (1 molar)		

2.10.4 Transformation von *Escherichia coli* XL1-Blue

(nach NISHIMURA et al. 1990)

Im Eisbad wurden 100 µl kompetente Zellen aufgetaut und vorsichtig mit der Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz verblieb 30 Minuten im Eis und wurde für 60 Sekunden bei 42° C inkubiert und dann für 2 Minuten auf 0° C abgekühlt, bevor er mit 0,5 ml SOC-Medium versetzt wurde. Zur Expression der Antibiotikumresistenz wurde der Ansatz bei 37° C und 180 UpM für eine Stunde geschüttelt.

Der gesamte Transformationsansatz wurde auf 1,2 % LB-Agarplatten (Tab. 2.16) mit Antibiotikum, welches den Resistenz-Gen-Eigenschaften des Vektors und des Bakteriums entsprach, ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf das Plasmid durch PCR (s. 2.6), Isolierung der Plasmid-DNA (s. 2.12.1) und Sequenzierung (Fa. SeqLab, Göttingen) geprüft.

2.11 Gerichtete Mutagenisierung (*Site Directed Mutagenesis*)

Der Quick Change *Site Directed Mutagenesis* Kit (Fa. Stratagene) bietet die Möglichkeit spezifische Nukleotide auszutauschen, um eine Beziehung zwischen Struktur und Funktion verschiedener Aminosäuren bei der Genexpression festzustellen. Die Plasmid-DNA wird hierbei mittels einer *proofreading*-Polymerase amplifiziert und dabei werden einzelne Basen innerhalb gewählter Oligonukleotide ausgetauscht. Nach der PCR folgt ein Verdau mit der Endonuklease DpnI (Zielsequenz: 5'-Gm⁶ATC 3'), die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA verdaut. Die isolierte Plasmid-DNA aus *TOP 10 E. coli* Zellen ist methyliert. So kann der Originalstrang durch die Verwendung von DpnI verdaut werden, ohne dass das mutagenisierte Plasmid angegriffen wird.

Die verwendeten Oligonukleotide müssen die gewünschten Mutationen tragen und an derselben Stelle der Sequenz an gegenüberliegenden Seiten des Plasmids binden. Dabei liegt die gewünschte Mutation in der Mitte der Oligonukleotide, mit jeweils 10 bis 15 Basen korrekter Sequenz an jeder Seite. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo-Hybaid synthetisiert und FPLC gereinigt. Folgende Formel wurde zur Ermittlung der T_m der Oligonukleotide benutzt:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ Fehlanpassung}$$

N → Oligonukleotidlänge in Basen; Werte von % GC und % Fehlanpassung in ganzen Zahlen

Tabelle 2.20. Pipettierschema.

Reaktionspuffer (10 x)	5 µl
Plasmid-DNA (5-50 ng)	y µl
5'-Oligonukleotid (125 ng)	1 µl
3'-Oligonukleotid (125 ng)	1 µl
dNTP Mix	1 µl
steriles dest. H ₂ O	> 50 µl
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U)	1 µl

Tabelle 2.21. Grundeinstellung des Thermozyklers.

<i>Hot Start</i>	95° C	0,5 min	} 16 Zyklen
Denaturierung	94° C	0,5 min	
Anlagerung	70-80° C	1 min	
Elongation	68° C	2 min / kBp → 9,6 min	

Die Anlagerungstemperatur für die jeweiligen Oligonukleotidkombinationen wurde entsprechend angepasst und lag 5° C unter dem entsprechenden T_m -Wert. Es fand eine *proof reading*-Polymerase der Firma Stratagene (*Pfu-Turbo*) Verwendung.

Direkt nach jeder Amplifikationsreaktion wurde 1 µl DpnI (10 U / µl) zugefügt und vorsichtig mit dieser vermischt. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert (10000 g, 30 s) und die parentale DNA für eine Stunde bei 37° C verdaut.

Die mutagenisierte Plasmid-DNA wurde nach Abschluss des Verfahrens mittels einer leicht veränderten Hitzeschocktransformation (s. 2.46) unter der Verwendung von Falcon 2059 Polypropylen Behältern in kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue Zellen transformiert. 50 µl der dem Reaktionsmix zugehörigen XL1-Blue Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut vorsichtig mit 1 µl der DpnI-behandelten DNA vermengt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten auf Eis belassen, um dann für 45 Sekunden mit 42° C behandelt zu werden. Der Ansatz wurde für zwei Minuten auf Eis belassen und anschließend mit 500 µl NZY⁺ Broth Medium (s. u.) versetzt zu werden. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde auf einem Rundschtüttler (37° C, 220 UpM) inkubiert und anschließend auf Selektionsagarplatten (1,2 % LB-Medium, 100 µg / ml Ampicillin) über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Selektion der Kolonien erfolgte mittels Blau-Weiß-Selektion (s. 2.9). Die weißen Kolonien wurden per PCR (s. 2.6), Isolierung der Plasmid-DNA (s. 2.12.1) mit jeweils anschließender Agarosegel-Elektrophorese (s. 2.2.1) und Sequenzierung durch die Fa. SeqLab identifiziert. Ein Klon mit gewünschter Punktmutation wurde für die nächste Mutagenisierungsrunde verwendet. Für den Versuch waren vier Mutagenisierungsschritte notwendig.

Tabelle 2.22. NZY+ Broth Medium

<u>Anteile pro l</u>	
10,0 g	NZ Amin
5,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	NaCl
→ pH 7,5, NaOH	

Nach dem Autoklavieren Zugabe von:

12,5 ml	MgCl ₂ (1 molar)
12,5 ml	MgSO ₂ (1 molar)
20,0 g	Glukose

2.12 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen

In ein steriles 50 ml Röhrchen wurden 10 ml des entsprechenden Flüssigmediums gefüllt und mit einer Einzelkolonie zuvor vermehrter Bakterien angeimpft. Die Zellen wurden bei 37° C bis zur späten logarithmischen Phase inkubiert (160 UpM, Rundschüttler). Anschließend wurden 4,5 ml eines sterilen Glycerinmediums zur Kultur gegeben und gut durchmischt. Diese Suspension wurde in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Präparation ist bei -80° C für mehr als zwei Jahre haltbar.

Tabelle 2.23. Glycerinmedium

<u>Anteile pro l</u>	
LB-Medium pH 7,5	500 ml
Glycerin	500 ml

2.12.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

(verändert nach BIRNBOIM und DOLY 1979)

Diese Aufarbeitung beruht auf der selektiven Entfernung von Bakterien-DNA, welche abweichend von Plasmid-DNA mit der Plasmamembran assoziiert ist. Die Plasmid-DNA konnte in Form einer Mini-Präparation gewonnen werden, dabei waren pro Ansatz bis zu 50 µg DNA zu erwarten.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* Zellen

Die Bakterien mit rekombinanten Plasmiden wurden in LB-Nährmedium (2,5 ml) auf einem Rundschtüttler bei 180 UpM über Nacht bei 37° C angezogen. Dem Nährmedium wurde das den der Resistenz-Gen-Eigenschaften der Plasmide entsprechende Antibiotikum (s. Tabelle 2.38) hinzugefügt.

Aus 1,5 ml einer solchen Über-Nacht-Kultur wurden die Bakterien zentrifugiert (12000 g; 1 min) und in 0,3 ml Puffer P1 (100 µg / ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Puffer P2 wurde die Mini-Präparation für 5 Minuten bei RT belassen, dann mit 0,3 ml Puffer P3 versetzt, 10 Minuten im Eisbad inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA abgenommen und dazu mit 800 µl Isopropanol versetzt; anschließend wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 15000 g zentrifugiert und das erhaltene DNA-Sediment mit eiskaltem 800 µl 70 %igem Ethanol versetzt und für 20 Minuten bei 15000 g zentrifugiert, um die Salze auszuwaschen. Die ausgewaschene DNA wurde getrocknet, und abschließend in 40 µl sterilem, destilliertem Wasser gelöst und bei -20° C aufbewahrt.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Die Isolierung der Plasmid-DNA folgte demselben Protokoll wie dem der *E. coli* Zellen. Jedoch erfolgte die Inkubation der Bakterien bei 28° C und 150 UpM.

Nach geeigneter Verdünnung wurde die Konzentration der Plasmid-DNA, wie unter 2.5.1 beschrieben, errechnet. Alternativ wurde mit dem QIAprepSpin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) gearbeitet.

Tabelle 2.24. Puffer für die Plasmid-DNA Isolierung

<u>Puffer P1 (4° C)</u> <u>(Anteile pro l)</u>	<u>Puffer P2 (RT)</u> <u>(Anteile pro l)</u>	<u>Puffer P3 (4° C)</u> <u>(Anteile pro l)</u>
50 mmol Tris / HCl, pH 8,0 10 mmol EDTA	200 mmol NaOH 1 % w / V SDS	3,0 mol K-Acetat, pH 5,5

2.13 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Im Folgendem werden die Methoden für die heterologe Expression in *E. coli* Zellen vorgestellt.

2.13.1 Enzymisolierung

Über Nacht wurden 50 ml der *pQE-30* haltigen Bakterienkultur bis zu einer Optischen Dichte von 0,6-0,8 in LB-Nährmedium (inkl. 100 µg / ml Ampicillin) angezogen (37° C, 180 UpM, Rundschüttler).

In 120 ml frisches Nährmedium wurden 0,5 ml der Übernachtskultur mit gleicher Antibiotikumkonzentration überimpft. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer Optischen Dichte von 0,6-0,8 (37° C, 180 UpM) angezogen, wobei diese im Abstand von 30-60 Minuten bei 600 nm überprüft wurde. Nach einer Inkubation mit 0,5 mmolar IPTG (30 min, 37° C, 180 UpM, Rundschüttler) wurden die plasmidhaltigen Zellen abzentrifugiert (10 min, 5000 g, 4° C) und zum Aufschluss der Zellen über Nacht bei -20° C eingefroren. Nach Auftauen der Zellen auf Eis wurden sie in 3,5 ml Lysispuffer gelöst, mit DNase (5 µg / ml) und Lysozym (1 mg / ml) versetzt und für 60 Minuten auf dem Eis vorverdaut, um anschließend durch einen Homogenisator (4° C) aufgeschlossen zu werden. Durch Zentrifugation (10 min, 5000 g, 4° C) kam es zur Abtrennung der löslichen Proteine von den Membranbruchstücken. Die Membranbruchstücke wurden bei -20° C eingefroren, während der Überstand mit 200 µl Ni²⁺-NTA versetzt und 30 Minuten im Rundschüttler gehalten wurde (140 UpM, 4° C).

Im Anschluss wurde für eine Minute bei 650 g (4° C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Ni²⁺-NTA mit den gebundenen Proteinen mit 5 ml Waschpuffer zweimal gewaschen. Das Sediment wurde mit 0,5 ml Elutionspuffer versetzt, bei 650 g für eine Minute (4° C) zentrifugiert und der Überstand mit den nativ isolierten Proteinen aufbewahrt. Dieser Schritt wurde bis zu dreimal wiederholt. Jedem Schritt wurden 3-10 µl für ein SDS-Polyacrylamidgel abgenommen und mit 10 µl 2 x SDS-Puffer versetzt. Die Aufbewahrung der isolierten Proteine erfolgte bei 4° C. Um unspezifische Bindungen herabzusetzen wurden geringe Konzentrationen Imidazol im Lysispuffer (10 mmolar Imidazol) und im Waschpuffer (20 mmolar Imidazol) zugegeben.

Tabelle 2.25. Puffer für die Enzymextraktion

<u>Lysispuffer (4° C),</u> <u>(Anteile pro l)</u>	<u>Waschpuffer (4° C),</u> <u>(Anteile pro l)</u>	<u>Elutionspuffer (4° C),</u> <u>(Anteile pro l)</u>
300 mmol NaCl	300 mmol NaCl	300 mmol NaCl
50 mmol NaH ₂ PO ₄	50 mmol NaH ₂ PO ₄	50 mmol NaH ₂ PO ₄
10 mmol Imidazol	20 mmol Imidazol	250 mmol Imidazol
→ pH 8,0, NaOH	→ pH 8,0, NaOH	→ pH 8,0, NaOH

2.13.2 Esen-Test

(nach ESEN 1978)

Mit diesem optischen Schnellbestimmungstest wurde geprüft, ob sich Protein im Eluat befand. Je 20 µl Proteinlösung (inkl. 0,1-1,0 mg / ml Rinderserumalbumin (BSA)-Eichreihe) wurden auf Whatman Papier (Fa. Schleicher & Schuell) aufgetropft, sodass der Radius möglichst gering blieb. Das Papier wurde getrocknet und dann für 15 Minuten in Esen-Lösung geschwenkt. Abschließend wurde die Esen-Lösung unter laufendem Wasser abgespült, sodass das Papier fast wieder seine ursprüngliche Farbe hatte. Die Proteine zeigten je nach Konzentration eine mehr oder minder ausgeprägte blaue Färbung und konnten durch den Standard optisch abgeglichen werden. Bei ausreichend positiven Ergebnis wurde die Konzentration des Enzyms mit dem Bradford-Assay bestimmt.

Tabelle 2.25. Esen-Lösung

<u>Anteile pro l</u>	
0,1 % w / V	Coomassie Brilliantblau G-250
65,0 % v / V	dest. H ₂ O
25,0 % v / V	Isopropanol
10,0 % v / V	Eisessig

2.13.3 Bradford-Assay

(nach BRADFORD 1976)

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts erfolgte mittels des Bradford-Assays. Die Konzentrationsbestimmung wird durch Nachweis funktioneller Proteingruppen mit Coomassie Brilliantblau bei 595 nm bestimmt. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Die Proteinlösung (20 µl) wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt (inklusive BSA-Eichreihe, 0,1-1 mg / ml) und nach 30minütiger Inkubation in Dunkelheit die Extinktion bei 595 nm gemessen. Gegen eine Eichreihe mit BSA (Stammlösung: 1 mg / ml) konnte die Konzentration bestimmt werden, welche im Allgemeinen um 0,5 µg / µl lag.

Tabelle 2.26. Bradford-Reagenz

<u>Anteile pro l</u>	
100 mg / l	Coomassie Brilliantblau G250 in
50 ml / l	Ethanol (99,8 %) lösen

Anschließend Zugabe von:
100 ml / l Phosphorsäure (85 %)

2.14 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

(nach LAEMMLI 1970)

Proteine haben durch die Mischung geladener Aminosäuren im Allgemeinen eine positive oder negative Nettoladung. Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese befinden sich die Polypeptide in einer Lösung (2 x SDS Puffer), welche Natriumdodecylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) enthält. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung der Polypeptide durch Bindung an die hydrophoben Regionen. Dadurch werden die Polypeptide aus ihrer Assoziation mit anderen Proteinen entlassen und liegen frei lösbar im 2 x SDS Puffer vor. Gleichzeitig werden die Disulfidbrücken der Proteine durch DTT als reduzierende Substanz zerstört.

Bei der SDS-PAGE werden zwei unterschiedliche Polyacrylamidgele verwendet, die über einen glycinhaltigen Laufpuffer verbunden werden. Wenn die Proteine das Trenngel erreichen, kommt es durch den pH-Wert von 8,8 und die geringere Porengröße des Gels zu einer Verzögerung der Laufgeschwindigkeit. Die Proteine werden nach ihrer molaren Masse aufgetrennt und anschließend durch Anfärben mit Coomassie Brilliantblau dargestellt. Mittels einer „Proteinleiter“ wird die Größenordnung der Proteine ermittelt. Die Auswertung erfolgt durch Bestimmung des Retentionsfaktors (s. 2.16.4).

Für drei Minuten wurden 20 µl der Probelösung, bestehend aus 10 µl 2 x SDS Puffer, 0,1 mol/l DTT und 10 µl Proteinlösung, auf 95° C erhitzt, und anschließend vollständig auf dem Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 7 µl einer 10-160 kDa Proteinleiter (Fa. MBI Fermentas) aufgetragen.

Anhand dieser wurde, mittels der R_f -Werte, die Größe der unbekannt Proteine bestimmt. Die Laufzeit betrug ungefähr 90 Minuten. Anschließend erfolgte eine Anfärbung der Proteine in der Färbelösung für 30-60 Minuten. Überschüssige Färbelösung wurde abschließend durch Entfärbelösung ausgewaschen (30-60 min), bis die Proteine deutlich zu erkennen waren.

Tabelle 2.27. Lösungen für die SDS-Gel Analyse

<u>2 x SDS Puffer (Anteile pro l)</u>	<u>5 x TGE Puffer (Anteile pro l)</u>
0,09 mol Tris/HCl, pH 6,8	1,25 mol Tris / NaOH, pH 8,3
20,00 % v / V Glycerin	1,25 mol Glycin, pH 8,3
2,00 % w / V SDS	0,5 % w / V SDS
0,02 % w / V Bromphenolblau	
<u>Färbelösung (Anteile pro l)</u>	<u>Entfärbelösung (Anteile pro l)</u>
25,0 % v / V Isopropanol	25,0 % v / V Isopropanol
10,0 % v / V Eisessig	10,0 % v / V Eisessig
65,0 % v / V dest. H ₂ O	65,0 % v / V dest. H ₂ O
0,1 % w / V Coomassie R 250	

Polyacrylamidgel-Zusammensetzung

10 ml Trenngel (10 %):	4000 µl dest. H ₂ O
	3300 µl Acrylamid 2K Mix (30 %)
	2500 µl Tris/HCl, pH 8,8 (1,5 molar)
	100 µl SDS (10 %)
	100 µl Ammoniumpersulfat (10 %)
	4 µl TEMED
4 ml Sammelgel (5 %):	2700 µl dest. H ₂ O
	670 µl Acrylamid 2K Mix (30 %)
	500 µl Tris/HCl, pH 6,8 (1,0 molar)
	40 µl SDS (10 %)
	40 µl Ammoniumpersulfat (10 %)
	4 µl TEMED

2.15 Herstellung von Liposomen

Phospholipide lagern sich in Anwesenheit von Wasser spontan zu geschlossenen Membransystemen zusammen, wodurch dünne Lipidschichten oder -stapel bzw. Liposomen gebildet werden. Um einschichtige Liposomen zu garantieren, die einen gleichmäßigen Angriff des Enzyms gewährleisten, werden diese Ultraschallwellen ausgesetzt. Liposomen aus 95 Mol % Phosphatidylcholin (PC) aus Soja und 5 Mol % bis-BODIPY-PC dienen als Substrat für den Enzymtest der exprimierten Proteine.

bis-BODIPY-PC (M_r 1029,80) ist ein an beiden Fettsäuren derivatisiertes Phospholipid, das unter UV-Licht grün fluoresziert. Durch Miteinbau des bis-BODIPY-PCs in die Liposomen ist eine spätere Dokumentation der Ergebnisse am Transilluminator möglich. Das bis-BODIPY wird durch Phospholipasen A in Fettsäure und Lysophosphatidylcholin gespalten. Liposomen und ihre Vorstadien sind licht- und sauerstoffempfindlich, deshalb wurden alle Versuche unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zudem wurden Versuche mit β -BODIPY-PC (M_r 881,93) oder BODIPY-FL DHPE (M_r 1067,23) anstelle des bis-BODIPY-PC durchgeführt. Neben denselben fluoreszierenden Eigenschaften wie bis-BODIPY-PC, besitzt β -BODIPY-PC an der *sn2*-Position eine fluoreszenzmarkierte Fettsäure, während BODIPY-FL DHPE eine andere Kopfgruppe als bis-BODIPY PC hat. Alle fluoreszenzmarkierten Phospholipide wurden von der Firma MoBiTec bezogen. Es wurde eine Stammlösung mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Liposomen hergestellt, welche zu 95 Mol % aus PC (M_r 758,07) und zu 5 Mol % aus eines der bis-BODIPY-Substrate bestand. Dazu wurde die gewünschte Menge bis-BODIPY-Substrat im Glasgefäß unter Stickstoff eingedampft, mit der benötigten Menge PC versetzt und zum Lösen mit 100 μl Chloroform vermennt. Das PC / bis-BODIPY-Gemisch wurde unter Stickstoff eingedampft. Puffer 1 wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Liposomen zugegeben, die Lipide darin resuspendiert und für fünf Minuten Ultraschallwellen ausgesetzt. Die Suspension wurde unter Lichtausschluss bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.28. Puffer 1 für die Liposomenherstellung

<u>Anteile pro l</u>	
50,0 mmol	Tris / HCl
100,0 mmol	KCl
0,1 % v / V	Natriumdeoxycolat
→ pH 8,0	

Biochemische Methoden

Im Folgendem werden die Methoden beschrieben, welche auf biochemischen Grundlagen beruhen.

2.16 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Um die Aktivität der isolierten Enzyme nachzuweisen, wurden eindimensionale Dünnschichtchromatographien durchgeführt.

Das Prinzip der Chromatographie nach MARTIN und SYNGE (1941) beruht auf der Trennung verschiedener Stoffe, die unterschiedlich auf einer stationären Phase (hier: Kieselgel) adsorbieren (COHN 2002). Je stärker die Adsorption ist, desto größer ist die Retention des jeweiligen Substrates. Die Dünnschichtchromatographie ist somit auch für die Auftrennung ähnlicher Produkte geeignet. Hier wird sie verwendet, um eine Spaltung des fluoreszierenden Phospholipids bis-BODIPY-PC (und Derivate) zu beobachten, welche auf der Enzymaktivität von Phospholipase A beruht.

2.16.1 Enzymtest I mit Liposomen

Die entsprechende Puffermenge wurde vorgelegt und mit der gewählten Inhibitorkonzentration versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Enzyms. Es wurden jeweils 0,5 oder 1,0 µg Protein für den Enzymtest mit dem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Dann wurden der Reaktion 3 µg Liposomen zugefügt und alles kurz vermenget. Je nach Zielsetzung des Experiments wurde unterschiedlich verfahren:

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde mit verschiedenen Puffern inkubiert (33° C, im Wasserbad). Aufgrund der Spannbreite der pH-Werte (4,5-9,0) wurde mit unterschiedlichen Puffersystemen gearbeitet. Der Einfluss der unterschiedlichen Systeme auf die Enzymaktivität wurde durch Anwendung identischer pH-Werte ermittelt.

Für die Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer wurde beim optimalen pH-Wert mit unterschiedlichen Zeiten inkubiert (33° C).

Für die Ermittlung der Ca²⁺-Abhängigkeit wurde mit dem optimalen pH-Wert und der ermittelten Inkubationsdauer mit unterschiedlichen Calciumionen-Konzentrationen bzw. Magnesiumionen-Konzentrationen gearbeitet.

Für die Ermittlung der Inhibitorwirkung auf das Enzym, wurde bei optimalem pH-Wert und optimaler Inkubationszeit mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen gearbeitet. Bei Verwendung des Inhibitors HELSS war aufgrund seiner irreversiblen Bindung an das Enzym eine 30minütige Präinkubation ohne Liposomen erforderlich.

Für Ermittlung der Hintergrundaktivität diente der jeweilige Puffer mit Liposomenzusatz. Es wurden 100 µl der Gesamtansatzes in der Dünnschichtchromatographie verwendet (s. 2.17.2). Durch Zugabe der Enzymlösung (Tris, pH 8,0) zu dem Puffersystem war die Pufferkapazität nicht ausreichend, um eine pH-Wert Abweichung zu verhindern. Aufgrund dessen wurde die Abweichung am pH-Meter ermittelt und als effektiver pH-Wert in die Ergebnisse einbezogen. Die Zugabe von Liposomen hatte keinen Effekt auf den pH-Wert.

Tabelle 2.29. Verwendete Puffersubstanzen und effektive pH-Werte

Puffersubstanz [pro l]	eingestellter pH-Wert	effektiver pH, Zugabe von	
		5 % Eluat	von 1 % Eluat
50 mmol MES, 1 mmol CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4,50	5,50	4,90
	5,5	6,00	5,70
	6,20	6,60	6,40
	6,80	7,24	6,90
25 mmol HEPES, 1 mmolCaCl ₂ x 2 H ₂ O	6,80	7,30	7,00
	7,20	7,41	7,30
	7,80	7,80	7,80
25 mmol HEPES	7,20	7,41	7,30
50 mmol Tris, 1 mmol CaCl ₂ x 2 H ₂ O	7,80	8,00	7,80
	9,00	9,00	9,00

Tabelle 2.30. Liste der verwendeten Inhibitoren *

- ⇒ AACOCF₃ (Arachidonyltrifluoromethyl ketone): Arachidonsäure-Analogon, das beim Menschen cytosolische PLA₂ hemmt
- ⇒ ETYA (5,8,11,14-eicosatetrayonic acid): Inhibitor von PLA₂, Cyclooxygenase und verschiedenen Lipoxygenasen
- ⇒ HELSS (=BEL; E-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphtaleny)-2H-pyran-2-one): Irreversibler Inhibitor der Calcium unabhängigen PLA₂, hemmt auch abgeschwächt cPLA₂ (Faktor 1000)
- ⇒ NDGA (Nordihydrogaleinsäure): Hemmstoff der Lipoxygenase
- ⇒ PACOCF₃ (Palmitoyl trifluoromethyl ketone): Reversibler Inhibitor der iPLA₂

* Sämtliche Inhibitoren wurden in DMSO gelöst.

2.16.2 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

100 µl aus dem Enzymtest wurden mit 200 µl Stopplösung versetzt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 0,1 molare KCl-Lösung und 50 µl Chloroform zugefügt, vermischt und über Nacht bei -20° C aufbewahrt, um eine möglichst vollständige Entmischung der Phasen zu gewährleisten. Nach einer 30sekündigen Zentrifugation bei 10000 g wurden 100 µl der unteren Chloroformphase abgenommen und in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde verworfen und das Chloroform unter Stickstoffatmosphäre abgedampft. Das Sediment wurde in 10 µl Chloroform resuspendiert und mit einer Glaskapillare vollständig auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgelplatte 60, Fa. Merck) 2 cm über dem unteren Rand aufgetragen und in eine Laufkammer gestellt, welche das Laufmittel bereits enthielt. Als Standards wurden ein Diacylglycerin- und ein Lysophosphatidylcholin-Fettsäure-Standard (Auftrag je ca. 4 µl) verwendet. Die Laufzeit betrug ungefähr 90 Minuten. Der Versuch wurde in Dunkelheit durchgeführt. Das Laufmittel war durch den unterschiedlichen Dampfdruck der Komponenten einem Alterungsprozess unterworfen und wurde laufend erneuert.

Tabelle 2.31. Materialien für den Enzymtest

<u>Stopplösung (-20° C)</u>	<u>Laufmittel</u>
400 ml Methanol	130 ml Chloroform
200 ml Chloroform	50 ml Methanol
	8 ml dest. H ₂ O

Tabelle 2.32. Herstellung der StandardsLysophosphatidylcholin-Fettsäurestandard (-20° C)

- 740 µl Tris (50 mmol), pH 5,6
- 100 µl Triton-X 100 (10 %)
- 100 µl CaCl₂ (100 mmol)
- 50 µl bis-BODIPY-PC (320 mmol)
- 2 µl PLA₂ (1200 U / ml), Fa. Sigma, P9279
 - Inkubation 30 min, 37° C
 - Extraktion wie beschrieben,
 - Aufnahme in 100 µl Ethanol

Diacylglycerin-Standard (-20° C)

- 1000 µl KH₂PO₄ (100 mmol), pH 6,0
- 50 µl CaCl₂ (100 mmol)
- 10 µl bis-BODIPY-PC (0,32 mmol)
- 5 µl Triton-X 100 (10%)
- 5 µl PLC Typ XI (0,5 U / ml), Fa. Sigma, P74147
 - Inkubation 60 min, 37° C
 - Extraktion wie im Text,
 - Aufnahme in 100 µl Ethanol

2.16.3 Enzymtest II nach VIEHWEGER

(nach VIEHWEGER et al. 2002)

Hierzu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 40 µl Kaliumphosphatpuffer mit 0,1; 0,5 und 1,0 µg Enzym und 2 mmol bis-BODIPY-PC versetzt und bei 34° C im Wasserbad im Dunkeln inkubiert. Um die optimale Reaktionszeit festzustellen, wurde die Inkubationsdauer variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Stopplösung (Tab. 2.31) nach einer 30minütigen Inkubation beendet (100 UpM, Rundschüttler, Dunkelheit). Anschließend wurden 50 µl 0,1 mmolare KCl-Lösung (4° C) und 50 µl Chloroform mit dem Reaktionsansatz vermenget. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20° C zur besseren Phasentrennung gelagert und anschließend zentrifugiert (1 min, 13000 UpM, Heraeus Biofuge 15). Die Chloroformphase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, danach wurde die Probe unter Stickstoff langsam eingedampft und anschließend wieder mit 10 µl Chloroform gelöst. Die Gesamtmenge wurde mittels einer Glaskapillare auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, Fa. Merck) wie unter 2.16.2 beschrieben aufgetragen. Zur Ermittlung der Hintergrundaktivität diente der jeweilige Puffer mit bis-BODIPY-PC Zusatz. Als Standard wurden die unter 2.32 beschriebenen DAG- und LysoPC-Standards verwendet.

Dieser Test wurde sowohl ohne als auch mit Detergenz (0,01 % Triton-X 100, 0,1 % SDC) durchgeführt.

Tabelle 2.33. Kaliumphosphatpuffer

<u>Anteile pro l</u>	
5,0 mmol	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8
5,0 mmol	KCl
0,1 mmol	EDTA
1,0 mmol	DTT
300,0 mmol	Saccharose

2.16.4 Auswertung der Chromatogramme

Die Dokumentation erfolgte mittels UV-Licht am Transilluminator, indem die Fluoreszenz der Substrate mit einer Videokamera festgehalten wurde. Nachdem über den Retentionsfaktor (R_f) die Zugehörigkeit der Banden bestimmt wurde, erfolgte die Auswertung des Fotos mit dem ScanPackII-Programm der Firma Biometra. Nach Erstellung eines Densitogramms wurden durch Ermittlung der Peakflächen die Integrale der einzelnen Peaks bestimmt. Bei Vergleich verschiedener Dünnschichtchromatogramme galt der maximale Umsatz des bis-BODIPY als 100% Aktivität. Von diesem ausgehend wurde die relative Fluoreszenz in Prozent bestimmt. Von den Versuchen wurde mit Hilfe des Programms Excel die Standardabweichung bestimmt.

Zur Auswertung wurde, wenn nicht anders angegeben, nur die Fluoreszenz der Fettsäure herangezogen, da Lysophosphatidylcholin eine stärkere Retention aufwies.

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke Substanz}}{\text{Laufstrecke Front}}$$

2.17 Nachweis der Promotoraktivität durch β -Glucuronidase

(nach JEFFERSON et al. 1987)

Das aus *Escherichia coli* isolierte *uidA* Gen codiert das Enzym β -Glucuronidase. In der Pflanze wird *uidA* vor allem als Reportergen in Kombination mit pflanzlichen Promotoren verwendet. Durch die Fusion von Promotor und *uidA*-Gen kann die transkriptionelle Aktivierung der β -Glucuronidase (GUS) nach Transformation in die Pflanze nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt über die Umsetzung von verschiedenen Substraten, je nach Anwendung.

2.17.1 Histologischer GUS-Assay

GUS-Aktivität kann qualitativ durch Färbung mit dem Substrat X-Gluc nachgewiesen werden. Hierbei spaltet β -Glucuronidase von X-Gluc ein Chromophor ab, sodass nach Dimerisierung und Oxidation ein blauer Farbstoff niederschlägt. Auf diese Weise erfolgt der gewebe- und zellspezifische Nachweis der Promotoraktivität. Zur besseren Identifizierung der Blaufärbung wird nach dem Test das Chlorophyll des Pflanzengewebes mit 70 %igem Ethanol extrahiert.

Der Größe entsprechend wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial in 2,0 oder 45 ml Reaktionsgefäße überführt und vollständig in X-Gluc Lösung getränkt. Es folgte eine 30sekündige Vakuuminfiltration und eine Inkubation bei 37° C über verschiedene Zeitspannen. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Pflanzengewebe mit 99 %igem Ethanol bedeckt, welcher bis zur vollständigen Extraktion des Chlorophylls aus dem Pflanzengewebe einmal in der Stunde gewechselt wurde. Die Lagerung der Pflanzen erfolgte bei 4° C in 70 %igem Ethanol. Die Dokumentation erfolgte entweder mit dem Axioskop mot *plus* Mikroskop (Fa. Zeiss), dem Perception 1650 Scanner (Fa. Epson) oder Stereolupe MZ FLIII (Fa. Leica).

Tabelle 2.34. Ansatz der X-Gluc Lösung

<u>X-Gluc Lösung</u> (Anteile pro l)	
1,0 mmol	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide [cyclohexamine salt] (-20° C)
0,5 mmol	K-Ferrocyanid (-20° C)
0,5 mmol	K-Ferrycianid (-20° C)
50,0 mmol	NaPO ₄ , pH 7,0
0,5 % v / V	Triton-X 100

<u>Stammlösung X-Gluc (-20° C),</u> (Anteile pro l)	
52 % w / V	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide [cyclohexamine salt] in DMSO
48 % v / V	steriles dest. H ₂ O

2.17.2 Quantitativer GUS-Assay

(nach NALEWAY 1992)

Der quantitative Nachweis erfolgte über die Spaltung von 4-MUG (4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronid-Trihydrat). Nach der Hydrolyse von 4-MUG entsteht das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon, welches im Fluorimeter bei 365 nm angeregt und bei 455 nm emittiert wird. Die β -Glucuronidase spaltet 4-MUG und setzt dabei das fluoreszierende 4-MU (4-Methylumbelliferon) frei.

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerstoßen und anschließend gewogen. Pro Milligramm Frischgewicht wurden 2 μ l Extraktionspuffer dem Pflanzenmaterial zugefügt und mit diesem vermenget. Es folgte eine Sedimentation bei 10000 g (15 min, 4° C). Der Überstand wurde abgenommen und die Konzentration der Proteine nach Bradford (s. 2.14.3) bestimmt, wobei die extrahierten Proteine den gesamten Zeitraum über auf Eis gelagert wurden.

Zur Berechnung der Menge des umgesetzten Substrats diente eine definierte Verdünnungsreihe des reinen Produkt 4-MU als Eichreihe (s. u.). Die Messung erfolgte in Acrylküvetten der Fa. Sarstedt in einem Fluorimeter (LS-5 Luminescence Spectrometer, Fa. PerkinElmer). Für jede Reaktion wurden 40 μ g Proteinlösung in 400 μ l Extraktionspuffer mit 1 mmol / l 4-MUG unter Lichtausschluss inkubiert (37° C). Der Reaktion wurden 50 μ l zum Zeitpunkt Null und in definierten Abständen von 30-60 Minuten entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 700 μ l Stopplösung abgebrochen. Es folgte eine sofortige Messung der Fluoreszenz. Die Anregung der Probe erfolgte bei 365 nm und die Emission wurde bei 455 nm gemessen.

Erstellung der 4-MU Eichreihe

Es wurde eine 1 mikromolare 4-MU-Eichreihe in sterilem, destiliertem Wasser erstellt. Die Verdünnung erfolgte in 1,5 ml 0,2 molarer Na_2CO_3 -Lösung, sodass Endkonzentrationen von 10, 20, 30, 40, 50 und 60 nmol / l 4-MU vorlagen.

Die Messung erfolgte nach geeigneter Verdünnung (1:100) von 15 μl des abgestoppten Reaktionsansatzes mit 1485 μl 0,2 molarer Na_2CO_3 Lösung. Die zu messende Reaktion wurde hiernach insgesamt auf 1:15000 verdünnt. Bei einem sehr hohen Substratumsatz fand eine weitere 1:10 Verdünnung statt. Die Berechnung der umgesetzten Substratmenge erfolgte durch oben erläuterte Eichreihe mit 4-MUG.

Die Reaktion endete im Allgemeinen nach drei Stunden. Die Vorschrift lieferte eine Zeitkinetik, welche es ermöglichte, die maximale Differenz der β -Glucuronidase Aktivität zwischen zwei Behandlungen zu ermitteln. Die Auswertung erfolgte über Erstellung einer Eichgrade.

Tabelle 2.35. Materialien für den quantitativen GUS-Nachweis

<u>Extraktionspuffer</u> (Anteile pro l)	<u>Stopplösung</u> (Anteile pro l)
10 mmol Na_2EDTA	0,2 mol Na_2CO_3
50 mmol NaHPO_4 , pH 7,0	
10 mmol β -Mercaptoethanol	
0,1 % v / V Natrium Lauryl Sarcosin	
0,1 % v / V Triton-X 100	
<u>4-MU Stammlösung</u> (Anteile pro l)	<u>4-MUG Stammlösung</u> (Anteile pro l)
1,0 μmol 4-Methylumbelliferon in sterilem dest. H_2O	100 mmol in 4-Methylumbelliferyl β -D- DMSO glucuronid-Trihydrat

2.18 Resistenz-Gen-Eigenschaften

Tabelle 2.36. Stammlösungen der verwendeten Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u> [mg / ml]	<u>gelöst in:</u>
Ampicillin	100,0	sterilem dest. H ₂ O
Kanamycin	50,0	sterilem dest. H ₂ O
Rifampicin	100,0	sterilem dest. H ₂ O mit HCl (0,5 molar)
Spectinomycin	100,0	sterilem dest. H ₂ O
Streptomycin	25,0	sterilem dest. H ₂ O
Tetracyclin	12,5	sterilem dest. H ₂ O

Tabelle 2.37. Selektionsmarker der verwendeten Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Vektorgröße</u>	<u>Antibiotikum</u>	<u>1 x Endkonzentration</u> [µg / ml]
<i>pQE-30</i>	3,6 kBp	Ampicillin	100
<i>pCR2.1-TOPO</i>	3,9 kBp	Ampicillin/Kanamycin	100 / 50
<i>pKGWFS7</i>	12,7 kBp	Kanamycin (in Pflanzen)	50
		Spectinomycin (in Bakterien)	100
<i>pENTR/D-TOPO</i>	2,58 kBp	Kanamycin	50

Tabelle 2.38. Resistenz-Gen-Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>1 x Endkonzentration Antibiotikum</u>
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	100 µg / ml Rifampicin
<i>E. coli One Shot</i> TOP10	Keine Resistenz-Gen-Eigenschaften vorhanden
<i>E. coli</i> XL1-Blue	12,5 µg / ml Tetracyclin

Tabelle 2.39. Resistenz-Gen-Eigenschaften der transgenen Pflanzen

<u>Mutante</u>	<u>Gen</u>	<u>Bezugsnummer</u>	<u>binärer Vektor</u>	<u>Selektionsmarker</u>	<u>[$\mu\text{g} / \text{ml}$]</u>
PIVB::uidA	At4g37060		<i>pKGWFS7</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IIA-1	At2g26560	205C02	<i>pAC161</i>	Sulfadiazin	11,25
<i>Atpla</i> IIA-2		SALK_059119.53.75.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IIIA-1	At3g54950	SALK_014334.47.95.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IIIA-2		SALK_057212.52.95.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IVA-1	At4g37070	SALK_036785.54.90.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin*	50
<i>Atpla</i> IVA-2		SALK_027625.39.00.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IVB-1	At4g37060	SALK_073180.18.00.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50
<i>Atpla</i> IVB-2		SALK_090933.54.20.x	<i>pROK2</i>	Kanamycin	50

*nicht aktiv

2.19 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.40. Oligonukleotidsequenzen für Isolierung der *AtPLA* IVB-cDNA und heterologe Expression in *E. coli*. Restriktionsschnittstellen blau markiert, Schnittstellen durch einen Längsstrich gekennzeichnet

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>bp*</u>	<u>T_m</u>
IVBcDNA	5' CCA AAA CTT CTA CCA AAT TTC GAT TCA 3'	5' TTT CAC ACA AAA GCA CGA GAG TGA T 3'	c 1352 d 2295	56° C
IVBEx	5' C GAGCT C GAG AAC GAA TCG CCC 3' (Sac1)	5' AAC TGC A GT TTT ACT TGA TCT CTT GTG A 3' (Pst1)	c 1391	56° C

*d → Anzahl Basenpaare bei genomischer DNA, c → Anzahl Basenpaare bei cDNA

Tabelle 2.41: Oligonukleotidsequenzen für Ligation von *AtPLA* IVB_{CT} mit dem Vektor *pQE-30*. Blau markiert sind die Restriktionsschnittstellen, Schnittstellen durch einen Längsstrich gekennzeichnet.

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>bp</u>	<u>T_m</u>
IVB _{CT} Ex	5' CGA GCT CGA GAA CGA ATC GCC C 3' (Sac1)	5' AAC TGC A GC CTT CCA ATG TAT CAT C 3' (Pst1)	972 bp	56° C

Tabelle 2.42. Oligonukleotidsequenzen für *Site Directed Mutagenesis*. Genetischer Code der geänderte(n) Aminosäure(n) ist blau unterlegt, geänderte Base unterstrichen

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>T_m</u>
4b Lys (Pos11)	5' CCC TCC AAG AAA AAC <u>AAG</u> CCG CCA TCG TGC G 3'	5' C GCA CGA TGG CGG <u>CTT</u> GTT TTT CTT GGA GGG 3'	80° C
4b NE (Pos408/409)	5' G ACT AAA GAT TCA TCA <u>AAC</u> <u>GAA</u> T CA CAA GAG ATC 3'	5' GAT CTC TTG TGA <u>TTC</u> <u>GTT</u> TGA TGA ATC TTT AGT C 3'	70° C
4b Leu (Pos397)	5' G AGG AGC GAC AAA ATG ACT <u>TTA</u> GAT TCA TCA AAC G 3'	5' C GTT TGA TGA ATC <u>TAA</u> AGT CAT TTT GTC GCT CCT C 3'	73° C
4b Gln (Pos347)	5' G AAA ATC TTT <u>CAA</u> AAA CTT GGA GAG AAG ATG CTG 3'	5' CAG CAT CTT CTC TCC AAG TTT <u>TTG</u> AAA GAT TTT C 3'	70° C

Tabelle 2.43. Sequenzieroligonukleotide in *pQE-30*.

	<u>Oligonukleotidsequenz</u>	<u>Vektor</u>
Promoter Region	5' CCC GAA AAG TGC CAC CTG 3'	<i>pQE-30</i>
Type III/IV	5' CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG' 3'	<i>pQE-30</i>
Reverse seq pQE	5' GGT CAT TAC TGG AGT CTT G 3'	<i>pQE-30</i>

Tabelle 2.44. Oligonukleotide für Transkript Null-Pflanzen Isolierung von *AtPLA IIA*, *AtPLA IIIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB*. Genspezifische Oligonukleotide

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>Erwartete Größe in bp*</u>	<u>T_m</u>
IIAKO	5' CTT GTT CTG TAA GAT GCA AAT GGA 3'	5' GAA GCC AAC TAT ATT CGC ATC CA 3'	d 1387	54° C
IIIAKO	5' CCG TCA AGC ATT TAA TCA AA CA 3'	5' TTT GAG ATT GAG TTT CTG AGA CAT GAT 3'	d 1523	60° C
IVAKO	5' TTA CTT CGA CGT GAT AGC TGG A 3'	5' GGT ATG CAA A AA TTC TCT CGG 3'	d 1683	60° C
IVBKO	5' TAG GAT CAT AAC TCG CCA TGC G 3'	5' GCA GGA TGA TAC ATT GGA AGG 3'	d 1623	60° C

*d→ Nukleinsäuresequenzgröße bei genomischer DNA

Tabelle 2.45. Oligonukleotide für Transkript Null-Pflanzen Isolierung von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB. T-DNA spezifische Oligonukleotide

<u>T-DNA Oligonukleotide für T-DNA Insertionslinien-Isolierung</u>			T_m
8409	5' ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC 3'		51° C
T-DNAIIIA	5' CCC ATT TGG ACG TGA ATG TAG ACA C 3'		54° C
LBa1	5' TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G 3'		59° C
LBb1	5' GCG TGG ACC GCT TGC TGC AAC T 3'		60° C

Tabelle 2.46. Oligonukleotide für den Transkript Null-Nachweis von *Atpla* IIA, *Atpla* IIIA, *Atpla* IVA und *Atpla* IVB

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>bp*</u>	<u>T_m</u>
IIAcDNA	5' TGG ATG GAG AAG AAG CAA GG 3'	5' GGA GCT TTT GCA TGA GGT GA 3'	d 1574 c 1038	56° C
IIIcDNA	5'ATA CCA AAA GTC CAA GAC TGG TTT CAT TT 3'	5'TCA TCA TGT CTC AGA AAC TCA ATC TCA AA 3'	d 1935 c 1680	56° C
IVAKO (s. auch Tab. 2.44)	5' TTA CTT CGA CGT GAT AGC TGG A 3'	5' GGT ATG CAA A AA TTC TCT CGG 3'	d 1683 c 1107	60° C
IVBcDNA	5' GAG AAC GGT AGA CCT CGT TT 3'	5' AGT GAT TTT CCG GCT GTA TT 3'	d 1737 c 1035	56° C
Aktin	5' AGG ATA TTC AGC CAC TTG TCT TGT 3'	5' AGA AAC ATT TCC TGT GAA CAA TCG 3'	c 1120 d 1430	56° C

*d→ bei genomischer DNA, c → bei cDNA

Tabelle 2.47. Oligonukleotide für die Isolierung von PIVB, der Promotorsequenz von *AtPLA* IVB

	<u>5'Oligonukleotid</u>	<u>3'Oligonukleotid</u>	<u>bp*</u>	<u>T_m</u>
PIVB	5' CAC CCT TTG TGT GAA ATT G 3'	5' AGT TGA TCA ATC TTC TTT TGA AC 3'	d 1180	54° C

*d→ bei genomischer DNA

Tabelle 2.48. Oligonukleotide für Sequenzierung und T-DNA Insertionsnachweis von PIVB

	<u><i>AtB1</i></u>	<u><i>AtB2</i></u>
T-DNA Oligonukleotide	5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT 3'	5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT 3'

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung der Insertionsmutanten

Im Folgenden wird die Isolierung der Insertionsmutanten von vier der zehn Patatin-ähnlichen PLAs aus *Arabidopsis thaliana* für eine spätere Funktionsanalyse beschrieben.

3.1.1 Allgemeine Vorgehensweise

Je zwei unabhängige Linien wurden von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB isoliert und überprüft, welche ihrem zugehörigem Gen entsprechend z. B. als *Atpla* IIA-1 bzw. *Atpla* IIA-2 bezeichnet wurden. Die verwendeten Insertionslinien sind aus Agrobakterien vermittelter T-DNA Insertion hervorgegangen. Es wurden je zwei unabhängige Linien pro Gen isoliert. Die Mutanten wurden, mit Ausnahme von *Atpla* IIA-1, alle aus dem Salk-Institut in Nottingham bezogen und weisen eine Kanamycin-Resistenz auf (Tab. 2.38). Bei *Atpla* IVA-1 ist das Kanamycin-Gen nicht aktiv. Dies kommt bei 10 % der Mutanten vor (WEIGEL und GLAZEBROOK 2001). *Atpla* IIA-1 stammt aus der Kollektion von GABI-Kat des Max Planck Instituts für Züchtungsforschung in Köln und trägt Sulfadiazin als Selektionsmarker auf der T-DNA (Tab. 2.38). Die *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionslinien der Alpha- und Basta-Population aus der University of Wisconsin wurden ebenfalls überprüft (60480 bzw. 72960 T-DNA Insertionslinien, SUSSMAN et al. 2000). Da eine gezielte Einzelbestellung nicht möglich war, wurden die gesamten Populationen auf die gesuchten Insertionsmutanten durch sequenzspezifische PCR mit anschließender *Southern Blot* Analyse getestet (KRYSAN et al. 1999, WEIGEL et al. 2000). Eine T-DNA Insertionslinie von *AtPLA* IIIA wurde in der Alpha-Population nachgewiesen, zeigte jedoch einen Pseudophänotyp durch ein in der T-DNA inseriertes Promotorstück des mutierten, die Blütenentwicklung steuernden Gens AP3, das durch den verwendeten Vektor pD991-AP3 verursacht wurde. Dieser Pseudophänotyp tritt nach Angaben des Vertreibers bei der Alpha-Population bei 10 % der Pflanzen auf. Weitere Insertionslinien der gesuchten *AtPLA*-Mitgliedern waren in den Populationen nicht vorhanden. Aus dem Salk-Institut und von GABI-Kat erhaltene Pflanzen wurden durch PCR analysiert.

Hierfür wurde die T-DNA Insertion durch PCR an genomischer DNA nachgewiesen (s. 2.6ff.). Einen Überblick über den Reaktionsablauf gibt Abbildung 3.1. Die PCR an genomischer DNA bestand je Pflanze aus drei Einzelreaktionen. Zum einen wurde auf das Gen getestet, welches die T-DNA enthalten sollte. Dazu wurde mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Angabe der Heterozygotie bzw. Homozygotie bezieht sich im Folgenden ausschließlich auf das jeweilige Gen mit T-DNA Insertion (vgl. 2.3). Wenn die Pflanzen-DNA dem Wildtyp entsprach oder die Insertion heterozygot vorlag, kam es zu keinem PCR-Produkt. Zum anderen wurde die PCR-Reaktion mit dem 5'T-DNA Oligonukleotid und dem 5'Oligonukleotid des Wildtyps, und eine weitere mit dem 5'T-DNA Oligonukleotid und dem 3'Oligonukleotid des Wildtyps durchgeführt. Je nach Orientierung der inserierten T-DNA im Genom entstand lediglich bei einer der beiden Reaktionen ein PCR-Produkt. Die 5'T-DNA Oligonukleotide lagen am 5'Ende der T-DNA (bei den Salk-Linien LBa1, bei GABI-Kat T-DNAIIA, Tab. 2.45). Konnten die Salk-Linien nicht mit LBa1 amplifiziert werden, war das 5'Ende der T-DNA möglicherweise abgebrochen. Die PCR wurde dann noch einmal mit dem 5'T-DNA Oligonukleotid LBb1 durchgeführt, welches weiter vom 5'Ende der T-DNA entfernt lag (s. Tab 2.45). Als Standard wurde gleichbehandelte Wildtyp-DNA von *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 eingesetzt und mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (s. 2.5.1, 2.6f.). Hier fand keine Amplifikation durch die 5'T-DNA Oligonukleotide statt. Bei positivem Test auf homozygote T-DNA Insertion wurde das Amplifikat gereinigt und sequenziert (s. 2.6.2). Als Sequenzieroligonukleotide wurde bei GABI-Kat das auf der T-DNA gelegene 8409-Oligonukleotid und bei den Salk-Linien mit LBb1 sequenziert (Tab. 2.45, vgl. 2.3.1). Die Position der ermittelten T-DNA Insertionen im jeweiligen Gen wurde ermittelt und dargestellt (Abb. 3.1, 3.3, 3.6, 3.8). Sämtliche PCR-Produkte der Insertionsmutanten wurden gereinigt und durch die Fa. Seqlab sequenziert. Zu ersten Sequenzvergleichen in Datenbanken waren Abschnitte von circa 300 bp ausreichend. Die Statistik der T-DNA Insertionsnachweise ist in Tabelle 3.1 bzw. 3.2 dargestellt. Tabelle 3.3 gibt die Sequenzierabweichungen der ermittelten und der von den Anbietern angegebenen T-DNA Insertionen an. Die PCR-Bedingungen sind in den Bildlegenden angegeben (Abb. 3.2, 3.4, 3.7, 3.9) und die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 2.45 zu finden.

3.1.2 T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IIA-1 und *Atpla* IIA-2

Die vom Salk-Institut (*Atpla* IIA-2; SALK_059119.53.75.x) und GABI-Kat (*Atpla* IIA-1; 205C02) erhaltenen Insertionsmutanten wurden wie unter 2.1 beschrieben in Einheitserde angezogen und vereinzelt. Die Insertionsmutanten besitzen eine T-DNA Insertion im *Arabidopsis*-Gen At2g26560, welches *AtPLA* IIA kennzeichnet. Da es sich um die T₁-Generation der transformierten Pflanzen handelt, treten sowohl heterozygote als auch homozygote Pflanzen auf. Aufgrund dessen wurde jede Pflanze im Folgenden einzeln auf die gewünschte T-DNA Insertion geprüft. Dazu wurde von jeder Pflanze und vom Wildtyp Columbia 0 eine Blattprobe entnommen und von dieser die genomische DNA isoliert (s. 2.5.1). Die Pflanzen wurden bis zur Samenernte weiter angezogen und die geernteten Samen jeder Pflanze separat gelagert (s. 2.1). Die PCR-Analyse der isolierten Pflanzen-DNA (s. 2.6) zeigte bei der Wildtyp-DNA mit den Oligonukleotiden 5'IIAKO und 3'IIAKO ein Amplifikationsprodukt in der an genomischer DNA errechneten Größe von 1387 bp (Abb. 3.2). Der Ursprung der unteren Bande bei der Wildtyp DNA ist unbekannt, entspricht aber in ihrer Größe nicht dem Amplifikationsprodukt bei dem T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IIA-1 und war somit für die Isolierung irrelevant. Bei den homozygoten T-DNA Insertionslinien von *AtPLA* IIA war kein Amplifikationsprodukt zu erwarten, da die inserierte T-DNA durch ihre Größe eine Amplifikation verhinderte (Abb. 3.2). Im Folgenden wurde auf die T-DNA Insertion in *AtPLA* IIA getestet, indem mit den T-DNA spezifischen Oligonukleotiden (T-DNA IIA bei *Atpla* IIA-1 bzw. LBb1 für *Atpla* IIA-2) amplifiziert wurde. Die Insertionsmutanten zeigten ein Amplifikationsprodukt in der errechneten Größe. *Atpla* IIA-1 wies ein 334 bp Amplifikat auf, während *Atpla* IIA-2 ein PCR-Produkt bei Anwendung von LBb1 und 5'IIAKO bei 1718 bp zeigte (Abb. 3.2). Die Wildtyp-DNA zeigte kein Amplifikat. Nach Feststellung der korrekten Insertion durch Sequenzierung der PCR-Produkte war gesichert, dass es sich um die gesuchten Insertionsmutanten von *AtPLA* IIA handelte. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.44 zu finden. *Atpla* IIA-1 hat die T-DNA Insertion im ersten Intron der genomischen Sequenz, direkt im aktiven Zentrum der codierten Phospholipase A. Es ist kein Unterschied zwischen ermitteltem und von GABI-Kat angegebenem T-DNA Insertionsort vorhanden.

Die vom Salk-Institut bezogene Linie *Atpla IIA-2* weist eine T-DNA Insertion im letzten Intron des Gens auf (Abb. 3.1). Auch hier liegt kein signifikanter Unterschied zwischen angeführter und geprüfter T-DNA Insertionsort (vgl. Tab 3.3).

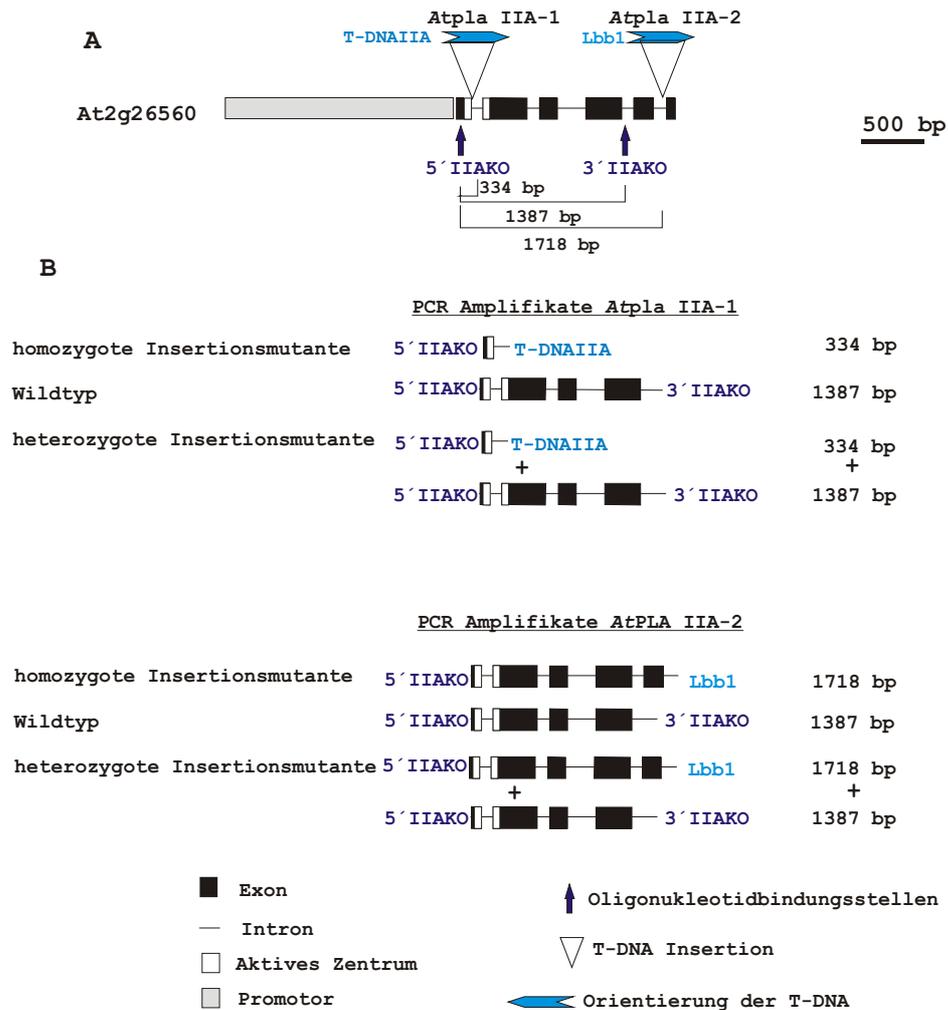


Abbildung 3.1. A) T-DNA Insertionen in *AtPLA IIA*. Die Promotor- und Domänenstruktur ist dargestellt. Die Pfeile zeigen die Bindungsstellen der Oligonukleotide, darunter sind die erwarteten Amplifikat-Größen gezeigt. B) Isolierungsschema einer Insertionsmutante. Die Abbildung ist für die PCR-Reaktionen sämtlicher Insertionslinien repräsentativ. Lbb1: Oligonukleotid in dem 5' Bereich der T-DNA bei Salk-Linien, T-DNA IIA: Oligonukleotid im 5' Bereich der T-DNA bei der GABI-Kat Linie, 5' IIAKO, 3' IIAKO: Oligonukleotide mit spezifischer Nukleotidsequenz für die Amplifikation von *AtPLA IIA*.

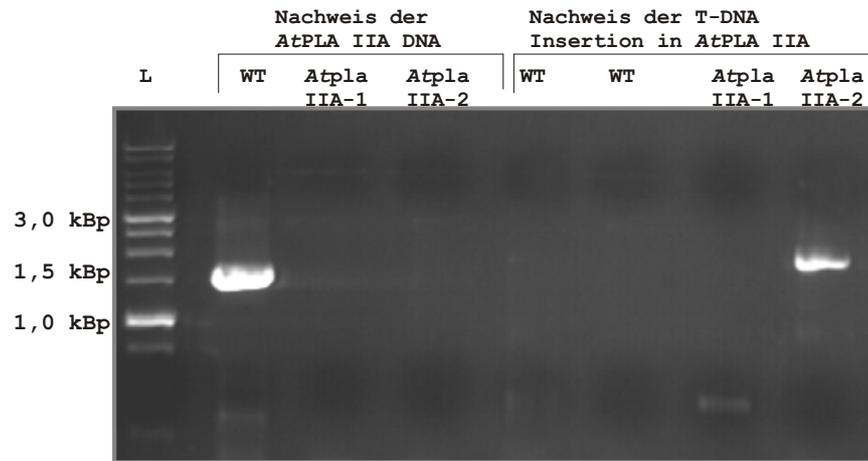


Abbildung 3.2. T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IIA-1 und *Atpla* IIA-2. Auftrennung von PCR-Produkten je einer homozygoten Insertionslinie und Wildtyp Col 0 DNA. PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 30 Zyklen 94° C 15 s, 54° C 30 s, 72° C 120 s. Es wurden 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen, 1,0 % Agarosegel, Laufzeit 40 min

L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl Probe

Nachweis des unveränderten Wildtyp-Gens At2g26560 (*AtPLA* IIA)

mit den Oligonukleotiden 5'IIAKO und 3'IIAKO

WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, 1387 bp

Atpla IIA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIA-1, kein PCR-Produkt

Atpla IIA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIA-2, kein PCR-Produkt

Nachweis der T-DNA Insertion im Gen At2g26560 (*AtPLA* IIA)

WT: PCR an genomischer WT DNA, Oligonukleotide 5'IIAKO und T-DNAIIA, kein PCR-Produkt

WT: PCR an genomischer WT DNA, Oligonukleotide LBB1 und 5'IIAKO, kein PCR-Produkt

Atpla IIA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIA-1, 5'IIAKO und T-DNAIIA, 334 bp

Atpla IIA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIA-2, LBB1 und 5'IIAKO, 1718 bp

3.1.3 T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IIIA-1 und *Atpla* IIIA-2

Der Ablauf der Isolierung ist unter 3.1.2 angegeben. Die vom Salk-Institut erhaltenen Insertionsmutanten *Atpla* IIIA-1 und *Atpla* IIIA-2 (SALK_014334.47.95.x, SALK_057212.52.95.x) für At3g54950 wurden in Einheitserde angezogen (s. 2.1). Eine PCR zur Analyse der isolierten Pflanzen-DNA auf T-DNA Insertion im gesuchten Gen folgte (s. 2.6f).

Die Wildtyp Columbia 0-DNA zeigte bei Verwendung der Oligonukleotide 5'IIIAGO und 3'IIIAGO ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 1523 bp (Abb. 3.4). Die T-DNA Insertion von *Atpla* IIIA-1 liegt im Promotor des Gens. Aufgrund dessen konnte durch genspezifische Oligonukleotide nicht zwischen Homo- und Heterozygotie unterschieden werden. Bei der homozygoten Insertionslinie von *Atpla* IIIA-2 war kein Amplifikationsprodukt zu erwarten. Im Folgenden wurde auf die T-DNA Insertion im Gen geprüft, indem mit den T-DNA spezifischen Oligonukleotid LBA1 und dem sequenzspezifischen Oligonukleotid 3'IIIAGO amplifiziert wurde. Die Wildtyp Columbia 0-DNA zeigte kein Amplifikat. Die Mutanten zeigten ein PCR-Produkt in der durch Sequenzvergleich errechneten Größe: *Atpla* IIIA-1 zeigte bei einer Größe von 1815 bp ein PCR-Produkt, während *Atpla* IIIA-2 ein Amplifikat von 1058 bp aufwies (Abb. 3.4). Die Amplifikation der Insertionsmutanten DNA mit 5'IIIAGO zeigte aufgrund der T-DNA Orientierung im Genom kein PCR-Produkt. Nach Sequenzierung war gesichert, dass es sich bei *Atpla* IIIA-2 um eine homozygote T-DNA Insertionslinie des gesuchten Gens handelte. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.44 zu finden. Die Überprüfung der Homozygotie von *Atpla* IIIA-1 war aufgrund der Oligonukleotidwahl durch PCR nicht möglich. Deshalb wurden sterilisierte Samen der T₂-Generation auf Selektionsmedium (1,2 % MS-Medium, 50 µg / ml Kanamycin) ausgesät und auf ihre Homozygotie für *AtPLA* IIIA geprüft (s. 2.3.1f.). Bei homozygoten Insertionslinien als Mutterpflanze überleben alle Keimlinge aufgrund ihrer Resistenz-Gen-Eigenschaften, während bei heterozygoten nach MENDEL nur circa 75 % überlebensfähig sind. Bereits fünf Tage nach Aussaat starben die ausgesäten Wildtyppflanzen ab (Abb. 3.5). Nach zehn Tagen wurden die homozygoten *Atpla* IIIA-1 Pflanzen ermittelt und nach Sequenzierung der DNA-Amplifikate von *Atpla* IIIA-1 wurde die gesuchte Pflanze mit T-DNA Insertion isoliert. Der T-DNA Insertionsort liegt bei einer Abweichung von 10 bp zwischen ermitteltem und angegebenem T-DNA Insertionsort. *Atpla* IIIA-2 weist eine Insertion direkt im aktiven Zentrum der potentiellen Phospholipase A auf (Abb. 3.3). Hier liegt die Differenz zwischen geprüftem und angeführtem T-DNA Insertionsort bei 11 bp (Tab. 3.3).

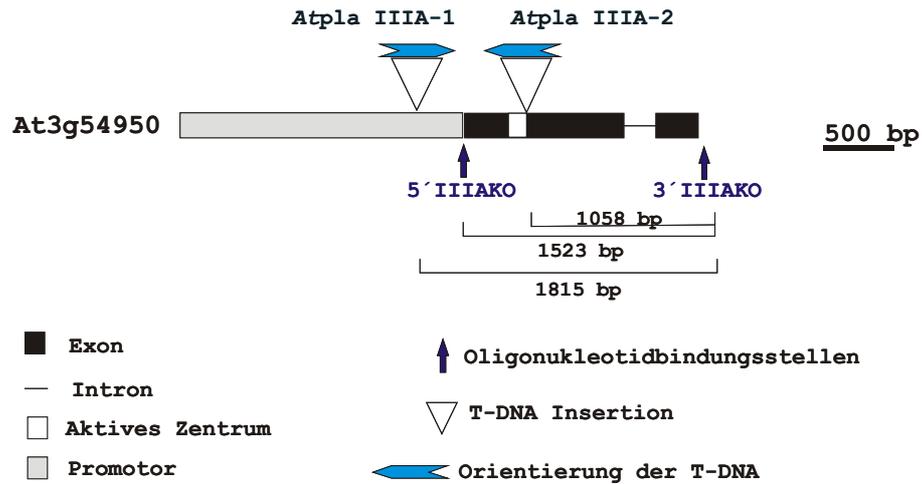


Abbildung 3.3. T-DNA Insertionen in *AtPLA* IIIA. Gezeigt ist die Exon-Intronstruktur des Gens mit potentielltem Promotor. Die Pfeile kennzeichnen die Oligonukleotidbindungsstellen. Darunter sind die zu erwartenden Amplifikatgrößen angezeigt.

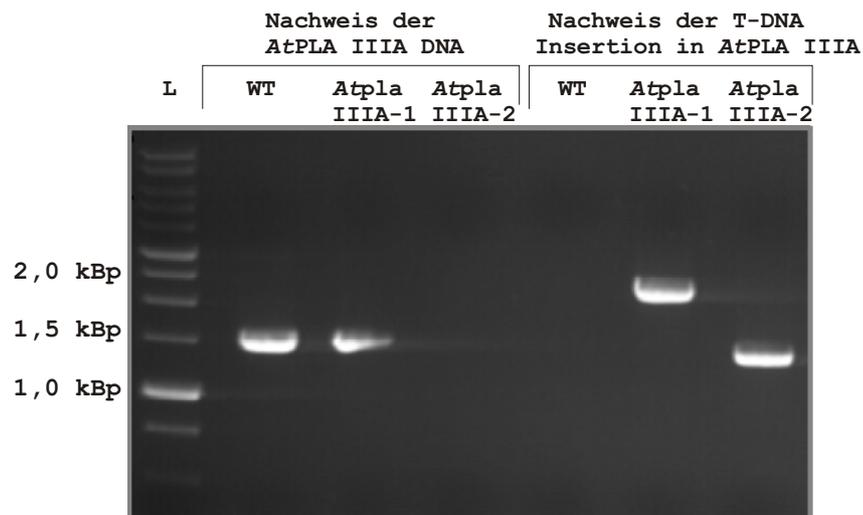


Abbildung 3.4. T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IIIA-1 und *Atpla* IIIA-2. Auftrennung von PCR-Produkten. PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 40 Zyklen, 94° C 30s, 60° C 30 s, 72° C 120 s, Probenauftrag je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer, 1,0 % Agarosegel, Laufzeit 40 min L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

Nachweis des unveränderten Wildtyp-Gens *At3g54950* (*AtPLA* IIIA) mit den Oligonukleotiden 5'III AKO und 3'III AKO

WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, 1523 bp

Atpla IIIA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIIA-1, 1523 bp

Atpla IIIA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIIA-2, kein PCR-Produkt

Nachweis der T-DNA Insertion im Gen *At3g54950* (*AtPLA* IIIA)

WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, LBa1 und 3'III AKO, kein PCR-Produkt

Atpla IIIA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIIA-1, LBa1 und 3'III AKO, 1815 bp

Atpla IIIA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IIIA-2, LBa1 und 3'III AKO, 1058 bp

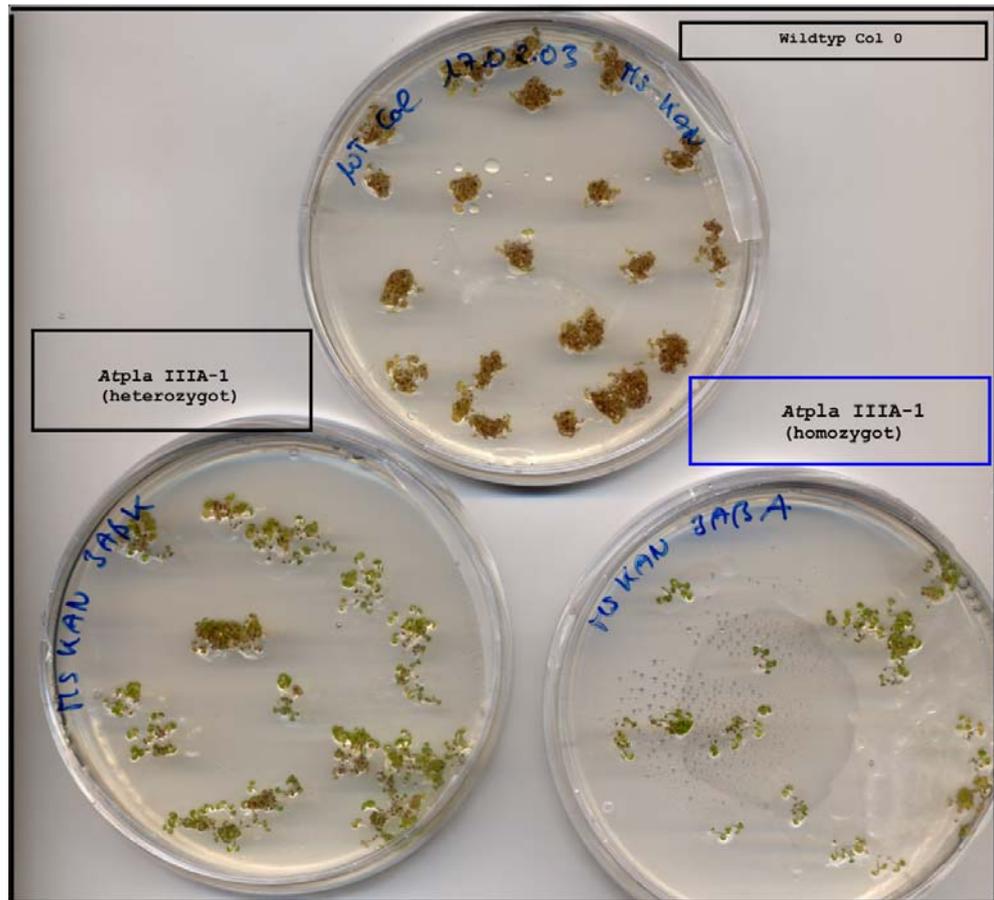


Abbildung 3.5. Homozygotienachweis der T-DNA Insertion bei *Atpla IIIA-1*. Die Sämlinge wurden sterilisiert, 2 Tage bei 4° C stratifiziert, auf 1,2 % Selektionsmedium ausgesät und fünf Tage nach Wachstum bei 23° C , 8000 lx / m², 18 h Licht / 6 h Dunkelheit mittels Perception 1650 (Fa. Epson) dokumentiert.

Oben: Wildtyp Columbia 0, Überlebensrate 0 %; unten links: *Atpla IIIA-1* (heterozygot), Überlebensrate 75 %; unten rechts: *Atpla IIIA-1* (homozygot), Überlebensrate 100 %

3.1.4 T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2*

Der Ablauf der Isolierung ist unter 3.1.2 angegeben. Die Insertionsmutanten *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* (SALK_036785.54.90.x, SALK_027625.39.00.x) für At4g37070 wurden wie unter 2.1 beschrieben in Einheitserde angezogen und vereinzelt. Eine PCR zur Analyse der isolierten Pflanzen-DNA auf T-DNA Insertion im gesuchten Gen folgte (s. 2.6.f.). Die Wildtyp-DNA von Columbia 0 zeigte bei Anwendung der Oligonukleotide 5'IVAKO und 3'IVAKO ein einzelnes Amplifikationsprodukt in der erwarteten Größe von 1683 bp.

Anschließend wurde auf die T-DNA Insertion im Gen getestet, indem mit dem für die T-DNA spezifischem Oligonukleotid LBb1 amplifiziert wurde. Insgesamt wurden von *Atpla IVA-1* 17 Pflanzen auf ihre T-DNA Insertion überprüft, von denen keine homozygot war (Tab. 3.1). Aufgrund dessen wurde eine der drei heterozygoten Linien noch einmal angezogen und vermehrt (s. 2.1). Eine Selektion der Pflanzen durch Aussaat auf Selektionsmedium war nicht durchführbar, da das Kanamycin-Gen der T-DNA bei dieser Mutante nicht intakt war, was bei circa 10 % einer T-DNA-Population auftritt (WEIGEL 2000). Aufgrund dessen wurden zwanzig *Atpla IVA-1* Pflanzen der Folgegeneration durch erneute DNA Isolierung und PCR auf Homozygotie getestet. Dabei konnte eine homozygote T-DNA Insertionslinie von *Atpla IVA-1* isoliert werden. Eine homozygote *Atpla IVA-2* Insertionslinie konnte bereits aus der T₁-Generation isoliert werden. Die Mutanten zeigten ein Amplifikationsprodukt in der erwarteten Größe: *Atpla IVA-1* wies bei 1334 bp ein Amplifikat auf, während *Atpla IVA-2* eine Amplifikation in der erwarteten Größe von 310 bp zeigte. Der Wildtyp zeigte kein Amplifikat, da er T-DNA frei war (Abb. 3.7). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.44 zu finden. Nach Feststellung der korrekten Insertion durch Sequenzierung der Amplifikate war gesichert, dass es sich bei *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* um T-DNA Insertionslinien von *AtPLA IVB* handelte.

Die T-DNA Insertionsorte von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* liegen dicht beieinander im zweiten Intron der Gensequenz (Abb. 3.6). Trotzdem handelt es sich definitiv um zwei unabhängige Insertionen, da die T-DNA Insertionen in verschiedenen Orientierungen vorliegen: Bei *Atpla IVA-1* in 5'→3' und bei *Atpla IVA-2* in 3'→5'. Die Differenz zwischen ermittelter und angegebener T-DNA Insertion zeigt bei *Atpla IVA-1* keinen Unterschied und bei *Atpla IVA-2* liegt eine Differenz von 40 Basenpaare zwischen dem nachgewiesenen und dem angegebenen T-DNA Insertionsort (vgl. Tab. 3.3).

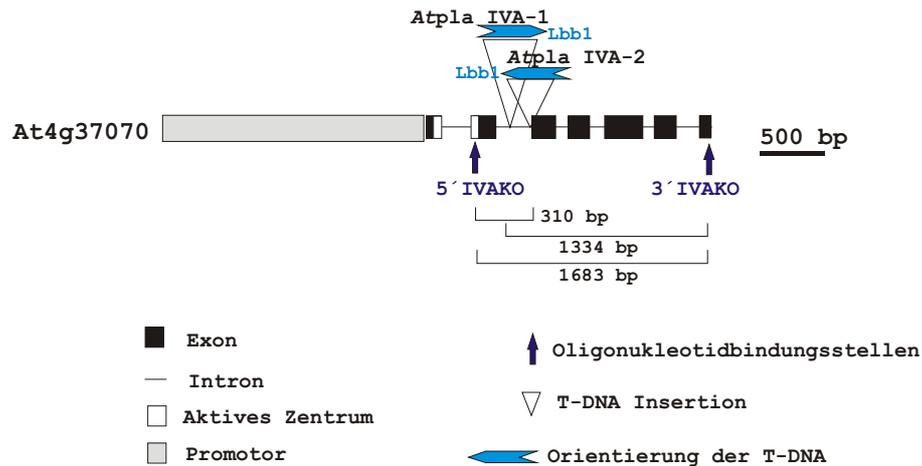


Abbildung 3.6. T-DNA Insertionen in *AtPLA IVA*. Gezeigt ist die Exon-Intronstruktur des Gens mit potentielltem Promotor. Die Pfeile kennzeichnen die Oligonukleotidbindungsstellen. Darunter sind die zu erwartenden Amplifikatgrößen angezeigt.

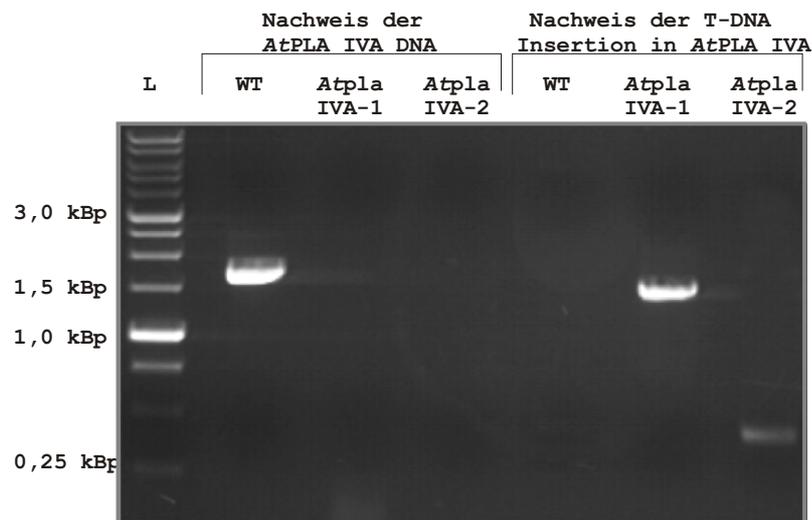


Abbildung 3.7. T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2*. Auftrennung von PCR-Produkten jeweils einer homozygoten Linie. PCR Bedingungen: 94° C 5 min, 30 Zyklen: 94° C 15 s, 56° C 30 s, 72° C 120 s. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen, 1,0 % Agarosegel, Laufzeit 40 min

L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

Nachweis des unveränderten Wildtyp-Gens *At4g37070* (*AtPLA IVA*)

Oligonukleotide: 5' IVAKO und 3' IVAKO

WT: PCR an genomische DNA Wildtyp Columbia 0, 1683 bp

Atpla IVA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla IVA-1*, kein PCR-Produkt

Atpla IVA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla IVA-2*, kein PCR-Produkt

Nachweis der T-DNA Insertion im Gen *At4g37070* (*AtPLA IVA*)

WT: PCR an genomischer WT DNA, Oligonukleotide Lbb1 und 3' IVAKO, kein PCR-Produkt

Atpla IVA-1: PCR an genomischer DNA *Atpla IVA-1*, Lbb1 und 3' IVAKO, 1334 bp

Atpla IVA-2: PCR an genomischer DNA *Atpla IVA-2*, 5' IVAKO und Lbb1, 310 bp

3.1.5 T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IVB-1 und *Atpla* IVB-2

Der Ablauf der Isolierung ist unter 3.1.2 angegeben. Die erhaltenen Insertionsmutanten *Atpla* IVB-1 und *Atpla* IVB-2 (SALK_073180.18.00.x, SALK_090933.54.20.x) von At4g37060 wurden angezogen und vereinzelt (s. 2.1). Die Wildtyp-DNA zeigte mit den Oligonukleotiden 5'IVBKO und 3'IVBKO ein Amplifikationsprodukt in der erwarteten Größe von 1623 bp. Bei den homozygoten Insertionslinien von *AtPLA* IVB wurde kein Amplifikationsprodukt sichtbar. Indem mit den T-DNA spezifischem Oligonukleotid LBa1 bzw. LBb1 amplifiziert wurde, konnte für beide Insertionslinien eine T-DNA Insertion nachgewiesen werden. Die DNA von *Atpla* IVB-1 wies bei 894 bp unter Einsatz von LBa1 und 5'IVBKO ein Amplifikat auf, während die *Atpla* IVB-2 DNA ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 356 bp bei Verwendung von LBb1 und 3'IVBKO zeigte. Nach Feststellung der korrekten Insertion durch Sequenzierung des PCR-Produktes war gesichert, dass es sich um homozygote Insertionslinien der gesuchten Gene handelt (Abb. 3.9). *Atpla* IVB-1 hat eine T-DNA Insertion im vierten Exon des Gens. Die Abweichung von 15 Basenpaaren zwischen ermitteltem und angegebenem T-Insertionsort ist unerheblich. *Atpla* IVB-2 zeigt eine Insertion im letzten Exon der Genstruktur. Hier besteht keine Abweichung zwischen ermittelter und vom Salk-Institut angeführtem T-DNA Insertionsort (Tab. 3.3).

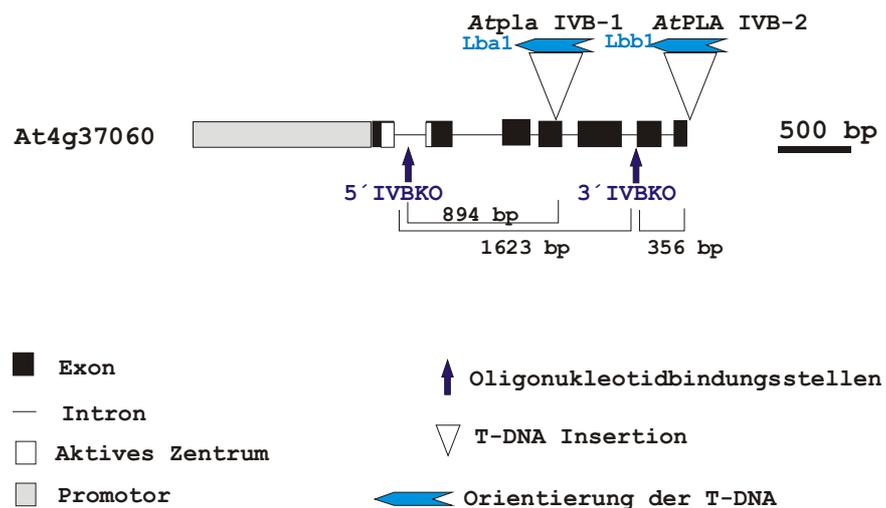


Abbildung 3.8. T-DNA Insertionen in *AtPLA* IVB. Gezeigt ist die Exon-Intronstruktur des Gens mit potentiellm Promotor. Die Pfeile kennzeichnen die Bindungsstellen der Oligonukleotide. Die Amplifikatgrößen sind darunter angezeigt.

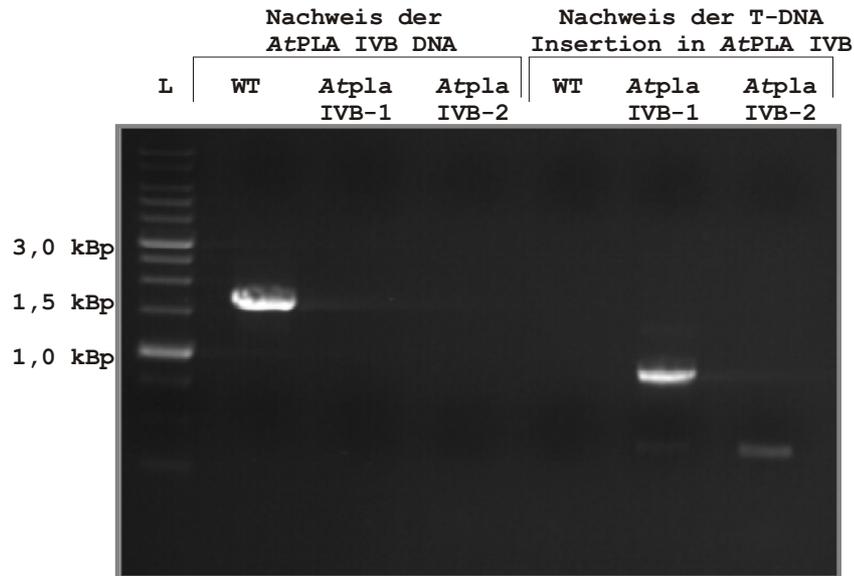


Abbildung 3.9. T-DNA Insertionsnachweis von *Atpla* IVB-1 und *Atpla* IVB-2. Auftrennung von PCR-Produkten jeweils einer homozygoten Linie. PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 35 Zyklen 94° C 15 s, 60° C 30 s, 72° C 120 s. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen, 1,0 % Agarosegel, Laufzeit 40 min

L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

Nachweis des unveränderten Wildtyp-Gens *At4g37060* (*AtPLA IVB*)

Oligonukleotide: 5'IVBKO und 3'IVBKO

WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, 1623 bp

Atpla IVB-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IVB-1, kein PCR-Produkt

Atpla IVB-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IVB-2, kein PCR-Produkt

Nachweis der T-DNA Insertion im Gen *At4g37060* (*AtPLA IVB*)

WT: PCR an genomischer WT DNA, 5'IVBKO und 3'IVBKO, kein PCR-Produkt

Atpla IVB-1: PCR an genomischer DNA *Atpla* IVB-1, 5'IVBKO und Lba1, 894 bp

Atpla IVB-2: PCR an genomischer DNA *Atpla* IVB-2, Lbb1 und 3'IVBKO, 356 bp

3.1.5.1 Zusammenfassung

Im Folgenden wird die ermittelte Statistik der Insertionsnachweise gezeigt. Die Anzahl der direkt vom Vertreiber erhaltenen homozygoten T-DNA Insertionslinien ist dabei prozentual unterschiedlich ausgeprägt. Insgesamt wurden bei *Atpla* IIA-1 15 Pflanzen auf ihre T-DNA Insertion überprüft, wobei acht sich als homozygote Insertionsmutanten erwiesen. Dies entspricht 53 % der erhaltenen Sämlinge, von denen zusätzlich 13 % heterozygot vorlagen.

Bei *Atpla* IIA-2 wurden 20 Pflanzen angezogen und getestet, von denen 20 % homozygot und 30 % heterozygot waren. Von *Atpla* IIIA-1 konnten acht Pflanzen angezogen werden, von denen 12,5 % homozygot und 50 % heterozygot waren. Bei *Atpla* IIIA-2 waren von zwanzig Pflanzen 5 % homozygot und 20 % heterozygot. 17 Pflanzen von *Atpla* IVA-1 wurden auf ihre T-DNA Insertion überprüft, von denen keine homozygot war (Tab. 3.3). Aufgrund dessen wurde eine der drei heterozygoten Linien noch einmal angezogen und vermehrt (s. 2.1). Zwanzig *Atpla* IVA-1 Pflanzen der Folgegeneration wurden durch erneute DNA Isolierung und PCR auf Homozygotie getestet. 10 % von *Atpla* IVA-1 lagen nun homozygot und 40 % heterozygot vor (vgl. Tab. 3.2), was bei der geringen Individuenanzahl nicht weit von der statistisch erwartenden Menge von 25 % entfernt liegt. Insgesamt konnten bei *Atpla* IVB-1 14 Pflanzen auf ihre T-DNA Insertion überprüft werden. 36 % lagen homozygot und 14 % heterozygot vor. Es konnten 20 Pflanzen von *Atpla* IVB-2 angezogen werden von denen 10 % eine homozygote und 30 % eine heterozygote T-DNA Insertion hatten (vgl. Tab. 3.1). Die durch Sequenzierung ermittelten T-DNA Insertionsorte wurden mit der vom Salk-Institut bzw. GABI-Kat übermitteltem Sequenzierungen verglichen. Dabei zeigten sich geringfügige Abweichungen (Tab. 3.3), wobei Abweichungen bis zu 300 bp der Norm entsprechen (http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html). Da es sich bei den gelieferten Samen des Salk-Institut und von GABI-Kat jeweils um eine geringe signifikante Anzahl handelte, konnten keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die Vererbungslehre nach MENDEL eingehalten wurde.

Tabelle 3.1. Isolierte T-DNA Insertionslinien. T₁-Generation, aus dem Salk-Institut in Nottingham bzw. der GABI-Kat Kollektion des Max-Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln. Von sämtlichen Linien wurde die DNA isoliert und diese auf gewünschte T-DNA Insertion im jeweiligen Gen mittels PCR getestet.

<u>Gen</u>	<u>Linie</u>	<u>angezogene</u> <u>Pflanzen gesamt</u>	<u>davon</u> <u>heterozygot</u>	<u>davon</u> <u>homozygot</u>
At2g26560	<i>Atpla</i> IIA-1	15	2	8
At2g26560	<i>Atpla</i> IIA-2	20	6	4
At3g54950	<i>Atpla</i> IIIA-1	8	4	1
At3g54950	<i>Atpla</i> IIIA-2	20	4	1
At4g37070	<i>Atpla</i> IVA-1	17	3	0
At4g37070	<i>Atpla</i> IVA-2	10	5	1
At4g37060	<i>Atpla</i> IVB-1	14	2	5
At4g37060	<i>Atpla</i> IVB-2	20	6	3

Tabelle 3.2. T₂-Generation. Erneute Aussaat einer heterozygoten *Atpla* IVA-1 Linie, Homozygotietest mittels DNA-Isolierung und PCR Analyse. Von sämtlichen Pflanzen wurde die DNA isoliert und diese auf gewünschte T-DNA Insertion im jeweiligen Gen mittels PCR getestet.

<u>Gen</u>	<u>Linie</u>	<u>angezogene Pflanzen gesamt</u>	<u>davon heterozygot</u>	<u>davon homozygot</u>
At4g37070	<i>Atpla</i> IVA-1	20	8	2

Tabelle 3.3. Ergebnisse der Sequenzierung von jeweils einer isolierten T-DNA Insertionspflanze. Angegeben sind die vom Salk-Institut in Nottingham bzw. dem Max-Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln angegeben, und die durch eigene Sequenzierungen ermittelten T-DNA Insertionsorte. Die *Accession* Nr. wurde dem Programm BLAST entnommen. Die T-DNA Orientierung ist ebenfalls angegeben.

<u>Gen</u>	<u>Linie</u>	<u>Accession Nr. nach BLAST</u>	<u>Angegebene T-DNA Insertion</u>	<u>Ermittelte T-DNA Insertion</u>	<u>T-DNA Orientierung</u>
At2g26560	<i>Atpla</i> IIA-1	AC002505	79691	79692	5' → 3'
At2g26560	<i>Atpla</i> IIA-2	AC002505	81054	81050	5' → 3'
At3g54950	<i>Atpla</i> IIIA-1	CAB41089	26225	26237	5' → 3'
At3g54950	<i>Atpla</i> IIIA-2	CAB41089	26956	26968	3' → 5'
At4g37070	<i>Atpla</i> IVA-1	CAB16787	101372	101372	5' → 3'
At4g37070	<i>Atpla</i> IVA-2	CAB16787	101285	101317	3' → 5'
At4g37060	<i>Atpla</i> IVB-1	CAB16788	105273	105288	3' → 5'
At4g37060	<i>Atpla</i> IVB-2	CAB16788	106103	106103	3' → 5'

3.2 Nachweise des Transkripte der gesuchten Gene

Die isolierten Insertionsmutanten von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB wurden im Folgenden geprüft, ob die Insertion der T-DNA zum Ausfall der Transkription führt. Jeweils 20 Keimlinge einer homozygoten Insertionsmutante wurden auf 1,2 % MS-Agar steril ausgesät (s. 2.3.2). Anschließend wurde aus zehn gleichmäßig gewachsenen Keimlingen die Gesamt-RNA isoliert (s. 2.5.2, 2.6.1, Abb. 3.10), aus welcher anschließend cDNA synthetisiert wurde (2.5.3, ohne Abbildung). An der isolierten cDNA wurde eine PCR durchgeführt (s. 2.6f.). Als Standard wurde identisch behandelte cDNA von Wildtyp Columbia 0 verwendet. Des Weiteren wurde aus zehn gleich behandelten Wildtypkeimlingen die genomische DNA isoliert (2.5.1). Diese wurde ebenfalls durch die entsprechenden Oligonukleotide amplifiziert, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen (ohne Abb.).

Für einen externen Aktin-Standard wurden ein Oligonukleotidpaar verwendet, welches für die Aktine 2 und 7 spezifisch ist (MCDOWELL et al. 1996), welche in allen Pflanzenorganen transkribiert werden (HUAN et al. 1996). Es lag zumindest ein Intron zwischen dem 5' und dem 3' Oligonukleotid, was eine Differenzierung zwischen dem PCR-Produkt der genomischen DNA und der cDNA gewährleistete. Jeweils 3 µg RNA-Lösung der einzelnen Proben wurden für die RT-PCR eingesetzt. 100 ng der erhaltenen cDNA und 10 ng DNA wurden für die PCR eingesetzt.

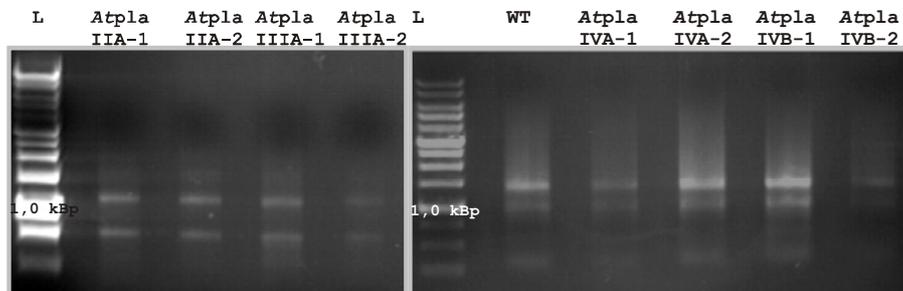


Abbildung 3.10. Isolierung der Gesamt-RNA aus den homozygoten T-DNA Insertionslinien und dem Wildtyp. Es wurden je 10 µl RNA und 5 µl 6 x GLB aufgetragen, 1,0 % Agarosegel, Laufzeit 25 min L: 1 kbp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl
Atpla IIA-1: Gesamt-RNA von *Atpla* IIA-1, *Atpla* IIA-2: Gesamt-RNA von *Atpla* IIA-2,
Atpla IIIA-1: Gesamt-RNA von *Atpla* IIIA-1, *Atpla* IIIA-2: Gesamt-RNA von *Atpla* IIIA-2,
 L: 1 kbp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl,
 WT: Gesamt-RNA Wildtyp Columbia 0,
Atpla IVA-1: Gesamt-RNA von *Atpla* IVA-1, *Atpla* IVA-2: Gesamt-RNA von *Atpla* IVA-2,
Atpla IVB-1: Gesamt-RNA von *Atpla* IVB-1, *Atpla* IVB-2: Gesamt-RNA von *Atpla* IVB-2

3.2.1 cDNA-Analyse von *Atpla* IIA-1 und *Atpla* IIA-2

Die genspezifischen Oligonukleotide (5'IIAcDNA und 3'IIAcDNA, Tab. 2.46) zeigten bei der genomischen DNA des Wildtyps Columbia 0 ein PCR-Produkt in der errechneten Größe von 1574 bp. Die cDNA vom Wildtyp Columbia 0 zeigte bei der ermittelten Größe von 1038 bp ein einzelnes Amplifikationsprodukt, sodass Verunreinigungen mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnten. Bei der cDNA von *Atpla* IIA-1 und *Atpla* IIA-2 war kein PCR-Produkt vorhanden. Der Aktin Standard zeigte bei allen drei cDNA ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 1120 bp (Abb. 3.11).

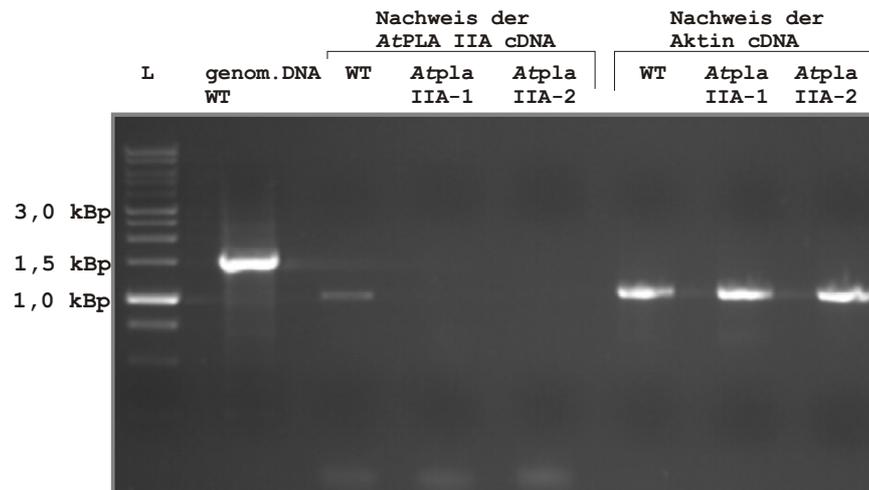


Abbildung 3.11. Nachweis der *Atpla* IIA-1 und *Atpla* IIA-2 cDNA. PCR an der cDNA der homozygoten Insertionsmutanten und des Wildtyps, PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 35 Zyklen 94° C 15 s, 56° C 30 s, 72° C 120 s; 1,0 % Agarosegel Laufzeit 40 min. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen,

L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

genom. DNA WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IIAcDNA und 3'IIAcDNA, 1574 bp

Nachweis der cDNA von At2g26560 (*AtPLA* IIA)

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IIAcDNA, 3'IIAcDNA, 1038 bp

Atpla IIA-1: PCR an cDNA *Atpla* IIA-1, 5'IIAcDNA und 3'IIAcDNA, kein PCR-Produkt

Atpla IIA-2: PCR an cDNA *Atpla* IIA-2, 5'IIAcDNA und 3'IIAcDNA, kein PCR-Produkt

Nachweis der cDNA von Aktin

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5' Aktin und 3' Aktin, 1120 bp

Atpla IIA-1: PCR an cDNA *Atpla* IIA-1, 5' Aktin, 3' Aktin, 1120 bp

Atpla IIA-2: PCR an cDNA *Atpla* IIA-2, 5' Aktin, 3' Aktin, 1120 bp

3.2.2 cDNA-Analyse von *Atpla* IIIA-1 und *Atpla* IIIA-2

Bei Verwendung der Oligonukleotide (5'IIIAcDNA und 3'IIIAcDNA, Tab. 2.46) trat bei der genomischen DNA des Wildtyps Columbia 0 ein PCR-Produkt in der errechneten Größe von 1935 bp auf. Die cDNA des Wildtyp Columbia 0 und von *Atpla* IIIA-1 zeigten bei der ermittelten Größe von 1680 bp jeweils ein einziges Amplifikationsprodukt in der errechneten Nukleinsäureanzahl. Bei *Atpla* IIIA-2 war kein PCR-Produkt vorhanden. Der Aktin Standard zeigte bei allen drei cDNAs ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 1120 bp (Abb. 3.12). *Atpla* IIIA-2 ist eine isolierte Insertionsmutante von *AtPLA* IIIA, bei der kein Transkript nachzuweisen war. *Atpla* IIIA-1 ist eine homozygote Insertionsmutante, wird jedoch wie das Wildtyp-Gen transkribiert (Abb. 3.4).

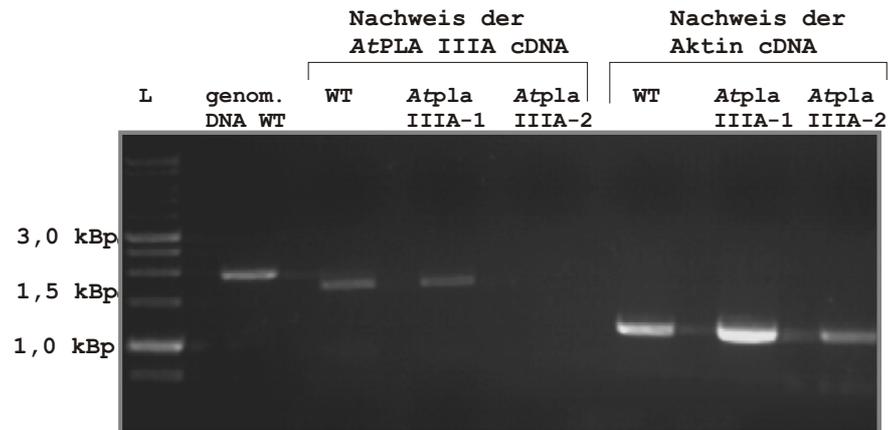


Abbildung 3.12. Nachweis von *Atpla* IIIA-1 und *Atpla* IIIA-2 cDNA, PCR an der cDNA der homozygoten Insertionsmutanten und des Wildtyps, PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 40 Zyklen 94° C 15 s, 56° C 30 s, 72° C 120 s, 1,0 % Agarosegel Laufzeit 40 min. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen

L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

genom. DNA WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IIIACDNA und 3'IIIACDNA, 1935 bp

Nachweis der cDNA von At3g54950 (*AtPLA* IIIA)

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IIIACDNA, 3'IIIACDNA, 1680 bp

Atpla IIA-1: PCR an cDNA *Atpla* IIIA-1, 5'IIIACDNA, 3'IIIACDNA, 1680 bp

Atpla IIIA-2: PCR an cDNA *Atpla* IIIA-2, 5'IIIACDNA, 3'IIIACDNA, kein PCR-Produkt

Nachweis der cDNA von Aktin

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'Aktin und 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IIIA-1: PCR an cDNA *Atpla* IIIA-1, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IIIA-2: PCR an cDNA *Atpla* IIIA-2, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

3.2.3 cDNA-Analyse von *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2

Es wurden dieselben Oligonukleotide verwendet wie für die Isolierung der Insertionsmutanten von *AtPLA* IVA (5'IVAKO und 3'IVAKO, Tab. 2.46). Bei Verwendung der genomischen DNA von Wildtyp Columbia 0 entstand ein PCR-Produkt in der ermittelten Größe von 1683 bp. Die cDNA des Wildtyp Columbia 0 zeigte bei der errechneten Nukleinsäureanzahl von 1107 bp ein einziges Amplifikationsprodukt. Bei der cDNA von *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 war kein PCR-Produkt vorhanden. Der Aktin Standard zeigte bei allen drei cDNAs ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 1120 bp (Abb. 3.13).

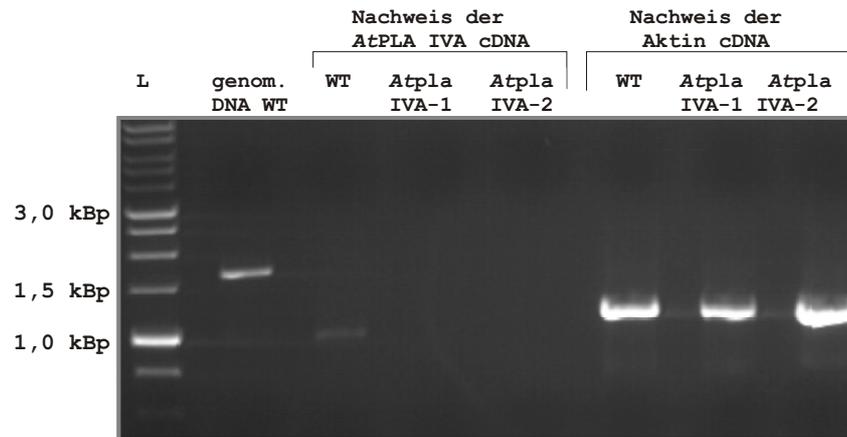


Abbildung 3.13. PCR an der cDNA der homozygoten Insertionslinien und des Wildtyps. PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 35 Zyklen: 94° C 15 s, 58° C 30 s, 72° C, 120 s, 1,0 % Agarosegel Laufzeit 40 min. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen, L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl genom. DNA WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IVAKO und 3'IVAKO, 1683 bp

Nachweis der cDNA von At4g37070 (*AtPLA IVA*)

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IVAKO, 3'IVAKO, 1107 bp

Atpla IVA-1: PCR an cDNA *Atpla IVA-1*, 5'IVAKO und 3'IVAKO, kein PCR-Produkt

Atpla IVA-2: PCR an cDNA *Atpla IVA-2*, 5'IVAKO und 3'IVAKO, kein PCR-Produkt

Nachweis der cDNA von Aktin

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'Aktin und 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IVA-1: PCR an cDNA *Atpla IVA-1*, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IVA-2: PCR an cDNA *Atpla IVA-2*, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

3.2.4 cDNA-Analyse von *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-2*

Unter Verwendung der genspezifischen Oligonukleotide (5'IVBcDNA und 3'IVBcDNA, Tab. 2.46) und genomischer DNA von Wildtyp Columbia 0 wurde ein PCR-Produkt in der errechneten Größe von 1737 bp amplifiziert. Bei der cDNA des Wildtyps Columbia 0 wurde ein einziges Amplifikationsprodukt in der ermittelten Größe von 1035 bp isoliert. Bei der cDNA von *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-2* war kein PCR-Produkt zu finden. Der Aktin Standard zeigte bei allen drei cDNAs ein Amplifikat bei 1120 bp in der erwarteten Größe (Abb. 3.14).

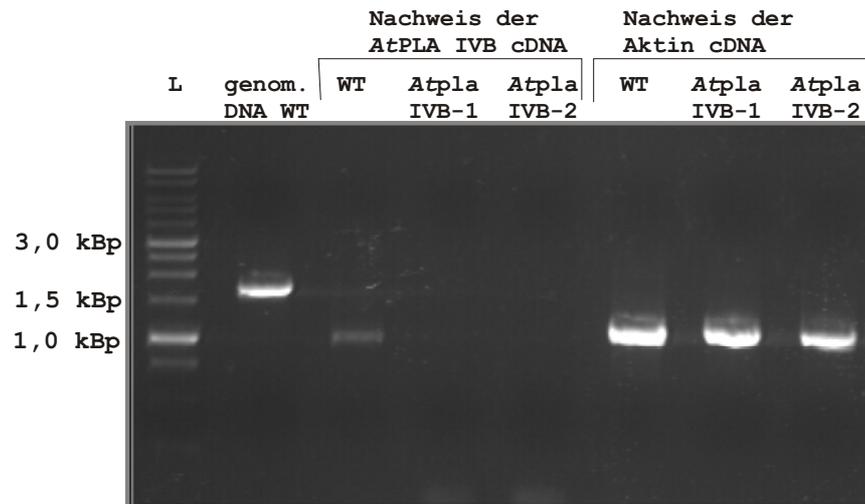


Abbildung 3.14. PCR an der cDNA der homozygoten Insertionslinien und des Wildtyps. PCR-Bedingungen: 94° C 5 min, 35 Zyklen: 94° C 15 s, 56° C 30 s, 72° C, 120 s, 1,0 % Agarosegel Laufzeit 40 min. Es wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl 6xGLB-Puffer aufgetragen
L: 1 kBp DNA-Leiter (Fa. GeneCraft), 5 µl

genom. DNA WT: PCR an genomischer DNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IVBcDNA und 3'IVBcDNA, 1737 bp

Nachweis der cDNA von At4g37060 (*AtPLA IVB*)

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'IVBcDNA, 3'IVcDNA, 1035 bp

Atpla IVB-1: PCR an cDNA *Atpla IVB-1*, 5'IVBcDNA, 3'IVBcDNA, kein PCR-Produkt

Atpla IVB-2: PCR an cDNA *Atpla IVB-2*, 5'IVBcDNA, 3'IVBcDNA, kein PCR-Produkt

Nachweis der cDNA von Aktin

WT: PCR an cDNA Wildtyp Columbia 0, Oligonukleotide 5'Aktin und 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IVB-1: PCR an cDNA *Atpla IVB-1*, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

Atpla IVB-2: PCR an cDNA *Atpla IVB-2*, 5'Aktin, 3'Aktin, 1120 bp

3.3 Anzucht der Insertionsmutanten

Zur morphologischen Untersuchung der isolierten Mutanten wurden jeweils 15 der geprüften Insertionsmutanten von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB in Einheitserde in der Klimakammer angezogen (s. 2.1). Bei der Anzucht der Mutanten wurde darauf verzichtet *Atpla* IIIA-1 ebenfalls auszusäen, da das Transkript von *AtPLA* IIIA nachgewiesen werden konnte. Das Wachstum und das äußere Erscheinungsbild der Mutanten wurde mit gleichbehandelten Wildtyp Columbia 0 Pflanzen verglichen. Die morphologischen Merkmale der Mutanten wichen nicht von denen des Wildtyps ab (Abb. 3.15, 3.16). Sie zeigten keine Änderung in den Rosetten, Blüten, Schoten oder in der Verzweigung gegenüber dem Wildtyp. Im Durchschnitt waren die Pflanzen nach sechs Wochen 40 cm hoch (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4. Gesamtlänge von 15 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Columbia 0, 6 Wochen alte Pflanzen, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 23° C, 65 % relative Luftfeuchtigkeit, 9600 lx / m²

WT	<i>Atpla</i> IIA-1	<i>Atpla</i> IIA-2	<i>Atpla</i> IIIA-2	<i>Atpla</i> IVA-1	<i>Atpla</i> IVA-2	<i>Atpla</i> IVB-1	<i>Atpla</i> IVB-2
Ø 39,5 cm	40,0 cm	39,6 cm	41,3 cm	42,3 cm	40,8 cm	39,8 cm	40,2 cm



Abbildung 3.15. Blütenstände von den *Arabidopsis thaliana* Insertionslinien und des Wildtyps, 6 Wochen alte Pflanzen, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 23° C, 65 % relative Luftfeuchte, 9600 lx / m²

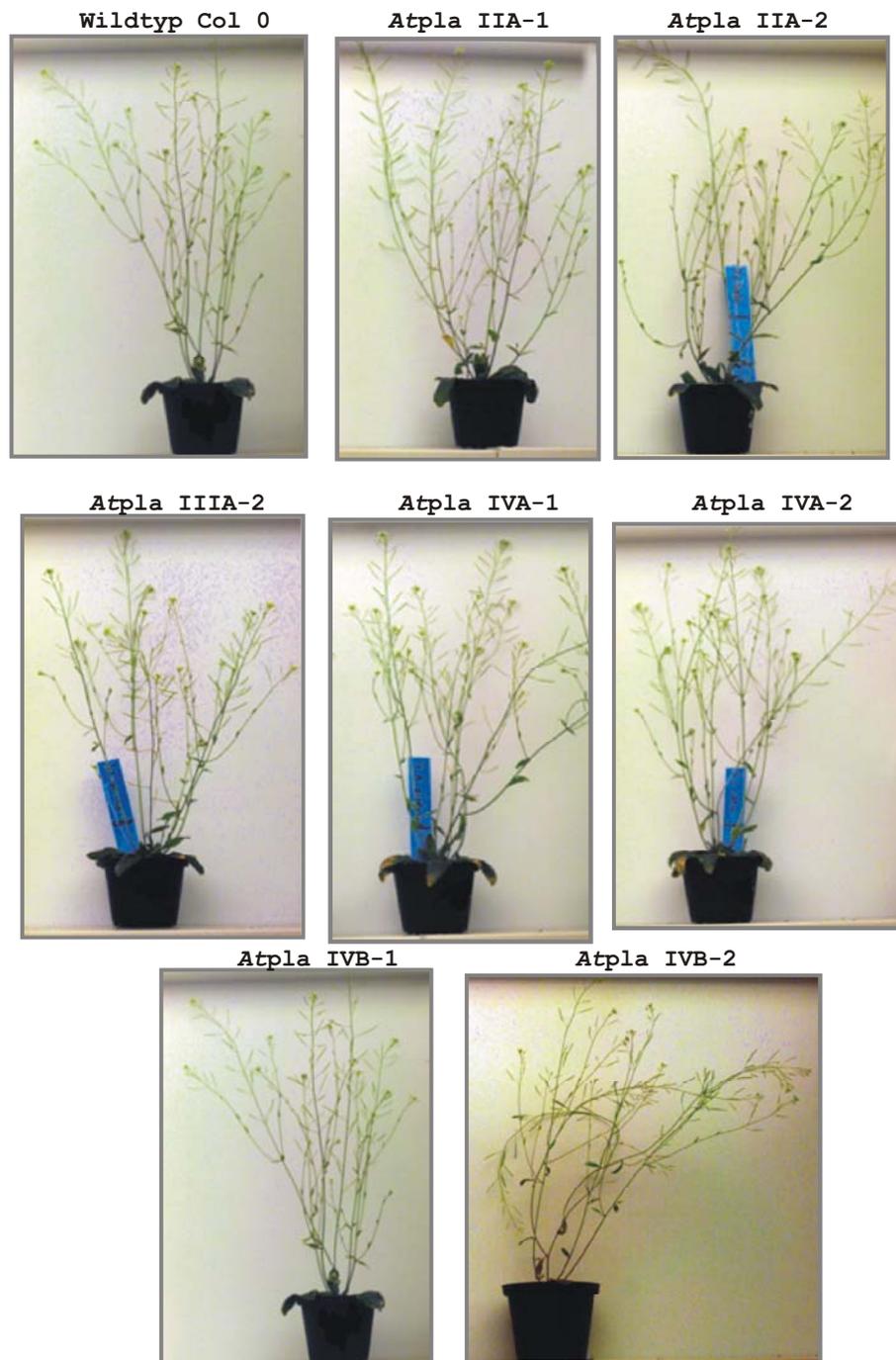


Abbildung 3.16. Aufnahmen adulter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Wildtyps und der Insertionslinien, 6 Wochen alt, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 23° C, 65 % rel. Luftfeuchte, 9600 lx /m²

Es war bekannt, dass *AtPLA IVA* ausschließlich in der Wurzel und *AtPLA IIA* in Wurzel, Blatt und basalen Stipeln transkribiert wurde (HOLK et al. 2002, RIETZ 2002). Die Transkription von *AtPLA IIIA* konnte mittels RT-PCR in Wurzel, Blatt, Blüte und Stängel nachgewiesen werden, während das Transkript von *AtPLA IVB* ausschließlich in der Wurzel nachgewiesen wurde (persönliche Mitteilung P. PIETRZYK). Da es offensichtlich keine Korrelation von morphologischen Eigenschaften und den Ausfall der Transkription bestimmter Gene in bestimmten Organen gab, waren zur Analyse der Insertionsmutanten aufwändigere Untersuchungen notwendig. Aufgrund dessen wurde im Folgenden der Schwerpunkt der Analysen auf die Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* gelegt. Diese sind in Tandem-Lage im Genom positioniert und sind sich in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von der gesamten Genfamilie am ähnlichsten. Zudem war das rekombinante Enzym IVA bereits untersucht und das transkriptionelle Muster durch GUS-Expression erforscht (HOLK et al. 2002, RIETZ 2002).

3.4 Funktionsanalyse des Gens *AtPLA IVA* (At4g37070)

Die Funktionsanalyse erfolgt durch Charakterisierung der isolierten Insertionsmutanten und Promotor::*uidA* Pflanzen.

3.4.1 Morphologie von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2*

Der Promotor von *AtPLA IVA* (PIVA) ist nach Expression des *uidA*-Gens ausschließlich in der Wurzel aktiv (RIETZ 2002). Aufgrund dessen wurde eine morphologische Untersuchung der Wurzel durchgeführt. Zunächst wurden die Agarkonzentrationen von 0,8 %, 1,0 %, 1,2 % und 1,5 % für das Wachstum der Keimlinge auf senkrechten Petrischalen getestet. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum der Keimlinge bei einem Agaranteil von 1,2 % am regelmäßigsten ausfiel. Mit dieser Konzentration wurde im Folgenden ausschließlich gearbeitet. Die Morphologie von *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-1* und Wildtyp Columbia 0 wurden verglichen (s. 2.3.2, s. 2.4ff.). Es folgten Versuchsreihen mit verschiedenen Mangelmedien, welchen jeweils ein Nährstoff fehlte, der sich auf die Wurzelmorphologie auswirkt und mögliche Wirkungen auf die Auxinsignalkette hat.

Die Keimlinge wurden auf den Mangelmedien bei einer Lichtstärke von 1100 lx / m^2 angezogen, da unter stärkeren Lichtverhältnissen die Pflanzen nicht gediehen. Die Samen wurden auf B5-Agar ausgelegt (s. 2.4) und nach drei bis vier Tagen wurden gleichartig gewachsene Keimlinge auf die verschiedenen Medien umgesetzt. Die Keimlinge wurden auf Minimal-Medium, und den entsprechenden Sulfatmangel-, Phosphatmangel-, und Eisenmangel-Medium und einer Nitratkonzentrationsreihe angezogen (s. 2.4.1ff.). Bei dem Minimal-Medium handelt es sich um 1:50 verdünntes B5-Medium mit einem geringeren Zuckergehalt als üblich (s. 2.4.1). Bei der Nitratkonzentrationsreihe, dem Phosphatmangel- und Sulfatmangel-Medium gab es keine morphologischen Abweichungen zwischen Wildtyp Columbia 0, *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 (Abb. 3.17). Zudem wurde auch eine Auxinkonzentrationsreihe auf Minimal-Medium angefertigt, welche allerdings kein eindeutiges Ergebnis zeigte. Bei einer Auxinkonzentration von $0,03 \text{ } \mu\text{mol / l}$ zeigten einige Pflanzen dasselbe Aussehen wie der Wildtyp (ca. 60 %), während die übrigen weniger Seitenwurzeln hatten (Abb. 3.17). Bei einer quantitativen Auswertung dieses Experiments zeigte sich, dass bei einer Auxinkonzentration von $0,03 \text{ } \mu\text{mol / l}$ die Insertionsmutanten von *AtPLA* IVA im Durchschnitt $2,05 (+/- 1,1)$ Seitenwurzeln pro Millimeter Hauptwurzel ausbildeten, während beim Wildtyp im Schnitt $2,1 (+/- 0,5)$ Seitenwurzeln pro Millimeter Hauptwurzel auftraten. Eine statistisch eindeutige Auswertung war in Bezug auf dieses Experiment nicht möglich, die hohe Standardabweichung bei den Insertionsmutanten deutet aber auf die veränderte Wurzelmorphologie hin. Diese steht in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum auf Minimal-Medium (s. u.). Auf MS-Agar bei einer Lichtstärke von 4600 lx / m^2 zeigten die Mutanten keinen Unterschied in ihrer Gestalt gegenüber dem Wildtyp. Auch das Wachstum auf MS-Medium mit einer Auxinkonzentrationsreihe (s. 2.4.1.4f.) resultierte bei den Mutanten in keiner eindeutigen morphologischen Veränderungen (Abb. 3.18). Die Anzucht der Mutanten auf Minimal-Medium führte zu einer deutlichen Verminderung der Seitenwurzelanzahl von *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.18). Nach 18 Tagen Wachstum auf Minimal-Medium wurde die Gesamtlänge des Hypokotyls, der Hauptwurzel, und die Anzahl der Seitenwurzeln bestimmt. Nur letztere war über die gesamte Wurzellänge der Insertionsmutanten von *AtPLA* IVA deutlich geringer (Abb. 3.18, A-C).

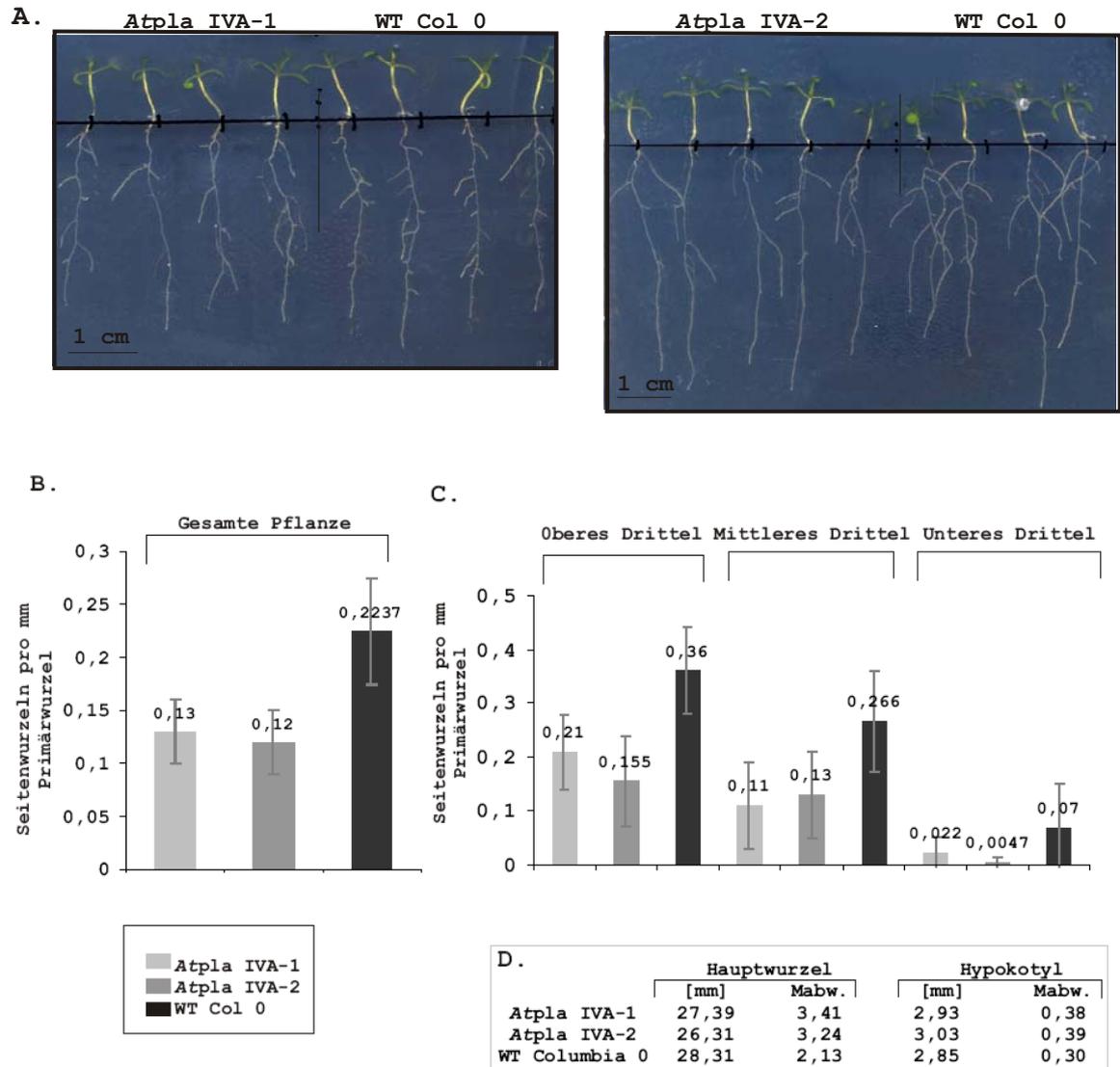


Abbildung 3.17. Morphologie der Insertionslinien *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 im Vergleich zum Wildtyp Columbia 0. 18 Tage alt, Anzucht auf 1,2 % Minimal-Medium (s. 2.4.1), 1100 lx / m², 23° C, 16 h Licht / 8 h Dunkelheit. Die Auswertungen in Abb. 3.18 B und C beziehen sich auf alle Versuche. Es wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt und je 30 Keimlinge vermessen. A) Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt. Aufnahmen mit Epson Perception 1650, 400 dpi, B) Seitenwurzelanzahl pro mm Primärwurzel der Insertionslinien und Wildtyp. Auswertung dhs Bilddatenbank 4.0, n= 30, C) Seitenwurzelanzahl pro mm 1/3-Primärwurzel von *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 im Vergleich zum Wildtyp. Auswertung dhs Bilddatenbank 4.0, n=30, D) Durchschnittliche Länge Hauptwurzel und Hypokotyl in mm

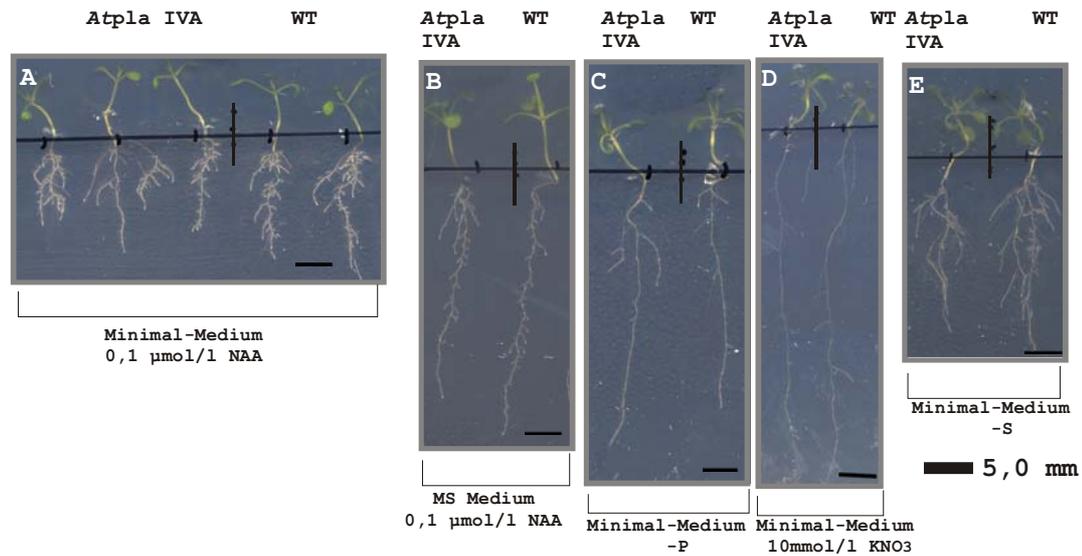


Abbildung 3.18. Morphologie der Insertionslinien *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 im Vergleich zum Wildtyp Columbia 0. Ausschnitte quadratischer Petrischalen. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ, Aufnahme mit Epson Perception 1650, 400 dpi, A, C-E) 18 Tage alt, Anzucht auf 1,2 % Minimal-Medium, 1100 lx / m², 23° C, 16 h Licht / 8 h Dunkelheit; A) Minimal-Medium 0,1 µmol / l NAA, B) 10 Tage alt, Anzucht auf 1,2 % MS-Medium, 4600 lx / m², 23° C, 16 h Licht / 8 h Dunkelheit. 0,1 µmol / l NAA, C) Phosphatmangel-Medium, D) 10 mmol / l KNO₃ im Minimal-Medium, weitere Nitrat-Konzentrationen wurden getestet, E) Sulfatmangel-Medium

Die Hauptwurzel und das Hypokotyl der Insertionslinien *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 waren unter Eisenmangel verkürzt (Abb. 3.19 A). Die Gesamtlänge des Hypokotyls, der Hauptwurzel, die Anzahl der Seiten- und Lateralwurzeln und die Länge der Seitenwurzeln wurden an 18 Tagen alten Keimlingen bestimmt (s. 2.4.1.1). Die durchschnittliche Länge der Hauptwurzel lag bei 11,6 mm beim Wildtyp und um 8 mm bei *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2. Die Seitenwurzeln traten vermehrt im unteren Drittel der Hauptwurzel auf, was dem Eisenmangeltyp von *Arabidopsis* entspricht (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Die Auswertung der Seitenwurzelanzahl erfolgte pro Millimeter Hauptwurzel (nach MARCHANT et al. 2002). Die Bestimmung der Seitenwurzelanzahl zeigte, dass die Anzahl der Seitenwurzeln pro Millimeter Hauptwurzel bei den Insertionslinien von *AtPLA* IVA bei 0,48 (+/- 0,07 mm) bzw. 0,49 (+/- 0,08 mm) und 0,39 (+/- 0,08 mm) beim Wildtyp lag (Abb. 3.19 D). Eine mikroskopische Untersuchung der Wurzel ergab keine Unterschiede der Zellmorphologie zwischen Wildtyp und Mutanten (Abb. 3.20).

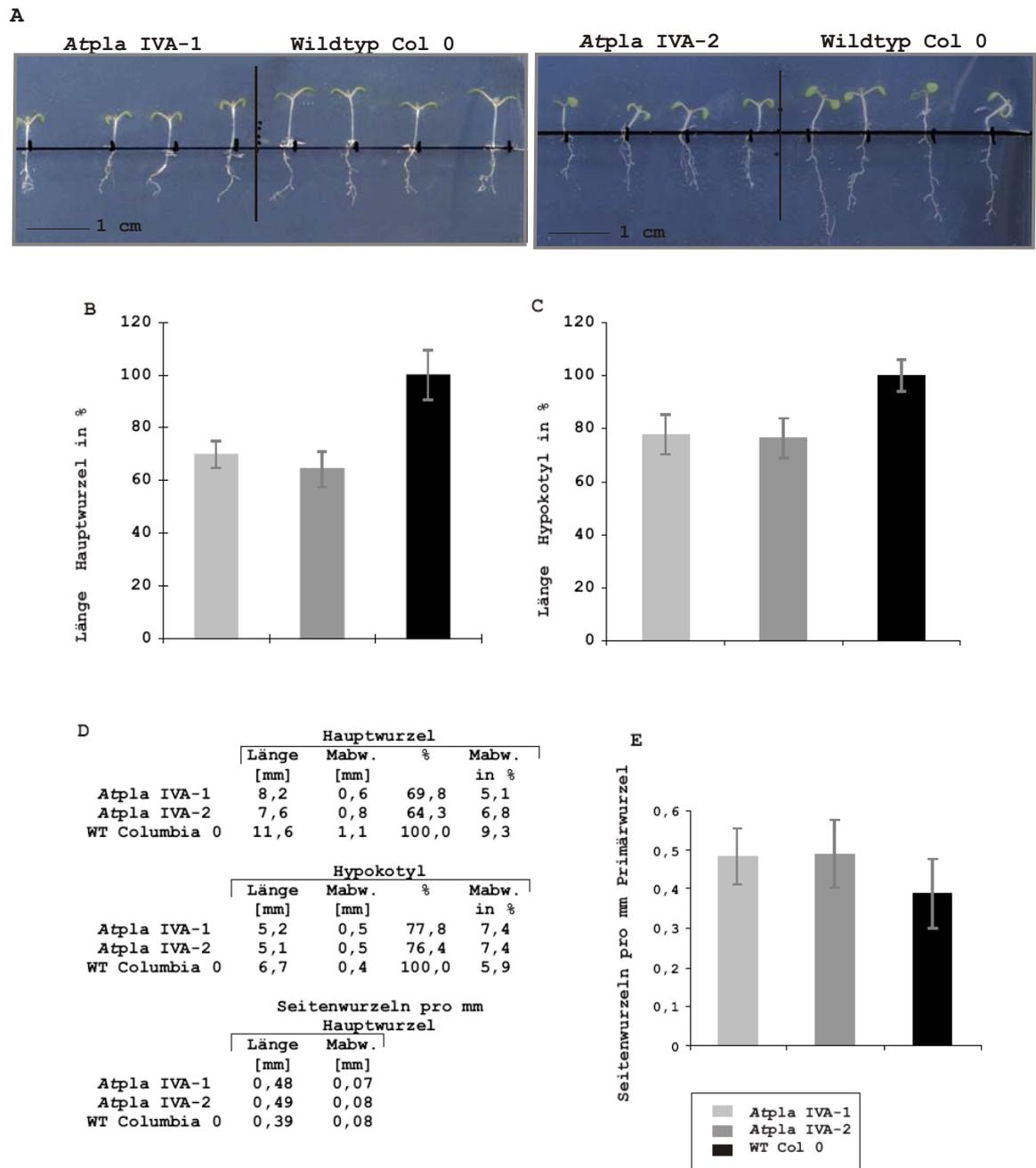


Abbildung 3.19. A) Phänotypanalyse der Insertionslinien *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-2* und Wildtyp auf 1,2 % Eisenmangel-Medium. 18 Tage alte Pflanzen bei 23° C, 16 h Licht / 8 h Dunkel, 1100 lx / m² angezogene Pflanzen, gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt einer quadratischen Petrischale, Dokumentation mit Epson Perception 1650, 400 dpi. Auswertung mit dhs Bilddatenbank 4.0.

B-D) 50 Keimlinge in 4 unabhängigen Experimenten wurden vermessen.

B) Bestimmung der Hauptwurzellänge von *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-2* und WT Columbia 0, n=50,

C) Bestimmung der Hypokotylllänge von *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-2* und WT Columbia 0, n=50,

D) Durchschnitt der Längenmessungen des Hypokotyls, der Hauptwurzel und der Seitenwurzeln der Insertionslinien *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-2* und des WT Columbia 0, n=50,

E) Seitenwurzeln pro mm Hauptwurzel von *Atpla IVA-1*, *Atpla IVA-2*, WT Columbia 0, n=50

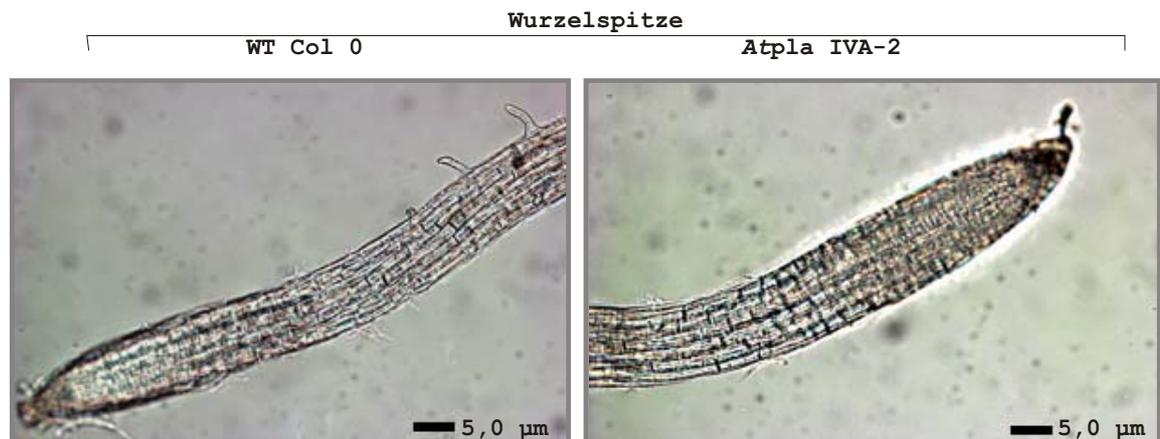


Abbildung 3.20. Mikroskopische Aufnahme der Wurzelspitze der Primärwurzel von Wildtyp Columbia 0 und *AtPLA IVA-2*, 18 Tage alt, Wachstum auf Eisenmangel-Medium, 1100 lx / m², 23° C, Zeiss Axioskop MR-5. Die Wurzelspitze von *Atpla IVA-1* hatte ein gleichartiges Aussehen (ohne Abbildung).

3.4.2 Histologischer und quantitativer Nachweis der Regulation von *PIVA::uidA* bei Eisenmangel

Die Insertionslinien *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* haben bei Eisenmangel eine Verkürzung der Hauptwurzel und des Hypokotyls gegenüber dem Wildtyp (s. 3.11.1). Aufgrund dessen wurden die von RIETZ (2002) isolierten *PIVA::uidA* Linien *PIVA.7* und *PIVA.9* unter denselben Wachstumsbedingungen wie die Insertionslinien angezogen. Als Standard wurden *PIVA::uidA* Linien verwendet, die auf Minimal-Medium angezogen wurden, welches bis auf den Eisenzusatz identisch mit dem Eisenmangel-Medium ist (s. 2.4.1f.). Die *PIVA::uidA* Pflanzen wurden in X-Gluc Lösung inkubiert und beobachtet (s. 2.17.1). Eine β -Glucuronidase-Aktivität des Wildtyps konnte unter den aufgeführten Bedingungen nicht nachgewiesen werden (ohne Abb.). RIETZ wies 2002 nach, dass *PIVA::uidA* Pflanzen ohne vorherige Induktion nach einer 20minütigen Inkubationsdauer in X-Gluc Lösung einen ersten Farbniederschlag durch die β -Glucuronidase-Aktivität zeigten. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bereits eine deutlich höhere *PIVA*-Aktivität bei den Pflanzen, die unter Eisenmangel herangezogen wurden (Abb. 3.21). Nach 60 Minuten Inkubationszeit war unter beiden Reaktionsbedingungen eine starke Färbung der Wurzeln zu erkennen. Es folgte ein quantitativer Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität von *PIVA.7* und *PIVA.9*.

Hierzu wurden jeweils 20 Pflanzen auf Eisenmangel-Medium und Minimal-Medium als Standard angezogen (s. 2.4ff.). Der Umsatz des Substrats 4-MUG durch die Aktivität der β -Glucuronidase wurde am Fluorimeter durch Messung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon bestimmt (s. 2.13.3). Dabei zeigte sich, dass es je nach Linie zu einer 168 bis 361%igen Erhöhung der β -Glucuronidase-Aktivität bei Eisenmangel kam (Abb. 3.22).

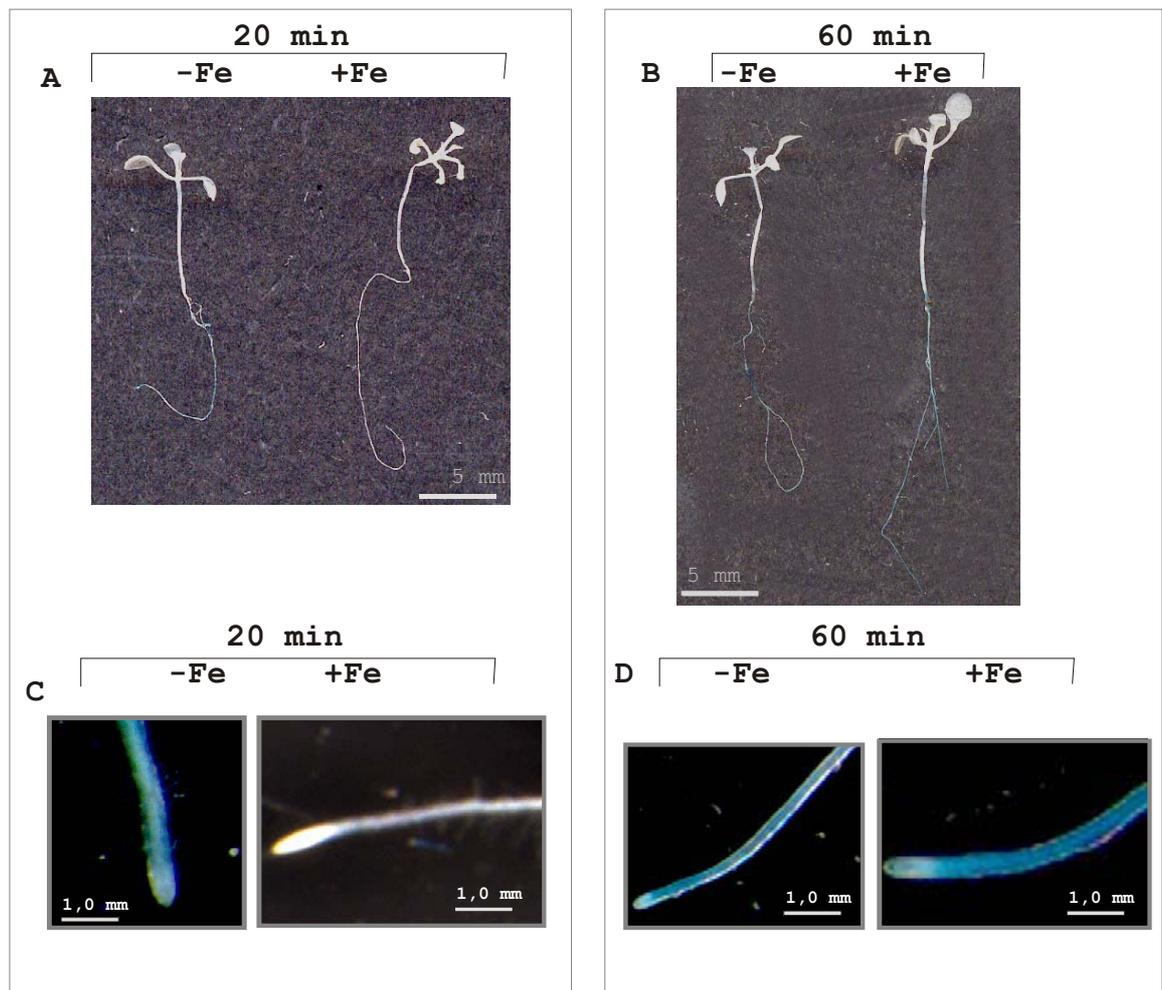


Abbildung 3.21. GUS-Färbung von PIVA.7::*uidA* nach Anzucht auf Minimalmedium und Eisenmangel-Medium. 18 Tage alte Pflanze nach Wachstum bei 1100 lx / m^2 , 23° C , 18 h Licht / 6 h Dunkelheit. Es wurden pro Inkubationszeitpunkt je 20 Pflanzen von drei verschiedenen PIVA::*uidA* Linien in drei unabhängigen Versuchen getestet. Das Ergebnis ist repräsentativ. Die zu sehende unterschiedliche Morphologie der Pflanzen ist in der Anzucht auf verschiedenen Medien begründet. A) 20 min: geringe Blaufärbung der Mutante auf Minimal-Agar, intensive Färbung auf Eisenmangel-Agar, B) Vergrößerungen der jeweiligen Wurzel, C) 60 min: regelmäßige Blaufärbung der Mutanten auf Minimal-Agar und Eisenmangel-Agar, D) Vergrößerungen der jeweiligen Wurzel

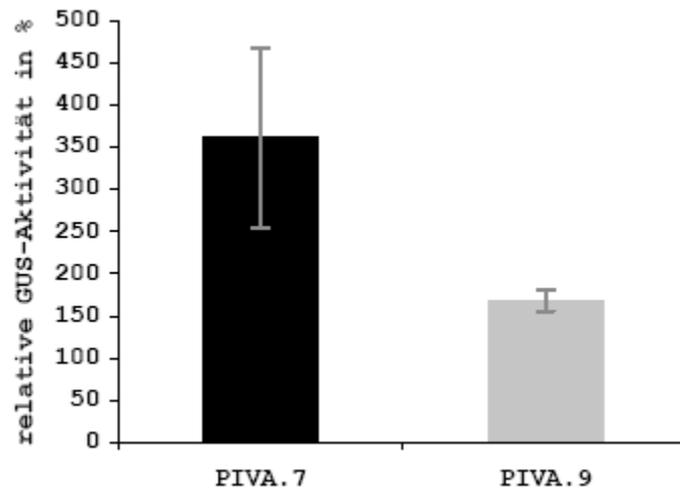


Abbildung 3.22. Quantitative Analyse der PIVA::GUS-Aktivität nach Anzucht der Pflanzen auf Eisenmangel-Medium in Relation zum Minimal-Medium. *Arabidopsis thaliana* PIVA::uidA Linie 7 und 9, 18 Tage alte Pflanzen, 23° C, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 1100 lx / m². Der Wert, welcher aus der Anzucht auf Minimal-Medium resultiert wurde als 100 % gesetzt und subtrahiert. Es wurden immer 40 µg Gesamtprotein in den Test eingesetzt und bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Die relative GUS-Aktivität bezieht sich auf den Umsatz in 4-MU pro µg Protein und pro Stunde.

3.5 Funktionsanalyse des Gens *AtPLA IVB* (At4g37060)

Im Folgenden wird das Gen *AtPLA IVB* durch die Analyse der Insertionslinien *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-2* charakterisiert, um so Rückschlüsse auf die Funktion des Transkripts zu ziehen. Des Weiteren werden die Ergebnisse mit Untersuchungen an PIVB::uidA verglichen, die für diese Untersuchungen generiert wurden.

3.5.1 Morphologische Untersuchung von *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-1*

Die Morphologie der Insertionslinien von *AtPLA IVB* wurde mit gleichartig behandelten Wildtyp Columbia 0 Pflanzen als Standard verglichen und senkrecht auf verschiedenen Nährmedien angezogen (s. 2.4ff.).

Atpla IVB-1 und *Atpla* IVB-2 zeigten auf verschiedenen Medien, wie Minimal-, Eisenmangel-, Phosphatmangel- oder Sulfatmangel-Medium keine morphologischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp (s. 2.4.1ff.). Auch auf einer Nitratkonzentrationsreihe auf B5-Medium 1:50 verdünnt waren keine morphologischen Unterschiede vorhanden (s. 2.4.5, Abb. 3.23). Auf MS-Agar zeigten die Mutanten keine Morphologieänderung gegenüber dem Wildtyp. Bei steigender, dem Medium zugefügter, Auxinkonzentration kam es bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp zu einer Erhöhung der Seitenwurzelanzahl pro Millimeter Hauptwurzel. Hypokotyl- und Hauptwurzellänge wurden vermessen und die Anzahl der Seitenwurzeln bestimmt. Aufgrund der Seitenwurzeldichte ab $0,3 \mu\text{mol/l}$ konnte keine adäquate Auswertung bei diesen Konzentrationen erfolgen und wurde aufgrund dessen in die Auswertung nicht miteinbezogen (ohne Abb.). Die durchschnittliche Länge der Hauptwurzel lag sowohl bei den Insertionsmutanten, als auch beim Wildtyp je nach Auxinkonzentration zwischen 14,4 und 62,6 mm, die des Hypokotyls zwischen 1,0 und 2,5 mm (Abb. 3.24).

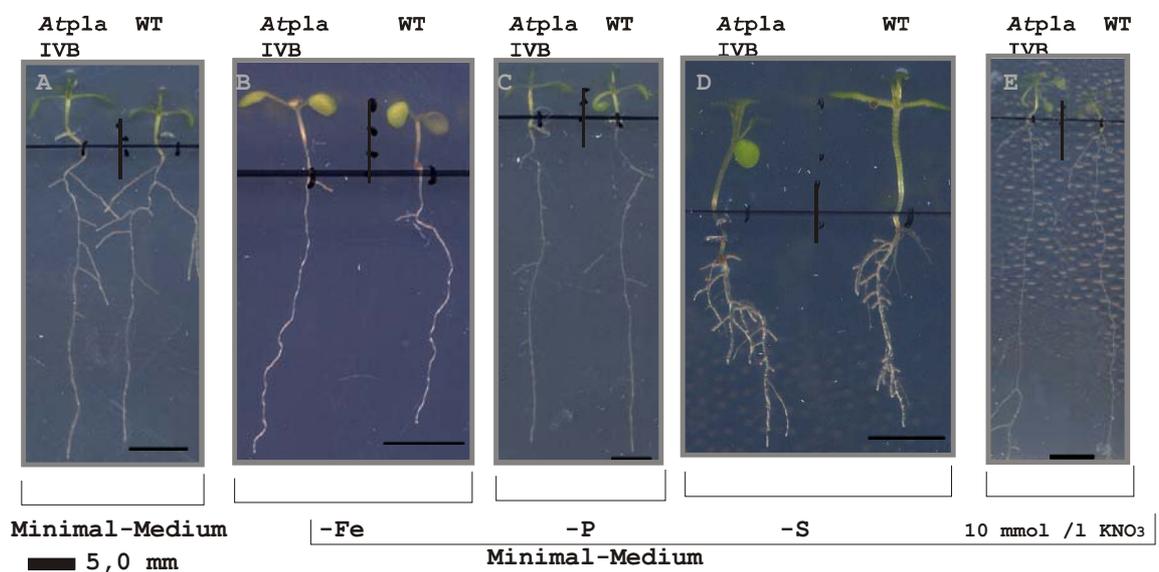


Abbildung 3.23. Wachstum einer Insertionslinie von *AtPLA* IVB auf verschiedenen Mangelmedien. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ. Die zweite Linie *Atpla* IVB-1 hatte ein gleichartiges Aussehen. 18 Tage alte Pflanzen, 16 h Licht / 8 h Dunkelheit, 23°C , 1100 lx/m^2 , 1,2 % Agar A) Minimal-Medium, B) Eisenmangel-Medium C) Phosphatmangel-Medium D) Sulfat-Mangelmedium E) 10 mmol/l KNO_3 im Minimal-Medium, weitere Nitrat-Konzentrationen wurden getestet

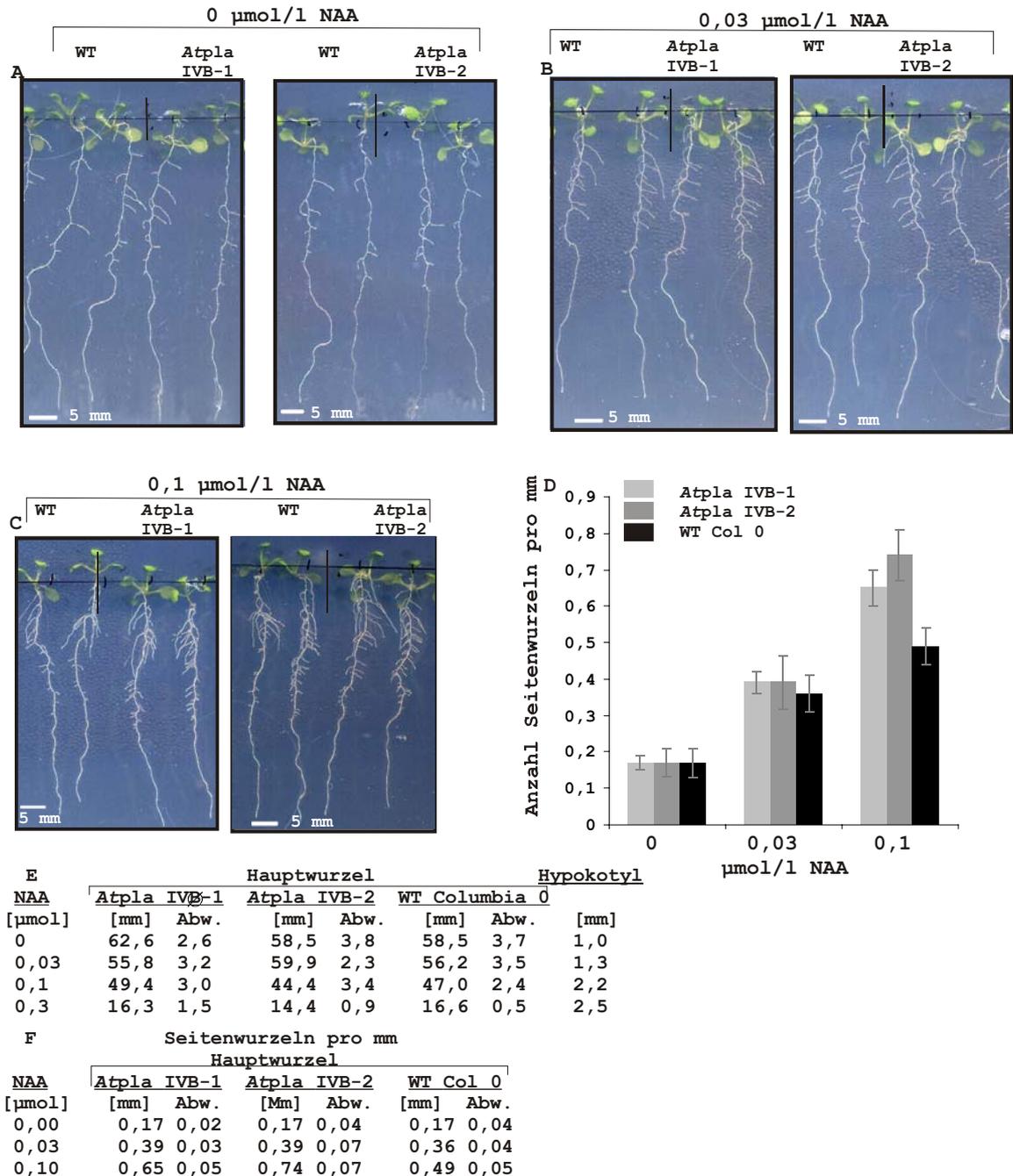


Abbildung 3.24. Morphologische Analyse von *Atpla* IVB-1, *Atpla* IVB-2 und Wildtyp in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration. Dokumentation mit Epson Perception 1650, 400 dpi von 10 Tage alten Pflanzen. Nach drei Tagen Anzucht im Langtag bei 8000 lx / m² bei 23° C wurden gleichartig gewachsene Keimlinge auf Agarplatten mit einer Auxinkonzentrationsreihe umgesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt und jeweils 20 Keimlinge pro Konzentration und Linie vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels dhs Bilddatenbank 4.0. A-C) Repräsentative Ausschnitte aus quadratischen Petrischalen mit den Insertionslinien von *AtPLA* IVB und Wildtyp. A) 0 $\mu\text{mol/l}$ NAA, B) 0,03 $\mu\text{mol/l}$ NAA, C) 0,1 $\mu\text{mol/l}$ NAA, D) Diagramm der ermittelten Seitenwurzelanzahl in Bezug auf die Auxinkonzentration, E) Tabellarische Aufführung der Längenmessung von Hauptwurzel und Hypokotyl der Insertionslinien und des Wildtyps, F) Tabellarische Auswertung von C)

3.5.2 Erstellung von PIVB::*uidA* Linien

Um die Ergebnisse der morphologischen Analyse der Insertionsmutanten von *AtPLA* IVB mit der β -Glucuronidase-Aktivität von PIVB::*uidA* Linien zu vergleichen, wurden Promotor::*uidA* Konstrukte von PIVB erstellt und in *Arabidopsis thaliana* transformiert.

3.5.2.1 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit PIVB::*uidA*

Als Promotor von *AtPLA* IVB wurden 1183 bp definiert, welche auch den transkribierten, aber nicht translatierten Bereich -1 relativ zum Adenin des Start-ATG beinhaltet und bis direkt hinter das Stopcodon des vorhergehenden Gens reicht. Für die Transformation wurde die T-DNA des Gateway-Vektors benutzt, welche die Reportergene für die Proteine *green fluorescent Protein* und β -Glucuronidase (GUS) trug (s. Anhang Abb. 2)

Eine Übersicht über die Erstellung der Konstrukte zeigt Abbildung 3.25. Die Promotorsequenzen wurden mittels PCR von gereinigter, genomischer DNA amplifiziert (s. 2.5.1) und an das 5'Ende der Reportergene kloniert (s. 2.7ff.). Hierfür wurden Oligonukleotide konzipiert, die direkt vor dem Start-ATG von *AtPLA* IVB und hinter dem Stopcodon des vorherigen Gens *AtPLA* IVA liegen (5'PIVB und 3'PIVB, s. Tab 2.47). Die gewünschte Sequenz wurde nach einer 5minütigen Denaturierungsphase mittels TaKaRa ExTaq für 38 Zyklen amplifiziert, für je 120 Sekunden bei 72° C und bei einer Anlagerungstemperatur von 54° C amplifiziert (s. 2.6). Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* durch TA-Klonierung in das TOPO System (s. 2.7). Nach Isolierung der Plasmid-DNA (s. 2.12.1) folgte eine Überprüfung der Insertion durch eine Restriktionsanalyse mit *SacI* und *XbaI* (s. 2.10.1). Nach Kontrolle der gewünschten Insertionsgröße schloss sich eine erneute PCR mit der *pfu* DNA-Polymerase der Firma Promega an der isolierten Plasmid-DNA an (s. 2.6.1). Hier wurde nach einer 5minütigen Denaturierungsphase mit einer Anlagerungstemperatur von 54° C und einer Verlängerungsdauer von 120 Sekunden bei 72° C gearbeitet. Es wurden dieselben Oligonukleotide verwendet wie für die erste PCR (s. o.).

Das entstandene PCR-Produkt wurde mittels *blunt end* Klonierung in den *pENTR/D-TOPO* Vektor des Gateway-TOPO System kloniert (s. 2.7.1). Anschließend wurde das inserierte Promotorstück über eine homologe Rekombination in den T-DNA tragenden Gateway-Vektor *pKGWFS7* mit dem Selektionsmarker Kanamycin inseriert und in kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue Zellen transformiert (s. 2.7.1, 2.10.3f.). Nach Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte die Überprüfung der erwarteten Insertion durch Restriktion mittels *SacII* und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (s. 2.10.1, s.2.6.1). Die Plasmid-DNA mit der erhaltenen DNA-Insertion wurde isoliert und in kompetente Agrobakterien transformiert (s. 2.8f.). Es folgte eine vollständige Überprüfung der inserierten Promotornukleotide durch Sequenzierung (Fa. Seqlab). Dabei wurden die in der T-DNA gelegenen Oligonukleotide *attB1* und *attB2* verwendet (Tab. 2.48, Genkarte des Vektors s. Anhang Abb. 2).

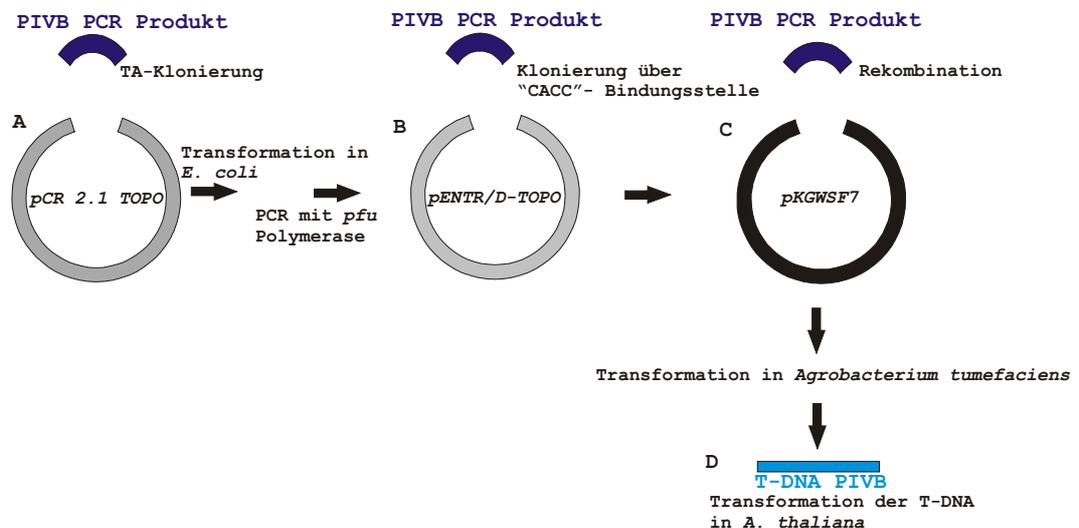


Abbildung 3.25. Schema für die Transformation von PIVB::uidA in *Arabidopsis thaliana*. Die Genkarten der verwendeten Vektoren sind im Anhang dokumentiert, Abb. 1-3

Nach Feststellung der gewünschten Sequenz durch Vergleich mit dem Programm BLAST wurde die T-DNA in die zuvor im Kurztag angezogene *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Columbia 0 Pflanzen transformiert (s. 2.1, 2.2f.). Die Pflanzen wurden nach der Transformation weiter angezogen und die Samen wie unter 2.1 beschrieben geerntet.

Anschließend erfolgte die Aussaat der T₁-Generation auf Selektionsmedium (s. 2.2.1.2). Die gewachsenen Pflanzen wurden bei Bildung von vier bis fünf Blättern in Einheitserde überführt und weiter angezogen. Von circa 4395 geernteten Samen überlebten 15 auf Selektionsmedium, wobei von diesen zwei das Umsetzen in Erde überstanden. Mit den beiden isolierten PIVB::*uidA* Pflanzen wurde im Folgenden weitergearbeitet und eine histologische und quantitative GUS-Analyse durchgeführt (s. 2.17ff.). Als Positivkontrolle dienten PIVA.7 Pflanzen und als Negativkontrolle *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Columbia 0.

3.5.3 Histologischer Nachweis der Regulation von PIVB::*uidA*

Im Folgenden wurden für einen histologischen GUS-Test (s. 2.17.1) zuvor angezogene, bis zu fünf Wochen alte, *Arabidopsis thaliana* PIVB::*uidA* Pflanzen verwendet (s. 2.1). Der transkriptionelle Aktivitätsnachweis durch β -Glucuronidase an Keimlingen ist unter 3.12.4 beschrieben. Für die Aktivität der β -Glucuronidase der PIVB::*uidA* Pflanzen war keine Induktion notwendig. Die Inkubationszeit betrug 17 bis 24 Stunden bei 37° C. Eine endogene β -Glucuronidase-Aktivität des Wildtyps konnte unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Die PIVB::*uidA* Pflanzen weisen eine β -Glucuronidase-Aktivität im Staubblatt auf (Abb. 3.26). Nach Entwicklung der Blüte zeigte sich zunächst eine Färbung in allen Filamenten. Nach dem Wachstum der Narbe an den Staubblättern vorbei verlagerte sich die β -Glucuronidase-Aktivität in die Anthere. Gleichermäßen ging die Aktivität im Filament zurück und beschränkte sich in späteren Stadien auf den Übergang von Filament und Anthere. Die Pollen zeigten in keinem Entwicklungsstadium eine β -Glucuronidase-Aktivität, wohingegen im Blütenboden ab der Entwicklung der Blüte bis zur Ausbildung der Schote stets ein blauer Farbniederschlag zu sehen war. Des Weiteren zeigte sich in der mittleren Blattader der adulten Pflanze eine β -Glucuronidase-Aktivität und keine in der Wurzel (Abb. 3.26). Die β -Glucuronidase-Aktivität in Blatt und Wurzel ist jedoch entwicklungsabhängig (vgl. 3.5.3).

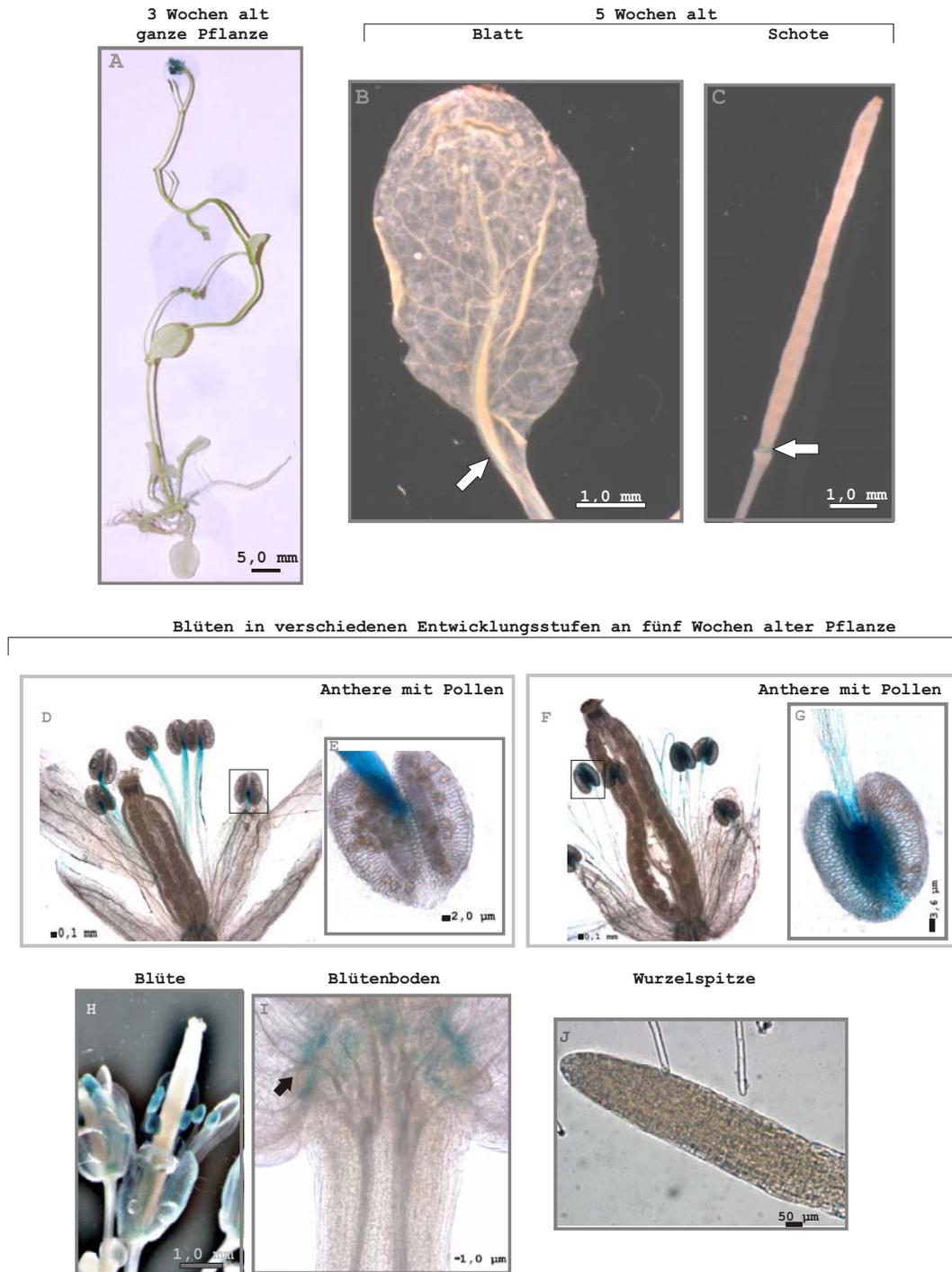


Abbildung 3.26. β -Glucuronidase-Aktivität der *Arabidopsis* PIVB::*uidA* Pflanzen, angezogen bei 23° C 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 9600 lx / m². Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ. Pfeile zeigen die Färbung durch die Aktivität der β -Glucuronidase A) ganze Pflanze, 3 Wochen alt; B-J: 5 Wochen alt: B) Stängelblatt, C) Schote, D) Blüte, E) Anthere, Vergrößerung von D, F) Blüte, G) Anthere, Vergrößerung von F, H) Blüte, I) Blütenboden, J) Wurzelspitze, keine β -Glucuronidase Aktivität nachweisbar

3.5.4 Histologischer und quantitativer Nachweis der Regulation von PIVB::*uidA* bei Auxinzugabe

Die fünf Tage alten Keimlinge zeigten eine durchgängige Färbung der Wurzel, wobei die Wurzelspitze nicht betroffen war, und eine leichte Färbung der Keimblätter (Abb. 3.27). Die β -Glucuronidase-Aktivität der Keimblätter und Blätter nahm bei älteren Pflanzen zu, wie an den zehn Tage alten Keimlingen erkennbar, fiel aber bei älteren Pflanzen wieder ab (vgl. 3.5.3). Bei steigender Auxinkonzentration weisen die Insertionsmutanten von *AtPLA IVB* im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung der Seitenwurzelanzahl auf (s. 3.12.1). Aufgrund dessen wurden zwei PIVB::*uidA* Linien unter denselben Wachstumsbedingungen histologisch und quantitativ untersucht. Die Versuche wurden an zehn Tage alten Pflanzen durchgeführt (vgl. 3.12.1), welche in X-Gluc Lösung inkubiert und beobachtet (s. 2.17.1) wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 17 bis 24 Stunden zeigten die PIVA::*uidA* Pflanzen in allen Auxinkonzentrationen einen ersten blauen Farbniederschlag durch die Aktivität der β -Glucuronidase und die Reaktion wurde gestoppt (s. 2.17.1). Die nachweisbare β -Glucuronidase-Aktivität nahm bei höheren Auxinkonzentrationen kontinuierlich ab (Abb. 3.27). In den Keimblättern war durchgängig eine Blaufärbung zu erkennen, die insbesondere in der äußeren Spitze und in den Blattadern ausgeprägt war (Abb. 3.27). Bei einer Auxinkonzentration von 1,0 $\mu\text{mol/l}$ NAA wurde noch eine minimale Färbung der Keimblätter beobachtet. Des Weiteren wurde in den Haupt- und Seitenwurzeln ein β -Glucuronidase-Aktivität beobachtet, welche sich jedoch nicht bis zur Wurzelspitze zog. Auch die Wurzelhaare zeigten eine leichte Anfärbung. Je höher die zugesetzte Auxinkonzentration war, desto geringer war die β -Glucuronidase-Aktivität. Bereits ab 0,03 $\mu\text{mol/l}$ NAA beschränkte sie sich auf den Zentralzylinder.

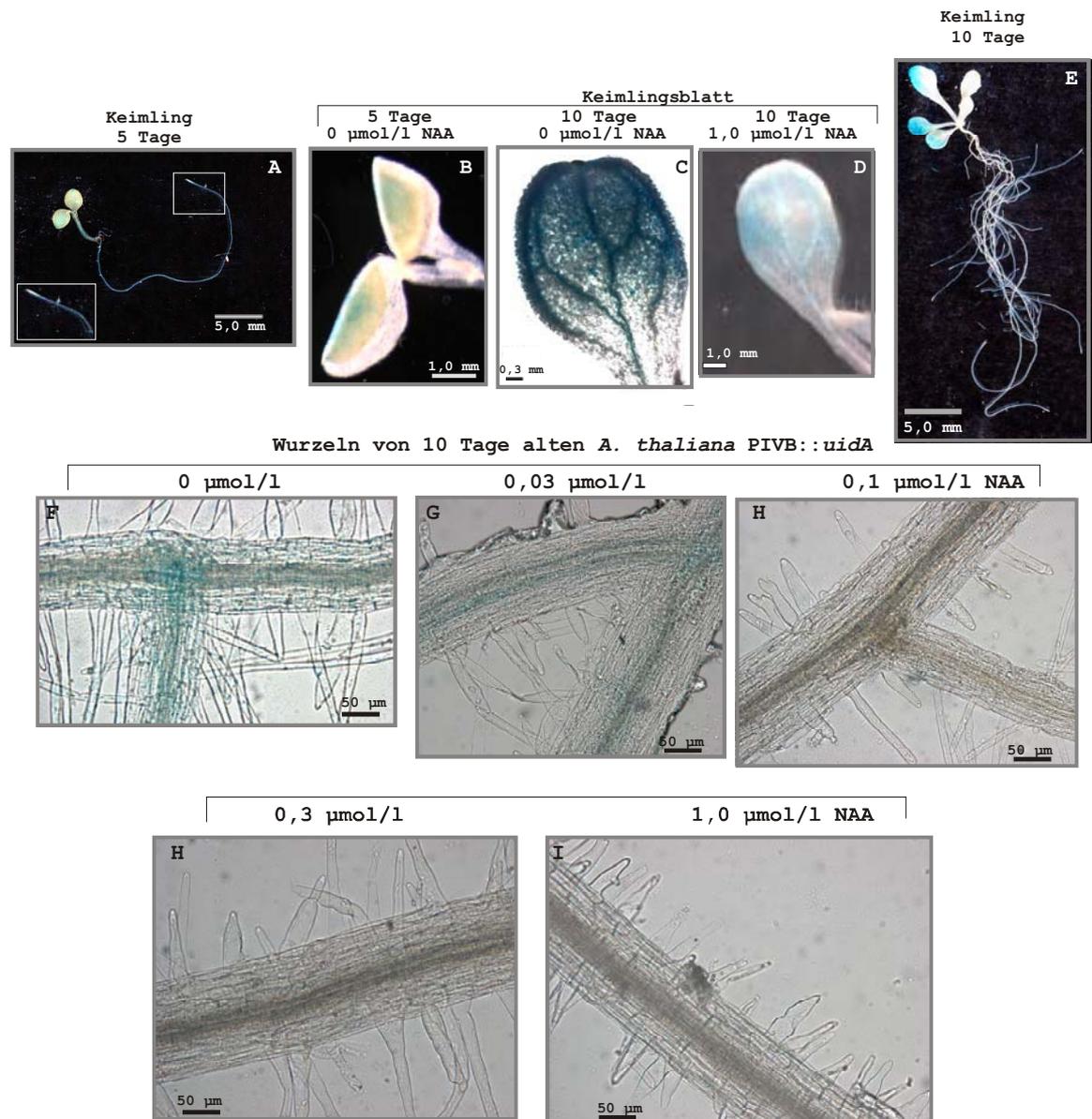


Abbildung 3.27. GUS-Färbung von PIVB::*uidA* Pflanzen in verschiedenen Altersstufen und Wachstum auf Agar mit einer Auxinkonzentrationsreihe. (Anzucht bei: 23° C, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 8000 lx / m²), Inkubationszeit 17 Stunden bei 37° C, n=3. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ. Eine β -Glucuronidase-Aktivität des Wildtyps wurde unter den beschriebenen Bedingungen nicht nachgewiesen. A) Keimling 5 Tage alt, B) Blatt von 5 Tage alter Pflanze, C-I) 10 Tage alte Keimlinge, Wachstum auf einer Auxinkonzentrationsreihe, je 40 Pflanzen wurden getestet, C) 0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Blatt, D) 1,0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Blatt, E) 0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Keimling, F) 0,03 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Wurzel, G) 0,1 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Wurzel, H) 0,3 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Wurzel, I) 1,0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA, Wurzel, Aufnahmen mit Zeiss Axioskop MR-5

Es folgte der quantitative Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität von PIVB.1 und PIVB.2 in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration. Hierzu wurden jeweils 20 Pflanzen auf MS-Agar mit einer Auxinkonzentrationsreihe angezogen (s. 2.4). Es folgte eine Gesamtproteinextraktion und die Bestimmung der Konzentration mittels Bradford-Assay (s. 2.13.3). Der Umsatz des Substrats 4-MUG durch die Aktivität der β -Glucuronidase wurde am Fluorimeter durch Messung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (4-MU) in 30 minütigen Intervallen bis zum Zeitpunkt 90 Minuten bestimmt (Abb. 3.28, s. 2.17.2). Ab diesem Zeitpunkt stagnierte die β -Glucuronidase Aktivität. Es wurden immer 40 μ g Gesamtprotein in den Test eingesetzt und bei 37° C im Dunkeln inkubiert, um die Fluoreszenz nicht herabzusetzen (s. 2.17ff.). Bei Wachstum auf einem auxinhaltigen Agar kam es bereits ab 0,03 μ mol / l NAA zu einem Rückgang der β -Glucuronidase-Aktivität.

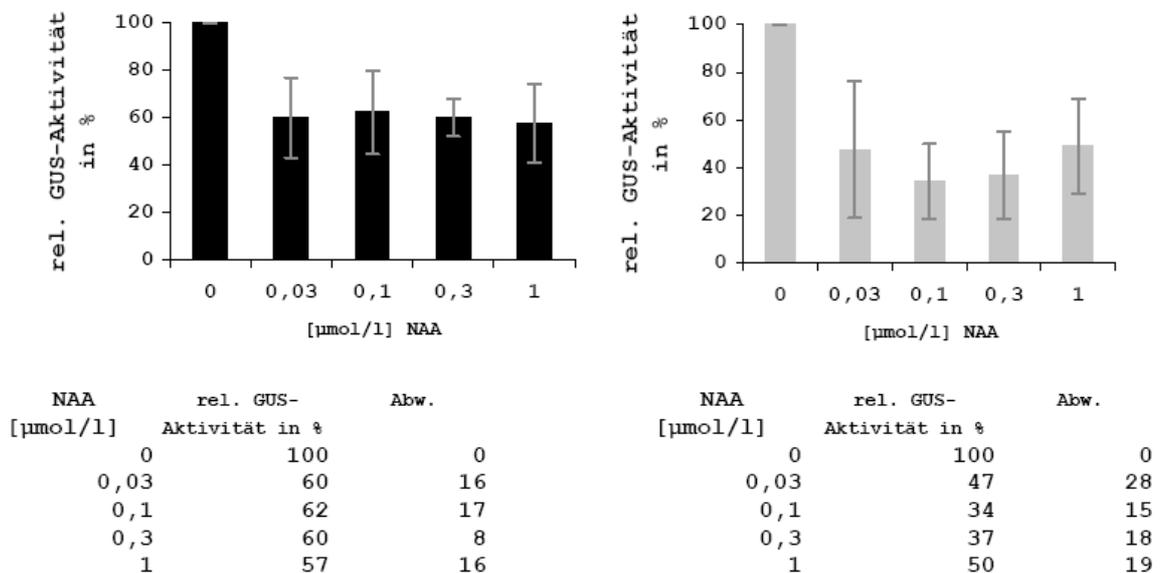


Abbildung 3.28. Quantitative GUS-Analyse von PIVB.1 und PIVB.2 in einer Auxinkonzentrationsreihe von 0; 0,03; 0,1 und 0,3 μ mol / l NAA. Anzucht der Pflanzen für 10 Tage bei 23° C, 18 h Licht / 6 h Dunkelheit, 8000 lx / m². Messung der Fluoreszenz von 4-Methylumbelliferon am Fluorimeter und Umrechnung in relative GUS-Aktivität in Prozent, wobei sich der Wert auf den Umsatz pro μ g Protein und pro Stunde bezieht.

Um unterstützende Indizien für die unterschiedlichen Reaktionen der Insertionslinien und den Promotor::GUS Pflanzen von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* auf exogene Reize zu erhalten, wurden die Promotorsequenzen mittels des Programms PlantCare (ROMBAUTS et al. 1999, LESCOT et al. 2002) mit bekannten *cis*-regulatorischen Promotorsequenzen verglichen. Sowohl in PIVA als auch PIVB wurden eine potentielle TATA-Box und weitere mögliche regulatorische Motive, wie die CAAT-Box und eine potentielle, Transkriptions-verstärkende GC-Box ermittelt. Nur bei PIVB wurden zudem zwei *cis*-regulatorische Elemente entdeckt, welche in der Auxinsignaltransduktion eine Rolle spielen. Das As1-Motiv bei -720 bp, sowie wiederholt bei -1133 bp, wurde 1994 zuerst von LIU und Mitarbeitern im GH3-Promotor der Sojabohne beschrieben. GH3 wird wenige Minuten nach Auxinapplikation transkribiert (GUILFOYLE 1999). As1 gehört zu den *Auxin-responsive elements* (AuxRE) und an diese binden die *Auxin Response Factors* Transkriptionsfaktoren (HAGEN et al. 2002, TIWARI et al. 2003). Ob ein *Auxin Response Factor* die Transkription aktiviert und reprimiert hängt, dabei von der Sequenz und der daraus resultierenden Struktur des jeweiligen *Auxin Response Factor* ab (ULMASOV et al. 1999). Das zweite Element, AuxRR, wurde bei -79 bp ermittelt und 1996 durch SAKAI und Mitarbeiter in Tabak als ein Element beschrieben, welches auf Auxin reagiert. PIVA enthielt jedoch keine Auxin-reaktiven Elemente. Da es sich hierbei um eine rein theoretische Analyse handelt, kann aufgrund der hiermit ermittelten Daten nur spekuliert werden, dass PIVB eine regulatorische Funktion in der Auxinsignalkette hat. Dennoch zeigen sich eindeutige Unterschiede zwischen der Promotorsequenz von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB*.

3.6 Proteinanalyse

Da *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* auf transkriptioneller Ebene analysiert wurden, folgt nun die Analyse der Proteine. Dabei wiesen die beiden ermittelten Nukleinsäuresequenzen von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* eine 88 %ige Homologie der abgeleiteten Aminosäuren auf (Abb. 3.29). Beide Proteine sind 414 Aminosäuren lang und unterscheiden sich bei Vergleich durch das Programm GeneDoc (NICHOLAS und NICHOLAS 1997) durch nur fünf Aminosäuren, welche physikochemisch voneinander abweichende Eigenschaften haben. Weitere 48 abweichende Aminosäuren haben bei IVA und IVB ähnliche physikochemische Eigenschaften. Im hochkonservierten Bereich um das aktive Zentrum der Enzyme (RYDEL et al. 2003) sind nur zwei konservative Austausch zu verzeichnen (Abb. 3.29). Die Nukleinsäuresequenzen liegen in Tandem-Position direkt hintereinander auf dem vierten Chromosom von *Arabidopsis* (KAUL et al. 2000). Beim Vergleich der gesamten, ermittelten Patatin-ähnlichen Genfamilie PLA_2 lässt sich feststellen, dass IVA und IVB phylogenetisch am engsten verwandt sind (Abb. 1.4). Die enzymatischen Eigenschaften des Proteins IVA wurden bereits analysiert (HOLK et al. 2002). In dieser Arbeit wurde das Protein IVB heterolog in *E. coli* exprimiert, um ähnliche oder unterschiedliche Eigenschaften der Enzymaktivität von IVA und IVB zu ermitteln. Außerdem wurde der C-Terminus deletiert, in welchem vier der fünf von IVA physikochemisch abweichenden Aminosäuren lagen. Des Weiteren wurden diese fünf abweichenden Aminosäuren von IVB mutagenisiert, um das Protein somit stärker an IVA anzugleichen. Die entstandenen Enzymvarianten wurden untersucht.

```

      *↓      20      *      40      *
IVA : MENKSPSKKNKPPSCGSLVTILSLDGGGVRGIIAGVILAFLEKQLQELDG : 50
IVB : MENESPSKKNMPPSCGTLVTILSLDGGGVRGIIAGVILAYLEKQLQELDG : 50
      MEN SPSKKN PPSCG3LVTTILSLDGGGVRGIIAGVILASLEKQLQELDG

      60      *      80      *      100
IVA : EEARLADYFDVIAGTSTGGGLVTAMLTVPDETGRHF AAKDIVPFYLEHCP : 100
IVB : EHV RVADYFDVIAGTSTGGGLVTAMLTAPDENGRERFAAKEIVPFYLEHCP : 100
      E R6ADYFDVIAGTSTGGGLVTAMLT PDE GRP FAAK IVPFYLEHCP

      *      120      *      140      *
IVA : KIFPQPTGVLALLPKLPKLLSGPKYSGKYLRNLLSKLLGETRIHQTLTNI : 150
IVB : KIFPQPTGVLALLPKLPKLLSGPKYSGNYLRRTLKLLGETKLRQTLTNV : 150
      KIFPQPTGVLALLPKLPKLLSGPKYSG YLR L KLLGET4L QTLTN6

      160      *      180      *      200
IVA : VIPTFDIKKLOPTIFSSYQLLVDPSLDVKVS DICIGTSAAPTEFFPPHYFS : 200
IVB : VIPTFDIKTLQPTIFSSYQALTDPSLDVKVSDICIGTSAAPTYFPPYYFS : 200
      VIPTFDIK LQPTIFSSYQ L DPSLDVKVSDICIGTSAAPT5FPP YFS

      *      220      *      240      *
IVA : NEDSQGNKTEFNLVDGAVTANNPTLVAMTAVSKQIVKNNPDMGCKLPLGF : 250
IVB : NEDSQGKTRHENLV DGGVTANNPTLVAMTAVTKQIVNNPDMGCTINPLGY : 250
      NEDSQG FNLVDG VTANNPTLVAMTAV3KQIV NNPDMG L PLG5

      260      *      280      *      300
IVA : DRELVISIGTGSTKREEKYSAKKAAKWGII SWLYDDGSTPILDITMESSR : 300
IVB : DQELVISIGTGS AKKEERYSAKKAAKWGII SWLYEDGCTPILDITFESSR : 300
      D FLVISIGTG S K4EE4YSAKKAAKWGII SWLY DG3TPILDIT ESSR

      *      320      *      340      *
IVA : DMIHYHSSVVF KALQSEDKYLRI DDDTLEGDVSTM DLATKSNLENLQKIG : 350
IVB : DIVHYHSSVVF KALQSEDKYLRI DDTLEGDASTL DDLSTKSNLENLTKLG : 350
      D66HYHSSVVF KALQSEDKYLRI DDDTLEGD ST6DL TKS NLENL K6G

      360      *      380      *      400
IVA : EKMLTNRVMQMNIDTGVYEPVAENITNDEQLKRYAKILSDERKLRR LRS : 400
IVB : EKMLTNRVMQMNIDTGTYEPAENINDEQLKREAKILSEERKLRRKRS : 400
      EKMLTNRVMQMNIDTG YEP AENI NDEQLKR5AKILS ERKLRR RSD

      *
      ↓ ↓
IVA : TMIKDSSNESQEI K : 414
IVB : KMIKDSSIGSQEI K : 414
      M KDSS SQEI K

```

Abbildung 3.29. Aminosäuresequenzvergleich der Proteine von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* mittels des Programms GeneDoc. Dargestellt sind die aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen in der Ein-Buchstaben-Abkürzung. Anzahl der Aminosäuren je 414. Die Klammern kennzeichnen die hoch konservierten Sequenzbereiche bei Patatinen, Patatin-ähnlichen Proteinen und iPLA₂s (persönliche Mitteilung G. SCHERER). Der blau umrandete Bereich kennzeichnet den experimentell entfernten C-Terminus in IVB_{CT}. Die Pfeile kennzeichnen die mutagenisierten Aminosäuren in IVB_{mut}.
 IVA: abgeleitete Aminosäuresequenz von *AtPLA IVA*
 IVB: abgeleitete Aminosäuresequenz von *AtPLA IVB*

3.7 Klonierung in das Expressionssystem

Um die Funktion von *AtPLA* IVB näher zu untersuchen, wurden die Eigenschaften des Enzyms untersucht. IVA lag bereits charakterisiert vor (HOLK et al. 2002, RIETZ 2002). Trotz der hohen Homologie zu IVA zeigten erste Untersuchungen des rekombinanten Proteins IVB Unterschiede in den enzymatischen Eigenschaften gegenüber IVA. Aufgrund dessen wurden zwei modifizierte Versionen des Proteins IVB untersucht, sodass insgesamt drei Versionen von IVB untersucht wurden. Die zu exprimierenden Proteine wurden in Anlehnung an ihre Eigenschaften IVB, IVB_{CT} (entfernter C-Terminus, s. 3.7.1) und IVB_{mut} (mutagenisiertes IVB Protein, s. 3.7.2) genannt. Die zu erwartenden molekularen Massen der Proteine zeigt Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5. Molekulare Daten zu den potentiellen rekombinanten Proteinen. Die Kalkulation bezieht sich auf die Größen vom Startmethionin bis zum Stopcodon bzw. bei IVB_{CT} bis zum Sequenzabbruch. In Klammern befindet sich die ermittelte cDNA- bzw. Aminosäuresequenz unter Einbeziehung der mitexprimierten N-terminalen Vektorsequenz.

	<u>Erwartete Größe der cDNA</u>	<u>Anzahl AS</u>	<u>Molekulare Masse [kDa]</u>
IVB	1245 (1275) bp	414 (425)	44,6 (47,1)
IVB _{CT}	972 (1005) bp	324 (335)	35,9 (37,1)
IVB _{mut}	1245 (1275) bp	414 (425)	44,6 (47,1)

Die Konstruktherstellung für IVB_{CT} fand wie unter 3.7.1 beschrieben statt. Für die Expression von IVB_{mut} wurde die cDNA von *AtPLA* IVB mutagenisiert (s. 3.7.2). IVB lag bereits im *pQE-30* Vektor vor und die PLA-Eigenschaften des Enzyms waren durch Analyse der Inkubationsdauer und des pH-Optimums bereits nachgewiesen (OPPERMANN 2001).

3.7.1 Konstruktherstellung von *AtPLA* IVB_{CT}

Zur Klonierung wurde der Vektor *pQE-30* der Firma Qiagen verwendet (s. 2.10, Genkarte s. Anhang Abb. 4). Dieser Vektor hat die Codons für sechs Histidine, die an der N-terminalen Region des zu exprimierenden Proteins lokalisiert sind, sodass dieses Protein bei Expression in *E. coli* XL1-Blue durch Imidazol nativ eluiert werden konnte (s. 2.13.1). Um die induzierbare Expression des Proteins zu erreichen, wurde ein 5' Oligonukleotid verwendet, welches direkt hinter dem Startcodon lag, um so eine Ligation mit dem Expressionsvektor *pQE-30* im korrekten Leseraster zu ermöglichen. Das 3' Oligonukleotid der cDNA von IVB_{CT} beginnt direkt nach der konservierten Aminosäuresequenz „YLRID“, sodass die Sequenz mit diesem Motiv als C-Terminus endete. Auf diese Weise wurden vier der fünf am meisten voneinander abweichenden Aminosäuren deletiert (Abb. 3.29). Zusätzlich hatten diese Oligonukleotide an den Enden Restriktionsschnittstellen, welche in der Polylinkerregion des *pQE-30* vorkommen. Diesen Oligonukleotiden (5' IVB_{CT}Ex und 3' IVB_{CT}Ex, Tab. 2.41) wurden die Restriktionsschnittstellen SacI und PstI angehängt, welche in der Polylinker-Region des *pQE-30* Expressionsvektors der Firma Qiagen zu finden sind (Abb. 3.30). Diese Schnittstellen kamen weder in der inserierten cDNA vor, noch wurde das Leseraster durch die Oligonukleotide verschoben. An die Restriktionsschnittstellen wurden jeweils ein bis mehrere Nukleotide angehängt, um die Effektivität der Restriktionsenzyme heraufzusetzen (Tab. 2.41). Das Startmethionin wurde nicht amplifiziert, da der Vektor vor dem 6 x His-Tag ein eigenes Startmethionin besitzt (Abb. 3.30). Die Amplifikation von IVB_{CT} fand an der isolierten Plasmid-DNA statt, welches bereits das Vektorkonjugat *pQE-30/AtPLA* IVB enthielt (OPPERMANN 2001, s. 3.3), Hierzu wurde die DyNazyme Ext Polymerase der Firma Biometra verwendet, welche eine *proof reading* Funktion hat, um Fehler während der Amplifikation zu vermeiden (s. 2.6). Es wurde nach einer primären Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 94° C mit einer Anlagerungstemperatur von 56° C und einer Elongationszeit von 90 Sekunden (30 Zyklen) gearbeitet. Die Amplifikation wurde mit einer 10minütigen Inkubation bei 72° C abgeschlossen. Für die PCR wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die erwarteten Sequenzgröße zeigt Tabelle 3.5.

Nach der Amplifikation von *AtPLA* IVB_{CT} wurden das PCR-Produkt und der *pQE-30* Vektor (Fa. Qiagen) gereinigt (s. 2.6.2) und über Nacht mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *PstI* verdaut (s. 2.10.1). Anschließend wurden Vektor und Insert erneut gereinigt, um die verdauten Enden zu entfernen und miteinander zu konjugieren (s. 2.10.2). Es folgte eine Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue (s. 2.10.3, s. 2.10.4). Die Zellen wurden auf 1,0 %igen LB-Agarplatten (50 µg / ml Ampicillin, Tab. 2.16) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf das rekombinante Plasmid überprüft, indem an den gewachsenen und vermutlich transformierten Kolonien eine PCR durchgeführt wurde (s. 2.6). Die Sequenz des 5' Oligonukleotids namens Promotor Region lag hierfür in der Vektorsequenz (Abb. 3.30). Das 3' Oligonukleotid war mit dem der Amplifikation der *AtPLA* IVB-cDNA identisch. Zusätzlich wurden die rekombinanten Plasmide isoliert, und mittels Restriktionsanalyse durch die Enzyme *SacI* und *PstI* (s. 2.10.1) auf die inserierte cDNA in erwarteter Größe überprüft (ohne Abbildung). Die Sequenzierung des Amplifikationsprodukt fand in 5' Richtung mit dem Oligonukleotid Type III/IV durch die Firma SeqLab statt und ergab die erwartete Sequenz (Abb. 3.30). Dabei wurde das Programm BlastN für den Nukleinsäuresequenzvergleich (MCGINNIS et al. 2004) und das Programm BlastX (ALTSCHUL et al. 1997) für den Aminosäuresequenzvergleich verwendet.

```

1           CACATTTCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA
                Promoter Region
51  TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCACC TCGAGAAAT
111 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
171 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAGA
                Type III/IV                                Startmethionin
231 GGATCGCATC ACCATCACCA TCACGGATCC GCATGCGAGC TCGGTACCCC GGGTCGACCT
                6 x His-Tag                                Polylinker
291 GCAGCCAAGC TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG

```

Abbildung 3.30. Abgebildet ist ein Teil der Gesamtsequenz des *pQE-30* (gesamt 3461 bp). Die Sequenzieroligonukleotidsequenzen, 6 x Histidin und die Polylinker-Region sind farbig unterlegt. Die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *PstI* sind blau gekennzeichnet.

3.7.2 Mutagenisierung von IVB

Um IVB der Aminosäuresequenz von IVA anzunähern, wurden fünf Aminosäuren von IVB mutagenisiert und an IVA angepasst. Die Nukleinsäuresequenz von *AtPLA* IVB wurde im Konjugat auf solche Weise mutagenisiert, dass bei IVB_{mut} fünf Aminosäuren verändert vorlagen. Jede Punktmutation wandelte eine stark polare Aminosäure in eine hydrophobe oder umgekehrt. Für die Mutagenisierung des *pQE-30 / AtPLA* IVB cDNA-Konstrukts durch den *Site Directed Mutagenesis* Kit der Fa. Stratagene wurde die Plasmid-DNA *pQE-30/AtPLA* IVB cDNA verwendet und aus *Escherichia coli* XL1-Blue isoliert (s. 2.12.1, s. 2.11). Für die Mutagenisierung wurde die isolierte Plasmid-DNA mittels einer *proofreading* Polymerase (*Pfu*-Turbo, Fa. Stratagene) vollständig amplifiziert (s. 2.11). Die verwendeten Oligonukleotide lagerten sich direkt komplementär an der Plasmid-DNA an und trugen durch Austausch von Einzel-nukleotiden die gewünschten Punktmutationen. Die Mutagenisierung fand in vier einzelnen Amplifikationsschritten statt (Tab. 3.6), wobei nach jeder Amplifikation das PCR-Produkt zuerst mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut wurde (s. 2.11). Dies führte zum Verdau der durch den Wirtstamm XL1-Blue methylierten, parentalen Plasmid-DNA. Auf diese Weise wurde nur das Amplifikationsprodukt isoliert und konnte in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert werden (s. 2.11). Die über Nacht bei 37° C auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien wurden auf das Plasmid überprüft (s. 2.12.1). Die Mutagenisierung wurde ab der zweiten Runde vom C-Terminus aus begonnen, da es Überschneidungen in dem zu mutierenden Bereich gab. Nach jeder Mutationsrunde fand eine Sequenzierung der inserierten cDNA am isolierten Plasmid (Fa. Seqlab, Göttingen) statt. Die Sequenzierung wurde vom 5'Ende mit dem Oligonukleotid namens Promoter Region (Tab. 2.43, Abb. 3.30) und vom 3'Ende mit dem Oligonukleotid Reverse Sequencing (Tab. 2.43) durchgeführt, sodass der Übergang von Plasmid-DNA und inserierter cDNA überprüft werden konnte (siehe Abb. 3.30). Die erhaltenen Sequenzen wurden nach jeder Amplifikationsrunde mittels des Programms BLAST mit der cDNA von *AtPLA* IVB verglichen, um die Mutationen nachzuweisen und zu zeigen, dass keine ungewünschte Veränderung der Basen stattgefunden hat (s. 2.6).

Von Kolonien mit dem gesuchten Vektorkonstrukt wurden Dauerkulturen angelegt (s. 2.12). Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert, um die nächste Mutagenisierung zu ermöglichen (s. 2.12.1). Dieses Prozedere wurde viermal wiederholt, bis die gewünschten Mutationen vorhanden waren (Tab. 3.6). Dabei wurden in jedem Mutagenisierungsschritt 0,5 Minuten bei 95° C predenaturiert, um dann die Plasmid-DNA für 16 Zyklen 9,6 Minuten bei 68° C zu verlängern und die Oligonukleotide bei einer Temperatur zwischen 70° C und 80° C für eine Minute anzulagern. Die Anlagerungstemperaturen und die Oligonukleotidsequenzen der einzelnen Mutagenisierungsschritte finden sich in Tabelle 2.42. Nach Abschluss der Mutagenisierung ließ sich die cDNA in *E. coli* nicht exprimieren. Da es möglich war, dass die viermalige Amplifikation der Vektor-DNA zu einer Veränderung der Nukleotide im Vektor geführt haben könnte, wurde die inserierte cDNA mittels der vorhandenen Schnittstellen durch die Restriktionsenzyme PstI und SacI aus dem Vektor isoliert und in einen gleich behandelten *pQE-30* legiert (s. 2.10 ff.). Diese cDNA-Insertion wurde erneut durch die Firma SeqLab in Göttingen überprüft. Die Kombination des neuen Vektors und der mutierten cDNA von *AtPLA IVB* wurde für die Expression des rekombinanten Enzyms erfolgreich herangezogen.

Tabelle 3.6 zeigt die zu ändernden Aminosäuren in IVB. Die Reihenfolge in der Tabelle entspricht der Reihenfolge der angefertigten Mutagenisierungsschritte. Der T_m -Wert entspricht der Anlagerungstemperatur bei der jeweiligen PCR.

	<u>Position</u> <u>der AS</u>	<u>Aminosäure</u> <u>in IVB</u>	<u>Aminosäure</u> <u>in IVA</u>	<u>GC-Gehalt der</u> <u>Oligonukleotide</u>	<u>Oligonukleotid-</u> <u>T_m</u>
1. Mutation	11	M: ATG	K: AAG	58,1 %	80,3° C
2. Mutation	408	I: ATC	G: GGA	35,3 %	70,25° C
	409	N: AAC	E: GAA		
3. Mutation	397	K: AAA	L: TTA	40,0 %	72,8° C
4. Mutation	347	I: ATA	Q: CAA	35,3 %	70,2° C

3.8 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Nach erfolgreicher Prüfung der korrekten cDNA-Insertion wurden IVB, IVB_{CT} und IVB_{mut} exprimiert. Für einige Versuche wurde auf das Protein IVA als Kontrolle zurückzugegriffen, welches auf dieselbe Weise mit 6 x Histidin-Tag isoliert wurde wie die anderen Enzyme (HOLK et al. 2002). Wie in Abschnitt 2.13ff. erläutert, erfolgte die Induktion der Expression über IPTG. Über Nacht wurden 50 ml der *pQE-30* haltigen Bakterienkultur bis zu einer Optischen Dichte von 0,6-0,8 in LB-Nährmedium (inkl. 100 µg / ml Ampicillin) angezogen. In 120 ml frisches Nährmedium mit gleicher Antibiotikumkonzentration wurden 0,5 ml der Übernachtskultur überimpft. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer Optischen Dichte von 0,6-0,8 angezogen. Um eine Probe von nicht-induzierten Bakterien zu haben, wurden 500 µl der Zellsuspension abgenommen und zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 250 µl 2 x SDS Puffer versetzt. 20 µl davon wurden auf das SDS-Gel aufgetragen (Bezeichnung: Sediment ohne IPTG-Induktion). Die übrigen plasmidhaltigen Zellen wurden nach einer Inkubation mit 0,5 mmol / l IPTG abzentrifugiert und in 3,5 ml Lysispuffer gelöst, um anschließend durch einen Homogenisator aufgeschlossen zu werden. Durch Zentrifugation kam es zur Abtrennung der löslichen Proteine von den Membranbruchstücken (Bezeichnung: Sediment nach IPTG-Induktion; Überstand / lösliche Proteine). Der dabei entstandene Überstand wurde mit Ni²⁺-NTA versetzt. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit den Ni²⁺-NTA gebundenen Proteinen mit 5 ml Waschpuffer zweimal gewaschen (Bezeichnung: Waschschrift 1 und 2). Das Sediment wurde mit Elutionspuffer versetzt, zentrifugiert und der Überstand mit den nativ isolierten Proteinen aufbewahrt (Bezeichnung: Eluat).

Die erwartete Größe von IVB lag bei 47,1 kDa (vgl. Tab. 3.2). Durch einen Vergleich der Retentionsfaktoren (R_f) konnte im Eluat das exprimierte IVB in der erwarteten Größe von 47 kDa identifiziert werden (Abb. 3.31, Pfeil). IVB wurde nur nach IPTG-Induktion exprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden Proteinmengen im Sediment und im Überstand nachgewiesen. Nach zweimaligem Waschen waren die Waschfraktionen frei von Proteinen, wobei möglicherweise auch ein Teil des Proteins IVB mitausgewaschen wurde, da eine prominente Bande von gleichem Molekulargewicht im Überstand auftrat.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration von IVB (s. 2.13.3) wurde mit 0,5 μg Enzym ein Enzymtest durchgeführt (s. 2.13, s. 2.13.3).

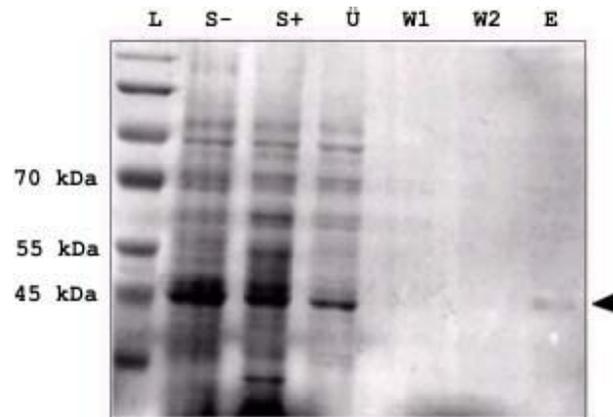


Abbildung 3.31. Expression und Reinigung des Proteins von *AtPLA* IVB cDNA mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Eines von neun repräsentativen Experimenten ist abgebildet. Es wurde ein 10 % Polyacrylamidgel angefertigt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt, um das exprimierte Protein von IVB im Eluat nachzuweisen. Der Pfeil deutet auf die Bande des exprimierten Proteins. Zum Erhalt der Fraktion S- wurden 500 μl der Bakteriensuspension abzentrifugiert und mit 250 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Für S+ wurden circa 3 μl des Sediments nach der Induktion mit IPTG mit 20 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Bei den weiteren Fraktionen wurden 10 μl abgenommen und mit 10 μl 2 x SDS Puffer vermengt. Es wurden jeweils 20 μl der Probe aufgetragen.

L: 10 -160 kDa Proteinleiter (Fa. MBI Fermentas), Probenauftrag 7 μl

S-: Sediment / abzentrifugierte Zellbestandteile vor IPTG-Induktion

S+: abzentrifugierte Zellbestandteile nach 30 min Induktion mit 1,0 mmol / l IPTG

Ü: Überstand / lösliche Proteine nach 30 min Induktion mit 1,0 mmol / l IPTG

W1: 1. Waschschrift der löslichen Proteine zur Entfernung überschüssiger Proteine

W2: 2. Waschschrift der löslichen Proteine zur Entfernung überschüssiger Proteine

E: Eluat, Fraktion mit gereinigtem Protein

Das Enzym mit dem deletierten C-Terminus wurde auf dieselbe Weise isoliert wie IVB. Die erwartete Größe von IVB_{CT} lag bei 37,1 kDa (vgl. Tab. 3.5). Durch Vergleich der R_{F} -Werte konnte IVB_{CT} im Eluat bei 37 kDa identifiziert werden (Abb. 3.32, Pfeil). Das Protein wurde nur nach IPTG-Induktion exprimiert. Nach dem Zellaufschluss waren Proteine im Sediment zu finden. Die Waschsubstanz war nach zweimaligem Waschen frei von Proteinen. Nach Feststellung der erwarteten Größe des exprimierten Proteins, wurde mit 0,5 μg Enzym, dessen Konzentration in einem Bradford-Assay bestimmt wurde, ein Enzymtest durchgeführt (s. 2.13, s. 2.13.3).

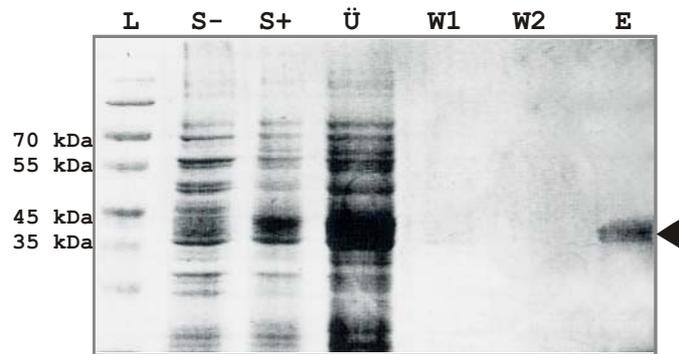


Abbildung 3.32. Expression und Reinigung von *AtPLA IVB_{CT}* cDNA mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Eines von fünf repräsentativen Experimenten ist abgebildet. Es wurde ein 10 % Polyacrylamidgel angefertigt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt, um das exprimierte von *IVB_{CT}* im Eluat nachzuweisen. Der Pfeil deutet auf die Bande des exprimierten Proteins. Bei S- wurden 500 μl der Bakteriensuspension abzentrifugiert und mit 250 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Für S+ wurden circa 3 μl Sediment mit 20 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Bei den übrigen Fraktionen wurden 10 μl abgenommen und mit 10 μl 2 x SDS Puffer vermischt. Von den Proben wurden je 20 μl aufgetragen.

L: 10 -160 kDa Proteinleiter (Fa. MBI Fermentas), Probenauftrag 7 μl

S-: Sediment / abzentrifugierte Zellbestandteile vor IPTG-Induktion

S+: Sediment / zentrifugierte Zellbestandteile, 30 min 0,5 mmol / l IPTG-Induktion

Ü: Überstand / lösliche Proteine nach 30 min 1,0 mmol / l IPTG-Induktion

W1: 1. Waschschrift der löslichen Proteine zur Entfernung überschüssiger Proteine

W2: 2. Waschschrift der löslichen Proteine zur Entfernung überschüssiger Proteine

E: Eluat, Fraktion mit gereinigtem Protein

Das mutagenisierte Enzym wurde auf dieselbe Art und Weise isoliert wie *IVB* und *IVB_{CT}*. Die erwartete Größe von *IVB_{mut}* lag bei 47,1 kDa (vgl. Tab. 3.5). Durch Vergleich der R_f -Werte konnte im Eluat *IVB_{mut}* in der erwarteten Größe von 47 kDa identifiziert werden (Abb. 3.3, Pfeil). Nach zweimaligem Waschen war die Waschsubstanz frei von Proteinen. Im Eluat war das gesuchte Protein zu erkennen. Nach Feststellung der erwarteten Größe des exprimierten Proteins, wurde mit 0,5 μg Enzym, dessen Konzentration in einem Bradford-Assay bestimmt wurde, ein Enzymtest durchgeführt (s. 2.13, s. 2.13.3).

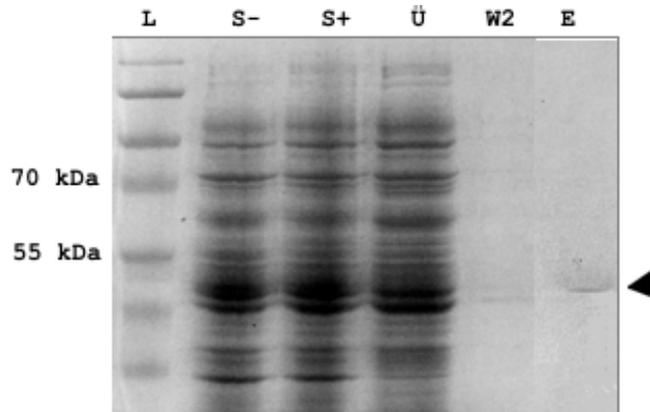


Abbildung 3.33. Expression und Reinigung von *AtPLA IVB_{mut}* cDNA mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Eines von vier repräsentativen Experimenten ist abgebildet. Es wurde ein 10 % Polyacrylamidgel angefertigt und mit Coomassie Brillantblau gefärbt, um das exprimierte Protein *IVB_{mut}* im Eluat nachzuweisen. Der Pfeil deutet auf die Bande des exprimierten Proteins. Bei S- wurden 500 μl der Bakteriensuspension abzentrifugiert und mit 250 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Für S+ wurden circa 3 μl Sediment mit 20 μl 2 x SDS Puffer versetzt. Von den weiteren Fraktionen wurden 10 μl abgenommen und mit 10 μl 2 x SDS Puffer vermengt. Von den Proben wurden je 20 μl aufgetragen.

L: 10 -160 kDa Proteinleiter (Fa. MBI Fermentas), Probenauftrag 7 μl

S-: Sediment / abzentrifugierte Zellbestandteile ohne IPTG-Induktion

S+: Sediment / abzentrifugierte Zellbestandteile nach 30 min 1,0 mmol / l IPTG-Induktion

Ü: Überstand / lösliche Proteine nach 30 min 0,5 mmol / l IPTG-Induktion

W2: 2. Waschschrift der löslichen Proteine zur Entfernung überschüssiger Proteine

E: Eluat, Fraktion mit gereinigtem Protein

3.9 Enzymatische Eigenschaften von *IVB*, *IVB_{CT}* und *IVB_{mut}*

Zur Ermittlung der Enzymcharakteristik der isolierten Proteine wurde ein Enzymtest (s. 2.16.1, s. 2.16.3) durchgeführt und dieser in Dünnschichtchromatogrammen analysiert (s. 2.16.2). Im Enzymtest wurden als Substrat Liposomen aus einer Mischung von Soja-Phosphatidylcholin und bis-BODIPY-Phosphatidylcholin verwendet (s. 2.16f.). bis-BODIPY-Phosphatidylcholin(PC) ist ein an beiden Fettsäuren derivatisiertes Phospholipid, welches im UV-Licht fluoresziert. Je nach Versuchsanordnung fanden verschiedene bis-BODIPY-Derivate Anwendung. Wenn nicht anders angegeben handelte es sich in den Diagrammen stets um bis-BODIPY-PC. Die Metaboliten von Phospholipase A sind Lysophosphatidylcholin und Fettsäure, deren fluoreszierende Banden mittels bekannter Vergleichssubstanzen im Dünnschichtchromatogramm identifiziert wurden (s. 2.16.2).

Anhand des Chromatogramms konnte keine Differenzierung zwischen der Phospholipase des A₁- oder A₂-Typs stattfinden, da beide die Abspaltung von Fettsäure katalysierten, wenn auch an *sn1*- bzw. *sn2*-Position des Phospholipids. Die dabei entstandenen unterschiedlichen Lysophospholipide sind mittels einer Dünnschichtchromatographie nicht trennbar. Um auszuschließen, dass die gemessene Enzymaktivität durch eluierte Bakterienproteine hervorgerufen wurde, wurden als Negativkontrolle Bakterien mit dem Expressionsvektor *pQE-30* ohne inserierte cDNA aufgearbeitet und über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Dieses Eluat wurde dann ebenfalls im Enzymtest eingesetzt. Als Blindwert dienten Liposomen ohne Enzymzusatz um auszuschließen, dass es zu einer vermeintlichen Aktivität aufgrund von chemisch zersetztem bis-BODIPY kam. Diese relative Fluoreszenz des Blindwerts wurde von der Fluoreszenz des Enzymumsatzes subtrahiert. Die Differenz entsprach der Enzymaktivität.

3.9.1 Analyse der Enzymeigenschaften von IVB

Die folgende Abbildung zeigt die enzymatische Aktivität von IVB in einem Dünnschichtchromatogramm. Der Nachweis der Aktivität der Präparation bestand bereits (OPPERMANN 2001). Im Folgenden wurde die Enzymcharakteristik von IVB näher analysiert und mit der von IVA verglichen (HOLK et al. 2002). Das Eluat von Bakterien mit dem Expressionsvektor *pQE-30* ohne inserierte cDNA wurde genauso hergestellt wie das Eluat von IVB (s. 2.16ff.) und zeigte keine enzymatische Aktivität. Die gereinigte Präparation von IVB wies eine PLA-Aktivität auf, da Hydrolyse von bis-BODIPY-PC in Fettsäure und Lysophosphatidylcholin stattfand (Abb. 3.34). Die Identifizierung der bis-BODIPY-PC Metaboliten fand im Vergleich zu aufgetragenen Standards von Fettsäure und Diacylglycerin statt (s. 2.16.2). Um festzustellen, ob IVB eine Präferenz für die Fettsäure an der *sn2*-Position des Glycerins hat, wurde β -BODIPY-PC als Substrat verwendet, das nur eine fluoreszierende Fettsäure in der *sn2*-Position hat (Abb. 3.34). Auch hier war ein Umsatz in die fluoreszierenden Metaboliten Fettsäure und Lysophospholipid zu beobachten. Da fluoreszierendes Lysophospholipid in diesem Fall nur das an der *sn2*-Position veresterte Produkt sein kann, musste das Enzym sowohl PLA₁-, als auch PLA₂-Aktivität haben.

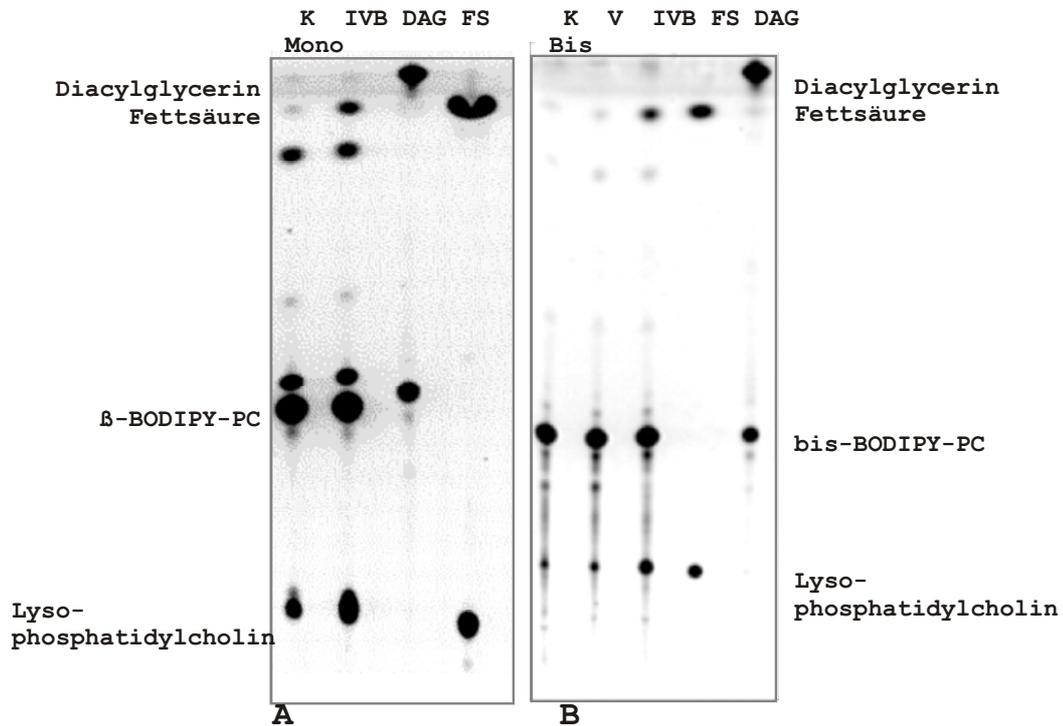


Abbildung 3.34. Nachweis der PLA-Aktivität von IVB. Für die Dünnschichtchromatogramme betrug die Laufzeit 90 min. 100 μ l aus der gesamten Chloroformfraktion von 150 μ l wurden für das Dünnschichtchromatogramm eingesetzt.

A) Nachweis der Aktivität von IVB mit β -BODIPY-PC als Substrat.

K Mono: Blindwert, 0 μ g Enzym, 3 μ g Liposomen mit β -BODIPY-PC

IVB: 0,5 μ g Protein IVB, 3 μ g Liposomen mit β -BODIPY-PC

DAG: Diacylglycerinstandard FS: Fettsäurestandard, Probenauftrag je 3 μ l

B) Nachweis der Aktivität von IVB und der Ausschluss der Aktivität von Bakterienproteinen mit bis-BODIPY-PC als Substrat.

K Bis: Blindwert, 0 μ g Enzym, 3 μ g Liposomen mit bis-BODIPY-PC

V: 0,5 μ g Protein aus Bakteriensuspension mit *pQE-30* Vektor ohne inserierte cDNA, 3 μ g Liposomen mit bis-BODIPY-PC

IVB: 0,5 μ g Protein IVB, 3 μ g Liposomen mit bis-BODIPY-PC

FS: Fettsäurestandard; DAG: Diacylglycerinstandard, Probenauftrag je 3 μ l

Aus den bisherigen Erfahrungen mit Patatin-ähnlichen PLAs wurden zuerst das pH-Optimum, die Linearität der Kinetik und der Einfluss von Calcium und Magnesium auf die Aktivität festgestellt. In den folgenden Abbildungen sind die Auswertungen der Dünnschichtchromatogramme dargestellt (s. 2.16.2). Die Auswertung bezieht sich jeweils auf den Umsatz der fluoreszierenden Phospholipids in Fettsäure, da diese besser aufgetrennt wurde als Lysophosphatidylcholin.

Um verschiedene Versuche miteinander verrechnen zu können, wurde bei Versuchen mit Hemmstoffen der maximale Umsatz ohne Inhibitor als 100 %ige Aktivität festgelegt. Die Eigenschaften der Hemmstoffe sind in 2.16.1 beschrieben.

Durch Vorversuche, bei denen mit 30, 60 und 90 Minuten Inkubationsdauer und verschiedenen pH-Werten gearbeitet wurde, zeigte der Umsatz bei 60 Minuten die optimale Reaktionsdauer für die Vergleichsbestimmung. Aufgrund der Spannbreite der pH-Reihe mussten unterschiedliche Puffer verwendet werden, welche unter 2.16.1, Tabelle 2.29 angegeben sind. Der Einfluss der Puffersubstanzen auf die Aktivität wurde berücksichtigt, indem bei Übergängen zwischen zwei Puffern beide mit demselben pH-Wert eingesetzt wurden. Wie bereits unter 2.16.1 erwähnt, unterscheidet sich der im Puffer eingestellte vom effektivem pH-Wert des Tests. In der Darstellung wurde der effektive pH-Wert des Tests verwendet.

IVB hatte bei einem pH-Wert von 7,3 in 25 mmol / l HEPES/ KOH-Puffer die höchste Aktivität. Im Folgenden wurde mit diesem Puffer gearbeitet, um die Enzyme näher zu charakterisieren. Vorversuche hatten gezeigt, dass das Enzym Calciumchlorid für seine Aktivität benötigt. Die höchste Aktivität wurde bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{mol} / \text{l}$ Calciumchlorid erzielt, wobei das Optimum bei 500 $\mu\text{mol} / \text{l}$ lag. Im Folgenden wurde mit einer Konzentration von 1000 $\mu\text{mol} / \text{l}$ gearbeitet, zumal da IVA bereits mit dieser Calciumkonzentration analysiert wurde und IVB mit IVA verglichen werden sollte. Parallel den Tests mit einer Calciumchlorid-Konzentrationsreihe wurde anschließend eine Magnesiumchlorid-Konzentrationsreihe durchgeführt. So wurde bestimmt, ob die enzymatische Aktivität von IVB auf Calcium- oder die Magnesium-Ionen zurückzuführen war. Dabei wurde eine Abhängigkeit von Calcium-Ionen *in vitro* und gleichzeitig eine Calcium-spezifische Aktivierung ermittelt. Ohne Calcium wurde bereits eine circa 20%ige Aktivität erzielt (Abb. 3.35 A-D).

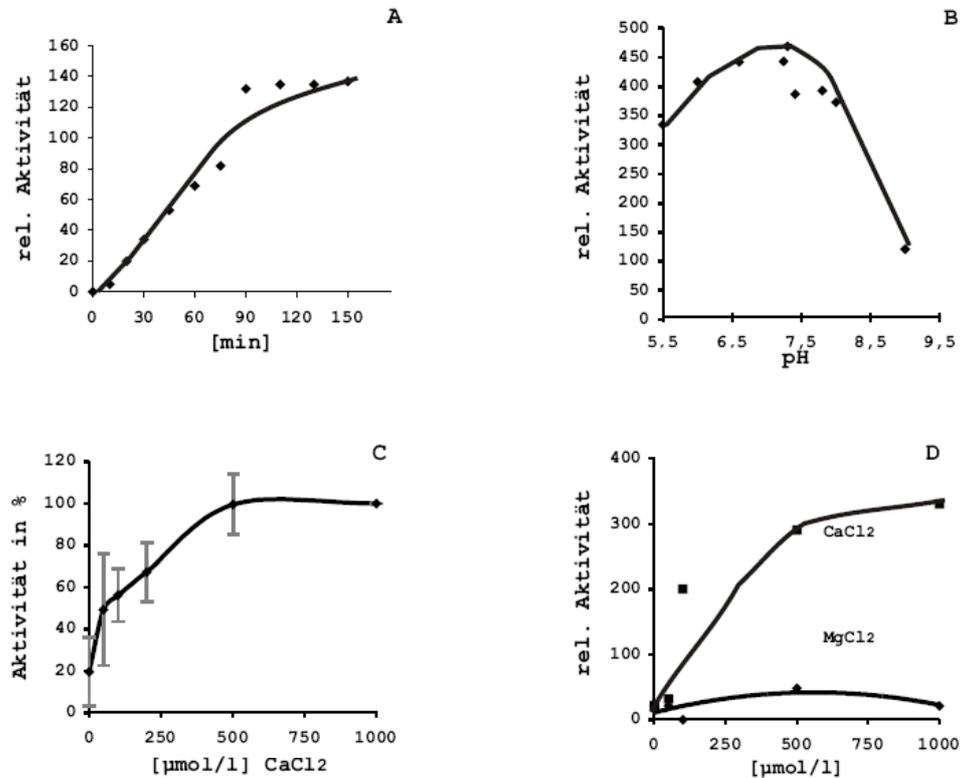


Abbildung 3.35. Ermittlung optimaler Versuchbedingungen zur Analyse von IVB.

Auswertungen der Dünnschichtchromatogramme mittels ScanPack II. Die Aktivität bezieht sich auf relative Fluoreszenz der entstandenen Fettsäure. Die Inkubationstemperatur betrug 33° C im Wasserbad. Laufzeit des Chromatogramms jeweils 90 min, es wurden jeweils 100 µl Probe der Gesamtchloroformfraktion von 150 µl aufgetragen.

A) Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer von 60 Minuten, n= 3, das gezeigte Experiment ist repräsentativ,

B) Ermittlung des pH-Optimums. Dieses lag beim pH von 7,3 unter Verwendung von 25 mmolarem HEPES /KOH Puffer, n=2, das gezeigte Experiment ist repräsentativ,

C) Calciumchlorid-Abhängigkeit. Die optimale Aktivität wurde bei 500 µmol / l CaCl₂-Zusatz erreicht, n=4, das gezeigte Experiment ist repräsentativ,

D) Vergleich der Calcium-Abhängigkeit und der MgCl₂-Abhängigkeit *in vitro*, n=3, das gezeigte Experiment ist repräsentativ.

Aufgrund dieser Versuche wurden alle folgenden Enzymtests des Enzym IVB mit den ermittelten Versuchsbedingungen als Standardbedingungen untersucht. Im Folgenden wurde dann die Wirkung von den zugesetzten Hemmstoffen auf die Aktivität von IVB ermittelt (Abb. 3.36 E-K).

Arachidonyltrifluoromethylcarbon (AACOCF₃) zeigt bei 40 µmol / l eine halb maximale Hemmung der enzymatischen Aktivität, während die von 5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid (ETYA) bei circa 5 µmol / l liegt. Tetrahydro-3-(1-naphtalenyl)-2H-pyran-2-on (HELSS) hemmte IVB weder bei der Verwendung von bis-BODIPY-PC noch bei BODIPY-FL DHPE. Die Aktivität von IVB wurde ab 25 µmol / l Nordihydroguajaretsäure (NDGA) gehemmt, wobei bis 100 µmol / l nur eine schwache Hemmung beobachtet wurde. Die halb maximale Hemmung des Enzyms IVB durch Palmitoyltrifluoromethylketone (PACOCF₃) lag bei circa 70 nmol / l.

Obwohl das Enzym IVA *in vitro* sehr ähnliche Sensitivität wie IVB gegen die Inhibitoren PACOCF₃, ETYA, und AACOCF₃ zeigte, wurde es durch NDGA deutlich stärker gehemmt (halb maximale Hemmung bei 15 µmol / l). Auffällig war, dass das Enzym IVB gegenüber HELSS insensitiv was, während IVA durch HELSS gehemmt wurde (halb maximale Hemmung bei 200 nmol / l, HOLK et al. 2002). Vor allem ist HELSS ein Hemmstoff der an das katalytische Serin der, zu den Patatin-ähnlichen PLAs der Pflanzen homologen, Calcium-unabhängigen PLA₂s bindet (BALSINDE et al. 1999). Dadurch unterscheidet es sich von den cPLA₂s des Tierreichs.

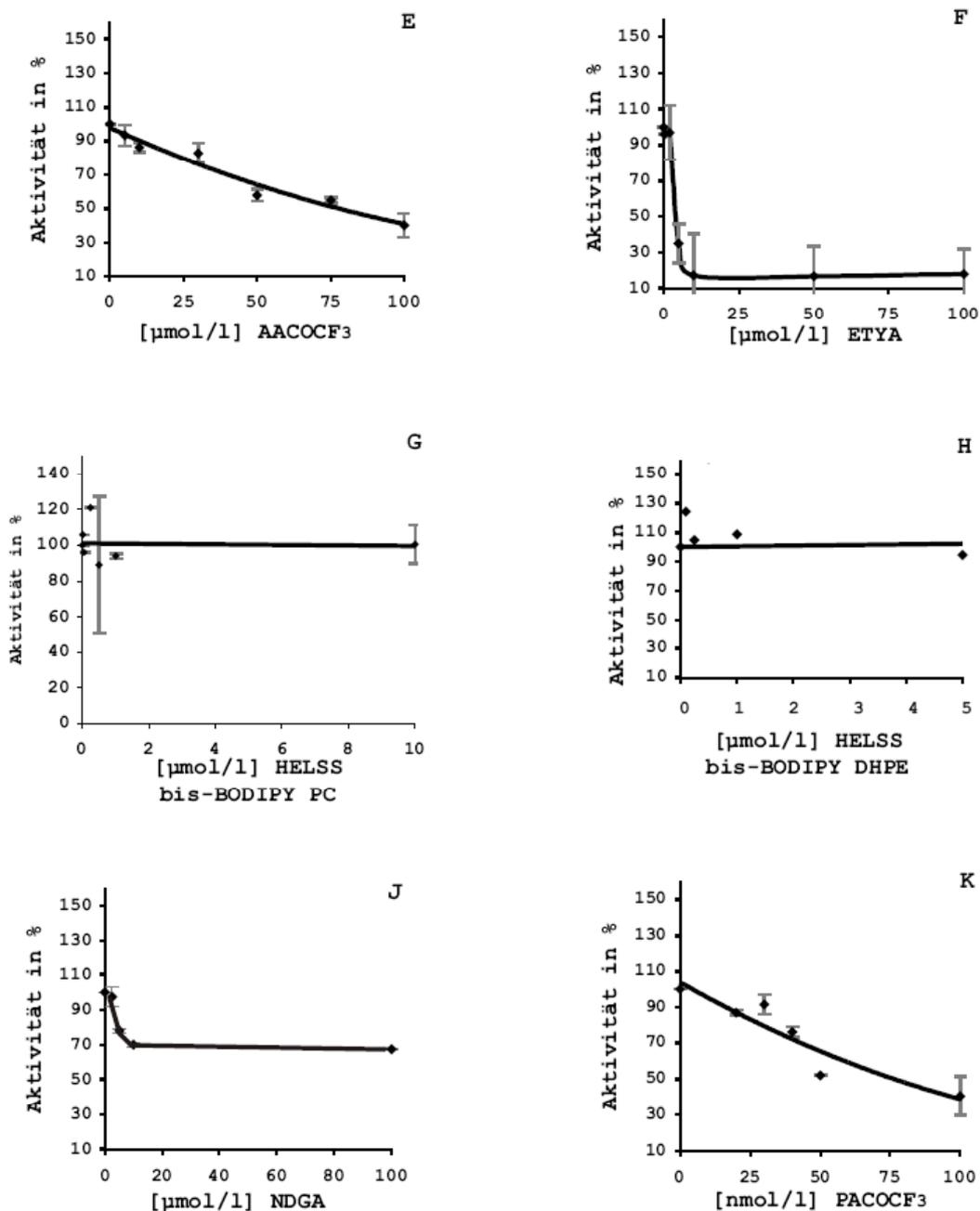


Abbildung 3.36. Wirkung der zugesetzten Hemmstoffe auf die Aktivität von IVB. Versuchsbedingungen: Die Inkubation betrug 60 min bei 33° C im Wasserbad, 25 mmolar HEPES (pH 7,3), pro Probe 3 µg Liposomen und 0,5 µg Protein IVB, Auswertungen der Dünnschichtchromatogramme mittels ScanPack II. Die Aktivität bezieht sich auf relative Fluoreszenz der entstandenen Fettsäure. Laufzeit des Chromatogramms jeweils 90 min. Es wurden jeweils 100 µl Probe der Gesamtchloroformfraktion von 150 µl aufgetragen.

E) Hemmung von IVB durch AACOCF₃ (halb maximale Hemmung ca. 40 µmol / l), n=4,
 F) Hemmung von IVB durch ETYA (halb maximale Hemmung ca. 5 µmol / l), n=4,
 G) Hemmung von IVB durch HELSS (keine Hemmung), bis-BODIPY-PC, n=3,
 H) Hemmung von IVB durch HELSS (keine Hemmung), BODIPY-FL DHPE, n=2,
 J) Hemmung von IVB durch NDGA (halb maximale Inhibition ca. 25 µmol / l), n=3,
 K) Hemmung von IVB durch PACOCF₃ (halb maximale Hemmung ca. 70 nmol / l), n=4

3.9.2 Analyse der Enzymeigenschaften von IVB_{CT}

Nach Deletion des C-Terminus von Aminosäure 325 bis 414 des Enzyms IVB lag IVB_{CT} als eine verkürzte Form von IVB vor und wurde analog zu den Ergebnissen von IVB charakterisiert.

Die Aktivität des Enzyms IVB_{CT} wurde nachgewiesen und ist in Abbildung 3.37 anhand eines Dünnschichtchromatogramms dargestellt (s. 2.16.ff). bis-BODIPY-PC wird durch IVB_{CT} in seine Metaboliten Fettsäure und Lysophosphatidylcholin gespalten. Gleichzeitig ist auf dem Chromatogramm die Hemmung von IVA und IVB_{CT} durch HELSS dargestellt.

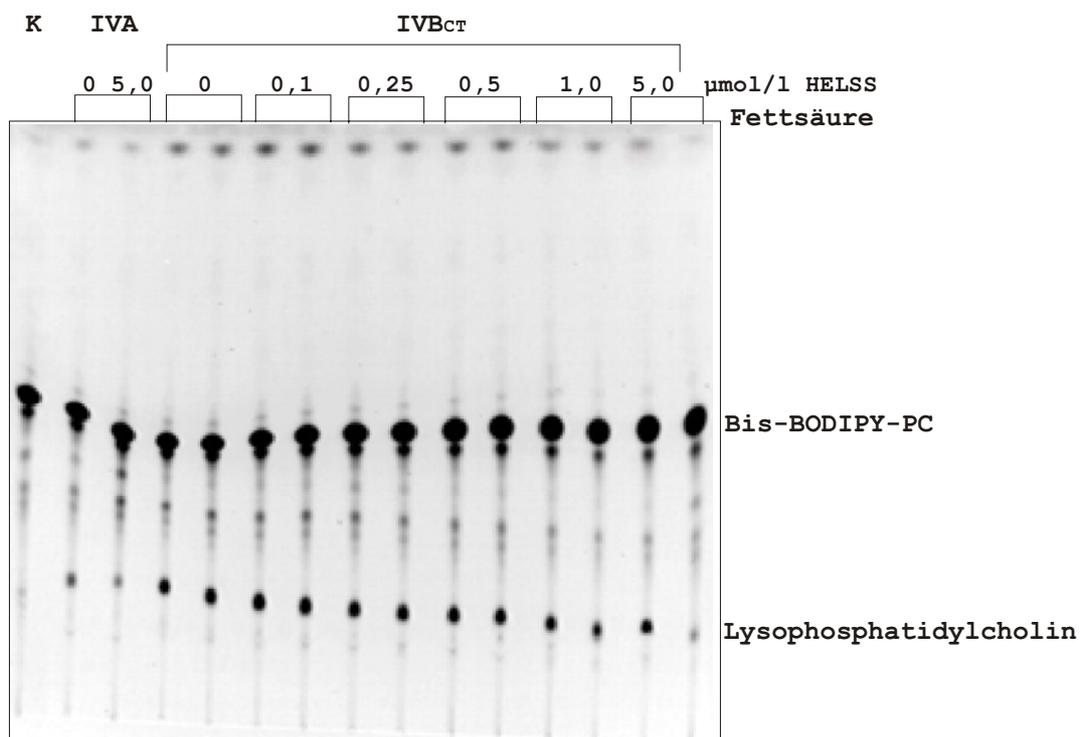


Abbildung 3.37. Nachweis der Aktivität von IVB_{CT} und IVA und der Hemmbarkeit durch HELSS. Dünnschichtchromatogramm mit einer Laufzeit 90 min, 3 μg Liposomen, pH 7,3, es wurden jeweils 100 μl Probe der Gesamtchloroformfraktion von 150 μl wurden eingesetzt, Auswertung mittels ScanPack II

K: Blindwert, 0 μg Enzym

IVA: 0,5 μg Enzym IVA, von links nach rechts: 0; 5,0 μmol / l HELSS

IVB_{CT}: 0,5 μg Enzym IVB_{CT}, 3 μg Liposomen, links nach rechts: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 μmol / l HELSS.

Der maximale Umsatz ohne Inhibitor wurde als 100 % festgelegt. Die Standardabweichung und die Anzahl der Versuche ist in der Legende verzeichnet. Es wurden die Parameter Linearität der Aktivität mit der Zeit, pH-Wert und Calcium-Abhängigkeit bestimmt, die den Ergebnissen von IVB sehr ähnelten (Abb. 3.38 A-C). Lediglich das pH-Optimum liegt bei 6,8, statt bei 7,3 wobei zu berücksichtigen ist, dass das pH-Optimum ein sehr breites Spektrum hat. Die Calciumabhängigkeit war gleich, zumal auch hier ohne Calcium eine Aktivität erhalten wurde, die circa 20 % der maximalen Aktivität betrug.

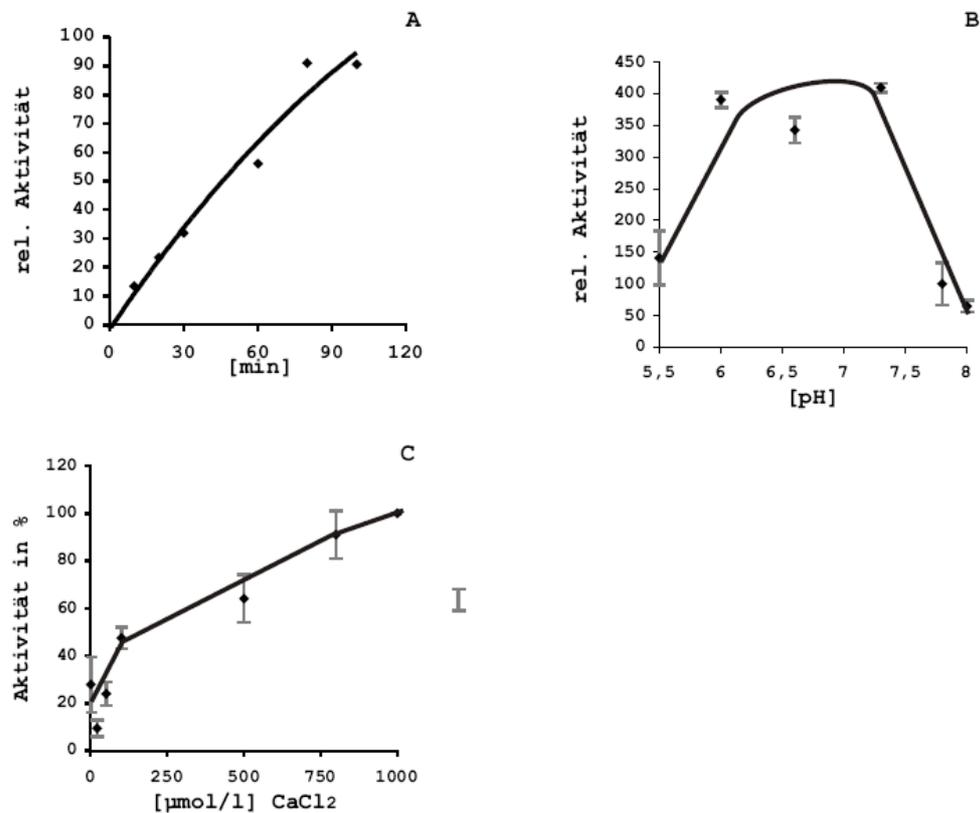


Abbildung 3.38. Ermittlung optimaler Versuchbedingungen für die Enzymaktivität von IVB_{CT}. Als Aktivität gilt die relative Fluoreszenz der entstandenen Fettsäure. Die Inkubationstemperatur betrug 33° C im Wasserbad, Laufzeit jeweils 90 Minuten, Auswertung mittels ScanPack II.

- A) Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer von 80 Minuten, n= 2, eins von zwei Experimenten ist gezeigt, das gezeigte ist repräsentativ,
 B) Ermittlung des pH-Optimums. Dieses liegt beim pH von 6,8 unter Verwendung von 25 mmolarem HEPES-Puffer, n=2,
 C) Ermittlung der Calcium-Abhängigkeit. Die optimale Aktivität wurde bei 500 μmol / l CaCl₂-Zusatz erreicht, n=4

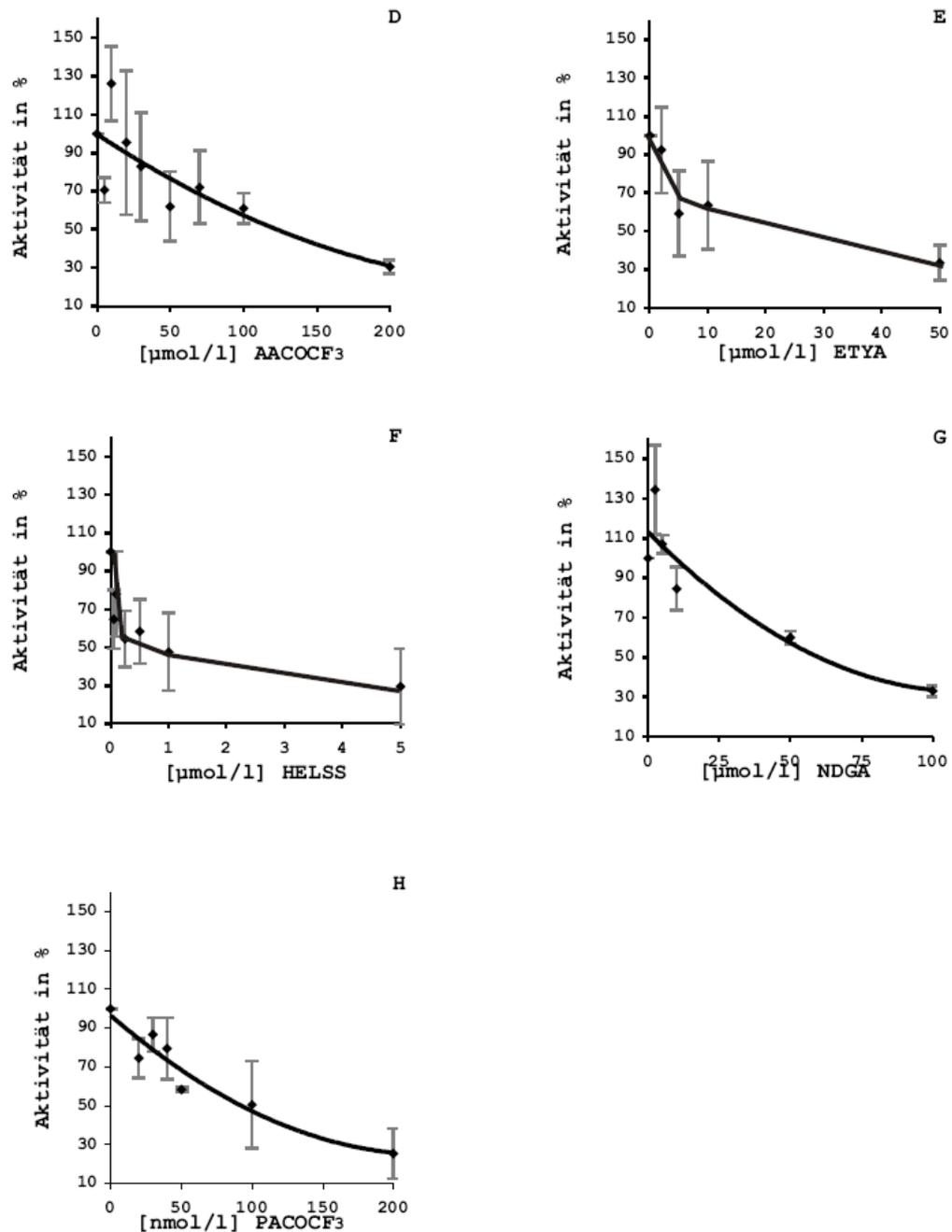


Abbildung 3.39. Wirkung der zugesetzten Hemmstoffe auf die Aktivität von IVB_{CT}. Als Aktivität gilt die Fluoreszenz der Fettsäure. Pro Enzymtest wurden 3 µg Liposomen und 0,5 µg IVB_{CT} verwendet, Laufzeit der Chromatogramme jeweils 90 Minuten, 100 µl der Gesamchloroformfraktion von 150 µl wurden eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels ScanPack II. Folgende Versuche wurden für 60 min bei 33° C durchgeführt, mit 1000 µmol / l Calciumchlorid und bei dem pH 6,8 inkubiert.

D) Hemmung von IVB_{CT} durch AACOCF₃ (halb maximale Hemmung ca. 40 µmol / l), n=6,
 E) Hemmung von IVB_{CT} durch ETYA (halb maximale Hemmung ca. 5 µmol / l), n=4,
 F) Hemmung von IVB_{CT} durch HELSS (halb maximale Hemmung ca. 150 nmol / l), n=3,
 G) Hemmung von IVB_{CT} durch NDGA (halb maximale Inhibition ca. 25 µmol / l), n=2,
 H) Hemmung von IVB_{CT} durch PACOCF₃, (halb maximale Hemmung ca. 60 nmol / l), n=4

Das Enzym IVB_{CT} zeigte bei Zusatz der Hemmstoffe AACOCF₃ (halb max. Hemmung ca. 40 μmol / l), ETYA (halb max. Hemmung circa 5 μmol / l) und PACOCF₃ (halb max. Hemmung ca. 60 nmol / l) ähnliche Sensitivitäten wie das Enzym IVB. Die katalytische Aktivität von IVB wurde durch HELSS nicht, und durch NDGA nur sehr wenig beeinflusst. Durch die Deletion des C-Terminus zeigte sich bei dem Enzym IVB_{CT} volle Hemmbarkeit durch HELSS in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie bei IVA (halb max. Hemmung bei ca. 150 nmol / l zu 200 nmol / l). Die Sensitivität von IVB_{CT} gegenüber NDGA entspricht ebenso den Eigenschaften von IVA (halb max. Hemmung bei ca. 25 zu 15 μmol / l, HOLK et al. 2002) und die Hemmung durch NDGA ist wesentlich deutlicher als bei IVB (Abb. 3.39 D-H).

3.9.3 Analyse der Enzymeigenschaften von IVB_{mut}

Das durch Änderung der unter 3.7.2 angegebenen Aminosäuren von IVB hervorgegangene Enzym IVB_{mut} wurde wie die vorhergehenden Enzyme IVB und IVB_{CT} charakterisiert. In Abbildung 3.40 wird ein Dünnschichtchromatogramm gezeigt, in welchem die Aktivität des Enzyms IVB_{mut} und dessen Hemmung durch HELSS dargestellt ist. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen von IVB (s. 3.5.3). Der Enzymtest von IVB_{mut} wurde für 60 Minuten bei 33° C inkubiert und bei einem pH-Wert von 7,3 und einer Konzentration von 1000 μmol / l Calciumchlorid durchgeführt. Es wurde darauf verzichtet, weitere Hemmstoffe zu testen, da sich nur NDGA und HELSS unterschiedlich auf die Aktivität von IVA und IVB auswirkten.

Die halb maximale Inhibition von IVB_{mut} durch 15 μmol / l NDGA war der halb maximalen Hemmung von IVA (10 μmol / l) und IVB_{CT} (25 μmol / l) sehr ähnlich. IVB_{mut} wurde erst bei 1 μmol / l HELSS halb maximal gehemmt, während die halb maximale Hemmung von IVA bei 200 nmol / l und von IVB_{CT} bei 150 nmol / l HELSS lag (Abb. 3.41).

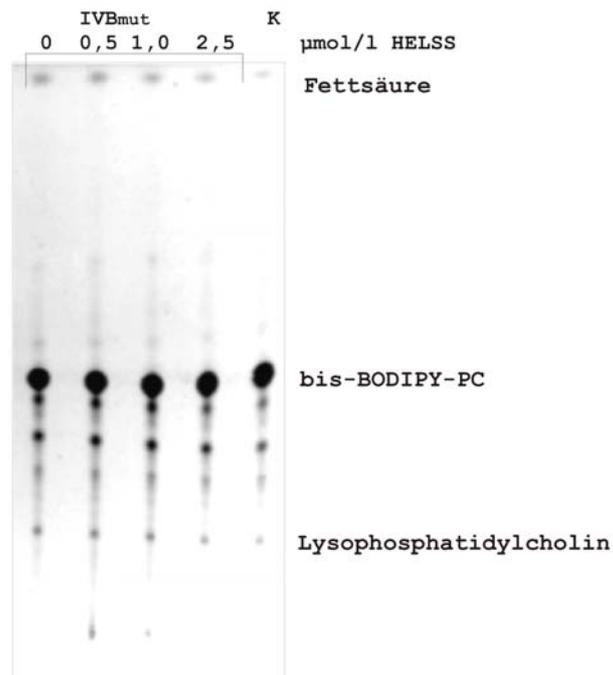


Abbildung 3.40. Nachweis der Aktivität von IVB_{mut} und der Hemmbarkeit durch HELSS. Dünnschichtchromatogramm mit einer Laufzeit von 90 min. Es wurden 100 μ l aus dem Gesamtchloroformfraktion von 150 μ l eingesetzt
 IVB_{mut} : 0,5 μ g Enzym IVB_{mut} , 3 μ g Liposomen; links nach rechts 0; 0,5; 1,0; 2,5 μ mol /l HELSS, K: Blindwert, 0 μ g Enzym, 3 μ g Liposomen

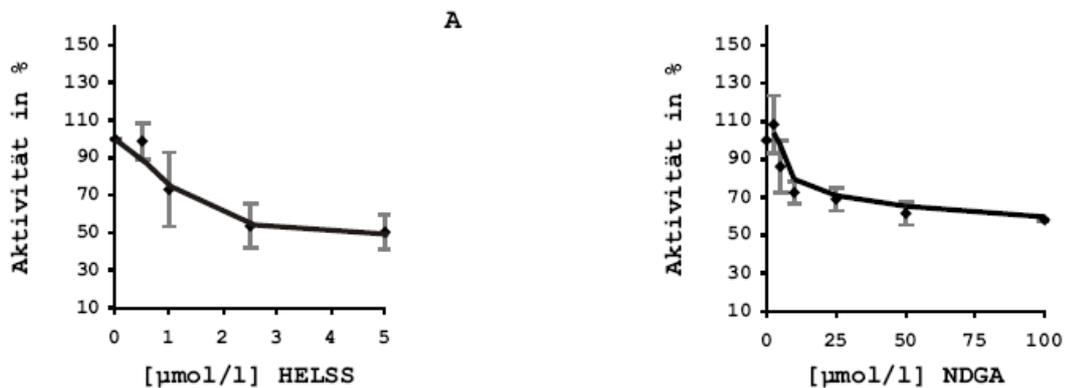


Abbildung 3.41. Wirkung der zugesetzten Hemmstoffe auf die Aktivität von IVB_{mut} . Als Aktivität gilt die Fluoreszenz der Fettsäure. Pro Enzymtest wurden 3 μ g Liposomen und 0,5 μ g IVB_{CT} verwendet, Laufzeit der Chromatogramme jeweils 90 Minuten, 100 μ l der Gesamtchloroformfraktion von 150 μ l wurden eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels ScanPack II. Folgende Versuche wurden für 60 min bei 33° C durchgeführt, mit 1000 μ mol / l Calciumchlorid und bei dem pH 7,3 inkubiert.
 A) Hemmung von IVB_{mut} Protein durch HELSS (halb maximale Hemmung 1 μ mol / l), n=3,
 B) Hemmung von IVB_{mut} Protein durch NDGA (halb maximale Inhibition 15 μ mol / l), n=3

3.10 Potentieller Aktivierungsmechanismus der Proteine IVA und IVB

HELSS ist ein Hemmstoff, der kovalent an das Serin im aktiven Zentrum der Ca^{2+} -unabhängigen Phospholipasen A_2 bindet (BALSINDE et al. 1999). Da dieser Inhibitor an andere PLAs nicht (sPLA₂) bzw. nur in sehr hohen Konzentrationen (cPLA₂) bindet, ist er zur Definition der Patatin-ähnlichen PLAs in der Pflanze bzw. der Calcium-unabhängigen Phospholipasen A_2 wichtig. Die unterschiedlichen Reaktionen des Enzyms IVA (hemmfähig) und IVB (nicht hemmfähig) legten nahe, dass bei dem Enzym IVB_{CT} (hemmfähig) die Deletion des C-Terminus den Zugang zum aktiven Zentrum öffnet. Aufgrund dessen wurde erst eine unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit für IVB und IVB_{CT} erwartet, was aber im direkten Vergleich unter Standardbedingungen (1 mmol / l Calciumchlorid, 33° C, 0,5 µg Enzym und 3 µg Liposomen pro Test bei einem pH-Wert von 7,3) nicht zutraf. Aus diesem Grund wurde eine zweite in der Literatur beschriebene Methode als Enzymtest angewandt (VIEHWEGER et al. 2002). In dieser Methode wird nur das fluoreszierende Substrat ohne Zusatzlipide verwendet.

Die Enzyme IVA, IVB und IVB_{CT} wurden mittels eines Enzymtest an Liposomen zuerst auf ihre Aktivität getestet (Abb. 3.42). Nach Feststellung der enzymatischen Aktivität schloss sich unmittelbar an diesen Nachweis der Enzymtest ohne Liposomen an. Der Aktivitätsnachweis von IVA, IVB und IVB_{CT} mit direkt eingesetztem 2 µmol / l bis-BODIPY-PC ist in Abbildung 3.42.B gezeigt und in 3.42.C ausgewertet (s. 2.16.2f.). Bei diesem zeigte sich bei IVB_{CT} ein deutlicher Umsatz des bis-BODIPY-PC in die Metaboliten Fettsäure und Lysophosphatidylcholin (relative Aktivität bei 56 und 158,5), während der Umsatz von IVA und IVB dem Blindwert entspricht und aufgrund dessen im Diagramm nicht dargestellt werden kann (Abb. 3.42.C).

Auch die Zugabe verschiedener Detergenzien (0,01 % v / V Triton-X, 0,1 % v / V SDC), verschiedener Enzym-Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0 µg) oder verschiedener Inkubationszeiten (0, 5, 10, 20, 30, 60, 80 min) führte zu keinem Umsatz des bis-BODIPY-PC durch IVA und IVB (ohne Abb.).

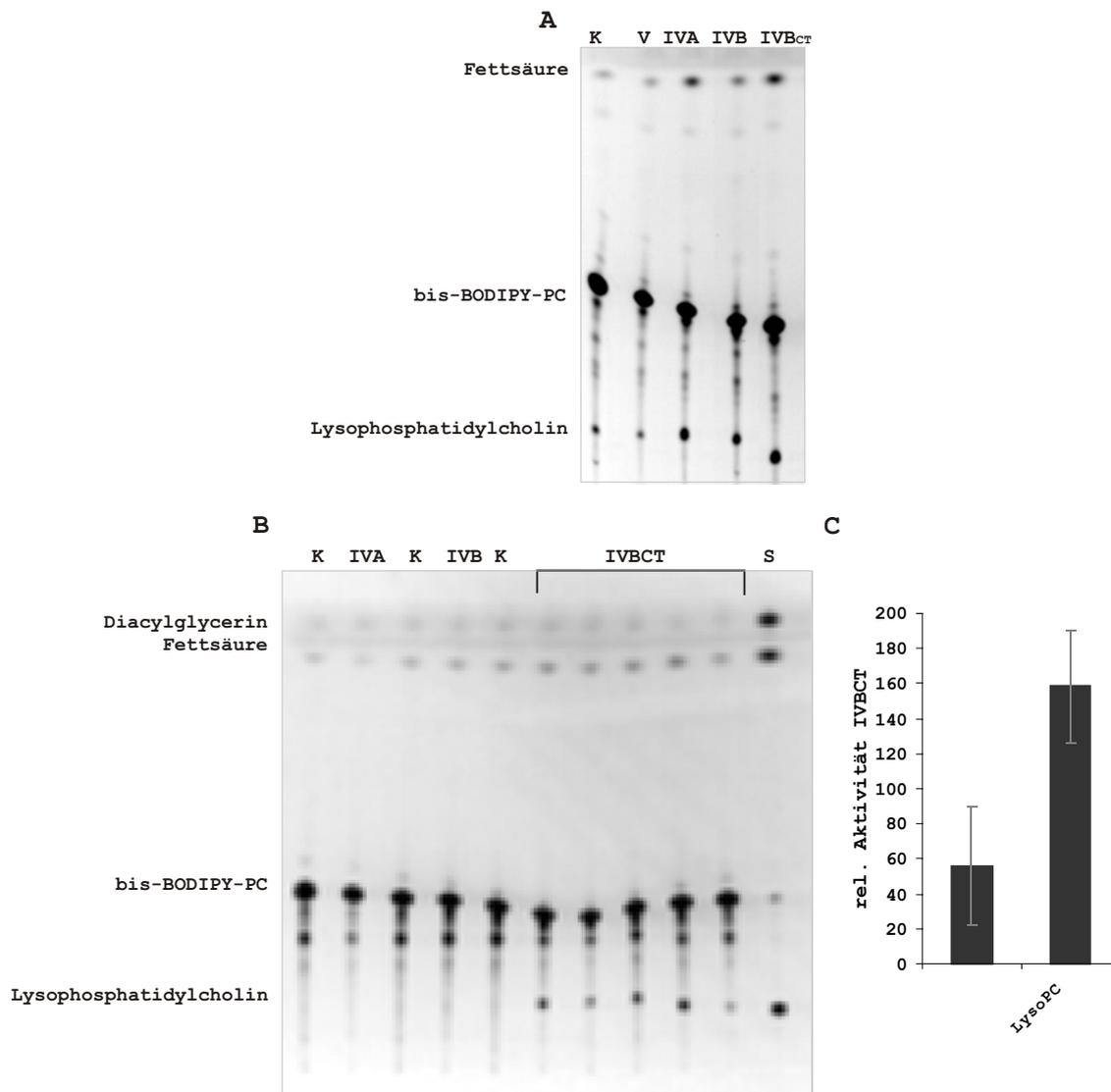


Abbildung 3.42. A) Aktivitätsnachweis von IVA, IVB und IVB_{CT} unter Verwendung von Liposomen. Es wurden 100 μ l aus der Gesamtchloroformfraktion von 150 μ l eingesetzt. Folgende Versuche wurden für 60 min bei 33° C durchgeführt, mit 1000 μ mol / l CaCl₂ inkubiert.

K: Blindwert, 0 μ g Enzym, 3 μ g Liposomen pH 7,3; V: 0,5 μ g Protein aus Bakteriensuspension mit *pQE-30* Vektor ohne inserierte cDNA, pH 7,3; IVA: 0,5 μ g IVA pH 7,3, IVB: 0,5 μ g IVB, pH 7,3, IVB_{CT}: 0,5 μ g IVB_{CT}, pH 7,3,

B) Aktivität unter Verwendung von reinem bis-BODIPY-PC. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, das gezeigte Experiment ist repräsentativ. Inkubation wie unter A). K: Blindwert, 0 μ g Enzym, 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC, pH 7,8; IVA: 1,0 μ g Enzym IVA, 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC, pH 7,8; K: Blindwert, 0 μ g Enzym, 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC, pH 7,8; IVB: 1,0 μ g Enzym IVB, 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC, pH 7,8; K: Blindwert, 0 μ g Enzym, 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC, pH 7,8; IVB_{CT}: 1,0 μ g Enzym IVB_{CT}, 2 μ molar bis-BODIPY-PC, pH 7,8; S: Standard, je 3 μ l Fettsäurestandard und Diacylglycerinstandard,

C) Auswertung der Aktivität von IVB_{CT} unter Einsatz von 2 μ mol / l bis-BODIPY-PC. Für die Auswertung der Chromatogramme wurden die relativen Fluoreszenzen der Fettsäure und des Lysophosphatidylcholin ermittelt (= Aktivität). Der Blindwert ist bereits subtrahiert. Die relativen Fluoreszenzen von IVA und IVB lagen im selben Bereich wie der Blindwert und können aufgrund dessen nicht dargestellt werden. Auswertung erfolgte mit dem Programm ScanPackII

3.11 Vergleichendes Strukturmodell von IVB

Die dreidimensionale Struktur eines Patatins wurde vor kurzem beschrieben (Rydel et al. 2003). So konnte die dreidimensionale Gestalt des Proteins IVB durch eine Modellberechnung analog zu den Patatinen dargestellt werden (Abb. 3.43). Dabei zeigte sich, dass das Entfernen des C-Terminus zur Entfernung einer Schleife führt, welche eng am aktiven Zentrum liegt. Ein nicht-helikaler Teil der C-terminalen Schleife scheint den Lipid-bindenden Tunnel der Aminosäuren 325 bis 335 des aktiven Zentrums einzurahmen (Abb. 3.43). Dies wäre eine mögliche Ursache für die Resistenz des Enzyms gegen HELSS.



Abbildung 3.43. Ermittlung der dreidimensionalen Proteinstruktur von *AtPLA IVB* unter Anwendung des Programms Genod 3D (COMBET et al. 2002) mit den Proteinen pdb1owA, pdb1owxB und pdb1owC als Vorlagen (RYDEL et al. 2003). Das Bild wurde mit dem Programm RasMol erstellt (University of Massachusetts).
 blaue Kreise: Kanal des aktiven Zentrums, Position des aktiven Zentrums ist markiert,
 blaue, gestrichelte Umrahmung: möglicher C-Terminus,
 gelber Kasten: konserviertes „YLRID“ Motiv (persönliche Mitteilung G. SCHERER). Die Deletion setzte direkt danach an.

4 Diskussion

4.1 Isolierung der Insertionsmutanten

Um *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB in *Arabidopsis thaliana* funktionell zu analysieren, wurden die Insertionsmutanten dieser Gene isoliert. Für die Isolierung wurden ausschließlich Mutanten herangezogen, die aus T-DNA Insertion hervorgegangen sind, da diese im Schnitt 1,5 Insertionen im Genom aufweisen (KRYSAN et al. 1996). Es wurden je zwei unabhängige Insertionsmutanten pro *AtPLA*-Gen isoliert um auszuschließen, dass die ermittelten Phänotypen durch eine zweite T-DNA-Insertion in einem unbekanntem Gen verursacht werden. Von der Isolierung von Mutanten mit Transposoninsertionen wurde Abstand genommen, da diese bis zu 25 Insertionen im Genom tragen können (BOUCHE und BOUCHEZ 2001).

Bei den homozygoten Insertionsmutanten von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IVA, *AtPLA* IVB und *Atpla* IIIA-2 wurde das jeweilige Gen nicht transkribiert. *AtPLA* IIIA-1 wurde als homozygote Insertionsmutante von *AtPLA* IIIA isoliert, zeigte aber bei Überprüfung der Gesamt-RNA ein Transkript der *AtPLA* IIIA cDNA. Die T-DNA Insertion bei *Atpla* IIIA-1 wurde -286 bp vor dem Translationssstart des Proteins von *AtPLA* IIIA ermittelt. Bei 85 % der bisher sequenzierten Pflanzengene liegt -25 bis -35 bp vor dem Transkriptionsstart eine TATA-Box, an welcher der Zusammenbau des Transkriptionsinitiationskomplexes erfolgt (TAIZ und ZEIGER 2000). Durch Analyse mit dem Programm PlantCare (ROMBAUTS et al. 1999, LESCOT et al. 2002) wurde -40 bp vor dem Startmethionin von *AtPLA* IIIA eine potentielle TATA-Box gefunden. Eine potentielle CAAT-Box, welche sich im Allgemeinen 25 bis 50 bp stromaufwärts von der TATA-Box befindet, konnte bei -94 bp ermittelt werden. An die Nukleotidsequenz der CAAT-Box binden Transkriptionsfaktoren (VAUTERIN et al. 1999). Aufgrund dessen ist es möglich, dass die T-DNA Insertion im Promotor von *Atpla* IIIA-1 die Transkription des Gens nicht verhindert. Sämtliche Insertionsmutanten von *AtPLA* IIA, *AtPLA* IIIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVB zeigten bei der Anzucht in Einheitserde keine morphologisch auffälligen Abweichungen vom Wildtyp.

Durch Promotor::*uidA* Analyse und semi-quantitative RT-PCR wurde das Transkript von *AtPLA IVA* in der Wurzel lokalisiert und die Transkription von *AtPLA IIA* in den Blättern, den Stipeln und der Wurzel (HOLK et al. 2002). Nach semiquantitativer RT-PCR wurde das Transkript von *AtPLA IIIA* in Wurzel, Spross, Blatt und Blüte lokalisiert, während *AtPLA IVB* ausschließlich in der Wurzel lokalisiert wurde (persönl. Mitteilung P. PIETRZYK). Diese Daten mussten nach der Analyse von PIVB::*uidA* exprimierenden Pflanzen ergänzt werden (s. u.). Da keine Korrelation der ausgeschalteten Gene in den verschiedenen Organen mit einem erkennbaren Phänotyp vorhanden war, waren für die morphologische Analysen intensivere Untersuchungen notwendig. Aufgrund dessen wurde die Funktionsanalyse im Folgenden auf *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* beschränkt. Bei der *AtPLA*-Familie in *Arabidopsis* weist das Gen *AtPLA IVA* nach Analyse mit dem Programm TreeView eine sehr ausgeprägte Homologie zu *AtPLA IVB* auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die Proteine dieser beiden Gene innerhalb der *AtPLA*-Familie phylogenetisch am engsten miteinander verwandt sind. Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenz der *AtPLAs* durch das Programm GeneDoc (NICHOLAS und NICHOLAS 1997) wurde festgestellt, dass die Aminosäuresequenz von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* zu 88 % identisch sind und von ihren jeweils 414 nur fünf Aminosäuren deutliche physikochemische Unterschiede aufweisen. Von diesen fünf liegen vier Aminosäuren in der jeweiligen C-terminalen Region der Enzyme. *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* liegen direkt hintereinander auf dem Chromosom IV von *Arabidopsis thaliana* und es ist wahrscheinlich, dass eines dieser Gene aus einer Duplikation des anderen hervorgegangen ist (KAUL et al. 2000, LYNCH und CONERY 2000, MOORE und PURRUGANAN 2003). Aufgrund dessen wurden beide Gene in dieser Arbeit intensiver charakterisiert. So folgte eine Analyse der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* und der Vergleich der transkriptionellen Regulation durch Analyse von Pflanzen mit Promotor::*uidA* Insertion. Die transgenen Pflanzen mit dem Promotor::*uidA* Konstrukt von *AtPLA IVA* lagen vor (RIETZ 2002). Es handelte sich hierbei nur um einen Nachweis der Transkription des *uidA*-Gens, welches durch den Promotor von IVA bzw. IVB reguliert wurde. Dadurch konnten anhand der durchgeführten Promotor::*GUS* Versuche keine Rückschlüsse über die Aktivität der regulären Transkripte von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* getroffen werden.

Des Weiteren wurde das Enzym IVB untersucht, um es mit den bekannten Eigenschaften des Enzyms IVA zu vergleichen (RIETZ 2002). Dabei ergaben sich Unterschiede zu IVA, welche zu einer Analyse der potentiellen, regulatorischen Funktion des C-Terminus führten.

4.2 Mögliche funktionelle Zuordnung von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB*

Durch Transkriptionsanalyse von Promotor::*uidA* Pflanzen konnte eine β -Glucuronidase-Aktivität sowohl bei *AtPLA IVA* als auch bei *AtPLA IVB* in der Wurzel nachgewiesen werden. Dies wurde durch semiquantitative RT-PCR bestätigt. Aufgrund dessen wurden die Wurzeln der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* auf morphologische Abweichungen vom Wildtyp untersucht.

Die Funktion von Patatin-ähnlichen PLAs in der Pflanze-Pathogen-Interaktion ist bekannt (u. a. RIETZ et al. 2004). Da aber Promotor::*GUS*-Pflanzen von *AtPLA IVA* bereits ohne nachweisbare Funktion in der pflanzlichen Pathogeninteraktion getestet wurden, wurde darauf verzichtet, die Insertionslinien von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* zu testen.

Es ist bekannt, dass PLAs eine Funktion in der pflanzlichen Auxinsignaltransduktion haben (SCHERER and ANDRÉ 1989, PAUL et al. 1998, HOLK et al. 2002). Auxin hat eine Funktion in vielen pflanzlichen Prozessen, wie dem Sprosswachstum, der Apikaldominanz, Fruchtreife, Zellstreckung und dem Gravi- und Phototropismus. Das Phytohormon Auxin ist bereits in Moosen und Algen zu finden (COOKE et al. 2002) und seine Funktion im Phototropismus ist teilweise bereits 1881 durch DARWIN angedeutet worden.

Da die Arbeitshypothese besteht, dass die Patatin-ähnlichen PLAs aus *Arabidopsis* eine Funktion in der Auxinsignaltransduktion haben, folgte eine Analyse der Insertionsmutanten in Bezug auf dieses Pflanzenhormon. Hierbei wurde unter anderem auch mit dem Entzug von verschiedenen Nährstoffen gearbeitet, die Einfluss auf die Morphologie der Wurzel haben und in einem direktem Zusammenhang mit dem Phytohormon Auxin diskutiert werden.

4.2.1 Morphologieänderung in Bezug auf exogene und endogene Faktoren

Die Wurzelmorphologie wird von der Zellteilung des primären Wurzelmeristems, der Seitenwurzelbildung und der Ausbildung von Wurzelhaaren beeinflusst (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Da die Nährstoffverteilung im Boden nicht homogen ist, erhöhen Pflanzen die Aufnahme notwendiger Nährstoffe durch verschiedene Entwicklungsprogramme, wobei sich die Wurzelmorphologie ändert, um eine bessere Aufnahme des Nährstoffes zu ermöglichen (FORDE und LORENZO 2001). Viele Pflanzen reagieren auf Auxin mit Seitenwurzelbildung und auf durch Auxin induziertes Ethylen durch Zunahme der Wurzelhaardichte (LYNCH und BROWN 1997, HIMANEN et al. 2002). Die Wurzelmorphologie wird dabei von vielfältigen hormonellen und exogenen Signalen beeinflusst (LEYSER und BERLETH 1999), welche hier zunächst geschildert werden, um dann die eigenen Befunde dagegen zu kontrastieren.

Das Phytohormon Ethylen beeinflusst fast immer Entwicklungsprozesse wie die Seneszenz, Blattabwurf und Fruchtreife und hat zudem Einfluss in den pflanzlichen Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress (ABELELES et al. 1992, Wang et al. 2002).

Zu den physiologischen Wirkungen der Cytokinine gehören die Induktion der Samenkeimung, die Ausbildung und Entwicklung von Knospen, die Kontrolle der apikalen Dominanz, die Blütenbildung, die Blattexpansion, die Entwicklung von Chloroplasten, die Chlorophyllsynthese, die Verzögerung der Seneszenz und die Hemmung des Wurzelwachstums (SKOOG & MILLER, 1957, HUTCHISON et al. 2002, SHEEN 2002).

Die wohl wichtigste Bedeutung der Cytokinine liegt in der Kontrolle von Zellteilung und -differenzierung, wobei die Cytokinine mit anderen Pflanzenhormonen in Wechselwirkung treten. Das Phytohormon Abscisinsäure hat eine wichtige regulatorische Funktion in der Seitenwurzelbildung, da bereits Konzentration ab $0,5 \mu\text{mol/l}$ Abscisinsäure diese hemmen (DE SMET et al. 2003).

Das Phytohormon Auxin beeinflusst von der Keimung bis zur Seneszenz nahezu alle der pflanzlichen Entwicklungsstadien. Dabei wird davon ausgegangen, dass die primäre Wirkung von Auxin in allen Zellen ähnliche Rezeptoren und Signalketten beinhaltet. Dabei hängt die Wirkung von Auxin vom jeweiligen Zielgewebe ab (TAIZ und ZEIGER 2002). Da Auxin für Pflanzen essentiell ist, gibt es nur Studien mit *Arabidopsis*-Mutanten, welche eine veränderte Auxinreaktionen zeigen (LEYSER und BERLETH 1999). Im Folgenden wird insbesondere auf die Funktion von Auxin in der pflanzlichen Entwicklung eingegangen.

Auxin wird in den apikalen Wachstumsgeweben der Pflanze, wie der Keimlingsspitze und den jungen Blättern gebildet (WALLROTH-MARNMOR und HARTE 1988). Von diesen wird IAA, das am häufigsten vorkommende Auxin, in basal lokalisierte Pflanzengewebe und Organe transportiert (LOMAX et al. 1995). Bei Versuchen mit DR5 zeigt sich eine entwicklungsabhängige β -Glucuronidase-Aktivität in sich entwickelnden Blättern (MATTSON et al. 2003). DR5 ist ein Auxin-induzierbarer Promotor, der als Indikator für Auxinkonzentrationen verwendet wird. Im Verlauf der Blattrife sinkt die DR5-Aktivität und der Auxingehalt ab, und in seneszenten Blättern erreicht er einen verhältnismäßig geringen Gehalt. Dies könnte in Zusammenhang damit stehen, dass Auxin in frühen Entwicklungsstadien bei Blütenblättern und Blättern den Abscissionsbeginn verzögert, diesen jedoch in späteren Entwicklungsstadien fördert (TAIZ und ZEIGER 2000).

Junge Blätter reagieren weniger sensibel auf Ethylen als ältere. Es ist also möglich, dass hohe IAA-Konzentrationen in jungen Blättern die Ethylenempfindlichkeit herabsetzen (REID 1985). Die Wechselwirkung zwischen Ethylen und Auxin in der Wurzelentwicklung wurde durch Mutanten ermittelt, die sowohl gegenüber Ethylen, als auch Auxin resistent waren (WILSON et al. 1990, LUSCHNIG et al. 1998, MÜLLER et al. 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass Auxin die Ethylenbiosynthese stimuliert (ABEL et al. 1995).

Auxinkonzentrationen über 10^{-8} mol / l hemmen das Wachstum der Primärwurzel und fördern zugleich die Bildung von Seiten- und Adventivwurzeln durch Stimulierung der Zellteilung (EVANS et al. 1994).

So bildet die *Arabidopsis*-Mutante *alf1* (*alf*: *aberrant lateral root formation*) überproportional mehr Seiten- und Adventivwurzeln aus als der Wildtyp, was mit einer 17fachen Zunahme der endogenen Auxinkonzentration einhergeht (CELENZA et al. 1995). Des Weiteren wird im Wurzelapex kurz nach der Samenentwicklung Auxin angehäuft (BHALERAO et al. 2002). Es kommt jedoch nicht zu dieser Akkumulation, wenn der Auxin-Influx-Carrier *Aux1* nicht intakt ist, wodurch daraufhin 50 % weniger Seitenwurzeln gebildet werden (SWARUP et al. 2001, MARCHANT et al. 2002).

Viele *Arabidopsis*-Mutanten, die einen Defekt in der Auxinsignaltransduktion haben, zeigen eine verminderte Anzahl von Seitenwurzeln. Zu ihnen gehören unter anderem die Auxin-resistenten Mutanten *axr1*, *axr4* und *axr6* (LINCOLN et al. 1990, HOBBIIE und ESTELLE 1995, HOBBIIE et al. 2000). Dabei verläuft die Ausbildung von Seitenwurzeln über einen anderen Signalweg, als den, der die embryonale Wurzelentwicklung steuert (CASSON und LINDSEY 2003). So bilden die *Arabidopsis*-Mutanten *monopteros* und *bodenlos* Seitenwurzeln aus, obwohl sie während der frühen Embryogenese das Wurzelmeristem nicht initiieren können (HAMANN et al. 2002). Des Weiteren existieren Mutanten und Gene, die spezifisch die Seitenwurzelbildung beeinflussen, jedoch keinen Einfluss auf die Hauptwurzel haben. Interessanterweise wurde bei allen eine Funktion von Auxin in der Seitenwurzelbildung beschrieben (CELENZA et al. 1995, RUEGGER et al. 1997, 1998, XIE et al. 2000, NAKAZAWA et al. 2001). Weitere Untersuchungen bestätigen die Bedeutung von Auxin in der Seitenwurzelbildung. So sind junge Seitenwurzeln unfähig sich zu teilen, wenn sie von der Hauptwurzel getrennt werden, und erst eine Zugabe von exogenem Indol-3-essigsäure (IAA) führt zu einer Wiederaufnahme der Zellteilung (DUBROVSKY et al. 2001). Jedoch führt die Zugabe von exogenem Auxin bei Mutanten, die eine veränderte Funktion im Auxinsignaltransduktionsweg haben, nicht immer zur Bildung von Seitenwurzeln (FUKAKI et al. 2002).

Bei Zusatz des Nährstoffes Nitrat zeigen *Arabidopsis*-Wurzeln drei unterschiedliche Reaktionen. Es kommt zur Unterdrückung der Seitenwurzelbildung, wenn der Gehalt von Zucker den von Stickstoff (C:N Verhältnis) überwiegt (MALAMY und RYAN 2001). Des Weiteren wird bei einer Nitratkonzentration von 10 mmol / l das Längenwachstum der Seitenwurzeln gehemmt.

Wenn die Wurzeln aus einem Sektor mit geringem Nitratgehalt in einen Bereich mit hoher Nitratkonzentration hineinwachsen, kommt es jedoch zu Verlängerung der Seitenwurzeln (ZHANG und FORDE 1998). Die Auxin-resistenten Mutanten *aux1*, *axr2* und *axr4* wurden durch eine lokal zugesetzte Nitraterhöhung getestet und die Länge der Seitenwurzeln erhöhten sich bei *aux1* und *axr2* genauso wie beim Wildtyp (MAHER und MARTINDALE 1980, WILSON et al. 1990, HOBBIIE und ESTELLE 1995). *axr4* reagierte nicht auf die Stimulierung mit NO_3^- . Aufgrund dessen wurde hier eine Funktion von Auxin in der Reaktion auf Nitrat postuliert (ZHANG et al. 1999). Es gibt aber auch gegenteilige Veröffentlichungen. Die Analyse der Auxin-resistenten *Arabidopsis*-Mutanten *axr1*, *aux1* und *axr4* ergab hier bei Nitratzugabe eine dem Wildtyp entsprechende Seitenwurzelverlängerung (LINKOHR et al. 2002). Der Unterschied in den Versuchen lag in der Verwendung eines anderen Mediums. Bei LINKOHR et al. handelte es sich um ein 1:10 verdünntes B5-Medium, während ZHANG et al. ein 1:50 verdünntes B5-Medium verwendeten. Des Weiteren ließen ZHANG et al. die Pflanzenwurzeln von einem Bereich mit wenig Nitrat in einen Bereich mit einer hohen Nitratkonzentration wachsen.

Welche Versuchsanordnung eindeutiger für eine Funktion von Auxin in der Reaktion auf Nitrat spricht, ist nicht leicht zu beurteilen. Wesentlich ist aber, dass auch ZHANG et al. eine nitratvermittelte Auxinreaktion nur bei einer der getesteten Mutanten nachweisen konnten. Abscisinsäure hat ebenfalls eine wichtige Funktion in der nitratbeeinflussten Reaktion der Pflanzenwurzel.

Abscisinsäure-Mangelmutanten reagieren wesentlich weniger sensitiv auf hohe Nitratkonzentrationen als Abscisinsäure-insensitive Mutanten (SIGNORA et al. 2001). Des Weiteren zeigte sich bei Zugabe von exogener Abscisinsäure ebenfalls eine Hemmung der Seitenwurzelbildung, die der bei hohen Nitratkonzentrationen gleicht (DE SMET et al. 2003). Ob Auxin, Abscisinsäure oder beide in einer nitratinduzierten Reaktion eine Funktion haben, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entgültig geklärt werden. Es wird aber hier davon ausgegangen, dass zumindest die Funktion von Abscisinsäure in der nitratbeeinflussten Reaktion höchstwahrscheinlich ist.

Bei Phosphatmangel kommt es zu einer erhöhten Bildung von Seitenwurzeln gegenüber einer Verkürzung der Hauptwurzel (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Die Änderung der Morphologie geht mit einer verminderten meristematischen Aktivität einher und ähnelt der Reaktion der Pflanzenwurzel auf hohe Auxinkonzentrationen ab 10^{-8} mol/l (CELENZA et al. 1995, LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Zudem ist bei geringem Phosphatgehalt die β -Glucuronidase-Aktivität des Auxin-induzierbaren Promotors DR5::*uidA* verringert (ULMASOV et al. 1997). Dies hängt vermutlich mit dem Verlust der mitotischen Aktivität der Wurzel zusammen. Die Wurzelhaare werden dichter und länger, wodurch die Oberfläche der Pflanzenwurzel im Verhältnis zum Volumen vergrößert wird. Die vermehrt vorkommenden Wurzelhaarzellen sind für die Phosphataufnahme essentiell und auf eine steigende Anzahl von Epidermiszellen zurückzuführen, die sich in Trichoblasten ausdifferenzieren (SCHMIDT et al. 2000, BATES und LYNCH 2001). Die Differenzierung von Wurzelhaaren wird jedoch durch Ethylen ausgelöst (LYNCH und BROWN 1997). Bei Auxinzugabe und hoher Phosphatkonzentration kommt es zu einer Erhöhung der Wurzelhaardichte, während Auxin bei geringer Phosphatkonzentration keinen Effekt auf die Wurzelhaardichte zeigt (MA et al. 2001). SCHMIDT und SHIKORA postulierten nach Versuchen an Auxin-resistenten Mutanten, dass Phosphat keinem Einfluss auf die Auxinsignalkette hat (2001). Sie testeten die Auxin resistenten Mutanten, *aux1*, *axr1* und *axr2* unter Phosphatmangelbedingungen (ESTELLE und SOMERVILLE 1987, PICKETT et al. 1990, WILSON et al. 1990). Des Weiteren testeten sie unter denselben Bedingungen die Ethylen-insensitive Mutante *ein2*, die Ethylen-resistente Mutante *etr1* und den Ethylen-Überexprimierer *eto3* (BLEECKER et al. 1988, GÚZMAN und ECKER 1990, KIEBER et al. 1993). Dabei konnten sie zeigen, dass es sowohl beim Wildtyp Columbia 0 als auch bei allen getesteten Mutanten zu einer Erhöhung der für Phosphatmangel typischen Wurzelhaardichte kam. Wahrscheinlich ist diese scheinbare Widersprüchlichkeit zwischen den Versuchen von MA et al. und SCHMIDT und SHIKORA auf das Phytohormon Ethylen zurückzuführen. Hohe Auxinkonzentrationen fördern die Ethylenbiosynthese, welches dann wiederum Wurzelhaare induziert (TAIZ und ZEIGER 2002).

Wenn es bei hohem Phosphatgehalt und Auxinzusatz zur Ausbildung von Wurzelhaaren kommt, ist dies womöglich auf eine von Auxin induzierte Ethylenbiosynthese zurückzuführen. Da es bei Phosphatmangel und hohem Auxingehalt zu keiner Ausbildung von Wurzelhaaren kommt, spricht dies dafür, dass Phosphat eine Wirkung auf die Ethylensignaltransduktion hat. Es gibt jedoch auch eindeutige Hinweise, dass für die Steuervorgänge unter Phosphatmangel Cytokinin eine funktionelle Bedeutung hat. Das Phytohormon Cytokinin ist sowohl ein ergänzender Part (in der Zellteilung) als auch Antagonist (in Spross- und Wurzelinduktion) von Auxin (CASSON und LINDSEY 2003). Da Cytokinin auch Ethylen induzieren kann (VOGEL et al. 1998) und die Versuche mit den Auxinmutanten *aux1*, *axr1* und *axr2* gegen eine Einbindung der Auxinsignaltransduktion bei Phosphatmangel sprechen, weisen die Literaturdaten eher auf die Beteiligung einer Cytokinin-abhängigen Funktion bei Phosphatmangel, als auf eine Auxin-abhängige Funktion hin.

Bei Sulfatmangel zeigen *Arabidopsis*-Wurzeln ein stärker verzweigte Morphologie. Die Seitenwurzeln entwickeln sich weiter von der Wurzelspitze entfernt als üblich und sind zahlreicher (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Eventuell steht dies im Zusammenhang mit Auxin, denn hohe Auxinkonzentrationen fördern das Seitenwurzelnwachstum (CASIMIRO et al. 2003). Die bei Sulfatmangel vermehrt vorkommenden Seitenwurzeln konnten mit Nitrilase3 (NIT3) in Zusammenhang gebracht werden. NIT3 ist ein Mitglied der Nitrilasegenfamilie, das Indol-3-acetonitril in das Auxin IAA umformen kann und dessen Promotor bei Sulfatmangel eine erhöhte Aktivität zeigt. Aufgrund dessen wird vermutet, dass Sulfat die Auxinsynthese negativ beeinflussen kann. Allerdings zeigt kein anderes Mitglied der Nitrilasegenfamilie eine Reaktion auf Sulfatmangel und bei NIT3 konnte auch keine morphologische Abweichung der Hauptwurzellänge vom Wildtyp nachgewiesen werden (KUTZ et al. 2002). Hohe endogene Auxinkonzentrationen führen aber nachgewiesenermaßen zu einer Verkürzung der Hauptwurzel (CELENZA et al. 1995). Da zwei unabhängige Wege von Haupt- und Seitenwurzelbildung postuliert werden und IAA die Seitenwurzelbildung fördert (DUBROVSKY et al. 2001), wäre es theoretisch möglich, dass NIT3 nur in den seitenwurzelbildenden Weg involviert ist.

Aber die Akkumulation von endogenem Auxin, die von den Autoren vorgeschlagen wird, führt zu einer Verkürzung der Hauptwurzel (CELENZA et al. 1995) und dies macht eine erhöhte IAA-Synthese bei Sulfatmangel zweifelhaft. Anhand der gegenwärtig bekannten Daten kann aufgrund dessen nicht eindeutig belegt werden, ob Auxin (oder ein anderes Phytohormon) durch Sulfatmangel induziert wird.

Bei Eisenmangel kommt es zu einer verkürzten Hauptwurzel und einer erhöhten Seitenwurzelbildung (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Somit ähnelt die Wurzelmorphologie bei Eisenmangel der Wurzelmorphologie bei hohen Auxinkonzentrationen ab 10^{-8} mol / l (CELENZA et al. 1995). Versuche mit Auxin- und Ethylen-resistenten Mutanten zeigen, dass die Mutanten nur bei Phosphatmangel wie der Wildtyp reagierten. Aufgrund dessen wird postuliert, dass trotz einer ähnlichen Morphologie die Reaktionen auf Eisen- und Phosphatmangel durch verschiedene Signaltransduktionsmechanismen vermittelt werden (MÜLLER und SCHMIDT 2004). Zudem kommt es bei Eisenmangel zu einer erhöhten Wurzelhaardichte (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Eine physiologische Beziehung zwischen der Mobilisierung der Eisenaufnahme bei Eisenmangel und der Wurzelhaarentwicklung ist allerdings noch nicht geklärt, zumal es zu diesem Thema widersprüchliche Veröffentlichungen gibt (SCHMIDT et al. 2000 und Referenzen darin).

Die Mobilisierung von Eisen wird bei Strategie I-Pflanzen, zu denen sämtliche dikotyle Pflanzen, wie auch *Arabidopsis*, zählen durch eine kombinierte Reaktion von einer Reduktase und einer H^+ -ATPase erreicht (WATERS et al. 2002, SCHMIDT 2003). Die bei Eisenmangel durch H^+ -ATPase vermittelte Ansäuerung der Rhizosphäre steigert die Aktivität einer Plasmamembran-gebundenen Reduktase, was zu einer erhöhten Expression eines Fe^{2+} -Transporters führt (FOX et al. 1996, ROBINSON et al. 1999, DELL' ORTO et al. 2000). Bei Unterbrechung des polaren Auxintransports vom Keimling zu der Wurzel, wird die Rhizosphäre bei Eisenmangel nicht angesäuert (SCHMIDT et al. 2000). Dies spricht für eine Reaktion von Auxin auf Eisenmangel, zumal Auxin erwiesenermaßen die Protonensekretion der Zellen erhöht (SCHERER 2002). Zudem testeten SCHMIDT und SHIKORA 2001 Auxin-resistente Mutanten auf Eisenmangelmedium. Hierbei konnten sie eine Verbindung zwischen der Verfügbarkeit des Nährstoffes Eisen und der Auxinsignalkette nachweisen.

Sowohl mit als auch ohne Eisen kam es bei *aux1*, *axr1* und *axr2* nicht zu einer Erhöhung der Wurzelhaardichte, während der Wildtyp dies eindeutig zeigte. Ein direkter Nachweis fehlt zwar bisher, aber alle vorliegenden Daten sprechen für eine Einbindung von Auxin in die Reaktion auf Eisenmangel.

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass Auxin eine dominante funktionelle Bedeutung in der Haupt- und Seitenwurzelbildung hat, welche anhand der ermittelten Daten auch durch Eisenmangel beeinflusst wird. Die anderen Nährstoffe wie Sulfat, Phosphat oder Nitrat scheinen zudem zusätzlich (oder ausschließlich) eine Wirkung auf andere Phytohormone wie Auxin zu haben. Aufgrund der hier zusammengestellten Daten folgt nun die Betrachtung der ermittelten Wurzelmorphologie der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen.

4.2.2 *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* haben eine verminderte Seitenwurzelanzahl und reagieren sensitiv auf Eisenmangel

Bei Wachstum der Insertionsmutanten auf einer Nitratkonzentrationsreihe, Phosphatmangel-Medium und Sulfatmangel-Medium kam es zu keiner Veränderung der Morphologie der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* gegenüber dem Wildtyp Columbia 0. Das Wachstum auf Minimal-Medium resultierte in einer 50 %igen Verminderung der Seitenwurzelanzahl von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* gegenüber dem Wildtyp. Bei einer Auxinkonzentrationsreihe auf Minimal-Medium war das Ergebnis nicht eindeutig. Während die *AtPLA IVA* Insertionsmutanten bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol} / \text{l}$ NAA eine dem Wildtyp entsprechende Seitenwurzelanzahl zeigten, war bei anderen die Seitenwurzelanzahl wie bei den Versuchen auf Minimal-Medium ohne Auxinzusatz vermindert. Das Wachstum auf MS-Vollmedium zeigte keine morphologischen Unterschiede von Mutante und Wildtyp. Auch bei Zusatz verschiedener Auxinkonzentrationen waren die Mutanten dem Wildtyp morphologisch gleich.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Mutanten von *AtPLA IVA* sensitiver auf Eisenmangel reagieren als der Wildtyp Columbia 0. Bei Wachstum auf Eisen-Mangelmedium waren die Hauptwurzeln des Wildtyps und der Mutanten gegenüber dem Wachstum auf Minimal-Medium reduziert. Die Hauptwurzeln von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* sind bei Eisenmangel gegenüber dem Wildtyp um 30-35 % reduziert. Die Seitenwurzelanzahl ist bei den Mutanten erhöht (0,48 (+/- 0,07) mm gegenüber 0,39 (+/- 0,07) mm Seitenwurzeln / mm beim WT Columbia 0). Eine mikroskopische Untersuchung auf Eisenmangelmedium zeigte keine Verlängerung der Wurzelzellen von Wildtyp zu Mutante. Das Wachstum auf Eisenmangelmedium zeigte zudem eine Verkürzung des Hypokotyls um 25 % bei den Mutanten.

AtPLA IVA ist nicht in eine sulfat- oder phosphatinduzierte Reaktion eingebunden. Bei der morphologischen Untersuchung der Insertionsmutanten auf der Nitrat-Konzentrationsreihe wurde das Medium verwendet, mit welchem bereits ZHANG et al. Hinweise auf eine Funktion von Auxin in der Nitratreaktion erhielten. Allerdings wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, die Wurzeln der Keimlinge von niedriger Nitratkonzentration in hohe Nitratkonzentration hineinwachsen zu lassen. Anhand der ermittelten Daten muss aber davon ausgegangen werden, dass es unter Nitrateinfluss zu keiner morphologischen Veränderung der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* (und auch *AtPLA IVB*) gegenüber dem Wildtyp kommt und somit *AtPLA IVA* nicht in eine Nitrat-induzierte Reaktion eingebunden ist.

Auxin hat eine anhand der Literaturdaten klar nachgewiesene Funktion in der Seitenwurzelbildung (CASSON und LINDSEY 2003). Des Weiteren haben alle in der Literatur erwähnten Mutanten mit verminderter Seitenwurzelanzahl eine Funktion in der Auxinsignaltransduktion (u. a. LINCOLN et al. 1990). *AtPLA IVA* ist anhand der ermittelten Daten der Insertionsmutanten in die Bildung von Seitenwurzeln eingebunden. Da zwei verschiedene Signalwege für die Bildung der Hauptwurzel und die Ausbildung von Seitenwurzeln postuliert werden, ist eine Funktion von *AtPLA IVA* in der Auxinsignalkette wahrscheinlich. Eine exogene Auxinapplikation führte nicht zu einer eindeutigen Angleichung der Seitenwurzelanzahl von *Atpla IVA-1* und *Atpla IVA-2* im Vergleich zum Wildtyp.

In der Literatur ist dies am Beispiel der *slr*-Mutante ebenfalls beschrieben worden. Diese Mutante kann keine Seitenwurzeln ausbilden, hat aber eine nachgewiesene Funktion in der Auxinsignalkette und eine exogene Auxinapplikation führt bei der *slr*-Mutante nicht zu einer Wiederaufnahme der Seitenwurzelbildung (TIWARI et al. 2001). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass exogen zugesetztes Auxin nicht bei allen Mutanten im Auxinsignalweg zu einer gleichartig vermehrten Seitenwurzelbildung wie im Wildtyp führt. Im Fall von *Atpla* IVA-1 und *Atpla* IVA-2 bleibt auf Minimal-Medium mit Auxinzusatz zum Teil die Seitenwurzelanzahl der Insertionsmutanten von *AtPLA* IVA gegenüber dem Wildtyp reduziert, während zum Teil die gleiche Seitenwurzelanzahl wie beim Wildtyp vorhanden ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass exogen zugesetztes NAA möglicherweise durch Aktivierung redundanter Gene der *AtPLA*-Familie eine Angleichung der Seitenwurzelanzahl zwischen den Insertionsmutanten und dem Wildtyp erzielt, dies aber durch die Störung von *AtPLA* IVA nicht vollständig und durchgängig der Fall ist.

Bei Eisenmangel sind die seitenwurzelbildenden Zellen nicht in ihrer Aktivität gehemmt, während die meristematischen Zellen der Hauptwurzel ihre Teilungsrate reduzieren (LÓPEZ-BUCIO et al. 2003). Dies entspricht den ermittelten Daten, wobei die Mutanten wesentlich sensitiver auf Eisenmangel reagieren als der Wildtyp Columbia 0.

Eisenmangel führt bei den Insertionslinien von *AtPLA* IVA im Vergleich zum Wildtyp zu einer verkürzten Hauptwurzel. Da *AtPLA* IVA ausschließlich in der Wurzel exprimiert wird, ist das, ebenfalls nachgewiesene, verkürzte Hypokotyl der Insertionsmutanten höchstwahrscheinlich auf die mangelhafte Versorgung durch die verminderte Hauptwurzel zurückzuführen. Anhand der Literaturdaten wurde nachgewiesen, dass Auxin-abhängige Reaktionen wahrscheinlich durch Eisenmangel aktiviert werden können, zumal bei Eisenmangel die Rhizosphäre nicht angesäuert wird, wenn der polare Auxintransport unterbrochen ist (SCHMIDT et al. 2000). Da Auxin unter Eisenmangel einen Einfluss auf die Hauptwurzellänge hat, spricht dies für eine Funktion von *AtPLA* IVA in der Auxinsignaltransduktion.

Allerdings ist bei dem Wachstum auf Minimal-Medium weder eine Verkürzung noch eine Verlängerung der Hauptwurzel der Insertionsmutanten gegenüber dem Wildtyp zu sehen. Dies spricht für zwei verschiedene Aktivierungsmechanismen von *AtPLA IVA*, wobei der eine nur unter Eisenmangel eintritt, während bei dem anderen *AtPLA IVA* eine funktionelle Bedeutung in der Seitenwurzelbildung unter eisenreichen Bedingungen hat. Zudem sind in der Literatur auch zwei verschiedene Reaktionswege für die Seitenwurzelbildung und die Entwicklung der Primärwurzel beschrieben (CASSON und LINDSEY 2003). Aufgrund dessen ist es möglich, dass *AtPLA IVA* in beide eingebunden ist, und demnach Gene unterhalb von *AtPLA IVA* reguliert werden, die eine Funktion in der Seiten- oder der Hauptwurzelbildung haben. Da anhand der ermittelten Literatur ein Zusammenhang zwischen Auxin, der Seitenwurzelbildung und dem Vorhandensein von Eisen besteht, ist es durchaus möglich, dass es sich bei Auxin um das aktivierende Element von *AtPLA IVA* handelt. Demnach kommt es aufgrund einer Störung der Eisenvermittelten Auxinsignaltransduktion durch das fehlende Transkript von *AtPLA IVA* zu einer höheren Sensitivität der Insertionsmutanten. Eine endgültige Aussage kann aber anhand der ermittelten Daten noch nicht getroffen werden, da der Nachweis eines direkten Zusammenhangs zwischen der Aktivierung von Auxinsignalwegen bei Eisenmangel noch aussteht.

Die β -Glucuronidase-Aktivität der *PIVA::uidA* Pflanzen konnte in dieser Arbeit nicht in der Wurzelspitze nachgewiesen werden und wurde entwicklungsunabhängig in der Wurzel exprimiert, was mit den Daten von RIETZ (2002) übereinstimmt. Da eine morphologische Veränderung der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* bei Eisenmangel zu beobachten war, wurden die *PIVA::uidA* Pflanzen unter Eisenmangel untersucht, wobei es zu einer erhöhten β -Glucuronidase-Aktivität kam. *AtPLA IVA* wurde durch Promotor::*uidA*-Analyse in der Wurzel lokalisiert und eine β -Glucuronidase-Aktivität konnte bereits nach 20 Minuten Inkubationszeit ermittelt werden (RIETZ 2002). Während bei den *PIVA::uidA* Pflanzen, die auf Minimal-Medium angezogen wurden nur eine wesentlich schwächere β -Glucuronidase-Aktivität nachzuweisen war, zeigten die *PIVA::uidA* Pflanzen auf Eisenmangel bereits nach 20 Minuten Inkubationszeit eine deutliche Färbung der Wurzel durch *PIVA::uidA*.

Anschließende, quantitative Analyse zeigte, je nach PIVA::*uidA*-Linie, eine Aktivitätserhöhung der β -Glucuronidase bei Eisenmangel von 168 bis 361 %. Diese Daten bestätigen die Funktion von *AtPLA IVA* im Zusammenhang mit Eisenmangel, wobei sich die ermittelten Daten auf die Aktivität des Promotors von *IVA* beziehen. Eine Untersuchung des Transkripts von *AtPLA IVA* steht noch aus. Die vorhandenen Daten sprechen jedoch für eine kontinuierliche Expression von *AtPLA IVA* in der Wurzel und für eine erhöhte Transkriptionsrate bei Eisenmangel. Dies erklärt wiederum die veränderte Morphologie und erhöhte Sensitivität der Insertionsmutanten von *AtPLA IVA* im Vergleich zum Wildtyp bei Eisenmangel.

In fortführenden Arbeiten sollten die vorhandene Daten der Transkriptionsanalyse durch Untersuchungen am regulären Transkript von *AtPLA IVA* mittels RT-PCR oder Northern-Blot Analyse untermauert werden, wobei die Promotor::*GUS* Untersuchungen bereits entscheidende Hinweise liefern. Des Weiteren reagierten auch Promotor::*GUS* Pflanzen von *AtPLA IIA* mit einer erhöhten β -Glucuronidase-Aktivität auf Eisenmangel (RIETZ et al. 2004). Eine morphologische Untersuchung der Insertionsmutanten von *AtPLA IIA* steht jedoch noch aus. Dies kann weitere Hinweise auf die Funktion von Eisen in Bezug auf die *AtPLA*-Genfamilie zeigen, zumal *AtPLA IIA* auch in der Wurzel exprimiert wird und eine nachgewiesene Funktion in der Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren hat (NARUSAKA et al. 2004)

4.2.3 *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-2* reagieren auf exogene Auxinapplikation

Auf den Entzug von Nährstoffen reagierten die Insertionsmutanten von *AtPLA IVB* mit keiner morphologischen Änderung gegenüber dem Wildtyp, sodass *AtPLA IVB* nicht in eine eisen-, sulfat- oder phosphatinduzierte Reaktion involviert ist. Zudem zeigten sich auch hier auf einer Nitratkonzentrationsreihe keine Unterschiede zwischen den Insertionsmutanten von *AtPLA IVB* und dem Wildtyp, sodass auch hier eine nitratvermittelte Reaktion ausgeschlossen werden kann.

Die Mutanten reagierten auf eine exogene Auxinzugabe mit Ausbildung von mehr Seitenwurzeln gegenüber dem Wildtyp. Synthetische Auxine werden nicht so rasch metabolisiert wie das natürlich vorkommende Auxin IAA (TAIZ und ZEIGER 2000). Aufgrund dessen wurde für diese Langzeitversuche ausschließlich das synthetische Auxin 1-Naphtyllessigsäure (NAA) verwendet. Die Insertionsmutanten zeigten gegenüber dem Wildtyp Columbia 0 bei einer Zugabe von 0,1 $\mu\text{mol} / \text{l}$ exogenem Auxin eine Erhöhung von 0,65 (+/- 0,49) bzw. 0,74 (+/- 0,05) zu 0,49 (+/- 0,07) Seitenwurzeln pro Millimeter Hauptwurzel.

Auxin hat, wie anhand der Literatur dargestellt ist, die wichtigste Funktion in der Seitenwurzelbildung. Die Ergebnisse sprechen für eine reprimierende Funktion von *AtPLA IVB* bei Applikation von exogenem Auxin. Das Wachstum der Hauptwurzel wurde, wie bei *Atpla IVA*, durch das Fehlen des Transkripts von *AtPLA IVB* nicht beeinflusst, da diese sowohl bei den Mutanten als auch beim Wildtyp eine vergleichbare Länge bei identischer Auxinkonzentration hatten. Da *AtPLA IVB* anhand der Ergebnisse eine Funktion in der Seitenwurzelbildung hat, ist eine Funktion von *AtPLA IVB* in der Auxinsignalkette möglich. In diesem Fall würde sich die funktionelle Bedeutung von *AtPLA IVB* jedoch auf die Ausbildung von Seitenwurzeln beschränken und nicht auf die Bildung der Hauptwurzel. Dies ist möglich, da zwei verschiedene Signalwege für die Bildung der Hauptwurzel und die Ausbildung von Seitenwurzeln postuliert werden (CASSON und LINDSEY 2003).

Die endogene Auxin-Konzentration wurde bei den Versuchen nicht gemessen. Auch der Ausfall einer Auxinwirkung oder eine veränderte Sensitivität wurden durch die Daten nicht erfasst.

Aufgrund dessen kann nur von den morphologisch vorliegenden Daten ausgegangen werden, und anhand dieser auf die endogene Wirkung von Auxin geschlussfolgert werden. Anhand dieser Daten hat das endogene Auxin in Bezug auf die Haupt- und die Seitenwurzeln keinen offensichtlichen morphologischen Einfluss auf die Insertionsmutanten von *AtPLA IVB*.

So lässt sich vermuten, dass endogenes Auxin entweder keinen Einfluss auf die Transkription von *AtPLA IVB* hat, oder der Einfluss zu gering ist um morphologisch nachweisbar zu sein.

Da es noch neun weitere Patatin-ähnliche Phospholipasen A in *Arabidopsis* gibt, von denen acht nachweislich in der Wurzel exprimiert werden, ist es durchaus möglich (OPPERMANN 2001, HOLK et al. 2002, persönl. Mitteilung P. PIETRZYK), dass diese bei den Insertionsmutanten von *AtPLA IVB* einen Teil der Funktion von *AtPLA IVB* übernehmen, sodass ohne exogenes Auxin die Wurzelmorphologie identisch im Vergleich zum Wildtyp ist. Erst mit Zugabe von exogenem Auxin kommt es dann zu einem offensichtlichen morphologischen Effekt. Falls das exogen zugesetzte Auxin zu einer Erhöhung der intrazellulären Auxin-Konzentration geführt hat und die Sensitivität gegenüber Auxin bei den Insertionsmutanten von *AtPLA IVB* vermindert ist, würde dies erklären, warum der morphologische Effekt von endogenem Auxin bei *Atpla IVB-1* und *Atpla IVB-2* nicht nachweisbar war. Diese Annahmen sind jedoch rein hypothetisch, da die durchgeführten Versuche keine Schlussfolgerung auf die endogene Auxinkonzentration oder eine veränderte Sensitivität zulassen. Jedoch lassen die Versuche die Schlussfolgerung zu, dass das Transkript von *AtPLA IVB* eine Reaktion auf Auxin zeigt und aufgrund dessen eine Einbindung in die Auxinsignaltransduktion möglich ist.

Als weiteres Hilfsmittel, um die Funktion von *AtPLA IVB* näher zu untersuchen, wurden *PIVB::uidA* Pflanzen auf eine Auxinreaktion untersucht. Die β -Glucuronidase-Aktivität von *PIVB* ist vor allem in jungen, sich entwickelnden Geweben zu finden.

Nach fünftägiger Anzucht zeigt der Keimling eine β -Glucuronidase-Aktivität in der gesamten Wurzel mit Ausnahme der Wurzelspitze, während die Aktivität bei zehn Tage alten Pflanzen nur noch auf das untere Drittel der Haupt- und Seitenwurzeln beschränkt ist. Die β -Glucuronidase-Aktivität konnte jedoch nur in jungen Wurzeln nachgewiesen werden, woraus eine entwicklungsabhängige Funktion von *AtPLA IVB* in der Wurzel resultiert. Auch die Aktivität in den anderen Organen war entwicklungsabhängig. In fünf Tage alten *PIVB::uidA* Keimlingen war eine leichte Aktivität in den Kotyledonen erkennbar, welche bei zehn Tage alten Pflanzen in Kotyledonen und Blättern wesentlich ausgeprägter war. Nach fünf Wochen Wachstum ist die β -Glucuronidase-Aktivität auf die Mittelader junger Blätter beschränkt. Zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch eine β -Glucuronidase-Aktivität in den Filamenten und im Blütenboden nachgewiesen. Nach der Fruchtreife kommt es in der Blütenabwurfzone zu einer β -Glucuronidase-Aktivität.

Die β -Glucuronidase-Aktivität in jungen, sich entwickelnden Blättern spricht für eine Funktion von PIVB in der Reaktion auf Auxin. In den Literaturdaten wird die Bildung von Auxin in apikalen Wachstumsgeweben, wie jungen Blättern postuliert, von wo aus, zumindest IAA, in die basalen Pflanzengewebe transportiert wird (LOMAX et al. 1995). Eine entwicklungsabhängige Auxinaktivität in jungen Blättern, gemessen an DR5::GUS Pflanzen, gleicht in der Gewebeverteilung und in dem Rückgang im Alter der β -Glucuronidase-Aktivität bei PIVB::*uidA* (MATTSON et al. 2003). Die β -Glucuronidase-Aktivität von PIVB::*uidA* wird durch Auxin reduziert. Je höher die Auxinkonzentration desto geringer war die β -Glucuronidase-Aktivität von PIVB. Vor allem in der Wurzel ließ sich ein Rückgang der β -Glucuronidase-Aktivität mit steigender exogenen Auxinkonzentration und auch im Alter nachweisen. Diese Daten konnten durch eine quantitative GUS-Analyse bestätigt werden.

Der Nachweis eines Transkripts im Blütenboden weist anhand der ermittelten Daten auf einen möglichen Auxin-abhängigen Einfluss auf Ethylen hin, welches eine Funktion im Blattabwurf hat. Es ist aber noch nachzuweisen, inwieweit die Mutanten von *AtPLA IVB* und auch die PIVB::*uidA*-Pflanzen auf exogen zugesetzte 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure, einem Vorläufer von Ethylen, reagieren.

Eine exogene Auxinapplikation führt somit zu einer Herunterregulation von *AtPLA IVB* und das Transkript von *AtPLA IVB* hat hemmende Wirkung auf die Seitenwurzelbildung. Daraus resultiert eine Einbindung von *AtPLA IVB* in der Reaktion auf Auxin.

4.3 Enzymcharakteristik von IVB, IVB_{CT} und IVB_{mut}

Um herauszufinden, inwieweit IVB in seinen enzymatischen Eigenschaften IVA gleicht, wurden die enzymatischen Eigenschaften von IVB untersucht. IVB wurde als N-terminales 6 x Histidin-Protein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Die Aktivität von IVB wurde durch Hydrolyse eines unter UV-Licht fluoreszierenden Phospholipids in LysoPC und Fettsäure nachgewiesen, welches an beiden Fettsäuren ein Fluorochrom trägt und in vorhergehenden Experimenten *in vivo* verwendet wurde, um die Auxinaktivierung einer PLA nachzuweisen (PAUL et al. 1998).

Eine sekretorisch lokalisierte PLA₂ aus *Arabidopsis* war erst nach Entfernung eines N-terminalen Bereichs aktiv, welcher als Signalpeptid identifiziert wurde (LEE et al. 2003). Da dies bei IVB nicht nötig ist, muss davon ausgegangen, dass es sich, wie bei allen bisher untersuchten Patatin-ähnlichen PLAs, um ein im Cytosol lokalisiertes Enzym handelt. Durch Versuche mit einem Phospholipid, welches nur an der *sn2*-Position eine fluoreszierende Fettsäure trägt, konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym sowohl PLA₁- als auch PLA₂-Aktivität besitzt. Das pH-Optimum liegt bei einem pH-Wert von 7,3, womit es dem cytosolischen pH-Wert entspricht. IVB weist eine geringe Aktivität ohne Ca²⁺-Ionen Zugabe auf. Die Aktivität nimmt bei Zusatz von bis zu 1,0 mmol / l Calciumchlorid zu. In dieser Hinsicht korreliert IVB mit den Enzymen IIA (RIETZ et al. 2004) und IVA (HOLK et al. 2002). Die Ca²⁺-Ionenkonzentration im Cytosol liegt normalerweise bei 10⁻⁴ mmol / l und somit deutlich unter den verwendeten Testbedingungen. Die eingesetzte Ionenkonzentration des *in vitro* Experiments spiegelt also in keiner Weise die Situation im Cytosol der Zelle wieder. Es ist möglich, dass die *in vitro* Ionenkonzentration eine Konformationsänderung der Phospholipase bewirkt, sodass die *in vitro* vorhandene Calcium-Ionenkonzentration nichts mit einer möglichen *in vivo* Ca²⁺-Abhängigkeit des Enzyms zu tun hat.

Durch Charakterisierung der Enzymeigenschaften und unter Verwendung von Hemmstoffen wurde geklärt, inwieweit das Enzym IVB den bereits charakterisiertem Enzym IVA und den iPLA₂ der Tiere gleich. Es folgt ein kurzer Überblick über die hierfür verwendeten Hemmstoffe.

Der Inhibitor AACOCF₃ ist ein Arachidonsäureanalogon, das ausschließlich cytosolische, Ca²⁺-abhängige und -unabhängige PLA₂ reversibel hemmt, indem es mit den natürlichen Fettsäuren um die Bindungsstelle konkurriert (KUWATA et al. 1998). AACOCF₃ hemmt *in vivo* die Systemin-induzierte Bildung von Lysophosphatidylcholin in Tomate (NARVÁEZ-VÁSQUEZ et al. 1999), sowie die Aktivität einer PLA der Bohne *in vitro* (JUNG und KIM 2000). PACOCF₃ ist, wie AACOCF₃, ein Fettsäureanalogon, welches reversibel iPLA₂ und in hohen Konzentrationen auch cPLA₂ hemmt (LIO et al. 1996). ETYA hemmt in Tierzellen den Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Weg (EKOKOSKI et al. 1994). In der Pflanze wurde nachgewiesen, dass ETYA das Auxin-induzierte Hypokotylwachstum etiolierter *Arabidopsis*-Keimlinge *in vivo* hemmt (HOLK et al. 2002).

HELSS hemmt irreversibel die iPLA₂-Aktivität von Tieren durch Bindung an das Serin des aktiven Zentrums (IC₅₀ = 60 nmol / l). Somit kann durch diesen Hemmstoff die Aktivität der Patatin-ähnlichen PLA eindeutig identifizieren werden. HELSS inhibiert in höheren Konzentrationen aber auch cPLA₂ (IC₅₀ = 60 mmol / l) und andere Enzyme des zellulären Phospholipidmechanismus, die aber in Pflanzen nicht vorhanden ist (ACKERMANN et al. 1995, TANG et al. 1997, BALSINDE et al. 1999). In Pflanzen hemmt HELSS *in vivo* die Auxin-induzierte Elongation von etioliertem *Arabidopsis*-Hypokotyl (HOLK et al. 2002).

NDGA ist ein selektiver Lipoxygenase-Hemmstoff, welcher in höheren Dosierungen auch Cyclooxygenase hemmt (DOMIN et al. 1994). In Pflanzen konnte die Hemmung einer Lipoxygenase der Sojabohne durch NDGA nachgewiesen werden (MACRI et al. 1994). Die Hemmung der PLA-Aktivität durch NDGA ist *in vivo* an Auxin- und Elicitor-induzierten Petersilienkulturzellen gezeigt worden (PAUL et al. 1998, SCHERER et al. 2000).

Das Enzym IVB zeigte bei Zugabe der Hemmstoffe AACOCF₃, ETYA und PACOCF₃ einen Aktivitätsrückgang (halb max. Hemmung bei 40 µmol / l, 5 µmol / l und 70 nmol / l), wobei es den Eigenschaften von IVA sehr ähnelte. IVB wurde von NDGA jedoch nur sehr schwach und von HELSS gar nicht in seiner Aktivität gehemmt.

Um auszuschließen, dass es durch die Kopfgruppe Cholin des verwendeten Phospholipids zu der Unempfindlichkeit von IVB gegenüber HELSS kam, wurde fluoreszierendes Phosphatidylethanolamin ebenfalls mit HELSS getestet. Auch hier trat kein Aktivitätsverlust auf. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität von IVA durch HELSS und alle anderen Inhibitoren gehemmt. IVA reagierte auch sensitiver auf eine Zugabe von NDGA (HOLK et al. 2002). Das Enzym IIA zeigte jedoch ähnliche Eigenschaften wie IVB (RIETZ et al. 2004). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass die unterschiedlichen Reaktionen auf die eingesetzten Hemmstoffe durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz verursacht werden. Bei dem Vergleich der Aminosäuren von IVA und IVB liegen im Bereich der aktiven Zentren der Enzyme keine andersartigen Aminosäuren. Die meisten Sequenzabweichungen sind im C-Terminus der Enzyme zu finden. Aufgrund dessen wurde der C-Terminus von IVB direkt hinter dem hoch konservierten „YLRID“ Motiv ab Aminosäure 335 entfernt, und das dadurch entstandene Enzym IVB_{CT} exprimiert und enzymatisch charakterisiert. Die Hemmung des Enzyms durch die Inhibitoren AACOCF₃, ETYA und PACOCF₃ ist der von IVB sehr ähnlich (halb max. Hemmung 40 µmol / l, 5 µmol / l bzw. 60 nmol / l). Demnach hat das Entfernen des C-Terminus keinen Effekt auf die Sensitivität des Enzyms gegenüber diesen Hemmstoffen. IVB_{CT} wird jedoch durch HELSS gehemmt und reagiert deutlicher auf NDGA als IVB (halb max. Hemmung 250 µmol / l bzw. 25 µmol / l). Damit unterscheidet es sich deutlich von dem vollständigen Enzym IVB und zeigt zudem dieselbe Sensitivität auf die einzelnen Hemmstoffe wie IVA.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden die fünf Aminosäuren, die bei IVB physikochemisch von IVA abwichen, durch *Site Directed Mutagenesis* verändert und der Aminosäuresequenz von IVA angeglichen. Von diesen fünf Aminosäuren lagen vier in der bei IVB_{CT} entfernten C-terminalen Region von IVB. Jede Mutation änderte eine stark polare Aminosäure in eine hydrophobe oder umgekehrt. IVB_{mut} zeigt bei Zugabe von NDGA (halb max. Hemmung 15 µmol / l) eine ähnliche Hemmbarkeit wie IVA und IVB_{CT}. Die Sensitivität gegen HELSS konnte in IVB_{mut} im Verhältnis zum Enzym IVA nicht vollständig wieder hergestellt werden (halb max. Hemmung 1,0 µmol / l).

Während der Reaktionsmechanismus von NDGA unklar ist, ist bekannt, dass HELSS kovalent an das Serin im aktiven Zentrum von Ca^{2+} -unabhängigen PLA_2s gebunden wird (BALSINDE et al. 1999, MANCUSCO et al. 2000). Das Enzym IVA konnte durch HELSS gehemmt werden, IVB jedoch nicht. Da kein Unterschied in der Aminosäuregröße oder -sequenz im Bereich um das aktive Zentrum der Enzyme zu finden ist, spricht alles für eine regulatorische Bedeutung des C-Terminus bei Patatin-ähnlichen PLAs.

Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Beispiel aus der pflanzlichen Zelle für die regulatorische Funktion des C-Terminus ist die Plasmamembran-Protonenpumpe (SERRANO et al. 1992, REGENBERG et al. 1995).

Um die Bedeutung des C-Terminus zu manifestieren, wurden Versuche mit reinem bis-BODIPY-PC als Substrat durchgeführt (nach VIEHWEGER et al. 2002), statt der ansonsten mit Liposomen durchgeführte Experimente. Die Liposomen bestanden aus einer Mischung aus Soja-Phosphatidylcholin und bis-BODIPY-PC. Die Enzyme IVA und IVB zeigten mit diesem Substrat keine Aktivität. Jedoch war das Enzym IVB_{CT} deutlich aktiver und ein Umsatz des bis-BODIPY-PC in die Metaboliten Fettsäure und Lysophosphatidylcholin zu beobachten. Es ist also möglich, dass der C-Terminus das aktive Zentrum von IVB gegenüber dem Hemmstoff HELSS abschirmt, sodass dieser bei IVB den Zugang partiell abschirmt.

Aus der dreidimensionalen Kristallstruktur von Patatinen wurde abgeleitet (RYDEL et al. 2003), dass ein nicht-helikaler Teil des C-Terminus von Aminosäure 325 bis 335 den Tunnel des aktiven Zentrums des Enzyms zu umrahmen scheint. Dieser Teil könnte demnach für die veränderte Sensitivität von IVB, IVB_{CT} und IVB_{mut} gegenüber HELSS verantwortlich sein.

Bei einer Analyse der Sekundärstruktur des restlichen C-Terminus von Aminosäure 325 bis 414 mit dem Computerprogramm SOPMA zeigt sich (GEOURJON et al. 1995), dass IVA und IVB_{mut} sich möglicherweise an zwei Stellen von IVB unterscheiden, wodurch es zu verschiedenen Konformationen der beiden C-Termini kommen könnte. Resultierend könnten die vier geänderten Aminosäuren bewirken, dass der C-Terminus von IVB_{mut} das aktive Zentrum partiell zugänglich für HELSS macht.

Dies ist bei dem Enzym IVB wahrscheinlich nicht der Fall. Die Analyse der Enzymcharakteristik ist ein Indiz für einen posttranslationalen Aktivierungsmechanismus der Patatin-ähnlichen Phospholipasen durch den C-Terminus.

Dieser ist eventuell wie bei der humanen cPLA₂ (DESSEN et al. 1999) auf einen flexiblen „Deckel“ zurückzuführen, der hier im C-Terminus des Enzyms zu finden sein könnte. Somit zeigt die Summe der hier beschriebenen Merkmale des Enzyms IVB die nötigen Eigenschaften, um den schnellen Aktivierungsschritt in der Auxinsignaltransduktion, Substratspezifität, Inhibitorspezifität und Hemmbarkeit des Enzyms und der physiologischen Reaktion durch die gleichen Inhibitoren HELSS, ETYA und NDGA erklären zu können (PAUL et al. 1998, HOLK et al. 2002). Auch eine schnelle, posttranslationale Aktivierung durch z. B. die Phosphorylierung des C-Terminus ist denkbar, kann aber erst durch weitere Untersuchungen manifestiert werden. Die hier gezeigten Experimente liefern jedoch erste entscheidende Hinweise.

4.4 Schlussfolgerung

Die Annahme, dass IVA (RIETZ 2002) und IVB (diese Arbeit) beide eine Funktion in der Auxinsignaltransduktion haben, wird durch ihre enzymologischen Eigenschaften unterstützt. Dabei liefern die Funktionsanalysen von *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* durch Untersuchung der Insertionslinien, ihrer Expressionsmuster und der Reaktionen der Genexpression weitere unterstützende Argumente für diese These. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass beide Gene in der Seitenwurzelbildung, einer für Auxin typischen Funktion, notwendig sind. Im Fall von *AtPLA IVA* ist dies bei dem Vergleich der Insertionslinien und des Wildtyps direkt sichtbar.

Auch der Phänotyp bei Eisenmangel ist voraussichtlich von Auxin gesteuert (SCHMIDT und SHIKORA 2001), und für die Steuerung der morphologischen Merkmale ist *AtPLA IVA* notwendig. Die Expression von *AtPLA IVB* wird durch Auxin reprimiert, auch wenn ein Experiment zur Auxinsteuerung des Wildtyp-Gens noch durchgeführt werden muss. Ferner bildet die Insertionsmutante von *AtPLA IVB* mehr Seitenwurzeln bei Zusatz von exogenem Auxin.

Diese beiden Eigenschaften sind funktionell in die gleiche Zielrichtung interpretierbar, nämlich in einer Hemmung oder Funktion der Seitenwurzelbildung durch *AtPLA IVB*. Ob auch eine Hemmung der Aktivität des Proteins durch eine Auxinsignaltransduktionskette ausgelöst wird, muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar bleiben. Es ist aber nicht zwingend notwendig, denn auch die Aktivierung des Proteins könnte zur Regulation der Genexpression eines oder vieler Gene, darunter *AtPLA IVB*, führen.

Es ist möglich, dass eine *sPLA₂* ebenfalls eine Funktion in der Auxinsignaltransduktion hat, wie von RYU und Mitarbeitern postuliert wird (LEE et al. 2003). Aber dann ist diese Funktion voraussichtlich durch Genaktivierung des *sPLA₂*-Gens zu verstehen, da ein extrazelluläres Enzym nicht an die rezeptorgesteuerten Aktivierungsvorgänge in der Signaltransduktion gekoppelt sein kann. Die Transkription dieses Gens wird frühestens 30 Minuten nach exogener Auxinapplikation heraufreguliert. Es könnte so im späteren Verlauf der auxingesteuerten Reaktionen die gleichen oder ähnliche Fettsäuren oder Lysolipide als sekundäre Botenstoffe freisetzen und so eine Co-Funktion zu den wahrscheinlich schnell aktivierbaren Patatin-ähnlichen PLAs haben.

Die hohe Übereinstimmung zwischen den Aminosäuresequenzen von IVA und IVB legt die Vermutung nahe, dass ein Gen aus der Duplikation des anderen hervorgegangen ist. Eine Genduplikation kann entweder dazu führen, dass eine Kopie des Gens stillgelegt wird, gegenüber dem ursprünglichen Gen eine veränderte Funktion hat, oder sich beide Gene die ursprüngliche Funktion teilen. Im letzten Fall wird die Aktivität der Gene durch eine Mutation reduziert, sodass beide zusammen auf dem Aktivitätslevel des ursprünglichen Gens arbeiten (LYNCH und CONERY 2000).

Neueste Erkenntnisse postulieren, dass die Duplikation heute vorhandener Tandem-Gene in *Arabidopsis* vor 10-12 Millionen Jahren stattgefunden hat, während die Duplikation des gesamten Genoms zu einem anderen Zeitpunkt vor 25 Millionen Jahren stattgefunden hat (BLANC und WOLFE 2004). Andere Studien postulieren ein einziges Duplikationsereignis von *Arabidopsis* (vor 112 Millionen Jahre: KU et al. 2000, vor 65 Millionen Jahre: LYNCH und CONERY 2000, vor 38 Millionen Jahre: ERMOLAEVA et al. 2003).

Auch wenn sich der genaue Zeitpunkt der Duplikation nicht einordnen lässt, ist es dennoch mehr als wahrscheinlich, dass es sich bei *AtPLA IVA* und *AtPLA IVB* um duplizierte Gene handelt. Beide Transkripte sind offenbar funktionsfähig und haben funktionell zwar ähnliche, aber nicht identische Funktionen. Dies äußerte sich sowohl in der morphologischen Funktionsanalyse, als auch in der Proteinanalyse.

Allerdings sind offenbar die Wurzelfunktionen erhalten geblieben, wobei diese durch die Evolution stark divergierend entwickelt sind. Die klare Funktion von *AtPLA IVA* in der Eisenaquisition ist bei *AtPLA IVB* nicht vorhanden, und die Transkription von *AtPLA IVB* wird durch Auxin reprimiert. Die Transkription von *AtPLA IVB* reprimiert die Seitenwurzelbildung, während *AtPLA IVA* für diese nötig ist. Anhand der vorliegenden Daten kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht entschieden werden, welche Funktionen vom ursprünglichen Gen, vor der Tandem-Duplikation, gesteuert wurden.

5 Literatur

- ABEL, S., NGUYEN, J. T., CHOW, W. & THEOLOGIS, A. (1995). *ACS4*, a primary indolacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana* - characterization, expression in *E. coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem*, 270:19093-19099.
- ABELES, F., MORGAN, P. & SALTVEIT, M. (1992). *Ethylene in plant biology*. New York: Academic Press.
- ABRC. (2004). Handling *Arabidopsis* plants and seeds. www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/.
- ACKERMANN, E. J., CONDE-FRIEBOES, K. & DENNIS, E. A. (1995). Inhibition of macrophage Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem*, 270:445-450.
- ADAMS, M. D. E. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287:2185-2195.
- AKIBA, S. & SATO, T. (2004). Cellular function of Calcium-independent phospholipase A_2 . *Biol Pharm Bull*, 27:1174-1178.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio: VCH: VCH Verlagsgesellschaft.
- ALONSO, J. M., STEPANOVA, A. N., LEISSE, T. J., KIM, C. J., CHEN, H., SHINN, P., STEVENSON, D. K., ZIMMERMANN, J., BARAJAS, P., CHEUK, R., GADRINAB, C., HELLER, C., JESKE, A., KOESEMA, E., MEYERS, C. C., PARKER, H., PREDNIS, H., ANSARI, Y., CHOY, N., DEEN, H., GERALT, M., HAZARI, N., HOM, E., KARNES, M., MULHOLLAND, C., NDUBAKU, R., SCHMIDT, I., GUZMAN, P., AGUILAR-HENONIN, L., SCHMID, M., WEIGEL, D., CARTER, D. C., MARCHAND, T., RISSEEUW, E., BRODGEN, D., ZEKO, A., CROSBY, W. L., BERRY, C. C. & ECKER, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301:653-657.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.
- BAHN, S. C., LEE, H. Y., KIM, H. J., RYU, S. B. & SHIN, J. S. (2003). Characterization of *Arabidopsis* secretory phospholipase A_2 -gamma cDNA and its enzymatic properties. *FEBS Lett*, 553:113-118.
- BALSINDE, J., BALBOA, M. A., INSEL, P. A. & DENNIS, E. A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A_2 . *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39:175-189.
- BALSINDE, J., WINSTEAD, M. V. & DENNIS, E. A. (2002). Phospholipase A_2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, 531:2-6.

- BATES, T. R. & LYNCH, J. P. (2001). Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorous availability. *Plant Soil*, 236:243-250.
- BAULCOMBE, D. C., SAUNDERS, G. R., BEVAN, M. W. & MAY HARRISON, B. D. (1986). Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*, 321:446-449.
- BECHTOLD, N., ELLIS, J. & PELLETIER, G. (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. III*, 316:1194-1199.
- BHALERAO, R. P., EKLÖF, J., LJUNG, K., MARCHANT, A., BENNETT, M. & SANDBERG, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 29:325-332.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513-1523.
- BLANC, G. & WOLFE, K. H. (2004). Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, 16:1667-1678.
- BLECHERT, S., BRODSCHELM, W., HÖLDER, S., KAMMERER, L., KUTCHAN, T. M., MUELLER, M. J., XIA, Z.-Q. & ZENK, M. H. (1995). The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:4099-4105.
- BLEECKER, A. B., ESTELLE, M. A., SOMERVILLE, C. & KENDE, H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241:1086-1089.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37:911-917.
- BOUCHE, N. & BOUCHEZ, D. (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol*, 4:111-117.
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W. & JONES, R. L. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- BUSHMAN, W., THOMPSON, J. F., VARGAS, L. & LANDY, A. (1985). Control of directionality in λ site-specific recombination. *Science*, 230:906-911.
- CASIMIRO, I., BEECKMAN, T., GRAHAM, N., BHALERAO, R., ZHANG, H., CASERO, P. J., SANDBERG, G. & BENNETT, M. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci*, 8:165-171.
- CASSON, S. A. & LINDSEY, K. (2003). Genes and signalling in root development. *New Phytol*, 158:11-38.
- CELENZA, J. L., GRISAFI, P. L. & FINK, G. R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 9:2131-2142.

- COHN, M. (2002). Biochemistry in the United States in the first half of the twentieth century. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30:77-85.
- COMBET, C., JAMBON, M., DELÉAGE, G. & GEOURJON, C. (2002). Geno3D an automated protein modelling web server. *Bioinformatics*, 18:213-214.
- CONSORTIUM, T. C. E. G. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* consortium. *Science*, 282:2012-2018.
- COOKE, T. J., POLI, D., SZTEIN, A. E. & COHEN, J. D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol*, 49:319-338.
- CREELMAN, R. A. & MULLET, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:355-381.
- DARWIN, C. (1881). *The power of movement in plants*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- DE SMET, I., SIGNORA, L., BEECKMAN, T., INZE, D., FOYER, C. H. & ZHANG, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J*, 33:543-555.
- DELL'ORTO, M., SANTI, S., DE NISI, P., CESCO, S., VARANINI, Z., ZOCCHI, G. & PINTON, R. (2000). Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *J Exp Bot*, 51:695-701.
- DESSEN, A., TANG, J., SCHMIDT, H., STAHL, M., CLARK, J. D., SEEHRA, J. & SOMERS, W. S. (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, 97:349-360.
- DHONDT, S., GEOFFREY, P., STELMACH, B. A., LEGRAND, M. & 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*, 23:431-440.
- DHONDT, S., GOUZERH, G., MÜLLER, A., LEGRAND, M. & HEITZ, T. (2002). Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *Plant J*, 32:749-762.
- DOMIN, J., HIGGINS, T. & ROZENGURT, E. (1994). Preferential inhibition of platelet-derived growth factor-stimulated DNA synthesis and protein tyrosine phosphorylation by nordihydroguaiaretic acid. *J Biol Chem*, 269:8260-8267.
- EKOKOSKI, E. & TORNQUIST, K. (1994). Effects of 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid on thapsigargin-induced calcium entry, and intracellular pH in thyroid FRTL-5 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1223:274-278.
- ERMOLAEVA, M. D., M., W., EISEN, J. A. & SALZBERG, S. L. (2003). The age of *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Mol Biol*, 51:859-866.

- ESEN, A. (1978). A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal Biochem*, 89:264-273.
- ESTELLE, M. & SOMERVILLE, C. (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol Gen Genet*, 206:200-206.
- EVANS, M. L., ISHIKAWA, H. & ESTELLE, M. (1994). Responses of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution: comparison of wild-type and auxin-resistant mutants. *Planta*, 194:215-222.
- FELDMANN, K. (1992). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Seed infection/transformation. In *Methods in Arabidopsis research*, ed. C. a. S. Koncz: World Scientific Publishing, 1992, pp. 275-289.
- FORDE, B. G. & LORENZO, H. (2001). The nutritional control of root development. *Plant Soil*, 232:51-68.
- FOX, T. C., SHAFF, J. E., GRUSAK, M. A., NORVELL, W. A., CHEN, Y., CHANEY, R. L. & KOCHIAN, L. V. (1996). Direct measurement of ⁵⁹labeled Fe²⁺ influx in roots of *Pisum sativum* using a chelator buffer system to control free Fe²⁺ in solution. *Plant Physiol*, 111:93-100.
- FUKAKI, H., TAMEDA, S., MASUDA, H. & TASAKA, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J*, 29:153-168.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A. & OJIMA, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*, 50:150.
- GEOURJON, C. & DELÉAGE, G. (1995). Sopma: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*, 11:681-684.
- GRANATA, F., BALESTRIERI, B., PETRAROLI, A., GIANNATTASIO, G., MARONE, G. & TRIGGIANI, M. (2003). Secretory phospholipases A₂ as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol*, 131:153-163.
- GRAY, W. M., OSTIN, A., SANDBERG, G., ROMANO, C. P. & ESTELLE, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:7197-71202.
- GUILFOYLE, T. J. (1999). Auxin-regulated genes and promoters. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, ed. P. J. J. Hooykaas, M. Hall & K. L. Libbenga. Leiden: Elsevier, 1999, pp. 423-459.
- GUZMÁN, P. & ECKER, J. R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2:513-523.
- HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol*, 49:373-385.

- HAMANN, T., BENKOVA, E., BAURLE, I., KIENZT, M. & JURGENS, G. (2002). The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.*, 16:1610-1615.
- HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F. & BRASCH, M. A. (2000). DNA cloning *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research*, 10:1788-1795.
- HIMANEN, K., BOUCHERON, E., VANNESTE, S., DE ALMEIDA ENGLER, J., INZE, D. & BEECKMAN, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, 14:2339-2351.
- HIRSCHBERG, H.-J. H. B., SIMONS, J.-W. F. A., DEKKER, N. & EGMOND, M. R. (2001). Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur. J. Biochem*, 268.
- HOBBIE, L. & ESTELLE, M. (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J*, 7:211-220.
- HOBBIE, L. X. (2000). The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development*, 127:23-32.
- HOLK, A., RIETZ, S., ZAHN, M., QUADER, H. & SCHERER, G. F. E. (2002). Molecular identification of cytosolic, Patatin-related, phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol*, 130:1-12.
- HUANG, S., AN, Y. Q., MCDOWELL, J. M., MCKINNEY, E. C. & MEAGHER, R. B. (1996). The *Arabidopsis thaliana* *ACT4/ACT12* actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *Plant J*, 10:189-202.
- HUTCHISON, C. E. & KIEBER, J. J. (2002). Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14:47-59.
- JEFFERSON, R. A., KAVANAGH, T. A. & BEVAN, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6:3901-3907.
- JUNG, K. M. & 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.
- KARIMI, M., INZE, D. & DEPICKER, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, 7:193-195.
- KATO, T., MORITA, M., FUKAKI, H., YAMAUCHI, Y., UEHARA, M., NIIHAMA, M. & TASAKA, M. (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14:33-46.

- KAUL, S., KOO, H.L., JENKINS, J., RIZZO M, ROONEY, T., TALLON, L.J., FELDBLYUM, T., NIERMAN, W., BENITO, M.-I., LIN, M.-I.X., TOWN, C.D., VENTER, J.C., FRASER, C.M., TABATA, S., NAKAMURA, Y., KANEKO, T., SATO, S., ASAMIZU, E., KATO, T., et al.(2000). The *Arabidopsis* genome initiative - analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.
- KIEBER, J. J., ROTHENBERG, M., ROMAN, G., FELDMANN, K. A. & ECKER, J. R. (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72:427-441.
- KIM, J. Y., CHUNG, Y. S., OK, S. H., LEE, S. G., CHUNG, W. I., KIM, I. Y. & SHIN, J. S. (1999). Characterization of the full-length sequences of phospholipase A₂ induced during flower development. *Biochim Biophys Acta*, 1489:389-392.
- KNIPPERS, R. (1997). *Molekulare Genetik*. Stuttgart; New York: Thieme.
- KOVAR, D. R., HICKEY, V. L., NOTI, J. D., SUSSMAN, G. L. & BEEZHOLD, D. H. (1998). Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7): homology to patatin, a plant PLA₂. *Clin Exp Immunol*, 112:355-362.
- KRYSAN, P., YOUNG, J. C., TAX, F. & SUSSMAN, M. (1996). Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:8145-8150.
- KRYSAN, P. J., YOUNG, J. C., SUSSMAN, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11:2283-2290.
- KU, H. M., VISION, T., LIU, J. & TANKSLEY, S. D. (2000). Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:9121-9126.
- KUTZ, A., MULLER, A., HENNING, P., KAISER, W. M., PIOTROWSKY, M., WEILER, E. W. (2002). A role for nitrilase3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 30:95-106.
- KUWATA, H., NAKATANI, Y., MURAKAMI, M. & KUDO, I. (1998). Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem*, 273:1733-1740.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LANDY, A. (1989). Dynamic, structural and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem*, 58:913-949.
- LEE, H. Y., BAHN, S. C., KANG, Y.-M., LEE, K. H., KIM, H. J., NOH, E. K., PALTA, J. P., SHIN, J. S. & RYU, S. B. (2003). Secretory low molecular weight phospholipase A₂ plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:1990-2002.

- LEE, S. G., SUH, S., KIM, S., CRAIN, R. C., KWAK, J. M., NAM, H.-G. & LEE, Y. (1997). Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J*, 12:547-556.
- LESCOT, M., DEHAIS, P., THUIS, G., MARCHAL, K., MOREAU, Y., VAN DE PEER, Y., ROUZE, P. & ROMBAUTS, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30:325-327.
- LEYSER, O. & BERLETH, T. (1999). A molecular basis for auxin action. *Semin Cell Dev Biol*, 10:131-137.
- LINCOLN, C., BRITTON, J. H. & ESTELLE, M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2:1071-1080.
- LINKOHR, B. I., WILLIAMSON, L., FITTER, A. H. & LEYER, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J*, 29:751-760.
- LIO, Y. C., REYNOLDS, L. J., BALSINDE, J. & DENNIS, E. A. (1996). Irreversible inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*, 1302:55-60.
- LIU, Y. W., HAN, C. H., LEE, M. H., HSU, F. L. & HOU, W. C. (2003). Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.), exhibits antioxidant activity in vitro. *J Agric Food Chem*, 51:4389-4393.
- LIU, Z. B., ULMASOV, T., SHI, X., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell*, 6:645-657.
- LOMAX, T. L., MUDAY, G. K. & RUBERY, P. H. (1995). Auxin transport. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed. P. J. Davie. Dordrecht: Kluwer, 1995, pp. 509-530.
- LÓPEZ-BUCIO, J., CRUZ-RAMÍREZ, A. & HERRERA-ESTRELLA, L. R. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol*, 6:280-287.
- LUSCHNIG, C., GAXIOLA, R., GRISAFI, P. & FINK, G. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 12:2175-2187.
- LYNCH, J. P. & BROWN, K. (1997). Ethylene and nutritional stress. *Physiol Plant*, 100:613-619.
- LYNCH, M. & CONERY, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290:1151-1154.
- MA, Z., BIELENBERG, D. G., BROWN, K. M. & LYNCH, J. P. (2001). Regulation of root hair density by phosphorous availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environm.*, 24:459-467.

- MACRI, F., BRAIDOT, E., PETRUSSA, E. & VIANELLO, A. (1994). Lipoxygenase activity associated to isolated plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1215:109-114.
- MAGGI, L. B., MORAN, J. M., SCARIM, A. L., FORD, D. A., YOON, J. W., MCHOWAT, J., BULLER, R. M. & CORBETT, J. A. (2002). Novel role for calcium-independent phospholipase A₂ in the macrophage antiviral response of inducible nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem*, 277:38449-38455.
- MAHER, E. P. & MARTINDALE, S. J. B. (1980). Mutants of *Arabidopsis* with altered responses to auxin and gravity. *Biochem Genet*, 18:1041-1053.
- MALAMAY, J. E. & RYAN, K. S. (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127:899-909.
- MANCUSO, D. J., JENKINS, C. M. & GROSS, R. W. (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 275:9937-9945.
- MARCHANT, A., BHALERAO, R., CASIMIRO, I., EKLOF, J., CASERO, P. J., BENNETT, M. & SANDBERG, G. (2002). AUX1 Promotes lateral root formation by facilitating Indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*, 14:589-597.
- MARTIN, A. J. P. & SYNGE, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J*, 35.
- MATOS, A. R., D'ARCY-LAMETA, A., FRANCA, M., PETRES, S., EDELMAN, L., KADER, J., ZUILY-FODIL, Y. & PHAM-THI, A. T. (2001). A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett*, 491:188-92.
- MAY, C., PREISIG-MÜLLER, R., HOHNE, M., GNAU, P. & KINDL, H. (1998). A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim Biophys Acta*, 1393.
- MCDOWELL, J. M., AN, Y. Q., HUANG, S., MCKINNEY, E. C. & MEAGHER, R. B. (1996). The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissue and responds to several external stimuli. *Plant Physiol*, 111:699-711.
- MCGINNIS, S. & MADDEN, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 32:W20-25.
- MEIKE, D. & KOORNNEEF, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J*, 12:247-253.
- MEIJER, H. J. G. & MUNNICK, T. (2003). Phospholipid-based signalling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 54:267-306.
- MIGNERY, G. A., PIKAARD, C. S. & PARK, W. D. (1988). Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene*, 62:27-44.

- MOORE, R. C. & PURUGGANAN, M. D. (2003). The early stages of duplicate gene evolution. *PNAS*, 100:15682–15687.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol*, 55:335-350.
- MUNNIK, T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci*, 6:227-233.
- MUNNIK, T., DE VRIJE, T., F., I. R. & MUSGRAVE, A. (1996). Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J Biol Chem*, 271:15708-15715.
- MUNNIK, T., IRVINE, R. F. & MUSGRAVE, A. (1998). Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1389:222-272.
- MURAKAMI, M., SHIMBARA, S., KAMBE, T., KUWATA, H., WINSTEAD, M. V., TISCHFIELD, J. A. & KUDO, I. (1998). The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. *J Biol Chem*, 273:14411-14423.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473.
- NAGAI, Y., AOKI, J., SATO, T., AMANO, K., MATSUDA, Y., ARAI, H. & INOUE, K. (1999). An alternative splicing form of phosphatidylserine-specific phospholipase A₁ that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. *J Biol Chem*, 274:11053-9.
- NAKAZAWA, M., YABE, N., ICHIKAWA, T., YAMAMOTO, Y. Y., YOSHIKUNI, T., HASUNUMA, K. & MATSUI, M. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J*, 25:213-21.
- NALEWAY, J. J. (1992). Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrates. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, ed. S. R. Gallagher. San Diego, CA: Academic Press, 1992, 61-76.
- NARUSAKA, Y., NARUSAKA, M., SEKI, M., FUJITA, M., ISHIDA, J., NAKASHIMA, M., ENJU, A., SAKURAI, T., SATOU, M., KAMIYA, A., PARK, P., KOBAYASHI, M. & SHINOZAKI, K. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis* phospholipase A IIA gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.*, 44:1246-1252.
- NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J., FLORIN-CHRISTENSEN, J. & 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., HAAPAMAKI, M. M. & GRONROOS, J. M. (2000). Roles of secretory phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta*, 1488:83-90.
- NICHOLAS, K. B. & NICHOLAS, B. (1997). GeneDoc: a tool for editing an annotating multiple sequence alignment: www.psc.edu/biomed/genedoc, 1997.

- NOIRIEL, A., BENVENISTE, P., BANAS, A., STYMNE, S. & BOUVIER-NAVE, P. (2004). Expression in yeast of a novel phospholipase A₁ cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 271:3752-3764.
- OPPERMANN, E. (2001). *Isolierung von cDNA's aus Arabidopsis mit Funktionen im Auxin-Wirkungsmechanismus*. Diplom-Arbeit, Universität Hannover. Unpublished.
- PAGE, R. D. M. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci*, 12:357-358.
- PAUL, R., HOLK, A. & 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*, 16:601-611.
- PICKETT, F. B., WILSON, A. K. & ESTELLE, M. (1990). The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol*, 94:1462-1466.
- PLANTA. (2001). Units, symbols and abbreviations. *Planta*, 213:158-162.
- PRIETO-DAPENA, P., ALMOGUERA, C., ROJAS, A. & JORDANO, J. (1999). Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis-abundant gene in sunflower. *Plant Mol Biol*, 39:615-627.
- PTASHNE, M. (1992). *A genetic switch. Phage λ and higher organisms*. Cambridge, MA: Cell Press.
- REGENBERG, B., VILLALBA, J. M., LANFERMEIJER, F. C. & PALMGREN, M. G. (1995). C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell*, 10:1655-1666.
- REID, M. S. (1985). Ethylene action and abscission. *HortScience*, 20:45-50.
- REISS, B., KLEMM, M., KOSAK, H. & SCHELL, J. (1996). RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:3094-3098.
- RIETZ, S. (2002). *Molekulare und biochemische Untersuchungen von Mitgliedern der Phospholipase-A-Genfamilie aus Arabidopsis thaliana in der Reaktion auf pflanzliche Hormone sowie biotischen und abiotischen Stress*. Dissertation, Universität Hannover. Unpublished.
- RIETZ, S., HOLK, A. & SCHERER, G. F. (2004). Expression of the patatin-related phospholipase A gene *AtPLA IIA* in *Arabidopsis thaliana* is up-regulated by salicylic acid, wounding, ethylene, and iron and phosphate deficiency. *Planta*, 219:743-753.
- ROBINSON, N. J., PROCTER, C. M., CONOLLY, E. L. & GUERINOT, M. L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397:694-697.

- ROMBAUTS, S., DEHAIS, P., VAN MONTAGU, M. & ROUZE, P. (1999). PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res*, 27:295-296.
- ROOS, W., DORDSCHBAL, B., STEIGHARDT, J., HIEKE, M., WEISS, D. & SAALBACH, 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*. *Biochim Biophys Acta*, 1488:390-402.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. J. (1998). Primer3: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html, 1998.
- RUEGGER, M., DEWEY, E., GRAY, W. M., HOBBIE, L., TURNER, J. & ESTELLE, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev*, 12:198-207.
- RUEGGER, M., DEWEY, E., HOBBIE, L., BROWN, D., BERNASCONI, P., TURNER, J., MUDAY, G. & ESTELLE, M. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, 9:745-757.
- RYAN, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, 1477:112-121.
- RYDEL, T. J., WILLIAMS, J. M., KRIEGER, E., MOSHIRI, F., STALLINGS, W. C., BROWN, S. M., PERSHING, J. C., PURCELL, J. P. & ALIBHAI, M. F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, 42:6696-6708.
- RYU, S. B. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science*, 9:229-235.
- SAKAI, T., TAKAHASHI, Y. & NAGATA, T. (1996). Analysis of the promoter of the auxin-inducible gene, *parC*, of tobacco. *Plant Cell Physiol*, 37:906-913.
- SCHERER, G. F. E. (1995). The functional relationship of plant lipid-derived second messengers and plant lipid-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans*, 23:871-875.
- . (1996). Phospholipid signalling and lipid-derived second messengers in plants. *Plant Growth Regul*, 18:125-133.
- . (2002). Secondary messengers and phospholipase A₂ in auxin signal transduction. *Plant Mol Biol*, 49:357-72.
- SCHERER, G. F. E. & ANDRÉ, B. (1989). A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A₂ *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 163:111-117.
- SCHERER, G. F. E. & ANDRÉ, B. (1993). Stimulation of phospholipase A₂ by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotids. *Planta*, 191:515-523.

- SCHERER, G. F. E. & ARNOLD, B. (1997). Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta*, 202.
- SCHERER, G. F. E., PAUL, R. & HOLK, A. (2000). Phospholipase A₂ in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Growth Regul*, 32:123-128.
- SCHERER, G. F. E., PAUL, R. U., HOLK, A. & MARTINEC, J. (2002). Down-regulation by elicitors of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 293:766-770.
- SCHLEGEL, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- SCHMIDT, W. (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in Plant Science*, 8:188-193.
- SCHMIDT, W. & SCHIKORA, A. (2001). Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol*, 126:2078-2084.
- SCHMIDT, W., TITTEL, J. & 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. & KAWAKITA, K. (1996). A cytosolic phospholipase A₂ from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol*, 37:347-53.
- SERRANO, R., PORTILLO, F., MONK, B. C. & PALMGREN, M. G. (1992). The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Acta Physiol Scand Suppl*, 607.
- SHEEN, J. (2002). Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science*, 296:1650-1652.
- SHEWRY, P. R. (2003). Tuber storage proteins. *Ann Bot*, 91:755-769.
- SHUMAN, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88:10104-10108.
- . (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem*, 269:32678-32684.
- SIGNORA, L., DE SMET, I., FOYER, C. H. & ZHANG, H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J*, 28:655-662.
- SKOOG, F. & MILLER, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society of Experimental Biology*, 11:118-131.
- SMITH, W. L., DEWITT, D. L. & GARAVITO, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69:145-182.

- SOWKA, S., WAGNER, S., KREBITZ, M., ARIJA-MAD-ARIF, S., YUSOF, F., KINACIYAN, T., BREHLER, R., SCHEINER, O. & BREITENENDER, H. (1998). DNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*, 255:213-219.
- STÄHL, U., EK, B. & STYMNE, S. (1998). Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A₂ from developing seeds of elm. *Plant Physiol*, 117:197-205.
- STÄHL, U., LEE, M., SJÖDAHL, S., ARCHER, D., CELLINI, F., EK, B., IANNAcone, R., MACKENZIE, D., SEMERARO, L., TRAMONTANO, E. & 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.
- STEPHENS, W. W., WALKER, J. L. & MYERS, W. (1898). The action of cobra poison on the blood: a contribution to the study of passive immunity. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 5:279-301.
- STRIZHOV, N., ROSSO, M. G., VIEHOVER, P., DEKKER, K. A. & WEISSHAAR, B. (2003). High-throughput generation of sequence indexes from T-DNA mutagenized *Arabidopsis thaliana* lines. *Biotechniques*, 35:1164-1168.
- SUSSMAN, M., AMASINO, R. M., YOUNG, J. C., KRYSAN, P. & AUSTIN-PHILIPS, S. (2000). The *Arabidopsis* knockout facility at the university of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol*, 124:1465-1467.
- SWARUP, R., FRIML, J., MARCHANT, A., LJUNG, K., SANDBERG, G., PALME, K. & BENNETT, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev*, 15:2648-2653.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2000). *Physiologie der Pflanzen*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- TANG, J., KRIZ, R. W., WOLFMAN, N., SHAFFER, N., SEEHRA, J. & JONES, S. S. (1997). A novel cytosolic Calcium-independent phospholipase A₂ contains eight Ankyrin motifs. *J Biol Chem*, 272:8567-8575.
- TIWARI, S. B., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, 15:533-543.
- TIWARI, S. B., WANG, X.-J., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, 13:2809-2822.
- TURNER, J. G., ELLIS, C. & DEVOTO, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14:153-164.

- ULMASOV, T., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5844–5849.
- ULMASOV, T., MURFETT, J., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 9:1963-1971.
- VAUTERIN, M., FRANKARD, V. & JACOBS, M. (1999). The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Mol Biol*, 39:695-708.
- VIEHWEGER, K., DORDSCHBAL, B. & ROOS, W. (2002). Elicitor-activated Phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholine that mobilize the vacuolar H-pool for pH signaling via the activation of Na-dependent proton fluxes. *Plant Cell*, 14:1509-1525.
- VOGEL, J. P., SCHUERMAN, P., WOESTE, K., BRANDSTATTER, I. & KIEBER, J. J. (1998). Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics*, 149:417-427.
- WALLROTH-MARMNOR, L. & HARTE, C. (1988). IAA in leaves of *Anthirinum majus* L. Sippe 50 and some mutants. *Biologisches Zentralblatt*, 197:517-531.
- WANG, C., ZIEN, C. A., AFITLHILE, M., WELTI, R., HILDEBRAND, D. F. & WANG, X. (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12:2237-2246.
- WANG, K. L., LI, H. & ECKER, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14::S131–S151.
- WANG, X. (2000). Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res*, 39:109-149.
- . (2001). Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:211-231.
- . (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 5:408-414.
- WANG, X., WANG, C., SANG, Y., QIN, C. & WELTI, R. (2002). Networking of phospholipases in plant signal transduction. *Physiol Plant*, 115:331-335.
- WATERS, B. W. & XXX. (2002). Characterization of *FRO1*, a pea ferric-chelate reductase involved in iron acquisition. *Plant Physiol*, 129:85-94.
- WATSON, C. L. & GOLD, M. R. (1997). Lysophosphatidylcholine modulates cardiac I-Na via multiple protein kinase pathways. *Circ Res*, 81:387-395.
- WEIGEL, D., GLAZEBROOK, J. (2001). *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-
- WEIGEL, D., AHN, J. H., BLAZQUEZ, M. A., BOREVITZ, J. O., CHRISTENSEN, S. K., FANKHAUSER, C., FERRANDIZ, C., KARDAILSKY, I., MALANCHARUVIL, E. J., NEFF, M. M., NGUYEN, J. T., SATO, S., WANG, Z. Y., XIA, Y., DIXON, R. A., HARRISON, M. J., LAMB, C. J., YANOFSKY, M. F. & CHORY, J. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 122:1003-1013.
- WEISBERG, R. A. & LANDY, A. (1983). Site-specific recombination of phage λ . In *Lambda II*, ed. J. W. Hendrix, Roberts, F. W., Stahl, X., Weisberg, R. A. Cold Spring Harbor, NY: Cold Harbor Press, 1983, pp. 211-250.
- WILSON, A. K., PICKETT, F. B., TURNER, J. C. & ESTELLE, M. (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet*, 222:377-383.
- XIE, Q., FRUGIS, G., COLGAN, D. & CHUA, N. H. (2000). *Arabidopsis NAC1* transduces auxin signal downstream of *TIR1* to promote lateral root development. *Genes Dev*, 14:3024-36.
- YI, H., PARK, D. & 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.
- ZHANG, H. & FORDE, B. G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*:279.
- ZHANG, H., JENNINGS, A., BARLOW, P. W. & FORDE, B. G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:6529-6534.

6 Anhang

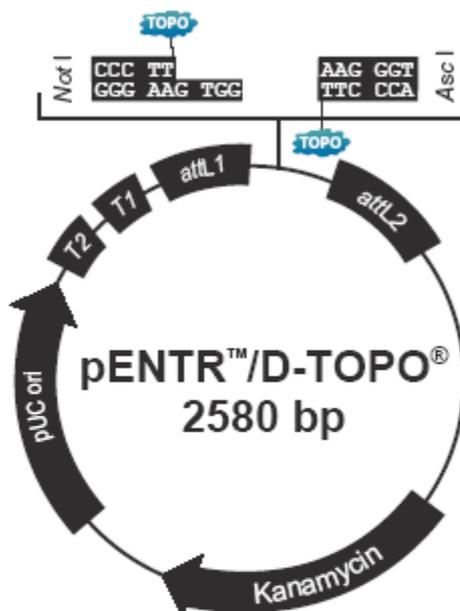
Tabelle 1. Nomenklatur der Organismen für die Abbildung 1.4 Die Sequenzen, die Gegenstand dieser Arbeit waren, sind mit einem (*) gekennzeichnet. Die aufgeführten Phospholipasen wurden der Datenbank BLAST des National Center for Biotechnology Information (ALTSCHUL et al. 1997) entnommen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Gen</u>	<u>Accession</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Art des Proteins</u>	<u>Referenz</u>
I	At1g61850	NP_176378	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	cds.At1g61850.1.
IIA*	At2g26560	AC002505	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	KAUL et al. 2000
IIB	At2g39220	AAP68308	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	KIM et al. (unveröffentlicht)
IIIA*	At3g54950	CAB41089	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	cds.At3g54950.1.
IIIB	At3g63200	CAB86421	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	RIEGER et al. (direkt)
IVA*	At4g37070	CAB16787	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	BEVAN et al. (unveröffentlicht)
IVB*	At4g37060	CAB16788	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	BEVAN et al. (direkt)
IVC	At4g37050	CAB16789	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	BEVAN et al. (unveröffentlicht)
IVD	At4g29800	T08541	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	BEVAN et al. (direkt)
V	At5g43590	BAB11622	<i>Arabidopsis thaliana</i>	potentielle PLA ₂	ASAMIZU et al. 1998
<i>Anabaena</i>		CAC01602	<i>Anabaena spec.</i>	iPLA ₂	ROUHIAINEN et al. 2000
<i>Caenorhab.</i>		AAG23484	<i>Caenorhabditis elegans</i>	iPLA ₂	<i>C. elegans</i> Genome Sequencing 1998
<i>Cucumis</i>		Y12793	<i>Cucumis sativus</i>	Patatin ähnlich	PREISIG-MÜLLER et al. (unveröffentlicht)
<i>Drosophila</i>		AAF50194	<i>Drosophila melangoster</i>	iPLA ₂	ADAMS et al. 2000
<i>Homo</i>		AAD08847	<i>Homo sapiens</i>	iPLA ₂ ähnlich	WATERSTON (unveröffentlicht)
<i>Mus</i>		AAH03487	<i>Mus musculus</i>	iPLA ₂	STRAUSBERG (direkt)
<i>Nicotiana</i>		AF158027	<i>Nicotiana tabacum</i>	Patatin ähnlich	DHONDT et al. 2000
<i>Solanum</i>		P11768	<i>Solanum tuberosum</i>	Patatin	MIGNERY et al. 1988

```

501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT
                                     M13 forward (-20) priming site
                                     attL1
581 TTATTTTGAC TGATAGTGAC CTGTTGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
                                     Nqt I                                     Asc I
                                     AAC ATG TTT
                                     Leu Tyr Lys
659 AAA GCA GGC TCC GCG GCC GCC CCC TTC ACC ATG ... AAG GGT GGG CGC GCC GAC CCA GCT TTC TTG
TTT CGT CCG AGG CGC CGG CGG GGG AAG TGG TAC ... TTC CCA CCC GCG CGG CTG GGT CGA AAG AAC
Lys Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Phe Thr ... Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu
                                     attL2
719 TAC AAAGTTGGC ATTATAAGAA AGCATTGCTT ATCAATTGTG TGCAACGAAC AGGTCACATAT CAGTCAAAAT AARATCATT
ATG
Tyr
                                     M13 reverse priming site
801 TTTGCCATCC AGCTGATATC CCCTATAGTG AGTCGTATTA CATGGTCATA GCTGTTTCCT GGCAGCTCTG

```



**Comments for pENTR™/D-TOPO®
2580 nucleotides**

mb T2 transcription termination sequence: bases 288-295
mb T1 transcription termination sequence: bases 427-470
 M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
attL1: bases 569-668 (complementary strand)
 TOPO® recognition site 1: bases 680-684
 Overhang: bases 685-688
 TOPO® recognition site 2: bases 689-693
attL2: bases 705-804
 M13 reverse priming site: bases 845-861
 Kanamycin resistance gene: bases 974-1783
 pUC origin: bases 1904-2577

Abbildung 1. Genkarte des Vektors *pENTR/D-TOPO*.

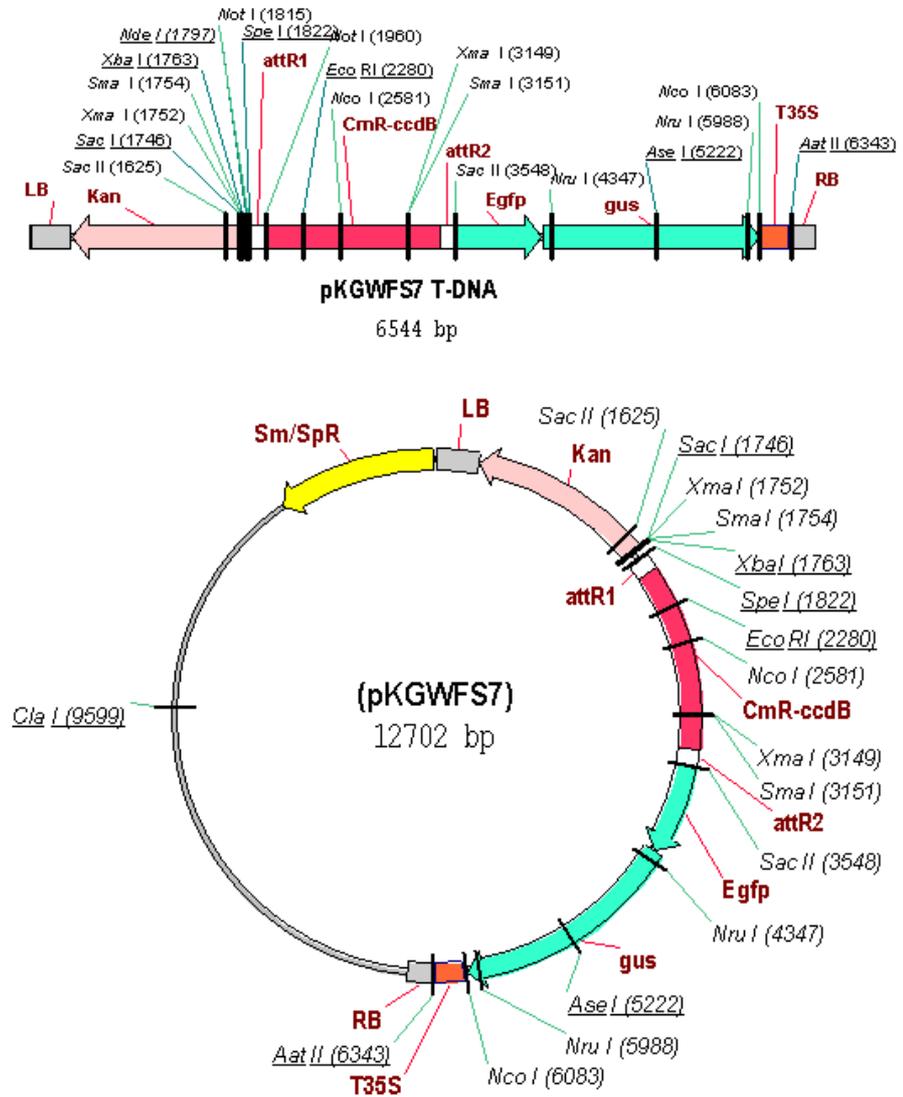
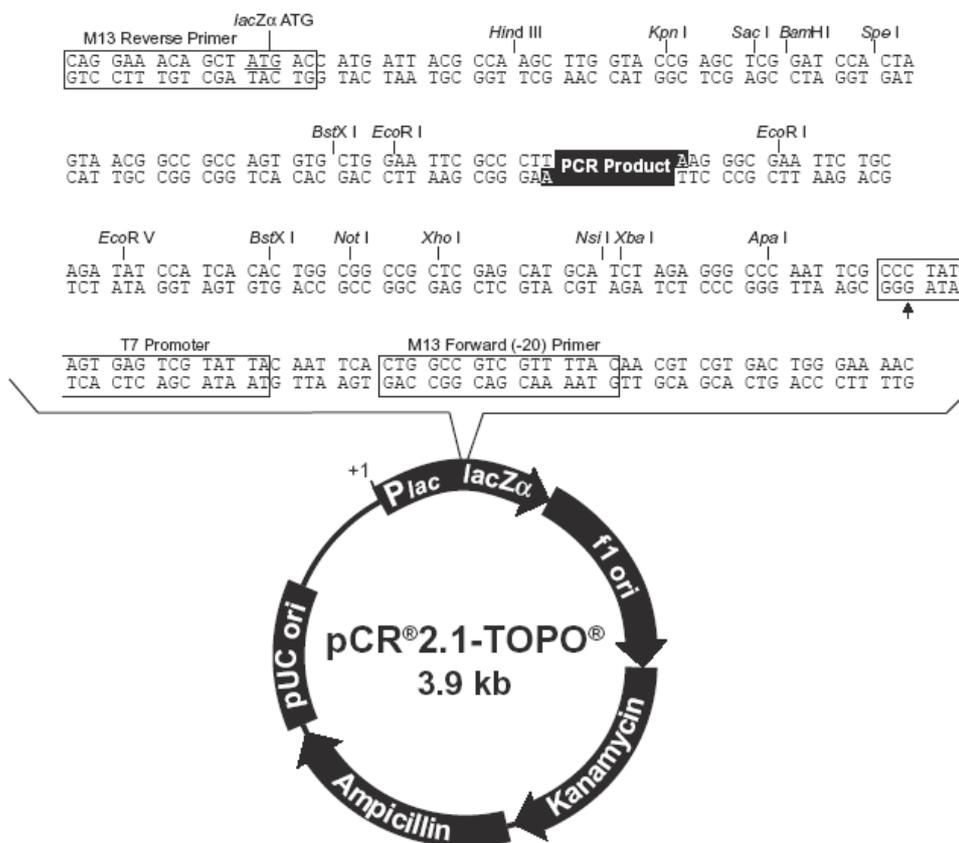


Abbildung 2. Genkarte des Vektors pKGWFS7.



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
 3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Abbildung 3. Genkarte des Vektors *pCR2.1-TOPO*.

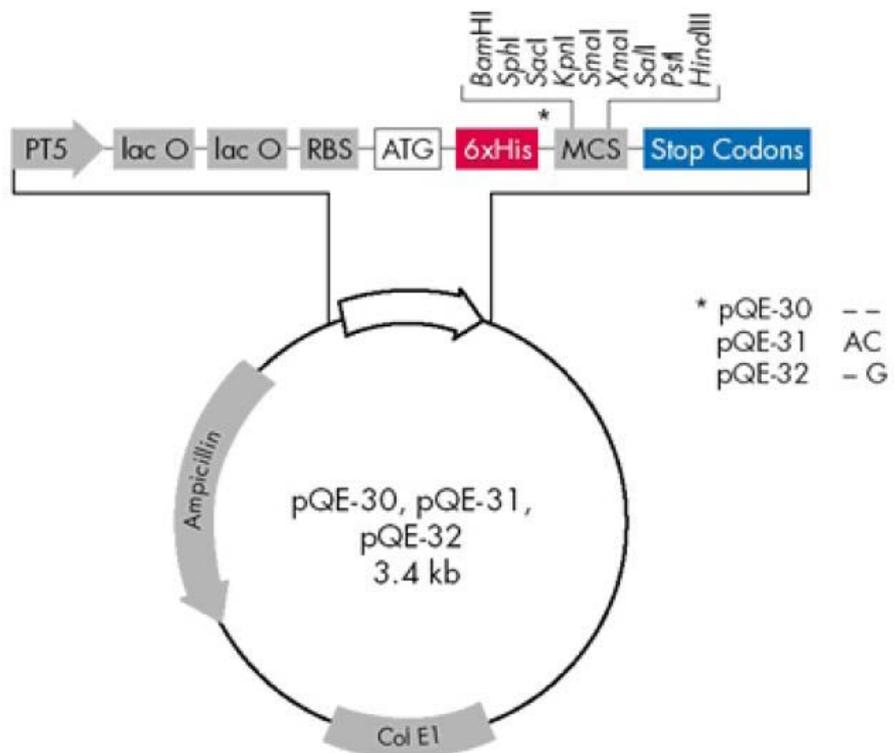


Abbildung 4. Genkarte des Vektors *pQE-30*.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Scherer für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn PD Dr. A. Holk für seine Unterstützung.

Christa Ruppelt danke ich für die beständige, herzliche Zusammenarbeit. Ebenso möchte ich mich auch bei Marianne Langer, Martin Pähler, Peter Pietrzyk, Rinukshi Wimalasekera und Sabine Reinecke für die nette Zeit an der Universität Hannover bedanken.

Den Gärtnerinnen und Gärtnern mit dem grünen Daumen sei für die Pflege der Pflanzen gedankt.

Bei Elisabeth und Maren möchte ich mich für die Hilfe bei den Korrekturen bedanken und für die unermüdliche Energie mit der sie mich unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mit aufrichtigem Interesse den Fortschritt der Arbeit verfolgt und begleitet haben.