

**Funktionale Charakterisierung einer Gruppe Adenylat bildender Enzyme  
aus *Arabidopsis thaliana*:**

**Die Rolle 4CL-ähnlicher Enzyme im Metabolismus von Fettsäuren und  
Phytohormonen**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Lucie Anna Kienow**

aus Bendorf

Köln, April 2008

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Krämer  
Prof. Dr. U. Höcker

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. UI Flügge

Termin der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2008

Die praktische Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Phytopathologie unter der Anleitung von Dr. Erich Kombrink durchgeführt.



## Zusammenfassung

Adenylat bildende Enzyme nehmen eine zentrale Funktion in vielen Stoffwechselwegen ein. Sie katalysieren die Reaktion von Carbonsäuren mit ATP zu einem AMP-Anhydrid (dem Adenylat) und den darauf folgenden Transfer an einen Acyl-Endakzeptor, oftmals Coenzym A. In dieser Arbeit wurde eine Gruppe von Proteinen analysiert, die auf Grund ihrer Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu den 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) als putative Adenylat bildende Enzyme identifiziert, aber größtenteils noch nicht charakterisiert wurden. Diese Proteine werden als 4CL-ähnliche Proteine (4CLL) bezeichnet.

Zur Charakterisierung der 4CLLs wurden diese zunächst heterolog exprimiert, aufgereinigt und einem umfangreichen Substratscreen mit rund 100 Carbonsäuren aus verschiedenen strukturellen Klassen unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die Mehrheit der untersuchten 4CLLs als Acyl-CoA-Synthetasen von Fettsäuren verschiedenster Kettenlängen und Sättigungsgrade fungiert. Dies konnte durch einen *in vivo*-Assay bestätigt werden, welcher auf der Komplementation eines Acyl-CoA-Synthetase-defizienten *E. coli*-Stammes basiert. Somit aktivieren sechs der neun überprüften 4CLLs Fettsäuren und bilden damit, neben den bereits bekannten Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren (LACS), eine weitere Gruppe von Acyl-CoA-Synthetasen in *A. thaliana*.

Zusätzlich aktivieren einige 4CLLs Derivate und Vorstufen der Phytohormone Jasmonsäure (JA) und Indoleessigsäure (IAA). Das Enzym At1g20510 konnte als OPC-8:CoA-Ligase identifiziert werden. Es aktiviert eine Zwischenstufe der JA-Biosynthese, OPC-8, zum korrespondierenden CoA-Ester. Diese Funktion konnte *in vivo* durch Analysen von Verlustmutanten des entsprechenden Gens, die reduzierte Mengen an JA aufwiesen, bestätigt werden. Mit At4g05160 und At5g63380 konnten erstmals Enzyme beschrieben werden, die das IAA-Derivat Indolbuttersäure (IBA) in den korrespondierenden CoA-Ester überführen. Neben der unter *in vitro*-Bedingungen geringen, aber signifikanten IBA:CoA-Ligase-Aktivität zeigte die Analyse von Doppelmutanten beider Gene deutlich veränderte IAA- und IBA-Mengen. Des Weiteren konnte At1g62940 als Acyl-CoA-Synthetase von Hydroxyfettsäuren identifiziert werden und ist vermutlich an der Biosynthese von Sporopollenin in Blütenknospen beteiligt. Die funktionale Analyse der 4CLLs wurde jeweils durch Untersuchungen zur Expression der korrespondierenden Gene ergänzt. Insgesamt ergibt sich damit ein umfassendes Bild einer Gruppe von CoA-Ligasen, deren Vertreter differenzierte, wichtige Funktionen im Stoffwechsel von *A. thaliana* übernehmen.



## Abstract

Adenylate-forming enzymes are of fundamental importance in many metabolic pathways. These enzymes catalyze the reaction of a carboxylic acid with ATP to an AMP-anhydrid (the adenylate) and its subsequent transfer to an acyl acceptor, which in most cases is coenzyme A. In this study, the function of a largely uncharacterized group of proteins from *Arabidopsis thaliana* was systematically explored. Based on their high sequence and structural similarity to 4-coumarate:CoA ligase (4CL) these enzymes were named 4CL-like (4CLL) proteins and are thought to display adenylate-forming activity.

To identify enzymatic functions, the heterologously expressed and purified 4CLL enzymes were subjected to an extensive substrate screen using about 100 carboxylic acids from different structural classes. These studies revealed that the majority of the tested 4CLLs function as acyl-CoA synthetases *in vitro*, activating fatty acids of variable chain length to the corresponding CoA esters. This function was confirmed by an independent *in vivo* assay, which relies on functional complementation of an acyl-CoA synthetase-deficient *E. coli* strain. In fact, six out of nine tested 4CLL enzymes showed this activity, thereby defining a new group of fatty acyl-CoA synthetases in *A. thaliana*, which is distinct from the known long-chain fatty acyl-CoA synthetase (LACS) family.

In addition, several 4CLL enzymes were also active on various derivatives of phytohormones such as jasmonic acid (JA) and indoleacetic acid (IAA). Importantly, the enzyme At1g20510 efficiently activated OPC-8 to the CoA ester, the predicted intermediate of JA biosynthesis, thus representing an OPC-8:CoA ligase. This *in vitro* function was confirmed by analysis of various *A. thaliana* lines deficient for the corresponding gene, which showed reduced levels of JA. By contrast, the enzymes At4g05160 und At5g63380 showed weak but significant *in vitro* activity towards indolebutyric acid (IBA) and in the corresponding *A. thaliana* mutant line the IAA/IBA balance was impaired. These results demonstrate that both enzymes participate in auxin metabolism and identify for the first time IBA:CoA ligases. Finally, the enzyme At1g62940 was found to activate hydroxy fatty acids, which are important precursors of sporopollenin biosynthesis in flowers of *A. thaliana*. The functional analysis of all enzymes was complemented by expression studies of the corresponding genes. Collectively, a comprehensive picture of a functionally important class of enzymes is presented.



---

1. Einleitung .....	1
1.1 Die Superfamilie der Adenylat bildenden Enzyme .....	1
1.2 Adenylat bildende Enzyme in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
1.2.1 Die Acyl –CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren (LACS) aus <i>A. thaliana</i> .....	4
1.2.2 Die 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) aus <i>A. thaliana</i> .....	5
1.2.3 Die 4-Cumarat:CoA-Ligase-ähnlichen Proteine (4CLL) aus <i>A. thaliana</i> .....	6
1.3 $\beta$ -Oxidation in <i>A. thaliana</i> : Mögliche Substrate der 4CLL .....	8
1.3.1 Fettsäuren .....	8
1.3.2 Jasmonsäurevorstufen .....	10
1.3.3 Auxin .....	13
1. 4 Zielsetzung der Arbeit .....	15
2. Material und Methoden .....	17
2.1 Materialien .....	17
2.1.1 Chemikalien .....	17
2.1.2 Kits .....	19
2.1.3 Molekulargewichtsstandards .....	20
2.1.4 Enzyme .....	20
2.1.5 Antikörper .....	20
2.1.6 Primer .....	20
2.1.7 Vektoren .....	23
2.1.8 Bakterienstämme .....	25
2.1.8.1 <i>E. coli</i> .....	25
2.1.8.2 <i>A. tumefaciens</i> .....	25
2.1.8.3 <i>P. syringae</i> pv. tomato strain DC3000 .....	25
2.1.9 Pflanzenlinien .....	26
2.1.10 Geräte .....	26
2.1.11 Sonstige Materialien .....	27
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.1.1 Isolation von DNA aus <i>A. thaliana</i> .....	27
2.2.1.2 Isolation von RNA aus pflanzlichem Gewebe .....	27
2.2.1.3 Synthese von cDNA aus Poly-A-RNA .....	28
2.2.1.4 PCR .....	28
2.2.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	29
2.2.1.6 Konstruktion von Plasmiden .....	30
2.2.1.7 Einfügen rationaler Mutationen in die cDNA von At1g20510 .....	31
2.2.1.8 „Mini-“ und „Midi-“Präparation von Plasmid-DNA .....	31
2.2.1.9 Sequenzieren .....	31
2.2.2 Arbeiten mit Proteinen .....	32
2.2.2.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen .....	32
2.2.2.2 Enzymatischer Aktivitätstest: Luciferase-Test .....	33
2.2.2.3 Enzymatischer Aktivitätstest: LDH-Test .....	34
2.2.2.4 Enzymatischer Aktivitätstest: Radiochemischer Test .....	35
2.2.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte .....	36
2.2.2.6 Analyse der exprimierten Proteine über Western Blot .....	36

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien .....	37
2.2.3.1 Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	37
2.2.3.2 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	38
2.2.3.3 Komplementation von Acyl-CoA-Synthetase defizienten <i>E. coli</i> -Stämmen .....	38
2.2.3.4 Herstellung von elektrokompenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	39
2.2.3.5 Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> Zellen.....	39
2.2.4 Arbeiten mit <i>A. thaliana</i> .....	40
2.2.4.1 Anzucht .....	40
2.2.4.2 Verifizierung der Knock-out-Linien .....	41
2.2.4.3 Färbung der Kutikula mit Toluidin-Blau .....	42
2.2.4.4 Quantifizierung der Jasmonate in <i>A. thaliana</i> .....	42
2.2.4.5 Quantifizierung der Fettsäuren und Auxine in <i>A. thaliana</i> .....	42
2.2.4.6 Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i> in <i>A. thaliana</i> .....	42
2.2.4.7 Transformation von <i>A. thaliana</i> unter Verwendung von <i>A. tumefaciens</i> .....	43
2.2.4.8 Selektion transformierter Pflanzen.....	43
2.2.4.9 Sterilisation von <i>A. thaliana</i> Samen.....	43
2.2.4.10 Promotoranalyse durch Reporterexpression.....	44
2.2.4.11 Subzelluläre Lokalisation von At1g20510 in <i>A. thaliana</i> .....	45
3. Ergebnisse .....	47
3.1 Überblick über die 4CL-ähnlichen Proteine.....	47
3.1.1 Analyse der <i>in vitro</i> -Aktivität der 4CL-ähnlichen Enzyme .....	47
3.1.1.1 Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der 4CL-ähnlichen Proteine.....	47
3.1.1.2 <i>In vitro</i> -Funktion der 4CL-ähnlichen Proteine.....	49
3.1.2. Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion 4CL-ähnlicher Enzyme in Acyl-CoA-Synthetase defizienten Stämmen von <i>E. coli</i> .....	52
3.1.3 <i>In silico</i> -Analyse der Expression der 4CLL-Gene .....	58
3.2 Detaillierte Charakterisierung des 4CLLs At1g20510.....	59
3.2.1 Detaillierte kinetische Analyse des Enzyms At1g20510 .....	59
3.2.2 Bestimmung der subzelluläre Lokalisation des Proteins At1g20510 in <i>A. thaliana</i> ..	61
3.2.3 Charakterisierung der <i>Knock-out</i> -Linien von At1g20510 .....	63
3.2.3.1 Analyse des Oxylipingehalts in <i>Knock-out</i> -Linien von At1g20510.....	65
3.2.4 Erstellung und Charakterisierung der Tripel-Knock-out-Linien At1g20510/At4g05160/At5g63380 und At1g20500/At4g05160/At5g63380 .....	67
3.2.4.1 Analyse des Oxylipingehalts in Tripel-Knock-out-Linien At1g20510/At4g05160/At5g63380 und At1g20500/At4g05160/At5g63380 .....	69
3.2.5 Die Analyse des Expressionsmusters von At1g20510 .....	71
3.2.5.1 Analyse der Wundinduktion von At1g20510 und weiterer 4CLLs durch semiquantitative RT-PCR .....	71
3.2.5.2 Analyse der koregulierten Gene von At1g20510 .....	72
3.2.5.3 Die Promotorregion von At1g20510 .....	73
3.2.5.4 Erstellung der Reporterpflanzen von At1g20510 und Analyse unterschiedlicher Entwicklungsstadien.....	74
3.2.5.5 Reaktion der Reporterpflanzen von At1g20510 auf die Applikation verschiedener Chemikalien und pathogener Bakterienstämme .....	77



---

3.3 Detaillierte Charakterisierung der 4CLLs At4g05160 und At5g63380 .....	81
3.3.1 Die Erstellung und makroskopische Charakterisierung von Einzel- und Doppel- <i>knock-out</i> -Pflanzen von At4g05160 und At5g63380 und der entsprechenden Komplementationslinien .....	81
3.3.2 Die Funktion von At4g05160 und At5g63380 in der $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren....	84
3.3.2.1 Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Einzel- und Doppel- <i>knock-out</i> -Linien von At4g05160 und At5g63380 .....	84
3.3.2.2 Analyse der Speicherlipide in Doppel- <i>knock-out</i> -Pflanzen At4g05160/At5g63380 .....	86
3.3.2.3 Analyse der Struktur lipide in Doppel- <i>knock-out</i> -Pflanzen At4g05160/At5g63380 .....	89
3.3.2.4 Expressionsanalyse der Markergene des Fettsäuremetabolismus in Doppel- <i>knock-out</i> -Pflanzen At4g05160 /At5g63380.....	90
3.3.3 Auxine .....	92
3.3.3.1 Die Beteiligung von At4g05160 und At5g63380 an der $\beta$ -Oxidation synthetischer Auxine .....	92
3.3.3.2 Die Beteiligung von At4g05160 und At5g63380 an der $\beta$ -Oxidation natürlicher Auxine .....	95
3.3.3.3 Die <i>in vitro</i> -Aktivität von At4g05160 und At5g63380 gegenüber 2,4-DB und IBA .....	100
3.3.4 Analyse der Expression von At4g05160 und At5g63380 .....	103
3.3.4.1 Analyse der koregulierten Gene von At4g05160 und At5g63380.....	103
3.3.4.2 Expressionsanalyse von At4g05160 und At5g63380 durch Reporterpflanzen..	103
3.4 Untersuchungen zur Funktion von At3g48990 und At1g62940 .....	105
3.4.1 Analyse der <i>in vitro</i> -Aktivität von At1g62940 durch einen indirekten Test: Luciferasetest.....	107
3.4.2 Analyse der <i>in vitro</i> Aktivität des Enzyms At1g62940 durch einen direkten Test: Radiochemischer Test .....	108
4. Diskussion .....	111
4.1. Die Aktivierung von Fettsäuren durch 4CLLs .....	111
4.2 Die Funktion der Acyl-CoA-Synthetasen At4g05160 und At5g63380 in <i>A. thaliana</i> ...	115
4.3 Die Funktion von At1g62940 in der Aktivierung von Hydroxyfettsäuren in <i>A. thaliana</i> .....	118
4.4 Die Aktivierung von Jasmonsäurevorstufen durch 4CLLs .....	119
4.5 Die Funktion der 4CLLs in der Jasmonsäurebiosynthese in <i>A. thaliana</i> .....	120
4.6 Die Wirkung von Jasmonaten auf die Genexpression der 4CLLs .....	124
4.7 Die Funktion der 4CLLs At4g05160 und At5g63380 im Auxinmetabolismus .....	126
4.8 Weitere Funktionen von 4CLLs .....	128
4.9 Schlussfolgerungen und Ausblick .....	129
Literaturverzeichnis .....	131

**Abkürzungsverzeichnis**

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DB	2,4-Dichlorphenoxybuttersäure
4CL	4-Cumarat:CoA-Ligasen
4CLL	4-Cumarat:CoA-Ligase-ähnliche Proteine
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AOS	Allenoxid-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonucleinsäure
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dnOPDA	Dinor-Cyclopentenon-12-oxophytodiensäure
dNTP	Desoxynukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Und weitere
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indolbuttersäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasenpaar
$k_{\text{cat}}$	Wechselzahl
kDa	Kilo-Dalton
$K_M$	Michaelis-Konstante
KO	<i>knock-out</i>
LACS	Acyl-CoA-Synthetase langkettiger Fettsäuren

---

LOX	Lipoxygenase
M	mol/l
min	Minute
MS	Murashige und Skoog
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OPC-4	3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-buttersäure
OPC-6	3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-hexansäure
OPC-8	3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-oktansäure
OPDA	Cyclopentenon-12-oxophytodiensäure
OPR3	OPDA-Reduktase-3
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp <i>A. thaliana</i> Columbia 0

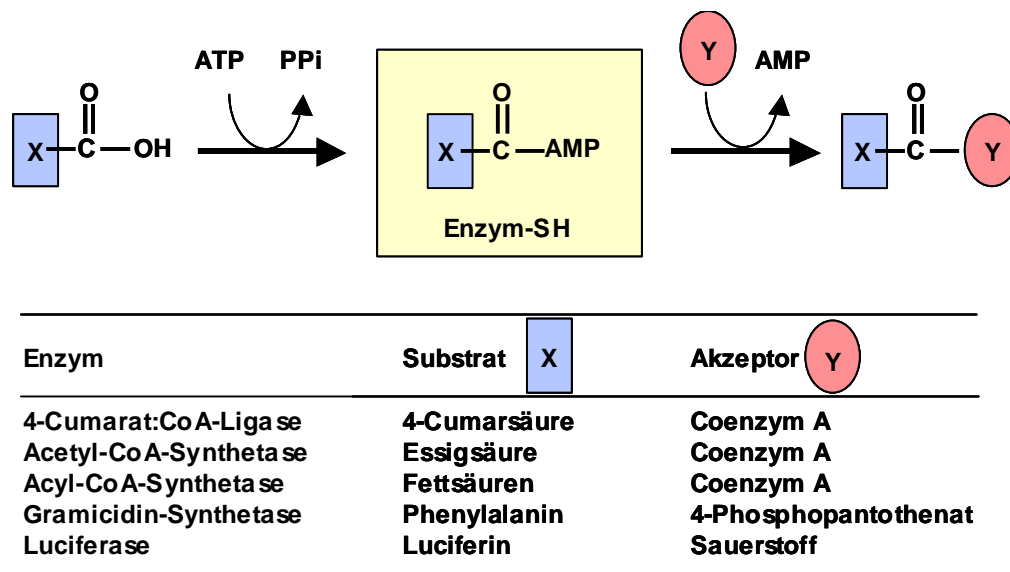


## 1. Einleitung

Die Aktivierung chemisch wenig reaktiver Substanzen stellt in allen Organismen einen grundlegenden Prozess dar. Insbesondere aktivierte Carbonsäuren sind Bestandteil zahlreicher anaboler und kataboler Stoffwechselwege, in denen verschiedenste Metabolite wie Lipide, Aminosäuren oder Sekundärstoffe umgesetzt werden. Entsprechend der chemischen Diversität der Substrate hat sich eine umfangreiche Klasse aktivierender Enzyme entwickelt, die Ligasen. Der überwiegende Teil dieser Enzyme gehört den *Acid:thiol*-Ligasen (EC 6.2.1) an, die unter ATP-Verbrauch energiereiche Kohlenstoff-Schwefel Bindungen knüpfen (Shockey *et al.*, 2003). Doch selbst innerhalb dieser Gruppe lassen sich drei verschiedene Reaktionsmechanismen unterscheiden, die zu einer weiteren Einteilung in drei Superfamilien führen (Groot *et al.*, 1976; Stein *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000). Im Folgenden wird nun näher auf die Superfamilie der Adenylat bildenden Enzyme eingegangen (Conti *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Shockey *et al.*, 2003; Fulda *et al.*, 1997).

### 1.1 Die Superfamilie der Adenylat bildenden Enzyme

Adenylat bildende Enzyme sind bislang in allen untersuchten pro- und eukaryotischen Organismen identifiziert worden. Sie werden auch als Acyl-Adenylat bildende Enzyme, Acyl aktivierende Enzyme oder AMP bindende Proteine bezeichnet (Babbitt *et al.*, 1992; Conti *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1997; Shockey *et al.*, 2003). Diese Enzymfamilie umfasst so diverse Vertreter wie Polyketid-Synthetasen aus Algen, die Luciferasen der Arthropoden, bakterielle Peptid-Synthetasen oder ubiquitär verbreitete Acyl- und Aryl-CoA-Synthetasen (Bibb *et al.*, 1994; Conti *et al.*, 1996 und 1997; Lee *et al.*, 1995; Watkins *et al.*, 1997). Die Einteilung in diese Familie beruht nicht auf einer direkten Verwandtschaft der Proteine, die sich in einer globalen Sequenzidentität ausdrücken lässt, sondern vielmehr auf der Existenz eines hochgradig konservierten strukturellen Merkmals, der AMP-Bindedomäne und dem sich daraus ableitenden Reaktionsmechanismus (Bar-Tana *et al.*, 1973; Babbitt *et al.*, 1992). Die Bindedomäne, welche für die Interaktion mit Adenosintriphosphat (ATP) und die Adenylatbildung wichtig ist, findet sich in der PROSITE-Konsensussequenz PS00455 wieder: [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-X-[PASLIVM]-[KR]. Der Mechanismus der Katalyse ist ein Zwei-Schritt-Reaktionsmechanismus, der in Abb. 1 schematisch dargestellt



**Abb. 1: Die Zwei-Schritt-Reaktion der Adenylat bildenden Enzyme**

Dargestellt ist eine schematische Abbildung des Reaktionsmechanismus der Adenylat bildenden Enzyme. Im ersten Schritt erfolgt, unter Abspaltung von Pyrophosphat die Bildung des enzymgebundenen Adenylats. Im zweiten Teil der Reaktion erfolgt der nucleophile Angriff des Endakzeptors auf den Carbonylkohlenstoff und die Freisetzung des aktivierten Endprodukts.

ist. Zu Beginn der Katalyse wird die Carboxylgruppe des Substrates zu einem stabilen, enzymgebundenen Acyl-AMP-Intermediat, dem Adenylat, umgesetzt. Dabei erfolgt die Abspaltung des Pyrophosphats von ATP, die die Reaktion energetisch begünstigt und irreversibel macht. Im zweiten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff der freien Elektronen eines Acyl-Endakzeptors auf den Carbonylkohlenstoff des Adenylats, wodurch das Produkt und AMP freigesetzt werden (Cleland *et al.*, 1963; Bar-Tana *et al.*, 1973; Hisanaga *et al.*, 2004). Bei gleichem Reaktionsmechanismus ist die Identität der verschiedenen Endakzeptoren sehr variabel, beispielsweise findet sich Coenzym A (CoA) bei Acyl- und Aryl-CoA-Synthetasen, 4'-Phosphopantothenat bei Peptid-Synthetasen, molekularer Sauerstoff bei Luciferasen (Conti *et al.*, 1996 und 1997) und verschiedene Aminosäuren bei Amido-Synthetasen (Staswick *et al.*, 2004; Staswick *et al.*, 2005).

Neben der Existenz der AMP-Bindedomäne und dem spezifischen Reaktionsmechanismus besitzen Adenylat bildende Enzyme ein ähnliches Faltungsmuster. Demnach bestehen die Proteine aus einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Domäne, wobei sich

das aktive Zentrum an deren Kontaktstelle befindet. Durch die Substratbindung erfolgt eine Rotation der C-terminalen Domäne und das Enzym nimmt eine, für die Bildung des Endprodukts essentielle, geschlossene Konformation an (Chang *et al.*, 1996; Horswill *et al.*, 2002; Gulick *et al.*, 2003). Diese Informationen wurden vor allem aus der Analyse der Kristallstrukturen gewonnen, die bislang für sechs Vertreter der Superfamilie ermittelt werden konnten. Dazu gehören eine Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* ohne ihr Substrat Luciferin (Conti *et al.*, 1996), die Phenylalanin aktivierende Domäne der bakteriellen Gramacidin-S-Synthetase mit den Substraten Phenylalanin und ATP (Conti *et al.*, 1997), das bakterielle 2,3-Dihydroxybenzoesäure aktivierende Enzym DhBE mit seinen Substraten 2,3-Dihydroxybenzoesäure und ATP (May *et al.*, 2002), eine bakterielle Acetyl-CoA-Synthetase mit CoA und dem Inhibitor Adenosin-5'-propylphosphat (Gulick *et al.*, 2003), die bakterielle 4-Chlorbenzoat:CoA-Ligase CBAL mit ihrem Substrat 4-Chlorbenzoat (Gulick *et al.*, 2004), sowie ein Homodimer der Acyl-CoA-Synthetase langkettiger Fettsäuren aus *Thermus thermophilus* mit Adenosin-5'-imidotriphosphat und Myristyl-AMP (Hisanaga *et al.*, 2004).

## 1.2 Adenylat bildende Enzyme in *Arabidopsis thaliana*

Im Jahre 2000 wurde die Sequenzierung des Genoms der Modellpflanze *A. thaliana* komplettiert. Die anschließende Analyse ergab, dass in dem 125 Mb großen Genom 25.498 Gene vorhergesagt werden (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Eine weitere Untersuchung der prognostizierten Genprodukte ermittelte 44 potentielle Proteine, die die typische, 12 Aminosäuren lange Konsensussequenz der AMP-Bindedomäne aufweisen und weitere 19, die eine leicht modifizierte Variante des Peptidmotivs tragen (Staswick *et al.*, 2002; Shockey *et al.*, 2003). Insgesamt enthält *A. thaliana* damit im Vergleich mit anderen Organismen die bislang größte Familie Adenylat bildender Enzyme (Shockey *et al.*, 2003). Jedoch ist die funktionale Charakterisierung der Proteine dieser Familie im Vergleich mit den Ligasen aus Bakterien, Hefen oder tierischen Organismen noch nicht sehr weit fortgeschritten (Watkins *et al.*, 1997; Shockey *et al.*, 2003). Bisher konnte nur einem Teil der Adenylat bildenden Proteine aus *A. thaliana* eine enzymatische Aktivität zugewiesen werden. Dazu gehören neun Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren (Shockey *et al.*, 2002), vier Isoformen der 4-Cumarat:CoA-Ligase (Lee *et al.*, 1995; Ehltling *et al.*, 1999; Hamberger *et al.*, 2004) und fünf 4-

Cumarat:CoA-Ligase-ähnliche Enzyme (Ke *et al.*, 2000; Shockey *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde acht Vertretern der 19 Mitglieder umfassenden Gruppe mit veränderter AMP-Bindedomäne eine Funktion als Amido-Synthetasen zugewiesen, die Phytohormone wie Indoleessigsäure oder Jasmonsäure an verschiedene Aminosäuren koppeln (Staswick *et al.*, 2002 und 2004). Im Folgenden wird auf die bereits charakterisierten Enzyme mit konservierter AMP-Bindedomäne näher eingegangen, d.h. die Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren, 4-Cumarat:CoA-Ligasen und 4-Cumarat:CoA-Ligase-ähnliche Enzyme.

### **1.2.1 Die Acyl –CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren (LACS) aus *A. thaliana***

Die Familie der Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren (LACS) besteht aus 11 Mitgliedern, die untereinander eine Aminosäuresequenzidentität von mindestens 30 % aufweisen. Sie unterscheiden sich grundlegend strukturell von weiteren Adenylat bildenden Enzymen aus *A. thaliana* durch das Vorhandensein einer 30 bis 70 Aminosäuren langen, für eukaryotische LACS typischen Linkerdomäne, welche für die enzymatische Funktion essentiell ist (Iijima *et al.*, 1996; Shockey *et al.*, 2002). Von diesen 11 Proteinen zeigen neun Isoformen eine detektierbare *in vitro*-Aktivität. Sie zeichnen sich durch ein sehr ähnliches, breites Substratspektrum aus und überführen vornehmlich langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren der Kettenlängen C16 und C18 in den korrespondierenden CoA-Ester (Shockey *et al.*, 2002). Bislang konnte drei der LACS eine spezifische *in vivo*-Funktion in *A. thaliana* zugewiesen werden. Den beiden einzigen peroxisomal lokalisierten LACS kommt eine essentielle Rolle in der Bereitstellung von aktivierten Fettsäuren im Keimungsgeschehen von *A. thaliana* zu. Dies wurde durch die Erzeugung einer keimungsunfähigen Doppelmutante der Gene *LACS6* und *LACS7* erkannt (Fulda *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Für die chloroplastidär lokalisierte LACS2 wurde durch die Analyse einer Einzelmutante eine Beteiligung an der Synthese von Fettsäuren zum Aufbau der pflanzlichen Kutikula nachgewiesen (Schnurr *et al.*, 2004). Phänotypen der anderen LACS sind bislang nicht beschrieben worden. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf enzymatische Redundanz.



### 1.2.2 Die 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) aus *A. thaliana*

Die Familie der 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) besteht aus vier Isoformen, die sich durch eine hohe Identität der Aminosäuresequenz von 60 bis 80 % auszeichnen. Diese Enzyme aktivieren *in vitro* hydroxy- und methoxysubstituierte Zimtsäurederivate zu reaktiven Thioestern (Ehlting *et al.*, 1999; Stuble *et al.*, 2001; Hamberger *et al.*, 2004). Obwohl die *in vivo*-Funktion bislang nur für 4CL1 durch die Analyse von Suppressionsmutanten bestätigt werden konnte, werden alle vier Enzyme auf Grund ihrer Substratspezifität dem pflanzlichen Phenylpropanstoffwechsel zugeordnet (Lee *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2005). In diesem Stoffwechselweg wird aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin eine Vielzahl an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie Flavonoide und Lignin gebildet (Dixon *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Die verschiedenen Isoformen besitzen ausgeprägte Substratspezifitäten und unterschiedliche, spezifische Expressionsmuster. So ist 4CL3 in den Blüten der Pflanze exprimiert und wird durch Bestrahlung mit UV-Licht stark induziert. Gleichzeitig aktiviert es mit hoher Affinität 4-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure). All dies deutet auf eine Rolle in der Synthese von Farb- und Schutzpigmenten, den Flavonoiden, hin (Ehlting *et al.*, 1999). 4CL1, 4CL2 und 4CL4 scheinen eher an der Bereitstellung von aktivierten Vorstufen für die Ligninbiosynthese beteiligt zu sein. Sie zeigen in den lignifizierten Teilen der Pflanze das höchste Expressionsniveau und aktivieren unterschiedliche Zimtsäurederivate. 4CL1 und 4CL2 akzeptieren Cumarsäure und Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) als Substrate (Ehlting *et al.*, 1999; Stuble *et al.*, 2001). 4CL4 aktiviert als einziges 4CL Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) (Hamberger *et al.*, 2004).

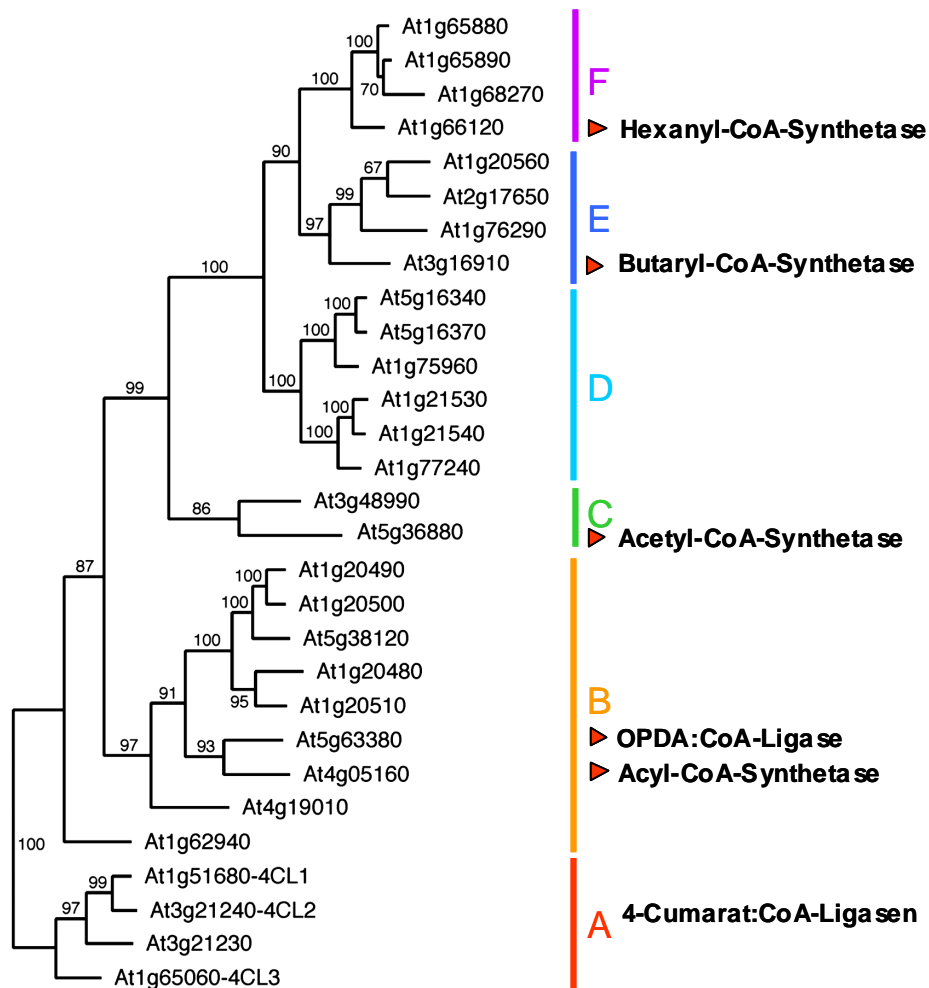
Zur Untersuchung der ausgeprägten Substratspezifität, bei gleichwohl hohem Verwandtschaftsgrad, wurde ein Homologiemodell auf der Kristallstruktur der Phenylalanin aktivierenden Domäne der Gramicidin-S-Synthetase erstellt (Conti *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 2003). Das bakterielle Protein wurde auf Grund homologer Anordnung struktureller Elemente sowie der Ähnlichkeit der Substrate Phenylalanin und 4-Cumarsäure ausgewählt. Durch dieses Verfahren konnten 12 Aminosäuren identifiziert werden, die die Substratbindetasche bilden und somit für die unterschiedlichen Substratpräferenzen der Isoformen für bestimmte Zimtsäurederivate verantwortlich sind. Dieses Modell wurde durch die Erstellung von 4CL-Varianten mit veränderter Substratspezifität in einem rationalen

Mutationsansatz bestätigt (Schneider *et al.*, 2003). Damit stellt die Familie der 4CLs die wohl am besten charakterisierte Gruppe von Adenylat bildenden Enzymen in *A. thaliana* dar.

### **1.2.3 Die 4-Cumarat:CoA-Ligase-ähnlichen Proteine (4CLL) aus *A. thaliana***

Innerhalb der Adenylat bildenden Enzyme aus *A. thaliana* konnten durch Sequenzvergleiche 25 Gene identifiziert werden, deren Produkte eine AMP-Bindedomäne, eine ähnliche Exon- und Intronstruktur und mindestens 25 % Aminosäuresequenzidentität zu den bekannten 4CLs aufweisen. Diese werden als 4-Cumarat:CoA-Ligase-ähnliche Proteine (4CLL) bezeichnet. Ein phylogenetischer Baum dieser Enzymfamilie ist in Abb. 2 dargestellt. Dabei wurden die 4CLLs korrelierend ihrer Ähnlichkeit mit 4CLs (Gruppe A) in die Gruppen B bis F eingeteilt (Schneider *et al.*, 2003). Auf Grund der AMP-Bindedomäne wird angenommen, dass die Proteine über die Bildung des Adenylat-Intermediates die Thioesterbildung noch unbekannter Substrate vermitteln. Trotz beständiger Versuche, konnte nur fünf Vertretern dieser Familie eine Funktion zugeschrieben werden (Ke *et al.*, 2000; Shockey *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2005). Die bislang charakterisierten 4CLLs unterscheiden sich funktionell deutlich von den 4CLs, da sie keine Zimtsäurederivate umsetzen. At5g36880 aus Gruppe C wurde über immunologische Methoden indirekt als Acetyl-CoA-Synthetase identifiziert (Ke *et al.*, 2000). Des Weiteren aktivieren die Enzyme At1g66120 aus Gruppe F und At3g16910 aus Gruppe E in *in vitro*-Versuchen Fettsäuren mit einer Präferenz für kurze und mittlere Kettenlängen (Shockey *et al.*, 2003). Im Jahr 2005 wurde für zwei peroxisomal lokalisierte 4CLLs der Gruppe B, At4g05160 und At5g63380, der *in vitro*-Umsatz von mittel- und langkettigen Fettsäuren, sowie erstmalig der Jasmonsäurevorstufen OPC:6 und OPDA beschrieben (Schneider *et al.*, 2005).

Durch Sequenzvergleiche zwischen den noch unbekanntem und bereits charakterisierten Enzymen aus anderen eukaryotischen Organismen wurden Vorhersagen über mögliche Funktionen der 4CLL getroffen. Für die am nächsten mit 4CL verwandten Proteine der Gruppe B wurden folgende Vermutungen beschrieben. Einerseits werden strukturell zu Zimtsäurederivaten verwandte Substanzen, wie Zimtsäure und Benzoesäure als Substrate vorgeschlagen (Schneider *et al.*, 2003). Unter Einbeziehung der Tatsache, dass acht dieser Proteine eine peroxisomale Importsequenz besitzen, wird aber auch eine Aktivierung von



**Abb. 2: Stammbaum der 4CLs und 4CLLs aus *A. thaliana***

Gruppe A umfasst die 4CLs, die Gruppen B bis F beinhalten die 25 4CLLs. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurde mittels der Programme PILEUP und PAUP ermittelt (Schneider *et al.*, 2003). Die vor Beginn dieser Arbeit bekannten enzymatischen Hauptaktivitäten sind angegeben.

Fettsäuren oder Phytohormonvorstufen nahe gelegt (Schneider *et al.*, 2003; Shockey *et al.*, 2003; Reumann *et al.*, 2004). Insbesondere für die Genprodukte At1g20510 und At5g63380 wurde über eine Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase sehr langkettiger Fettsäuren (> C22) spekuliert, da sie eine relativ hohe Sequenzidentität mit einer gut charakterisierten Isoform eines entsprechenden Enzyms aus der Maus (*Mus musculus*) aufweisen (Berger *et al.*, 1998; Shockey *et al.*, 2003). Der einzige Vertreter der Gruppe B ohne offensichtliches Importsignal

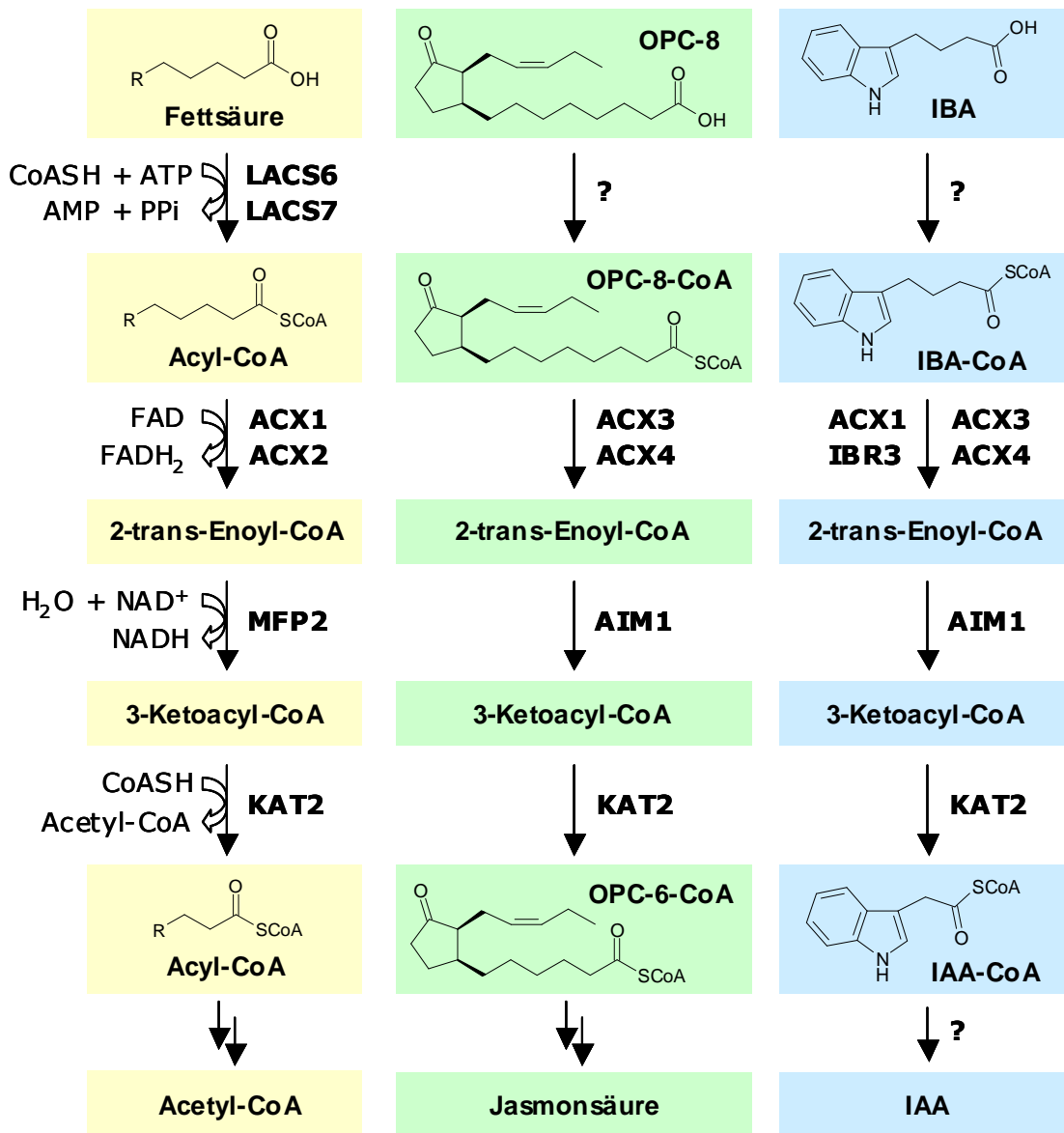
ist At1g62940. Außerdem wird dieses Protein auf Grund der Aminosäuresequenzidentität von ca. 40 % sowohl zu 4CL als auch zu den anderen 4CLLs als Bindeglied zwischen beiden Familien angesehen (Abb. 2). Somit scheint dieses 4CLL eine Sonderstellung einzunehmen. Diese wird durch zwei weitere Besonderheiten zusätzlich unterstützt. Im Sequenzvergleich bildet dieses Protein mit orthologen Acyl-CoA-Synthetasen aus Pappel (*Populus spec.*), Reis (*Oryza sativa*) und Tabak (*Nicotiana glauca*) eine eigene evolutionäre Untergruppe (unveröffentlichte Daten C. Douglas). Mitglieder dieser Untergruppe zeigen außerdem ein charakteristisches Expressionsmuster, das sich auf ein spezifisches Stadium der Blütenentwicklung konzentriert (unveröffentlichte Daten C. Douglas). Des Weiteren wird einer potentielle CoA-Ligase aus Gruppe C der 4CLLs, At3g48990, eine mögliche Rolle in der Abwehr von Pathogenen zugeschrieben, da ein entsprechendes Homolog aus Paprika (*Capsicum annuum*) nach Behandlung mit dem hemibiotrophen Bakterium *Xanthomonas campestris* transkriptionell stark induziert wird (Shockey *et al.*, 2003). Auch Daten zu *A. thaliana* unterstützen diese Theorie, so wird die Genexpression durch die Applikation des necrotrophen Pilzes *Botrytis cinerea* auf Blätter aktiviert (Daten aus ExpressionAngler). Zur funktionalen Charakterisierung der 4CLLs aus *A. thaliana* wurde außerdem versucht das Modell der 4CL-Substratbindetasche auf die 4CLLs zu übertragen. Dies erwies sich allerdings als ungeeignet (Doktorarbeit K. Schneider).

### 1.3 $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana*: Mögliche Substrate der 4CLL

Im Rahmen dieser Arbeit werden Enzyme funktional charakterisiert die in ihrer Mehrzahl eine putative peroxisomale Importsequenz aufweisen. Da die Peroxisomen die Organellen der pflanzlichen  $\beta$ -Oxidation darstellen, liegt eine Funktion der 4CLLs in der Aktivierung von Substraten für den Abbau mittels  $\beta$ -Oxidation nahe. Im Folgenden werden mögliche Substrate beschrieben.

#### 1.3.1 Fettsäuren

Fettsäuren spielen als Speicherlipide, Struktur lipide, Komponenten in Signaltransduktionswegen und als Membranbestandteile in allen Organismen eine zentrale Rolle. Ihr Abbau durch  $\beta$ -Oxidation ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. In *A. thaliana* werden Fettsäuren zunächst über einen ABC-Transporter (CTS1) ins Peroxisom importiert und durch



**Abb. 3: Die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana***

Dargestellt ist die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, der Jasmonsäurevorstufe OPC-8 und des Auxins Indolbuttersäure (IBA). Dabei erfolgt zunächst die Aktivierung der Carbonsäure zum korrespondierenden CoA-Ester. Für die Jasmonsäurevorstufen und IBA sind die entsprechenden Acyl-CoA-Synthetasen noch unbekannt. Im Folgenden werden Acyl-CoA-Oxidasen, Multifunktionsproteine und Ketoacyl-Thiolasen aktiv. Dabei sind in der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren diejenigen Enzyme zu sehen, die während der Keimung relevant sind. Im Falle der Fettsäuren und der OPC-8 können diese Schritte im Folgenden mehrfach wiederholt werden, sodass letztlich Acetyl-CoA bzw. Jasmonsäure entstehen. Die Co-Substrate der einzelnen Reaktionsschritte sind beispielhaft nur für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren angegeben.

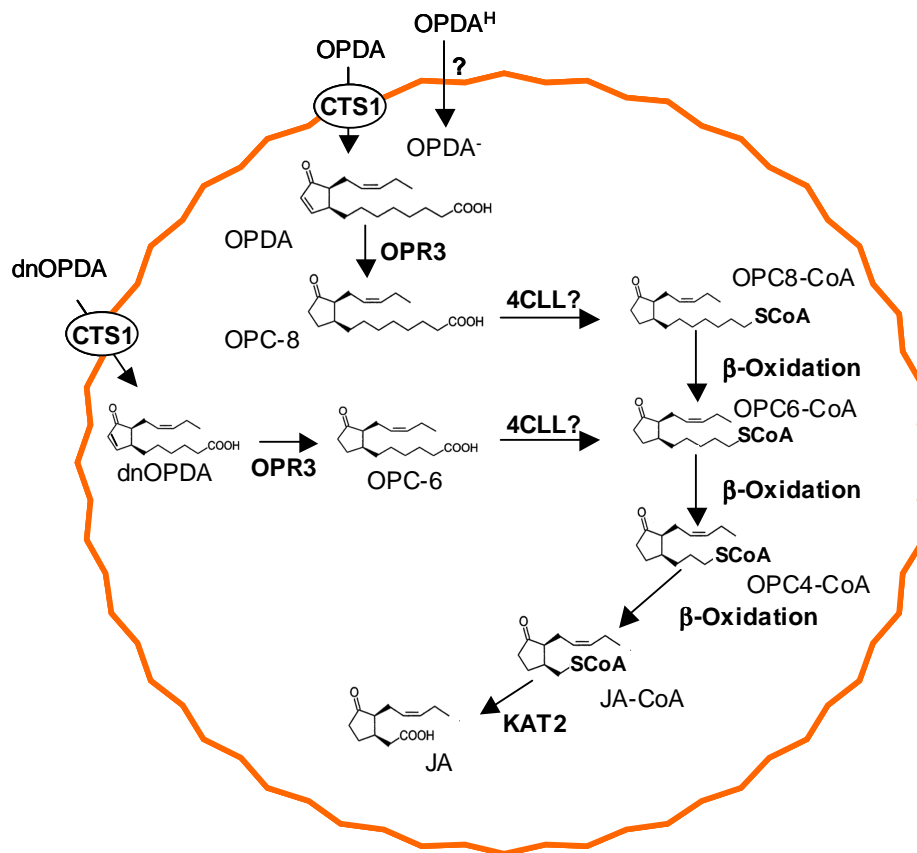
die Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 zum CoA-Ester aktiviert (Footitt *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2002 und 2004). Daraufhin erfolgt die Verkürzung der Kettenlänge mittels  $\beta$ -Oxidation in vier Reaktionsschritten, die von drei unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden (Kindl *et al.*, 1993). Durch die Isoformen ACX1 und ACX2 der insgesamt sechs Acyl-CoA-Oxidasen in *A. thaliana* wird eine ungesättigte Bindung eingefügt und somit 2-Trans-enoyl-CoA erzeugt (Adham *et al.*, 2005; Pinfield-Wells *et al.*, 2005). Die folgenden Schritte der Hydrierung zu 3-Hydroxyacyl-CoA und der Oxidation zu 3-Ketoacyl-CoA werden von der Isoform 2 der beiden Multifunktionalen Proteine durchgeführt (Preissig-Muller *et al.*, 1994; Eastmond *et al.*, 2000; Rylott *et al.*, 2006). Schlussendlich wird durch die Isoform 2 der drei 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen 3-Ketoacyl-CoA in Acyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten (Preissig-Muller *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1996; Germain *et al.*, 2001). Dieser Zyklus wiederholt sich bis zum kompletten Abbau der Fettsäure. Dann werden in angeschlossenen Stoffwechselwegen aus Acetyl-CoA Reduktionsäquivalente und Energie gewonnen (Beevers *et al.*, 1961). In *A. thaliana* wurden bislang auf Grund des leicht zu erkennenden Phänotyps von Verlustmutanten vornehmlich diejenigen Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren funktional charakterisiert, die an der Keimung der Pflanzen beteiligt sind (Cooper *et al.*, 1969). LACS6 und LACS7 kommt hierbei eine essentielle Funktion zu, sodass eine *lacs6/lacs7*-Mutante keimungsunfähig ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass 4CLLs zumindest bei der Aktivierung von Fettsäuren während der Keimung keine Rolle spielen. Allerdings ist die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in Pflanzen nach dem Keimlingsstadium nur wenig untersucht. Lediglich die Mutante einer Isoform des multifunktionalen Proteins AIM1, das eine Funktion im Primärmetabolismus erfüllt, deutet auf die Bedeutsamkeit des Fettsäureabbaus in allen Entwicklungsstadien der Pflanze hin. So zeigt die Mutante im adulten Stadium multiple Phänotypen, wie deutlich verkleinerte Blätter und stark verzweigte Blütenstängel (Richmond *et al.*, 1999). Es besteht daher die Möglichkeit, dass 4CLLs bei ausgewachsenen Pflanzen an der Fettsäureaktivierung beteiligt sein könnten.

### 1.3.2 Jasmonsäurevorstufen

Der Methylester der Jasmonsäure wurde 1962 als Komponente des Dufts von Jasmin (*Jasminum grandiflorum*) beschrieben, ab 1980 begann man die Existenz eines neuen Hormons zu vermuten (Yamane *et al.*, 1982). Heutzutage ist die Funktion von Jasmonsäure als

Phytohormon etabliert. Sie weist deutliche Parallelen zu den gut charakterisierten Eicosanoidhormonen tierischer Organismen auf (Liechti *et al.*, 2002). Sowohl ihre Entstehung aus Fettsäuren als auch ihre Funktion als Trauma- und Pathogenesesignale ähneln sich (Liechti *et al.*, 2002). Wie in Abb. 5 ersichtlich, ist Jasmonsäure verantwortlich für die Interaktion von Pflanzen mit der biotischen Umwelt, d.h. die Steuerung von Abwehrreaktionen gegen Herbivoren und necrotrophe Pilzen. Außerdem regelt es, zumindest in *A. thaliana*, die Entwicklung der männlichen Blütenorgane und ist somit an der Fertilität beteiligt. Darüber hinaus hat Jasmonsäure Einfluss auf die Wurzelentwicklung (Browse 2005).

Die Biosynthese von Jasmonsäure ist bereits detailliert erforscht. Nach einem entsprechenden Stimulus wird aus den Galactolipiden der Chloroplasten durch die Lipasen DAD1 und DGL  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3) freigesetzt und über mehrere enzymatische Schritte in 12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgewandelt (Schaller *et al.*, 2001; Gobel *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003; Hyun *et al.*, 2008). Das chloroplastidäre Endprodukt OPDA ist zugleich Vorstufe in der Biosynthese von Jasmonsäure und ein eigenständiges Signalmolekül, das für die Pathogenabwehr notwendig ist. Außerdem kann es, an Galactolipide verestert in den Chloroplasten gespeichert werden. Im nächsten Schritt wird OPDA auf bisher unbekannte Weise aus dem Chloroplasten exportiert. Der folgende Biosyntheseteil ist in Abb. 4 dargestellt. Der anschließende Transport in die Peroxisomen beruht teilweise auf der Aktivität eines ABC-Transporters (CTS1), wird jedoch höchstwahrscheinlich durch einen Ionenfallenmechanismus unterstützt (Theodoulou *et al.*, 2005). Hier erfolgt zunächst eine Reduktion des Cyclopentenons zum Cyclopentanon OPC-8 durch das Enzym OPDA-Reduktase (OPR3) (Schaller *et al.*, 2000). Der nun folgende Schritt der Aktivierung des unreaktiven Moleküls erfordert die Aktivität einer CoA-Ligase. Es wurden bereits zwei 4CLLs identifiziert, die *in vitro* Jasmonsäurevorstufen umsetzen können (Schneider *et al.*, 2005; Doktorarbeit K. Schneider; Diplomarbeit L. Kienow). An Hand des postulierten Mechanismus der Jasmonsäurebiosynthese wäre die Aktivität einer OPC-8:CoA-Ligase erforderlich (Vick *et al.*, 1983 und 1984), beide Enzyme setzen diese Jasmonsäurevorstufe aber nicht um. Somit würde entweder die Aktivierung des Substrates vor dessen Reduktion auf Stufe des OPDA stattfinden oder es sollten weitere Enzyme existieren, die die postulierte Aktivität besitzen. Nach der Aktivierung wird OPC-8:CoA durch die



**Abb. 4: Der peroxisomal lokalisierte Teil der Jasmonsäurebiosynthese**

Im ersten, chloroplastidäre lokalisierten Teil der Jasmonsäurebiosynthese entsteht OPDA bzw. dnOPDA, welche durch den ABC-Transporter CTS1 bzw. einen Ionenfallenmechanismus ins Peroxisom transportiert werden. Hier erfolgt die Reduktion zu OPC-8 bzw. OPC-6 durch OPR3, dann sollte eine Aktivierung dieser Vorstufen erfolgen, an der wahrscheinlich 4CLLs beteiligt sind. Die aktivierten Vorstufen werden durch β-Oxidation zu Jasmonyl-CoA, aus welchem durch KAT2 Jasmonsäure freigesetzt wird.

Enzyme der peroxisomalen β-Oxidation verkürzt (Abb. 3). Dabei konnte die Beteiligung zweier Isoformen der Acyl-CoA-Oxidase-Familie, ACX1 und ACX5, des Multifunktionsproteins AIM1 und der Ketoacyl-Thiolase KAT2 nachgewiesen werden (Richmond *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2004; Schillmiller *et al.*, 2007). Durch mehrere β-Oxidationsschritte entsteht auf diese Weise zunächst der CoA-Ester der Jasmonsäure, der durch die Aktivität einer Thioesterase in Jasmonsäure und CoA gespalten werden sollte. Ein entsprechendes Enzym wurde jedoch in *A. thaliana* noch nicht identifiziert. Jasmonsäure wird nicht nur als freie Säure in der Pflanze



vorgefunden, sondern unterliegt vielfältigen Modifikationen wie Decarboxylierung, Glycolysierung, Hydroxylierung, Konjugation an Aminosäuren oder Methylierung, so dass weitere enzymatische Aktivitäten vorgefunden werden (Seo *et al.*, 2001; Staswick *et al.*, 2004; Swiatek *et al.*, 2004; Miersch *et al.*, 2008).

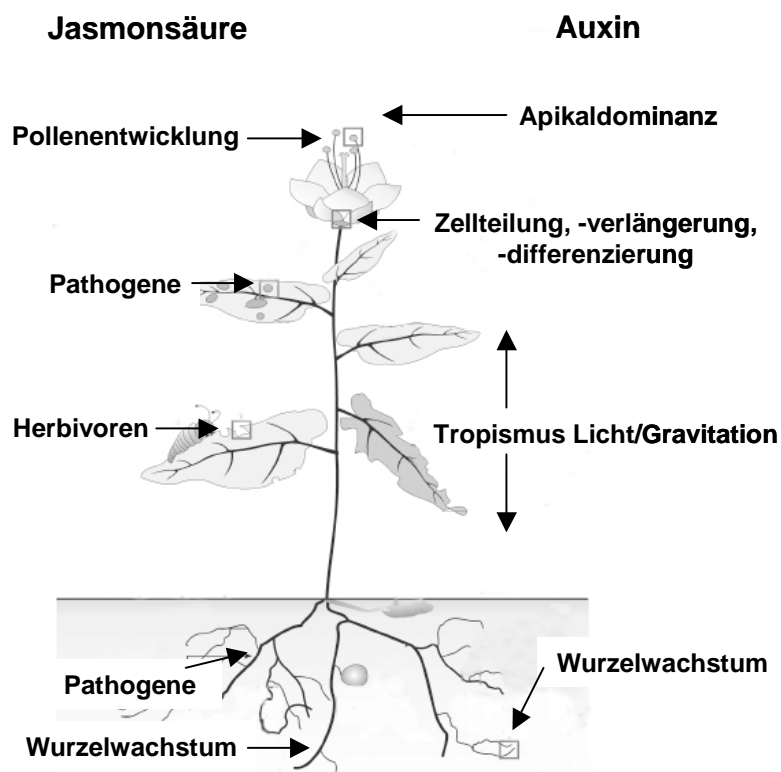
Daneben existiert ein alternativer Weg der Jasmonsäurebiosynthese, der von der Fettsäure Hexadecatriensäure (C16:3) ausgeht und parallel zu der soeben beschriebenen Hauptbiosyntheseroute zunächst Dinor-Oxophytodiensäure (dnOPDA) bildet (Abb. 4). Dieses wird zu OPC-6 reduziert und letztlich ebenfalls zu Jasmonsäure  $\beta$ -oxidiert (Weber *et al.*, 1997).

### 1.3.3 Auxin

Die Erforschung des Hormons Auxin gehört zu den ältesten Feldern der experimentellen Pflanzenforschung. Bereits Charles Darwin führte Versuche zum Gravitropismus durch und postulierte eine hypothetische Substanz, die das Sprosswachstum der Pflanzen moduliert (Darwin 1880). Die verantwortlichen Moleküle wurden allerdings erst 1931 aus menschlichem Urin isoliert und Auxin A und B genannt (Kögl *et al.*, 1931). Die Gesamtarchitektur einer Pflanze wird maßgeblich von Auxin beeinflusst (Abb.5). Es steuert Wachstum und Entwicklung und passt diese über die Vermittlung der Perzeption tropischer Reaktionen an die Umwelt an (Davies 1995). Die Biosynthese von Auxin, insbesondere der Hauptform Indoleessigsäure (IAA), findet in den meristematischen Geweben der Pflanze statt. Die Reaktionswege sind auf Grund hoher enzymatischer Redundanz bisher nur lückenhaft aufgeklärt. In vielen Fällen ist die Ausgangssubstanz die Aminosäure Tryptophan; es existiert jedoch auch ein Tryptophan unabhängiger Weg (Normanly *et al.*, 1999; Bartel *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2001). In *A. thaliana* wird die Hauptmenge an IAA von Tryptophan über Indole-3-Acetaldoxim als Zwischenprodukt gebildet. Die bislang identifizierten Enzyme sind in Chloroplasten und im Cytosol der Zelle lokalisiert.

IAA wird in der Pflanze in geringerem Maße als freie Säure vorgefunden (Woodward *et al.*, 2005a). Hauptformen, die vor allem der Speicherung dienen, sind Konjugate an verschiedene Aminosäuren und Zucker (Normanly *et al.*, 1993). Eine weitere Speichervariante von IAA ist Indolbuttersäure (IBA) (Ludwig-Müller *et al.*, 1993a und 1993b; Bartel *et al.*, 2001 und 2007). Da im Vergleich mit IAA die Seitenkette von IBA um eine Ethyleneinheit verlängert ist, bedarf

es zur Freisetzung von IAA eines  $\beta$ -Oxidationsschrittes (Abb.3). Es wird angenommen, dass IBA in den Peroxisomen der Zelle zunächst aktiviert wird, wozu die enzymatische Aktivität einer CoA-Ligase notwendig wäre (Bartel *et al.*, 2001). Bislang konnte jedoch kein Enzym mit einer solchen Aktivität in *A. thaliana* identifiziert werden. Nach der Aktivierung erfolgt dann die Verkürzung der Seitenkette durch  $\beta$ -Oxidation. Dabei konnte eine Beteiligung von drei Isoformen der Acyl-CoA-Oxidase (ACX1, ACX3, ACX4) durch Mutantanalysen nachgewiesen werden (Eastmond *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2005). Die weiteren Schritte werden durch das Multifunktionsprotein AIM1 und die Thiolase KAT2 katalysiert (Richmond *et al.*, 1999; Rylott *et al.*, 2006; Zolman *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2006).



**Abb. 5: Wirkungen der Phytohormone Jasmonsäure und Auxin**

Dargestellt sind die Hauptwirkungen der beiden Phytohormone Jasmonsäure und Auxin. Dabei wurden nur Wirkungen in *A. thaliana* berücksichtigt. Die Originalabbildung stammt aus dem Buchkapitel Oxylipins: Biosynthesis, signal transduction and action von C. Wasternack und wurde modifiziert.

#### 1. 4 Zielsetzung der Arbeit

In einigen Organismen wurden Adenylat bildenden Enzymen bereits wichtige Funktionen bei der Aktivierung von Carbonsäuren in verschiedensten Stoffwechselwegen zugewiesen. Obwohl *A. thaliana* eine der umfangreichsten Familien von Adenylat bildenden Enzymen aufweist, konnte bislang nur wenigen Vertretern eine Funktion im Stoffwechselgeschehen der Pflanze zugeordnet werden. Auf Grund der Sequenz- und Strukturähnlichkeit zu bekannten Enzymen (4CLs) wurde auch für die 4CLs eine Funktion als Adenylat bildende Enzyme vorhergesagt, eine funktionale Charakterisierung steht aber größtenteils noch aus. Dementsprechend wird auch für verschiedene Stoffwechselwege in *A. thaliana* die Existenz verschiedener CoA-Ligasen postuliert, welche bislang noch nicht identifiziert werden konnten.

Das Ziel dieser Arbeit ist die systematische, funktionale Analyse der 4CLs aus *A. thaliana*. Auf Grund der großen Anzahl an potentiellen CoA-Ligasen muss eine hohe enzymatische Redundanz erwartet werden. Daher wird die Strategie gewählt, zunächst die *in vitro*-Funktion dieser Enzyme zu identifizieren indem sie einem groß angelegten *in vitro*-Substratscreen unterzogen werden. Diese Aktivitäten lassen somit Rückschlüsse auf die *in vivo*-Funktionen zu, welche im Folgenden gezielt durch die Untersuchung von Mutanten in *A. thaliana* analysiert werden. Diese funktionale Charakterisierung der 4CLs wird durch die Analyse der Expression sowie erste Untersuchungen zu deren Regulation ergänzt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien der angegebenen Hersteller wurden verwendet.

±-cis,trans-Abscisinsäure (Sigma)	±-Jasmonsäure (Sigma)
α-Linolensäure (Sigma)	β-Mercaptoethanol (BioRad)
1-Aminocyclopropan-carbonsäure (Sigma)	1-[ <sup>14</sup> C]-Ölsäure (Sigma)
10 × Ligase-Puffer (Roche)	10 × Taq-Reaktionspuffer Y (Peqlab)
10 × TGS (BioRad)	2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (Sigma)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Sigma)	
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Sigma)	2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure (Aldrich)
2-Propanol (Merck)	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-propionsäure (Merck)
3-Aminobuttersäure (Aldrich)	3-Indolbuttersäure (Fluka)
3-Indolessigsäure (Fluka)	3-Indolpropionsäure (Fluka)
3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-buttersäure (Leibniz-Institut, Halle)	
3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-hexansäure (Leibniz-Institut, Halle)	
3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentan-1-oktansäure (Leibniz-Institut, Halle)	
4-Aminobuttersäure (Sigma)	4-Hydroxy-3-methoxyphenylpropionsäure (Fluka)
4-Hydroxybenzoesäure (Roth)	4-Hydroxyphenylelessigsäure (Merck)
4-Hydroxyphenylpyruvat (Fluka und Sigma)	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (Roth)
4-Methylvaleriansäure (Merck)	4-Phenylbuttersäure (Merck)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Glucuronsäure, Monohexylammoniumsalz (Roth)	
5 × RT-Reaktionspuffer (Invitrogen)	5-Phenylvaleriansäure (Merck)
6-Benzylaminopurin (Sigma)	Acrylamid/Bisacrylamid (BioRad)
Adenosinmonophosphat (Roche)	Adenosintriphosphat (Roche)
Agarose (Whittaker Molecular Applications)	Ammoniumchlorid (Merck)
Ammoniumhydrogencarbonat (Merck)	Ammoniumpersulfat (Sigma)
Ampicillin (Sigma)	Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company)

---

BASTA <sup>®</sup> (AgrEvo)	Benzoessäure (Sigma)
BP-Puffer (Invitrogen)	Bradford (BioRad)
Brij58 (Sigma)	Bromphenolblau (Sigma)
BSA (BioLabs)	Buttersäure (Merck)
Calciumchlorid (Merck)	Carbenicillin (Sigma)
Carnitin (Sigma)	Chloroform (Merck)
Coenzym A (Sigma)	Coronalon (MPI, Jena)
Cyclopentenon-12-oxophytodiensäure (Leibniz-Institut, Halle)	
Cycloheximid (ICN Chemicals)	Decansäure-Natriumsalz (Sigma)
Diethylpyrocarbonat (Sigma)	Dimethylsulfoxid (Merck)
Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)	D-Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (Roth)
Dinor-cyclopentenon-12-oxophytodiensäure (Leibniz-Institut, Halle)	
DL-1,4-Dithiothreitol (Invitrogen)	DL-3-Phenyllactat (Fluka)
Dodecansäure-Natriumsalz (Sigma)	1,4-Dithioerythritol (Sigma)
Essigsäure (Fluka)	Ethanol (Merck)
Ethidiumbromid (Merck)	Ethylendiamintetraacetat (Roth)
Ferulasäure (Sigma)	Fleischextrakt (Becton, Dickinson and Company)
Gentamycin (Sigma)	Glycerin (Merck)
Gibberellinsäure GA3 (Serva)	Glycin (Sigma)
Hefextrakt (Becton, Dickinson and Company)	Heptansäure (Merck)
Hexansäure (Merck)	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (Roth)
Imidazol (Sigma)	Indanoyl-Isoleucin (MPI, Jena)
Kaffeesäure (Sigma)	Kaliumacetat (Merck)
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)	Kaliumhydroxid (Merck)
Kanamycin (Sigma)	Kinetin (Sigma)
Linolsäure-Natriumsalz (Sigma)	Lithiumchlorid (Fluka)
L-Isoleucin (Merck)	L-Phenylalanin (Sigma)
LR-Puffer (Invitrogen)	Luciferin (Roche)
Magnesiumchlorid (Merck)	Magnesiumsulfat (Merck)

---

Mandelsäure (Acros)	Manganchlorid (Fluka)
Methanol (Roth)	Methyljasmonat (Sigma)
Methylviologen (Riedel-de-Haen)	Milchpulver (Difco)
MS-Salz (Sigma)	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (BioRad)
N,N-Dimethylformamid (Sigma)	N-Morpholino-Propansulfonsäure (Merck)
Natriumchlorid (Merck)	Natriumdihydrogenphosphat (Merck)
Ni <sup>2+</sup> -Natrium-Agarose (Qiagen)	Nonansäure (Merck)
Nucleotide, dNTP (Roche)	Oktansäure (Merck)
Oligo(dT) <sub>18</sub> (Sigma)	Ölsäure-Natriumsalz (Sigma)
Palmitinsäure-Natriumsalz (Sigma)	Para-Cumarsäure (Sigma)
Pepton (Becton, Dickinson and Company)	Phenylacetat (Sigma)
Phenylpropionsäure (Merck)	Phosphoenolpyruvat (Roche)
Propionsäure (Fluka)	Ponceau-Rot (Serva)
Puffer H (Roche)	Rifampicin (Sigma)
Rubidiumchlorid (Merck)	Saccharose (Merck)
Salicylsäure (Merck)	Sammelgelpuffer (BioRad)
SDS (BioRad)	Silwet L-77 (Lehle Seeds)
Simply-Blue <sup>TM</sup> Safe Stain (Invitrogen)	Sinapinsäure (Sigma)
Spermidin (Sigma)	Stearinsäure-Natriumsalz (Sigma)
Succinylsäure (Fluka)	Syringasäure (Merck)
Tetradecansäure-Natriumsalz (Sigma)	Thiamin-Hydrochlorid (Sigma)
Toluidin-Blau (Merck)	trans-Zimtsäure (Sigma)
Trenngelpuffer (BioRad)	Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Sigma)
TritonX-100 (Sigma)	Trypton (Becton, Dickinson and Company)
Tween20 (Sigma)	Valeriansäure (Merck)
Vanillesäure (Sigma)	

### 2.1.2 Kits

ECL-Detection-Kit (Amersham)	Plasmid Midi Kit, Tip 100 (Qiagen)
PCR Purification Kit (Qiagen)	TRIReagent <sup>®</sup> RNA-Isolation Reagent

### 2.1.3 Molekulargewichtsstandards

DNA-Marker, Gene Ruler™, 1kb DNA Leiter (MBI Fermentas)

Proteinmarker, Bench Mark™ Protein Leiter, 10-220 kDa (Invitrogen)

### 2.1.4 Enzyme

BamHI (BioLabs)

Pyruvatkinase (Roche)

DpnI (BioLabs)

Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Gateway BP-Clonase-Mix (Invitrogen)

RNase-out RNase-Inhibitor (Roche)

Gateway LR-Clonase-Mix (Invitrogen)

SalI (BioLabs)

KpnI (BioLabs)

SphI (BioLabs)

Lactatdehydrogenase (Sigma)

T4 DNA Ligase (Roche)

Luciferase (Roche)

SAWADY Taq-DNA-Polymerase (Peqlab)

Myokinase (Sigma)

### 2.1.5 Antikörper

Mouse anti-His-Tag Monoclonal Antibody (Qiagen)

Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)

### 2.1.6 Primer

Zur Erstellung der Expressionsplasmide der folgenden 4CLLs im Vektor pQE-32 (Sigma):

#### Bezeichnung

#### Sequenz

At1g20510 SphI 5` TTATAATATGCATGCCGTCAGTGAATTCTCGAGTGG 3`

At1g20510 SalI 5` ATTATATGTCGACTCAAAGCTTGGAGTTGGAAGTTGC3`

At1g20480 SphI 5`TTATAATATGCATGCCGGTTAAGCACGGCGTCG 3`

At1g20480 KpnI 5`TATTATATCCATGGCTAGAGTTTTGAAGTTGTGAGC 3`

At3g48990 SphI 5`ATTATAATAGCATGCATAGCGATACTCTCTCA 3`

At3g48990 SalI 5`ATTATAGTCGACTCAGGGCTTCTCAAGGAAATGT 3`

Zur Erstellung des Expressionsplasmids von At1g20510 im Vektor pQE-70 (Sigma):

#### Bezeichnung

#### Sequenz

At1g20510SphI 5` TTATAATATGCATGCCGTCAGTGAATTCTCGAGTGG 3`

At1g20510BamHI 5` TACGACATAGGATCCAAGCTTGGAGTTGGAAG 3`



Für das Einfügen gezielter Mutationen in At1g20510 (Sigma/Invitrogen):

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
MutLys20510for	5`CCAAAGAACCCTTCAGGCAATATTCTACGCAAAGATCTC3`
MutLys20510rev	5`GAGATCTTTGCGTAGAATATTGCCTGAAGGGTTCTTTGG 3`
20510Mutstopfor	5`CCAACTCCAAGCTTTTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG 3`
20510Mutstoprev	5`CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAAAGCTTGGAGTTGG3`

Für das GUS-Reporterkonstrukt von At1g20510 erstellt mit der Gateway<sup>TM</sup>-Technologie (Invitrogen):

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
At1g20510attb1	5`GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCATGGCTTCAGTGA ATTCTCG 3`
At1g20510attb2	5`GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCTCAAAGCTTGGAG TTGGAAG 3`

Zur Verifizierung der *knock-out* Linien (Metabion/Sigma):

<b>Gen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
At5g63380	003233A	5`GTAGGTTTCTTCTAGGTCAGGCTC 3`
	003233B	5`TGAGTGAGCAAACGCCTTTGACC 3`
At4g05160	05160A	5`TACTTATTCTCAGCTTCAGAGAGG 3`
	05160B	5`ACGACAGCATCTAGTATATCAGGATG 3`
At1g20510	4CL9-LP	5`AAATATACTCCATCTCCATCCCG 3`
	4CL9-RP	5`CAGCGATTGGCAAGTATCAAG 3`
At1g20510	GK550H05for	5`AAGTTACGGTGAGACGAGATCACT 3`
	GK550H05rev	5`AGCGATTGGCAAGTATCAAG 3`
At1g20500	4CL6-LP	5`AGCTGCACTGTGTCGTGAGTC 3`
	4CL6-RP	5`GTTCCCGACGAGTAAAGCATC 3`
T-DNA-SALK	T-DNASALK	5`TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3`
T-DNA-GK	T-DNAGK	5`CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC 3`

RT-PCR Primer (Sigma, Metabion) :

<b>Gen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
At1g20480	20480RThin	5` TGGAGACTCATCGTTCTTCG 3`
	20480RTrueck	5` TCAGGGATGGGTATTACTGC 3`
At1g20490	20490RThin	5` TGGTGATTCTCCGGAGATTC 3`
	20490RTrueck	5` TCCGGAAACGGAATAACAGC 3`
At1g20500	20500RThin	5` TCATCTGTACCGTCCCGATG 3`
	20500RTrueck	5` GCTGGAGGCACCTGATAGC 3`
At1g20510	20510forw	5` GGAACCACGGGAATGAGCAAAGGAGTGATCTCG 3`
	20510rev	5` AGCCTCTAGCTCAGCTGGAGCAACCTGATAACC 3`
At1g62940	62940RThin	5` GCTCATGAGGTTTCGTTTGC 3`
	62940RTrueck	5` CCGGAGCAACCTGAAAACCT 3`
At4g19010	19010RThin	5` CCTGGAGAAATTGGCAAATGG 3`
	19010RTrueck	5` GGTAAGGCTGACGAGCGAC 3`
At4g05160	05160 Rthin	5` TGGAGAAATCCGGCTACGG 3`
	05160Rtrueck	5` ATTCCATATCCCTGCATAAGC 3`
At5g38120	38120RThin	5` GGAGTGAATTCGTCTCACGG 3`
	38120RTrueck	5` TTCCTGAAATAACCTTTGGCG 3`
At5g63380	63380 Rthin	5` TGACGAAAACCAACGACAGC 3`
	63380 Rtrueck	5` CGGTGGAACCTGATAAGCC 3`
OPR3	OPR3hin	5` TTCTCATGCAGTGTATCAACC3`
	RTOPR3rueck	5` AAGCCATCCTCAAGCTCTTC 3`
AOS	AosRThin	5` GATACAAAGCTCAAAGCCGACGCTCCGGGTTTG 3`
	AosRTrueck	5` CGGAAAATCTCAATCACAAACAACCTCGCCACC 3`
ACX1	RThinACX1	5` ATGGAAGGAATTGATCACCTC 3`
	RTrevACX1	5` GTTGCACGATGAATCCATGG 3`
CTS1	RThinPXA1	5` GATGATGTAGCTGGAGGTG 3`
	RTrevPXA1	5` AACAGACAAACCACTTGAAGC 3`
LACS6	RThinLacs6	5` CGTATCAACGCTATCCACTC 3`

	RTrevLacs6	5`GCATCAGGACCAAGAGTATC 3`
KAT2	RThinPED1	5`GAGCATCTCCGACCTTCTTC 3`
	RTrevPED1	5`GCGAGTCAACAGCAGCTTG 3`
MFP2	RThinMFP2	5`ATGGATTCACGAACCAAGGG 3`
	RTrevMFP2	5`CTTCAGCTTCCTTTTCTAAACC 3`
Actin	Actin RThin	5`CCTTGTACGCCAGTGGTCGTACAACCGGTATTG 3`
	Actin RTrueck	5`ATAGTGGTTCCACCACTGAGCACAATGTTACCG 3`

### 2.1.7 Vektoren

Verwendete Vektoren:

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pQE-32	<i>PT5</i> , 2× <i>lacO</i> , <i>RBS</i> , 6× <i>His</i> , <i>MCS</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Qiagen
pQE-70	<i>PT5</i> , 2 x <i>lacO</i> , <i>RBS</i> , <i>MCS</i> , 6 x <i>His</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Qiagen
pDONR <sup>TM</sup> 207	<i>pUC ori</i> , <i>rrnB T1+2</i> , <i>attP1</i> , <i>ccdB</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>attP2</i> , <i>Gent<sup>R</sup></i>	Invitrogen
pENSGYFP	<i>pXCS</i> , <i>p35SS</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	MPIZ, Köln
pJawohl11-GW-GUS	<i>attR1</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>ccdB</i> , <i>attR2</i> , <i>uidA</i> , <i>NosT</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	MPIZ, Köln
pREP4	<i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	Qiagen
pEXSGYFP	<i>pXCS</i> , <i>p35SS</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	MPIZ, Köln
pAMPAT	<i>p35SS</i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>pat</i> , <i>MCS</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Lipka <i>et al.</i> , 2003
pJ2B-3HA-GW	<i>pXCS</i> , <i>p35SS</i> , <i>pat</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	MPIZ, Köln

Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmide:

Plasmid	Eigenschaften	Verwendeter Bakterienstamm
pQE32-At1g20510	pQE-32, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , SphI/SalI-Schnittstellen, zur Expression des Proteins, N-terminaler His-Tag	DH5α DH5α-pREP4
pQE70-At1g20510	pQE-70, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , SphI/BamH1-Schnittstellen, zur Expression des Proteins, C-terminaler His-Tag	DH5α DH5α-pREP4

pQE32-At1g20510-K530N	pQE-32, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , Ersatz K530 gegen N, SphI/SalI-Schnittstellen, zur Expression des Proteins, N-term. His-Tag	DH5 $\alpha$ DH5 $\alpha$ -pREP4
pQE32-At1g20480	pQE-32, cDNA des Gens <i>At1g20480</i> , SphI/KpnI-Schnittstellen, zur Expression des Proteins, N-terminaler His-Tag	DH5 $\alpha$ DH5 $\alpha$ -pREP4
pDONR <sup>TM</sup> 207-20510Pr	pDONR <sup>TM</sup> 207, 1 kb-Promotor des Gens <i>At1g20510</i>	DH5 $\alpha$
pJawohl11-GW-GUS-20510Pr	pJawohl11-GW-GUS, 1 kb-Promotor des Gens <i>At1g20510</i> vor <i>uidA</i>	DH5 $\alpha$ GV3101
pDONR <sup>TM</sup> 207-20510	pDONR <sup>TM</sup> 207, cDNA des Gens <i>At1g20510</i>	DH5 $\alpha$
pENSGYFP-20510	pENSGYFP, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , N-terminal YFP-Fusion	DH5 $\alpha$
pDONR <sup>TM</sup> 207-20510Mut	pDONR <sup>TM</sup> 207, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , kein Stop-Codon	DH5 $\alpha$
pEXSGYFP-20510	pEXSGYFP, cDNA des Gens <i>At1g20510</i> , C-terminal YFP-Fusion	DH5 $\alpha$ GV3101 (pMP90RK)
pAMPAT-05160	pAMPAT, 35SS, cDNA des Gens <i>At4g05160</i> , zur Komplementation	DH5 $\alpha$ GV3101 (pMP90RK)
pJ2B-05160	pJ2B, 35SS, HA-Tag, cDNA des Gens <i>At4g05160</i> , zur Komplementation	DH5 $\alpha$ GV3101 (pMP90RK)

pAMPAT-63380	pAMPAT, 35SS, cDNA des Gens <i>At5g63380</i> , zur Komplementation	DH5 $\alpha$ GV3101 (pMP90RK)
--------------	--	-------------------------------------

## 2.1.8 Bakterienstämme

### 2.1.8.1 *E. coli*

Stamm	Eigenschaften	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>endA1, supE44 thi-1 <math>\lambda^-</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR (lacZYA-argF) U196 <math>\rho</math>80 <math>\Delta</math>lacZ <math>\Delta</math>M15mcrA <math>\Delta</math>(<i>mmr</i> <i>hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>)</i>	GibcoBRL Life Technologies
DH5 $\alpha$ pREP4	<i>endA1, supE44 thi-1 <math>\lambda^-</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR (lacZYA-argF) U196 <math>\rho</math>80 <math>\Delta</math>lacZ <math>\Delta</math>M15mcrA <math>\Delta</math>(<i>mmr</i> <i>hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>) pREP4</i>	GibcoBRL Life Technologies
LS1907	K12 <i>fadD::Kan<sup>R</sup></i>	Paul N. Black (Albany Medical College, NY)
LS1908	K12 $\Delta$ <i>fadR</i> <i>fadD::Kan<sup>R</sup></i>	Paul N. Black

### 2.1.8.2 *A. tumefaciens*

Stamm	Eigenschaften	Referenz
pGV3101	Rif <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Koncz <i>et al.</i> , 1986
pGV3101 (pMP90RK)	Rif <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Koncz <i>et al.</i> , 1986

### 2.1.8.3 *P. syringae* pv. *tomato* strain DC3000

Stamm	Eigenschaften	Referenz
AvrRpm1	Rif <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ritter <i>et al.</i> , 1995
AvrRps4	Rif <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Hinsch <i>et al.</i> , 1996

### 2.1.9 Pflanzenlinien

Columbia 0

Columbia 5

Columbia 0 KO *At1g20500* SALK\_067285 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, zur Verfügung gestellt von H. Weng, Washington State University, Pullman)

Columbia 0 KO *At1g20510* SALK\_140659 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, zur Verfügung gestellt von H. Weng, Washington State University, Pullman)

Columbia 0 KO *At1g20510* GK-550H05 (GABI-Kat, MPIZ Köln)

Columbia 0 KO *At4g05160* SALK\_050214 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)

Columbia 0 KO *At5g63380* SALK\_003233 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)

Columbia 0 *At4g05160* SALK\_050214/ *At5g63380* SALK\_003233

Columbia0 *At4g05160* SALK\_050214/ *At5g63380*SALK\_003233/ *At1g20500* SALK\_067285

Columbia0 *At4g05160* SALK\_050214/ *At5g63380*SALK\_003233/ *At1g20510* SALK\_140659

Columbia 0 *At1g20510p::GUS*

Columbia 0 *At5g63380p::GUS*

Columbia 5 *At5g63380p::GUS*

Columbia 0 *At1g62940p::GUS* (Diplomarbeit S. Koch)

Columbia 0 *4CL1(At1g51680)p::GUS* (Serrano *et al.*, 2006)

Columbia 0 *LOX2(At3g45140)p::GUS* (Jensen *et al.*, 2002)

### 2.1.10 Geräte

Axiophot Photomikroskop (Carl-Zeiss)

BioPhotometer 6131 (Eppendorf)

Sonifier S-250 (Branson)

FluoroCount (Packard)

GeneAmp, PCRsystems 9700 (Applied Biosystems)

LSM 510 Meta confocal laser microscope (Carl-Zeiss)

Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold Technologies)

Micromass Q-TOF 2 TM Spectrometer (Waters)

Multi-Purpose Scintillation Counter L6500 (Beckman Coulter)

Particle Delivery System Biolistic PDS-1000/He (BioRad)

Cary 50-Spectrometer (Varian)

Elektroporation Gene Pulser (BioRad)

### **2.1.11 Sonstige Materialien**

Einmalküvetten, halbmikro (Brand)

Quarzküvetten

Poly-Prep Chromatographiesäulen (BioRad)

Filterflaschen 0,2 µM (Nalgene, Nalge Nunc International Corp.)

48 und 96-*well*-Platten (Nalgene, Nalge Nunc International Corp.)

Petrischalen Ø 92mm

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Isolation von DNA aus *A. thaliana***

- Extraktionspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS, autoklaviert

Zur Isolation der DNA von *A. thaliana* wurde ein Blatt geerntet, in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mittels eines Pistills homogenisiert und in 400 µl Extraktionspuffer aufgenommen. Nach dem Vortexen der Probe wurde diese 3 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 320 µl Isopropanol folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 20 min. Das Pellet wurde in 190 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### **2.2.1.2 Isolation von RNA aus pflanzlichem Gewebe**

- DEPC-Wasser: 1 ml DEPC, 1 l steriles Wasser, 24 h bei RT, danach autoklaviert

Das Pflanzenmaterial wurde sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurde es mit Hilfe eines ebenfalls durch flüssigen Stickstoff abgekühlten Mörsers und Pistills zu einem feinen Pulver gemahlen. Von diesem wurden jeweils 100 mg in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen

und mit dem Isolationskit TRI-Reagent<sup>®</sup> (Ambion) nach Angaben des Herstellers weiter bearbeitet. Das Pellet wurde 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 30  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration bei 260 und 280 nm wurde die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.2.1.3 Synthese von cDNA aus Poly-A-RNA

Zur Synthese von cDNA wurde die RNA in einem Reaktionsgefäß der reversen Transkription mit Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern unterzogen. Folgenden Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben:

10  $\mu$ g RNA

1  $\mu$ l Rnase-Out (40 U/ $\mu$ l)

3  $\mu$ l Oligo-(dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu$ g/ml)

add 25  $\mu$ l DEPC -Wasser

Diese Lösung wurde 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert und daraufhin 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden

1  $\mu$ l DTT (0,1 M)

10  $\mu$ l 5  $\times$  Reaktions-Puffer

2  $\mu$ l dNTP-Mix (je 10 mM)

1  $\mu$ l SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)

hinzugefügt, die Reaktion 1 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  ausgeführt und der gesamte Ansatz 5 min bei  $90^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Die Konzentration der erhaltenen cDNA wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt und diese des Weiteren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.1.4 PCR

Für die PCR-Ansätze zur Amplifizierung der kompletten 4CLL-cDNA wurde jeweils die folgende Lösung angesetzt und mit dem für das gewünschte Produkt spezifischen Primerpaar (Kap. 2.1.6) versehen. In diesen Fällen war die PCR 40 Zyklen lang.

Für die semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung von Transkriptmengen in cDNA-Proben wurden intronüberspannende Primer eingesetzt und die Konzentration der cDNA über den Einsatz von Actin-Kontrollprimern normiert (Kap. 2.1.6). Mit einer cDNA-Probe wurden zwei RT-PCR-Ansätze durchgeführt: ein Kontrollansatz, in dem sich die Actin-Primer befand und



ein Testansatz, in dem die jeweils transkriptspezifischen Primer vorlagen. Aus diesen Reaktionsansätzen wurden beginnend bei 20 Zyklen und dann im Abstand von 5 Zyklen jeweils 5  $\mu$ l entnommen.

Die PCR-Lösung enthielt folgende Komponenten:

5  $\mu$ l 10 $\times$ Puffer

2  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM)

2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

2  $\mu$ l Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l cDNA-Template

0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

35  $\mu$ l Wasser

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe des folgenden Programms:

94°C 5 min

94°C 30 s

57°C 30 s

72°C 1 min pro 1Kb

72°C 5 min

4°C  $\infty$

} 20-40 $\times$

Aliquots der PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle auf 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt.

### 2.2.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

- TAE-Puffer 40 mM Tris/Acetat pH8,3; 1 mM EDTA

Zur Überprüfung von PCR-Ansätzen oder Restriktionsverdau wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das Gel bestand aus 0,8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer und 3,5  $\mu$ l Ethidiumbromid. Nach Beladung des Gels mit den Proben sowie einem 1 Kb-Molekulargewichtsstandard wurde die Elektrophorese 30 min bei 90 V in TAE-Laufpuffer durchgeführt.

## 2.2.1.6 Konstruktion von Plasmiden

### 2.2.1.6.1 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Für die Erstellung der Expressionsplasmide wurde die spezifische cDNA zunächst aus einer cDNA-Probe amplifiziert. Wurde cDNA in die Vektoren pQE-32 oder pQE-70 kloniert, so wurde sie während der Amplifikation mit Schnittstellen für zwei Restriktionsenzyme versehen (Kap. 2.1.6). Daraufhin wurde die aufgereinigte und überprüfte Probe und der Vektor mit denselben zwei Restriktionsenzymen verdaut (37° C, 1 h). Zur Integration der geschnittenen DNA-Fragmente in den verdauten Vektor wurde eine Ligationslösung angesetzt:

2 µl T4-Ligase-Puffer

2 µl T4-Ligase

7 µl verdautes PCR-Produkt

1 µl verdauter Vektor

8 µl Wasser

Die Inkubation wurde bei 4°C ÜN durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α (Kap. 2.2.3.2) mit dem Plasmid. Dieses wurde dann wie in den folgenden Kapiteln beschrieben vermehrt, aufgereinigt und sequenziert.

### 2.2.1.6.2 Klonierung mittels der Gateway™-Technologie

Über dieses Klonierungssystem wurde das Reportergenkonstrukt von *At1g20510* im Vektor pJawohl11 erzeugt. Außerdem wurden die Expressionskonstrukte zur subzellulären Lokalisation des Proteins *At1g20510* in den Vektoren pENSGYFP und pEXSGYFP und die Komplementationskonstrukte *At4g05160* und *At5g63380* in den Vektoren pAMPAT und pJ2B mittels Gateway-Technologie (Invitrogen) kloniert. Dazu wurde für das Reportergenkonstrukt aus genomischer DNA mittels spezifischer Primer im PCR-Ansatz die Promotorregion mit 25bp langen Rekombinations-Bereichen (att-Sequenzen) amplifiziert. Die spezifischen cDNAs für die Expressionskonstrukte wurden aus cDNA-Proben amplifiziert und dabei ebenfalls mit att-Sequenzen versehen. Dann wurde weiter nach Angaben des Herstellers vorgegangen: Der verwendete Donor-Vektor war in allen Fällen pDONR207. Mit den Ansätzen wurden jeweils *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (Kap. 2.2.3.2), das Plasmid wie in den folgenden Kapiteln

beschrieben vermehrt, aufgereinigt und sequenziert. Daraufhin wurde es in *A. tumefaciens* (Kap.2.2.3.5) und im Folgenden in *A. thaliana* (Kap. 2.2.4.7) eingebracht.

### **2.2.1.7 Einfügen rationaler Mutationen in die cDNA von At1g20510**

Es wurde eine katalytisch inaktive Mutante von At1g20510 im Vektor pQE-32 erzeugt, bei der die Aminosäure Lysin an Aminosäureposition 530 gegen Asparaginsäure ersetzt wurde. Außerdem wurde eine Variante von At1g20510 im Vektor pDONR207 erzeugt, die kein Stop-Codon besitzt, da ein C-terminales Fusionsprotein erzeugt werden sollte. Prinzipiell wurde nach Angaben des Protokolls des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) vorgegangen. Dazu wurde zunächst eine PCR mit in Kap. 2.1.6 beschriebenen Primern und dem Template, einer Aufreinigung des zu mutierenden Konstruktes im Vektor, angesetzt. Die PCR war auf 18 Zyklen beschränkt. Daraufhin wurde das PCR-Produkt mit DpnI verdaut (37° C, 1 h) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht. Das Plasmid wurde dann wie in den folgenden Kapiteln beschrieben vermehrt, aufgereinigt und sequenziert.

### **2.2.1.8 „Mini-“ und „Midi-“Präparation von Plasmid-DNA**

Beide Präparationen wurden mit Hilfe des *Plasmid Purification Kit* (Qiagen) durchgeführt. Für die „Mini“-Präparation wurden resistente *E. coli* Kolonien von den Selektivplatten in jeweils 3 ml 2 $\times$ LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und ÜN bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen der 3 ml-Kulturen in ähnlicher Weise wie im *Qiagen Plasmid Midi Protocol* beschrieben, aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde dann durch einen Restriktionsverdau überprüft und erneut *E. coli* DH5 $\alpha$  wie in Kapitel 2.2.1.8 mit dem gewählten Konstrukt transformiert. Die Inkubation erfolgte ÜN in 50 ml selektivem 2 $\times$ LB-Medium bei 37°C. Dann wurde nach Anleitung des *Qiagen Plasmid Midi Protocol* die „Midi“-Präparation der Plasmide durchgeführt und das Pellet am Ende in 80  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

### **2.2.1.9 Sequenzieren**

Alle erzeugten Plasmidkonstrukte wurden vor der Weiterverwendung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die Sequenzierung erfolgte an einem ABI-PRISM™ 377 DNA-Sequenzierer (ADIS, Serviceeinheit, MPIZ-Köln).

## 2.2.2 Arbeiten mit Proteinen

### 2.2.2.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen

- Natriumphosphatpuffer 1: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5
- Natriumphosphatpuffer 2: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 600 mM NaCl, 30 mM Imidazol
- Natriumphosphatpuffer 3: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerin
- Natriumphosphatpuffer 4: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 100 mM Imidazol, 10% Glycerin
- Natriumphosphatpuffer 5: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 400 mM Imidazol, 10% Glycerin

Zur heterologen Expression der cDNA der 4CLL-Gene im Expressionsvektor pQE-32 wurden kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  pREP4 bzw. M15 mit dem jeweiligen Plasmid transformiert (Kap. 2.2.3.2). Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte in 50 ml selektivem 2 $\times$ LB-Medium (37°C, ÜN). Diese wurde daraufhin in 400 ml frisches, selektives 2 $\times$ LB-Medium überführt, 1 h bei 37 °C geschüttelt, dann mit 0,5 g IPTG die Proteinexpression induziert und weitere 5 h bei 28°C inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur in zwei 200 ml Aliquots abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C), das Pellet in 5 ml Natriumphosphat-Puffer 1 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

Zur Aufreinigung des Proteins wurde das Zellpellet in 50 ml Natriumphosphat-Puffer 1 aufgetaut. Die Lyse der Bakterien erfolgte unter Eiskühlung durch drei Ultraschallbehandlungen von jeweils 45 s (20 kHz, constant cycle, Branson Sonifier). Die Suspension wurde daraufhin in 30 ml Corex-Röhrchen überführt, und die Zelltrümmer abzentrifugiert (8000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in ein Becherglas überführt und im Verhältnis 3:1 mit Puffer 2 versetzt. Nach Zugabe von 0,5 ml Nickel-NTA-Matrix (ÜN äquillibriert in Natriumphosphatpuffer 1) wurde die Lösung für 1 h bei 4 °C gerührt, in Falcon-Tubes abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C) und das Pellet dreimal mit Puffer 3 gewaschen. Daraufhin wurde die Nickel-Matrix in eine Chromatographie-Säule überführt, die Säule mit 100  $\mu$ l Puffer 4 gewaschen und das Protein in drei Fraktionen mit jeweils 500  $\mu$ l Puffer 5 eluiert. Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurden zunächst nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Daraufhin wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese nach dem Protokoll von Laemmli (1970) auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurden jeweils 2 bis 4  $\mu$ g

der Proteinfractionen und ein Molekulargewichtsmarker auf 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und nach 90 min bei 100 V mit der Safe-Stain Färbelösung Coomassie gefärbt.

### 2.2.2.2 Enzymatischer Aktivitätstest: Luciferase-Test

- Tris-ATP-Lösung: 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,7, 110 µl ATP-Lösung 1:22, 20 µl DTE, 2 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub>
- ATP-Lösung: 360 mg ATP, 300 µl 4 N KOH, 4500 µl 0,5 M Tris/HCl pH 7,8, 1200 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, 48 µl 0,5 M DTE
- Substratlösung: 4 mM Substrat, 0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 2 % Triton
- Luciferin/Luciferase-Mix: 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,7, 115 µl Luciferin-Lösung, 50 µl Luciferase-Lösung
- Luciferin-Lösung: 1 µg/µl Luciferin, 0,1 M Tris/HCl pH 7,7
- Luciferase-Lösung: 1 mg/ml Luciferase, 0,1 M Tris/HCl pH 7,7

Der Luciferase-Test bietet die Möglichkeit eines breit angelegten Substratscreens für ATP verbrauchende Enzyme. Grundlegend ist hierbei die Kopplung der zu untersuchenden Testreaktion an die ATP-abhängige Aktivität der Luciferase (Abb. 6). Diese setzt unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und ATP ihr Substrat Luciferin zu Oxyluciferin um. Dabei wird Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich frei, die im Luminometer bei 560 nm detektiert wird (Schneider *et al.*, 2005).

Reaktionsansatz:

0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7.7)

0,05 mM ATP

0,1 mM CoA

0,2 mM Substrat

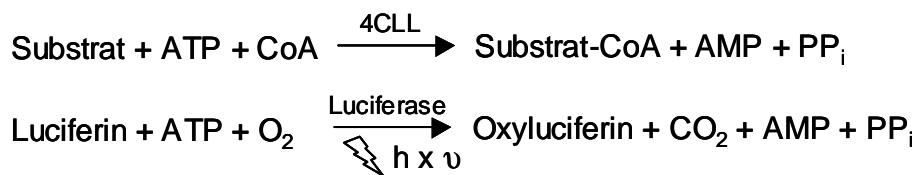
1 mM DTE

0,2 mM MgCl<sub>2</sub>

Pro 200 µl Reaktionsansatz wurde 2 µg aufgereinigtes Enzym eingesetzt.

Reaktionszeit  
2 bis 22 h,  
RT

Diese Ansätze wurden 2 und 22 Stunden inkubiert und dann die Rest-ATP-Menge über die gekoppelte Luciferase-Reaktion gemessen. Dafür wurden pro zu testendem Substratansatz 200 µl des eiskalten Luciferase/Luciferin-Mix in ein Saarestedt-Röhrchen gegeben und mit 2 µl Testansatz versetzt. Dieses Gemisch wurde dann vermessen. Als Negativ-Kontrolle wurde ein nur mit Luciferase/Luciferin-Mix gefülltes Röhrchen gemessen. Die erhaltenen Werte für das



**Abb. 6: Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktionen des Luciferasetests**

Das 4CLL setzt das Substrat in den korrespondierenden CoA-Ester unter Verbrauch von ATP um. Die anschließende Luciferasereaktion setzt nicht verbrauchtes ATP um, wobei Lichtenergie entsteht, die detektiert werden kann.

zu untersuchende Enzym wurden auf den mit gemessenen Kontrollwert der 4CL2-Variante LP3 mit ihrem Substrat Sinapinsäure normiert. Da LP3 dieses Substrat nicht umsetzt, entspricht die hierbei gemessene starke Luciferaseaktivität einer Rest-ATP-Menge von 100 %. Für jedes Substrat wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 2.2.2.3 Enzymatischer Aktivitätstest: LDH-Test

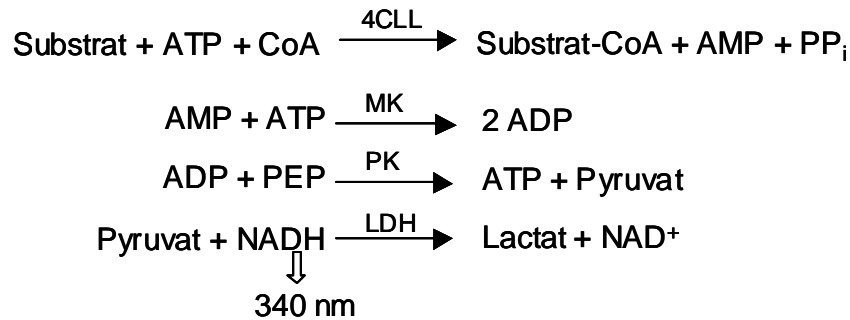
- Enzymmix: 37  $\mu\text{l}$  Lactatdehydrogenase, 29  $\mu\text{l}$  Myokinase, 29  $\mu\text{l}$  Pyruvatkinase
- Trislösung: 0,5 M DTE, 50 mM PEP, 0,5 M  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM NADH, 10 mM CoA, 0,1 M Tris/HCl pH 7,7

Um genauere Aussagen über die im Luciferase-Test detektierten potentiellen Substrataffinitäten der Enzyme treffen zu können wurde, ein quantitativer Enzymtest eingesetzt. Grundlegend ist hier der Umsatz von ATP zu AMP durch das 4CLL-Enzym. Das entstehende AMP wird über die Aktivitäten der Myokinase (MK), der Pyruvatkinase (PK) und der Lactatdehydrogenase (LDH) an die photometrisch quantifizierbare NADH-Oxidation gekoppelt (Abb.7).

Es wurde die Abnahme von NADH bei 340 nm verfolgt. Unter Berücksichtigung, dass aus einem AMP zwei ADP werden, wurden die Michaelis-Menten-Konstanten für die 4CLL-Enzyme mit einzelnen Substraten mittels linearer Regression im Hanes-Plot ermittelt. Alle Enzymaktivitäten wurden in mindestens drei unabhängigen Messungen erfasst.

Für den Test wurden pro Quarz-Küvette folgende Lösungen zusammengegeben und am Varian Cary 50- Spektrometer vermessen:

916 $\mu\text{l}$ Trislösung (pH 7.7)	} Reaktionszeit 10 min, RT
5 $\mu\text{l}$ Enzymmix	
50 $\mu\text{l}$ Substrat	
9,1 $\mu\text{l}$ ATP (110 mM)	
0,25 – 1 $\mu\text{g}$ aufgereinigtes Enzym At1g20510	



**Abb. 7: Schematische Darstellung des LDH-Tests**

Die Reaktion des 4CLLs wird über die Reaktionen der Myokinase (MK), Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt. Dessen Abnahme wird bei 340 nm verfolgt.

Nach 10 min wurden 100 µl AMP (10 mM) zugegeben und somit die Reaktion abgestoppt. Die Substrate OPDA, dnOPDA und OPC-8 wurden in Konzentrationsreihen von 3 bis 400 µM eingesetzt. Tetradecansäure und OPC-6 in Konzentrationsreihen von 3 bis 800 µM.

#### 2.2.2.4 Enzymatischer Aktivitätstest: Radiochemischer Test

- ATP-Stammlösung: 100 mM ATP in 0,1 M Tris/HCl pH 7.6
- CoA-Stammlösung: 10 mM CoA in 0,1 M Tris/HCl pH 7.6

Dieser Test entstammt im Wesentlichen der Arbeit von Shockey *et al.*, 2002 und beruht auf dem direkten Nachweis des CoA-Esters der Ölsäure. Die folgende Reaktionslösung wird angesetzt:

0,1 M Tris/HCl (pH 7.6)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM ATP

2,5 mM DTT

1 mM CoA

30 µM 1-[<sup>14</sup>C]-Ölsäure

pro 100 µl Reaktionsansatz wurden 4 µg Enzym eingesetzt.

Reaktionszeit 10 min, RT

Für die Komplementationsversuche wurden jeweils noch 50 bzw. 100 µM eines nicht radioaktiv markierten Substrates dazugegeben. Die Reaktion wurde nach 10 min durch 100 µl 10 % (v/v) Essigsäure in Isopropanol gestoppt und zweimal mit 900 µl Hexan (mit 50 % (v/v) Isopropanol gesättigt) extrahiert. Die Menge an markiertem CoA-Ester im Reaktionsansatz

wurde dann im Scintillationsmeßgerät bestimmt. Die Enzymaktivität wurde dann durch Bestimmung der Menge des radioaktiven Isotops im reagierten Reaktionsansatz gegen den unreaktierten Ansatz errechnet. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Enzym. Als Positivkontrolle der unreaktierte Reaktionsansatz. Jede Messung wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

### 2.2.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte

Um den Nachweis zu erbringen, dass At4g05160 2, 4-DB und IBA umgesetzt wurde eine massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte vorgenommen.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

30 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> -Puffer pH 7	} Reaktionszeit ÜN, bei RT
2 mM IBA bzw. 2, 4-DB	
1 mM ATP	
1 mM CoA	
1 mM MgCl <sub>2</sub>	
pro 500 µl 2 µg Testenzym	

Nach einer Inkubationszeit ÜN (RT) wurden Aliquots 1:1 mit Acetonitril verdünnt und jeweils 2 µl im negativen Ionen-Modus am Massenspektrometer analysiert. Die Kapillarspannung betrug 800 V und die Kegelspannung 40 V. Es wurde das Massenspektrum des Masse/Ladungsverhältnisses von 0-1500 erfasst und mögliche Produktpeaks des Weiteren durch MS/MS untersucht (Argon als Kollisionsgas und 40 V Spannung). Durch Subtraktion des 0 h-Spektrums vom Spektrum nach einer Stunde Inkubationszeit erhielt man das im Ergebnisteil gezeigte Differenzspektrum.

### 2.2.2.6 Analyse der exprimierten Proteine über Western Blot

- Towbin-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, Wasser; pH 8.3
- SDS-Probenpuffer: 100mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, Wasser
- Ponceau-Rot: 0.5 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Ponceau, Wasser
- TBS (11): 8 g NaCl, 20 ml 1M Tris/HCl, Wasser; pH 7.6
- TBST: TBS + 0.05 % (v/v) Tween20



In der, mit den 4CLLs komplementierten, *E. coli*-Mutante K12 fadD::Kan<sup>R</sup> sollte die Expression der 4CLLs überprüft werden (Kap. 2.2.3.3). Daher wurden diese über ihren N-terminalen His-Tag mittels Antikörper detektiert. Zunächst wurden dazu die abzentrifugierten Aliquots der Komplementationsstämme in 10 µl LB-Medium resuspendiert, mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und denaturiert (95 °C, 3 min). Dann erneut abzentrifugiert (13.000 rpm, 30 sec), zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen und nach der Methode von Laemmli (1970) durch SDS-Gelelektrophorese für 1,5 Stunden bei 100 V aufgetrennt. Das Gel und die Membran wurden dann in die Blotting Aparatur eingesetzt und in Towbin-Puffer für 1,5 Stunden bei 4° C und 100 V geblottet. Anschließend wurde die Membran, zwecks Überprüfung des Bloterfolgs, für 2 min mit Ponceau-Rot gefärbt, dann mit Wasser gespült und die Färbung dokumentiert. Dann wurde die Membran erneut mit Wasser gespült und ÜN bei 4° C mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran im ersten Antikörper (Anti-His) in TBST (1:1000) für eine Stunde inkubiert und dreimal 5 min mit TBST gewaschen. Dann wurde die Membran im zweiten Antikörper in TBST (1:5000) für eine Stunde inkubiert und erneut dreimal für 5 min in TBST gewaschen. Da der zweite Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, wurde die Membran nach Angaben des Herstellers mittels des ECL-Detection-Kits behandelt und dann die Strahlung nach einer Stunde Belichtung durch Autoradiographie detektiert.

### 2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

#### 2.2.3.1 Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen

- TfBI: 100 mM RbCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 35 mM K-Ac, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM LiCl, 15 % Glycerin; pH 5.8
- TfBII: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin; pH 7.0

*E. coli* Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode kompetent zur Aufnahme von DNA gemacht. Dazu wurde 100 ml 2 x LB-Medium mit dem gewünschten Stamm versetzt und ÜN bei 37° C kultiviert. Dieser Ansatz wurde dann auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min), in 7.5 ml TfBI-Puffer aufgenommen und wiederum 10 min auf Eis inkubiert. Dann erneut abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min) und in 4 ml TfBII aufgenommen. Daraufhin aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

### 2.2.3.2 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

- 2×LB-Medium: 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 20 g Trypton, 1000 ml Wasser, pH7,5, autoklaviert,
- 2×LB-Platten: 2×LB-Medium, 10 g Agar
- Antibiotika: Ampicillin (100 mg/l), Gentamycin (7 mg/l), Kanamycin (65 mg/l), Carbenicillin (50 mg/l)

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten 200- $\mu\text{l}$ -Aliquots der Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, dann mit 5  $\mu\text{l}$  der Plasmid-Lösung versetzt und auf Eis inkubiert (30 min). Daraufhin erfolgte ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  (90 s), gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis (5 min). Die Suspension wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Antibiotika-freiem 2×LB-Medium versetzt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert (20 min). Anschließend wurde ein 200  $\mu\text{l}$ -Aliquot auf einer selektiven 2×LB-Platte ausgestrichen und ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.2.3.3 Komplementation von Acyl-CoA-Synthetase defizienten *E. coli*-Stämmen

- M9-Medium: 6g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g NaCl, 1g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (0,01M), 1 ml  $\text{MgSO}_4$ -Lösung (1M), 0,5 ml Thiamin Hydrochlorid-Lösung (1 % w/v), 0,1 % einer Kohlenstoffquelle, 0,5 % Brij58, gegebenenfalls Antibiotika, bei Platten: 15 g Agar, add 1000 ml Wasser; autoklaviert
- Antibiotika: Ampicillin (100mg/l), Kanamycin (65 mg/l)

Die vorhandenen N-terminal Histidin-getaggten 4CLL-Konstrukte im Expressionsvektor pQE-32 wurden in kompetente Acyl-CoA-Synthetase defiziente Stämme eingebracht. Dabei wurde der Stamm K12  $\text{fadD}::\text{Kan}^{\text{R}}$  für die Analysen des Wachstumsverhaltens auf Ölsäure, und der Stamm K12  $\Delta\text{fadR}$   $\text{fadD}::\text{Kan}^{\text{R}}$  für die Analysen des Wachstums auf Decansäure und Dodecansäure eingesetzt (Kap.2.1.8.1). Nach der Transformation wurden die komplementierten Stämme zunächst auf Vollmedium angezogen und dann auf die selektiven M9-Platten (Miller 1972) mit der jeweiligen Fettsäure umgesetzt. Diese Platten wurden für mehrere Tage bei RT inkubiert und das Wachstum dokumentiert. Für die Anzucht in Flüssigmedium wurden die komplementierten Stämme zunächst bei  $37^{\circ}\text{C}$ , ÜN, unter schütteln in 2 x LB-Medium angezogen. Dann wurde die OD bestimmt und die Menge an Bakterien, die später eine Dichte von 0,15 ergeben sollte, abzentrifugiert (13.000 rpm, 20 sec). Die Proben wurden dann zweimal in M9-Medium gewaschen und letztlich in 50 ml M9-Medium überführt. Diese Proben wurden zunächst ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter schütteln inkubiert, da die Kulturen sich erst umgewöhnen mussten und erst nach einigen Stunden das Wachstum begann. Dann wurden im Verlauf einer Generationszeit ( $>12$  Std.) regelmäßig Proben entnommen und die Dichte bestimmt. Aus diesen

Kulturen des Stammes K12 fadD::Kan<sup>R</sup> in Ölsäure haltigem Medium wurden außerdem Proben entnommen, die zur der Analyse der exprimierten Proteine über Western Blot eingesetzt wurden (Kap.2.2.2.6).

#### 2.2.3.4 Herstellung von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

- Agro-Medium: 5 g NaCl, 10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 10 g Fleischextrakt, 1000 ml Wasser, autoklaviert
- Agro-Platten: Agro-Medium, 15 g Agar
- HEPES-Puffer: 1mM HEPES, Wasser, pH 7.0

*A. tumefaciens* wurde zunächst in 200 ml Agro-Medium ÜN bei 28° C auf einem Schüttler (180 rpm) angezogen. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 4500 rpm, 4° C) und in 20 ml eiskaltem HEPES-Puffer resuspendiert. Dieses Waschen wurde noch einmal wiederholt und dann das Pellet in 2 ml eiskaltem HEPES-Puffer mit 10 % Glycerin aufgenommen. Die 2 ml wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C aufbewahrt.

#### 2.2.3.5 Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* Zellen

- Antibiotika: Carbenicillin (50 mg/l), Gentamycin (25 mg/l), Kanamycin (50 mg/l), Rifampicin (50 mg/l in DMF)

Die Transformation der kompetenten *A. tumefaciens* Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dabei wurden die Reportergenkonstrukte im Vektor pJawohl11 in den Stamm GV3101 eingebracht. Die Konstrukte in den pAMPAT-basierten Vektoren wurden in den Stamm GV3101 (pMP90RK) eingebracht. Ein 50 µl Aliquot der Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Diese wurde mit einem *Elektroporation Gene Pulser* (BioRad) einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Unmittelbar danach wurde 900 µl frisches Agro-Medium hinzugegeben, die Suspension bei 28° C für 2 Stunden inkubiert und ein 50 µl Aliquot auf einer selektiven Agro-Platte ausgestrichen. Diese wurde 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert und daraufhin die Kolonien mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids kontrolliert. Dafür wurden die zu untersuchenden *A. tumefaciens* Kolonien in 20 µl Wasser aufgenommen, ein 2µl Aliquot auf einer frischen Selektivplatte ausgestrichen und der Rest der Suspension mit 20 µl 40 mM Natronlauge versehen. Ein µl dieser Lösung diente als DNA-Template zur

Durchführung der PCR (2.2.1.4). Allerdings wurde hierbei die erste Inkubationszeit bei 95 °C von 2 auf 5 min verlängert. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.5 angegeben. Jene Kolonien, für die das Vorhandensein des Plasmids durch die Kolonie-PCR nachgewiesen werden konnte, wurden für die Transformation von *A. thaliana* (2.2.4.7) weiterverwendet.

## **2.2.4 Arbeiten mit *A. thaliana***

### **2.2.4.1 Anzucht**

- MS-Medium: 4 g MS-Natrium-Salz, evtl. 10 g Saccharose, 1000 ml Wasser, bei Platten: 7,5 g Agar, autoklaviert; pH 6,2
- Antibiotikum: Kanamycin (75 mg/l)

#### **2.2.4.1.1 Standardbedingungen**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzen (2.1.8) wurden, sofern nicht anders angegeben, in Erde unter Kurztagbedingungen angezogen (9 h Licht 500  $\mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-2}$  bei 22°C).

#### **2.2.4.1.2 Anzucht zur Analyse der Fettsäurezusammensetzung und Auxinmengen**

Für die Analyse der Fettsäurekomposition und der Auxinmengen in Doppel-*knock-out*-Pflanzen von *At4g05160/At5g63380* wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen in 50 ml Reaktionsgefäßen in 10 ml flüssigem MS-Medium angezogen. Dabei wurden jeweils 5 mg Samen pro Reaktionsgefäß eingewogen. Die Kultivierung erfolgte für 7 bis 14 Tage unter Dauerbelichtung bei 24 °C und 90 rpm auf einem Schüttler.

#### **2.2.4.1.3 Anzucht zur Analyse der Reaktion auf Chemikalien in Flüssigmedium**

Die Pflanzen für die Chemikalientests wurden in 48-well Microtiterplatten (Nunc) unter sterilen Bedingungen angezogen. Dabei wurden je drei Samen pro Vertiefung in 500  $\mu\text{l}$  flüssigem, Saccharose haltigem MS-Medium ausgelegt.

Die Reporterpflanzen von *At1g20510* wurden dabei unter Kurztagbedingungen angezogen und nach 14 Tagen mit den jeweiligen Chemikalien (Ausgangskonzentration 5 mg/ml in DMSO) behandelt. Die Ernte erfolgte nach 2 bis 48 Stunden, die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung (Kap. 2.2.4.10.2) bei -80° C aufbewahrt.

Die Pflanzen zur Bestimmung der Resistenz gegenüber verschiedenen Auxinen, d.h. Doppel-*knock-out*-Pflanzen von *At4g05160/At5g63380* und die Reporterpflanzen von 4CL1 wurden unter Dauerbelichtung in MS-Medium ohne Saccharose angezogen. Dabei waren dem Medium von der Aussaat an Chemikalien (Stammlösung in DMSO) zugesetzt. Die Pflanzen wurden sieben bis vierzehn Tage kultiviert.

#### **2.2.4.1.4 Anzucht auf Festmedium zur Analyse der Reaktion auf Auxin**

Die Pflanzen zur Bestimmung der Resistenz gegenüber externen Auxinen wurden unter sterilen Bedingungen in Dauerbelichtung auf MS-Festmedium angezogen und das Wachstum nach sieben bis vierzehn Tagen analysiert. Die Pflanzen wuchsen dabei vom Tag der Aussaat an auf den Auxinen (Stammlösung in DMSO). Im Falle der beiden Substanzen IAA und IBA wurden durch Gelbfilter kleinere Wellenlängen als 500 nm herausgefiltert, da die Indolkomponenten im Blaulicht instabil sind (Stasinopoulos *et al.*, 1990). Der Filter bestand aus 3 mm dickem Plexiglas GS Gelb 303 (Degussa).

#### **2.2.4.1.5 Anzucht zur Analyse der Speicherlipide**

Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen auf festem MS-Medium mit und ohne Saccharose unter Dauerbelichtung angezogen und die Entwicklungsphasen fotografisch festgehalten. Für die Analyse der Keimungsfähigkeit in Dunkelheit wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf festem MS-Medium ohne Zucker ausgelegt. Dann wurden die Platten zur Imbibition einen Tag unter Licht kultiviert und dann in Dunkelheit überführt. Nach 6 Tagen wurde die Länge der elongierten Hypokotyle vermessen.

#### **2.2.4.2 Verifizierung der Knock-out-Linien**

Zur Verifizierung der *knock-out* Linien wurde die im Genom integrierte T-DNA nachgewiesen. Eine Aufreinigung genomischer DNA aus der Pflanze (Kap. 2.2.1.1) diente als *Template* für die in Kapitel 2.2.1.4 beschriebene PCR-Reaktion. Für die Mehrzahl der verwendeten Knock-out-Pflanzen wurde nachgewiesen, dass es sich um eine Nullmutante handelt. Dazu wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann eine RT-PCR auf dem Material durchgeführt (Kap. 2.2.1.4). Die verwendeten Primer sind in Kap. 2.1.6 einzusehen. Zur Erzeugung der Tripelmutanten wurde die Doppelmutante *At4g05160/At5g63380* mit den Einzelmutanten

*At1g20510* SALK\_140659 bzw. *At1g20500* SALK\_067285 gekreuzt und im Folgenden über den Nachweis der T-DNA-Insertionen im Genom homozygote Tripelmutanten ausgelesen.

#### **2.2.4.3 Färbung der Kutikula mit Toluidin-Blau**

- Toluidine-Blau-Lösung: 0.05 % (w/v) Toluidin-Blau in Wasser, gefiltert

Die Färbung der Pflanzen wurde nach Tanaka *et al.*, 2000 vorgenommen. Dafür wurden die Pflanzen für 2 min in einer frischen Toluidin-Blau-Lösung inkubiert und danach mit Wasser gespült. Die Färbung wurde durch Fotos dokumentiert.

#### **2.2.4.4 Quantifizierung der Jasmonate in *A. thaliana***

Die Blätter 6-8 Wochen alter, unter Standardbedingungen (Kap. 2.2.4.1) aufgezogener *Knock-out*- und Wildtyp-Pflanzen wurden mittels einer Pinzette sechsmal gequetscht, nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei – 80° C gelagert. Die Jasmonatmengen wurden von Dr. Miersch (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle), wie in Stenzel *et al.*, 2003 beschrieben, bestimmt.

#### **2.2.4.5 Quantifizierung der Fettsäuren und Auxine in *A. thaliana***

Die *Knock-out* und Wildtyppflanzen wurden, wie in Kap. 2.2.4.1.2 beschrieben, in Flüssigmedium kultiviert, nach 13 Tagen geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei – 80° C aufbewahrt. Die Fettsäuremengen wurden von Dr. Miersch (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) wie in Markham *et al.*, 2006 beschrieben, bestimmt. Die Auxinmengen wurden von Dr. Ludwig-Müller (Institut für Botanik, TU Dresden) wie in Ludwig-Müller *et al.*, 1993 beschrieben, bestimmt.

#### **2.2.4.6 Infiltration von *Pseudomonas syringae* in *A. thaliana***

- NGYA-Medium: 5 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 20 ml Glycerin, 15 g Agar, 1000 ml Wasser; pH 7.0
- Antibiotika: Kanamycin (50mg/l), Rifampicin (50mg/l)
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Wasser

Um die Reaktion des Reportergenkonstruktes von *At1g20510* auf die Applikation von phytopathogenen Bakterien zu untersuchen wurden die Pflanzen mit den Stämmen *P. syringae* AvrRpm1 und AvrRps4 infiltriert (Anzuchtbedingungen: Kap. 2.2.4.1.3). Dazu wurden die Bakterien ÜN bei 28° C auf NGYA-Medium-Platten inkubiert. Die Bakterien einer Platte

wurden in 20 ml  $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen, dann abzentrifugiert (3000 rpm, 15 min) und in 10 ml  $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen. Daraufhin wurde die  $OD_{600}$  der Suspension bestimmt und diese auf eine  $OD_{600}$  von 0,02 (entspricht  $10^7$  Kolonie bildenden Einheiten) verdünnt. Diese Lösung bzw. eine  $MgCl_2$ -Kontrolllösung wurde für 2 min unter Vakuum in die Pflanzen infiltriert und die Pflanzen dann zurück in das ursprüngliche MS-Medium gegeben. Nach 3, 6 und 24 Stunden wurden die Pflanzen geerntet und bis zur Bestimmung der GUS-Aktivität (Kap. 2.2.4.7.1) bei  $-80^\circ C$  aufbewahrt.

#### **2.2.4.7 Transformation von *A. thaliana* unter Verwendung von *A. tumefaciens***

- Saccharoselösung: 5% Saccharose, 1000 ml steriles Wasser, 750  $\mu$ l Silwet L-77

Die mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup>-Cloning-Technologie erzeugten GUS-Konstrukte (Kap.2.1.7) wurden durch *Agrobakterien* vermittelte Transformation in *A. thaliana*, Ökotyp Columbia 0 eingebracht. Das Protokoll entstammt Logemann *et al.*, 2006.

#### **2.2.4.8 Selektion transformierter Pflanzen**

Die Nachkommen der Pflanzen, die mit einem Reportergenkonstrukt transformiert worden waren, wurden über die Resistenz gegen Kanamycin auf MS-Platten ausgelesen (Kap. 2.2.4.1). Die Nachkommen der *At4g05160/At5g63380* Doppel-*knock-out*-Pflanzen, die mit den Komplementationskonstrukten transformiert waren, wurden über eine Resistenz gegen BASTA<sup>®</sup> ausgelesen.

#### **2.2.4.9 Sterilisation von *A. thaliana* Samen**

Die Samen, die auf MS-Medium ausgelegt wurden, wurden zuvor oberflächensterilisiert. Dazu wurde die Papiermembran aus einer Geextraktionssäule (Qiagen, *PCR-Purification-Kit*) entfernt, die Säule auf einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert, die Samen in die Säule hineingegeben und mit 70% Ethanol aufgefüllt. Die Samen wurden 10 min geschüttelt, der Ethanol durch zentrifugieren entfernt und erneut 100% Ethanol hinzugegeben. Dieser wurde sofort durch Zentrifugation entfernt. Die Samen wurden dann aus der Säule auf ein Filterpapier gegeben und eine Minute getrocknet. Daraufhin erfolgte die Aussaat auf einer Selektivplatte.

## 2.2.4.10 Promotoranalyse durch Reportergenexpression

### 2.2.4.10.1 Qualitative Analyse der GUS-Expression

- X-Gluc-Lösung: 50  $\mu$ l 1 M X-Gluc (in DMSO), 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1,86 g 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 82 mg 0,5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 105 mg 0,5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]

Die zu untersuchende Gewebeprobe der GUS-Pflanze wurde in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit X-Gluc-Lösung (Monohexylammoniumchloridsalz der 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure) überschichtet. Der Ansatz wurde für 15 min im Eksikator unter Vakuum gesetzt und dann ÜN bei 37° C inkubiert. Dann wurde die X-Gluc-Lösung entfernt und das Gewebe mit 100% Ethanol überschichtet. Durch mehrmaligen Austausch des Ethanols wurde das Chlorophyll entfernt. Die Blaufärbung der Zellen, in denen das Promotor-GUS-Konstrukt exprimiert wurde, war nun sichtbar (Jefferson *et al.*, 1987).

Im Falle der Reportergenlinie von At1g62940 wurde nach der GUS-Färbung eine Fixierung der Blüten mit Glutaraldehyd vorgenommen und von Dr. E. Schmelzer (MPIZ, Köln) Dünnschnitte angefertigt und analysiert (nach Robertsen *et al.*, 2004).

### 2.2.4.10.2 Quantitative Analyse der GUS-Expression

- Aufschlusspuffer: 100 mM Natriumphosphat, 1 mM DTT; pH 7.5
- MUG-Puffer: 2 mM 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (4-MUG), 50 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 7.0

Die Pflanzen wurden zunächst wie in Kap. 2.2.4.1.3 angezogen und behandelt. Der GUS-Assay wurde im Wesentlichen nach Sprenger-Haussels *et al.*, 2000 durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 100  $\mu$ l Aufschlusspuffer aufgearbeitet, dann bei 13.000 rpm (10 min) zentrifugiert und 50  $\mu$ l dieses Zellüberstandes zu 50  $\mu$ l MUG-Puffer gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 37° C inkubiert und nach 20, 40 und 60 min 20  $\mu$ l Aliquots entnommen. Diese wurden zum Abstoppen in 200  $\mu$ l 0,2 M Na(CO)<sub>3</sub>-Puffer gegeben und im Fluorimeter vermessen. Die GUS-Aktivität wurde durch die Steigung des Graphen von 20 bis 40 min und von 40 bis 60 min, nach Normierung auf einen mitgemessenen Standard, bestimmt. Außerdem wurde die Proteinkonzentration in den Zellüberständen nach Bradford (1970) bestimmt und floss in die Berechnung der GUS-Aktivität ein. Jedes Experiment wurde in mindestens 3 unabhängigen Messungen erfasst.



#### 2.2.4.11 Subzelluläre Lokalisation von At1g20510 in *A. thaliana*

- Benzimidazolplatte: 1% Agar, 85  $\mu$ M Benzimidazol, Wasser, autoklaviert

Die cDNA des Gens *At1g20510* wurde mittels Gateway<sup>TM</sup>-Technologie in die Expressionsvektoren pENSGYFP und pEXSGYFP kloniert (Kap. 2.2.1.6.2). Zuvor wurde für die Konstruktion des C-terminal getaggten At1g20510 eine Variante im pDONR207 erstellt, die kein Stop-Codon mehr enthielt (Kap. 2.2.1.7).

##### 2.2.4.11.1 Detektion des N-terminal fusionierten At1g20510

Zur subzellulären Lokalisation wurde die N-terminale Fusion von *At1g20510* mit dem gelb fluoreszierenden Protein YFP analysiert. Als Kontrollplasmid wurde ein Expressionsvektor verwendet, der die etablierte peroxisomale Importsequenz SRL besaß, die an das rot fluoreszierende Protein RFP gekoppelt war. Die Expression beider Proteine wurde durch den CaMV-35S-Promotor gesteuert.

Zur Transformation wurden Blätter vier Wochen alter *A. thaliana* Col0 Pflanzen auf einer Benzimidazolplatte ausgelegt. Dann wurden Gold-Microcarrier mit der Plasmid-DNA präpariert. Dafür wurden zuvor die beiden Plasmidaufreinigungen (Kontroll- und Testplasmid) vereinigt. 30 mg der Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,1  $\mu$ m wurden mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden diese noch dreimal mit Wasser gewaschen und letztlich in einem 50%igen Glycerin/Wasser-Gemisch aufgenommen (60 mg/ml). Die Suspension wurde 5 min geschüttelt und anschließend 50  $\mu$ l in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Diese Menge war ausreichend für 1 Bombardement. Unter erneutem Vortexen wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

5  $\mu$ l Plasmid-DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (2,5 M)

20  $\mu$ l Spermidin

Daraufhin wurde das Gemisch 2 s zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 140  $\mu$ l 70 % Ethanol zum Pellet gegeben. Es wurde erneut für 2 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 60  $\mu$ l 100 % Ethanol resuspendiert. Nun wurde der Beschuss der *A. thaliana* Blätter mit 6  $\mu$ l der präparierten Microcarrier am Particle Delivery System Biolistic PDS-1000/He (BioRad) nach Anleitung des Herstellers vorgenommen. Die Platte mit den

beschossenen Blättern wurde dann für 2 Tage in einem Klimaschrank inkubiert. Zur Lokalisation der exprimierten Proteine wurden die Blätter am konfokalen Laser-Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss) analysiert. Dazu wurde Licht der Wellenlänge 514 nm eingestrahlt und die Emission elektromagnetischer Strahlung der Wellenlängen 535-590 nm (YFP-63380) und 570-634 nm (RFP) detektiert. Die Bilder wurden mit dem LSM 510 3.2 Programm bearbeitet (Carl Zeiss).

#### **2.2.4.11.2 Detektion des C-terminal fusionierten At1g20510**

Das C-terminale Fusionskonstrukt wurde stabil über *Agrobakterien* vermittelte Transformation in *A. thaliana* Col0 eingebracht (Kap. 2.2.4.4). In Pflanzen der zweiten Generation ließ sich die Fluoreszenz detektieren. Die Pflanzen wurden unter einem Axiophot Photomikroskop untersucht. Dazu wurden die Pflanzen mit UV-Licht angeregt und die Emission der elektromagnetischen Strahlung durch einen YFP-Filter detektiert.

### 3. Ergebnisse

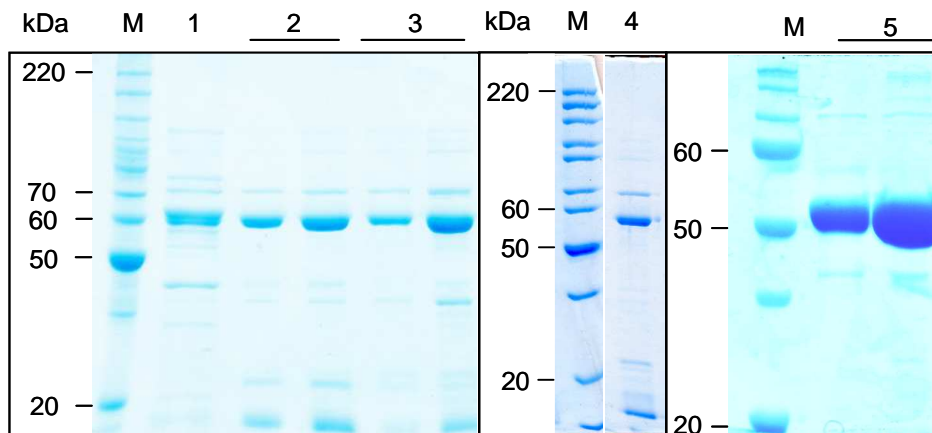
#### 3.1 Überblick über die 4CL-ähnlichen Proteine

Durch die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* im Jahre 2000 wurden 25.000 Gene annotiert, deren Charakterisierung bislang oftmals nicht über die Klärung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse hinausging. Auch für die Superfamilie der Adenylat bildenden Enzyme wurden auf diese Weise 63 Mitglieder identifiziert, von denen bisher nur 25 Enzymen eine Funktion zugewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionalen Charakterisierung von Vertretern der Familie der 4CL-ähnlichen Proteine, die aus 25 Mitgliedern besteht. Zur Funktionsbestimmung wurde zunächst die *in vitro*-Aktivität der untersuchten 4CLs analysiert und dann für einige ausgewählte Enzyme durch die Analyse von Ein- und Mehrfachmutanten die *in vivo*-Aktivität in *A. thaliana* identifiziert.

##### 3.1.1 Analyse der *in vitro*-Aktivität der 4CL-ähnlichen Enzyme

###### 3.1.1.1 Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der 4CL-ähnlichen Proteine

Zur Charakterisierung der ausgewählten 4CLs wurden diese in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend aufgereinigt. Dazu wurden die cDNAs von At1g20510, At1g20480 und At3g48990 aus Blättern von *A. thaliana* Ökotyp Columbia amplifiziert, mit terminalen Schnittstellen versehen und in den Vektor pQE-32 bzw. pQE-70 integriert (Kapitel 2.1.7). Als Negativkontrolle wurde von At1g20510 durch eine gezielte Mutagenese eine Mutante erzeugt, deren Codon für die katalytisch aktive Aminosäure Lysin 530 durch ein Codon für Asparaginsäure ersetzt wurde. Diese wird im Folgenden als At1g20510-K530N bezeichnet. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren der 4CLs At1g20500, At1g62940, At4g05160, At4g19010, At5g38120 und At5g63380 lagen bereits als fertige Konstrukte im Vektor pQE-32 vor (Doktorarbeit K. Schneider, Diplomarbeit L. Kienow). Im Folgenden wurden die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  pREP4, sowie M15 mit den Expressionsvektoren transformiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG induziert und die Proteine mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie über den N-terminalen Hexahistidin-Tag aufgereinigt. Der Aufreinigungserfolg und die Reinheit wurden durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. Somit wurden alle 4CLs der Gruppe B außer At1g20490 kloniert



**Abb. 8: SDS-Gele einiger aufgereinigter 4CLLs**

Dargestellt sind Coomassie gefärbte SDS-Gele einiger aufgereinigter 4CLLs. (M) Proteinstandardmarker; (1): Protein At1g20480 MW 61 kDa; (2) Protein At1g20510 MW 59 kDa; (3) Protein At1g20510-K530N MW 59 kDa; (4) C-terminal Hexahistidin-getaggttes At1g20510 MW 59 kDa; (5) At3g48990 MW 56 kDa; Bei den Proben 2, 3 und 5 wurden jeweils zwei unterschiedliche Mengen aufgetragen.

und exprimiert. In Abb. 8 sind Bilder der Coomassie gefärbten Gele derjenigen 4CLLs zu sehen, die in Rahmen dieser Arbeit erstmalig exprimiert und aufgereinigt wurden, d.h. von At1g20480, At1g20510, At1g20510-K530N und At3g48990. Bei allen aufgereinigten Proteinen ließ sich eine angereicherte Hauptproteinbande, die dem Molekulargewicht des jeweiligen Enzyms entspricht, feststellen. In einigen Fällen zeigten sich aber auch weitere Proteinbanden, die entweder Abbauprodukte der 4CLLs darstellen oder auf eine Verunreinigung durch *E. coli*-Proteine hinweisen. An Hand des Proteins At1g20510 ließ sich jedoch feststellen, dass die Nebenbanden sich weder auf die Aktivität noch auf das Substratspektrum der 4CLLs auswirken. Dazu wurde einerseits das exprimierte Protein At1g20510 mit Histidin-Tag am C-Terminus anstelle des N-Terminus verglichen (pQE-70/pQE-32). In dieser Aufreinigung sollte also nur das vollständig translatierte Protein zu finden sein und keine Bruchstücke, die durch unvollständige Translation entstehen könnten. Das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Aufreinigung zeigte das gleiche Muster an Haupt- und Nebenbanden wie das der N-terminalen getaggtten Variante. Somit findet man in beiden Aufreinigungen keine unvollständig translatierten Proteinbruchstücke, die eine Aktivitätsbestimmung verfälschen könnten. Des Weiteren wurde, wie bereits erwähnt, eine katalytisch inaktive Variante des Proteins

At1g20510 erzeugt, die *in vitro* und *in vivo* keine enzymatische Aktivität aufwies. Da auch in dieser Aufreinigung ein vergleichbares Spektrum an Nebenbanden zu sehen war, zeigt die fehlende enzymatische Aktivität, dass die beobachtete Aktivität des funktionalen At1g20510 nicht auf eine Verunreinigung mit Adenylat bildenden Enzymen aus *E. coli* zurückzuführen ist. Die isolierten 4CLLs weisen damit eine ausreichende Reinheit auf und können für *in vitro*-Charakterisierungen eingesetzt werden.

### 3.1.1.2 *In vitro*-Funktion der 4CL-ähnlichen Proteine

Zur Identifizierung des akzeptierten Substrats wurden die heterolog exprimierten und aufgereinigten 4CLLs (Kap. 3.1.1.1) einem semiquantitativen, Luciferase gekoppelten Enzymtest unterzogen. Dieser Test beruht auf einem charakteristischen Merkmal der Adenylat bildenden Enzyme, dem Umsatz der Substrate unter ATP-Verbrauch. Demnach wird zunächst das 4CLL mit dem Substrat der Wahl und einer definierten Menge an ATP inkubiert. Im Anschluss wird die im Ansatz verbliebene ATP-Menge über eine gekoppelte Luciferase-Reaktion analysiert (Kap. 2.2.2.2). Die Luciferaseaktivität wurde nach 2 und 22 Stunden bestimmt und unter Zuhilfenahme bereits bekannter Enzymaktivitäten die ATP-Restmengen in den Reaktionsansätzen ermittelt (Schneider *et al.*, 2005). Eine Abnahme der ATP-Menge auf unter 10 % innerhalb von 2 Stunden stellte dabei einen guten Substratumsatz durch das 4CLL dar (Schneider *et al.*, 2005). Als potentielle Substrate wurde ein breites Spektrum unterschiedlicher Carbonsäuren untersucht. Dabei kamen ca. 100 verschiedene Substanzen zum Einsatz, die zu den folgenden Klassen gehören: Zimtsäurederivate, Benzoessäurederivate, Phenyllessigsäurederivate, Aminosäuren, Fettsäuren und die Phytohormone Jasmonsäure und Auxin, sowie deren Vorstufen. Die wichtigsten Ergebnisse der ATP-Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst, während die Ergebnisse mit allen getesteten Substraten im Anhang zu sehen sind. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit gefundenen Werten ist die Tabelle um Werte ergänzt, die bereits veröffentlicht wurden (Doktorarbeit K. Schneider; Diplomarbeit L. Kienow), um ein vollständiges Bild über die Aktivitäten der 4CLLs zu ermöglichen.

Bei der Analyse der Substrate der neun 4CLLs wurde offensichtlich, dass alle Enzyme mehr als ein Substrat akzeptieren (Tab.1). Außerdem ist das vereinheitlichende Merkmal dieser Familie die Aktivierung von Fettsäuren zu CoA-Estern und nicht, wie bei 4CL, von Zimtsäurederivaten.

**Tab. 1: Ergebnisse des Luciferasetests mit den 4CLLs**

Dargestellt sind die ATP-Restmengen in den Reaktionsansätzen des jeweiligen 4CL bzw. 4CLLs nach 2 h bzw. 22 h Inkubationszeit. Die gelb hinterlegten Werte zeigen einen guten Substratumsatz an, d.h. die detektierte Restmenge an ATP entspricht weniger als 10% der eingesetzten ATP-Menge. n.t. = Substanz nicht getestet. \* = Werte entstammen größtenteils der Arbeit von K. Schneider. \*\* = Werte entstammen größtenteils der Diplomarbeit von L. Kienow

2 Std. Inkubation		4CLL									
Substrat	4CL2*	At1g 62940*	At4g 19010*	At4g 05160*	At5g 63380**	At1g 20510	At1g 20510-K530N	At1g 20480	At5g 38120*	At1g 20500*	At3g 48990
<b>Zimtsäure-Derivate</b>											
Zimtsäure	49,6	102,4	20,4	118,1	65,5	85,2	92,8	83,5	95,2	67,7	110,2
2-Cumarsäure	33,4	72,1	85,4	69,5	n.t.	96,5	n.t.	70,1	87,9	66,8	82,3
3-Cumarsäure	5,0	76,2	81,1	88,2	n.t.	122,2	n.t.	90,4	81,7	80,0	88,8
4-Cumarsäure	4,0	101,9	18,2	105,8	50,0	81,1	117,1	68,6	72,1	46,9	92,1
Kaffeesäure	4,3	96,9	36,5	95,6	69,2	92,3	n.t.	68,2	81,0	60,9	75,7
Ferulasäure	49,9	106,7	5,3	147,7	93,9	123,0	81,8	98,2	46,7	26,9	89,5
Sinapinsäure	102,3	104,7	74,0	103,8	120,1	84,3	115,9	82,3	90,8	8,1	100,3
<b>Fettsäuren</b>											
Essigsäure	86,6	87,1	106,4	99,4	84,9	79,6	n.t.	89,5	88,7	107,8	91,2
Propansäure	91,3	80,8	108,2	106,7	97,7	86,4	n.t.	81,2	108,8	97,4	92,2
Butansäure	97,1	90,2	90,6	80,9	85,7	87,7	n.t.	80,5	97,2	105,6	91,6
Pentansäure	110,1	85,2	16,2	23,2	67,1	80,0	n.t.	103,9	77,4	91,3	90,1
Hexansäure	45,8	83,2	5,5	1,1	47,0	77,5	n.t.	100,0	79,2	92,7	74,6
Heptansäure	26,1	75,8	7,7	5,5	20,3	62,6	n.t.	107,3	77,8	86,7	66,6
Oktansäure	70,4	84,7	17,9	17,9	7,9	77,5	n.t.	100,6	102,2	117,7	85,6
Nonansäure	54,0	107,2	17,7	43,1	0,1	56,1	n.t.	111,7	108,1	81,8	111,1
Decansäure	93,3	77,9	27,1	11,0	1,0	9,2	95,6	103,6	89,9	90,5	163,3
Dodecansäure	109,0	82,6	17,3	24,7	3,1	0,0	109,5	103,5	97,5	41,8	89,9
Tetradecansäure	84,7	59,1	9,3	0,2	0,8	0,1	89,0	93,8	87,7	44,5	91,5
Hexadecansäure	93,6	51,9	24,6	0,1	2,0	3,0	n.t.	62,2	91,8	63,0	94,9
Octadecansäure	97,8	29,5	54,2	0,2	0,4	9,6	n.t.	85,6	96,3	74,7	105,5
Ölsäure	84,3	46,9	63,2	0,1	3,2	1,2	n.t.	45,6	60,8	44,6	n.t.
Linolsäure	109,3	45,6	25,3	0,1	0,1	78,0	n.t.	82,8	77,2	49,0	87,5
Linolensäure	111,3	42,9	17,4	0,1	1,5	94,3	n.t.	97,5	99,3	47,5	153,5
<b>Jasmonate</b>											
OPDA	101,5	91,7	91,7	21,2	0,2	0,6	n.t.	74,5	104,8	26,1	121,5
dnOPDA	93,1	81,0	77,4	34,1	103,5	6,8	n.t.	71,2	87,3	56,2	114,0
OPC-8:0	110,6	91,7	87,8	41,2	22,1	0,2	n.t.	96,3	94,5	61,5	128,4
OPC-6:0	95,7	79,9	82,9	5,3	82,4	0,6	n.t.	97,5	101,3	3,7	111,7
OPC-4:0	95,4	80,3	88,3	46,6	89,5	47,6	n.t.	82,8	94,5	93,4	121,0
Jasmonsäure	106,8	96,8	99,0	109,6	118,3	67,5	n.t.	80,1	91,8	102,4	101,9
<b>Weitere Substrate</b>											
4-Hydroxyphenylpyruvat	97,4	85,1	96	87,9	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	91,5	87,6	49,7
<b>22 Std. Inkubation</b>											
<b>Auxin-Derivate</b>											
Indolessigsäure	78,5	40,9	24,6	49,2	113,7	76,1	n.t.	69,0	71,2	93,9	85,9
Indolpropansäure	39,0	35,4	18,6	48,9	n.t.	n.t.	n.t.	68,1	85,3	85,2	78,6
Indolbutansäure	88,9	37,7	23,8	1,3	89,0	70,5	n.t.	96,4	87,0	96,0	81,1
2,4-Dichlorophenoxyessigsäure	n.t.	n.t.	43,5	32,8	39,0	55,7	n.t.	n.t.	n.t.	101,0	112,9
2,4-Dichlorophenoxybuttersäure	n.t.	n.t.	43,1	0,1	34,4	58,8	n.t.	n.t.	n.t.	105,2	152,8

Vier der neun getesteten Enzyme aktivierten in diesem *in vitro*-Test Fettsäuren und zeigten dabei ein recht breites, teilweise überlappendes Substratspektrum. Dabei setzten At5g63380 und At1g20510 effektiv mittel- bis langkettige Fettsäuren um, während At4g05160 und At4g19010 bereits kurzkettige Fettsäuren ab Kettenlänge C6 aktivierten. Es konnte nachgewiesen werden, dass keines dieser Enzyme sehr kurzkettige Fettsäuren aktiviert. Sehr langkettige Fettsäuren (> C20) ließen sich auf Grund ihrer schlechten Löslichkeiten in Wasser in diesem *in vitro*-Assay nicht einsetzen. Somit lässt sich, zumindest für das Substratspektrum von At1g20510, At4g05160 und At5g63380, keine Obergrenze der Kettenlänge der Fettsäuren festlegen.

Zusätzlich setzten diese drei Enzyme, sowie At1g20500 Vorstufen des Phytohormons Jasmonsäure um. Dabei aktivierten At1g20500, At4g05160, At5g63380 jeweils nur eine der Vorstufen OPC-6 bzw. OPDA, während das Enzym At1g20510 vier der fünf Jasmonsäurevorstufen umsetzte, also OPDA, dnOPDA, OPC-8 und OPC6.

Außerdem akzeptierte At4g05160 noch weitere Substrate. Es aktivierte das synthetische Auxin 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure und das natürliche Auxin Indolbuttersäure. Diese Aktivität zeigte sich jedoch erst nach 22-stündiger Inkubation des Reaktionsansatzes.

Zwei der getesteten Enzyme, At1g20500 und At4g19010 besaßen neben dem Umsatz von einer Jasmonsäurevorstufe bzw. von Fettsäuren auch die Fähigkeit einzelne Zimtsäurederivate (Sinapinsäure oder Ferulasäure) zu aktivieren und ähneln somit ihren nächsten Verwandten, den 4CLs (Doktorarbeit Katja Schneider).

Für weitere drei 4CLs At1g20480, At1g62940 und At5g38120 konnte, zumindest in diesem *in vitro*-Test, keine enzymatische Aktivität mit den untersuchten Substraten identifiziert werden. Somit wurden annähernd alle 4CLs aus Gruppe B auf ihre *in vitro*-Aktivität hin überprüft. Eine Ausnahme stellt At1g20490 dar, welches bislang nicht kloniert werden konnte. Obwohl verschiedene cDNAs aus diversen Pflanzengeweben amplifiziert und kloniert wurden, stellten diese ausschließlich Spleißvarianten der cDNA mit Intronresten dar, die zu einer Leserasterverschiebung und somit unvollständigen Proteinvarianten führten. Auch in öffentlich zugänglichen Datenbanken ließen sich keine vollständigen Transkripte identifizieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Es könnte sich also um ein Pseudogen handeln.

Neben den Enzymen der Gruppe B wurde die Analyse des Substratspektrums auf das 4CLL At3g48990 ausgedehnt, das der Gruppe C angehört (Tab.1). Es stellt das nächste, noch uncharakterisierte Enzym im Stammbaum der 4CLLs dar. Dabei zeigte sich bei den eingesetzten Substratkonzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  keine Aktivität, bei Erhöhung auf 500  $\mu\text{M}$  deutet sich jedoch eine Aktivität mit 4-Hydroxyphenylpyruvat an, auf welche Kapitel 3.4 näher eingegangen wird.

Die in dieser *in vitro*-Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die funktionalen 4CLLs der Gruppe B ein breites, teilweise überlappendes Substratspektrum besitzen. Sie stellen eine Gruppe von Acyl-CoA-Synthetasen von Fettsäuren dar, die weitere Aktivitäten mit verschiedenen Phytohormonvorstufen bzw. -derivaten aufweisen. Detaillierte enzymkinetische Analysen werden in den weiteren Kapiteln 3.2, 3.3 und 3.4 dargestellt.

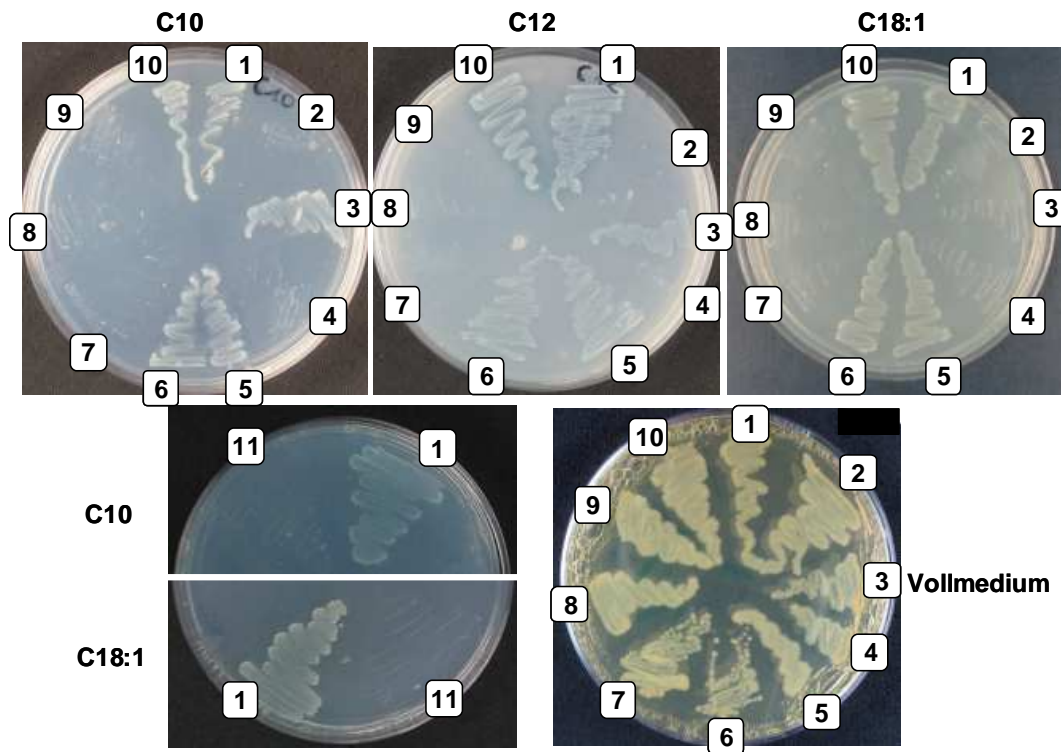
### **3.1.2. Analyse der *in vivo*-Funktion 4CL-ähnlicher Enzyme in Acyl-CoA-Synthetase defizienten Stämmen von *E. coli***

Die *in vitro*-Aktivität der 4CLLs als Acyl-CoA-Synthetasen wurde im Folgenden unter *in vivo*-Bedingungen in *E. coli* überprüft. Dieses Bakterium besitzt ein vergleichsweise einfaches und detailliert charakterisiertes Energiegewinnungssystem, das es ihm ermöglicht auf Fettsäuren als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die Fettsäure wird durch den Prozess der *vectorial acylation* über das Transportprotein FadL importiert und durch FadD, dem einzigen Enzym in *E. coli* mit einer Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase für langkettiger Fettsäuren, mit Coenzym A verestert. Daraufhin bindet die aktivierte Fettsäure an den Transkriptionsrepressor FadR und inaktiviert diesen, was zur Expression der durch FadR reprimierten Gene der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation (FadA, FadB, FadE, FadH) führt. Diese degradieren dann die aktivierte Fettsäure zu Acetyl-CoA-Einheiten, welche letztlich zur ATP-Gewinnung weiter metabolisiert werden. Ist nun die Funktion der Acyl-CoA-Synthetase FadD ausgeschaltet, ist das Bakterium nicht mehr in der Lage Fettsäuren zur Energiegewinnung zu nutzen (Overath *et al.*, 1969; Greenway *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1986; Henry *et al.*, 1992).

Im Folgenden sollte mittels solch einer Verlustmutante die Frage geklärt werden ob 4CLLs aus *A. thaliana* den Verlust der enzymatischen Aktivität von FadD kompensieren können. Dazu wurde der Stamm K12 fadD::Kan<sup>R</sup> mit dem Expressionsvektor des jeweils zu untersuchenden



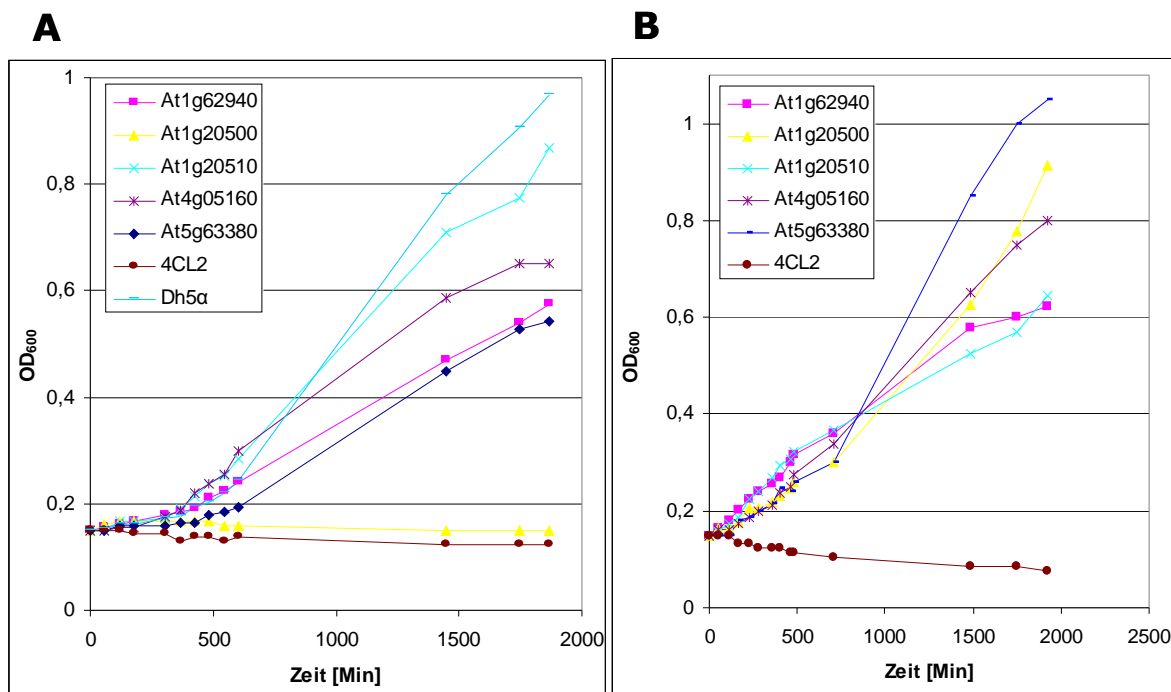
4CLLs transformiert und anschließend das Wachstum auf der langkettigen Ölsäure (C18:1) und den mittelkettigen Fettsäuren Decansäure (C10) und Dodecansäure (C12) überprüft (Kap. 2.2.3.3). Zur Untersuchung der Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 10 bzw. 12 Kohlenstoffatomen wurde ein zweiter Stamm verwendet (K12  $\Delta$ fadR fadD::Kan<sup>R</sup>), der zusätzlich zum unfunktionalen FadD auch noch eine Mutation des Transkriptionsrepressors FadR aufweist. Dies ist notwendig, da FadR nur auf CoA-Ester langkettiger Fettsäuren (>C14) reagiert. Ist FadR ausgeschaltet werden die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation konstitutiv exprimiert und auch kurzkettige Fettsäuren können abgebaut und somit das Wachstum auf diesen analysiert werden (Henry *et al.*, 1992).



**Abb. 9: Komplementation Acyl-CoA-Synthetase defizienter *E. coli*-Stämme**

Dargestellt ist das Wachstum der, mit 4CLL-Konstrukten transformierten, FadD defizienten *E. coli* Stämme auf Agarplatten, die entweder Decansäure (C10), Dodecansäure (C12) oder Ölsäure (C18:1) als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle enthalten, bzw. auf Agarplatten aus Vollmedium. Dabei wurde der Stamm K12  $\Delta$ fadR fadD::Kan<sup>R</sup> für das Wachstum auf Fettsäuren der Kettenlänge C10 und C12 eingesetzt, K12 fadD::Kan<sup>R</sup> für das Wachstum auf C18:1. Die Platten wurden für 168 h bei RT inkubiert. Die Stämme wurden mit Expressionsvektoren der folgenden Proteine transformiert: 1: At1g20510; 2: At1g20510K530N; 3: At1g20500; 4: At1g20480; 5: At5g63380; 6: At4g05160; 7: 4CL2; 8: At5g38120; 9: At4g19010; 10: At1g62940; 11: At3g48990.

Insgesamt wurden alle Enzyme aus Gruppe B, außer At1g20490, sowie das Protein At3g48990 aus Gruppe C untersucht. Die Ergebnisse dieser Komplementationsexperimente auf Fest- und in Flüssigmedium sind in Abb. 9 und 10 und Tab. 2 dargestellt. Sie bestätigen und erweitern die im *in vitro*-Substrattest gefundenen Aktivitäten. Fünf der acht getesteten 4CLLs aus der Gruppe B konnten die Funktion von FadD in *E. coli* übernehmen und das Wachstum der Bakterien auf fettsäurehaltigem Medium ermöglichen (Abb. 9/10). Für At1g20510, At4g05160 und At5g63380 konnte die *in vitro* beobachtete Aktivität als Fettsäure aktivierende Enzyme reproduziert werden. Ihre Anwesenheit erlaubte das Wachstum des FadD defizienten *E. coli*-Stammes auf allen getesteten Fettsäuren, also sowohl auf Decansäure und Dodecansäure, als auch auf Ölsäure. Dabei war, zumindest für At1g20510 und At4g05160, die in Flüssigmedium



**Abb. 10: Komplementation Acyl-CoA-Synthetase defizienter *E. coli*-Stämme mit 4CLL-Aktivität in Flüssigmedium**

Dargestellt ist das Wachstum der mit 4CLL-Konstrukten komplementierten Bakterienstämme K12 FadD::Kan<sup>R</sup> bzw. K12 ΔFadR FadD::Kan<sup>R</sup> in Flüssigmedium, das als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle (A) Ölsäure oder (B) Decansäure enthielt. Bestimmt wurde die optische Dichte bei 600 nm nach den angegebenen Zeitpunkten. Die Stämme wurden mit den Expressionsvektoren der folgenden Proteine transformiert: At1g62940, At1g20500, At1g20510, At4g05160, At5g63380, 4CL2. Als Positivkontrolle diente der unveränderte Stamm Dh5α.

ermittelte Generationszeit von 10 Stunden mit der des unveränderten *E. coli*-Stammes Dh5 $\alpha$  vergleichbar (Tab. 2).

Für die 4CLLs At1g62940 und At1g20500, welche beide im *in vitro*-Test keine Aktivität mit Fettsäuren zeigten, konnte durch dieses Komplementationsexperiment in *E. coli* erstmals deren Funktion als Acyl-CoA-Synthetasen nachgewiesen werden. Das Enzym At1g62940 ermöglichte das Wachstum der *E. coli*-Mutante sowohl auf den mittelkettigen Fettsäuren C10 und C12 als auch auf der langkettigen Fettsäure C18:1. Hingegen aktivierte At1g20500 nur die Fettsäuren mittellanger Kettenlängen wie C10 und C12, allerdings nicht die langkettige Fettsäure C18:1.

Im Gegensatz dazu zeigen die Stämme, welche mit den Expressionsvektoren für At4g19010, At1g20480 und At5g38120 transformiert wurden, weder Wachstum auf Fest- noch in Flüssigmedium. Für At4g19010 konnte damit die *in vitro* beobachtete Aktivität als Fettsäure aktivierendes Enzym durch dieses Experiment nicht bestätigt werden. Im Falle von At1g20480 und At5g38120 sind die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den *in vitro*-Experimenten, die negativ bezüglich Fettsäuren und aller weiteren Substrate waren.

**Tab. 2: Generationszeiten mit 4CLLs transformierter FadD-defizienter *E. coli*-Stämme**

Angegeben sind die durchschnittlichen Generationszeiten der FadD-defizienten *E. coli*-Stämme, welche mit Expressionsvektoren für die jeweiligen 4CLLs transformiert wurden. Außerdem diente Dh5 $\alpha$  als Positivkontrolle und FadD-defiziente *E. coli*s mit 4CL2 und At1g20510-K530N als Negativkontrolle. Alle Stämme wurden in Flüssigmedium, das entweder Ölsäure (C18:1) oder Decansäure (C10) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt, kultiviert. -:kein Wachstum nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt.

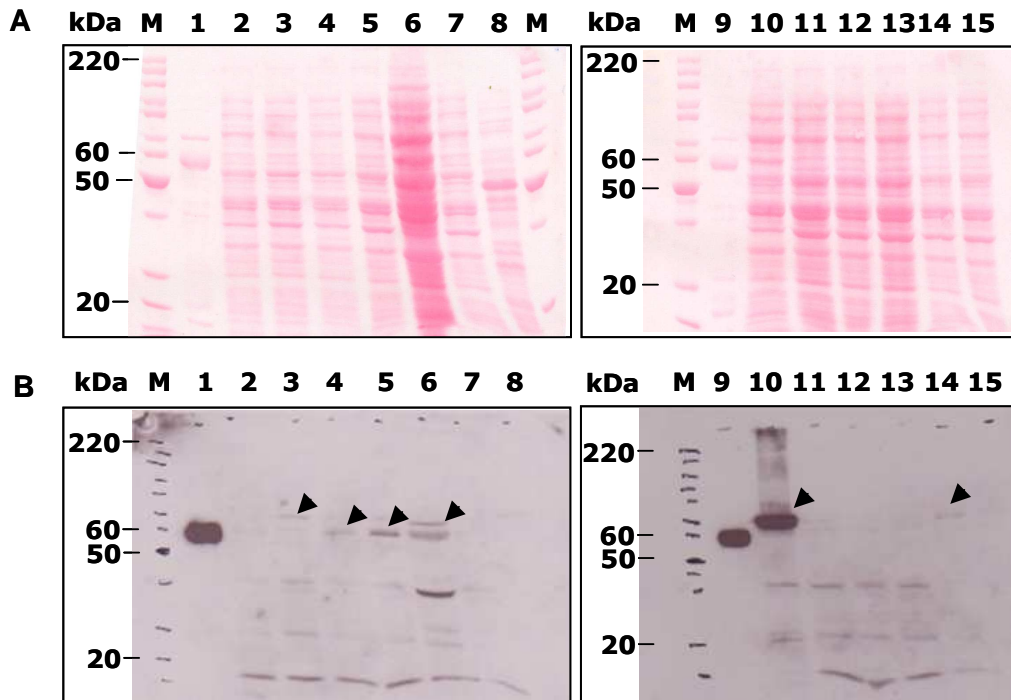
Stamm	Generationszeit [h]	
	C18:1	C10
At4g05160	10	10
At1g20510	10	8
At1g62940	14	8
At5g63380	16	11
At1g20500	-	12
At4g19010	-	-
At1g20480	-	-
At5g38120	-	-
Dh5 $\alpha$	10	n.d.
4CL2	-	-
At1g20510-K530N	-	-

In Ausdehnung der Analyse wurde auch die Funktion von At3g48990 aus Gruppe C untersucht. Es ergaben sich jedoch keine zusätzlichen Hinweise auf seine Funktion, da das Protein At3g48990 das Wachstum der Verlustmutante auf keiner der eingesetzten Fettsäuren unterstützte (Abb. 9).

Als Positivkontrolle wurde der Wildtypstamm Dh5 $\alpha$  von *E. coli* eingesetzt. Wie erwartet war Dh5 $\alpha$  in der Lage auf der Fettsäure C18:1 zu wachsen (Tab. 2). Zur Negativkontrolle wurde die FadD defiziente *E. coli*-Mutante mit den Expressionsvektoren einer 4CL (At4CL2) sowie der katalytisch inaktiven Variante At1g20510-K530N transformiert. Für beide Enzyme konnte in den *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass sie keine Fettsäure aktivierenden Aktivitäten besitzen (Kap. 3.1.1.2). Beide Negativkontrollen wuchsen nicht auf den Fettsäuren C10, C12 und C18:1 (Abb.9/Tab.2). Diese Ergebnisse verifizieren damit die Funktionalität des Experimentes.

Zur Überprüfung ob die jeweiligen 4CLs tatsächlich exprimiert waren, wurden Rohextrakte der komplementierten Stämme mittels Western Blot analysiert (Kap. 2.2.2.6). Dazu wurden Antikörper eingesetzt, welche die N-terminalen Hexahistidin-Tags der exprimierten Proteine binden. Das Ergebnis ist in Abb. 11 zu sehen. In den Rohextrakten der Komplementationsstämme ließen sich das Protein 4CL2 sehr deutlich durch eine starke Bande, sowie die 4CLs At5g63380, At1g20510, At1g20510K538N, At4g19010 und At1g62940 durch eine schwache Bande auf Höhe des jeweiligen Molekulargewichtes im Western Blot nachweisen. Die beiden Proteine At1g20480 und At5g38120 konnten dagegen nicht detektiert werden. Die eingesetzten Positivkontrollen in Form der aufgereinigten 4CLs At1g20510 und At1g20510-K530N zeigen jeweils eine starke Bande auf der Höhe des entsprechend zu erwartenden Molekulargewichtes. Als generell problematisch stellten sich die unspezifischen Kreuzreaktionen des Antikörpers dar, die zum Auftreten weiterer Banden im Western Blot führten.

Somit zeigte das Enzym At4g19010, welches *in vitro* Fettsäuren umsetzt, zumindest in diesem Experiment keine entsprechende *in vivo*-Aktivität, obwohl seine Anwesenheit mittels Western Blot gezeigt werden konnte. Die vermeintlich fehlende Aktivität der Enzyme At1g20480 und At5g38120 in diesem Komplementationsexperiment lässt sich hingegen darauf zurückführen, dass diese Proteine in diesem Experiment nicht exprimiert wurden.



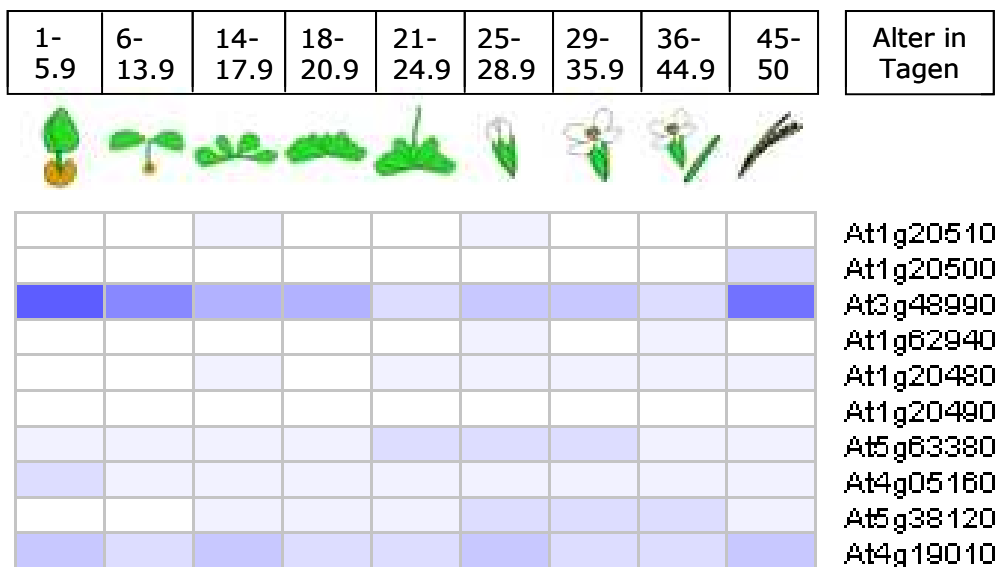
**Abb. 11: Nachweis von Hexahistidin-getaggtten Proteinen im Rohextrakt verschiedener in Ölsäure-haltigem Medium gewachsener *E. coli*-Stämme**

Dargestellt sind sowohl die Färbungen der Membranen mit Ponceau-Rot (A) als auch die Radiogramme (B) der Western Blots zum Nachweis von Hexahistidin-getaggtten Proteinen. Bei den analysierten Proben handelt es sich Marker (M), aufgereinigtes At1g20510K530N (1), aufgereinigtes At1g20510 (9), sowie um Rohextrakte von *E. coli*-Stämmen (K12 fadD::Kan<sup>R</sup>), die mit Expressionsvektoren für das jeweils angegebene Protein transformiert 2: At4g05160. 3: At5g63380. 4: At1g20510. 5: At1g20510K530N 6: At4g19010. 7: Leervektor-Negativkontrolle. 10: 4CL2. 11: At1g20480. 12: At1g20500. 13: At5g38120. 14: At1g62940. 15: Leervektor und in Ölsäure-haltigem M9-Medium kultiviert wurden, sowie um eine Rohextrakt des *E. coli*-Wildtyps Dh5 $\alpha$ , der ebenfalls in Ölsäure-haltigem M9-Medium kultiviert wurde (8).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Mehrheit der untersuchten 4CLLs aus Gruppe B, nämlich sechs von acht Proteinen, eine Aktivität als Acyl-CoA-Synthetasen mittel- bis langkettiger Fettsäuren besitzen. Für die Enzyme At1g20510, At4g05160 und At5g63380 konnte diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in *E. coli* nachgewiesen werden. Die Enzyme At1g62940 und At1g20500 zeigten diese Aktivität bisher nur unter *in vivo*-Bedingungen in *E. coli*, wobei At1g20500 mittelkettige Fettsäuren, aber keine langkettigen Fettsäure umsetzt. Für das Enzym At4g19010 konnte eine Fettsäure aktivierende Aktivität bisher nur *in vitro* gezeigt werden.

### 3.1.3 *In silico*-Analyse der Expression der 4CLL-Gene

Um Expressionsdaten aus ca. 3000 Microarray-Experimenten über bioinformatische Analysen zu untersuchen wurde das Programm Genevestigator V3 eingesetzt. Das Ergebnis dieser Analyse für die 4CLL-Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. thaliana* ist in Abb. 12 dargestellt. Es konnte von allen 4CLLs, außer dem putativen Pseudogen *At1g20490*, eine Expression in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Die 4CLLs *At4g05160*, *At4g19010*, *At5g63380* und *At3g48990* besitzen ein gleichartiges Expressionsmuster. Ihr Transkript wurde in allen untersuchten Entwicklungsstadien und Geweben in relativ konstanter Menge aufgefunden. Dies weist auf enzymatische Aktivitäten in grundlegenden Stoffwechselwegen in *A. thaliana* hin (Shockey *et al.*, 2003). Da *At4g05160* und *At5g63380* ebenfalls ein ähnliches Substratspektrum mit Fettsäuren und Phytohormonvorstufen aufweisen, könnte dies auf redundante enzymatische Aktivitäten in der Pflanze hindeuten (Kap. 3.1.1.2, 3.1.2 und 3.3). Die Funktion von *At3g48990* konnte noch nicht im Detail aufgeklärt werden, doch zeigt dieses Gen



**Abb. 12: Expressionsmuster der 4CLL-Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. thaliana***

Diese Abbildung entstammt im Original dem Programm Genevestigator V3 und stellt die Expression der 4CLLs der Gruppen B und C in verschiedenen Stadien der Entwicklung von *A. thaliana* dar. Die Werte geben das Alter der Pflanzen in Tagen an. Die Blaufärbung gibt relative Werte im Vergleich zur höchsten gemessenen Transkriptmenge eines Gens an.

das höchste Expressionsniveau aller untersuchten 4CLLs (Kap. 3.1.1.2, 3.1.2, 3.4). Auch die Gene der beiden, in den bisherigen Tests nicht funktionalen Enzyme At1g20480 und At5g38120 sind exprimiert und zeigen dabei ein ähnliches Expressionsmuster (Kap. 3.1.1.2, 3.1.2). Sie sind in Geweben der adulten Pflanzen, nicht jedoch in keimenden und jungen Pflanzengewebe exprimiert. Die verbliebenen 4CLLs sind deutlich spezifischer exprimiert. Das Transkript von At1g20510 ist nur in Blättern und Blüten zu finden. At1g62940 ist in Blüten und Schoten exprimiert und die Expression von At1g20500 ist nur auf die reifen Schoten der Pflanze beschränkt.

Somit stellen die 4CLLs der Gruppe B eine Familie von Acyl-CoA-Synthetasen mit breitem Substratspektrum dar, denen in *A. thaliana* auf Grund ihrer Expressionsmuster spezifische Funktionen zukommen sollten. Im Folgenden wurden die 4CLLs At1g20510 (Kap. 3.2), At4g05160 (Kap. 3.3), At5g63380 (Kap. 3.3), At1g62940 (Kap. 3.4) und At3g48990 (Kap.3.4) detaillierter charakterisiert.

### **3.2 Detaillierte Charakterisierung des 4CLLs At1g20510**

Das Enzym At1g20510 zeigte sowohl unter *in vitro*- als auch unter *in vivo*-Bedingungen in *E. coli* eine Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase mittel- bis langkettiger Fettsäuren. Darüber hinaus aktivierte es *in vitro* sehr effektiv vier der fünf Jasmonsäurevorstufen, darunter das aus dem Verlauf der Jasmonsäurebiosynthese vorhergesagte Substrat OPC-8. Auf Grund dieses interessanten Substratspektrums wurde At1g20510 für eine detaillierte funktionale Charakterisierung ausgewählt und, wie nun dargestellt, die *in vivo* Funktion in *A. thaliana* ermittelt.

#### **3.2.1 Detaillierte kinetische Analyse des Enzyms At1g20510**

Um die Substratspezifität des Enzyms näher zu bestimmen, wurde eine genaue enzymkinetische Charakterisierung vorgenommen. Dabei kam ein quantitativer Enzymtest zum Einsatz. Dieser nutzt die Fähigkeit der Acyl-CoA-Synthetasen das Substrat mit ATP und CoA zum entsprechenden Substrat-CoA-Ester und AMP umzusetzen. Das hierbei entstehende AMP wird über mehrere enzymatische Reaktionen an die Oxidation von NADH gekoppelt, die photometrisch verfolgt werden kann (Kap. 2.2.2.3). Wie in Tab. 3 ersichtlich wurden die enzymkinetischen Daten für alle vier Jasmonsäurevorstufen, sowie exemplarisch für eine

**Tab. 3: Kinetische Charakterisierung von At1g20510**

Dargestellt sind die Michaeliskonstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$  von At1g20510 für eine Fettsäure und die Jasmonsäurevorstufen. Diese wurden durch den gekoppelten LDH-Test ermittelt. Das mutierte At1g20510-K530N wies keine nachweisbare enzymatische Aktivität auf. n.d.: nicht detektierbar.

	At1g20510			At1g20510-K530N
	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{cat}$ [ $\text{sec}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $(\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ ]	Enzymaktivität
Tetradecansäure	$36 \pm 22$	$0,96 \pm 0,2$	26,41	n.d.
OPDA	$27 \pm 13$	$1,56 \pm 0,4$	56,35	n.d.
dnOPDA	$76 \pm 17$	$1,78 \pm 0,6$	23,42	n.d.
OPC-8:0	$19 \pm 4$	$1,27 \pm 0,1$	65,38	n.d.
OPC-6:0	$94 \pm 38$	$1,49 \pm 0,3$	15,17	n.d.

Fettsäure, Tetradecansäure, bestimmt. Die kinetischen Parameter lagen für alle angebotenen Substrate in etwa der gleichen Größenordnung und zeigten nur geringe Unterschiede. Tetradecansäure sowie die beiden Jasmonsäurevorstufen dnOPDA und OPC-6 waren dabei die etwas schlechter umgesetzten Substrate. Die katalytische Effizienz lag bei diesen Substraten zwischen  $15,17$  und  $26,41 (\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ . Im Gegensatz dazu zeigte At1g20510 mit OPDA eine katalytische Effizienz von  $56,35 (\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ . Die höchste katalytische Effizienz von  $65,38 (\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$  ergab sich für OPC-8, welches aus dem Verlauf der Jasmonsäurebiosynthese das vorhergesagte Substrat ist (Kap. 1.3.2). Somit kann At1g20510 als OPC-8:CoA-Ligase bezeichnet werden.

Als Aminosäure, die essentiell für die katalytische Aktivität von Adenylat bildenden Enzymen ist, wurde ein Lysin in der C-terminalen Domäne des Proteins identifiziert (Conti *et al.*, 1997; Stuitable *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Sequenzvergleiche ermittelt, dass bei At1g20510 höchstwahrscheinlich das Lysin an Position 530 diese Funktion übernimmt. Daher wurde das entsprechende Codon im Gen von At1g20510 mittels zielgerichteter Mutagenese durch das Codon von Asparaginsäure ersetzt. Das resultierende Protein zeigte weder in den *in vitro*-Versuchen noch im Komplementationstest in *E. coli* eine enzymatische Aktivität (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Somit ist das konservierte Lysin auch in Enzymen der 4CLL-Gruppe essentiell für die Bildung des Endproduktes und bestätigt prinzipiell das Modell der Katalyse über die Stabilisierung des negativen Übergangszustands (Conti *et al.*, 1997).

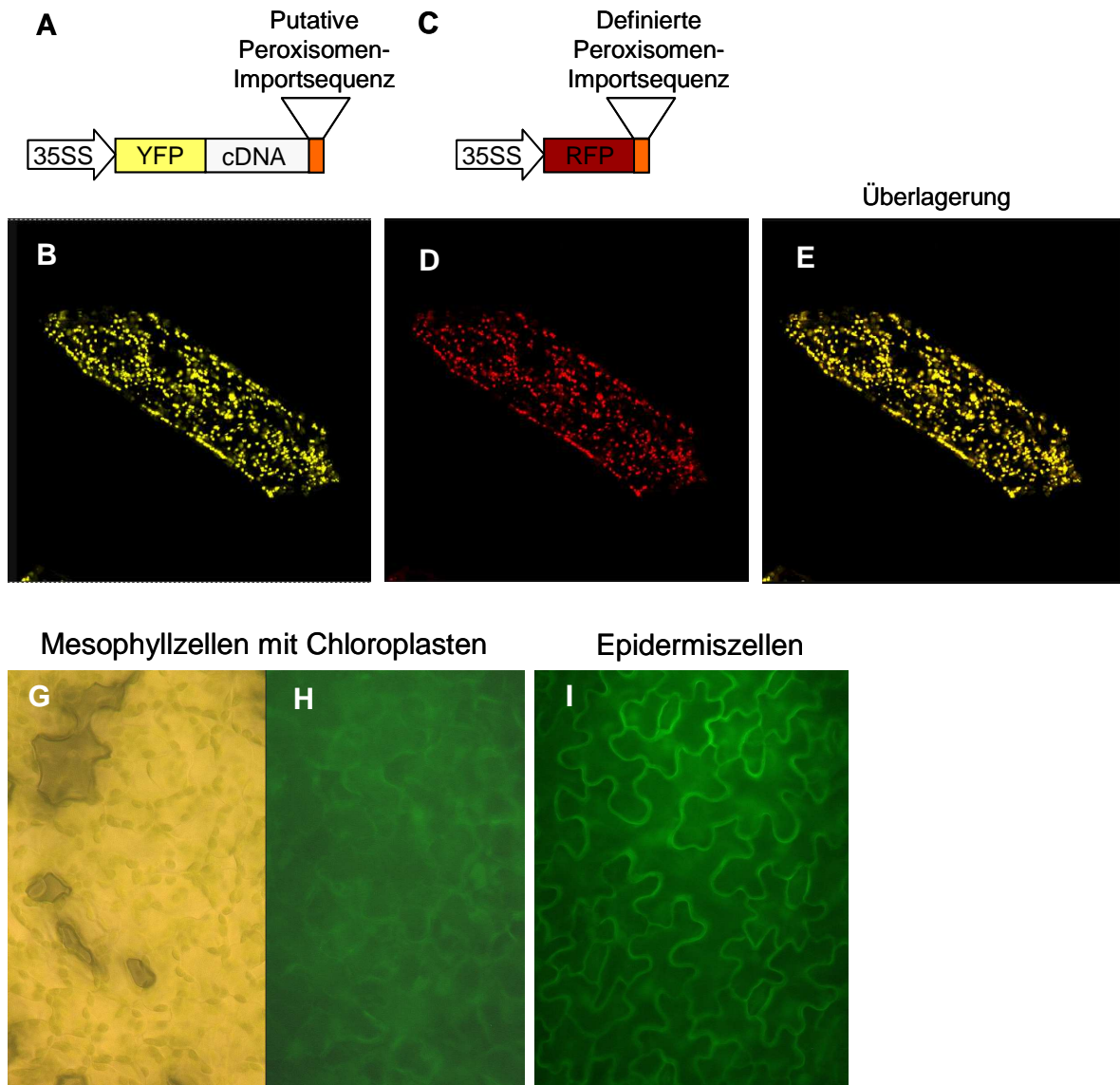


### 3.2.2 Bestimmung der subzelluläre Lokalisation des Proteins At1g20510 in *A. thaliana*

Aus der Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle ergibt sich die Notwendigkeit ausgewählte Proteine in bestimmten Organellen zu transportieren. Dazu müssen definierte Signalpeptide oder Importsequenzen, die durch spezifische Aminosäureabfolgen gekennzeichnet sind, in den Proteinen vorhanden sein. Durch die Analyse der Aminosäuresequenz eines Proteins können also Hinweise darauf erhalten werden in welchem zellulären Kompartiment ein Protein lokalisiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Analyse für das Protein At1g20510 durchgeführt. Das hierfür eingesetzte Signalpeptid erkennende Programm lieferte allerdings kein eindeutiges Ergebnis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). Der Algorithmus TargetP sagt mit 75 %iger Wahrscheinlichkeit eine Lokalisation des Proteins in den Chloroplasten voraus, da sich am N-Terminus vermehrt hydrophobe Aminosäuren befinden. Andererseits existiert aber eine peroxisomale Importsequenz vom Typ1 (Peroxisomal Targeting Sequence 1) am C-Terminus des Proteins. Diese wird durch das charakteristische Tripeptid SKL bestimmt.

Zur Überprüfung der Funktionalität beider putativer Importsequenzen wurden Fusionsproteine mit dem gelb fluoreszierenden Protein YFP hergestellt (Kap. 2.1.7). Eine N-terminale Fusion zur Überprüfung der Funktionalität der C-terminalen SKL-Sequenz und eine C-terminale Fusion zur Analyse der chloroplastidären Importsequenz am N-Terminus. Beide Fusionskonstrukte wurden in den Pflanzen unter der Kontrolle des doppelten CaMV-35S-Promotors überexprimiert (Kap. 2.2.4.11).

Das N-terminale Fusionsprotein wurde in Blättern von *A. thaliana* transient exprimiert und die subzelluläre Lokalisation mittels konfokaler Lasermikroskopie bestimmt (Kap. 2.2.4.11.1). In den gleichen Blättern wurde ein Kontrollkonstrukt koexprimiert. Dieses bestand aus dem rot fluoreszierenden Protein RFP mit einer bekannten Importsequenz für Peroxisomen (-SKL), welches ebenfalls unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand (Mano *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2005). Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt. Nach der Anregung des fluoreszierenden Proteins mit der Wellenlänge 514 nm ergab sich ein deutlich punktförmiges Verteilungsmuster des YFP-Fusionsproteins in der Zelle (Abb. 13A/B). Die Analyse der Fluoreszenz des RFP-Kontrollkonstruktes nach Anregung bei 561 nm zeigte ebenfalls die Lokalisation in den punktförmigen Organellen (Abb. 13C/D). Deutlich wurde die übereinstimmende Lokalisation



**Abb. 13: Subzelluläre Lokalisation des Proteins At1g20510**

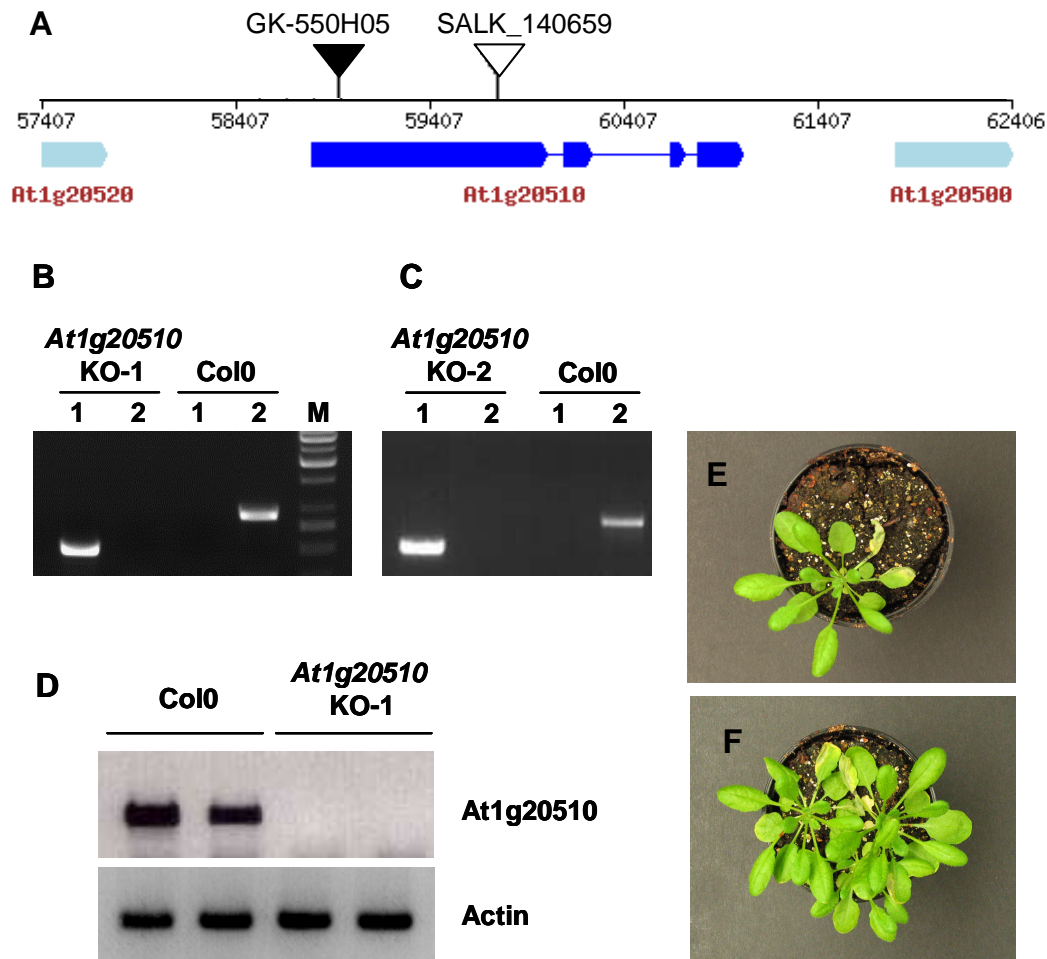
(A) Konstrukt mit zweimal 35S-Promotor, N-terminale Fusion von YFP und der cDNA von At1g20510. (B) Emission von gelbem Licht durch das angeregte YFP-At1g20510-Fusionsprotein. (C) Kontrollkonstrukt zur Lokalisation der Peroxisomen mit zweimal 35 S-Promotor, RFP und der peroxisomalen Importsequenz. (D) Emission von rotem Licht durch das RFP-Protein. (E) Überlagerung der Bilder B und D. (F) Konstrukt mit zweimal 35 S-Promotor, C-terminale Fusion von YFP und der cDNA von At1g20510. (G) Mesophyllzellen mit Chloroplasten im Lichtmikroskop. (H) Mesophyllzellen mit Chloroplasten, die durch At1g20510-YFP gelbes Licht abstrahlen. (I) Epidermiszellen, die durch At1g20510-YFP gelbes Licht emittieren. (J) Pflanzen ohne Fusionsprotein nach UV-Anregung mit YFP-Filter.

der Proteine vor allem in der Überlagerung beider Bilder (Abb. 13E). Da die RFP-SKL-Fusion bekanntermaßen in Peroxisomen lokalisiert ist, muss es sich bei den Organellen um Peroxisomen handeln. Somit ist bei At1g20510 das C-terminale Tripeptid SKL funktional und führt zu einem Transport des Proteins in die peroxisomale Matrix.

Zur Lokalisation des C-terminalen Fusionsproteins und Überprüfung der chloroplastidären Importsequenz wurden Pflanzenlinien erstellt, die das Transgen stabil tragen. Das Konstrukt steht ebenfalls unter Kontrolle des doppelten CaMV-35S-Promotors. Es gelang in der zweiten Pflanzengeneration die Fluoreszenz des gelb fluoreszierenden Proteins zu detektieren. Dies ist in Abb. 13F bis I dargestellt. Sowohl in den Mesophyll- als auch in den Epidermiszellen der Pflanze ist die YFP-Fluoreszenz keiner spezifischen Organelle zuzuordnen. Sie liegt vielmehr in diffuser Verteilung im gesamten Cytoplasma, sowie gehäuft an der Zellmembran vor. Die putative Chloroplastenimportsequenz von At1g20510 scheint demnach nicht funktional zu sein. Somit wurde eindeutig nachgewiesen, dass At1g20510 in der peroxisomalen Matrix lokalisiert ist, also in dem Kompartiment, in dem sowohl Fettsäuren als auch Jasmonsäurevorstufen aktiviert und  $\beta$ -oxidiert werden.

### 3.2.3 Charakterisierung der *Knock-out*-Linien von *At1g20510*

Um die *in vivo*-Funktion von At1g20510 aufzuklären wurden *Knock-out*-Linien des entsprechenden Gens untersucht. Hierzu wurden zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien des Gens *At1g20510* charakterisiert. Eine der Linien, SALK\_140659, stammt aus der Mutantensammlung des SALK-Instituts und trägt die Insertion der T-DNA an Position 977 bp im ersten Exon, wie in Abb. 14A ersichtlich. Die zweite Linie, GK-550H05, wurde aus der Kollektion der T-DNA-Insertionslinien von GABIKAT ausgewählt und trägt die T-DNA-Insertion an Position 76 bp im ersten Exon des Gens *At1g20510*. Für beide Linien wurden über den Nachweis der T-DNA im Genom der Pflanze homozygote Individuen selektiert und deren Nachkommenschaft für nachstehende Versuche verwendet (Kap. 2.2.4.2). In Abb. 14B/C sind beispielhaft die Ergebnisse zweier PCR-Analysen zu sehen. Da bei den *Knock-out*-Pflanzen kein Wildtypallel mehr amplifiziert wurde, war also die Isolation zweier unabhängiger homozygoter *Knock-out*-Linien von *At1g20510* erfolgreich. Eine RT-PCR-Analyse auf das Vorhandensein von At1g20510-mRNA in Pflanzen der *Knock-out*-Linie SALK\_140659



**Abb. 14: Charakterisierung der *Knock-out*-Pflanzen von *At1g20510***

(A) Lokalisierung der T-DNA-Insertionen in den beiden *Knock-out*-Linien des Gens *At1g20510*. Das Bild entstammt im Original der GABI-KAT-Datenbank und wurde modifiziert. (B) Linie 1 (SALK\_140659): Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Primerkombinationen 1 und 2. Primerkombination 1 ergibt bei einem *Knock-out*-Allel ein Produkt, Kombination 2 bei einem Wildtypallel. M:Marker. (C) Linie 2 (GK-550H05): Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Primerkombinationen siehe C. (D) Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte: Analyse der Transkriptlevel von *At1g20510*. bzw. Actin in Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen. (E) Bild einer Wildtyppflanze. (F) Bild der beiden *At1g20510*-*Knock-out*-Linien.

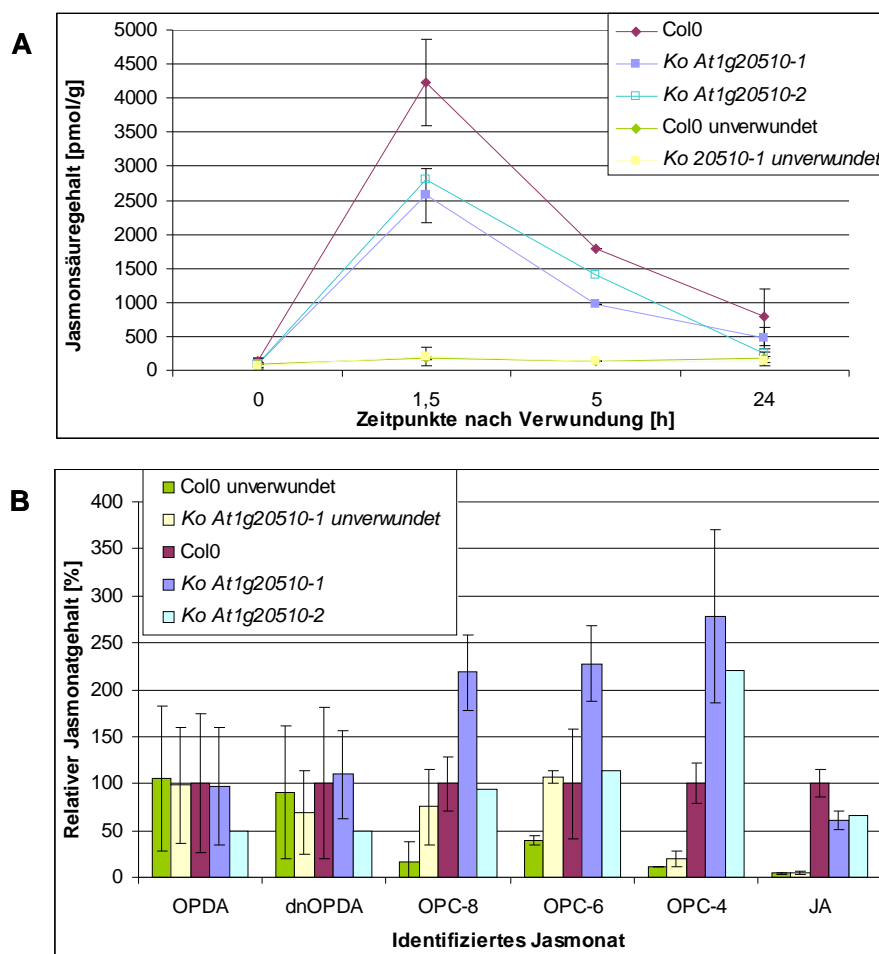
zeigte, dass sich kein Transkript des Gens *At1g20510* nachweisen ließ, während die cDNA des Wildtyps zu einem entsprechenden PCR-Produkt führte (Abb.14D). Somit handelt es sich bei der Linie SALK\_140659 um eine Nullmutante des Gens *At1g20510*. Eine Bestimmung der *At1g20510*-mRNA Menge wurde für die zweite *Knock-out*-Linie GK-550H05 nicht vorgenommen.

Die makroskopische Analyse beider *Knock-out*-Linien ergab kein offensichtliches Anzeichen für einen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abb.14E/F). Deshalb wurden Pflanzen der *Knock-out*-Linien auf mögliche biochemische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

### **3.2.3.1 Analyse des Oxylipingehalts in *Knock-out*-Linien von *At1g20510***

In den *Knock-out*-Pflanzen wurde die Menge an Jasmonsäure und ihren Vorstufen im Vergleich zu Wildtyppflanzen analysiert. Hierzu wurden Verwundungsexperimente durchgeführt (Kap. 2.2.4.4). Es zeigte sich, dass die mechanische Verwundung der Blätter zu einem Anstieg der Jasmonsäurekonzentrationen führte, die nach 90 Minuten ihr Maximum erreichten und danach wieder absanken (Abb. 15A). Dabei war deutlich zu erkennen, dass beide *Knock-out*-Linien von *At1g20510* eineinhalb und fünf Stunden nach der Verwundung eine um ca. 40% niedrigere Jasmonsäuremenge aufwiesen als der Wildtyp. Somit führt das Fehlen des Enzyms *At1g20510* zu einer verminderten Produktion an Jasmonsäure nach Verwundung. In den unverwundeten Blättern kam es, wie erwartet, zu keinem Anstieg der Jasmonsäuremengen und ein Unterschied zwischen Wildtyp und *Knock-out* war nicht zu erkennen.

Auch für die Jasmonsäurevorstufen wurden die Akkumulationsprofile von verwundeten und unverwundeten Pflanzen erstellt. Der Übersichtlichkeit halber sind jedoch nur die Werte für den Zeitpunkt 90 Minuten nach dem Start des Experiments angegeben (Abb. 15B). Bereits in den unverwundeten Pflanzen der Linie SALK\_140659 von *At1g20510* akkumulierten die Vorstufen OPC-8 und OPC-6 stark. Sie erreichten sogar im unverwundeten Zustand die Mengen, die in Wildtyppflanzen nach einer Verwundung vorgefunden wurden. Durch die Verwundung der *Knock-out*-Pflanzen wurde dieser Effekt noch verstärkt, es trat eine weitere deutliche Akkumulation der Jasmonsäurevorstufen OPC-8, OPC-6 und auch OPC-4 auf. Dies korrespondiert mit der signifikant geringeren Menge an Jasmonsäure in diesen Pflanzen. Die



**Abb. 15: Analyse des Oxylipingehaltes in Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen von *At1g20510***

Dargestellt ist die Menge verschiedener Jasmonate in Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen in einem Verwundungsexperiment. (A) Jasmonsäuregehalt im Zeitverlauf von 0, über 1,5, 5 bis 24 Stunden in verschiedenen Pflanzen, Col0 verwundet und unverwundet; *At1g20510* *Knock-out*-Linie 1 (SALK\_140659) verwundet und unverwundet; *At1g20510* *Knock-out*-Linie 2 (GK-550H05) verwundet. (B) Menge unterschiedlicher Jasmonate in Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen *At1g20510* Linien 1 und 2 90 min nach der Verwundung und in unverwundeten Kontrollpflanzen (Col0, *At1g20510-1*).

Anstauung von OPC-8 entsprach dabei den Erwartungen, denn es stellt in den *in vitro*-Versuchen das bevorzugte Substrat von *At1g20510* dar (Kap. 3.2.1). Doch zeigten auch die bereits verkürzten Vorstufen OPC-6 und OPC-4 eine hohe Akkumulation von bis zu 250 % im Vergleich zum Wildtyp. Da OPC-6 sowohl von *At1g20510* *in vitro* aktiviert wird, als auch in der Pflanze einer Aktivierung unterliegen sollte, entspricht auch diese Akkumulation den

Erwartungen. Überraschend war die starke Anstauung der Vorstufe OPC-4, da diese entsprechend dem derzeitigen Stand des Wissens nicht als freie Säure in der Pflanze vorliegen sollte, sondern nur als CoA-veresterte Zwischenstufe im  $\beta$ -Oxidationsprozess auftreten sollte (Miersch *et al.*, 2000). Erst das Endprodukt der  $\beta$ -Oxidation, Jasmonsäure, sollte durch die Aktivität einer Thioesterase wieder als freie Säure erscheinen. Bei den Vorstufen OPDA und dnOPDA traten dagegen keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen auf, möglicherweise treten hier Regulationsmechanismen auf, die die Menge dieser Jasmonsäurevorstufen relativ konstant halten.

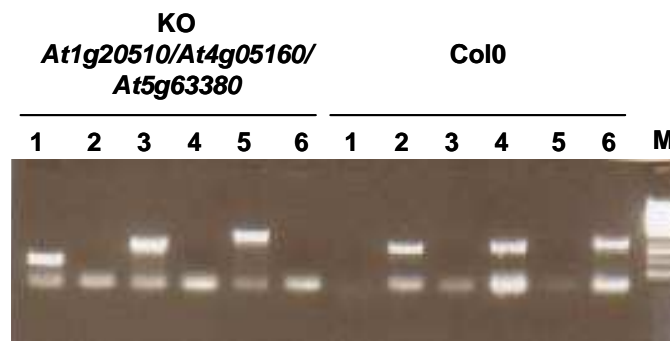
Die Ergebnisse für die zweite *Knock-out*-Linie, GK-550H05, bestätigten prinzipiell die soeben vorgestellten Daten (Abb.15A/B). Leichte Unterschiede zu den Ergebnissen der SALK\_140659-Linie sollten zunächst durch mehrfache Wiederholungen dieser Einzelmessung überprüft werden.

Die signifikante Absenkung der Jasmonsäuremenge in den *Knock-out*-Linien von *At1g20510* bei gleichzeitiger Akkumulation der Jasmonsäurevorstufen bestätigte damit die Ergebnisse der *in vitro*-Analysen, die eine Funktion von *At1g20510* als CoA-Ligase von Jasmonsäurevorstufen ergaben. Beide *Knock-out*-Linien produzierten jedoch weiterhin genügend Jasmonsäure, so dass kein makroskopischer Phänotyp auftrat. Es existieren also redundante enzymatische Aktivitäten in der Pflanze, wobei sich aus den *in vitro*-Aktivitätsprofilen der 4CLLs *At1g20500*, *At4g05160* und *At5g63380* als Kandidaten ergaben.

### **3.2.4 Erstellung und Charakterisierung der Tripel-Knock-out-Linien *At1g20510/At4g05160/At5g63380* und *At1g20500/At4g05160/At5g63380***

Zur Untersuchung einer möglichen redundanten Funktion der Enzyme *At1g20510*, *At1g20500*, *At4g05160* und *At5g63380* bei der Aktivierung von Jasmonsäurevorstufen in *A. thaliana* wurden zwei Mehrfachmutanten erzeugt. Dabei handelt es sich um die Tripel-*Knock-out*-Linien *At1g20510/At4g05160/At5g63380* und *At1g20500/At4g05160/At5g63380*. Die Kreuzung zur Quadrupel-Mutante konnte nicht durchgeführt werden, da *At1g20510* und *At1g20500* direkt aufeinander folgend auf Chromosom 1 angeordnet sind.

Die grundlegenden *Knock-out*-Linien aus denen die Mehrfachmutanten gekreuzt wurden, sind *At1g20510* SALK\_140659 (Kap. 3.2.3), *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380*



**Abb. 16: Verifizierung der Tripel-Knock-out-Linie  
*At1g20510/At4g05160/At5g63380***

Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte einer PCR. Die verwendeten Matrizen sind die genomische DNA von Col0 und des potentiellen Tripel-Knock-outs. Primerkombinationen sind: 1: *At1g20510* T-DNA-spezifische Primer. 2: *At1g20510* Wildtypallel-spezifische Primer. 3: *At4g05160* T-DNA-spezifische Primer. 4: *At4g05160* Wildtypallel-spezifische Primer. 5: *At5g63380* T-DNA-spezifische Primer. 6: *At5g63380* Wildtypallel-spezifische Primer. M:Marker

SALK\_003233 (Kap. 3.3.1). Die Einzelmutante SALK\_067285 von *At1g20500* stammt ebenfalls aus der SALK-Kollektion von T-DNA-Insertionslinien und trägt eine Insertion an Position 536 bp im Gen (Daten der Isolation nicht gezeigt). Auch diese weist, wie alle anderen bisher untersuchten *Knock-out*-Linien, keinen makroskopischen Phänotyp auf (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde die Doppel-*knock-out*-Linie *At4g05160/At5g63380* mit dem Einzel-*knock-out* von *At1g20510* gekreuzt. Aus der aufspaltenden F2-Generation, in welcher theoretisch jede 64. Pflanze homozygot die drei T-DNA-Insertionen trägt, wurde eine reinerbige Pflanze mittels PCR identifiziert (Kap. 2.2.4.2). In Abb. 16 ist beispielhaft das Ergebnis einer solchen PCR zu sehen, in der nur noch die T-DNA-Allele, nicht jedoch die Wildtypallele amplifiziert werden konnten. Somit war die Erstellung des homozygoten Tripel-*knock-outs* *At1g20510/At4g05160/At5g63380* erfolgreich.

In der gleichen Vorgehensweise konnte eine homozygote Tripel-*knock-out*-Linie der 4CLLs *At1g20500/At4g05160/At5g63380* erstellt und isoliert werden (Abb.17).

Die makroskopische Analyse der beiden Tripel-*knock-out*-Linien ergab, dass auch diese Linien keinen makroskopischen Phänotyp aufwiesen, der sich von Wildtyppflanzen unterscheiden lässt (Ergebnisse nicht gezeigt). Gleichwohl wurde auch hier eine Bestimmung des Oxylypingehalts





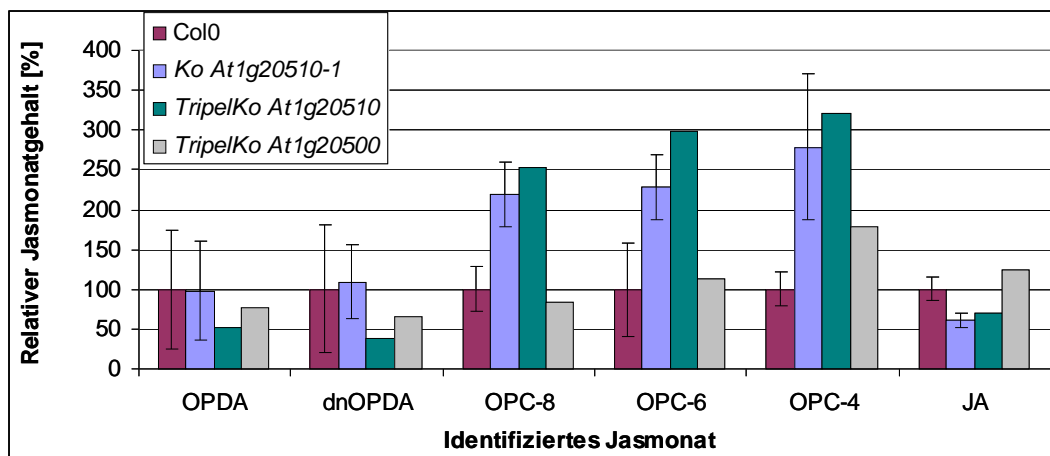
**Abb. 17: Verifizierung der Tripel-Knock-out-Linie *At1g20500/At4g05160/At5g63380***

Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte einer PCR. Die verwendeten Matrizen sind die genomische DNA von Col0 und des potentiellen Tripel-Knock-outs. Primerkombinationen sind: 1: *At4g05160* T-DNA-spezifische Primer. 2: *At4g05160* Wildtypallel-spezifische Primer. 3: *At5g63380* T-DNA-spezifische Primer. 4: *At5g63380* Wildtypallel-spezifische Primer. 5: *At1g20500* T-DNA-spezifische Primer. 6: *At1g20500* Wildtypallel-spezifische Primer. M:Marker

vorgenommen, um eine mögliche Beteiligung aller vier 4CLs an der Jasmonsäurebiosynthese zu untersuchen.

### 3.2.4.1 Analyse des Oxylipingehalts in Tripel-Knock-out-Linien *At1g20510/At4g05160/At5g63380* und *At1g20500/At4g05160/At5g63380*

Die Bestimmung der Jasmonatmengen in den Tripel-Knock-out-Linien erfolgte in einem Verwundungsexperiment (Kap. 2.2.4.4). Die Tripel-knock-out-Linie *At1g20500/At4g05160/At5g63380* zeigte dabei zu keinem Zeitpunkt eine signifikant veränderte Konzentration an Oxylipinen gegenüber dem Wildtyp Col0 (Abb. 18). Im Gegensatz dazu wies die Tripel-knock-out-Linie von *At1g20510/At4g05160/At5g63380* deutliche Unterschiede im Oxylipinprofil im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 18). 90 Minuten nach der Verwundung war die Jasmonsäuremenge deutlich niedriger als die des Wildtyps, zugleich waren einige Vorstufen stark akkumuliert. Sowohl für OPC-8, als auch für OPC-6 und OPC-4 waren zwei- bis dreifach erhöhte Werte im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Dabei war wiederum OPC-4 die am höchsten akkumulierende Vorstufe. Vergleicht man die Ergebnisse der Oxylipinanalyse des Tripel-knock-outs *At1g20510/At4g05160/At5g63380* mit denen der Einzel-knock-out-Linien von *At1g20510* ergaben sich jedoch keine Unterschiede (Abb. 18). Es zeigte sich weder eine höhere Anstauung der Jasmonsäurevorstufen, noch eine weitere Reduktion des



**Abb. 18: Analyse des Oxylipingehaltes in Wildtyp- und Tripel-Knock-out-Pflanzen**

Dargestellt ist die relative Menge verschiedener Jasmonate in Wildtyp, Einzel- und Tripel-Knock-out-Linien 90 min nach der Verwundung der Pflanzen. Dabei handelt es sich um den Wildtyp Col0, die Einzel-Knock-out-Linie *At1g20510* SALK\_140659 und die 4CLL-Tripel-Knock-out-Linien *At1g20510/At4g05160/At5g63380* bzw. *At1g20500/At4g05610/At5g63380*.

Jasmonsäuregehalts. Daher scheint der Ausfall der Genprodukte von *At4g05160* und *At5g63380* keinen weiteren Einfluss auf die Jasmonsäuremenge oder die der Vorstufen zu haben. Dazu soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch die Einzel- und Doppel-knock-out-Linien von *At4g05160* und *At5g63380* einer Oxylipinanalyse unterzogen wurden, jedoch auch hier keine signifikant veränderten Mengen festgestellt wurden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Somit konnte nur für *At1g20510* eine Beteiligung an der Jasmonsäurebiosynthese in *A. thaliana* nachgewiesen werden, für die weiteren 4CLLs *At1g20500*, *At4g05160* und *At5g63380* kann lediglich die *in vitro*-Aktivität vermerkt werden. Ihre *in vivo*-Funktion scheint, zumindest unter den getesteten Bedingungen, nicht in der Bereitstellung aktivierter Jasmonsäurevorstufen zu liegen. Die Identität der Enzyme mit redundanter enzymatischer Aktivität zu *At1g20510*, deren Existenz sich durch die verbleibende Jasmonsäure in den beschriebenen *Knock-out*-Linien erklärt, ist demnach ungeklärt.

### 3.2.5 Die Analyse des Expressionsmusters von *At1g20510*

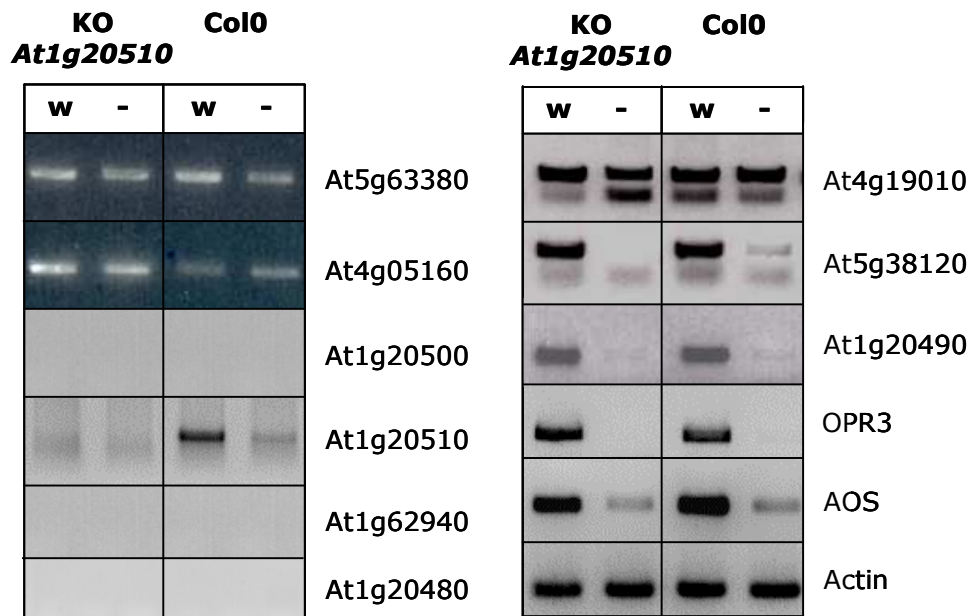
#### 3.2.5.1 Analyse der Wundinduktion von *At1g20510* und weiterer 4CLLs durch semiquantitative RT-PCR

Eines der Merkmale der an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligten Enzyme ist die Induktion der Expression der korrespondierenden Gene durch das Endprodukt des Biosynthesewegs, Jasmonsäure, in einem positiven *Feedback*-Mechanismus (Laudert *et al.*, 1998; Kubigsteltig *et al.*, 1999; Strassner *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003).

Da die Synthese von Jasmonsäure und somit die Expression der entsprechenden Gene auch durch mechanische Verwundung der Pflanzen induziert wird, wurde geprüft, wie sich die Genexpression der neun 4CLLs aus Gruppe B nach Verwundung verhält. Als Positivkontrolle wurden *OPR3* und *AOS* analysiert, für die bekannt ist, dass ihre Expression durch Jasmonsäure induziert wird (Laudert *et al.*, 1998; Strassner *et al.*, 2002). Dieses Experiment wurde sowohl mit Wildtyppflanzen als auch mit Einzel-*knock-out*-Pflanzen von *At1g20510* durchgeführt (Abb. 19).

Hierbei zeigten die Gene *At1g20510*, *At1g20490* und *At5g38120* eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge nach Verwundung des Blattgewebes. Ihr Expressionsmuster entsprach damit dem der Positivkontrollen *OPR3* und *AOS*. Für *At1g20510* unterstützt die Wundinduzierbarkeit der Genexpression eine Beteiligung dieses Enzyms an der Jasmonsäurebiosynthese (Kap.3.2.3). Basierend auf diesem Kriterium könnten auch *At1g20490* und *At5g38120* an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligt sein. Für beide Genprodukte ist eine Funktion bislang unbekannt (Kap. 3.1.1.2/3.1.2).

Im Gegensatz dazu konnte für drei der 4CLLs *At4g19010*, *At4g05160* und *At5g63380*, eine Induktion der Expression nach Verwundung nicht nachgewiesen werden. Diese Gene wurden in allen getesteten Pflanzen konstitutiv exprimiert. Entsprechend diesem Merkmal wäre eine Beteiligung der korrespondierenden Genprodukte an der Jasmonsäurebiosynthese auszuschließen. Dies entspricht für *At4g19010* der bisher erhaltenen *in vitro*-Aktivität (Kap. 3.1.1.2), sowie für *At4g05160* und *At5g63380* den Ergebnissen der funktionalen Charakterisierung in *A. thaliana* (Kap. 3.2.4/3.3).



**Abb. 19: RT-PCR zur Analyse der wundinduzierten Genexpression der 4CLLs der Gruppe B**

Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte von PCRs. Getestet wurden die 4CLLs der Gruppe B und die Positivkontrollen OPR3, AOS und Actin. Die cDNA stammt von unverwundeten und verwundeten Blättern von Wildtyppflanzen und Pflanzen der *Knock-out*-Linie SALK\_140659 des Gens *At1g20510*. Nicht nachgewiesen werden konnte die cDNA der 4CLLs *At1g62940*, *At1g20500* und *At1g20480*. w: Pflanzen vor 90 min verwundet; -: Pflanzen unverwundet.

Die cDNA dreier weiterer Gene, *At1g20480*, *At1g20500* und *At1g62940*, konnte in Blättern von *A. thaliana* durch die semiquantitative RT-PCR nicht nachgewiesen werden. Somit kann eine putative Beteiligung der Genprodukte an der Jasmonsäurebiosynthese im Blattgewebe der Pflanze ausgeschlossen werden. Dies entspricht auch der Expressionsdaten, die mittels des Programms Genevestigator V3 gewonnen wurden (Kapitel 3.1.3).

### 3.2.5.2 Analyse der koregulierten Gene von *At1g20510*

Mittlerweile stehen in diversen digitalen Datenbanken umfassende Expressionsanalysen der Gene von *A. thaliana* zur Verfügung. Das Programm ExpressionAngler ermöglicht in diesen Datenbanken die Suche nach koregulierten Genen, was sich als ergänzendes Werkzeug zur Funktionsanalyse erwiesen hat (van Noort *et al.*, 2003). Daher wurde mit Hilfe dieses

Programms nach koregulierten Genen von *At1g20510* gesucht (Ergebnisse nicht gezeigt). In dieser Analyse wurden die Daten von 392 Microarray-Experimenten der NASC-Datenbank verglichen und deutliche Koregulationen gefunden. Das am stärksten koregulierte Gen mit einem *r-value* von 0,9 war *OPR3*, das für die OPDA-Reduktase 3 kodiert. Dieses gut untersuchte, peroxisomal lokalisierte Enzym führt die Reduktion des Cyclopentenons OPDA zum Cyclopentanon OPC-8 durch und katalysiert somit den Reaktionsschritt vor der Aktivierung der Jasmonsäurevorstufe (Schaller *et al.*, 1997; Stintzi *et al.*, 2000). Die Koregulation von *OPR3* und *At1g20510* nach Verwundung konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (Kap. 3.2.5.1). Außerdem konnte durch die Datenbanksuche ein weiteres Enzym der Jasmonsäurebiosynthese identifiziert werden, LOX3 (Lipoxygenase3). Interessanterweise waren auch einige Transkriptionsfaktoren in der Liste der koregulierten Gene zu finden. Darunter WRKY 33 und WRKY40, die beide in der Signaltransduktion im Netzwerk der Phytohormone Jasmonsäure und Salizylsäure wirken (Xu *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007), sowie MYC2, welcher der Haupttranskriptionsfaktor der Jasmonsäure regulierten Gene ist (Boter *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). Sogar Isoformen der vor kurzem charakterisierten Familie von transkriptionalen Repressoren der Jasmonsäuresignaltransduktion (JAZ) zeigten Koregulation mit *At1g20510* (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Alle diese Gene wiesen einen *r-value* von mindestens 0,8 auf und waren somit signifikant koreguliert. Diese Ergebnisse bekräftigen die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit *At1g20510*.

### 3.2.5.3 Die Promotorregion von *At1g20510*

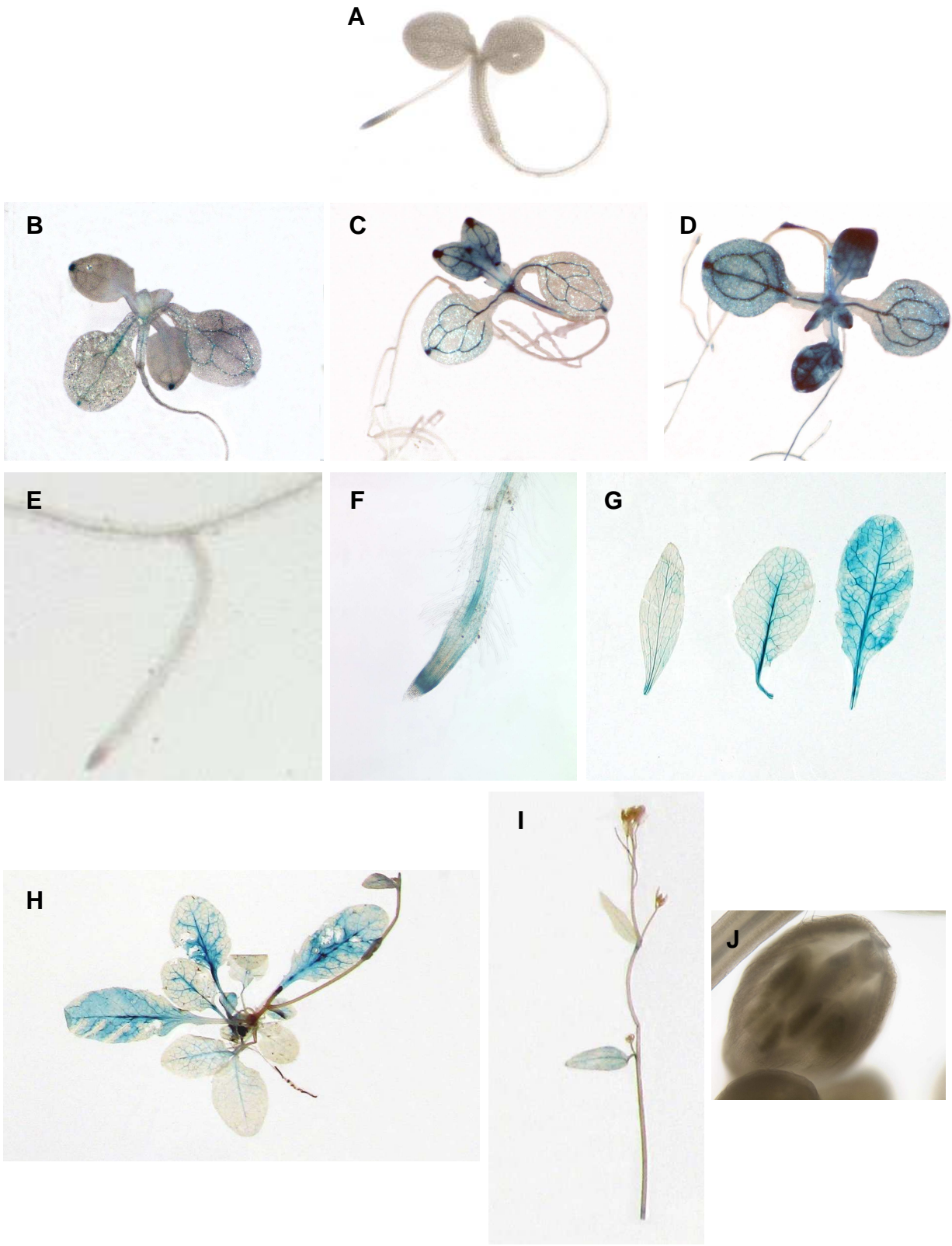
Die Koregulation von Genen, deren Produkte an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligt sind, deutet auf gemeinsame regulatorische Promotorelemente hin. Diese sollten durch einen Vergleich der Promotorregionen identifizierbar sein, welcher mit Hilfe des Programms Athena durchgeführt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Promotorregion von *At1g20510* wurde der durch das nächste, stromaufwärts gelegene Gen (*At1g20520*) begrenzte Bereich des Genoms definiert. Dieser hat eine Größe von 1064 bp und enthält an Position -63 bis -58 als Element zur Rekrutierung der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie eine TATA-Box (TATAAA). Es konnten jedoch auch eine Reihe von gemeinsamen Sequenzmotiven identifiziert werden, die

möglicherweise mit einer Regulation in Jasmonsäure abhängiger Weise in Verbindung stehen. Darunter waren das Z-Box-Motiv mit der Konsensussequenz ATACGTGT und das G-Box-Motiv, das sich durch die Sequenz CACGTG auszeichnet. Beide gehören zur Gruppe der Licht regulierten Promotorelemente und sind Bindestelle des Haupttranskriptionsfaktor in der Signaltransduktion von Jasmonsäure, MYC2 (Yadav *et al.*, 2005; Dombrecht *et al.*, 2007). Die G-Box befindet sich an Position -152 bis -147 bp im Promotor von *At1g20510* und innerhalb der ersten 250 bp vor dem Transkriptionsstart auch in den Promotorregionen der Gene *OPR3* und *MYC2*. Die Z-Box hingegen liegt am distalen Ende der Promotorregion von *At1g20510* von -954 bis -947 bp und zeigt in den Promotoren der anderen Gene keine einheitliche Lokalisierung. Des Weiteren konnte das **AB**scisic Acid **R**esponsive **E**lement-like Bindemotiv mit der Konsensussequenz (C/T)ACGTG(G/T)(A/T) in den Promotoren der Jasmonsäure regulierten Gene identifizieren werden. Auch dieses Motiv ist eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor MYC2. Der Promotor von *At1g20510* enthält außerdem fünf W-Boxen, die Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren darstellen und die Konsensussequenz (T)TGAC(C/T) besitzen (Eulgem *et al.*, 1999).

#### **3.2.5.4. Erstellung der Reporterpflanzen von *At1g20510* und Analyse unterschiedlicher Entwicklungsstadien**

Zur Analyse der Expression von *At1g20510* wurden Reporterpflanzen erstellt. Dazu wurde die 1064 bp lange, in Kap. 3.2.5.3 beschriebene Promotorregion von *At1g20510* vor das Reportergen *uidA*, welches für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert, kloniert und in *A. thaliana* Col0 eingebracht (Kap. 2.1.7/2.2.4.7). Beispielhaft ist in Abb. 20 das Ergebnis für eine Reportergenlinie dargestellt.

Im Verlaufe der Keimlingsentwicklung zeigte sich bis zur Ausbildung der Primärblätter keine Blaufärbung der Pflanzen und damit keine Expression des Reportergens von *At1g20510* (Abb. 20A). Erst zwei Wochen alte Pflanzen wiesen in Blättern und Wurzeln eine leichte Blaufärbung des vaskulären Gewebes auf (Abb. 20B). Außerdem zeigte sich, vornehmlich in den Primärblättern, eine deutlich umgrenzte, blau gefärbte Zellgruppe, wobei es sich um Hydathoden des Blattes handelte. Wurden diese zwei Wochen alten Pflanzen vor der Färbung für 24 Stunden mit 10  $\mu$ M Methyljasmonat behandelt, so führte dies zu einer deutlichen



**Abb. 20: GUS-Reportergermpflanzen von *At1g20510***

(A) 7 Tage alte Reportergermpflanze, keine GUS-Expression. (B) 14 Tage alte Reportergermpflanze, GUS-Expression in Vaskulatur und Zellgruppe in Sekundärblättern. (C) 14 Tage alte Reportergermpflanze, behandelt mit 10  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat für 24 h, verstärkte GUS-Expression im Blattbereich. (D) 14 Tage alte Reportergermpflanze, behandelt mit 100  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat für 24 h, starke GUS-Expression in der gesamten Pflanze. (E) Wurzel einer 14 Tage alten, unbehandelten Pflanze. (F) Wurzel einer 14 Tage alten, mit 100  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat behandelten Pflanze. (G) Induktion der GUS-Expression in Blättern 6 Wochen alter Pflanzen durch Verwundung, links unverwundetes Blatt, rechts daneben vor 30 min verwundetes Blatt, daneben vor 90 min verwundetes Blatt. (H) 6 Wochen alte Pflanze, GUS-Expression in der Vaskulatur und in verwundeten Blättern in der gesamten Lamina. (I) Blütenstängel mit Blaufärbung eines Blattes. (J) Blüte einer Reportergermpflanze ohne GUS-Expression.

Ausbreitung und Verstärkung der Expression, die jedoch weiterhin größtenteils im Leitgewebe der Pflanze lokalisiert war (Abb. 20C). Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat auf die zwei Wochen alten Pflanzen führte zu einer weiteren Ausbreitung der Expression. In diesem Fall war eine Blaufärbung auch im restlichen Blattgewebe der Pflanze zu detektieren (Abb. 20D). Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Methyljasmonat führte auch im Wurzelgewebe dieser Pflanzen zu einer deutlich verstärkten Expression. Diese war ebenfalls hauptsächlich auf das Leitgewebe beschränkt und teilweise in der Zellteilungszone in Haupt- und Seitenwurzeln zu sehen (Abb. 20E/F).

Abb. 20H zeigt die GUS-Färbung von sechs Wochen alten Pflanzen mit intakten und verwundeten Blättern. Bei Pflanzen mit ungereizten Blättern beschränkte sich auch hier die Expression des Reportergens auf das Leitgewebe. Eine Verwundung der Blätter dieser Pflanzen führte dagegen zu einer starken Ausbreitung der Expression in der gesamten Blattlamina. Diese vom vaskulären Gewebe ausgehende Ausbreitung war bereits 30 Minuten nach Verwundung der Blätter verstärkt sichtbar. 90 Minuten nach Verwundung war in der gesamte Blattlamina eine Blaufärbung und damit eine Expression des Reportergens zu detektieren (Abb. 20G).

In Blütenstängeln der Pflanze und den hier befindlichen Blättern zeigte sich ebenfalls eine leichte Blaufärbung (Abb. 20I), nicht jedoch in den Blüten (Abb. 20J).

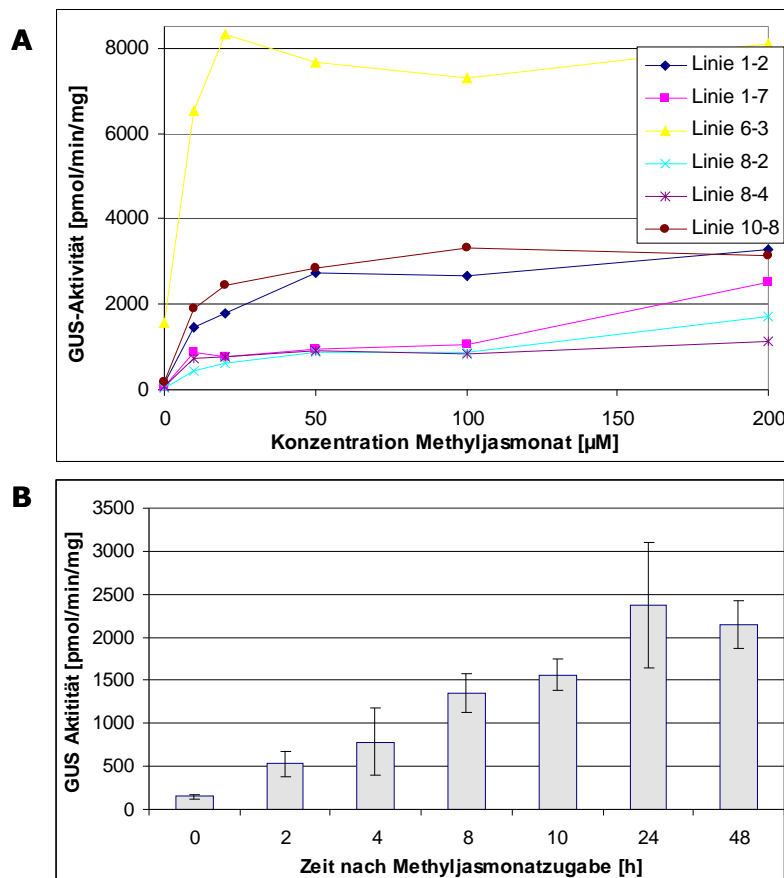
Somit bestätigten die Analysen der Reporterpflanzen prinzipiell das in digitalen Datenbanken gefundene Expressionsmuster (Kap. 3.1.3), konnten dieses aber zusätzlich bezüglich der Expression auf zellulärer Ebene verfeinern. So wurde die Genexpression in den Leitgeweben der Blätter deutlich. Außerdem konnte die Induktion der Expression durch Verwundung



bestätigt und die folgende Ausbreitung der Expression im gesamten Blattgewebe beobachtet werden.

### 3.2.5.5 Reaktion der Reporterpflanzen von *At1g20510* auf die Applikation verschiedener Chemikalien und pathogener Bakterienstämme

Für die weitergehende Analyse der Regulation der Expression von *At1g20510* wurden die Reaktionen der Reporterlinien (Kap. 3.2.5.4) auf die Applikation verschiedener Chemikalien getestet. Dazu wurden die Pflanzen zwei Wochen lang in einer Hydrokultur angezogen, anschließend die jeweiligen Testsubstanzen appliziert und nach spezifischen Inkubationszeiten die GUS-Aktivität quantitativ bestimmt (Kap. 2.2.4.10.2).

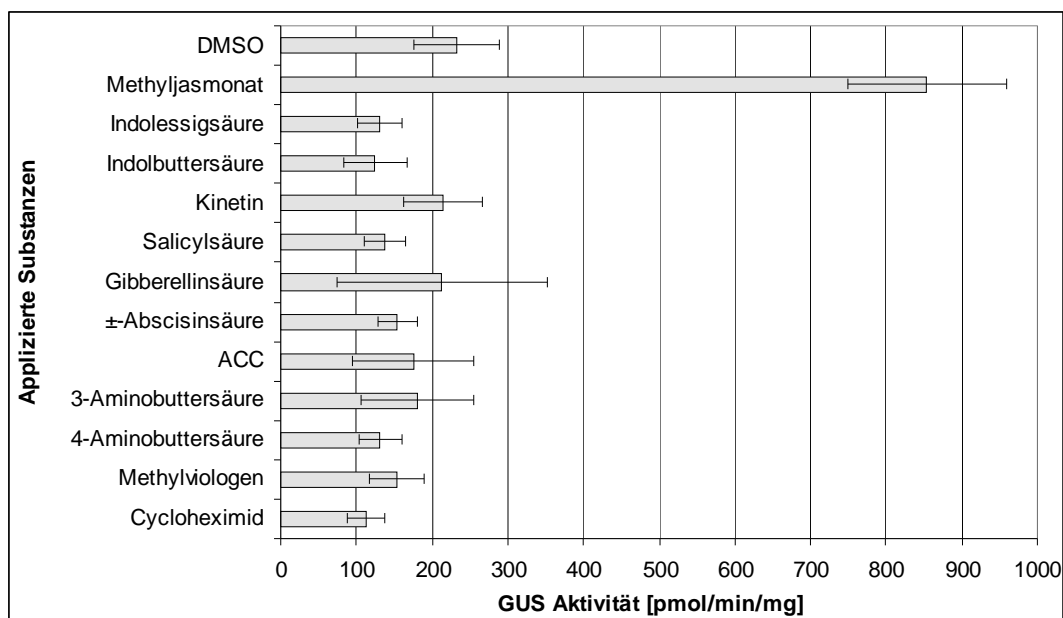


**Abb. 21: Analyse der GUS-Expression in Reporterlinien von *At1g20510***

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte 14 Tage in Microtiterplatten. (A) Analyse der Wirkung verschiedener Methyljasmonatkonzentrationen auf die GUS-Expression unabhängiger, homozygoter Reporterlinien von *At1g20510*, die Ernte erfolgte nach 24 h. (B) Analyse des Zeitverlaufs nach Applikation von 100 µM Methyljasmonat auf die GUS-Expression in Reporterlinie 1-2.

Methyljasmonat führte in allen getesteten Linien zu einer verstärkten Reporterexpression (Abb. 21A). Dabei wurde das Maximum der Methyljasmonat induzierten GUS-Expression bei Konzentrationen zwischen 20 und 100  $\mu\text{M}$  erreicht. Die unterschiedlichen Linien reagierten dabei relativ ähnlich, nur die absolute Stärke der GUS-Aktivität variierte. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit zwei unabhängigen Linien durchgeführt; gezeigt werden hier aber nur die Ergebnisse der Linie 1-2. Außerdem wurde ermittelt, dass eine Inkubationszeit der Pflanzen mit Methyljasmonat von 24 Stunden zur höchsten GUS-Aktivität führt (Abb. 21B). Daher wurden die Auswirkungen der weiteren getesteten Substanzen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden untersucht.

Die Analyse der Regulation der Expression von *At1g20510* durch Jasmonate und andere Phytohormone zeigte, dass nur die Applikation von Methyljasmonat eine Aktivierung der Genexpression bewirkte (Abb. 22). Die Zugabe aller weiteren Phytohormone, darunter Auxine, Cytokinin, Salizylsäure, Gibberellinsäure, Abscisinsäure und Ethylen, hatte keine Auswirkungen, die sich von der Negativkontrolle DMSO unterschieden.



**Abb. 22: Analyse der GUS-Expression in Reporterpflanzen von *At1g20510***

GUS-Expression in Linie 1-2 24 h nach Applikation verschiedener Chemikalien. ACC: 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (Ethylenvorstufe), DMSO: Dimethylsulfoxid (Negativkontrolle).

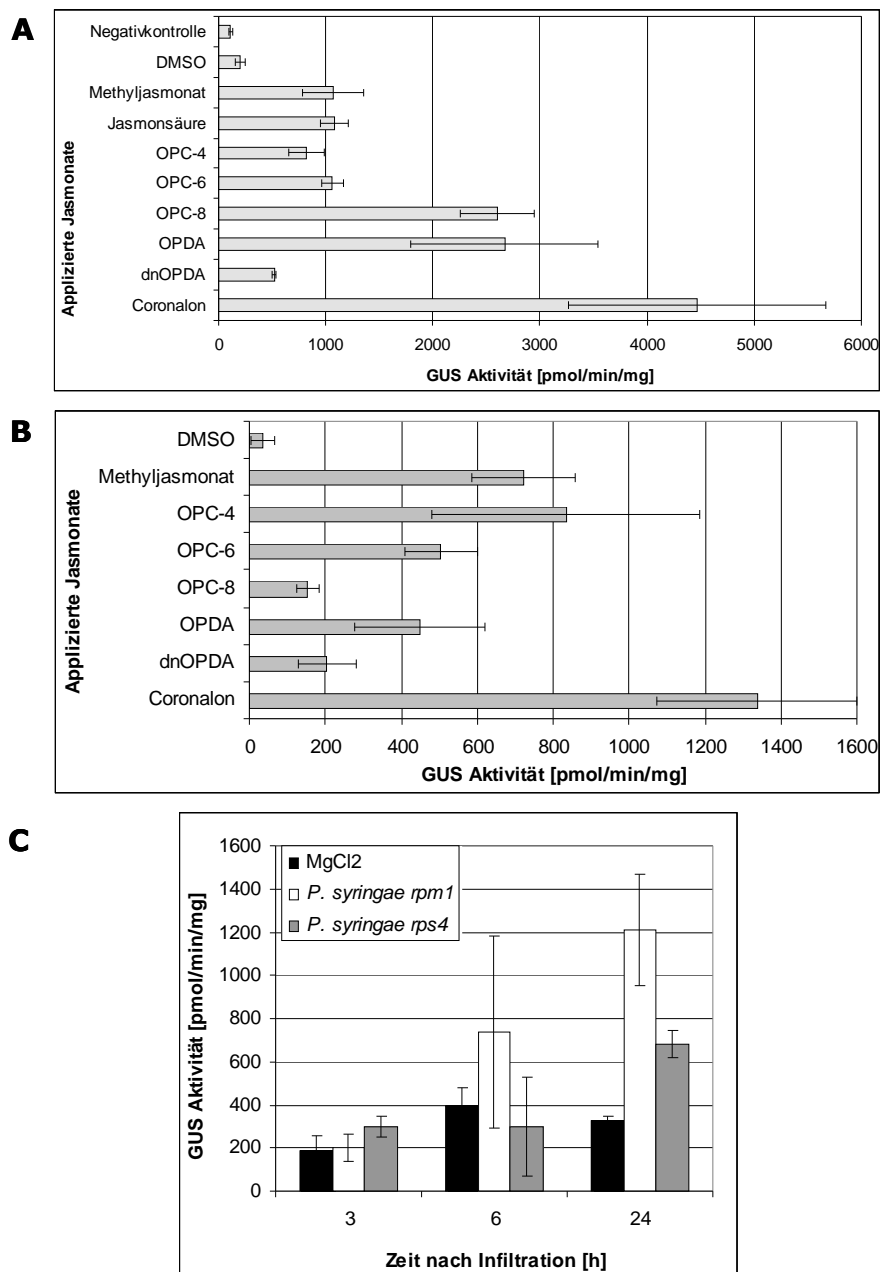
Im Folgenden wurde daher die Reaktion des Promotors auf unterschiedliche Jasmonate genauer untersucht (Abb. 23A). Dabei führten Jasmonsäure und die Vorstufen OPC-4 und OPC-6 zu einer Induktion der GUS-Expression in ungefähr der gleichen Höhe wie Methyljasmonat. Im Vergleich ergab die Applikation von dnOPDA eine schwächere Induktion der Expression. OPDA und OPC-8 zeigten allerdings eine deutlich stärkere Aktivierung der Genexpression als Methyljasmonat. Nur das synthetische Jasmonat Coronalon hatte eine noch stärkere Wirkung auf die GUS-Expression. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen der Charakterisierung des Substratspektrums von *At1g20510*, welche ergab, dass OPDA und OPC-8 die am effizientesten umgesetzten Jasmonsäurevorstufen sind (Kap. 3.2.1).

Zur Einordnung dieser Ergebnisse wurde eine weitere Reportergermlinie getestet (Abb. 23B), bei der das Reportergerm unter der Kontrolle des Promotor von *LOX2* steht (Jensen *et al.*, 2002). Das korrespondierende Genprodukt ist eine Lipoxygenase, die an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligt ist (Feussner *et al.*, 2002). Die Induzierbarkeit durch Jasmonate war interessanterweise unterschiedlich zu der der Reporterpflanzen von *At1g20510*. Die längerkettigen Jasmonsäurevorstufen OPDA und OPC-8 führten zu einer schwächeren Induktion als Methyljasmonat und OPC-4. Die stärkste Wirkung hatte wiederum das synthetische Jasmonat Coronalon. Die unterschiedliche Induzierbarkeit der Expression von *At1g20510* und *LOX2* durch OPDA/OPC-8 bzw. Methyljasmonat könnte auf Unterschiede in der Regulation zwischen chloroplastidären Enzymen, die am Anfang der Jasmonsäurebiosynthese stehen und den peroxisomal lokalisierten Enzymen hindeuten.

Um die Frage zu klären ob die Expression von *At1g20510* auch durch Pathogene induziert wird, wurden zwei Stämme des phytopathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* infiltriert (Abb.23C). Es zeigte sich, dass der Stamm *P. syringae avrRpm1* eine deutliche und der Stamm *P. syringae avrRps4* eine schwächere Aktivierung der Expression von *At1g20510* vermittelte. Die schwache Aktivierung der Expression durch die  $MgCl_2$ -Kontrolllösung auf die mechanische Verletzung der Pflanze beim Infiltrieren zurückzuführen ist.

Das Enzym *At1g20510* konnte als peroxisomal lokalisierte OPC-8:CoA-Ligase mit einem breiten Substratspektrum weiterer Jasmonsäurevorstufen identifiziert werden. Es wurde bestätigt, dass *At1g20510* an der Jasmonsäurebiosynthese in *A. thaliana* beteiligt ist und die

Genexpression in dem typischen positiven *Feedback*-Mechanismus durch Jasmonsäure aktiviert wird. Außerdem wird die Genexpression durch Verwundung sowie die Applikation von Jasmonaten und phytopathogenen Bakterien induziert.



**Abb. 23: Analyse der GUS-Expression in Reporterlinien von *At1g20510***

(A) Analyse der GUS-Expression in Linie 1-2 24 h nach Applikation verschiedener Jasmonate. (B) Analyse der GUS-Expression der Reporterlinie LOX2 24 h nach Applikation verschiedener Jasmonate. (C) Analyse der GUS-Expression in Linie 1-2 nach Infiltration phytopathogener *Pseudomonas* Stämme und einer MgCl<sub>2</sub>-Kontrolle, die Ernte erfolgte nach 3, 6, 24 h. DMSO: Dimethylsulfoxid (Negativkontrolle).

### 3.3 Detaillierte Charakterisierung der 4CLLs At4g05160 und At5g63380

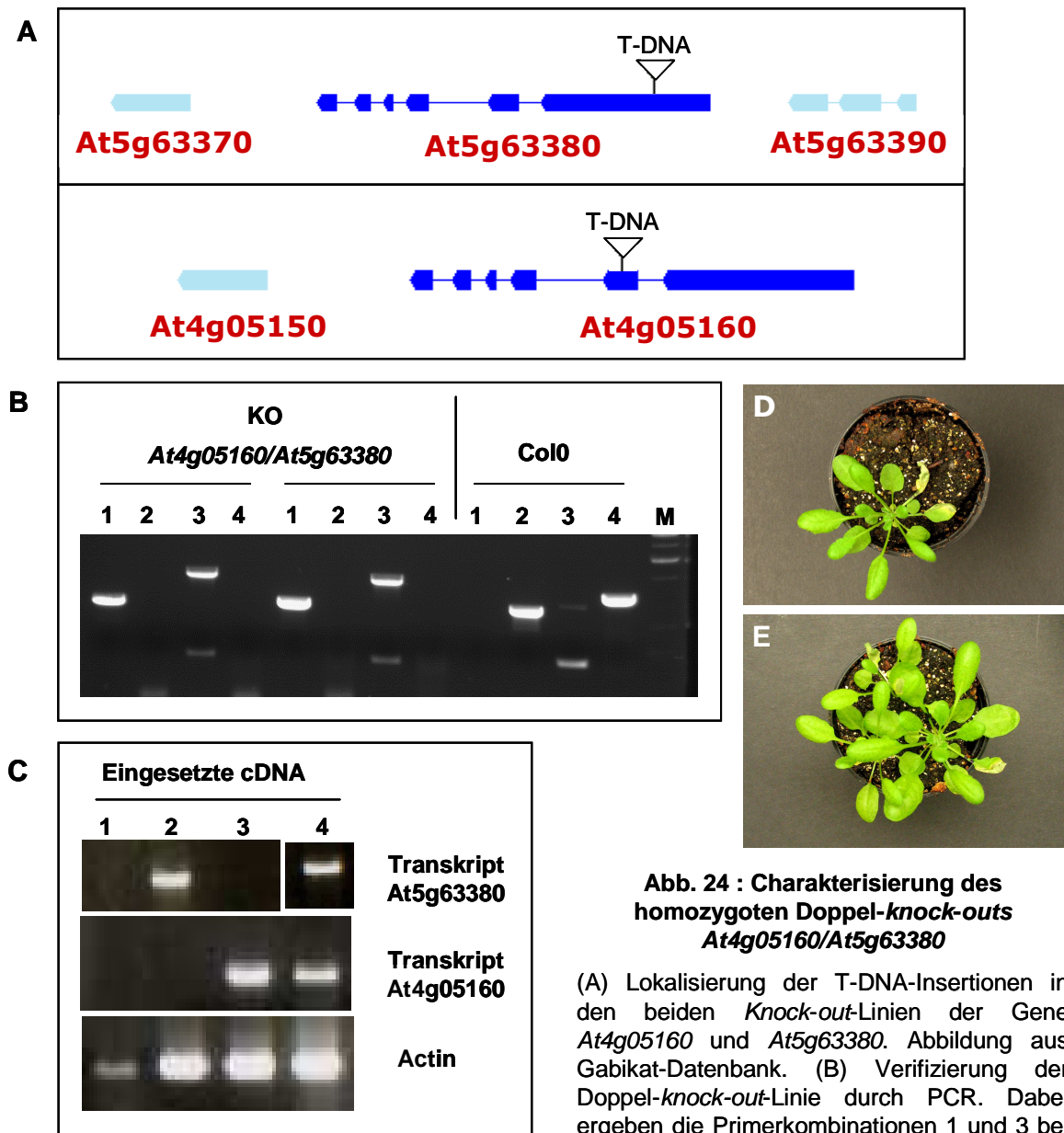
Die beiden homologen 4CLLs At5g63380 und At4g05160 wurden *in vitro* bereits weitreichend charakterisiert. Demnach setzt At4g05160 *in vitro* Fettsäuren, die Jasmonsäurevorstufen OPDA und OPC-6 und die Auxine IBA und 2,4-DB um, wobei es die höchste katalytische Effizienz mit der Fettsäure Nonansäure aufweist (teilweise Doktorarbeit K. Schneider). Das Enzym At5g63380 aktiviert *in vitro* Fettsäuren und OPDA. Die höchste katalytische Effizienz ergibt sich mit dem Cyclopentenon OPDA (Diplomarbeit L. Kienow).

Die tatsächliche *in vivo*-Funktion ist jedoch bislang unbekannt. Wie in Kap. 3.2.4.1 beschrieben konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung beider Enzyme an der Jasmonsäurebiosynthese ausgeschlossen werden. Aus dem *in vitro*-Substratspektrum und der peroxisomalen Lokalisierung ergibt sich jedoch die Möglichkeit, dass die Enzyme bei der Aktivierung von Fettsäuren und/oder Auxinen für die  $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana* eine Rolle spielen. Daher wurden diese Stoffwechselwege in Einzel- und Doppelmutanten von At4g05160 und At5g63380 einer genauen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

#### 3.3.1 Die Erstellung und makroskopische Charakterisierung von Einzel- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen von At4g05160 und At5g63380 und der entsprechenden Komplementationslinien

Zur Aufklärung der *in vivo*-Funktion der beiden Enzyme At4g05160 und At5g63380 wurden die Linien At4g05160 SALK\_050214 und At5g63380 SALK\_003233 aus der Kollektion des SALK-Instituts verwendet. Diese wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit (L. Kienow) als Einzel-Insertionslinien charakterisiert. Ein makroskopischer Unterschied zwischen den Einzelinsertionslinien und der entsprechenden Wildtyppflanze konnte dabei nicht festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus den Einzelmutanten eine homozygote Doppel-*knock-out*-Linie der beiden Gene erstellt und über PCR-Analysen verifiziert. Wie in Abb. 24B zu sehen ist wurden Pflanzen identifiziert, die nur die T-DNA-Allele beider Gene, nicht jedoch die nativen Allele enthielten. Somit war die Erzeugung der homozygoten Doppel-*knock-out*-Pflanzen At4g05160/At5g63380 erfolgreich.

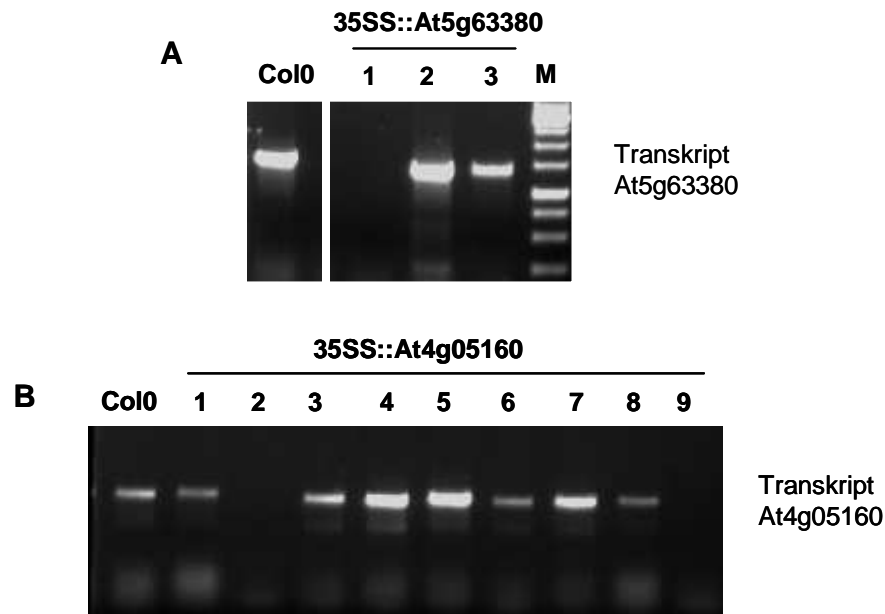


**Abb. 24 : Charakterisierung des homozygoten Doppel-knock-outs *At4g05160/At5g63380***

(A) Lokalisierung der T-DNA-Insertionen in den beiden *Knock-out*-Linien der Gene *At4g05160* und *At5g63380*. Abbildung aus Gabikat-Datenbank. (B) Verifizierung der Doppel-*knock-out*-Linie durch PCR. Dabei ergeben die Primerkombinationen 1 und 3 bei einem *Knock-out*-Allel ein Produkt, die Kombinationen 2 und 4 bei einem Wildtypallel. M: Marker. (C) Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Analyse der Transkriptlevel in Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen. Dabei enthielt Ansatz 1 cDNA des Doppel-*knock-outs*, Ansatz 2 cDNA des Einzel-*knock-outs* *At4g05160*, Ansatz 3 cDNA des Einzel-*Knock-outs* *At5g63380* und Ansatz 4 cDNA von Col0. (D) Wildtyppflanze. (E) Doppel-*Knock-out*-Linie *At4g05160/At5g63380*. Abbildung A entstammt der Gabikat-Datenbank und wurde modifiziert.

Pflanzen der Doppel-*knock-out*-Linie wurde auch auf das Vorhandensein von Transkript der beiden ausgeschalteten Gene untersucht. Dargestellt ist das Ergebnis einer Analyse der cDNA durch PCR (Abb. 24C). Offensichtlich kann die Doppel-*knock-out*-Linie als Nullmutante betrachtet werden, da weder Transkript von *At4g05160* noch von *At5g63380* detektiert werden konnte. Die Doppel-*knock-out*-Linie zeigte jedoch, genau wie die jeweiligen Einzel-*knock-out*-Pflanzen, unter Standardbedingungen keinen makroskopischen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Abb. 24D/E). Im Folgenden wurden daher sowohl die Einzelinsertionslinien als auch die Doppelininsertionslinie mit biochemischen, physiologischen und molekularbiologischen Methoden genauer untersucht.

Zunächst soll jedoch die Erstellung der Komplementationspflanzen dieser Doppel-*knock-out*-Linie beschrieben werden. Hierzu wurde die jeweils die cDNA von *At4g05160* oder *At5g63380*



**Abb. 25: Nachweis der spezifischen Transkripte in Komplementationslinien des Doppel-Knock-outs *At4g05160/At5g63380***

Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der jeweiligen cDNA der Komplementationslinien 35SS:At5g63380 bzw. 35SS:At4g05160. Es wurden Primerkombinationen eingesetzt, die zu einer Amplifikation der cDNA von entweder (A) *At5g63380* oder (B) *At4g05160* führen. Die Pflanzen 2 und 3 der Komplementationslinien 35SS:At5g63380 sowie die Pflanzen 1, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 der Komplementationslinien 35SS:At4g05160 zeigen wieder Transkript. Es handelt sich um Pflanzen der ersten Generation. M: Marker

unter der Kontrolle des doppelten CaMV35S-Promotors in Pflanzen der Doppel-*knock-out*-Linie überexprimiert (Kap. 2.1.7/2.2.4.7). Die Komplementation ist in einigen Fällen erfolgreich verlaufen. Dargestellt sind die Ergebnisse von PCR-Analysen der Pflanzen zum Nachweis der Transkriptmengen von *At4g05160* (Abb. 25B) und *At5g63380* (Abb. 25A). Hierbei konnten in beiden Fällen mehrere komplementierte Doppel-*knock-out*-Pflanzen identifiziert werden, die wieder eine nachweisbare Menge an Transkript von *At5g63380* bzw. *At4g05160* enthielten.

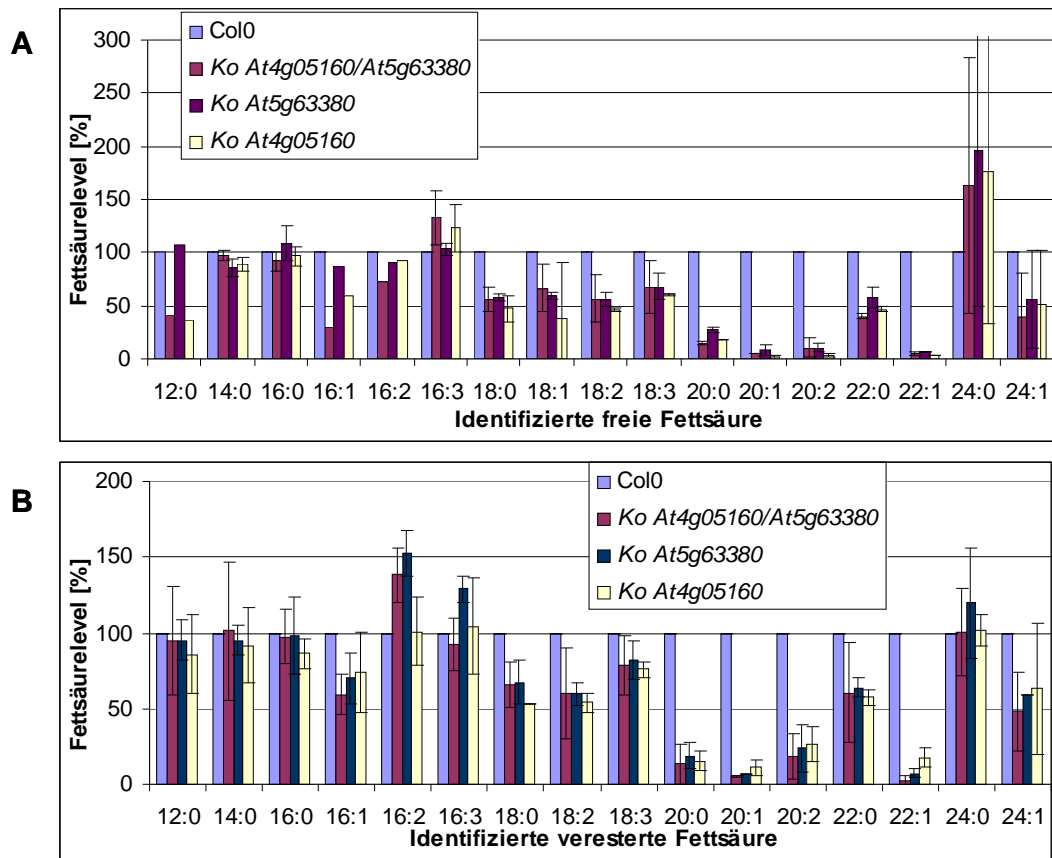
### 3.3.2 Die Funktion von *At4g05160* und *At5g63380* in der $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren

#### 3.3.2.1 Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Einzel- und Doppel-*knock-out*-Linien von *At4g05160* und *At5g63380*

Zunächst wurde eine Analyse der Fettsäurekomposition in Einzel- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen von *At4g05160* und *At5g63380* im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen für 13 Tage in Flüssigmedium unter Dauerlicht angezogen und anschließend die Mengen an freien und veresterten Fettsäuren analysiert (Kap. 2.2.4.1.2/2.2.4.5) Die Ergebnisse sind in Abb. 26A/B zu sehen. Die Mengen an Fettsäuren der Kettenlängen C20:0, C20:1, C20:2, C22:0 und C22:1 waren in allen getesteten *Knock-out*-Linien signifikant gegenüber dem Wildtyp erniedrigt. Weitere Fettsäuren wie C12, C16:1, C18:0, C18:2 und C18:3 lagen ebenfalls in reduzierten Mengen in den *Knock-out*-Pflanzen vor. Dies gilt sowohl für die freien, wie auch für die veresterten Fettsäuren. Des Weiteren machte es offenbar keinen Unterschied ob jeweils eines oder beide Gene ausgeschaltet sind. Der Befund, dass der *Knock-out* der Gene zu einer Reduktion der Fettsäuregehalte führte ist interessant, da durch das Fehlen von Enzymen, die den Abbau der Fettsäuren einleiten, eigentlich eine Akkumulation der potentiellen Substrate zu erwarten gewesen wäre.

Des Weiteren wurden fünf Wochen alte Pflanzen, die unter Standardbedingungen aufgezogen wurden, untersucht (Kap.2.2.4). Hier zeigte sich ein deutlich abgeschwächter, biochemischer Phänotyp. Die Mengen der sehr-langkettigen Fettsäuren ab einer Kettenlänge von C20 hatten sich in den *Knock-out*-Pflanzen normalisiert. Sie entsprachen nun dem Wildtyp. Ein Unterschied zeigte sich im Gehalt der freien Fettsäure C16:3, der in den Einzel- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen auf ca. 50 % des Wildtypgehalts abgesenkt war (Abb. 27A). Leichte

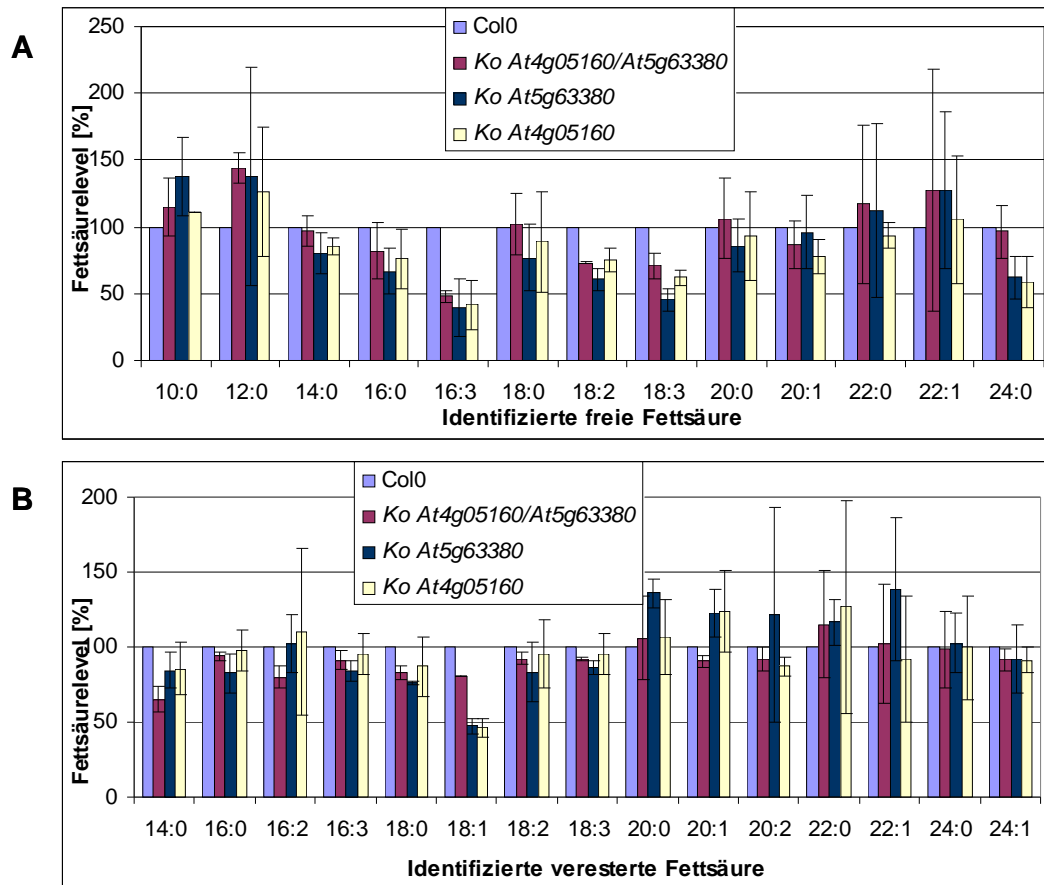




**Abb. 26: Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in 13 Tage alten Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen**

Dargestellt sind die relativen Fettsäuremengen in 13 Tage alten Wildtyp- und *Knock-out*-Linien. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out*-Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie den Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*. (A) Bestimmung der Level an freien Fettsäuren. (B) Bestimmung der Level an veresterten Fettsäuren.

Differenzen zum Wildtyp wiesen auch die Level der Fettsäuren C18:0, C18:2 und C18:3 auf. Diese Unterschiede zeigten sich aber nur noch bei den freien Fettsäuren. Die Mengen der veresterten Fettsäuren der *Knock-out*-Pflanzen entsprachen denen des Wildtyps (Abb. 27B). Die Bestimmung der Fettsäuremengen in *Knock-out*-Linien beider Gene scheint auf eine Störung des Fettsäurestoffwechsels und daher eine Beteiligung beider Enzyme an diesem hinzudeuten. Daher wurden in weiteren Versuchen pflanzliche Prozesse, die von einem funktionalen Fettsäuremetabolismus abhängig sind, untersucht.

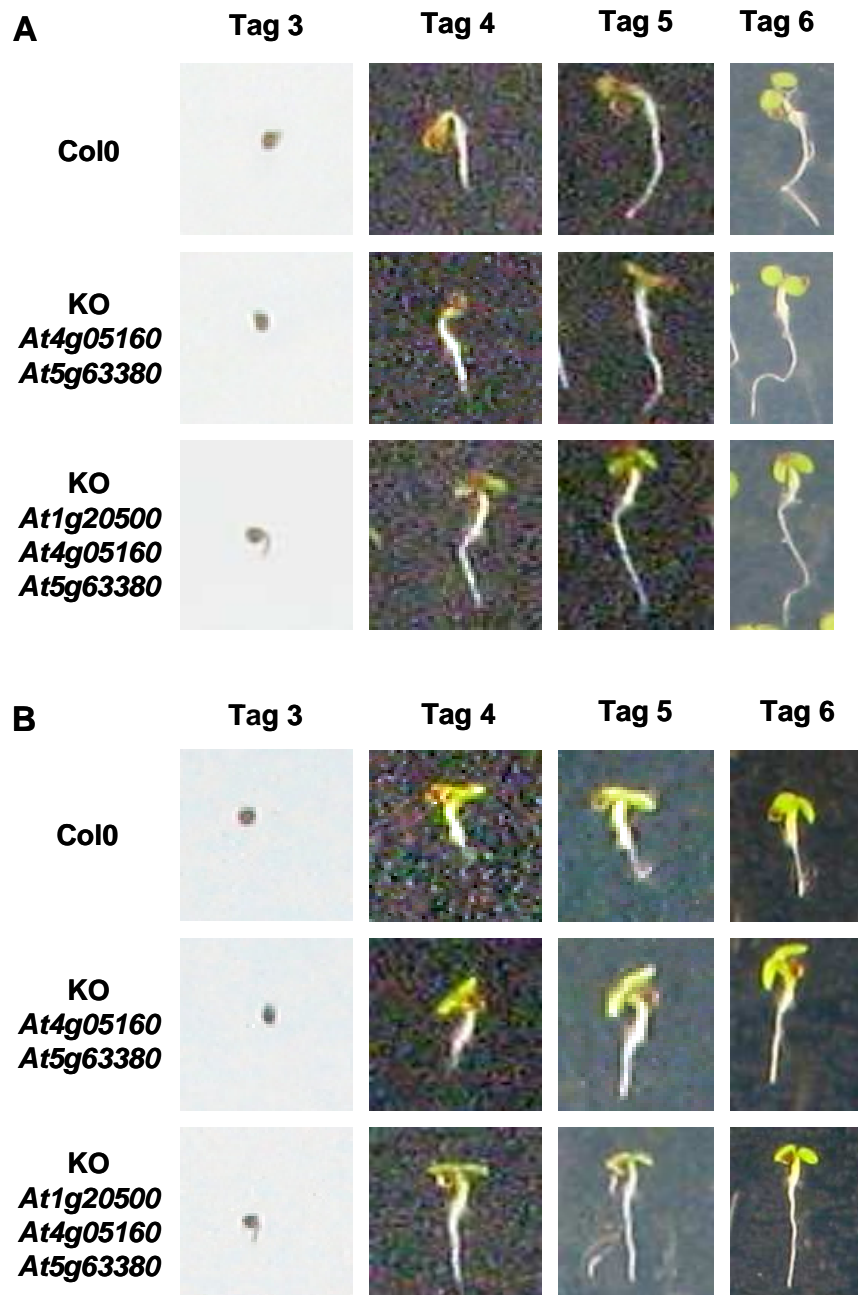


**Abb. 27: Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in 35 Tage alten Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen**

Dargestellt sind die relativen Fettsäurelevel in 35 Tage alten Wildtyp- und *Knock-out*-Linien. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out*-Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie den Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*. (A) Bestimmung der Level an freien Fettsäuren. (B) Bestimmung der Level an veresterten Fettsäuren.

### 3.3.2.2 Analyse der Speicherlipide in Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160/ At5g63380*

Für Triglyzeride speichernde Pflanzen wie *A. thaliana* ist die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, vor allem von Eicosensäure (C20:1), essentiell zur Energiegewinnung während der Entwicklung des Keimlings. Da die Analyse der Fettsäurekomposition eine starke Verminderung der Menge von C20:1 in der Doppel-*knock-out*-Linie der Gene *At4g05160/At5g63380* im Vergleich zum Wildtyp ergab, wurde ein möglicher Einfluss des Defektes von *At4g05160* und *At5g63380* auf



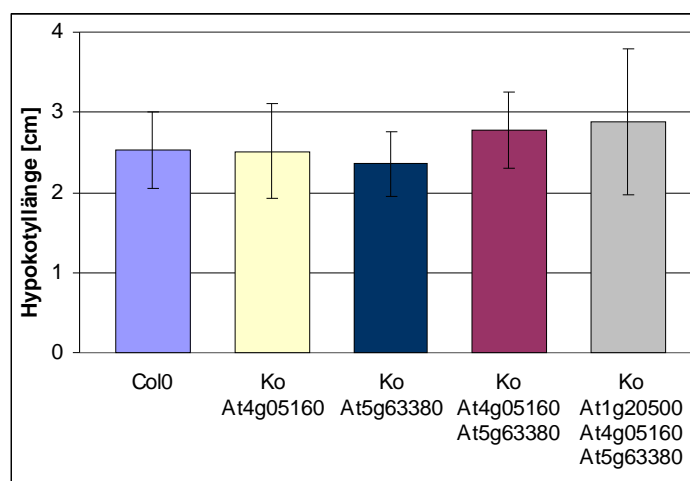
**Abb. 28: Zeitreihe der Entwicklung von Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen**

Dokumentiert ist der Entwicklungsverlauf von Tag drei nach der Aussaat bis Tag sechs. Es handelt sich um Wildtyppflanzen, sowie um Pflanzen des Doppel-*Knock-outs* *At4g05160/At5g63380* und des Tripel-*Knock-outs* *At1g20500/At4g05160/At5g63380*. (A) Pflanzen mit Zucker im Medium. (B) Pflanzen ohne Zucker im Medium.

die Keimungsfähigkeit untersucht. Da die *in vitro*-Analysen des Enzyms *At1g20500* ergaben, dass dieses ebenfalls Fettsäuren umsetzen kann, wurde zusätzlich der Tripel-*knock-out* *At1g20500/At4g05160/At5g63380* untersucht, dessen Charakterisierung in Kapitel 3.2.4 näher beschrieben ist.

Zunächst wurde der Wildtyp, die Doppel-*knock-out*-Linie *At4g05160/At5g63380* und die Tripel-*knock-out*-Linie *At1g20500/At4g05160/At5g63380* in Medium ohne Kohlenstoffquelle unter Licht angezogen (Kap. 2.2.4.1.5). In Abb. 28 ist die zeitliche Entwicklung der Keimung und des Wachstums der Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen dargestellt. Es konnten keine Unterschiede im Keimungs- und Wachstumsverhalten von Wildtyp und den *Knock-out*-Linien festgestellt werden. In Gegenwart von Zucker im Medium war die Entwicklung der Keimlinge beschleunigt, ein offensichtlicher Unterschied zwischen den Linien war aber nicht zu beobachten (Abb. 28A).

Um mögliche Einflüsse durch Photosynthese auszuschließen, wurde das Experiment in Dunkelheit wiederholt. In diesem Fall sind die Pflanzen vollständig auf den Abbau der Speichertriglyceride zur Energiegewinnung angewiesen, was die Sensitivität des Experimentes



**Abb. 29: Hypokotyllänge etiolierter Wildtyp- und *Knock-out* Keimlinge**

Dargestellt ist die durchschnittliche Länge der Hypokotyle etiolierter, sechs Tage alter Keimlinge. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out* Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie des Doppel-*Knock-outs* *At4g05160/At5g63380* und Tripel-*Knock-outs* *At1g20500/At4g05160/At5g63380*.

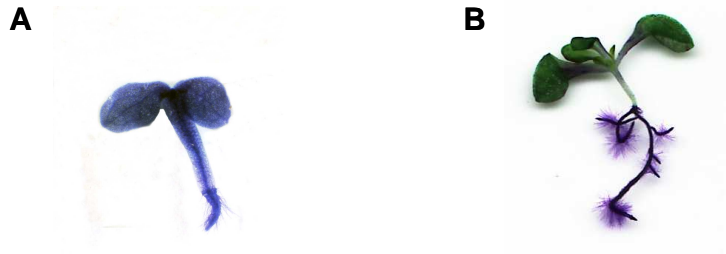
gegenüber Veränderungen bei der Mobilisierung der Speicherlipide erhöhen sollte. Die Längen der Hypokotyle etiolierter, sechs Tage alter Keimlinge der Pflanzen der Einzel- und Doppel-*knock-out*-Linien wiesen keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 29) und bestätigten daher das Ergebnis des Experiments unter Lichteinfluss. Offenbar besitzen die *Knock-out*-Pflanzen weder Veränderungen in der Menge der Speicherlipide, noch Defekte in der Bereitstellung aktivierter Fettsäuren zur Energiegewinnung während der Keimung. Eine Beteiligung der Enzyme At4g05160 und At5g63380 im Keimungsgeschehen ist daher unwahrscheinlich.

### 3.3.2.3 Analyse der Strukturlipide in Doppel-*knock-out*-Pflanzen At4g05160/At5g63380

Eine weitere, zentrale Rolle spielen Fettsäuren für den Aufbau der pflanzlichen Kutikula. Diese besteht hauptsächlich aus Wachsen, die sich aus sehr langkettigen Fettsäuren der Kettenlängen C26 bis C32 ableiten. Diese werden wiederum durch Kettenverlängerung von C16- oder C18-Fettsäuren im Stoffwechsel der Pflanze synthetisiert. Da die *Knock-out*-Pflanzen von At4g05160 und At5g63380 verminderte interne Konzentrationen der C16- oder C18-Fettsäuren aufwiesen, wurde eine mögliche Veränderung der Kutikulazusammensetzung dieser Linie untersucht.

Dafür wurden Doppel-*knock-out*- und Wildtyppflanzen einer Kutikulafärbung mit Toluidin-Blau unterzogen (Kap.2.2.4.1.2/2.2.4.3). Dieser Farbstoff färbt ausschließlich Pflanzenteile, die nicht durch eine Kutikula geschützt sind (Tanaka *et al.*, 2004). Die Untersuchung einwöchiger Pflanzen, die in Flüssigmedium unter Dauerlicht mit bzw. ohne Zucker angezogen wurden, ergab keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit ist die Wachszusammensetzung der Kutikula vom Ausfall der enzymatischen Aktivität von At4g05160 und At5g63380 nicht beeinflusst.

Darüber hinaus gehend konnte eine interessante Beobachtung in diesem Experiment gemacht werden. Es zeigte sich, dass Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen, die in Medium ohne Zucker angezogen wurden, keine Kutikula entwickelt hatten. Die Oberfläche des gesamten Pflanzenkörpers war durch die Einlagerung des Farbstoffs Toluidin-Blau eingefärbt. Im Gegensatz dazu waren Pflanzen, die eine Woche in Zucker haltigem Medium aufwuchsen, deutlich weiter entwickelt und hatten an den oberirdischen Organen eine Kutikula ausgebildet (Abb. 30). Die Messungen der Fettsäurezusammensetzung (Kapitel 3.3.2.1) der 13 Tage alten



**Abb. 30: Kutikularfärbung von Col0-Keimlingen**

Dargestellt sind zwei sieben Tage alte Keimlinge, die (A) ohne Zucker oder (B) mit Zucker in Flüssigmedium unter Dauerbelichtung aufgezogen wurden.

Pflanzen wurden an Pflanzen durchgeführt, die ohne Zucker kultiviert wurden, d.h. genau unter den Bedingungen, die zum Fehlen der Kutikula führten. Somit ist es möglich Prozesse, die dem peroxisomal lokalisierten Abbau der Fettsäuren zugeordnet werden, getrennt von denen der Kutikulasynthese zu analysieren.

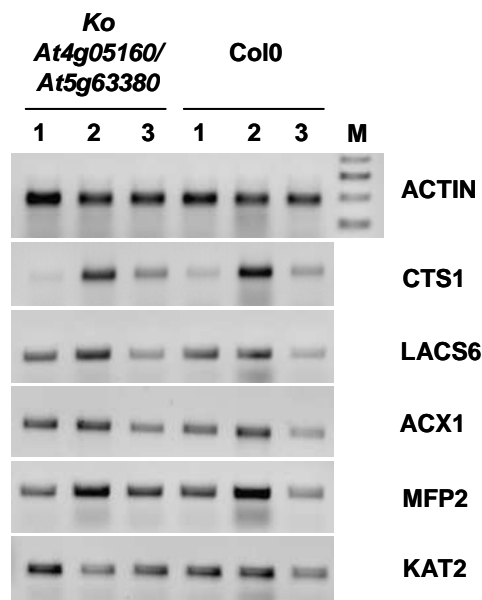
#### **3.3.2.4 Expressionsanalyse der Markergene des Fettsäuremetabolismus in Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160* /*At5g63380***

Um weitere Anhaltspunkte auf die Funktion der beiden Enzyme im Fettsäurestoffwechsel von *A. thaliana* zu erhalten, wurde die Expression von Markergenen des peroxisomalen Fettsäuremetabolismus in Wildtyp- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160/At5g63380* mittels semiquantitativer PCR analysiert (Kap. 2.2.1.4). Als Markergene wurden solche ausgewählt, deren Genprodukte bereits als Enzyme des Fettsäurestoffwechsels charakterisiert wurden. Dazu zählen der Fettsäuretransporter CTS1, die Acyl-CoA-Synthetase LACS6, die Acyl-CoA-Oxidase ACX1, das Multifunktionsproteins MFP2 und die Thiolase KAT2 (Footitt *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2002 und 2004; Eastmond *et al.*, 2000; Rylott *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 1996; Germain *et al.*, 2001; Adham *et al.*, 2005; Pinfield-Wells *et al.*, 2005). Außerdem diente  $\beta$ -Actin zur Transkriptquantifizierung. Als Pflanzenmaterial wurden Wildtyp- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen eine bzw. zwei Wochen in Flüssigmedium mit bzw. ohne Zucker angezogen (Kap.2.2.4.1.2). Die Ergebnisse der PCR sind in Abb. 31 zu sehen. Es zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsprofil der Markergene zwischen gleich aufgezogenen Pflanzen des Wildtyps und des Doppel-*knock-outs*. Ein weiterer Hinweis auf eine

Beteiligung von At4g05160 und At5g63380 am Fettsäurestoffwechsel von *A. thaliana* konnte somit nicht gefunden werden.

Es wurde jedoch für Wildtyp und für Doppel-*knock-out*-Pflanzen gleichermaßen eine verstärkte Expression der Markergene in Pflanzen, die in zuckerhaltigem Medium aufgewachsen waren, festgestellt. Dies deutet auf eine zeitlich verzögerte Expression der Markergene hin. Normalerweise ist der Abbau der Speicherlipide nach fünf Tagen abgeschlossen. In Anwesenheit von Zucker als Energiequelle verwerten die Pflanzen jedoch zuerst den Zucker und beginnen dann mit dem Abbau der Speichertriglyzeride.

Die aus den *in vitro*-Versuchen und der Komplementationsstudie gewonnenen Daten, sowie die biochemische Analyse der Fettsäurezusammensetzung der *Knock-out*-Pflanzen von At4g05160 und At5g63380 deuten also auf eine Beteiligung am Fettsäurestoffwechsel in *A. thaliana* hin. Doch konnte bislang kein spezifischer Prozess identifiziert werden, der durch das Fehlen der beiden enzymatischen Aktivitäten beeinflusst wird. Deshalb werden zunächst mögliche Defekte in weiteren  $\beta$ -Oxidationsprozessen in *A. thaliana* untersucht.



**Abb. 31: RT-PCR zur Analyse von Markergenen des Fettsäureabbaus in Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen**

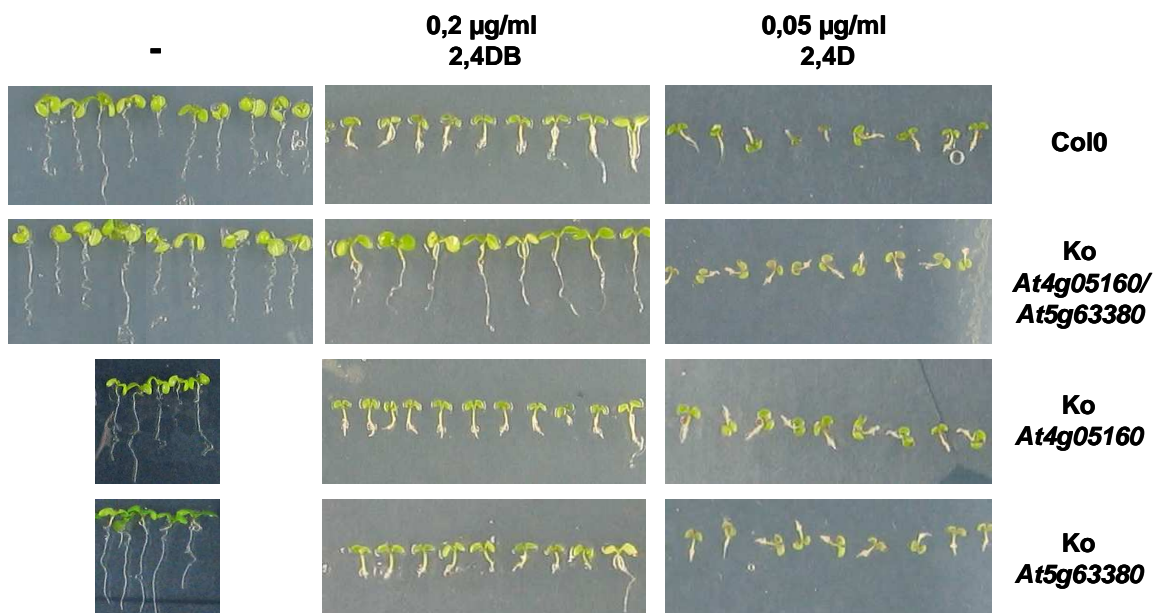
Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, die mit genspezifischen Primern für Actin, CTS1, LACS6, ACX1, MFP2 und KAT2 amplifiziert wurden. Es wurde Wildtyp- und Doppel-*Knock-out*-Pflanzenmaterial eingesetzt. Diese wurden unter gleichen Bedingungen angezogen: 1. 14 Tage alte Pflanzen. 2. Sieben Tage alte Pflanzen in zuckerhaltigem Medium angezogen. 3. Sieben Tage alte Pflanzen in Standardmedium ohne Zucker angezogen. M:Marker

### 3.3.3 Auxine

#### 3.3.3.1 Die Beteiligung von At4g05160 und At5g63380 an der $\beta$ -Oxidation synthetischer Auxine

Zur Analyse der  $\beta$ -Oxidation in Pflanzen werden üblicherweise synthetische Auxine wie 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (2,4-DB) eingesetzt. 2,4-DB ist ein Pro-Hormon, das durch eine intakte  $\beta$ -Oxidation zum aktiven Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) verkürzt wird. Die Wirkung von 2,4-D führt dann zu einer Hemmung des Wurzelwachstums der Pflanze. Auf diese Weise können Mutanten mit einer Störung in der  $\beta$ -Oxidation von anderen Pflanzen mit intakter  $\beta$ -Oxidation durch eine Analyse der Wurzellänge nach Wachstum auf 2,4-DB identifiziert werden (Wain *et al.*, 1954; Hayashi *et al.*, 1998).

Daher wurden Einzel- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen von *At4g05160* und *At5g63380* acht Tage auf Medium mit und ohne 2,4-D bzw. 2,4-DB-Zusatz angezogen (Kap.2.2.4.1.4). Alle getesteten Linien zeigten auf auxinfreiem Medium das gleiche, ungestörte Wachstum mit langer Wurzellänge (Abb. 32). In Gegenwart von 2,4-D zeigten alle Pflanzen eine starke



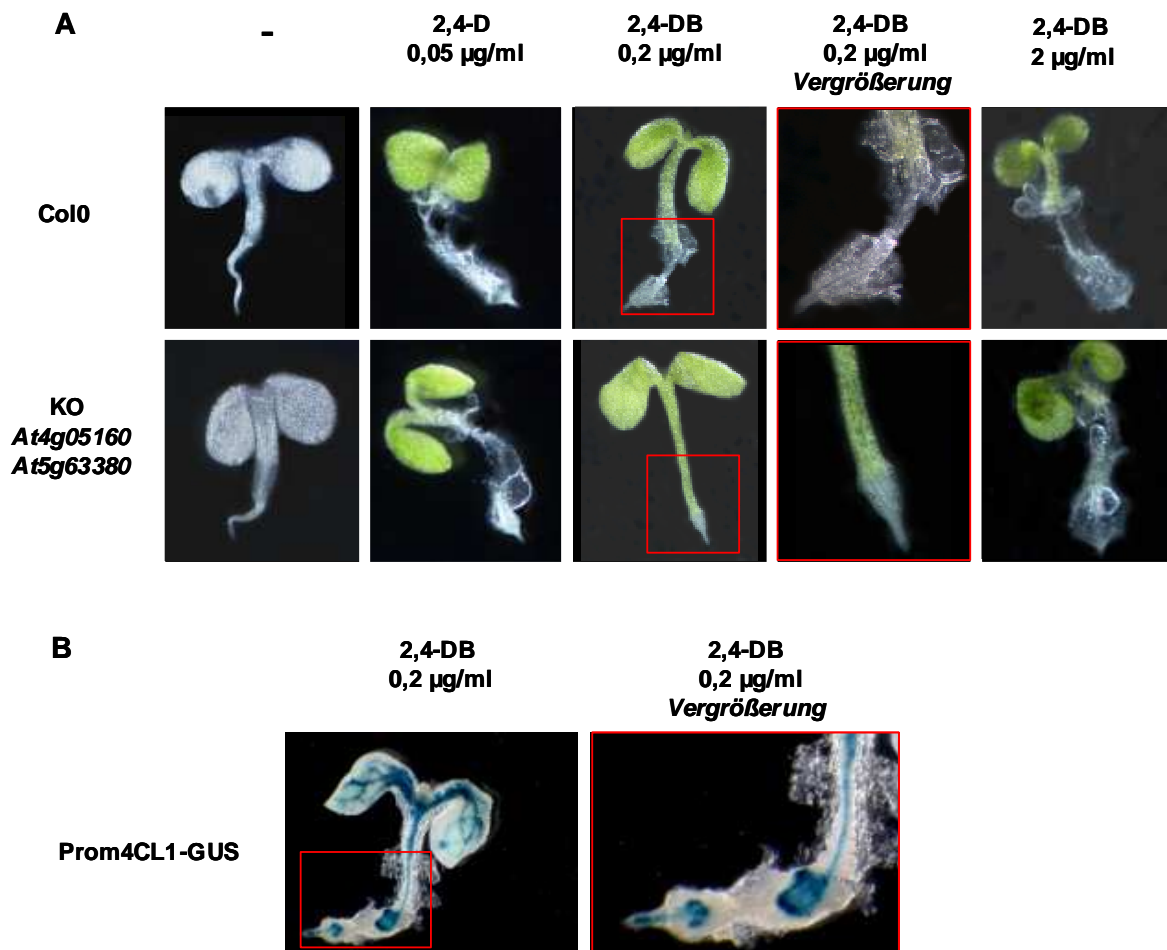
**Abb. 32: Reaktion von Wildtyp- und Knock-out Pflanzen auf externe, synthetische Auxine**

Dargestellt sind acht Tage alte Pflanzen des Wildtyps, sowie der Linien *At4g05160* SALK\_050214, *At5g63380* SALK\_003233 und des Doppel-*knock-outs* *At4g05160/At5g63380*. Diese wurden entweder auf Standard-MS-Medium angezogen oder auf MS-Medium mit 2, 4-D bzw. 2, 4-DB.



Wachstumshemmung, die sich vor allem im Wurzelbereich deutlich erkennen lässt. Wurden die Pflanzen dagegen auf 2,4-DB haltigem Medium angezogen, so zeigten die Einzel-*knock-out*-Linien von *At4g05160* und *At5g63380* und der Wildtyp eine starke Hemmung des Wurzelwachstums, die innerhalb der Population leicht variierte. Im Gegensatz dazu zeigten alle Pflanzen der Doppel-*knock-out*-Linie *At4g05160/At5g63380* eine Resistenz gegenüber der Wirkung des Pro-Auxins 2,4-DB. Sowohl die Blattentwicklung als auch die Wurzelentwicklung waren deutlich weniger beeinflusst als dies beim Wildtyp und den Einzel-*knock-out*-Linien der Fall war. Offensichtlich ist in der Doppel-*knock-out*-Linie *At4g05160/At5g63380* die  $\beta$ -Oxidation soweit gestört, dass 2,4-DB nicht mehr in 2,4-D umgesetzt werden kann.

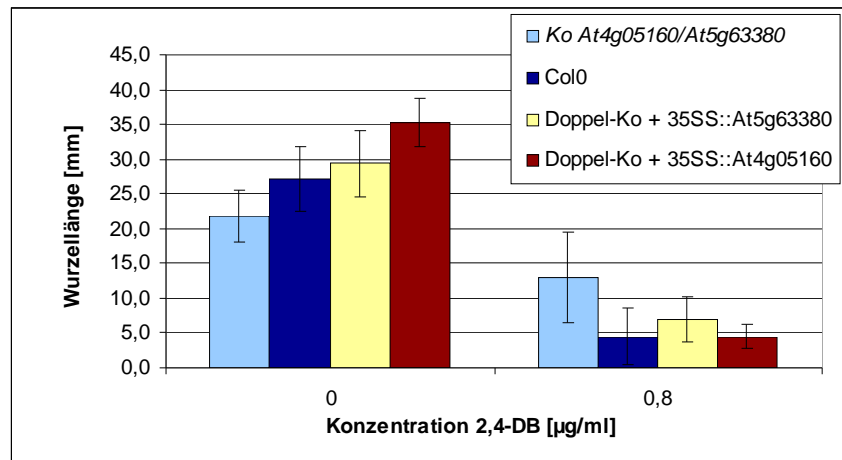
Zur Verifizierung der auf Festmedium erhaltenen Ergebnisse wurden die Anzuchtbedingungen variiert und die Pflanzen für zwei Wochen unter Dauerlicht in Flüssigmedium angezogen (Kap. 2.2.4.1.2). Auch dieses Medium war mit den entsprechenden Auxinen versetzt. Zunächst zeigte sich überraschenderweise ein anderer Habitus der Pflanzen (Abb. 33). Sie wirkten klein und bildeten auch in auxinfreiem Medium keine deutliche Wurzel aus. Dies resultierte höchstwahrscheinlich aus den Stressbedingungen während der Aufzucht, die durch die Dauerlichtbestrahlung in Flüssigmedium verursacht wurden. Eine Behandlung dieser Pflanzen mit 2,4-D führte zu einem nicht mehr intakten Hypokotyl (Abb. 33). Um zu analysieren, ob sich die Zerstörung nur auf die Epidermis oder auch auf das Leitgewebe der Pflanze auswirkte, wurden Reportergermpflanzen analysiert, bei denen das Leitgewebe durch Färbung sichtbar gemacht werden kann. Die Pflanzenlinie exprimiert das GUS-Reportergerm unter dem Xylem spezifischen Promotor von *4CLI* (Serrano *et al.*, 2007). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass nach Wachstum der Pflanzen in Auxin haltigem Medium neben der Epidermis auch das Leitgewebe der Pflanze zerstört war (Abb. 33B). Möglichweise resultierte dies aus einem zu starken Wachstum bestimmter Zellen unter Auxinwirkung. Wie bei den Versuchen mit Festmedium war eine deutliche Resistenz des Doppel-*knock-outs* *At4g05160/At5g63380* gegen 2,4-DB zu beobachten. Diese Pflanzen glichen unbehandelten Kontrollpflanzen, während der Wildtyp ein gestörtes Hypokotylwachstum unter 2,4-DB-Einfluß aufwies. Wurde jedoch die Konzentration von 2,4-DB im Medium auf 2  $\mu\text{g/ml}$  gesteigert, verloren die Doppel-*knock-out*-Pflanzen ihre Resistenz, sie entsprachen dem Phänotyp des Wildtyps.



**Abb. 33: Reaktion von Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen auf synthetische Auxine in Flüssigmedium**

A: Dargestellt sind Wildtyppflanzen (Col0) und Pflanzen des Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*, die 7 Tage unter Dauerbelichtung in Flüssigmedium aufgezogen wurden. Das Anzuchtmedium wurde entweder in reiner Form (-) eingesetzt oder mit den angegebenen Mengen der synthetischen Auxine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) bzw. 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (2,4-DB) versetzt. Die Pflanzen, die in reinem Medium angezogen wurden, wurden vor Aufnahme des Bildes entfärbt. B: Dargestellt ist die Reportergermlinie 4CL1-Prom-GUS nach Wachstum in 2,4-DB-haltigem Medium und darauf folgender GUS-Färbung.

Wurden Komplementationspflanzen des Doppel-*knock-outs* *At4g05160/At5g63380* (Kap. 3.3.1), die wieder Transkript von *At4g05160* oder *At5g63380* enthielten und somit einem Einzel-*knock-out* entsprachen, auf festem MS-Medium mit 0,8 µg/ml 2,4-DB ausgelegt, so glich der Phänotyp dieser Pflanzen dem des Wildtyps (Abb. 34). Sie entwickelten annähernd keine Wurzel und waren wieder sensitiv gegen das Pro-Auxin 2,4-DB. Die durch einen Doppel-



**Abb. 34: Reaktion der Komplementationpflanzen auf 2,4-DB**

Dargestellt ist die Wurzellänge von 14 Tage alten Pflanzen, die auf Medium ohne oder mit 2,4-DB wuchsen. Getestet wurden Wildtyp, Doppel-Knock-out *At4g05160/At5g63380* und Doppel-knock-out-Pflanzen, die durch Überexpression von *At5g63380* bzw. *At4g05160* komplementiert wurden.

*knock-out* von *At4g05160* und *At5g63380* hervorgerufene Resistenz kann also durch eine homologe Expression der Gene kompensiert werden.

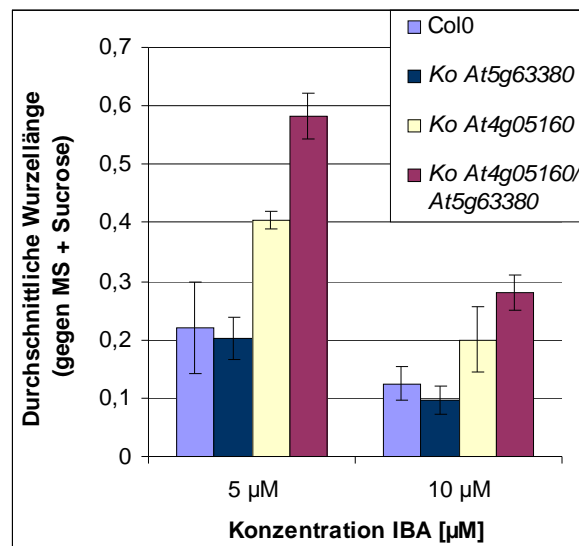
Somit besitzt die Doppel-knock-out-Linie durch das Fehlen der enzymatischen Aktivität von *At4g05160* und *At5g63380* einen Defekt in der Aktivierung synthetischer Auxine. Dies entspricht der schwachen, aber nachweisbaren Aktivität dieser 4CLs unter *in vitro*-Bedingungen (Kap. 3.3.3.4).

### 3.3.3.2 Die Beteiligung von *At4g05160* und *At5g63380* an der $\beta$ -Oxidation natürlicher Auxine

Das stärkste, natürliche Auxin in der Pflanze ist Indoleessigsäure (IAA), die in der Pflanze am häufigsten in Form von Aminosäure- oder Zucker-Konjugaten vorliegt (Slovin *et al.*, 1999). Daneben enthalten Pflanzen auch Indolbuttersäure (IBA), sowie deren Konjugate (Ludwig-Müller *et al.*, 1993). Zur Umwandlung von IBA in die aktive Hauptform IAA muss die Seitenkette von IBA durch  $\beta$ -Oxidation um eine C<sub>2</sub>-Einheit verkürzt werden, was die Aktivität einer IBA:CoA-Ligase erfordert. Diese Enzyme konnte bislang nicht identifiziert werden. Im Folgenden wurde überprüft, ob *At4g05160* und *At5g63380*, analog zu ihrer Rolle bei der  $\beta$ -Oxidation des synthetischen Auxins 2,4-DB, auch an der Aktivierung von IBA beteiligt sind.

### 3.3.3.2.1 Analyse der Resistenz der Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160/At5g63380* gegen externe, natürliche Auxine

Zunächst wurde die Wildtyp-, Einzel- und Doppel-*knock-out*-Pflanzen sieben Tage unter gelbgefiltertem Dauerlicht auf IAA- bzw. IBA-haltigem MS-Medium angezogen und anschließend der Phänotyp analysiert (Kap. 2.2.4.1.4). Der Gelbfilter wurde erforderlich, da die Indolkomponenten des IAAs und IBAs in MS-Medium unter Blaulicht instabil sind (Stasinopoulos *et al.*, 1990). Bei Pflanzen, die mit IAA behandelt wurden, konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *Knock-out*-Linien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch bildeten Doppel-*knock-out*-Pflanzen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  IBA im Medium im Vergleich zum Wildtyp deutlich längerer Wurzeln aus (Abb. 35). Auch die Wurzeln des Einzel-*knock-outs* von *At4g05160* waren signifikant länger als die des Wildtyps. Sie erreichten allerdings nicht die Wurzellänge des Doppel-*knock-outs*. Der Einzel-*knock-out* von *At5g63380* hingegen entsprach dem Phänotyp des Wildtyps. Auch bei einer IBA-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ließen sich diese Unterschiede noch deutlich feststellen, wenn auch



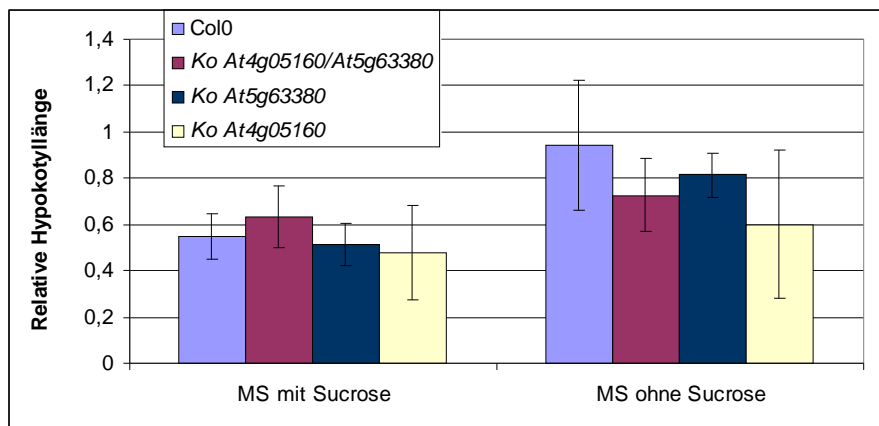
**Abb. 35: Durchschnittliche Wurzellänge von Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen auf IBA-haltigem Medium**

Dargestellt ist die relative durchschnittliche Wurzellänge von Pflanzen, die auf Medium mit IBA gewachsen sind gegenüber Pflanzen, die auf Standardmedium gewachsen sind. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out* Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie dem Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*.

die Gesamtlänge der Wurzeln kürzer war. Erst ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  IBA im Medium nivellierte sich dieser Effekt (Daten nicht gezeigt). Somit wurde die IBA-Resistenz des Einzel-*knock-outs* von *At4g05160* durch den Verlust des zweiten 4CLLs *At5g63380* noch deutlich gesteigert. Dies korreliert mit den Ergebnissen der *in vitro*-Aktivitäten, die zeigten, dass vor allem *At4g05160* und in geringerem Maße *At5g63380* IBA *in vitro* aktiviert (Kap. 3.1.1.2 /3.3.3.3).

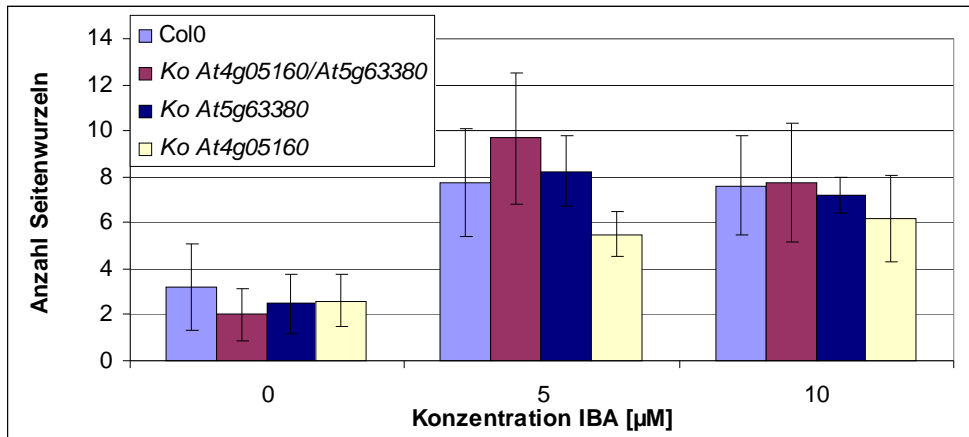
Um den Einfluss von IBA auf die Hypokotyllänge zu ermitteln wurden Pflanzen sieben Tage auf Medium mit 10  $\mu\text{M}$  IBA angezogen (Abb. 36). Dabei ließen sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den drei *Knock-out*-Linien ermitteln. Auch ein Zusatz von Zucker im Medium veränderte lediglich die absolute Länge aller Hypokotyle. Die Wurzellänge scheint daher der sensitiver Parameter zur Analyse von IBA-Effekten auf die Pflanzen zu sein.

IBA wird als Bewurzelungshormon eingesetzt, da es in der Lage ist die Seitenwurzelbildung zu induzieren (De Klerk *et al.*, 1997). Daher wurden die Pflanzen auf IBA-haltigem Medium angezogen und im Anschluss für drei Tage auf eine Platte ohne Hormone umgesetzt. Obwohl offensichtlich IBA die Entwicklung von Seitenwurzeln deutlich förderte, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Einzel-, sowie Doppel-*knock-out*-Pflanzen von *At4g05160* und *At5g63380* (Abb. 37).



**Abb. 36: Relative durchschnittliche Hypokotyllänge von Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen auf IBA-haltigem Medium**

Dargestellt ist die relative durchschnittliche Hypokotyllänge von 7 Tage alten Pflanzen, die auf Medium mit 10  $\mu\text{M}$  IBA gewachsen sind gegenüber Pflanzen, die auf Standardmedium gewachsen sind. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out*-Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie dem Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*.

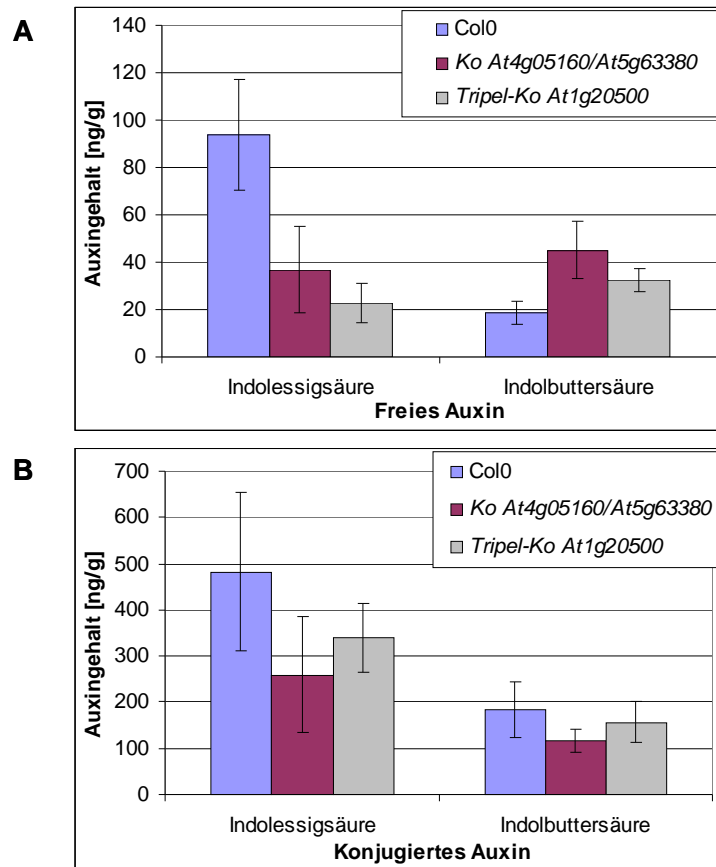


**Abb. 37: Anzahl der IBA-induzierten Seitenwurzeln bei Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen**

Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl an Seitenwurzel, die durch das Wachstum auf IBA-haltigem Medium induziert wurden. Es handelt sich um Wildtyp und Einzel-*Knock-out* Pflanzen der Linien *At4g05160* SALK\_050214 und *At5g63380* SALK\_003233, sowie den Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380*.

### 3.3.3.2.2 Analyse der Auxinmengen in Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160/ At5g63380*

Um weitere Anhaltungspunkte für die Beteiligung beider Enzyme am Indolbuttersäuremetabolismus zu erhalten wurden Wildtyp-, Doppel-*knock-out*-Pflanzen *At4g05160/At5g63380* und der Tripel-*knock-out* *At1g20500/At4g05160/At5g63380* (Kap. 3.2.4) 13 Tage in Flüssigmedium unter Dauerlicht angezogen und dann die Mengen an freier und konjugierter IAA und IBA bestimmt (Kap. 2.2.4.1.2/2.2.4.5). Als konjugierte Auxine werden, wie bereits beschrieben, mit Zucker veresterte oder an verschiedene Aminosäuren gebundene Auxine bezeichnet. Das Ergebnis ist in Abb. 38 zu sehen. Im Vergleich zu den Wildtyppflanzen waren die internen Konzentrationen an freier Indolessigsäure im Doppel-*knock-out* und Tripel-*knock-out* signifikant geringer, während die freie Indolbuttersäure in Pflanzen des Doppel-*knock-out* und Tripel-*knock-out* akkumulierte (Abb. 38A). Dies deutet auf einen zumindest teilweisen Verlust der IBA:CoA-Ligase-Aktivität in diesen Linien hin. Die Bestimmung der Werte der konjugierten Auxine lieferte dagegen weniger eindeutige Ergebnisse (Abb. 38B). Tendenziell ist die Menge an konjugierter IAA in Doppel-*knock-out*-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen geringer, jedoch ist dieser Effekt auf Grund der Streuung der Einzelwerte



**Abb. 38: Mengen an freien und konjugierten Auxinen in Wildtyp und *Knock-out*-Pflanzen**

Dargestellt sind die Mengen an IBA und IAA, die in 13 Tage alten Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen bestimmt wurden. Es wurden sowohl (A) freie, als auch (B) konjugierte Auxine analysiert. Es handelt sich um Wildtyp, Doppel-*Knock-out* *At4g05160/At5g63380* und Tripel-*knock-out* *At4g05160/At5g63380/At1g20500*.

nicht signifikant. Auch für die interne Konzentration an gebundener IBA konnte keine signifikante Veränderung ermittelt werden. Das veränderte Verhältnis an freier IAA und IBA wurde offenbar während der Bildung der Konjugate ausgeglichen.

Die Akkumulation des Substrats IBA und die Absenkung des Produkts IAA bestätigen prinzipiell die Funktion der Enzyme *At4g05160* und *At5g63380* als IBA:CoA-Ligasen in *A. thaliana*.

### 3.3.3.3 Die *in vitro*-Aktivität von At4g05160 und At5g63380 gegenüber 2,4-DB und IBA

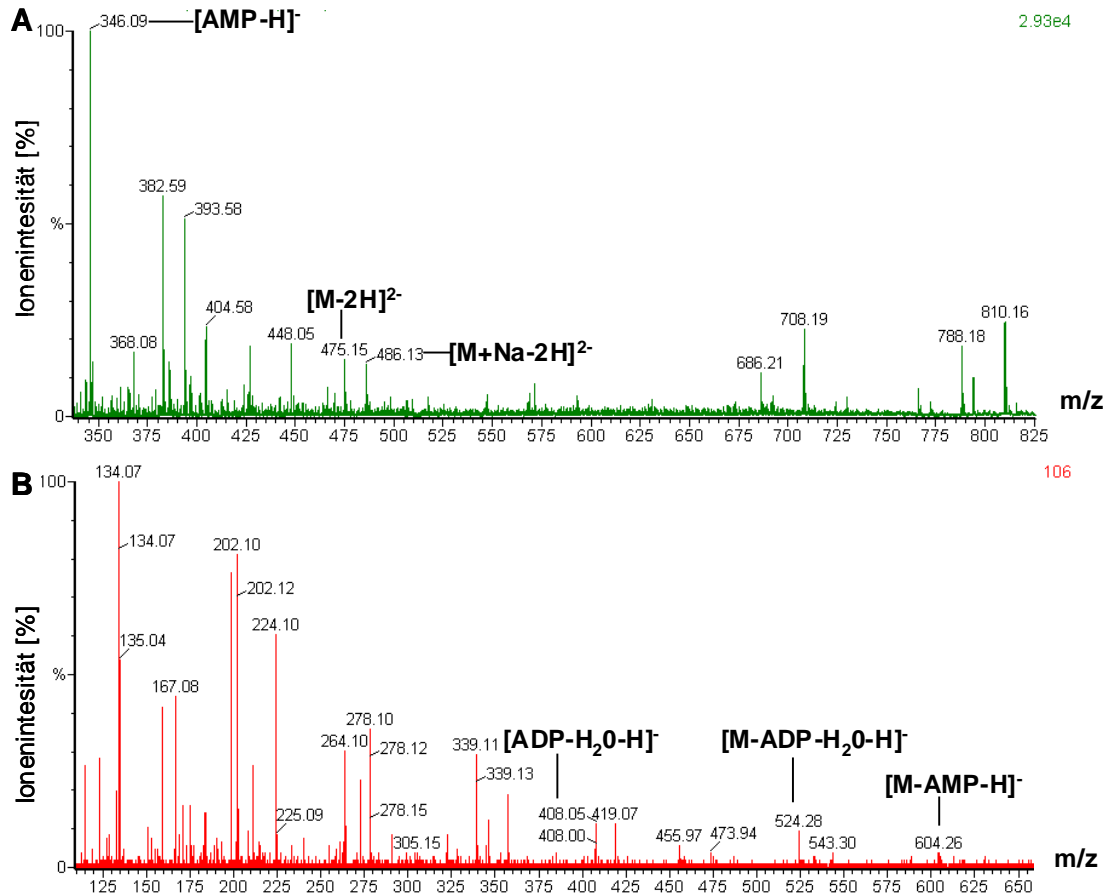
Die in den *in vivo*-Experimenten erhaltenen Daten deuten auf eine Funktion von At4g05160 und At5g63380 als Auxin aktivierende Enzyme hin. Daher wurde der *in vitro*-Umsatz von 2,4-DB bzw. IBA zum CoA-Ester durch diese Enzyme detaillierter untersucht. Zunächst wurden daher mittels des Luciferasetests die enzymkinetischen Daten des Enzyms At4g05160 mit 2,4-DB ermittelt (Kap. 2.2.2.2). Diese sind in Tab. 4 im Vergleich zu den Parametern für andere umgesetzte Substrate dargestellt. Während der  $K_M$ -Wert mit 46  $\mu\text{M}$  in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen getesteten Substraten liegt, ist die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  mit  $0,049 \text{ sec}^{-1}$  deutlich geringer als die der Jasmonsäurevorstufen oder der Fettsäuren Hexan-, Nonan- und Tetradecansäure, die bis zu 50-fach höhere  $k_{\text{cat}}$ -Werte aufweisen ( $2,31 \text{ sec}^{-1}$  für Tetradecansäure). Es zeigte sich also, dass At4g05160 eine Affinität für 2,4-DB als Substrat besitzt, jedoch die katalytische Effizienz im Vergleich mit den anderen Substraten geringer ist. Laut der Ergebnisse des Luciferasetests stellt 2,4-DB das Auxin dar, das von At4g05160 am besten umgesetzt wird. Da aber bereits mit 2,4-DB die Effizienz der Aktivierung relativ gering war, wurde auf eine enzymkinetische Charakterisierung von At4g05160 mit IBA verzichtet.

**Tab. 4: Ergebnisse der enzymkinetischen Analyse von At4g05160**

Dargestellt sind die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  und die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_M$ . Diese wurden über den gekoppelten LDH-Test bzw. über den Luciferasetest für das Enzym ermittelt. Dabei entstammen die Werte für die Fettsäuren und die Jasmonsäurevorstufen der Arbeit von K. Schneider und dienen zu Vergleichszwecken für die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte für das Auxin 2, 4-DB.

At4g05160	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{sec}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [( $\text{sec} \cdot \text{mM}$ ) $^{-1}$ ]
Hexansäure	$75 \pm 18$	$1,26 \pm 0,09$	16,74
Nonansäure	$6 \pm 1$	$1,38 \pm 0,12$	<b>230,65</b>
Tetradecansäure	$54 \pm 7$	$2,31 \pm 0,47$	42,76
OPDA	$93 \pm 36$	$0,29 \pm 0,08$	3,19
OPC-6:0	$187 \pm 33$	$0,41 \pm 0,06$	2,19
<b>2, 4-DB</b>	46,6	0,0496	1,06



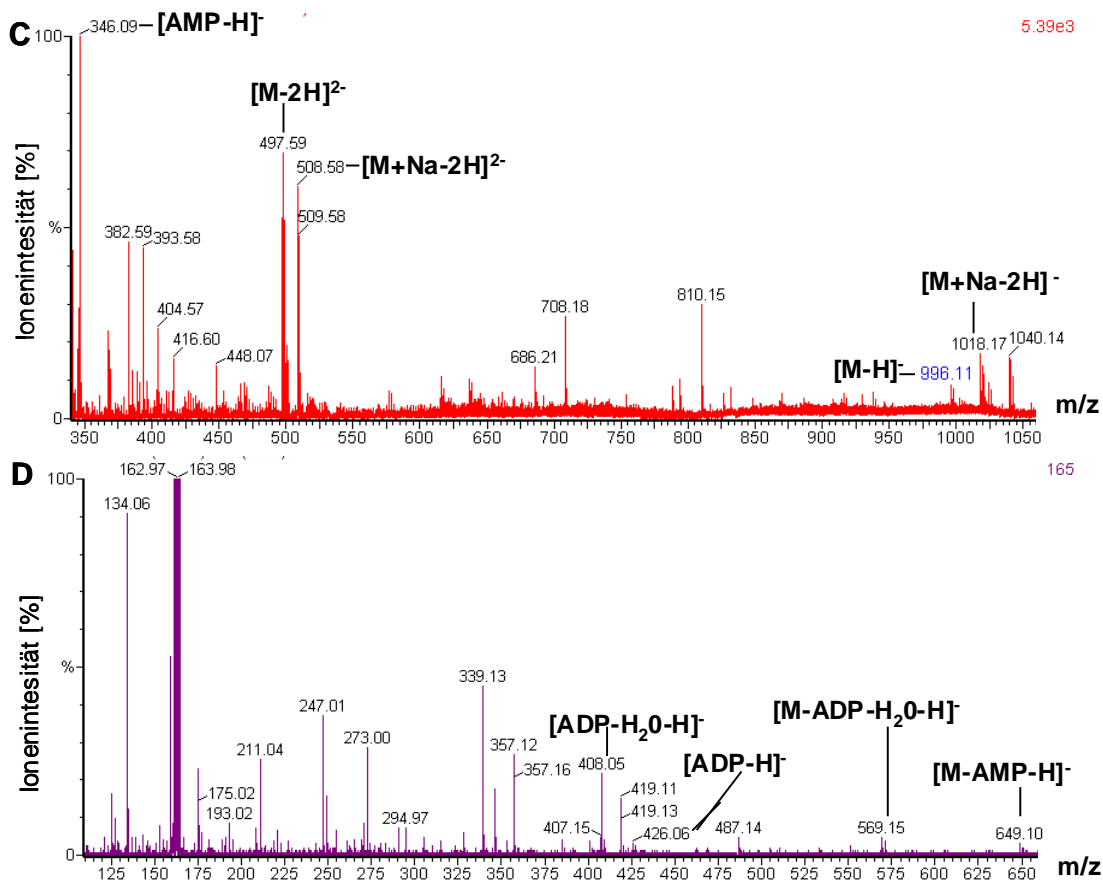


**Abb. 39: Massenspektren der Reaktionsprodukte von At4g05160 mit ATP, CoA und IBA**

(A) Massenspektrum der Produkte der Reaktion von At4g05160 mit IBA, CoA und ATP, gemessen im negativen Ionenmodus. (B) MS-MS-Spektrum des zweifach geladenen IBA-CoA, gemessen im negativen Ionenmodus. M: Masse des Ursprungsmoleküls IBA-CoA.

Als Nachweis, dass At4g05160 tatsächlich eine 2,4-DB:CoA-Ligase- bzw. IBA:CoA-Ligase-Aktivität besitzt, wurden Massenspektren der jeweiligen Reaktionsansätze aufgenommen. Die beiden Massenspektren und die zugehörigen Fragmentierungen sind in Abb. 39/40 zu sehen. In den Reaktionsansätzen konnte sowohl der CoA-Ester von 2,4-DB als auch der CoA-Ester von IBA nachgewiesen werden. Sowohl im Fragmentierungsmuster des 2,4-DB-CoA-Peaks als auch des IBA-CoA-Peaks wiesen die spezifischen Zerfallsprodukte auf die Existenz des CoA-Esters hin. Dies zeigt, dass At4g05160 sowohl als 2,4-DB:CoA-Ligase als auch als IBA:CoA-

Ligase fungieren kann, wenngleich beide Substrate unter *in vitro*-Bedingungen nur mit relativ niedriger katalytischer Effizienz umgesetzt werden. Die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch At5g63380 diese Funktionen besitzt, allerdings mit einer geringeren enzymatischen Aktivität als At4g05160. Eine massenspektrometrische Analyse dieser Reaktionsprodukte steht jedoch noch aus.



**Abb. 40: Massenspektren der Reaktionsprodukte von At4g05160 mit ATP, CoA und 2,4-DB**

(A) Massenspektrum der Produkte der Reaktion von At4g05160 mit 2,4-DB, CoA und ATP, gemessen im negativen Ionenmodus. (B) MS-MS-Spektrum des einfach geladenen 2,4-DB-CoA, gemessen im negativen Ionenmodus. M: Masse des Ursprungsmoleküls 2,4-DB-CoA.

### 3.3.4 Analyse der Expression von *At4g05160* und *At5g63380*

#### 3.3.4.1 Analyse der koregulierten Gene von *At4g05160* und *At5g63380*

Das Programm ExpressionAngler ermöglicht in digitalen Expressionsdatenbanken die Suche nach koregulierten Genen, was sich als ergänzendes Werkzeug zur Funktionsanalyse erwiesen hat (van Noort *et al.*, 2003).

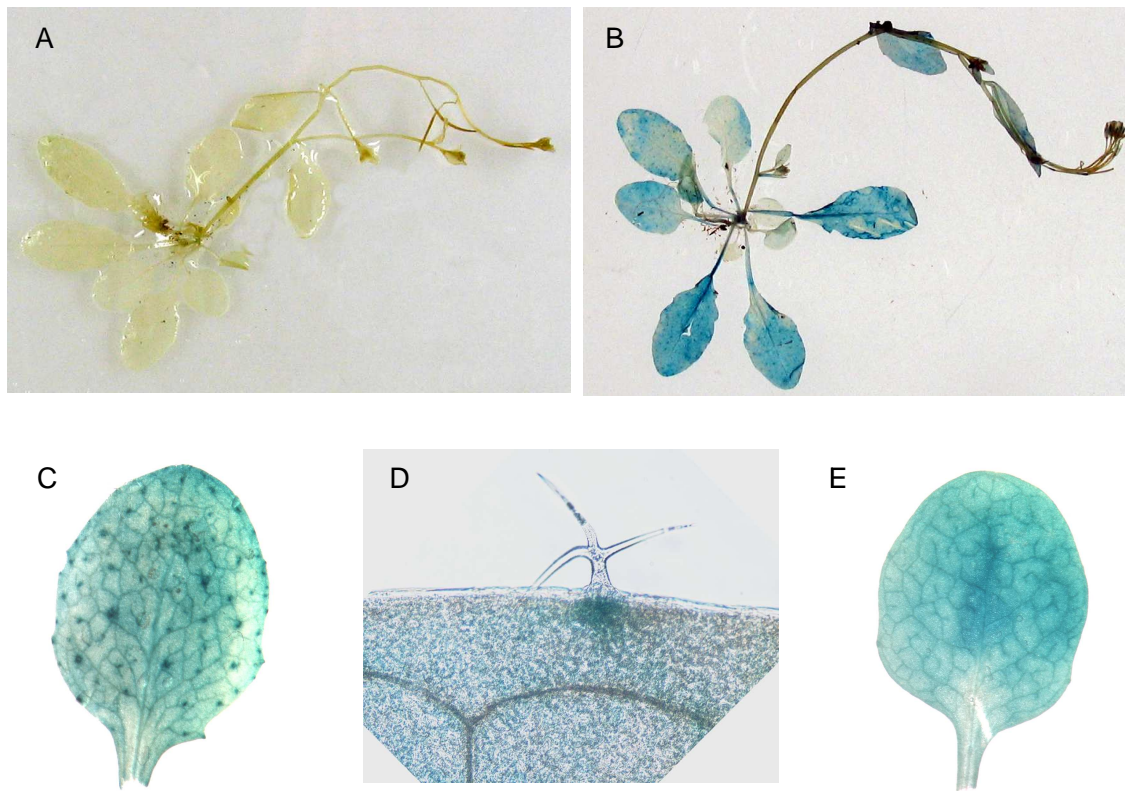
Die Expressionsanalyse von *At4g05160* in den Microarray-Daten der NASC-Datenbank ergab, dass *At4g05160* größtenteils konstitutiv exprimiert wird (Kap. 3.1.3) und nur durch wenige Reize wie Hitze, osmotischen Stress oder Salzstress induziert wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Doch konnten einige koregulierte Gene identifiziert werden, deren Genprodukte die an Fettsäure-, IBA- und Jasmonsäurevorstufenabbau beteiligte Thiolase KAT2, die am IBA-Metabolismus beteiligte Acyl-CoA-Dehydrogenase IBR3 und das Multifunktionsprotein MFP2 sind (Kato *et al.*, 1996; Germain *et al.*, 2001; Eastmond *et al.*, 2000; Rylott *et al.*, 2006; Zolman *et al.*, 2007). Die Analyse der Expression von *At5g63380* in der NASC-Datenbank durch das Programm ExpressionAngler zeigte, dass dieses Gen konstitutiv exprimiert ist und nicht auf äußere Einflüsse reagiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher lieferte die Untersuchung der koexprimierten Gene von *At5g63380* keine sinnvollen Ergebnisse.

Diese Expressionsanalysen deuten auf eine mögliche *housekeeping*-Funktion der beiden Enzyme *At4g05160* und *At5g63380* hin, da beide konstitutiv exprimiert werden. Darüber hinaus weisen die koregulierten Gene zu *At4g05160* auf die identifizierte Funktion als IBA:CoA-Ligase hin.

#### 3.3.4.2 Expressionsanalyse von *At4g05160* und *At5g63380* durch Reporterpflanzen

Abschließend wurde die Expression beider Gene durch Reporterpflanzen untersucht. Die eingesetzten Promotorregionen von *At4g05160* und *At5g63380* wurden durch die jeweils nächstgelegenen Gene begrenzt, daher ergab sich für *At4g05160* eine Promotorregion, die 1700 bp umfasst, während der untersuchte Promotorbereich von *At5g63380* nur 500 bp groß war. Als Reportergen wurde die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) gewählt.

Die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse von *At5g63380* sind in Abb. 41 zu sehen. Die Reporterlinien wurden teilweise bereits in einer Diplomarbeit erstellt und untersucht (L. Kienow). In Blättern sechs Wochen alten Pflanzen trat eine generelle Blaufärbung der Lamina



**Abb. 41: GUS-Reporterpflanzen der Gene *At4g05160* und *At5g63380* in *A. thaliana***

(A) 6 Wochen alte Reporterpflanze von *At4g05160*, keine GUS-Färbung. (B) 6 Wochen alte Reporterpflanze von *At5g63380*, Blaufärbung der Blattflächen. (C) Blatt einer Reporterpflanze von *At5g63380* in Col0, GUS-Expression punktförmig verstärkt unter den Trichomen. (D) vergrößerte Aufnahme eines Trichoms mit blaugefärbten Mesophyllzellen der Reporterpflanzen von *At5g63380*. (E) Blatt einer Reporterpflanze von *At5g63380* in trichomlosen Col5 Hintergrund, kein punktförmiges Expressionmuster. C und D entstammen Diplomarbeit von L. Kienow.

aller Blätter auf (Abb. 41A), jedoch war zusätzlich eine verstärkte, sehr spezifische GUS-Expression unter den Blatthaaren der Pflanze zu beobachten (Abb.41C/D). Dabei handelt es sich um Mesophyllzellen, die bislang nicht im Zusammenhang mit Trichomen beschrieben wurde. Zur Untersuchung dieses Effekts wurde daher im Rahmen dieser Arbeit das Reportergenkonstrukt in *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Col5 gebracht, die sich durch das Fehlen von Trichomen auszeichnen. Diese trichomlosen Reporterpflanzen zeigten weiterhin eine durchgängige Färbung der Lamina, aber keine punktförmige GUS-Expression auf den Blättern (Abb. 41E), wie sie bei Col0-Pflanzen unterhalb der Blatthaare zu beobachten war. Somit interagieren anscheinend die Mesophyllzellen und damit die Expression von *At5g63380*

spezifisch mit den Trichomen. Einen direkten Einfluss auf die Anzahl und Morphologie der Blatthaare scheint At5g63380 hingegen nicht zu besitzen, da diese in Doppel-*knock-out*-Pflanzen At5g63380/At4g05160 im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

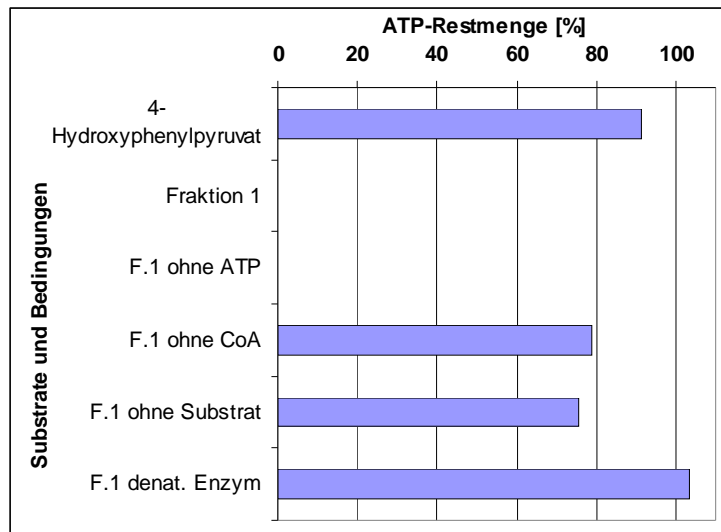
Die Erstellung und Analyse einer analogen Reporterpflanze mit dem Promotor von At4g05160 brachte keine weiteren Erkenntnisse zum Expressionsmuster, eine GUS-Expression konnte nicht detektiert werden (Abb. 41A). Auch die Verkürzung der untersuchten Promotorregion von At4g05160 führte zu keiner Blaufärbung des Gewebes.

Die *in vitro*-Analyse der 4CLLs At4g05160 und At5g63380 deutete auf eine Funktion beider Enzyme im Stoffwechsel von Fettsäuren, Jasmonsäurevorstufen oder Auxinen hin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Beteiligung von At4g05160 und At5g63380 an der Jasmonsäurebiosynthese, zumindest unter den untersuchten Bedingungen, ausgeschlossen werden. Doch zeigte sich durch die Analyse der Ein- und Mehrfachmutanten, dass beide Enzyme offenbar am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind, die genaue Funktion jedoch noch offen ist. Darüber hinaus wurden mit At4g05160 und At5g63380 erstmalig zwei IBA:CoA-Ligasen identifiziert, die am Indolbuttersäureabbau in *A. thaliana* beteiligt sind.

### **3.4 Untersuchungen zur Funktion von At3g48990 und At1g62940**

Abschließend soll auf zwei weitere 4CLLs eingegangen werden auf deren Funktion im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise erhalten wurden.

At3g48990 ist in sehr großer Menge in allen Geweben von *A. thaliana* exprimiert (Kap. 3.1.3). Interessanterweise zeigt eine Verlustmutante von At3g48990 einen Defekt in der Entwicklung der Hauptwurzel (persönliche Kommunikation P.J. Eastmond). In vorangegangenen Studien konnte diesem 4CLL keine *in vitro*-Aktivität zugeordnet werden (Shockey *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels des Luciferasetests jedoch gezeigt, dass At3g48990 ein funktionales Adenylat bildendes Enzym mit CoA als Acyl-Endakzeptor darstellt. Es akzeptierte aber keine der 100 getesteten Substanzen, sondern setzte eine Verunreinigung in der Charge des verwendeten, unreinen 4-Hydroxyphenylpyruvats um. Dies wurde über die chromatographische Auftrennung dieses Substanzgemischs und einen Test der gesammelten Fraktionen

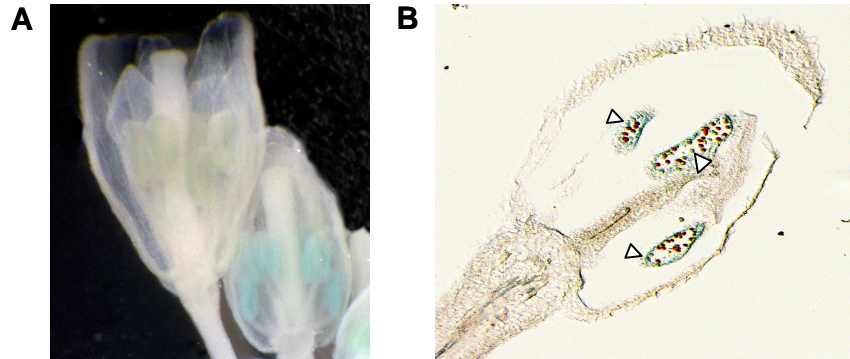


**Abb. 42: Analyse der enzymatischen Aktivität von At3g48990**

Dargestellt ist die ATP-Restmenge in den Reaktionsansätzen nach 2 Stunden Inkubationszeit. In den Ansätzen ist reines 4-Hydroxyphenylpyruvat, die durch HPLC aufgereinigte Fraktion 1 des unreinen 4-Hydroxyphenylpyruvats und variierte Bedingungen ohne ATP, CoA, Substrat und funktionales At3g48990.

nachgewiesen (Abb. 42). Die tatsächliche Identität des akzeptierten Substrats wird derzeit über Analyse des Massenspektrums und NMR untersucht.

Das Protein At1g62940 wird als Bindeglied zwischen den 4CLs und 4CLLs angesehen, da es zu beiden Gruppen eine durchschnittliche Identität der Aminosäuresequenz von 38 bis 40 % besitzt (Shockey *et al.*, 2003). Zuvor konnte für At1g62940 in *in vitro*-Untersuchungen keine enzymatische Aktivität bestimmt werden (Kapitel 3.1.1.2), doch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase unter *in vivo*-Bedingungen in *E. coli* nachgewiesen (Kapitel 3.1.2). Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte diese Aktivität *in vitro* durch einen sensitiven, radiochemischen Test bestätigt werden (S. Koch). Darüber hinaus erfüllt At1g62940 offenbar in *A. thaliana* eine sehr spezifische Funktion, da es nur in Stadium neun der Blütenentwicklung exprimiert ist (Kapitel 3.1.3; Morant *et al.*, 2007). Dies konnte auch durch die Analyse einer GUS-Reportergenlinie bestätigt werden (Abb. 43) (Linie erzeugt von S. Koch). Korrespondieren dazu wurde in der öffentlich zugänglichen *Riken Arabidopsis Phenome Information Database* mit Linie 12-1917-1 eine Verlustmutante von At1g62940 identifiziert, die männlich steril ist (Kuromori *et al.*, 2006).



**Abb. 43: Blütenspezifische Expression von At1g62940**

Dargestellt sind Bilder einer GUS-Reportergenlinie von At1g62940. (A) Die GUS-Expression findet sich nur in den Antheren der Blütenknospen, nicht in bereits geöffneten Blüten. (B) Dünnschnitt einer Blütenknospe. Expression im Tapetum der Antheren (markiert). Blau:GUS-Expression, Rot: Mikrosporen.

### 3.4.1 Analyse der *in vitro*-Aktivität von At1g62940 durch einen indirekten Test:

#### Luciferasetest

Auf Grund des blütenspezifischen Expressionsmusters dieses 4CLLs wurde die Analyse der *in vitro*-Aktivität auf Hydroxyfettsäuren ausgedehnt. Deren Aktivierung ist für die Bildung des Biopolymers Sporopollenin für die Pollenentwicklung von zentraler Bedeutung. Dazu wurde erneut die ATP-Restmenge im Reaktionsansatz mittels des bereits beschriebenen Luciferasetests bestimmt (Kapitel 3.1.1.2). Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Für das Enzym At1g62940 konnte mit keiner der angebotenen Hydroxyfettsäuren eine deutliche Abnahme der ATP-Restmenge beobachtet werden. Dies zeigt einerseits, dass Hydroxyfettsäuren keine besser umgesetzten Substrate darstellen als beispielsweise Ölsäure (Kap. 3.1.1.2), andererseits scheint der Luciferasetest nicht sensitiv genug zu sein, um schwache enzymatische Aktivitäten detektieren zu können. Im Gegensatz dazu konnte für die Kontrollenzyme At4g05160 und At5g63380 ein effektiver Umsatz vieler der angebotenen Hydroxyfettsäuren beobachtet werden. Somit wurde das *in vitro*-Substratspektrum dieser beiden Enzyme noch erweitert.

**Tab. 5: Luciferasetest von At1g62940, At4g05160 und At5g63380 mit Hydroxyfettsäuren**

Dargestellt sind die ATP-Restmengen der Reaktionsansätze nach zwei Stunden Inkubationszeit. Es wurden die aufgereinigten Enzyme At1g62940, At4g05160 und At5g63380 mit Hydroxyfettsäuren getestet. Gelb hinterlegt sind gut umgesetzte Substrate (weniger als 10 % Rest-ATP). n.t.:nicht getestet

Hydroxyfettsäuren	At1g62940	At4g05160	At5g63380
2-Hydroxy-Oktansäure	110,9	13,2	108,1
3-Hydroxy-Oktansäure	123,6	n.t.	n.t.
8-Hydroxy-Oktansäure	131,9	0,2	82,0
10-Hydroxy-Decansäure	125,8	0,6	0,6
12-Hydroxy-Dodecansäure	96,5	3,7	0,5
5-Dodecanolide	89,2	12,0	85,0
16-Hydroxy-Hexadecansäure	96,9	0,4	0,4
12-Hydroxy-Oktadecansäure	96,5	1,2	0,4

### 3.4.2 Analyse der *in vitro* Aktivität des Enzyms At1g62940 durch einen direkten Test:

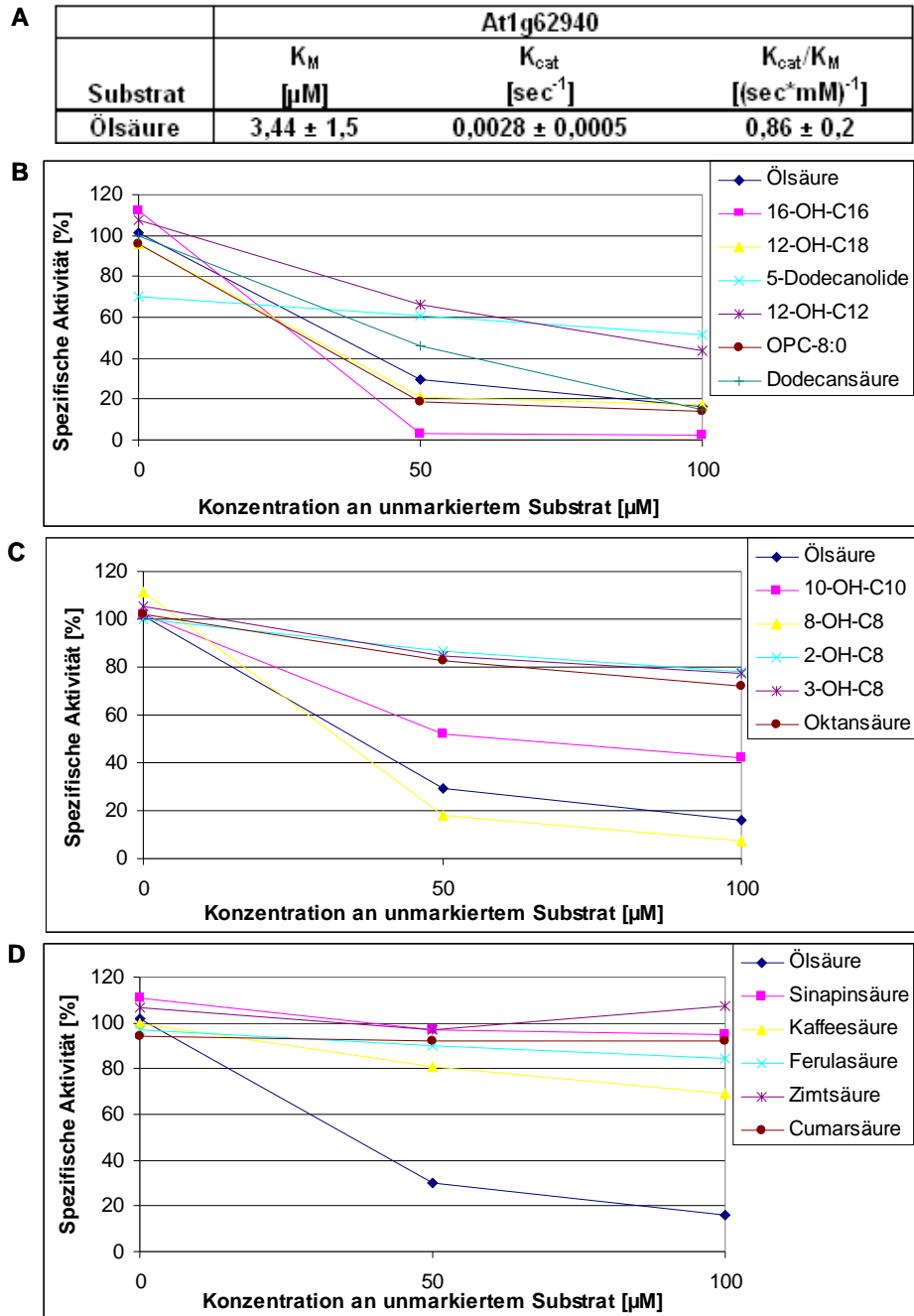
#### Radiochemischer Test

Zur Detektion schwacher enzymatischer Aktivitäten eignet sich eine radiochemischer Test, bei dem direkt der Einbau von [<sup>14</sup>C]-markierter Ölsäure in Oleat:CoA nachgewiesen wird (Kap. 2.2.2.4)(Shockey *et al.*, 2003).

Mit Hilfe dieses Tests wurden die enzymkinetischen Parameter von At1g62940 mit Ölsäure bestimmt (Diplomarbeit S. Koch). Es stellte sich heraus, dass das Enzym für Ölsäure einen sehr niedrigen K<sub>M</sub>-Wert von 3,4 µM besitzt und eine äußerst niedrige Wechselzahl von 0,0028 sec<sup>-1</sup> (Abb.44A). Dieses Ergebnis erklärt warum im weniger sensitiven Luciferasetest keine Aktivitäten detektierbar waren.

In dieser Arbeit wurde mittels des radiochemischen Tests der Umsatz von Fettsäuren, Hydroxyfettsäuren und Zimtsäurederivaten durch At1g62940 analysiert. Da die zu untersuchenden Substrate, neben Ölsäure, nicht in einer radioaktiv markierten Variante verfügbar waren, konnte keine direkte Messung durchgeführt werden. Deswegen wurde überprüft, ob die Zugabe nicht radioaktiv markierter Substrate zum Reaktionsansatz zu veränderten Mengen an [<sup>14</sup>C]-Oleat:CoA führt. Substrate, die ähnlich gut wie Ölsäure umgesetzt wurden, sind demnach 16-Hydroxyhexadecansäure, 8-Hydroxyoktansäure, 12-Hydroxyoktadecansäure, die mittelkettige Fettsäure Dodecansäure und die Jasmonsäurevorstufe





**Abb. 44: Bestimmung des Substratspektrums des Enzyms At1g62940**

(A) Bestimmung der kinetischen Parameter für das Enzym At1g62940 und das Substrat Ölsäure (Diplomarbeit S. Koch). (B) Ergebnis des Kompetitionstests: mittel- bis langkettige Substrate (C) Ergebnis des Kompetitionstests: kurzkettige Fettsäuren; (D) Ergebnis des Kompetitionstests: Zimtsäurederivate. Unmarkierte Ölsäure diente als Positivkontrolle. Werte für Oktansäure und Dodecansäure aus der Arbeit S. Koch.

OPC-8 (Abb. 44B). In schwächerem Ausmaß kompetitierten die drei Hydroxyfettsäuren 10-Hydroxydecansäure, 5-Dodecanolide und 12-Hydroxydodecansäure (Abb. 44C). Keine Konkurrenz zeigten die kurzkettigen Fettsäuren Oktansäure, 2-Hydroxyoktansäure und 3-Hydroxyoktansäure (Abb. 44D). Außerdem akzeptierte, wie in Abb. 44 D ersichtlich, At1g62940 keines der angebotenen Zimtsäurederivate Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Zimtsäure und Sinapinsäure. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass At1g62940 trotz der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten verwandtschaftlichen Position als Bindeglied zwischen 4CLs und 4CLLs als Acyl-CoA-Synthetase von Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren fungiert und keine Zimtsäurederivate akzeptiert. Diese, im Tapetum lokalisierte, Aktivität ist offensichtlich für die Pollenentwicklung in *A. thaliana* essentiell.

## 4. Diskussion

In den letzten Jahren wurde das Genom vieler Organismen sequenziert, wodurch sich eine große Anzahl an Genen mit unbekannter Funktion ergab. Bei *A. thaliana* wurden in einem relativ kleinen Pflanzengenom von 125 Mb ca. 25.000 Gene identifiziert, deren funktionale Charakterisierung derzeit Gegenstand vieler Untersuchungen ist. Ziel dieser Arbeit war die funktionale Charakterisierung von Vertretern der Superfamilie der Adenylat bildenden Enzyme. Die Komplexität des vorliegenden enzymatischen Netzwerks ergibt sich bereits aus der großen Anzahl dieser Enzyme. In *A. thaliana* existieren 44 Gene, deren Produkte vermutlich die Aktivierung von Carbonsäuren zu reaktiven Thioestern vermitteln und weitere 19, die Aminosäuren als Acyl-Endakzeptor besitzen. Während in anderen Organismen Adenylat bildenden Enzymen bereits wichtige Funktionen im Transport von Metaboliten, in der Signaltransduktion und der Entstehung von Krankheiten zugewiesen werden konnten, ist die Analyse der Funktion der Adenylat bildenden Enzyme in *A. thaliana* noch nicht sehr weit fortgeschritten (Faergeman *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 1994; Watkins *et al.*, 2008; Shockey *et al.*, 2003). Neun Enzyme wurden als Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren charakterisiert (LACS), vier weitere als 4-Cumarat:CoA-Ligasen (4CL) identifiziert (Shockey *et al.*, 2002; Ehling *et al.*, 1999; Hamberger *et al.*, 2003). In Ausdehnung der Analyse der 4CLs wurden mit der Untersuchung der Funktion einer Gruppe naher verwandter Proteine, der 4CLs, bereits begonnen (Doktorarbeit K. Schneider; Diplomarbeit L. Kienow, Schneider *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Untersuchungen fortgesetzt und durch eine umfangreiche Charakterisierung sowohl der *in vitro*- als auch der *in vivo*-Aktivität komplettiert. Dabei wurden neun potentielle CoA-Ligasen untersucht (At1g20480, At1g20500, At1g20510, At1g62940, At3g48990, At4g05160, At4g19010, At5g38120, At5g63380).

### 4.1. Die Aktivierung von Fettsäuren durch 4CLs

Auf Grund der erwarteten enzymatischen Redundanz wurde eine Strategie gewählt, bei der zunächst die *in vitro*-Funktion der Enzyme aufgeklärt werden sollte. In einem breiten *in vitro*-Aktivitätsscreen nach Substraten wurde eine Vielzahl an Carbonsäuren aus unterschiedlichen Strukturklassen eingesetzt (u.a. Fettsäuren, Zimtsäuren, Benzoensäuren, Indolcarbonsäuren,

Jasmonsäuren, Aminosäuren). Diese *in vitro*-Aktivitäten wurden im Folgenden durch verschiedene *in vivo*-Studien u.a. in *E. coli* genauer untersucht.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die Aktivierung von Fettsäuren das vereinheitlichende Merkmal der 4CLLs der Gruppe B ist. Sechs der neun untersuchten Enzyme aktivieren Fettsäuren zu den korrespondierenden CoA-Estern und stellen damit eine neue Klasse von Acyl-CoA-Synthetasen aus *A. thaliana* dar. Diese Erkenntnis war erstaunlich, da einerseits die nächsten Verwandten (4CL1-4CL4) Zimtsäurederivate und keine Fettsäuren umsetzen und somit funktional deutlich differenziert werden müssen (Ehlting *et al.*, 1999; Hamberger *et al.*, 2003). Andererseits existiert bereits innerhalb der Familie der Adenylat bildenden Enzyme in *A. thaliana* eine detailliert charakterisierte Gruppe von Acyl-CoA-Synthetasen von langkettigen Fettsäuren (LACS), die in ihrer Aminosäuresequenz keine nahe Verwandtschaft zu den 4CLLs erkennen lassen (Shockey *et al.*, 2002 und 2003).

Neben der Aminosäuresequenz unterscheiden sich 4CLLs und LACS auch in strukturellen Merkmalen deutlich voneinander. So ist für die LACS die Anwesenheit einer Linkerdomäne kennzeichnend, welche für die enzymatische Funktion essentiell ist und diese Enzyme dem eukaryotischen Typ der Acyl-CoA-Synthetase zuordnet (Johnson *et al.*, 1994; Iijima *et al.*, 1996; Fulda *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1997; Shockey *et al.*, 2002). Dieses Motiv ist in den 4CLLs nicht vorhanden, sie gleichen daher dem prokaryotischen Typ der Acyl-CoA-Synthetase, wie z.B. FadD aus *E. coli*.

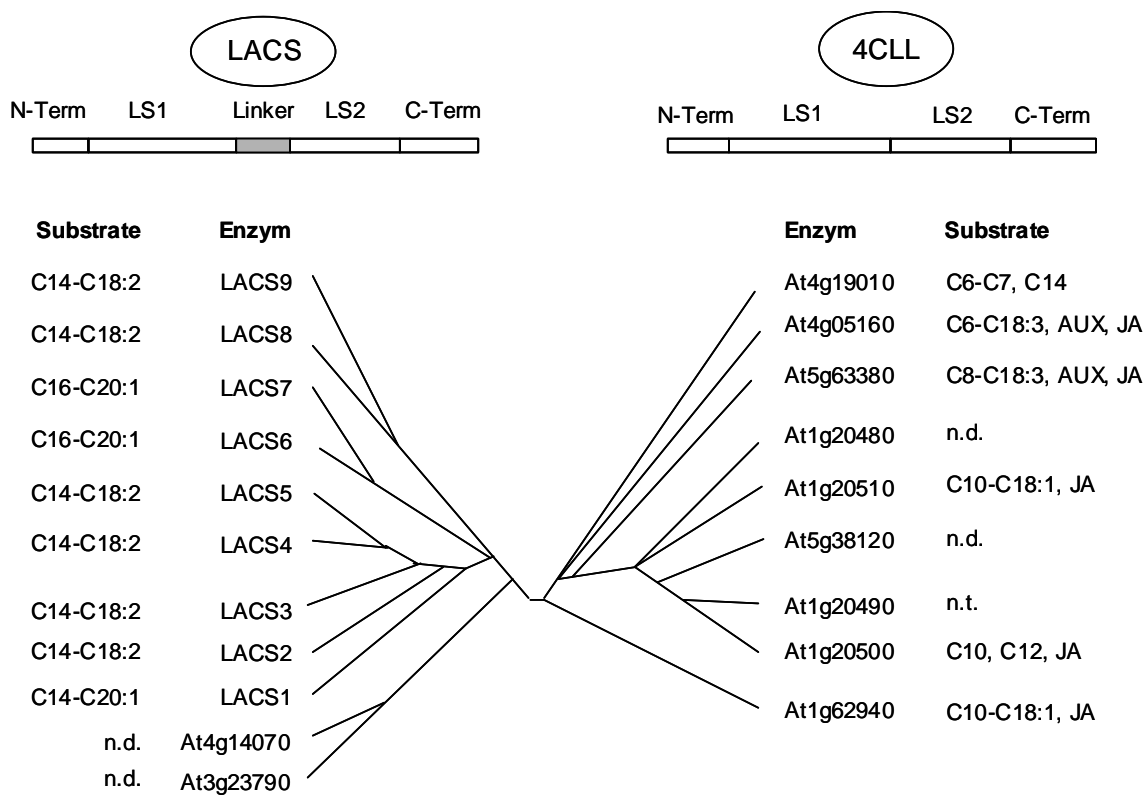
Die Gruppen der Acyl-CoA-Synthetasen des eukaryotischen bzw. prokaryotischen Typs lassen sich außerdem durch ihre zelluläre Lokalisation differenzieren. Die Eukaryoten-typischen LACS liegen an der Membran gebunden vor, während FadD ein frei gelöstes Protein darstellt, das nur nach spezifischen Reizen an die Membran bindet (Overath *et al.*, 1969; Shockey *et al.*, 2002). Ob dieser Mechanismus auch in *A. thaliana* eine Rolle spielt, ist jedoch bislang unbekannt.

Die Ähnlichkeit der 4CLLs zur prokaryotischen und der LACS zur eukaryotischen Gruppe lässt sich zusätzlich an den Ergebnissen der Komplementationsstudien in *E. coli* erkennen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass fünf der sechs 4CLLs, die *in vitro* Fettsäuren aktivieren auch in der Lage sind in *E. coli* Fettsäuren zu aktivieren und FadD funktional zu ersetzen. Im Gegensatz dazu ergab eine ähnliche Studie mit LACS der Ratte, dass

diese nur schwer die Funktion von FadD in *E. coli* übernehmen können (Caviglia *et al.*, 2004). Lediglich eine von fünf Isoformen, die *in vitro* Fettsäuren aktivierten, konnte den Verlust von FadD in *E. coli* komplementieren. Wurden hingegen Acyl-CoA-Synthetase defiziente Hefestämme verwendet, so waren vier der fünf LACS in der Lage Fettsäuren zu aktivieren (Tong *et al.*, 2006). Für diese Ergebnisse gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte das Protein FadD aus *E. coli* essentielle Wechselwirkungen mit anderen prokaryotischen Proteinen eingehen, die nicht von den vier LACS aus Ratte, aber durch die 4CLLs aus *A. thaliana* unterstützt werden. Außerdem könnte die normalerweise membranständige Lokalisation der LACS der Ratte einer wirksamen Funktion in *E. coli* im Wege stehen (Caviglia *et al.*, 2004). Möglicherweise sind auch Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischen Membranen für diesen Effekt mitverantwortlich (Tong *et al.*, 2006). Die Funktionalität der 4CLLs in *E. coli* könnte dadurch erklärt werden, dass sie wie Acyl-CoA-Synthetasen des prokaryotischen Typs frei gelöst und nicht an die Membran gebunden vorliegen. Allerdings konnte auch im Rahmen dieser Arbeit ein 4CLL, At4g19010, identifiziert werden, das unter *in vitro*-Bedingungen Fettsäuren aktiviert, nicht jedoch in *E. coli*. Obwohl sich At4g19010 strukturell nicht wesentlich von den anderen 4CLLs unterscheidet, könnte möglicherweise das Ergebnis einer Untersuchung dieses Enzyms in Hefestämmen zum Verständnis der Funktionsweise der 4CLLs beitragen.

Trotz der strukturellen und funktionalen Unterschiede setzen die Enzyme beider Gruppen, 4CLL und LACS, diverse Fettsäuren um und weisen damit ein zumindest teilweise redundantes Substratspektrum auf. Dabei zeigen alle neun Isoformen der LACS ihre Hauptaktivität mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren der Kettenlängen C16 und C18 (Shockey *et al.*, 2002). Die 4CLLs setzen diese Fettsäuren ebenfalls um, besitzen jedoch insgesamt ein breiteres Substratspektrum, da alle aktiven Enzyme auch mittelkettige und einige Vertreter auch kurzkettige Fettsäuren aktivieren. Ein wesentlicher Unterschied im Substratspektrum ergibt sich jedoch im Umsatz von Phytohormonen bzw. deren Vorstufen. Bislang ist kein LACS beschrieben worden, das in der Lage wäre, diese zu aktivieren. Im Gegensatz dazu konnten unter anderem im Rahmen dieser Arbeit fünf 4CLLs identifiziert werden, die Jasmonsäurevorstufen bzw. Auxine umsetzen. Wie in Kap. 4.2.1 beschrieben, besitzen die 4CLLs jedoch bei diesen Substraten strikte Mechanismen der Substratselektion und setzen nur

bestimmte Jasmonate bzw. Auxine um. Obwohl die Determinanten der Substratselektion in 4CLLs bislang unbekannt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine für den Mechanismus der Katalyse essentielle Aminosäure im C-Terminus von At1g20510, Lysin 530, identifiziert werden. Diese Aminosäure ist in allen Adenylat bildenden Enzymen konserviert und ihre Funktionalität in At1g20510 bestätigt prinzipiell das Modell der Katalyse über die Stabilisierung des negativen Übergangszustands (Conti *et al.*, 1997).



**Abb. 45: Eu- (LACS) und Prokaryoten-typische (4CLL) Acyl-CoA-Synthetasen aus *A. thaliana***

Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse der Enzyme aus den Gruppen der LACS und 4CLLs (Gruppe B), ihr Substratspektrum mit Fettsäuren der indizierten Kettenlängen und Sättigungsgrade. Zusätzlich setzen einige 4CLLs Auxine (AUX) und Jasmonsäurevorstufen (JA) um. Die schematischen Strukturen stellen die Zugehörigkeit zu den eukaryotischen (LACS) und prokaryotischen (4CLL) Acyl-CoA-Synthetasen dar. Diese beruht auf der Anwesenheit oder dem Fehlen der Linker-Domäne. Die Daten für die LACS sowie die schematisch dargestellten Strukturen entstammen der Publikation von Shockey *et al.*, 2002. Der hier dargestellte Stammbaum basiert auf einer Abbildung aus der Publikation Shockey *et al.*, 2003 und wurde modifiziert. Cx-Cx: Länge der Fettsäure und Sättigungsgrad, LS1 und LS2: Luciferase-ähnliche Domänen, n.d.: enzymatische Aktivität konnte bisher nicht gezeigt werden, n.t. nicht getestet.

Somit konnten mittlerweile 18 Fettsäuren aktivierende Enzyme aus *A. thaliana* identifiziert werden (diese Arbeit, Ke *et al.*, 2000; Shockey *et al.*, 2002 und 2003; Schneider *et al.*, 2005). Von diesen gehören neun Vertreter der Gruppe der Eukaryoten-typischen LACS an, die nur Fettsäuren als Substrate akzeptieren. Weitere neun sind die Prokaryoten-typischen 4CLLs, deren Substratspektrum sich teilweise auf Phytohormonvorstufen ausdehnen lässt. Diese Anzahl an Acyl-CoA-Synthetasen ist erstaunlich und zeigt die Bedeutung des Fettsäurestoffwechsels, sowohl für die Integrität der einzelnen Pflanze, als auch als Grundlage für die evolutionäre Weiterentwicklung ganzer Arten. Interessanterweise sind alle Acyl-CoA-Synthetasen aus Vertebraten dem eukaryotischen Typ der LACS zuzuordnen. 4CLL-Orthologe des prokaryotischen Typs sind in dieser Linie nicht zu finden. Diese lassen sich nur in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Insekten identifizieren (Oba *et al.*, 2005). Auf Grund der Ähnlichkeit zu FadD aus *E. coli* wird ein solches Enzym als Vorläufer der 4CLL angenommen (Oba *et al.*, 2005). Ob jedoch die LACS ebenfalls aus diesem Vorläuferenzym entstanden und sich dann strukturell, nicht jedoch funktional differenzierten oder ob eine konvergente Entwicklung der eu- und prokaryotischer Gruppe stattfand, ist bislang unklar. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abb. 45 dargestellt.

#### **4.2 Die Funktion der Acyl-CoA-Synthetasen At4g05160 und At5g63380 in *A. thaliana***

Die beiden Enzyme At4g05160 und At5g63380 sind relativ konstant in der Pflanze exprimiert und zeigen ein stark redundantes Substratspektrum mit gesättigten, ungesättigten und hydroxylierten Fettsäuren. Um die biologische Bedeutung dieser Aktivität aufzuklären, wurde die entsprechende Doppelmutante *At4g05160/At5g63380* auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Es zeigte sich, dass in 13 Tage alten Pflanzen der Gehalt der freien und veresterten sehr langkettigen Fettsäuren (> C20) gegenüber Wildtyppflanzen deutlich reduziert ist. Dieser biochemische Phänotyp schlug sich jedoch nicht in einem makroskopischen Phänotyp nieder. Die Pflanzen zeigen keine Defekte in der Bereitstellung aktivierter Fettsäuren während der Keimung in Licht und Dunkelheit, keine von Wildtyppflanzen unterscheidbare Expression der peroxisomalen Fettsäuremarkergene und keine Störungen im Aufbau der Kutikula.

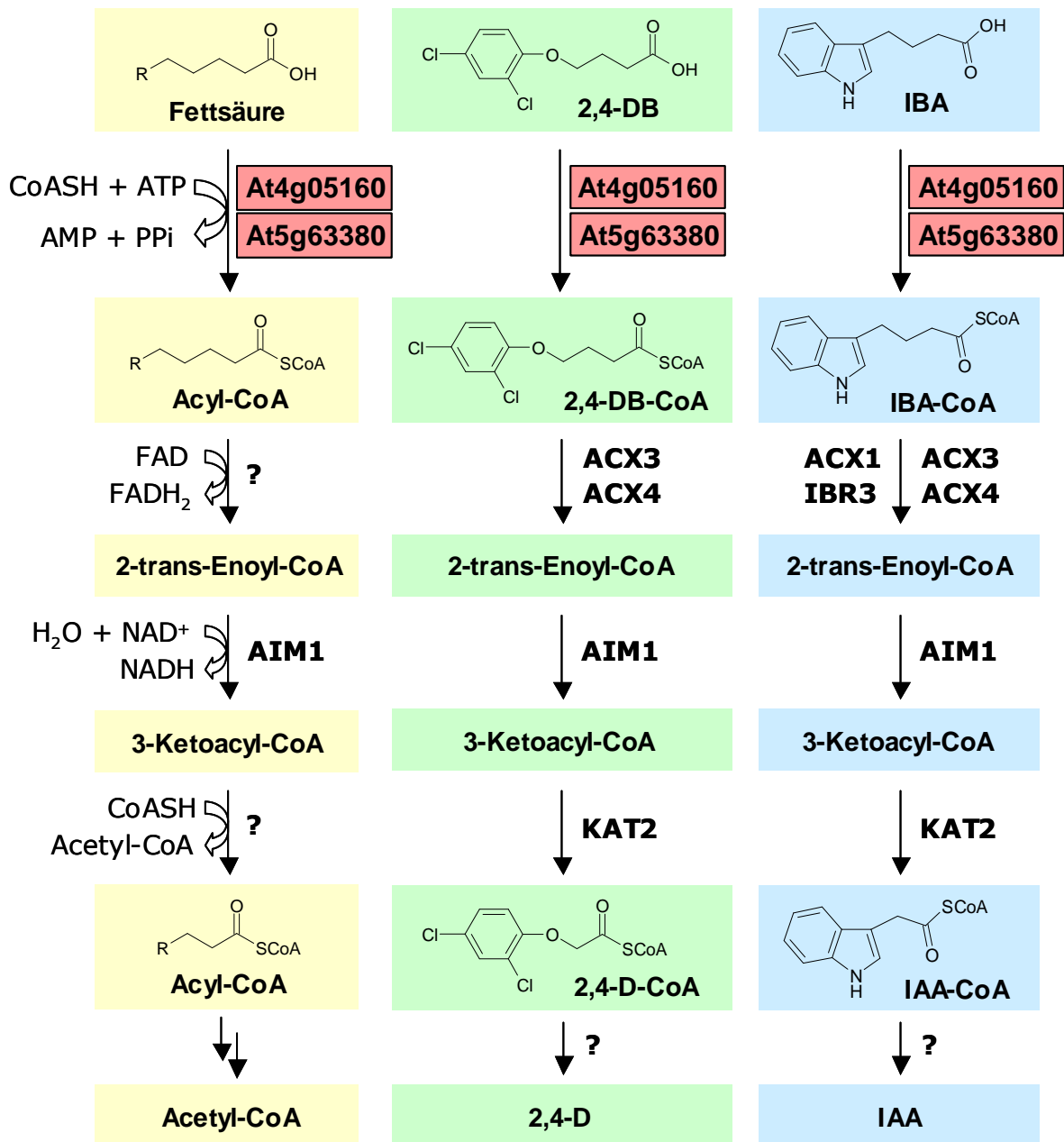
Somit blieb der einzige feststellbare Phänotyp der Doppelmutante der Gene *At4g05160* und *At5g63380* der reduzierte Gehalt der freien und veresterten sehr langkettigen Fettsäuren der

Kettenlängen C20 und C22. Dieser Befund ist zunächst erstaunlich, da durch den *Knock-out* der beiden Fettsäure umsetzenden Enzyme eine Akkumulation der freien Fettsäuresubstrate, statt einer Reduktion des Fettsäuregehaltes der Pflanzen erwartet wurde. Ein ähnliches Bild zeigt sich jedoch auch bei Mutanten der  $\beta$ -Oxidation, die essentiell in das Keimungsgeschehen involviert sind. Sowohl die Verlustmutante *cts1* des ABC-Transporters, als auch die Doppelmutante der peroxisomal lokalisierten Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 sind keimungsunfähig und akkumulieren CoA-Ester der Fettsäuren der Kettenlängen C20 und C22 (Footit *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Da die Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität in *lacs6/lacs7* ausgeschaltet ist, wäre eine Reduktion in der Menge der CoA-Ester erwartet worden. Stattdessen führt aber die Hemmung des Imports der freien Fettsäuren in die Peroxisomen in *cts1* und die Hemmung der Aktivierung der Fettsäuren in den Peroxisomen in *lacs6/lacs7* zu einem Anstieg der entsprechenden Fettsäure-CoA-Ester. Nach einem bislang akzeptierten Modell kommt es in beiden Fällen zu einem Rückstau an freien Fettsäuren im Cytosol, die dann durch eine normalerweise wenig aktive und bislang unbekanntene Acyl-CoA-Synthetase in die entsprechenden CoA-Ester umgesetzt werden. Da der CTS1-Transporter aber keine CoA-Ester langkettiger Fettsäuren transportiert, würden diese im Cytosol akkumulieren (Fulda *et al.*, 2004). Weitere Hinweise auf die *in vivo*-Funktion von At4g05160 und At5g63380 könnte also die Bestimmung der Fettsäure-CoA-Ester in der Doppel-*knock-out*-Linie geben.

Über die genaue Rolle von At4g05160 und At5g63380 in *A. thaliana* lässt sich daher zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren. So ist keimungsunfähige *lacs6/lacs7*-Mutante in der Lage zu keimen, wenn sie die nötige Energie aus Zucker gewinnen kann. In den ersten vier Tagen zeigt sich daher nicht der ansonsten übliche Abbau der Fettsäure C20:1. An Tag sieben nach der Keimung findet man allerdings eine Reduktion der Menge dieser Fettsäure auf nur noch 23 % des Anfangsgehaltes (Fulda *et al.*, 2004). Offensichtlich existieren also neben LACS6 und LACS7 weitere peroxisomal lokalisierte Acyl-CoA-Synthetasen langkettiger Fettsäuren. Eine Beteiligung der anderen LACS-Isoformen ist hierbei wenig wahrscheinlich, da diese nicht peroxisomal lokalisiert sind (Shockey *et al.*, 2002). Möglicherweise sind At4g05160 und At5g63380 für die beobachtete Aktivität verantwortlich.

Während in tierischen Organismen der Abbau von Fettsäuren in jedem Entwicklungsstadium nachgewiesen werden konnte, ist bei Pflanzen bislang nur die Rolle der  $\beta$ -Oxidation im





**Abb. 46: Funktion von At4g05160 und At5g63380 in der  $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana***

Dargestellt sind die Schritte in der  $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana* und die bereits bekannten Enzyme. Dabei sind beim Abbau der Fettsäuren nicht die Enzyme die in das Keimungsgeschehen, sondern in späteren Entwicklungsphasen involviert sind, dargestellt. At4g05160 und At5g63380 stellen möglicherweise eine *housekeeping*-Funktion dar. Die jeweiligen Co-Substrate sind beispielhaft nur für Fettsäuren angegeben. IAA: Indollessigsäure; IBA: Indolbuttersäure; 2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; 2,4-DB: 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure.

Keimungsgeschehen eindeutig geklärt. Die *aim1*-Mutante gibt jedoch durch deutlich verkleinerte Blätter und stark verzweigte Blütenstängel Hinweise darauf, dass auch bei Pflanzen die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren während der gesamten Entwicklung von Bedeutung ist (Richmond *et al.*, 1999). Auch hierbei könnten At4g05160 und At5g63380 eine Rolle spielen. Ein Modell der Funktion beider Enzyme ist in Abb. 46 dargestellt. Möglicherweise kommt beiden Enzymen eine Funktion als *housekeeping*-Acyl-CoA-Synthetasen in den Peroxisomen der pflanzlichen Zelle zu, welche unabhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze ein breites Spektrum an Fettsäuren zu den korrespondierenden CoA-Estern aktivieren. Der fehlende makroskopische Phänotyp der Mutanten zeigt allerdings, dass es weitere Enzyme redundanter Aktivität geben muss, die im Falle des Ausfalls von At4g05160 und At5g63380 deren Funktion übernehmen. Eine weitere mögliche Funktion beider Enzyme im Indolbuttersäuremetabolismus in *A. thaliana* wird in Kap. 4.7 diskutiert.

#### **4.3 Die Funktion von At1g62940 in der Aktivierung von Hydroxyfettsäuren in *A. thaliana***

At1g62940 stellt ein weiteres 4CLL dar, dessen Funktion in *A. thaliana* wahrscheinlich in der Aktivierung von Fettsäuren liegt. So wurde gezeigt, dass es gesättigte, ungesättigte und hydroxylierte Fettsäuren in die korrespondierenden CoA-Ester umsetzt. Es akzeptiert jedoch keine Zimtsäurederivate als Substrate. *At1g62940* ist spezifisch in Stadium neun der Blütenentwicklung exprimiert und eine Mutante wird in der öffentlich zugänglichen *Riken Arabidopsis Phenome Information Database* als männlich steril beschrieben (Kuromori *et al.*, 2006). In Abschnitt 4.2.2 wird diskutiert, dass dieser Phänotyp wahrscheinlich nicht mit einer Funktion in der Jasmonsäurebiosynthese verknüpft werden kann. Jedoch ergibt die weitergehende Analyse von At1g62940 entscheidende Hinweise auf seine Funktion. Die Gruppe der At1g62940-Orthologen bildet eine eigene, evolutionär separierte Untergruppe, deren hoch konservierte Vertreter auch in anderen Angiospermen wie Reis (*Oryza sativa*) und Pappel (*Populus spec.*) gefunden werden. Außerdem werden die Orthologen auch in Moosen (*Physcomitrella patens*), nicht jedoch in Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*) identifiziert (unveröffentlichte Daten C. Douglas). Dieses Verbreitungsmuster der Orthologen und ein identisches Expressionsmuster lässt sich bei Enzymen, die an der Biosynthese der Pollenwand beteiligt sind, wie der Monooxygenase CYP703A2, wieder finden (Morant *et al.*, 2007). Hier

konnte gezeigt werden, dass in Verlustmutanten die Synthese des Sporopollenins, eines Biopolymers, das aus Lipiden und Phenolen besteht, gestört ist, was in einem männlich sterilen Phänotyp der Pflanzen resultiert (Osthoff *et al.*, 1987; Wilmesmeier *et al.*, 1995; Meuter-Gerhards *et al.*, 1999; Morant *et al.*, 2007). Eine genauere Analyse des Sporopollenins zeigt, dass es aus Estern und Ethern von Hydroxyfettsäuren und Hydroxyzimtsäuren besteht und den Pollen vor äußeren Witterungseinflüssen schützt. Für die Biosynthese dieses Polymers wird die Existenz mindestens einer CoA-Ligase erwartet (Wehling *et al.*, 1989; Morant *et al.*, 2007). Da die Aktivierung von Hydroxyzimtsäuren durch At1g62940 in den *in vitro*-Experimenten ausgeschlossen werden konnte, ist dieses Enzym mit hoher Wahrscheinlichkeit die Acyl-CoA-Synthetase, die aktivierte Hydroxyfettsäuren für die Biosynthese des Sporopollenins bereitstellt. Die evolutionäre Bedeutsamkeit dieser enzymatischen Aktivität ist grundlegend, da der Schutz des Pollens vor Trockenheit und UV-Strahlung eine der essentiellen Anpassungen der Pflanzen ist, die eine Besiedelung des Landes erst möglich machten (Eglinton *et al.*, 1991; Morant *et al.*, 2007).

#### 4.4 Die Aktivierung von Jasmonsäurevorstufen durch 4CLs

Die Biosynthese des Phytohormons Jasmonsäure ist bis auf wenige enzymatische Schritte aufgeklärt (siehe Kap. 1.5.2). Im ersten Teil der Biosynthese wird in den Chloroplasten  $\alpha$ -Linolensäure in das Cyclopentenon OPDA umgesetzt (Schaller *et al.*, 2001; Gobel *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003). Da die weiteren Schritte der Jasmonsäurebiosynthese in den Peroxisomen ablaufen (Miersch *et al.*, 2000), wird OPDA ins Cytosol exportiert und anschließend durch den ABC-Transporter CTS1 sowie einen postulierten Ionenfallenmechanismus für OPDA<sup>H</sup> ins Peroxisom transportiert (Theodoulou *et al.*, 2005). In den Peroxisomen wird OPDA dann durch weitere enzymatische Schritte in Jasmonsäure umgesetzt. Nach dem bisherigen Modell wird OPDA zunächst durch die OPDA-Reduktase-3 (OPR3) zum Cyclopentanon OPC-8 reduziert (Schaller *et al.*, 2000; Stintzi *et al.*, 2000). Anschließend sollte OPC-8 durch eine unbekannte CoA-Ligase aktiviert und im Folgenden durch  $\beta$ -Oxidation zu Jasmonsäure verkürzt werden. Schon vor Beginn dieser Arbeit wurde für drei 4CLs gezeigt, dass diese *in vitro* die Jasmonsäurevorstufen OPC-6 und OPDA, nicht jedoch OPC-8, umsetzen (At4g05160, At5g63380, At1g20500) (Schneider *et al.*, 2005;

Doktorarbeit K. Schneider; Diplomarbeit L. Kienow). Im Rahmen dieser Arbeit konnten noch zwei weitere Enzyme, At1g20510 und At1g62940 identifiziert werden, die unter *in vitro*-Bedingungen Jasmonsäurevorstufen aktivieren. Dabei aktiviert At1g20510 das größte Spektrum an Jasmonsäurevorstufen, nämlich OPC-8, OPDA, dnOPDA und OPC-6, wobei OPC-8 mit der höchsten katalytischen Effizienz aller untersuchten Substrate umgesetzt wird. Außerdem akzeptiert At1g62940 OPC-8 als Substrat. Die Aktivierung der Jasmonsäurevorstufen zum entsprechenden CoA-Ester in *A. thaliana* ist damit auf Grund des Substratspektrums der 4CLLs möglicherweise deutlich komplexer und entgegen der bisherigen Annahmen nicht nur auf OPC-8 beschränkt.

Interessanterweise besitzen die 4CLLs gegenüber den diversen Jasmonsäurevorstufen einen strikteren Mechanismus der Substratselektion als dies bei Fettsäuren der Fall ist. So akzeptiert beispielsweise At5g63380 eine Bandbreite an Fettsäuren verschiedener Sättigungsgrade und Kettenlängen, sowie hydroxylierte Fettsäuren. Bezüglich der Jasmonsäurevorstufen aktiviert es hingegen nur OPDA nicht jedoch das, sich nur durch den Sättigungsgrad einer Bindung unterscheidende OPC-8 oder das um zwei Kohlenstoffeinheiten verkürzte dnOPDA.

#### **4.5 Die Funktion der 4CLLs in der Jasmonsäurebiosynthese in *A. thaliana***

Zur Klärung der Frage, welche der *in vitro* beobachteten Aktivitäten der 4CLLs mit Jasmonsäurevorstufen auch in *A. thaliana* von Bedeutung ist, wurden verschiedenen Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten von At1g20510, At1g20500, At4g05160 und At5g63380 isoliert und untersucht. Zunächst zeigte sich, dass keine der Pflanzen männliche steril war, wie dies bei einem vollständigen Mangel an Jasmonsäure zu erwarten gewesen wäre (Stintzi *et al.*, 2002; von Malek *et al.*, 2002). Biochemische Analysen der Jasmonatmengen nach Verwundung ergaben dagegen, dass die fehlende enzymatische Aktivität von At1g20510 in den Einzel- und der Tripelmutante mit At4g05160/At5g63380 zu einer Reduktion des Jasmonsäuregehalts auf 50 – 60 % der Wildtypmenge führt. Korrespondierend zu dieser signifikanten Absenkung der Jasmonsäuremenge war auch eine starke Akkumulation der Vorstufen OPC-8, OPC-6 und OPC-4 zu beobachten. Darüber hinaus führte der Ausfall von At1g20510 bereits in unverwundeten Pflanzen zur Akkumulation von OPC-8 und OPC-6. Diese beiden Vorstufen entsprechen auch den unter *in vitro*-Bedingungen aktivierten Substraten, wobei OPC-8 aus der

OPDA-Reduktion entsteht und das zu aktivierende Hauptsubstrat sein sollte (Schaller *et al.*, 2000; Miersch *et al.*, 2000). Während OPC-6 durch einen Nebenweg der Jasmonsäurebiosynthese gebildet wird und daher eine weniger zentrale Rolle in der Pflanze einnimmt (Weber *et al.*, 1997). Entsprechend wurde OPC-8 *in vitro* von At1g20510 am effektivsten umgesetzt. Doch aktiviert dieses Enzym *in vitro* auch OPDA und dnOPDA. Ob diese beiden Vorstufen auch in der Pflanze einer Aktivierung unterliegen ist bislang unbekannt, doch könnte die Aktivierung der beiden Jasmonsäurevorstufen zum Import ins Peroxisom beitragen, in einem ähnlichen Prozess wie dem des Fettsäureimports mittels *vectorial acylation* in Bakterien, Hefen und Säugetieren (Overath *et al.*, 1969; Black *et al.*, 1992; Faegemann *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2006). Diese Vermutung steht jedoch in Widerspruch mit dem bislang akzeptierten Modell der Jasmonsäurebiosynthese, nachdem zunächst OPDA zu OPC-8 reduziert wird. Auch wurde bislang noch nicht untersucht, ob die Reduktase OPR3 in der Lage ist OPDA-CoA als Substrat zu akzeptieren. Ein Modell der Funktion von At1g20510 in der Jasmonsäurebiosynthese ist in Abb. 47 dargestellt.

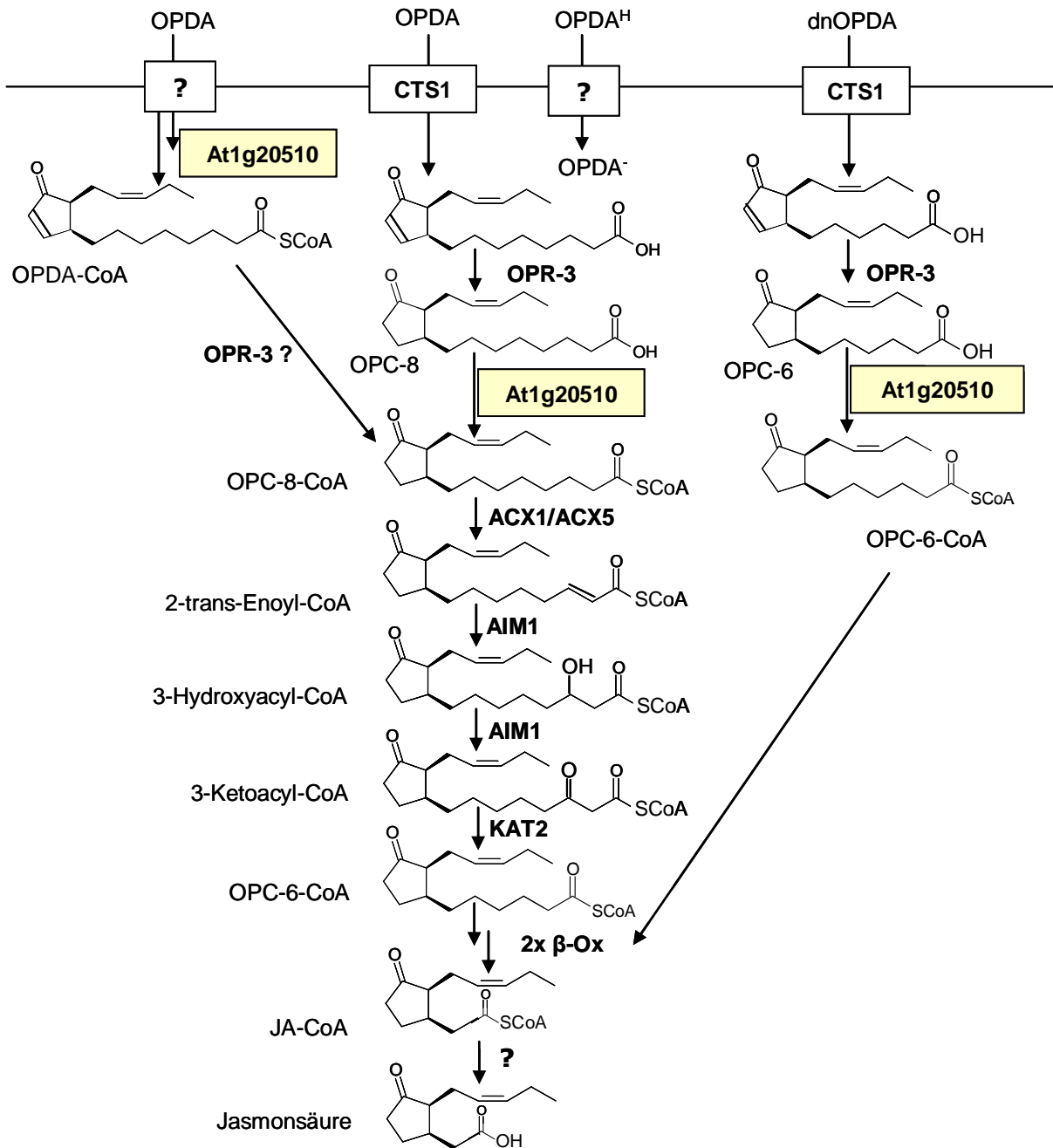
Überraschend bei der Analyse der internen Jasmonatmengen in *Knock-out*-Linien von At1g20510 war, dass OPC-4 in hohem Maße akkumulierte. Diese Vorstufe wird nur als Zwischenprodukt im Verlauf der  $\beta$ -Oxidation angesehen und sollte daher nicht als freie Säure, sondern nur an CoA verestert vorgefunden werden (Miersch *et al.*, 2000). Möglicherweise wird durch den Ausfall der Aktivität von At1g20510 die  $\beta$ -Oxidation der Jasmonsäurevorstufen so gestört, dass eine Thioesterase-Aktivität CoA von OPC-4 abspaltet. Dieses Enzym wird für die Deaktivierung des Zwischenprodukts Jasmonoyl-CoA zu Jasmonsäure postuliert. Da OPC-4 in der Pflanze nicht mit hoher Effizienz wieder zum CoA-Ester aktiviert wird, akkumuliert diese Vorstufe zunächst in relativ hohen Mengen.

Nachdem die Analysen der *in vitro*- und *in vivo*-Funktion von At1g20510 im Rahmen dieser Arbeit fast abgeschlossen waren, wurde die Funktion dieses Gens in der Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (Koo *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse bestätigten die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten. Auch diese Gruppe analysierte den wundinduzierten Anstieg der Jasmonsäuremenge in *Knock-out*-Pflanzen des Gens At1g20510 und fand eine Reduktion des Jasmonsäuregehalts auf 50 – 60 % des Wildtyplevels. Die publizierten *in vitro*-Daten beschränken sich auf die Untersuchung zum Umsatz von OPDA und OPC-8 durch heterolog

exprimiertes Protein, eine Aktivierung der weiteren Substrate dnOPDA und OPC-6 wurde nicht untersucht. Eine genaue enzymkinetische Charakterisierung ist nicht ausführlich dargelegt. Es werden lediglich zwei  $K_M$ -Werte angegeben, die prinzipiell den in dieser Arbeit ermittelten Werten entsprechen. Für OPDA wurde für At1g20510 ein  $K_M$  von 24  $\mu\text{M}$  angegeben, dies entspricht dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von  $27 \mu\text{M} \pm 13 \mu\text{M}$ . Für OPC-8 wird ein  $K_M$  von 45  $\mu\text{M}$  angegeben, während in dieser Arbeit eine Michaelis-Konstante von  $19 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$  ermittelt wurde. Der Grund für diese leichte Diskrepanz lässt sich nicht klären, da in der publizierten Arbeit (Koo *et al.*, 2006) weder eine Standardabweichung noch weitere enzymkinetische Parameter angegeben wurden. Er liegt jedoch möglicherweise in der Reinheit der eingesetzten Substrate begründet.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen 4CLLs wurde auch für At1g62940 eine *in vitro*-Aktivität gegenüber OPC-8 gefunden. Außerdem ist die Verlustmutante von At1g62940 männlich steril (*Riken Arabidopsis Phenome Information Database*; Kuromori *et al.*, 2006). Somit wäre eine Funktion des Enzyms in der Aktivierung von Jasmonsäurevorstufen möglich, da Mutanten wie *dde2-2* oder *opr3*, deren Genprodukte essentiell für die Jasmonsäurebiosynthese sind, ebenfalls eine männliche Sterilität aufweisen (Stintzi *et al.*, 2002; von Malek *et al.*, 2002). Ein weitergehender Vergleich mit diesen Mutanten zeigt jedoch, dass eine Beteiligung von At1g62940 an der Jasmonsäurebiosynthese eher unwahrscheinlich ist. So sind *opr3*-Mutanten männlich steril, können aber durch Applikation von Methyljasmonat auf die Blüten ihre Fertilität wieder erlangen. Dies gelingt allerdings nur wenn sich die Blüten im Entwicklungsstadium 12 befinden (Stintzi *et al.*, 2002). At1g62940 ist aber spezifisch nur im Stadium neun der Blütenentwicklung exprimiert (Morant *et al.*, 2007). Da der Übergang vom Stadium neun in das Stadium 12 drei Tage dauert (Smyth *et al.*, 1990), lässt dies eine Beteiligung von At1g62940 an der Jasmonsäurebiosynthese eher unwahrscheinlich erscheinen. Eine wahrscheinliche Funktion dieses Enzyms in der Aktivierung von Fettsäuren in der Pollenentwicklung wurde bereits in Kap. 4.3 diskutiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den fünf 4CLLs mit *in vitro*-Aktivitäten gegenüber Jasmonsäurevorstufen anscheinend in *A. thaliana* nur At1g20510 an der Aktivierung von Jasmonsäurevorstufen beteiligt ist, während für die übrigen vier Enzyme dies zumindest unter den untersuchten Bedingungen und Entwicklungsstadien der Pflanze nicht zutrifft. *Knock-out-*



**Abb. 47: Funktion von At1g20510 und  $\beta$ -Oxidationsschritte in der Jasmonsäurebiosynthese in *A. thaliana***

Dargestellt ist der peroxisomal lokalisierte Teil der Jasmonsäurebiosynthese und die bereits identifizierten Enzyme aus *A. thaliana*. Dabei entspricht der Weg über OPDA der Hauptbiosyntheseroute, der Weg über dnOPDA einer Nebenroute. Die dargestellte Möglichkeit, dass OPDA vor der Reduktion aktiviert wird ergibt sich aus dem Substratspektrum von At1g20510. In diesem Fall wäre auch ein Import über einen *vectorial* acylation-Mechanismus möglich.

Pflanzen von *At1g20510* weisen jedoch noch genügend Jasmonsäure auf und haben daher keinen makroskopischen Phänotyp. Daraus lässt sich schließen, dass weitere Adenylat bildende Enzyme in *A. thaliana* an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligt sein müssen. Der Stammbaum der 4CLLs umfasst noch 15 weitere Enzyme, die größtenteils noch uncharakterisiert sind. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich hier weitere Jasmonsäurebiosynthese-Enzyme identifizieren lassen.

#### **4.6 Die Wirkung von Jasmonaten auf die Genexpression der 4CLLs**

Ein gemeinsames Merkmal der an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligten Enzyme ist, dass die Expression der korrespondierenden Gene durch das Endprodukt Jasmonsäure koordiniert aktiviert wird, d.h. einem positiven *Feedback*-Mechanismus unterliegt. Da Jasmonsäure als Mediator der Resistenz gegen Herbivoren fungiert, induziert eine Verwundung des Pflanzengewebes die Biosynthese und somit die Expression von *AOS*, *AOC*, *LOX*, *OPR3* (Sasaki *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 2000; Maucher *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2000).

Da *At1g20510* eine Funktion in der Jasmonsäurebiosynthese zugewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob auch seine Genexpression dieser charakteristischen Aktivierung unterliegt. Dazu wurden zunächst Reporterpflanzen erstellt. Deren Analyse zeigte, dass die Expression von *At1g20510* in den Blättern adulter Pflanze hauptsächlich auf das Leitgewebe konzentriert ist, bei Verwundung jedoch stark induziert wird und sich über die gesamte Blattfläche ausbreitet. Auch eine Behandlung der Pflanzen mit phytopathogenen Bakterien oder mit Jasmonaten führt zu einer starken Induktion der Genexpression. Somit wurde die Existenz des positiven *Feedback*-Mechanismus auch für die CoA-Ligase der Jasmonsäurebiosynthese bestätigt. Ein Vergleich mit publizierten Reporterpflanzen von *AOS*, *LOX3* und *LOX4*, deren Genprodukte an der Jasmonsäurebiosynthese beteiligt sind, zeigt außerdem, dass alle ein identisches Expressionsmuster in den Leitgeweben der Pflanze aufweisen (Kubigsteltig *et al.*, 1999; Vellosillo *et al.*, 2007). Da für Jasmonsäure eine Funktion als Langstreckensignal in der systemisch induzierten Resistenz (SAR) der Pflanze gegen Pseudomonaden nachgewiesen wurde, entspricht die Lokalisierung der Biosyntheseenzyme im Leitgewebe der Pflanze der postulierten Rolle von Jasmonsäure in der Signaltransduktion (Truman *et al.*, 2007). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte bei der Analyse der Reporterpflanzen von *At1g20510* eine



Induktion der Genexpression durch die Infiltration von phytopathogenen Pseudomonaden beobachtet werden.

Außerdem wurde in diesen Linien die Aktivierung des Promotors von *At1g20510* durch unterschiedliche Jasmonate untersucht. Dabei zeigte sich, dass Jasmonsäure und Methyljasmonat im Vergleich mit anderen Jasmonaten eher schwache Aktivatoren sind. Von den natürlich vorkommenden Jasmonaten hatten OPDA und OPC-8 den stärksten Effekt auf die Genexpression. Im Gegensatz dazu wurden jedoch die Expression in Kontrollpflanzen mit einem *LOX2*-Promotor am stärksten durch Methyljasmonat und das kurzkettige OPC-4 aktiviert. Diese Unterschiede könnten darauf hinweisen, dass die Expression von *At1g20510* und möglicherweise aller Enzyme des zweiten, peroxisomalen Syntheseabschnitts durch einen bislang nicht beschriebenen *Feedforward*-Mechanismus reguliert wird. Für eine abschließende Klärung bedarf es allerdings noch weiterer Analysen, beispielsweise mit weiteren Reportergermpflanzen von Enzymen aus den unterschiedlichen Abschnitten der Jasmonsäurebiosynthese.

Interessanterweise aktivierten OPDA und OPC-8 die Genexpression von *At1g20510* gleich stark. Bislang wurde angenommen, dass OPDA die Aktivierung der Genexpression über die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Bindung des Kohlenstoffs vermittelt (Alméras *et al.*, 2003). Da OPC-8 aber das reduzierte Molekül darstellt, ist offensichtlich eher die Länge der Seitenkette entscheidend. Korrespondierend dazu aktiviert das zweite Molekül, das eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Bindung trägt, aber eine kürzere Seitenkette besitzt, dnOPDA, die Genexpression eher schwach. Dieser Effekt wurde auch in einer anderen Genexpressionsstudie beobachtet und regt zum Überdenken des bislang akzeptierten Modells der Signalmediation von Jasmonaten an (Taki *et al.*, 2005).

Da die Analyse der Mutanten von *At1g20510* auf die Existenz weiterer CoA-Ligasen in der Jasmonsäurebiosynthese hindeutet, wurden alle 4CLL-Gene einer *in silico*-Analyse der Koexpression mit Genen der Jasmonsäurebiosynthese unterzogen. Hierbei zeigte sich jedoch, dass nur *At1g20510* signifikante Ko-Regulation mit weiteren Genen der Jasmonsäurebiosynthese, wie *OPR3* oder *LOX3*, sowie mit dem Transkriptionsfaktor der Jasmonsäuresignaltransduktion, *MYC2*, aufweist. Die Expressionsanalysen von verwundeten Pflanzen mittels RT-PCR-Analyse ergab, dass auch die Expression der 4CLLs *At1g20490* und *At5g38120* durch die Verwundung stimuliert wird. Bei *At1g20490* handelt es sich

wahrscheinlich um ein Pseudogen. Für At5g38120 konnte bislang in keinem Test ein Substrat oder eine Aktivität identifiziert werden. Daher stellt sich dieses 4CLL als der bislang einzig weitere Kandidat einer Jasmonsäurevorstufen aktivierenden CoA-Ligase heraus und sollte in Zukunft weiter analysiert werden.

#### **4.7 Die Funktion der 4CLLs At4g05160 und At5g63380 im Auxinmetabolismus**

Die Gesamtarchitektur einer Pflanze und viele Wachstums- und Entwicklungsprozesse werden durch Auxine, insbesondere IAA, gesteuert (Davies 1995). In *A. thaliana* wird IAA unter anderem in Form von IBA gespeichert (Ludwig-Müller *et al.*, 1993 a und b; Bartel *et al.*, 2001; Zolman *et al.*, 2007). Da IBA im Vergleich zu IAA eine um eine Ethyleneinheit verlängert Seitenkette besitzt, ist zur Freisetzung von IAA aus IBA ein  $\beta$ -Oxidationszyklus notwendig. Dieser Abbau durch peroxisomale  $\beta$ -Oxidation ist bis auf wenige Schritte bereits aufgeklärt (Eastmond *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2005; Richmond *et al.*, 1999; Rylott *et al.*, 2006; Zolman *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2006). Die Identität der notwendigen IBA:CoA-Ligase war in *A. thaliana* allerdings bislang unbekannt (Bartel *et al.*, 2001; Zolman *et al.*, 2007). Analog zum Mechanismus der  $\beta$ -Oxidation von IBA wird auch das synthetische Auxin 2,4-DB zu 2,4-D verkürzt. Dabei ist bei den bislang identifizierten Enzymen eine Funktion im Abbau von IBA immer mit derselben Rolle in der  $\beta$ -Oxidation von 2,4-DB gekoppelt (Zolman *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 4CLLs auf die Fähigkeit zur Aktivierung von IBA und 2,4-DB hin untersucht. Unter *in vitro*-Bedingungen zeigte sich, dass At4g05160 und At5g63380 neben ihrer vornehmlichen Aktivität mit Jasmonsäurevorstufen und Fettsäuren auch eine geringe Aktivität mit IBA und 2,4-DB aufweisen. Beide setzen die Prohormone 2,4-DB und IBA *in vitro* um, allerdings mit einer erheblich geringeren Effektivität als Fettsäuren; so ist die katalytische Effizienz von At4g05160 mit Nonansäure um das 230-fache höher als die für 2,4-DB. Dennoch konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen eindeutig die Entstehung der CoA-Ester von IBA und 2,4-DB unter *in vitro*-Bedingungen durch At4g05160 nachgewiesen werden. Somit lässt sich festhalten, dass At4g05160 *in vitro* als CoA-Ligase von IBA und 2,4-DB fungieren kann. Ähnliches trifft vermutlich auch auf At5g63380 zu, die entsprechenden massenspektroskopischen Untersuchungen stehen allerdings noch aus.

Offenbar ist das breite Substratspektrum vielen Enzymen des IBA-Metabolismus gemein. Es wurde sowohl für das Multifunktionsprotein AIM1, den ABC-Transporter CTS1 als auch die Thiolase KAT2 gefunden, dass sie nicht nur am Abbau von IBA beteiligt sind, sondern auch eine Funktion in der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren oder Jasmonsäurevorstufen besitzen (Richmond *et al.*, 1999; Zolman *et al.*, 2000 und 2001; Footitt *et al.*, 2002). Auch die Acyl-CoA-Oxidasen ACX1, ACX3 und ACX4 oxidieren Fettsäuren und weisen dabei *in vitro* ein völlig unterschiedliches Substratspektrum auf. Alle korrespondierenden *Knock-out*-Pflanzen zeigen aber eine erhöhte Resistenz gegenüber IBA (Hayashi *et al.*, 1999; Hooks *et al.*, 1999; Eastmond *et al.*, 2000; Froman *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2005). Bislang konnte jedoch der Umsatz von IBA-CoA durch die Oxidasen nicht analysiert werden, da IBA-CoA kommerziell nicht erhältlich ist und bislang die Syntheseveruche unter Einsatz einer mikrobiellen Acyl-CoA-Synthetase scheiterten (Zolman *et al.*, 2007). Möglicherweise könnte At4g05160 zukünftig für die Synthese von IBA-CoA eingesetzt werden.

Die Untersuchung der Funktion von At4g05160 und At5g63380 *in planta* zeigte, dass die Doppelmutante eine Resistenz gegenüber externem 2,4-DB und IBA, nicht aber gegen 2,4-D und IAA aufweist, während im Wildtyp alle vier Substanzen zu einer Hemmung des Wurzelwachstums führen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung zum CoA-Ester eine notwendige Voraussetzung für die  $\beta$ -Oxidation von 2,4-DB und IBA ist, die von At4g05160 und At5g63380 ausgeführt wird. Eine Expression der entsprechenden cDNAs in den Doppelmutanten führt wiederum zur erhöhten Sensitivität gegenüber den Auxinen. Die abschließende Bestimmung der internen Auxin-Mengen in 13 Tage alten Pflanzen ergab, dass die Doppelmutanten erhöhte Mengen an freier IBA und erniedrigte Mengen an IAA, jedoch konstante Mengen der konjugierten Auxine, im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit At4g05160 und At5g63380 erstmalig zwei Enzyme identifiziert werden konnten, welche IBA und 2,4-DB zu den entsprechenden CoA-Estern aktivieren können, wobei At4g05160 wahrscheinlich eine bedeutendere Funktion zukommt. Ein Modell der Funktion beider Enzyme in *A. thaliana* ist in Abb. 46 dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Funktion von IBA als Speichervariante von IAA, da die Erhöhung der Level an freier IBA durch einen Block in der  $\beta$ -Oxidation sich direkt auf die Menge an freier IAA in der Pflanze auswirkt. Da die Veränderung der Menge an IBA keine

Auswirkungen auf den Phänotyp der Mutante hat scheint IBA keine eigene Wirkung zu besitzen. Jedoch tritt bei einigen anderen Mutanten des IBA-Metabolismus eine veränderte Anzahl von Seitenwurzeln auf (Zolman *et al.*, 2001 und 2004; Woodward *et al.*, 2005). Daher sind enzymatisch redundante CoA-Ligase-Aktivitäten zu At4g05160 und At5g63380 anzunehmen. Hierfür kämen die übrigen 15, bisher nicht charakterisierten 4CLLs aus *A. thaliana* in Frage. Ausgeschlossen werden können hingegen LACS6 und LACS7. Die *lacs6/lacs7*-Doppelmutante der beiden am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme zeigt keine Resistenz gegenüber 2,4-DB (Fulda *et al.*, 2004). Da eine Resistenz gegenüber 2,4-DB bislang immer mit einer Resistenz gegenüber IBA gekoppelt war, besitzen die beiden LACS wohl keine IBA:CoA-Ligase-Aktivität (Zolman *et al.*, 2000).

Darüber hinaus war bei der Analyse der gewebespezifische Expression von At5g63380 durch Reportergermpflanzen ein interessantes Expressionsmuster zu beobachten. In Reporterpflanzen im Ökotyp Col0 wurde At5g63380 spezifisch verstärkt in einer Gruppe von Mesophyllzellen direkt unter den Blatthaaren exprimiert. Im trichomlosen Ökotyp Col5 war eine entsprechend verstärkte Expression des Reportergens nicht mehr zu sehen. Somit besitzt At5g63380 ein Trichom assoziiertes Expressionsmuster. Die spezifische Mesophyllzellgruppe ist bislang noch nicht im Zusammenhang mit Trichomen beschrieben worden. Doch kann die Existenz dieses Proteins unter den Blatthaaren möglicherweise mit dem Auxinmetabolismus in Zusammenhang gebracht werden. So wurde gezeigt, dass Trichome bzw. Mesophyllzellen sekundäre Produktionsorte für freies Auxin sind und eine Rolle in der Auxin gesteuerten Blattmorphogenese einnehmen (Aloni *et al.*, 2003). Einen direkten Einfluss auf die Anzahl und Morphologie der Blatthaare scheint At5g63380 hingegen nicht zu besitzen, da diese in Doppel-*knock-out*-Pflanzen der Gene At5g63380 und At4g05160 im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren.

#### 4.8 Weitere Funktionen von 4CLLs

Für vier weitere Vertreter der 4CLLs (At3g48990, At1g20480, At1g20490, At5g38120) wurden bereits zuvor und im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt (Doktorarbeit K. Schneider). Die bisherigen Ergebnisse lassen bisher noch keine eindeutige Funktion erkennen. Da von At1g20490 keine vollständige cDNA identifiziert werden kann, scheint es sich um ein

Pseudogen zu handeln. Im Gegensatz dazu waren At1g20480 und At5g38120 in keinem der Tests enzymatisch aktiv. Möglicherweise benötigen die beiden Enzyme zur Aktivierung posttranslationale Modifizierungen, die bei einer heterologen Expression in *E. coli* nicht eingeführt werden, oder andere Substrate, die in der bisher angebotenen Auswahl nicht untersucht wurden. Von At3g48990 konnte erstmalig eine enzymatische Aktivität detektiert werden, die Identität des akzeptierten Substrats ist jedoch bislang unbekannt. Dieses Enzym setzte *in vitro* CoA- und ATP-abhängig eine Verunreinigung in der Charge des 4-Hydroxyphenylpyruvats um, wie durch die chromatographische Auftrennung dieses Substanzgemisches gezeigt werden konnte. Vermutlich handelt es sich bei diesem Substrat um eine Substanz des allgemeinen, primären Stoffwechselgeschehens in *A. thaliana*, da das Gen *At3g48990* in sehr großer Menge und konstitutiv in allen Geweben exprimiert ist (Shockey *et al.*, 2003). Von besonderem Interesse ist die Funktion dieses Enzyms deshalb, weil eine Mutante identifiziert wurde, die einen drastischen Defekt in der Wurzelentwicklung besitzt (persönliche Kommunikation P. Eastmond).

#### 4.9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die weitere Charakterisierung der 4CLLs aus *A. thaliana* war erfolgreich. Es zeigte sich, dass die Strategie von der *in vitro*-Aktivität ausgehend die *in vivo*-Funktion zu untersuchen auf Grund der hohen enzymatischen Redundanz in dieser Enzymfamilie sinnvoll war. Die Gruppe B der 4CLLs wurde somit als eine neue Gruppe von Acyl-CoA-Synthetasen identifiziert, die entgegen den bislang etablierten LACS dem prokaryotischen Typus entsprechen. Damit stellen sich interessante Fragen, sowohl nach der Evolution der gesamten Enzymfamilie in *A. thaliana*, als auch nach dem Mechanismus der Substratselektion. So setzen einige 4CLLs sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren verschiedenster Kettenlängen um, aktivieren andererseits aber nur eine einzige Jasmonsäurevorstufe. Die Untersuchung des Mechanismus der Substratselektion könnte einerseits durch die Aufklärung der Kristallstruktur erfolgen, andererseits wären auch die Grundlagen für die Durchführung eines *directed evolution*-Ansatzes gegeben.

Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit zuvor nicht identifizierte Enzymaktivitäten in wichtigen Stoffwechselwegen beschrieben. So konnten im Metabolismus der Hormone

Jasmonsäure und Auxin die aktivierenden enzymatischen Aktivitäten, also eine OPC-8:CoA-Ligase und zwei IBA:CoA-Ligasen charakterisiert werden. Analysen der entsprechenden Mutanten zeigten die Komplexität des enzymatischen Netzwerks in der Pflanze auf. In Zukunft wird wohl die größte Herausforderung zur weiteren Charakterisierung von 4CLLs in der Überwindung der enzymatischen Redundanz der CoA-Ligasen liegen. Dazu wäre es zunächst sinnvoll, der Strategie weiter zu folgen und eine Bestimmung der *in vitro*-Aktivität der verbleibenden, noch uncharakterisierten 15 4CLLs durchzuführen. Dann könnte eine gezielte weitere funktionale Analyse in *A. thaliana* über die Erstellung von Mehrfachmutanten durchgeführt werden. Korrespondierend zu der Vielzahl an noch uncharakterisierten Enzymen werden auf Grund von Vergleichen mit primären und sekundären Stoffwechselwegen anderer Organismen noch weitere, bislang unidentifizierte CoA-Ligase-Aktivitäten in *A. thaliana* postuliert. So werden beispielsweise im Dicarboxylatmetabolismus Malat:CoA-Ligasen, im Geraniol-Abbau Citronellat:CoA-Ligase und im Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin Hydroxyphenylacetat:CoA-Ligasen vermutet.

## Literaturverzeichnis

- Adham AR, Zolman BK, Millius A, Bartel B** (2005) Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in  $\beta$ -oxidation, *Plant J* 41, 859-874
- Alm ras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, M ne-Saffran  L, Farmer EE** (2003) Reactive electrophile species activate defence gene expression in *Arabidopsis*, *Plant J* 34, 205-216
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*, *Planta* 216, 841-53
- Babbitt PC, Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang KH, Liang PH, Dunaway-Marino D** (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of the amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases, *Biochemistry* 24, 5594-604
- Baker A, Graham IA, Holdsworth M, Smith SM, Theodoulou FL** (2006) Chewing the fat: $\beta$ -oxidation in signalling and development, *Trends Plant Sci* 11, 1360-1385
- Bar-Tana J, Rose G, Brandes R, Shapiro B** (1973) Palmitoyl-coenzym A synthetase: mechanism of reaction, *Biochemistry J* 131, 199-209
- Bartel B, LeClere S, Magidin M, Zolman BK** (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation, *J Plant Growth Reg* 20, 198-216
- Beevers H** (1961) Metabolic production of sucrose from fat, *Nature* 191, 433-36
- Bell E, Creelmann RA, Mullet JE** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12053-12058
- Berger J, Truppe C, Neumann H, Forss-Petter S** (1998) A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern, *Biochem Biophys Res Commun* 247, 255-260
- Bibb MJ, Shermann DH, Omura S, Hopwood DA** (1994) Cloning, sequencing and deduced function of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin, *Gene* 142, 31-39
- Black PN, DiRusso CC, Metzger AK, Heimert TL** (1992) Cloning, sequencing and expression of the *fadD* gene from *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase, *JBC* 267, 25513-20
- Boter M, Ru z-Rivero O, Abdeen A, Prat S** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signalling both in tomato and *Arabidopsis*, *Genes Dev* 18, 1577-91

- Bradford MA** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254
- Browse J** (2005) Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants, *Vitam Horm* 72, 431-56
- Caviglia JM, Li LO, Wang S, DiRusso CC, Coleman RA, Lewin TM** (2004) Rat long chain acyl-CoA synthetase 5, but not 1, 2, 3, or 4, complements *E.coli* fadD, *JBC* 279, 11163-11169
- Chang KH and Dunaway-Mariano D** (1996) Determination of the chemical pathway for 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase catalysis, *Biochemistry* 35, 13478-13484
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, López-Vidriero, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling, *Nature* 448, 666-671
- Conti E, Franks NP, Brick P** (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes, *Structure* 4, 287-298
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel M, Brick P** (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S, *EMBO* 16, 4174-4183
- Cooper TG, Beevers H** (1969)  $\beta$ -oxidation in glyoxisomes from castor bean endosperm, *JBC* 244, 3514-20
- Costa MA, Bedgar DL, Syed GA, Moinuddin SG, Kim KW, Cardenas CL, Cochrane FC, Shockey JM, Helms GL, Amakura Y, Takahashi H, Milhollan JK, Davin LB, Browse J, Lewis NG** (2005) Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation, *Phytochemistry* 66, 2072-91
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE** (1992) Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4938-41
- Creelmann RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 355-381
- Cruz-Castillo M, Martinez C, Buchala A, Metraux JP, Leon J** (2004) Gene-specific involvement of  $\beta$ -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*, *Plant Phys* 135, 85-94
- Darwin** (1880) *The power of movement in plants*, London John Murray, Albemarle Street
- Davies PJ** (1995) *The plant hormones: their nature, occurrence and functions*, *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 1-5
- De Klerk GJ, Krieken W, Jong JC** (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities, *In vitro cell. Dev Biol Plant* 35, 189-199



- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The f-box protein TIR1 is an auxin receptor, *Nature* 435, 441-5
- Dixon RA, Steele CL** (1999) Flavonoids and isoflavonoids- a gold mine for metabolic engineering, *Trends Plant Sci* 4, 394- 400
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K** (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 19, 2225-2245
- Douglas CJ** (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees, *Trends Plant Sci* 1, 171-178
- Eastmond PJ, Graham IA** (2000) The multifunctional protein AtMFP2 is co-ordinately expressed with other genes of fatty acid  $\beta$ -oxidation during seed germination in *A. thaliana*, *Biochem Soc Trans* 28, 95-99
- Eglinton G, Logan GA** (1991) Molecular preservation, *Philos Trans Soc Lond B Biol Sci* 333, 315-27
- Ehltling J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E** (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionary divergent classes in angiosperms, *Plant J* 19, 9-20
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE** (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors, *EMBO* 18, 4689-99
- Faergeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC** (2001) The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *S. cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization, *JBC* 276, 37051-9
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The lipoxygenase pathway, *Annu Rev Plant Biol* 53, 275-297
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG** (1994) *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen, *Plant Cell* 6, 751-59
- Footitt S, Slocombe SP, Lerner V, Kurup S, Wu Y, Larson T, Graham I, Baker A, Holdsworth M** (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP, *EMBO* 21, 2912-2922
- Froman BE, Edwards PC, Bursch AG, Dehesch K** (2000) ACX3, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from *Arabidopsis*, *Plant Phys* 123, 733-42
- Fulda M, Shockey J, Werber M, Wolter F, Heinz E** (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, *Plant J* 32, 93-103

- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, Browse J** (2004) Peroxisomal Acyl-CoA-Synthetase activity is essential for seedling development in *A. thaliana*, *Plant Cell* 16, 394-405
- Germain V, Rylott EL, Larson TR, Sherson SM, Bechthold N, Carde JP, Bryce JH, Graham IA, Smith SM** (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of Arabidopsis seedlings, *Plant J* 28, 1-12
- Gobel C et al** (2001) Oxylin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells, *J Biol Chem* 276, 6267-6273
- Greenway DL, Silbert DF** (1983) Altered acyltransferase activity in *E. coli* associated with mutations in acyl coenzyme A synthetase, *JBC* 258, 13034-42
- Groot PH, Scholte HR, Hulsmann WC** (1976) Fatty acid activation: specificity, localization, and function, *Adv Lipid Res* 14, 75-126
- Gulick AM, Starai VJ, Horswill AR, Homick KM, Escalante-Semerena JC** (2003) The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphat and coenzyme A, *Biochem* 42, 2866-2873
- Gulick AM, Lu X, Dunaway-Mariano D** (2004) Crystal structure of 4-chlorobenzoate:CoA ligase/synthetase in the unliganded and aryl substrate-bound states, *Biochem* 43, 8670-8679
- Hamberger B, Hahlbrock K** (2003) The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *A. thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly isoenzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2209-2214.
- Harms K, Atzorn R, Kühn H, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortés H** (1995) Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes, *Plant Cell* 7, 1645-1654
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M** (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects in glyoxysomal fatty acid response, *Plant Cell* 10, 183-195
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA** (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin and methyl jasmonate, *Plant Phys* 114, 1085-1093
- Henry MF, Cronan JE Jr** (1992) A new mechanism of transcriptional regulation: release of an activator triggered by small molecule binding, *Cell* 70, 671-9
- Hinsch M, Staskawicz BJ** (1996) Identification of a new Arabidopsis disease resistance locus, RPS4, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*, *Mol Plant Microbe Interact* 9, 55-61

- Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa N, Hamada K, Ida K, Yamamoto M, Hori T, Arii Y, Sugahara M, Kuramitsu S, Yokoyama S, Miyano M** (2004) Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer, *JBC* 279, 31717-31726
- Hooks MA, Kellas F, Graham IA** (1999) Long-chain acyl-CoA oxidases of *Arabidopsis*, *Plant J* 20, 1-13
- Horswill AR and Escalante-Semerena JC** (2002) Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of *Salmonella enterica*: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis, *Biochemistry* 41, 2379-2387
- Howe GA, Lee GI, Itho H, Li L, DeRocher AE** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Phys* 123, 711-24
- Hyun Y, Choi S, Hwang HJ, Yu J, Nam SJ, Ko J, Park JY, Seo YS, Kim EY, Ryu SB, Kim WT, Lee KH, Kang H, Lee I** (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis, *Dev Cell* 14, 183-92
- Iijima H, Fujino T, Minekura H, Suzuki H, Kang MJ, Yamamoto T** (1996) Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2, *Eur J Biochem* 242, 186-90
- Ishiguru S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K** (2001) The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel phospholipase A 1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 13, 2191-2209
- Jensen AB, Raventos D, Mundy J** (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*, *Plant J* 29, 595-606
- Johnson R, Narvaez J, An GH, Ryan C** (1989) Expression of proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9871-75
- Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto T** (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis, *PNAS* 94, 2880-4
- Kato A, Hayashi M, Takeushi Y, Nishimura M** (1996) cDNA cloning and expression of a gene for 3-ketoacyl-CoA thiolase in pumpkin cotyledons, *Plant Mol Biol* 31, 843-52
- Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ** (2000) The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds, *Plant Physiology* 123, 497-508

- Kienow L** (2005) Mechanismus der Substratselektion durch Adenylat bildende Enzyme: Klonierung, funktionelle Expression und Charakterisierung ausgewählter Vertreter eine Genfamilie aus *A. thaliana*, Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Kindl H** (1993) Fatty acid degradation in plant peroxisomes: function and biosynthesis of the enzymes involved, *Biochimie* 75, 225-30
- Koch S** (2007) Biochemische und funktionelle Charakterisierung des Adenylat bildenden Enzyms At1g62940 aus *A. thaliana*, Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Kögl F, Haagen-Smit AJ** (1931) Über die Chemie des Wuchsstoffs, *Proc Kon Akad Wetensch* 34, 1411–1416
- Koo AJ, Chung HS, Kobayashi Y, Howe GA** (2006) Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis, *JBC* 281, 33511-33520
- Kubigsteltig I, Laudert D, Weiler EW** (1999) Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene, *Planta* 208, 463-471
- Kuromori T, Wada T, Kamiya A, Yuguchi M, Yukouchi T, Imura Y, Takabe H, Sakurai T, Akiyama K, Hirayama T, Okada K, Shinozaki K** (2006) A trial of phenome analysis using 4000 Ds-insertional mutants in gene-coding regions of Arabidopsis, *Plant J* 47, 640-51
- Laudert D, Schaller F, Weiler EW** (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase, *Planta* 211, 163-165
- Laudert D, Weiler EW** (1998) Allene oxid synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling, *Plant J* 15, 675-684
- Lee D, Ellard M, Wanner LA, Davis KR, Douglas CJ** (1995) The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate:CoA ligase (4CL) gene: stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA, *Plant Mol Biol* 28, 871-884
- Lee D, Meyer C, Chapple C, Douglas C** (1997) Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition, *Plant Cell* 9, 1985-1998
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense, *Plant J* 46, 477-491
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA** (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development, *Plant Cell* 16, 126-143
- Liechti R, Farmer EE** (2002) The Jasmonate Pathway, *Science* 296, 1649-1650

- Ljung K, Bhalearo RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth, *Plant J* 28, 465-75
- Logemann E, Birkenbihl R, Ülker B, Somssich IE** (2006) An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol, *Plant Methods* 2-16
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 16, 1938-50
- Ludwig-Müller J, Sass S, Sutter EG, Wodner M, Epstein E** (1993a) Indole-3-butyric acid in *A. thaliana*, I. Identification and quantification, *Plant Growth Regulation* 13, 179-187
- Ludwig-Müller J, Sass S, Sutter EG, Wodner M, Epstein E** (1993b) Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*, II. In vivo metabolism, *Plant Growth Regulation* 13, 189-195
- Mano S, Nakamori C, Hayashi M, Kato A, Kondo M, Nishimura M** (2002) Distribution and characterization of peroxisomes in *Arabidopsis* by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement, *Plant Cell Phys* 43, 331-341
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG** (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves, *JBC* 281, 22684-22694
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C** (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development, *Plant J* 21, 199-213
- May JJ, Kessler N, Marahiel MA, Stubbs MT** (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases, *PNAS* 99, 12120-12125
- Meier C, Bouquin T, Nielsen ME, Raventos D, Mattson O, Rocher A, Schomburg F, Amasino R, Mundy J** (2001) Gibberellin response mutants identified by Luciferase imaging, *Plant Journal* 25, 509-519
- Meuter-Gerhards A, Riebart S, Wiermann R** (1999) Studies on sporopollenin biosynthesis in *Curcubita maxima* (DUCH)-II: the involvement of aliphatic metabolism, *J Plant Phys* 154, 431-36
- Miersch O, Wasternack C** (2000) Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato leaves: Endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biol Chem* 381, 715-722
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signalling, *New Phytol* 177, 114-27
- Morant M, Jorgensen K, Schaller H, Pinot F, Moller BL, Werck-Reichhart D, Bak S** (2007) CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen, *Plant Cell* 19, 1473-87

- Müssig C, Biesgen C, Lisso J, Uwer U, Weiler EW, Altmann T** (2000) A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis, *Plant Phys* 157, 143-152
- Normanly J, Bartel B** (1999) Redundancy as a way of life-IAA metabolism, *Curr Opin Plant Biol* 3, 207-13
- Nunn WD, Colburn RW, Black PN** (1986) Transport of long-chain fatty acids in *Escherichia coli*. Evidence for role of fadL gene product as long-chain fatty acid receptor, *JBC* 261, 167-71
- Oba Y, Sato M, Ojika M, Inouye S** (2005) Enzymatic and genetic characterisation of firefly Luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl-CoA-Synthetase, *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 819-28
- Overath P, Pauli G, Schairer HU** (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants, *Eur J Biochem* 7, 559-74
- Pinfield-Wells H, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Job K, Larson TR, Graham IA** (2005) Sucrose rescues seedling establishment but not germination of *Arabidopsis* mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism, *Plant J* 43, 861-72
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA, Feyereisen R** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis, *Plant J* 1, 1-12
- Preissig-Müller R, Günemann-Schäfer K, Kindl H** (1994) Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity, *JBC* 269, 20475-81
- Reumann S, Ma C, Lemke S, Babujee L** (2004) AraPerox: A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes, *Plant Phys* 136, 1-22
- Richmond TA, Bleecker AB** (1999) A defect in  $\beta$ -oxidation causes abnormal inflorescence development in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 11, 1911-1923
- Ritter C, Dangl JL** (1995) The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*, *Mol Plant Microbe Interact* 3, 444-53
- Robertson WR, Clark K, Young CY, Sussman MR** (2004) An *Arabidopsis thaliana* Plasma Membrane Proton Pump Is Essential for Pollen Development, *Genetics* 168, 1677-87
- Rylott EL, Eastmond PJ, Gilday AD, Slocombe SP, Larson TR, Baker A, Graham IA** (2006) The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal  $\beta$ -oxidation is essential for seedling establishment, *Plant J* 45, 930-941

- Rylott EL, Rogers CA, Gilday AD, Edgell T, Larson TR, Graham IA** (2003) Arabidopsis Mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid  $\beta$ -oxidation is essential for embryo development, *JBC* 278, 21370-21377
- Sánchez LB, Galperin MY, Müller M** (2000) Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (nucleoside diphosphate-forming), *J Biol Chem* 275, 5794-5803
- Saniewski M, Czapski J, Nowacki J** (1987 a) Relationship between stimulatory effect of methyl jasmonate on ethylene production and content in tomatoes, *Biol Plant* 29, 17-21
- Saniewski M, Czapski J, Nowacki J, Lange E** (1987 b) The effect of methyl jasmonate on ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in apple fruits, *Biol Planta* 29, 199-203
- Sasaki Y et al** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signalling pathways, *DNA Res* 8, 153-161
- Schaller F, Biesgen C, Müssig C, Altmann T, Weiler EW** (2000) 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis, *Planta* 210, 979-984
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules, *J Exp Bot* 52, 11-23
- Schillmiller AL, Koo AJ, Howe GA** (2007) Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action, *Plant Phys* 143, 812-24
- Schneider K** (2005) Mechanismus der Substratselektion durch Adenylat bildende Enzyme: Analyse der 4CL und ausgewählter 4CL-ähnlicher Enzyme aus *A. thaliana*, ISBN 3-86537-681-9
- Schneider K, Hövel K, Witzel K, Hamberger B, Schomburg D, Kombrink E, Stuible HP** (2003) The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase, *PNAS* 100, 8601-8606
- Schneider K, Kienow L, Schmelzer E, Colby T, Bartsch M, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E, Stuible HP** (2005) A new type of peroxisomal acyl-CoA synthetase from Arabidopsis thaliana has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid, *JBC* 280, 13962-13972
- Schnurr J, Shockey J, Browse J** (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in Arabidopsis, *Plant Cell* 16, 629-642
- Serrano M, Robatzek S, Torres M, Kombrink E, Somssich IE, Robinson M, Schulze-Lefert P** (2007) Chemical interference of pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses in Arabidopsis reveals a potential role for fatty-acid synthase type II complex-derived lipid signals, *JBC* 282, 6803-6811

- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses, *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4788-4793
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ulker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P** (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses, *Science* 315, 1098-103
- Shockey JM, Fulda MS, Browse J** (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism, *Plant Phys* 129, 1710-1722
- Shockey JM, Fulda MS, Browse J** (2003) Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-Coenzyme A synthetases, *Plant Phys* 132, 1065-1076
- Slovin J, Bandurski R., Cohen J (1999) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, Amsterdam Elsevier Science 33, 115–140.
- Smith DR, Bowman JL, Meyerowitz EM** (1990) Early flower development in Arabidopsis, *Plant Cell* 2, 755-767
- Sprenger-Haussels M, Weisshaar B** (2000) Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors, *Plant J* 1, 1-8
- Stasinopoulos TC, Hangarter RP** (1990) Preventing photochemistry in culture medium by long-pass light filters alters growth of cultured tissues, *Plant Phys* 93, 1365-1369
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate response locus *Jar1* and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic-acids in an assay for adenylation, *Plant Cell* 14, 1405-1415
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucin in Arabidopsis, *Plant Cell* 8, 2117-2127
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tirjaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid, *Plant Cell* 17, 616-27
- Stein T, Vater J, Kruff V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R, Morris HR** (1996) The multiple carrier model of non-ribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates, *J Biol Chem* 271, 15428-15435
- Steinberg SJ, Morgenthaler J, Heinzer AK, Smith KD, Watkins PA** (2000) Very long-chain acyl-CoA synthetases, *JBC* 275, 35162-35169



- Stelmach BA, Müller A, Hennig P, Gebhardt S, Schubert-Zsilavecz M, Weiler EW** (2001) A novel class of oxylipins, SN1-O-(12-oxophytodienoyl)-SN2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*, *J Biol Chem* 276, 1282-1283
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol* 51, 895-911
- Stintzi A, Weber J, Reymond P, Browse JA, Farmer EE** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenons, *Proc Natl Acad Sci* 98, 12837-12842
- Stintzi A, Browse J** (2002) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10625-10630
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response, *Plant J* 32, 585-601
- Stuible HP, Büttner D, Ehlting J, Hahlbrock K, Kombrink E** (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes, *FEBS* 467, 117-122
- Stuible HP, Kombrink E** (2001) Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate:Coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties, *J Biol Chem* 276, 26893-26897
- Swiatek A, Azmi A, Stals H, Inzé D, VanOnckelen H** (2004) Jasmonic acid prevents the accumulation of cyclin B1;1 and CDK-B in synchronized tobacco BY-2 cells, *FEBS* 572, 118-22
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H** (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*, *Plant Phys* 139, 1268-83
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase, *Nature* 446, 640-45
- Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y** (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*, *Plant J* 37, 139-146
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* 408, 796-815

- Theodoulou FJ, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA** (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes, *Plant Phys* 137, 835-40
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COII</sup> complex during jasmonate signalling, *Nature* 448, 661-665
- Tong F, Black PN, Coleman RA, DiRusso CC** (2006) Fatty acid transport by vectorial acylation in mammals: roles played by different isoforms of rat long-chain acyl-CoA synthetases, *Arch Biochem Biophys* 447, 46-52
- Traw BM, Bergelson J** (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*, *Plant Phys* 133, 1367-1375
- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M** (2007) *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates, *PNAS* 104, 1075-80
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The Jasmonate Signalling Pathway, *Plant Cell*, 153-164
- Van Noort V, Snel B, Huynen MA** (2003) Predicting gene function by conserved co-expression, *Trends in Genetics* 19, 238-42
- Van der Krieken WM, Breteler H, Visser MHM** (1992) Uptake and metabolism of indolebutyric acid during root formation on *Malus* microcuttings, *Acta Bot Neerl* 41, 497-505
- Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signalling cascade, *Plant Cell* 19, 831-46
- Vick BA, Zimmermann DC** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase, *Biochem Biophys Res Commun* 111, 470-77
- Vick BA, Zimmermann DC** (1984) Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species, *Plant Phys* 75, 458-461
- Von Malek B, Van der Graaf E, Schneitz K, Keller B** (2002) The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway, *Planta* 216, 187-92
- Wain RL, Wightman F** (1954) The growth regulating activity of certain omega-substituted alkyl carboxylic acids in relation to their beta-oxidation within the plant, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 142, 525-36

- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development, *Ann Bot* 110, 681-97
- Watkins PA, Chen WW, Harris CJ, Hoefler G, Blake DC, Balfe A, Kelley RI, Moser AB, Beard ME** (1989) Peroxisomal bifunctional enzyme deficiency, *J Clin Invest* 83, 771-7
- Watkins PA** (2008) Very long-chain acyl-CoA synthetases, *JBC* 283, 1773-7
- Weber A, Vick BA, Farmer EE** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family, *PNAS* 94, 10473-8
- Wehling K, Niester C, Boon JJ, Willemse MT, Wiermann R** (1989) p-Coumaric acid—A monomer in the sporopollenin skeleton, *Planta* 179, 376-380
- Woodward AW, Bartel B** (2005a) Auxin: Regulation, Action, and Intermediates, *Ann Bot* 95, 707-735
- Woodward AW, Bartel B** (2005) The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5, *Mol Biol of the Cell* 16, 573-83
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z** (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors, *Plant Cell* 18, 1310-26
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S** (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth, *Plant Cell* 17, 1953-66
- Yamane H, Abe H, Takahasi N** (1982) Jasmonic acid and methyljasmonate in pollens and anthers of three Camellia species, *Plant Cell Physiol* 23, 62-64
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T** (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens, *Plant J* 48, 592-605
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C** (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates, *JBC* 275, 19132-38
- Zolman BK, Nyberg M, Bartel B** (2007) IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response, *Plant Mol Biol* 64, 59-72
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The Arabidopsis *pxal* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, *Plant Phys* 127, 1266-1278
- Zolman BK, Yoder A, Bartel B** (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes, *Genetics* 156, 1323-1337

Sonstige Quellen:

<http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/athal/index.jsp>

<https://www.genevestigator.ethz.ch>

[http://www.bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_expression\\_angler.cgi](http://www.bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi)

<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>

<http://rarge.gsc.riken.jp/phenome>

**Anhang:** Gesamtergebnisse des Luciferasetests aller getesteter 4CLLs (2 h Inkubationszeit)

Inkubationszeit: 2h					
Substrat	4CL2-WT*	At1g62940*	At4g19010*	At4g05160*	At5g63380**
<b>Zimtsäure-Derivate</b>					
Zimtsäure	49,6	102,4	20,4	118,1	65,5
2-Cumarsäure	33,4	72,1	85,4	69,5	n.t.
3-Cumarsäure	5,0	76,2	81,1	88,2	n.t.
4-Cumarsäure	4,0	101,9	18,2	105,8	50,0
Kaffeensäure	4,3	96,9	36,5	95,6	69,2
Ferulasäure	49,9	106,7	5,3	147,7	93,9
Sinapinsäure	102,3	104,7	74,0	103,8	120,1
oMethylZimtsäure	89,5	79,6	73,5	77,7	n.t.
<b>Fettsäuren</b>					
Acetat	86,6	87,1	106,4	99,4	84,9
Propansäure	91,3	80,8	108,2	106,7	97,7
Butansäure	97,1	90,2	90,6	80,9	85,7
Pentansäure	110,1	85,2	16,2	23,2	67,1
Hexansäure	45,8	83,2	5,5	1,1	47,0
Heptansäure	26,1	75,8	7,7	5,5	20,3
Octansäure	70,4	84,7	17,9	17,9	7,9
Nonansäure	54,0	107,2	17,7	43,1	0,1
Decansäure	93,3	77,9	27,1	11,0	1,0
Dodecansäure	109,0	82,6	17,3	24,7	3,1
Tetradecansäure	84,7	59,1	9,3	0,2	0,8
Hexadecansäure	93,6	51,9	24,6	0,1	2,0
Octadecansäure	97,8	29,5	54,2	0,2	0,4
Ölsäure	84,3	46,9	63,2	0,1	3,2
Linolensäure	111,3	45,6	17,4	0,1	1,5
Linolsäure	109,3	42,9	25,3	0,1	0,1
<b>JA-Vorstufen</b>					
OPDA	101,5	91,7	91,7	21,2	0,2
dnOPDA	93,1	81,0	77,4	34,1	103,5
OPC 8	110,6	91,7	87,8	41,2	22,1
OPC 6	95,7	79,9	82,9	5,3	82,4
OPC 4	95,4	80,3	88,3	46,6	89,5
JA	106,8	96,8	99,0	109,6	118,3
<b>Phenyl-Fettsäuren</b>					
φ Acetat	96,6	75,3	64,1	90,3	81,0
2H φ Acetat	96,7	76,5	72,1	83,9	n.t.
3H φ Acetat	103,8	78,7	86,3	88,6	n.t.
4H φ Acetat	76,9	93,3	61,0	77,3	83,9
2M φ Acetat	107,7	63,5	73,7	91,9	n.t.
3,4 DM φ Acetat	87,1	111,1	64,6	88,5	n.t.
φ Propansäure	92,1	80,5	62,1	91,7	66,3
4H φ Propansäure	34,1	65,2	45,2	82,3	66,2
4H 3M φ Propansäure	119,9	67,7	53,2	73,2	78,4
3,4 DM φ Propansäure	108,4	75,2	65,8	72,8	96,4
4 φ Butansäure	127,0	85,3	91,9	3,0	85,9
2H 4M φ Butansäure	89,0	71,1	80,6	93,4	75,7
5 φ Pentansäure	117,0	45,8	81,1	8,9	59,2
3 φ Lactat	92,9	67,8	74,2	97,5	72,3
4H φ Pyruvat	97,4	85,1	96,0	87,9	n.t.

Substrat	4CL2-WT*	At1g62940*	At4g19010*	At4g05160*	At5g63380**
<b>Benzoat-Derivate</b>					
Benzoessäure	89,3	104,4	92,4	138,5	94,8
Salicylsäure	100,8	113,4	106,0	123,5	82,8
3-H Benzoessäure	100,7	90,2	104,3	162,7	n.t.
4-H Benzoessäure	115,2	98,4	114,8	86,9	119,8
2,3 DH Benzoessäure	127,0	97,8	113,7	156,9	n.t.
2,4 DH Benzoessäure	129,8	84,8	112,5	116,2	n.t.
3,4 DH Benzoessäure	92,5	118,8	94,3	90,6	n.t.
3,5 DH Benzoessäure	115,7	100,8	103,8	93,8	n.t.
2M Benzoessäure	96,5	94,2	97,2	65,5	n.t.
3M Benzoessäure	106,7	93,5	89,1	107,3	n.t.
4M Benzoessäure	91,6	99,0	99,2	95,9	n.t.
2H 3M Benzoessäure	108,3	83,9	77,6	115,0	n.t.
2H 4M Benzoessäure	169,3	83,9	95,7	90,6	n.t.
3,5 DM Benzoessäure	145,5	80,3	99,0	89,3	n.t.
4H 3,5 DM Benzoessäure	95,7	93,3	93,8	99,3	68,5
Vanillinsäure	101,2	90,5	111,1	105,5	93,9
2-Amino-Benzamid	145,1	91,4	101,0	57,1	n.t.
3H 2- $\phi$ Propansäure	110,7	73,8	74,0	89,2	n.t.
$\alpha$ -Hydroxy $\phi$ Acetat	101,1	62,7	101,5	76,5	81,4
3H Mandelsäure	95,6	80,2	90,7	83,9	n.t.
4H Mandelsäure	118,5	100,4	85,3	79,4	n.t.
3H 4M Mandelsäure	97,3	78,3	94,5	101,0	n.t.
<b>Auxine</b>					
Indolessigsäure	104,9	75,2	67,4	98,7	113,7
Indolpropansäure	79,8	72,5	51,8	92,3	n.t.
Indolbutansäure	109,9	67,8	72,1	58,5	89,0
2,4-Dichlorophenoxy- essigsäure	n.t.	n.t.	82,5	105,1	97,3
2,4-Dichlorophenoxy- buttersäure	n.t.	n.t.	110,7	13,5	88,5
<b>Aminosäure-Derivate</b>					
Phenylalanin	97,6	89,4	96,7	80,4	91,8
Prolin	72,0	76,7	77,3	79,9	n.t.
Hydroxyprolin	121,2	118,9	93,4	97,6	n.t.
Isoleucin	95,9	78,2	85,5	96,9	119,2
2-Methylpropansäure	99,7	92,6	75,4	69,1	n.t.
2-Methylbutansäure	80,8	78,6	87,5	105,9	n.t.
3-Methylbutansäure	115,4	83,2	87,0	93,1	n.t.
4-Methylpentansäure	93,8	74,9	13,9	26,6	50,2
Carnitin	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>Sonstige</b>					
Propandisäure	82,5	75,5	74,5	106,9	91,7
Butandisäure	107,8	74,6	85,4	87,4	112,7
Lactat	106,0	61,3	85,5	85,5	n.t.
Heptandisäure	105,6	57,2	63,3	72,3	n.t.
Shikimat	128,5	95,0	89,5	92,6	n.t.
Chinasäure	151,9	67,2	92,8	100,6	n.t.

Substrat	At5g38120*	At1g20500*	At1g20510	At1g20480	At3g48990
<b>Zimtsäure-Derivate</b>					
Zimtsäure	95,2	67,7	85,2	83,5	110,2
2-Cumarsäure	87,9	66,8	96,5	70,1	92,1
3-Cumarsäure	81,7	80,0	122,2	90,4	88,8
4-Cumarsäure	72,1	46,9	81,1	68,6	82,3
Kaffeensäure	81,0	60,9	92,3	68,2	75,7
Ferulasäure	46,7	26,9	123,0	98,2	89,5
Sinapinsäure	90,8	8,1	84,3	82,3	100,3
αMethylZimtsäure	80,5	114,3	n.t.	n.t.	71,2
<b>Fettsäuren</b>					
Acetat	88,7	107,8	79,6	89,5	91,2
Propansäure	108,8	97,4	86,4	81,2	92,2
Butansäure	97,2	105,6	87,7	80,5	91,6
Pentansäure	77,4	91,3	80,0	103,9	90,1
Hexansäure	79,2	92,7	77,5	100,0	74,6
Heptansäure	77,8	86,7	62,6	107,3	66,6
Octansäure	102,2	117,7	77,5	100,6	85,6
Nonansäure	108,1	81,8	56,1	111,7	111,1
Decansäure	89,9	90,5	9,2	103,6	163,3
Dodecansäure	97,5	41,8	0,04	103,5	89,9
Tetradecansäure	87,7	44,5	0,1	93,8	91,5
Hexadecansäure	91,8	63,0	3,0	62,2	94,9
Octadecansäure	96,3	74,7	9,6	85,6	105,5
Ölsäure	60,8	44,6	1,2	45,6	n.t.
Linolensäure	99,3	47,5	94,3	97,5	153,5
Linolsäure	77,2	49,0	78,0	82,8	87,5
<b>JA-Vorstufen</b>					
OPDA	104,8	26,1	0,6	74,5	121,5
dnOPDA	87,3	56,2	6,8	71,2	114,0
OPC 8	94,5	61,5	0,2	96,3	128,4
OPC 6	101,3	3,7	0,6	97,5	111,7
OPC 4	94,5	93,4	47,6	82,8	121,0
JA	91,8	102,4	67,5	80,1	101,9
<b>Phenyl-Fettsäuren</b>					
φ Acetat	88,9	71,2	81,3	101,1	n.t.
2H φ Acetat	76,8	101,7	n.t.	82,9	100,8
3H φ Acetat	81,0	90,4	n.t.	83,2	99,5
4H φ Acetat	81,2	93,6	54,8	63,3	n.t.
2M φ Acetat	78,8	86,4	n.t.	72,8	102,2
3,4DM φ Acetat	90,4	114,6	n.t.	96,2	97,3
φ Propansäure	85,0	69,1	71,4	82,1	107,6
4H φ Propansäure	81,2	68,3	n.t.	89,0	78,6
4H 3M φ Propansäure	103,0	61,9	n.t.	80,3	86,4
3,4DM φ Propansäure	88,0	52,0	74,4	53,8	109,8
4 φ Butansäure	99,5	81,3	67,0	97,5	93,7
2H 4M φ Butansäure	87,7	73,4	75,1	86,9	95,7
5 φ Pentansäure	93,2	76,2	59,3	97,7	102,9
3 φ Lactat	83,0	107,6	n.t.	93,1	86,5
4H φ Pyruvat	91,5	87,6	n.t.	84,4	49,7

Substrat	At5g38120*	At1g20500*	At1g20510	At1g20480	At3g48990
<b>Benzoat-Derivate</b>					
Benzoessäure	87,1	86,3	46,1	80,7	99,0
Salicylsäure	100,9	76,5	112,7	63,2	99,8
3-H Benzoessäure	80,9	75,0	n.t.	93,6	92,7
4-H Benzoessäure	80,0	76,2	65,1	50,6	69,5
2,3 DH Benzoessäure	85,3	71,9	n.t.	95,9	54,7
2,4 DH Benzoessäure	86,5	66,7	n.t.	77,5	66,0
3,4 DH Benzoessäure	82,5	71,4	n.t.	79,8	102,0
3,5 DH Benzoessäure	71,8	63,3	n.t.	65,6	74,1
2M Benzoessäure	99,9	76,4	n.t.	63,4	74,6
3M Benzoessäure	106,4	69,0	n.t.	62,7	84,8
4M Benzoessäure	94,3	64,2	n.t.	71,0	101,5
2H 3M Benzoessäure	79,9	90,0	n.t.	66,4	78,5
2H 4M Benzoessäure	76,3	79,0	n.t.	49,4	102,8
3,5 DM Benzoessäure	68,7	84,0	n.t.	67,1	66,0
4H 3,5 DM Benzoessäure	97,4	78,8	82,3	72,0	55,5
Vanillinsäure	77,0	76,9	110,8	64,0	69,8
2-Amino-Benzamid	78,0	79,8	n.t.	65,3	90,1
3H 2- $\phi$ Propansäure	94,6	107,8	n.t.	71,3	108,6
$\alpha$ -Hydroxy $\phi$ Acetat	95,7	91,8	116,4	66,7	94,0
3H Mandelsäure	82,8	84,9	n.t.	69,4	87,6
4H Mandelsäure	93,0	87,0	n.t.	61,2	74,6
3H 4M Mandelsäure	114,1	82,6	n.t.	92,0	73,2
<b>Auxine</b>					
Indolessigsäure	89,9	92,8	76,1	95,6	85,9
Indolpropansäure	115,7	102,7	n.t.	90,9	78,6
Indolbutansäure	93,1	84,8	70,5	88,7	81,1
2,4-Dichlorphenoxy- essigsäure	n.t.	161,7	83,5	n.t.	112,9
2,4-Dichlorphenoxy- buttersäure	n.t.	116,8	103,3	n.t.	152,8
<b>Aminosäure-Derivate</b>					
Phenylalanin	81,2	93,5	102,5	80,0	97,2
Prolin	98,0	93,6	n.t.	51,7	92,6
Hydroxyprolin	94,9	109,0	n.t.	53,2	90,5
Isoleucin	81,7	88,8	95,8	74,0	109,1
2-Methylpropansäure	94,5	94,9	n.t.	70,6	n.t.
2-Methylbutansäure	85,3	82,6	n.t.	69,8	64,2
3-Methylbutansäure	89,7	96,1	n.t.	73,6	110,3
4-Methylpentansäure	84,1	81,8	91,6	72,3	142,2
Carnitin	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	98,2
<b>Sonstige</b>					
Propandisäure	85,9	85,4	84,8	67,9	57,3
Butandisäure	73,3	94,6	85,8	70,4	100,5
Lactat	79,9	99,0	83,0	68,7	96,2
Heptandisäure	79,6	95,6	n.t.	n.t.	100,6
Shikimat	86,4	73,3	n.t.	87,1	113,3
Chinasäure	85,6	124,1	n.t.	89,9	114,2



**Ich bedanke mich herzlich...**

bei Prof. Dr. R. Krämer für die Betreuung meiner Arbeit

bei Prof. Dr. U. Höcker für die Übernahme des Ko-Referats

bei Prof. Dr. U.I. Flüge für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes

bei Dr. E. Kombrink für die Überlassung dieses interessanten und ertragreichen Themas, sowie die fachliche Unterstützung

bei unseren Kooperationspartnern Dr. O. Miersch und Dr. C. Wasternack (IPB, Halle), Dr. J. Ludwig-Müller (TU Dresden), Dr. J. Schmidt, Dr. T. Colby und Dr. E. Schmelzer (MPIZ, Köln)

bei Katja Schneider für die fachliche und persönliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und die gute Zeit im Labor

bei Rainer Birkenbihl für die tatkräftige Hilfe und die vielen praktischen Tipps

bei Stefanie Koch, Brigitte Pickel, Luis de Conceicao, Govinda Guevara und allen Mitarbeitern der Molekularen Phytopathologie für die gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei der Durchführung diverser Experimente

bei Tim Müller für das große Interesse an dieser Arbeit, für Lob & Kritik und unendliche Geduld

bei meinen lieben Eltern Martin und Heide Kienow, die mich zu jeder Zeit unterstützen und immer für mich da sind



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werden. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer aus dem Institut für Biochemie der Universität Köln betreut worden.

Köln, 10.April 2008

Teilpublikation:

**Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible HP, Weng H, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E** (2008) Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany* **59**, 403-419