



**Der Einfluss von Inositolpolyphosphaten
auf die Auxin- und Jasmonatwahrnehmung
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

angefertigt an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
Institut für Biochemie und Biotechnologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

zur Erlangung des
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Tobias Heinz

geboren am 04.05.1984 in Halle (Saale)

eingereicht am 27.08.2015

Gutachter:

Prof. Dr. Ingo Heilmann

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Prof. Dr. Ivo Feussner

Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Bettina Hause

Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle

Verteidigungsdatum:

15.12.2015, 10:15 Uhr

Institut für Biochemie und Biotechnologie

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzen und ihre Umgebung – Wachstum oder Verteidigung?	1
1.2 Phytohormonrezeptoren für Auxin und Jasmonsäure-Isoleucin.....	2
1.2.1 Phytohormone steuern die Balance von Wachstum und Verteidigung.....	2
1.2.2 Aufbau und Funktion des IAA- und JA-Ile-Rezeptors	2
1.2.3 Inositolpolyphosphate als Kofaktoren von Hormonrezeptoren	5
1.2.4 Koordination und Einfluss der Inositolpolyphosphat-Kofaktoren.....	6
1.3 Inositolpolyphosphate (IPPs).....	8
1.3.1 Stoffwechsel von IPPs in Pflanzen	10
1.3.2 Bedeutung von IPPs als sekundäre Botenstoffe.....	12
1.4 Zielstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Enzyme und Kits	19
2.1.4 Software und Programme (EDV).....	19
2.1.5 Oligonukleotide.....	20
2.1.6 Nährmedien	22
2.1.6.1 LB-Medium (<i>Lysogeny Broth Medium</i> ,)	22

2.1.6.2 SD-Medium	22
2.1.6.3 Halbkonzentriertes MS-Medium (Murashige & Skoog)	23
2.1.7 Pflanzenlinien.....	23
2.2 Methoden	25
2.2.1 Klonierung und Erzeugung transgener Arabidopsispflanzen	25
2.2.2 Anzucht und Ernte von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	26
2.2.4 Gravitrope Wurzelkrümmungsexperimente.....	27
2.2.5 Blattflächenanalyse	27
2.2.6 Wurzelkulturen von <i>A. thaliana</i>	28
2.2.7 Verwundungsexperimente mit <i>A. thaliana</i>	28
2.2.8 Infiltration von <i>N. tabacum</i> Blättern	28
2.2.9 Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudien	29
2.2.9.1 Split-Ubiquitin System	29
2.2.9.2 Beurteilung des selektiven Wachstums (Tropftest).....	30
2.2.9.3 ONPG-Test (<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid-Test)	30
2.2.10 Nachweis exprimierter Proteine in biologischen Proben.....	31
2.2.10.1 Proteinextraktion aus infiltrierten <i>N. tabacum</i> Blättern.....	31
2.2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.2.10.3 Elektrophoretische Trennung von Proteingemischen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.2.10.4 Immundetektion von Proteinen (Western Blot).....	35
2.2.11 Mikroskopie	37
2.2.12 IPP-Analytik	37
2.2.12.1 Extraktion von IPPs	38
2.2.12.2 Auftrennung von IPPs mittels HPLC.....	38
2.2.12.3 Quantifizierung von IPPs.....	41
2.2.13 PI-Analytik.....	41
2.2.13.1 Extraktion von PIs	41
2.2.13.2 Separation von PIs	42

2.2.13.3	Transmethylierung von Fettsäuren isolierter Lipidklassen.....	43
2.2.13.4	Quantifizierung der lipidassoziierten Fettsäuren mittels Gaschromatographie	43
2.2.14	Quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR).....	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	Distribution von IPPs in verschiedenen Geweben von <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.2	Charakterisierung IPP-modulierter Pflanzen	47
3.2.1	Genexpression von IPK1 und IPK2 in den transgenen Linien	47
3.2.2	Basale IPP-Konzentrationen	48
3.2.3	PI-Gehalte	48
3.2.4	Phytohormonkonzentrationen	50
3.3	Dynamische Änderungen der IPP-Konzentrationen.....	51
3.3.1	Temperaturinduzierte Änderung von IPPs.....	52
3.3.2	Dynamische Änderungen von IPPs nach Verwundung	52
3.4	Phänotypische Konsequenzen der IPP-Modulierung	55
3.4.1	IAA-abhängige Effekte	55
3.4.1.1	Wurzellängen.....	55
3.4.1.2	Hemmung des Wurzelwachstums.....	56
3.4.1.3	Blattflächen.....	57
3.4.1.4	Gravitrope Krümmung.....	59
3.4.2	Induktionsmuster IAA-abhängiger Gene	60
3.4.3	Defensivantwort der Pflanzen (Caterpillar performance test)	63
3.4.4	Induktionsmuster JA-abhängiger Gene.....	64
3.4.5	Korrelation physiologischer IAA-Antworten mit IP ₆ -Konzentration.....	66
3.5	Lokalisationsstudien	69
3.5.1	Heterologe Expression und subzelluläre Lokalisation von IPK1 und IPK2 in <i>N. tabacum</i> Epidermiszellen	69
3.5.2	Subzelluläre Lokalisation von IPK1 und IPK2 in <i>A. thaliana</i>	70

3.5.3 Bioinformatische Analyse von Kernlokalisationsignalen und subzellulärer Lokalisation.....	71
3.5.4 Mutation und Lokalisationsstudien putativer Kernlokalisationssignale	73
3.5.5 Interaktionstest zwischen IPKs und α -Importinen.....	76
3.6 Sensitivität IPP-modulierter Pflanzen gegenüber verschiedenen Hormonkonzentrationen	78
3.7 Kompetitionsstudien	79
4. Diskussion.....	82
4.1 Signalintegration der IPPs	82
4.2 Modulierung des IPP-Stoffwechsels.....	85
4.3 IPPs als funktionale Kofaktoren von COI1 und TIR1.....	86
4.4 Dynamik und Stabilität der FBPs	89
4.5 Zusammenspiel oder Konkurrenz von IPPs	90
5. Zusammenfassung	92
6. Anhang	94
Literaturverzeichnis	98
Danksagung	106
Lebenslauf.....	108
Eidesstattliche Erklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IAA-Perzeption.....	4
Abbildung 2: Strukturmodelle von TIR1 und COI1	5
Abbildung 3: Koordination von IP ₆ im TIR1 und IP ₅ in COI1	7
Abbildung 4: <i>myo</i> -Inositol	8
Abbildung 5: Funktionen von <i>myo</i> -Inositol im pflanzlichen Metabolismus	9
Abbildung 6: IPP-Stoffwechsel in Eukaryoten.....	10
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Western Blot	35
Abbildung 8: HPLC-Gradient.....	39
Abbildung 9: HPLC-Standard: IPP-Gemisch	40
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramme für IPP-Analyse in Arabidopsissamen	41
Abbildung 11: Verteilung von IP ₅ und IP ₆ in Geweben von Arabidopsis.....	46
Abbildung 12: Basale Transkriptmengen von IPK1 und IPK2 in IPP-modulierten Pflanzen.....	47
Abbildung 13: Basale IP ₅ - und IP ₆ -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen.....	48
Abbildung 14: PI-Gehalt IPP-modulierter Pflanzen	49
Abbildung 15: Phytohormonkonzentration IPP-modulierter Pflanzen.....	51
Abbildung 16: Temperaturinduzierte Veränderung von IP ₅ - und IP ₆ -Konzentrationen in Arabidopsis	52
Abbildung 17: Dynamische Veränderung von IP ₅ - und IP ₆ -Konzentrationen nach Verwundung.....	54
Abbildung 18: Wurzellängen verschiedener IPP-modulierter Pflanzen.....	55
Abbildung 19: Mittlere Wurzellänge IPP-modulierter Pflanzen	56
Abbildung 20: Relative Hemmung des Wurzelwachstums bei IPP-modulierten Pflanzen durch IAA und MeJA.....	57
Abbildung 21: Blattflächen IPP-modulierter Pflanzen.....	58
Abbildung 22: Blattflächenmessung IPP-modulierter Pflanzen.....	58
Abbildung 23: Gravitrope Krümmung IPP-modulierter Pflanzen nach 24 h	59
Abbildung 24: Krümmungswinkel von Wurzelspitzen und Hypokotylen	60

Abbildung 25: Korrelation von IAA-induzierter Genexpression und IP ₆ -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen	62
Abbildung 26: Caterpillar performance test mit <i>S. littoralis</i>	63
Abbildung 27: Korrelation von JA-induzierter Genexpression und IP ₅ -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen	65
Abbildung 28: Korrelation zwischen IAA-abhängigen Wachstumseffekten und IP ₆ -Konzentration	67
Abbildung 29: Transiente Expression von <i>AtIPK1::eYFP</i> , <i>AtIPK2::eYFP</i> in <i>N. tabacum</i> Blättern	69
Abbildung 30: Immundetektion eYFP-markierter Proteine aus infiltriertem <i>N. tabacum</i> Blattmaterial	70
Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation von <i>AtIPK1::eYFP</i> und <i>AtIPK2::eYFP</i> in Arabidopsis-Wurzelzellen	71
Abbildung 32: Aminosäuresequenz von IPK1 und IPK2 mit den putativen NLS	74
Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation mutierter IPK1-Varianten in Tabakepidermiszellen	74
Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation von mutierter IPK2-Variante und eYFP-Kontrolle in Tabakepidermiszellen	75
Abbildung 35: Interaktionstest von IPK1 und IPK2 mit α -Importinen aus Arabidopsis	77
Abbildung 36: Sensitivität IAA- und JA-abhängiger Genexpression in IPP-modulierten Pflanzen	79
Abbildung 37: IAA-Antwort bei simultaner IAA- und MeJA-Applikation	80
Abbildung 38: JA-Antwort bei simultaner IAA- und MeJA-Applikation	81
Abbildung 39: IPP-Bildung und Integration	84
Abbildung 40: IP ₅ - und IP ₆ -Konzentration in Arabidopsissamen	94
Abbildung 41: IAA-induzierte Genexpression von IAA-induzierbaren Genen	94
Abbildung 42: Relative Genexpression von JA-induzierbaren Genen nach MeJA-Behandlung	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	16
Tabelle 2: Chemikalien	17
Tabelle 3: Enzyme und Kits.....	19
Tabelle 4: Software und Programme	19
Tabelle 5: Oligonukleotide	20
Tabelle 6: Oligonukleotide für qRT-PCR.....	21
Tabelle 7: Pflanzenlinien	24
Tabelle 8: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisationsignalen durch cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp):	72
Tabelle 9: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisationsignalen durch NLStradamus (http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/):	72
Tabelle 10: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisationsignalen durch NucPred (https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/):	72
Tabelle 11: Ergebnis der Vorhersage von subzellulärer Lokalisation durch Distill (http://distill.ucd.ie/distill/):	73
Tabelle 12: Phytohormonmessungen IPP-modulierter Pflanzen	96

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ade (A)	Adenin
AK	Antikörper
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
AS	Aminosäure(n)
ASK1	Adapterprotein des SCF-Komplex in Pflanzen
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX/IAA	Transkriptionsrepressoren der IAA-abhängigen Genexpression
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BR	Brassinosteroide
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK	Cytokinin
COI1	Jasmonat-Isoleucin-Rezeptor (<i>coronatine-insensitive protein 1</i>)
CUL	Cullin
Cys (C)	Cystein
Cyt (C)	Cytosin
d	Durchmesser, Schichtdicke
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser (<i>double distilled water</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBP	F-Box-Protein
g	Erdbeschleunigung
GA	Gibberlinsäure
GLE1	Nukleoprotein (<i>nuclear pore protein</i>)
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
Gua (G)	Guanin

h	Stunde
His (H)	Histidin
IAA	Auxin
Ile (I)	Isoleucin
IP ₅	Inositolpentakisphosphat
IP ₆	Inositolhexakisphosphat
IPP	Inositolpolyphosphat
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
JAZ	Transkriptionsrepressoren der jasmonatabhängigen Genexpression
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu (L)	Leucin
LRR	F-Box-Protein Domäne (<i>leucin rich repeats</i>)
Lys (K)	Lysin
M	Molar
Mb	Megabasen
Met (M)	Methionin
min	Minuten (<i>minutes</i>)
MS	Murashige & Skoog
MYC2	Transkriptionsfaktor (bekannt durch Myelocytomatose)
nmol	Nanomol
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>poly chain reaction</i>)
Phe (F)	Phenylalanin
PI	Phosphoinositid
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro (P)	Prolin
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>Real-time</i>)
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde

SA	Salicylsäure
SCF	SKP1-CUL1-FBP-Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKP1	Adapterprotein des SCF-Komplex (<i>supressor of kinetechor protein 1</i>)
Ser (S)	Serin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr (T)	Threonin
TIR1	Auxinrezeptor (<i>transport inhibitor response 1</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Trp (W)	Tryptophan
Thy (T)	Thymin
Tyr (Y)	Tyrosin
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val (V)	Valin
Vol.	Volumen
X-Gal	Indoxyl- β -D-galactopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
% (w/v)	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
Δ	Deletion

1. Einleitung

1.1 Pflanzen und ihre Umgebung – Wachstum oder Verteidigung?

Pflanzen sind als Nahrungsmittel für den Menschen essentiell. Aufgrund einer immer weiter fortschreitenden Zunahme der Weltbevölkerung rückt auch die Steigerung der Nahrungsmittelproduktion weiter in den Fokus. Dabei ist die Steigerung des Wachstums von Nutzpflanzen durch klassische Züchtung und biotechnologische Veränderungen der Hauptansatz. Doch Wachstum ist für Pflanzen eine Herausforderung, denn sie werden auch immer mit Umwelteinflüssen konfrontiert, die eine Umverteilung ihrer Ressourcen erfordern (Coley *et al.*, 1985). Pflanzen als sessile Lebensformen mussten einzigartige Mechanismen entwickeln, um sich an verschiedene abiotische und biotische Stressfaktoren anzupassen. Besonders wichtig ist dabei eine ausgewogene Balance zwischen Wachstum und Verteidigung, um sich vor pathogenen Erregern und Fraßfeinden zu schützen.

Wahrnehmung und dynamische Anpassung an Stressfaktoren sind von großer Bedeutung. Verteidigungsantworten nach Pathogenbefall führen zur Umverteilung von zellulären Ressourcen, die normalerweise für Wachstum gedacht sind, z.B. die Bildung von Sekundärmetaboliten, Zellwandverstärkung und Produktion von antimikrobiellen Proteinen. Die Immunaktivierung ist energetisch aufwändig und erfordert komplexe Regulationsmechanismen, die eine schnelle und angemessene Verteidigungsantwort erzeugen. Pflanzenhormone sind essentielle Bestandteile für die Entwicklung und Umweltanpassung von Pflanzen und als solche wahrscheinliche Kandidaten die physiologische Antworten bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen beeinflussen. So wurde kürzlich herausgefunden, dass das Pflanzenhormon Jasmonsäure durch Unterbrechung der Signalkaskade von Gibberellinsäure die Verteidigungsantwort gegenüber dem Wachstum priorisiert (Yang *et al.*, 2012).

Die Umverteilung der Ressourcen zur Verteidigung erfolgt immer auf Kosten des Wachstums. Um die Kosten-Nutzen-Rechnung für die Pflanze zu beschreiben, wurde die sogenannte Kohlenstoff-Nährstoff-Balance (CNB) Hypothese entwickelt (Hamilton *et al.*, 2001). Die Kosten einer gesteigerten Verteidigung können z.B. eine verminderte Reproduktivität bewirken. So führt eine Behandlung von Tomatenpflanzen (*L. esculentum*) mit dem Verteidigungshormon Jasmonsäure zu einer reduzierten Frucht- und Samenbildung (Redman *et al.*, 2001). Gerade bei vielen Nutzpflanzen, die

z.B. in Monokulturen wachsen, spielt die verbesserte Verteidigung und Resistenz gegenüber Schädlingen eine wichtige Rolle. Es stellt sich daher die Frage, ob mit geeigneten biotechnologischen Kenntnissen und Mitteln die Erzeugung von Pflanzen mit gleichzeitig gesteigertem Wachstum und effizienter Verteidigung möglich ist. Daher ist es wichtig, die zugrundeliegenden Regulations- und Signalprozesse zu erforschen, die das Umschalten kontrollieren.

1.2 Phytohormonrezeptoren für Auxin und Jasmonsäure-Isoleucin

1.2.1 Phytohormone steuern die Balance von Wachstum und Verteidigung

Ob eine Pflanze wächst oder ihre Ressourcen zur Verteidigung einsetzt, wird maßgeblich durch Phytohormone beeinflusst und gesteuert. Dabei spielen für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen Phytohormone wie Auxin (IAA), Gibberellinsäure (GA), Brassinosteroide (BR) und Cytokinine (CK) eine wichtige Rolle. Bei der Verteidigung von Pflanzen sind die Phytohormone Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA) von Bedeutung.

In den letzten Jahren konnten erste Einblicke in die Funktionsweise dieser hormongesteuerten Prozesse gewonnen werden. Interessanterweise wurde eine mögliche Beteiligung von Inositolpolyphosphaten (IPPs) bei der Wahrnehmung von IAA und Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile) entdeckt. Diese Moleküle waren lange Zeit lediglich als Speicher für Phosphat und möglicherweise als Signalmoleküle für die Calciumfreisetzung bekannt. Das steigende Interesse an IPPs wurde auch durch Entdeckungen in tierischen Modellorganismen unterstützt.

1.2.2 Aufbau und Funktion des IAA- und JA-Ile-Rezeptors

Der IAA-Rezeptor Transport Inhibitor Response 1 (TIR1) ist Teil der Maschinerie, die für die IAA-Wahrnehmung benötigt wird. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der F-Box-Proteine (F-Box-Domäne als Protein-Protein-Interaktionsmotiv; Bai *et al.*, 1996) und vermittelt den proteasomalen Abbau von AUX/IAA-Transkriptionsrepressoren (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010). Speziell TIR1 ist Teil einer E3-Ubiquitinligase, des sogenannten Skp1-Cullin-F-Box-Komplexes (SCF-Komplex), die Transkriptions-

repressoren der AUX/IAA-Familie reguliert. Der SCF-Komplex gehört zur größten E3-Ubiquitinligase Familie in Pflanzen (Gagne *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass SCF-Komplexe ein breites Spektrum von Proteinen mit Funktionen im Zellzyklus, der Signaltransduktion und der Transkription ubiquitinieren (Deshaies, 1999). Sie bestehen aus vier Untereinheiten, nämlich dem Suppressor of Kinetochor Protein 1 (SKP1 bzw. ASK1 in Pflanzen) als Adapterprotein, dem Cullin (CUL1) als Rückgrat, dem Ring-Box-Protein (RBX1) und dem F-Box-Protein (FBP) als Substratrezeptor (Cardozo & Pagano, 2004). Die N-terminale F-Box-Domäne von FBPs interagiert mit dem Adapterprotein SKP1. Dabei können verschiedene FBPs mit den Adapterproteinen interagieren und dem SCF-Komplex unterschiedlichste Substratspezifitäten vermitteln (Schwechheimer & Calderon Villalobos, 2004). Bekannte Proteininteraktionsdomänen von FBPs sind Leucin rich repeats (LRR), Kelch, WD-40, Armadillo (Arm), Tetratricopeptid (TPR), Tub, Actin, DEAD-like Helicase und Jumonji (Jmj)-c Domänen (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010). Die größte Klasse von FBPs in Arabidopsis beinhalten LRRs (Gagne *et al.*, 2002). Diese C-terminale Domäne besteht aus 20 bis 29 Aminosäuren und lagert sich als Multimer zu einer helikalen Struktur zusammen. Die CUL und RBX1 Untereinheiten bilden den Kern des SCF-Komplex. Sie binden verschiedene FBP-SKP1 Subkomplexe und rekrutieren die E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzyme. Die SCF-Komplexe werden durch die Modifikation der Cullin Untereinheiten mit einem Ubiquitin-verwandten Protein namens Related to Ubiquitin; neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8 (RUB/NEDD8) reguliert (Dharmasiri *et al.*, 2003). Insgesamt gibt es in Arabidopsis mindestens 6 CUL-Proteine, 3 RBX-Proteine, 21 ASK/SKP-Proteine und über 700 FBPs.

Inositolhexakisphosphat (IP_6) wurde als Kofaktor in der Kristallstruktur des TIR1 Rezeptors gefunden. Erst die Bindung von IP_6 im TIR1 koordiniert den Zusammenhalt der LRR-Domänenstruktur zu einem Fass. Das ermöglicht die Bindung von IAA in eine entstehende Bindetasche des Rezeptors. Mit gebundenem IP_6 und IAA kann TIR1 dann spezifische Peptide der AUX/IAA-Repressoren binden und deren Ubiquitinierung ermöglichen.

Ein vereinfachtes Schema der IAA-Perzeption ist in der nachfolgenden Abbildung 1 dargestellt.

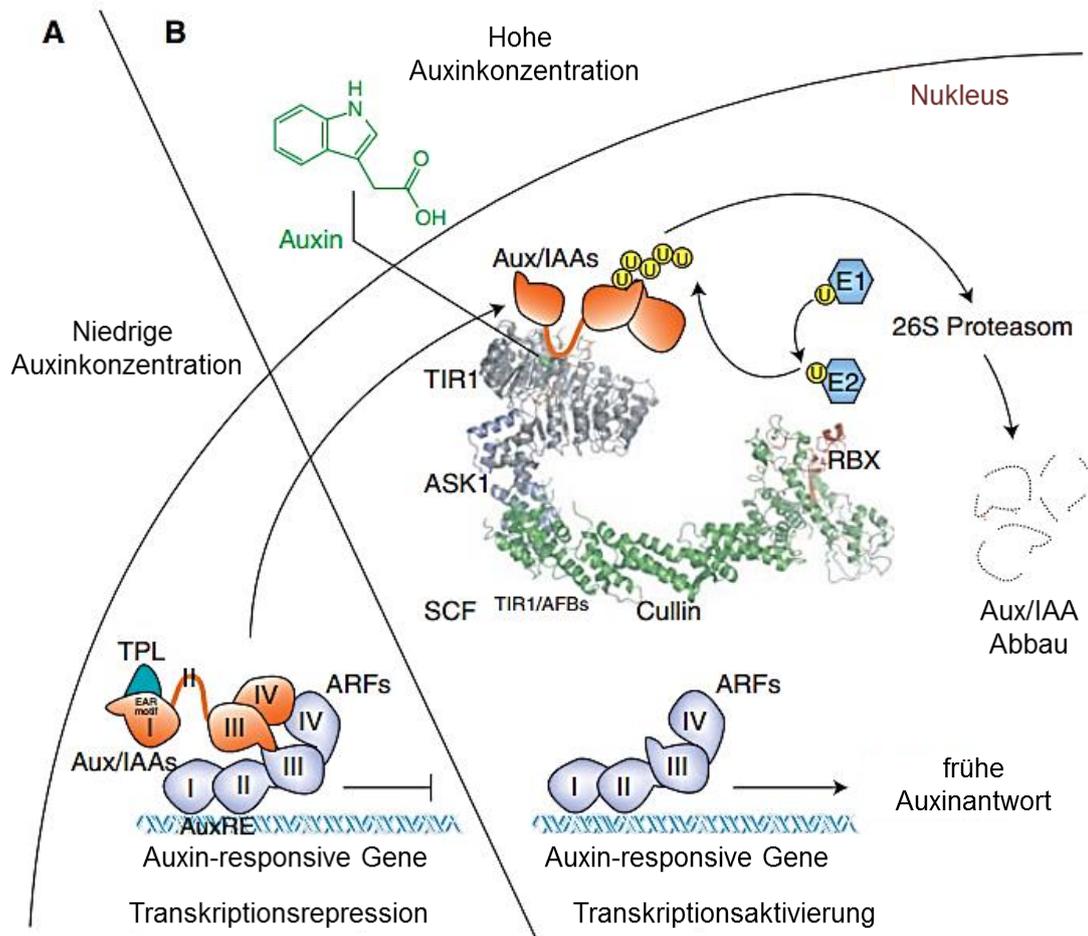


Abbildung 1: IAA-Perzeption

A) Transkriptionelle Repression bei niedrigen IAA-Konzentrationen. Die AUX/IAA-Repressoren sind an ARFs (Auxin Response Factors; Auxinantwortfaktoren) gebunden und verhindern so die Transkription von Auxin-responsiven Genen (Auxin Responsive Elements; AuxRE). B) Transkriptionsaktivierung bei hohen IAA-Konzentrationen. Die AUX/IAA-Repressoren werden durch das F-Box-Protein gebunden wenn IAA und IP_6 vorhanden sind. Der assoziierte SCF-Komplex initiiert die Ubiquitinierung der Repressoren, die dann durch das 26S-Proteasom abgebaut werden. (Abbildung modifiziert nach Calderon-Villalobos *et al.*, 2010)

Der Aufbau des JA-Ile-Rezeptor Coronatine-Insensitiv 1 (COI1) weist große Analogie mit dem des TIR1-Rezeptor auf (Sheard *et al.*, 2010). Es bildet sich in gleicher Weise ein SCF-Komplex als E3-Ubiquitinligase, bestehend aus RBX, CUL1, SKP1 und COI1. Dabei ist das COI1 als F-Box-Protein für die Substratrekrutierung verantwortlich. Es bindet an sogenannte JAZ-Proteine (Jasmonate ZIM Domain), die als Transkriptionsrepressoren fungieren (Chini *et al.*, 2007). Durch deren Ubiquitinierung und Abbau werden JA-spezifische Transkriptionsfaktoren wie z.B. MYC2 freigesetzt (Lorenzo *et al.*, 2004).

1.2.3 Inositolpolyphosphate als Kofaktoren von Hormonrezeptoren

Der erste Pflanzenhormonrezeptor, dessen Röntgenkristallstruktur publiziert wurde, war der IAA-Rezeptor TIR1 (Tan *et al.*, 2007; Abbildung 2A). Interessanterweise wurde bei der Kristallisierung des TIR1 Rezeptors ein Inositolhexakisphosphat (IP₆) als relevantes Element der Struktur gefunden und als Kofaktor identifiziert (Tan *et al.*, 2007). Dieses IP₆ koordiniert den Zusammenhalt der LRR-Domäne zu einer fassähnlichen Struktur, durch Interaktion mit basischen Aminosäuren. Dadurch kann IAA in einer sich bildenden Aushöhlung des TIR1 binden und die Interaktion zwischen AUX/IAAs und SCF-Komplex als eine Art „molekularer Klebstoff“ unterstützen. Die AUX/IAA-Repressoren werden nach der Bindung durch den SCF-Komplex ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Ein Mechanismus dieser Art der Hormonwahrnehmung wird als Transkriptionelle Derepression bezeichnet und scheint auch bei der Perzeption von anderen Phytohormonen wie z.B. JA und GA eine Rolle zu spielen (Santner *et al.*, 2009)

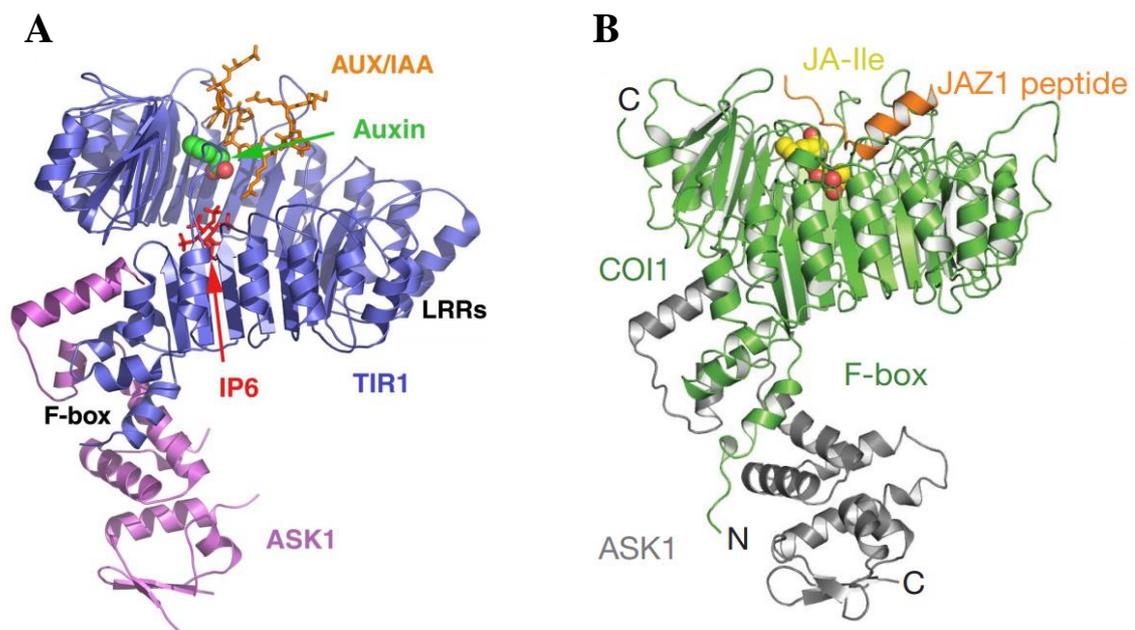


Abbildung 2: Strukturmodelle von TIR1 und COI1

A) Struktur des TIR1 Rezeptors mit IP₆-Kofaktor (rot), IAA (grün) und gebundenem AUX/IAA-Peptid (orange). (Abbildung entnommen aus Tan & Zheng, 2009) B) Struktur des COI1 Rezeptors ohne IP₅-Kofaktor, aber mit JA-Ile (gelb) und gebundenem JAZ1 Peptid (orange) (Abbildung entnommen aus Sheard *et al.*, 2010)

Einige Jahre nach der Strukturaufklärung des IAA-Rezeptors TIR1 konnte auch die Struktur des JA-Ile-Rezeptors COI1 aufgeklärt werden (Sheard *et al.*, 2010; Abbildung 2B). COI1 ist ebenfalls ein FBP und als Teil eines SCF-Komplexes am Abbau von

Jasmonat-ZIM Domäne (JAZ) Transkriptionsrepressoren beteiligt. Beim COI1 Rezeptor konnte interessanterweise ein Inositolpentakisphosphat (IP₅) als Kofaktor identifiziert werden (Sheard *et al.*, 2010; Mosblech *et al.*, 2011). Das IP₅ koordiniert in ähnlicher Weise die Assoziation von COI1, JA-Ile und JAZ wie IP₆ beim TIR1, IAA und den AUX/IAA-Repressoren.

1.2.4 Koordination und Einfluss der Inositolpolyphosphat-Kofaktoren

Die Bindung von IP₆ in TIR1 und IP₅ in COI1 wird durch konservierte Aminosäuren koordiniert. In der Kristallstruktur von TIR1 konnte IP₆ als Kofaktor direkt nachgewiesen werden. Bei der Strukturanalyse des COI1-Rezeptors wurde zwar IP₅ mitaufgereinigt, aber lediglich freies Phosphat in der Kristallstruktur entdeckt (Sheard *et al.*, 2010). Wahrscheinlich wurde der IP₅-Kofaktor während der Kristallisation durch freie Phosphate aus dem hochkonzentrierten Ammoniumphosphatpuffer ersetzt. Die Koordination der Inositolpolyphosphat-Kofaktoren in den Phytohormonrezeptoren wird durch basische Aminosäuren bestimmt.

Die für die IP₆-Bindung im TIR1 und die IP₅-Bindung im COI1-Rezeptor benötigten Aminosäuren sind in der nachfolgenden Abbildung gezeigt (Abbildung 3).

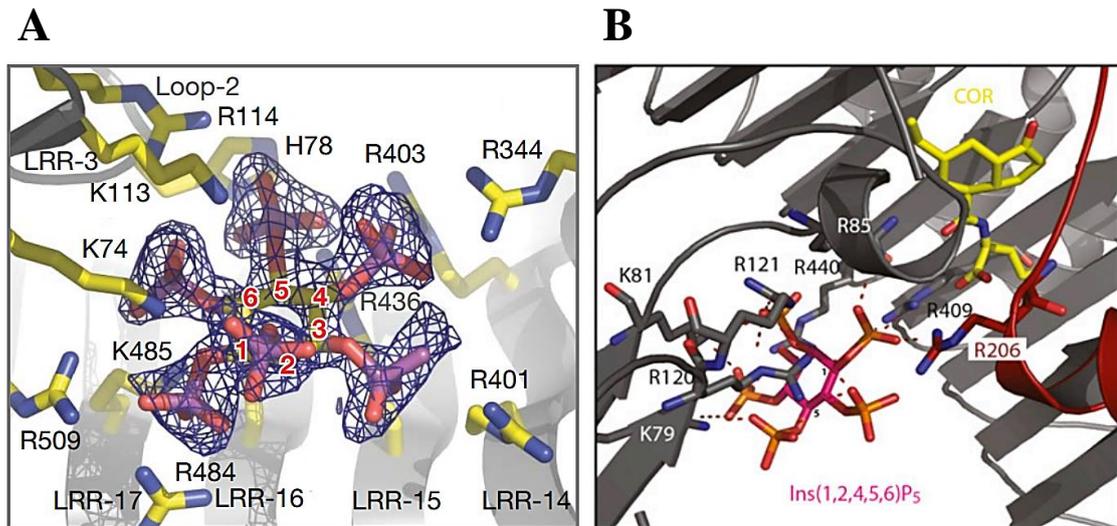


Abbildung 3: Koordination von IP_6 im TIR1 und IP_5 in COI1

A) Koordination von IP_6 im IAA-Rezeptor TIR1. Die für die IP_6 -Bindung relevanten basischen Aminosäuren der LRR-Domäne sind gekennzeichnet. (Abbildung modifiziert nach Tan & Zheng, 2009) **B)** Koordination von I(1,2,4,5,6) P_5 (orange) und Coronatin (gelb) im JA-Ile-Rezeptor COI1. Die für die IP_5 -Bindung relevanten basischen Aminosäuren sind gekennzeichnet. (Abbildung modifiziert nach Laha *et al.*, 2015)

Die Bedeutung des putativen IP_5 -Kofaktors im COI1-Rezeptor wurde daraufhin weiter untersucht, wohingegen beim IP_6 keine weiteren Analysen zur Funktionalität im TIR1 Rezeptor durchgeführt wurden. In Liganden-Bindungsexperimenten wurde die Coronatinbindung der COI1-JAZ1-Komplexe in An- und Abwesenheit verschiedener IPP-Kofaktoren untersucht (Sheard *et al.*, 2010). Durch diese Bindungsexperimente konnte I(1,2,4,5,6) P_5 als wichtigster Kofaktor für die JA-Ile-Perzeption identifiziert werden. Interessanterweise führte auch die Zugabe von I(1,4,5,6) P_4 zu einer gesteigerten Coronatinbindung, wohingegen I(1,4,5) P_3 nur schwachen und IP_6 -Zugabe keinen nennenswerten Einfluss zeigte. Ein Hinweis, dass auch ein anderes IP_5 (I(1,3,4,5,6) P_5) ein funktionaler Kofaktor des COI1-Rezeptors sein kann, lieferten Hefe-2-Hybrid Interaktionstests zwischen COI1 und JAZ9 in einem Hefe *ipk1Δ* Deletionsstamm (Mosblech *et al.*, 2011). Bei diesem Stamm fehlt das Enzym, wodurch I(1,3,4,5,6) P_5 akkumuliert, und eine verstärkte COI1-JAZ9 Interaktion gemessen werden konnte.

1.3 Inositolpolyphosphate (IPPs)

Um den Beitrag von IPPs zur Wahrnehmung von IAA und JA-Ile besser verstehen zu können, soll im folgenden Abschnitt der Stoffwechsel dieser wichtigen Botenstoffe erläutert werden. IPPs enthalten das Polyol *D-myo*-Inositol als Grundgerüst, das wichtigste und häufigste Inositol in Eukaryoten (Abbildung 4). Der sechswertige, zyklische Alkohol zeichnet sich durch einen axialen Substituenten an Position 2 und fünf äquatoriale Substituenten an den Positionen 1, 3, 4, 5 und 6 aus (Michell, 2011; Gillaspy, 2011).

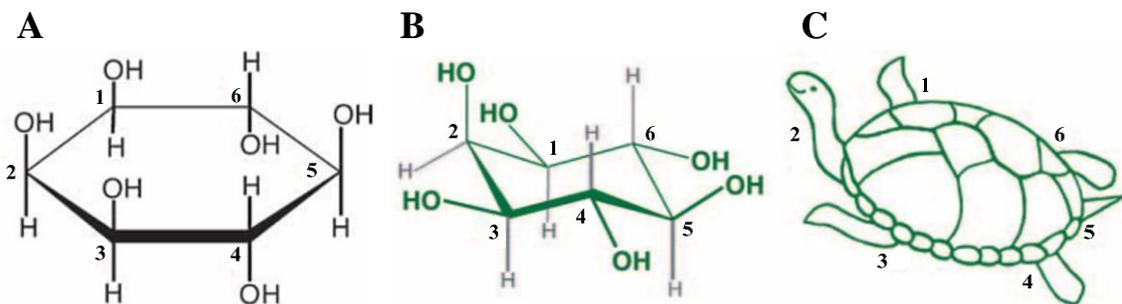


Abbildung 4: *myo*-Inositol

A) Harworth-Projektion **B)** Sesselkonformation **C)** Schematisch als Schildkröte (Agranoff, 1978) (Abbildung modifiziert nach Irvine, 2005)

Es existieren noch 8 andere Isomere von Inositol, namentlich *scyllo*-, *epi*-, *D-chiro*-, *L-chiro*-, *neo*-, *allo*-, *cis*- und *muco*-Inositol, von denen *epi*-, *D-chiro*-, *neo*-, *allo*- und *muco*-Inositol in geringen Mengen (Michell, 2008) in verschiedenen Eukaryoten wie Schaben, Menschen, Sojabohnen und Buchweizen gefunden wurden (Higgs *et al.*, 1972; Lerner, 2002; Streeter, 1980; Horbowicz *et al.*, 1998). Allerdings beinhalten die meisten inositolhaltigen Botenstoffe *D-myo*-Inositol, über dessen Synthese und Metabolisierung mittlerweile viel bekannt ist (Loewus & Murthy, 2000). So ist der *myo*-Inositol Stoffwechsel durch Oxidation unter anderem an der Biogenese von Pektin, Hemicellulose und anderen Zellwandstrukturen beteiligt (Loewus & Loewus, 1983; Morr e *et al.*, 1990). Außerdem können *myo*-Inositole durch Veresterung zu Auxinestern und deren Glykosiden umgewandelt werden (Slovin *et al.*, 1999). Die Konjugation von freiem *myo*-Inositol mit UDP-D-Galaktose initiiert die Bildung von Galaktinol und Galaktosyldonoren, die für die Biosynthese einer Reihe von Oligosacchariden wie Raffinose und Galaktopinitolen wichtig sind (Obendorf, 1997). Des Weiteren werden durch Isomerisierung und Methylierung von *myo*-Inositol und anderen Inositolisomeren

verschiedene O-Methyl-Ether und Isomere gebildet, die bei der Ausprägung von Stresstoleranzen wie z.B. Samenaustrocknung, Salzstress oder Wassermangel eine Rolle spielen (Bohnert & Jensen, 1996; Peterbauer *et al.*, 1998). Außerdem ist *myo*-Inositol das wichtigste Molekül für die Biosynthese von Phytinsäure, Phytinsäurepyrophosphaten und deren metabolischem Recycling durch Hydrolyse und Dephosphorylierung (Murthy, 1996). Auch für die Biosynthese inositolhaltiger Phospholipide (Phosphoinositide) und seinen Vorläufern für spezifische Signaltransduktionsprozesse werden *myo*-Inositole gebraucht (Brearley & Hanke, 1996). Des Weiteren spielen die daraus gebildeten Glykosylphosphatidylinositole und Glykosylinositolphosphorylceramide eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und als Proteinanker (Nakazato *et al.*, 1998). Wichtige Funktionen von Inositolen und deren Derivaten sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

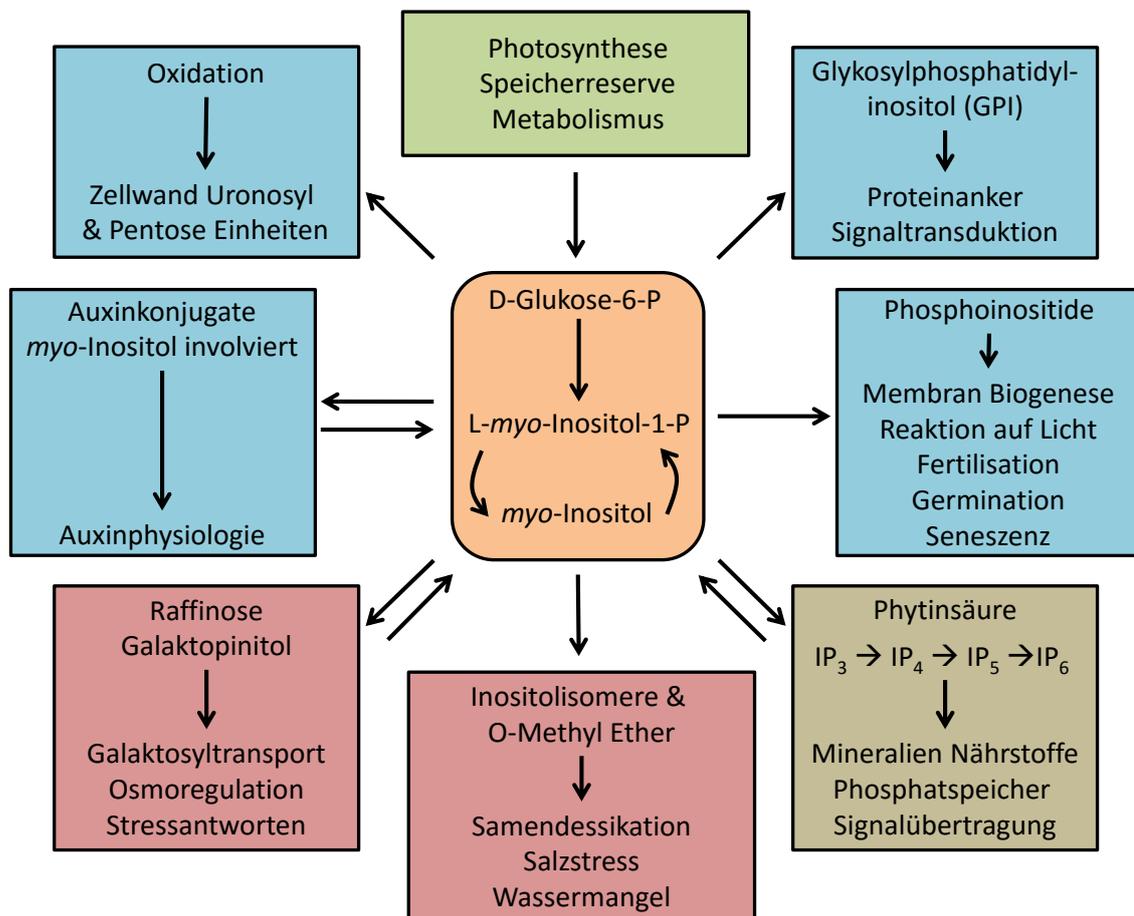


Abbildung 5: Funktionen von *myo*-Inositol im pflanzlichen Metabolismus

(Abbildung modifiziert nach Loewus & Murthy, 2000)

Die wohl essentiellste Eigenschaft des Inositols für seine biologische Funktion besteht in der Fähigkeit der Modifizierung. Es kann an seinen Alkoholgruppen sowohl

phosphoryliert, als auch an Lipide konjugiert werden (Gillaspy, 2011). Diese reversiblen Reaktionen ermöglichen die Fähigkeit dieser Moleküle zur Signalübertragung. Vom Inositol abgeleitete Signalmoleküle übernehmen von der Signalintegration, über Transduktion bis hin zur funktionellen Regulation verschiedenste Aufgaben (Tsui & York, 2010).

1.3.1 Stoffwechsel von IPPs in Pflanzen

Der IPP-Stoffwechsel in Pflanzen beginnt an der Plasmamembran mit der Hydrolyse von Phosphoinositiden (PIs), einer besonderen Klasse von Membranphospholipiden (M. Heilmann & Heilmann, 2015). Das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$; PIP_2) wird durch Phospholipase C (PLC) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ($\text{I}(1,4,5)\text{P}_3$) gespalten. Dieses lösliche Molekül wird durch verschiedene Kinasen und Phosphatasen in andere IPPs umgewandelt (Abbildung 6).

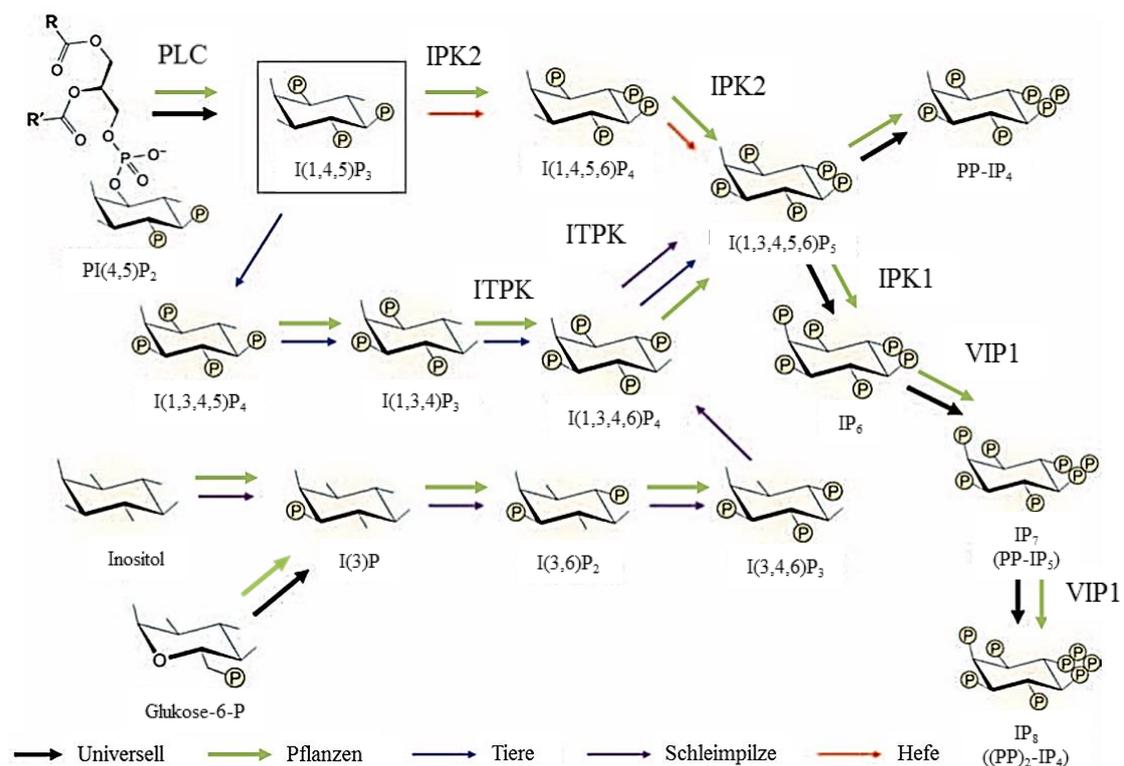


Abbildung 6: IPP-Stoffwechsel in Eukaryoten

Der Metabolismus von IPPs. Es sind identifizierte IPPs und deren Synthesereaktionen in Pflanzen, Tieren, Schleimpilzen, Hefen und universell in Eukaryoten dargestellt. (Abbildung modifiziert nach Irvine, 2005)

Es wurden vier Inositolphosphatkinasen (IPKs) identifiziert, die in nahezu allen Eukaryoten konserviert sind. Sie bilden sowohl Inositolphosphomonoester als auch Inositolphosphodiester. Die für den pflanzlichen Inositolstoffwechsel entscheidenden Kinasen sind die Inositolpentakisphosphat-2-kinase (IPK1), die Inositoltrisphosphat-3,6-kinase (IPK2), die Inositoltrisphosphat-5,6-kinase (ITPK) und die Inositolhexakisphosphatkinase (VIP). Diese Enzyme werden in *Arabidopsis* ubiquitär in allen Geweben und während aller Entwicklungsstadien exprimiert.

Für IPK1 existiert in *Arabidopsis* nur ein Gen, bestehend aus 1356 Nukleotiden. Das kodierte Enzym ist ca. 50,52 kDa groß und besitzt Inositol (1,3,4,5,6)-pentakisphosphat-2-kinase Aktivität (Sweetman *et al.*, 2006). Es existiert eine *ipk1-1* -T-DNA-Insertionslinie aus der SALK Kollektion, die eine starke Verminderung der *IPK1*-Transkriptmengen und der IP_6 -Konzentration in Pflanzen bewirkt. Andere T-DNA-Insertionen erwiesen sich als letal (Kuo *et al.*, 2014). Die Blätter der *ipk1-1*-Pflanzen zeigten sich bei 1 mM Phosphat im Medium achsfern geringelt. Des Weiteren wurden erhöhte intrazelluläre Phosphatkonzentrationen und Phosphathomeostaseeffekte beobachtet (Tsui & York, 2010). IPK1 und ihr Produkt IP_6 könnten eine Rolle bei der Phosphatwahrnehmung und der Homeostase spielen.

Von IPK2 wurden in *Arabidopsis* zwei Isoformen identifiziert, IPK2 α und IPK2 β . Sie besitzen beide Inositol (1,4,5)-trisphosphat-3/6-kinase Aktivität, sind Multikinasen und scheinen teilweise redundante Funktionen zu haben (Stevenson-Paulik *et al.*, 2002). IPK2 α ist ca. 31,9 kDa und IPK2 β ca. 33,5 kDa groß. Beide Enzyme sind kernlokalisiert (Xia *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005) und besitzen eine Sequenzidentität von ca. 73,1 %. IPK2 α konnte mit der Pollen- und Wurzelentwicklung in Verbindung gebracht werden (Xu *et al.*, 2005). Für IPK2 β konnte eine Rolle bei der Achselsprossverzweigung und die Fähigkeit zur Komplementation von IPK2 aus Hefe (bei nur ca. 18 % Identität) gezeigt werden (Xia *et al.*, 2003).

ITPK ist eine weitere Inositoltrisphosphatkinase in *Arabidopsis*. Von ihren vier Homologen IPTK-1, IPTK-2, IPTK-3 und ITPK-4 besitzt nur ITPK-1 *in vivo* Funktionalität (Qin *et al.*, 2005). ITPK-1 ist ca. 36,2 kDa groß, besitzt Inositol (1,3,4)-trisphosphat-5/6-kinase Aktivität und ist mit dem COP9-Signalosom assoziiert (Y. Sun *et al.*, 2002).

Von der VIP-Kinase gibt es in *Arabidopsis* zwei Homologe, VIP1 und VIP2. VIP1 ist ca. 119,5 kDa und VIP2 ca. 120 kDa groß. VIP1 und VIP2 sind zu ca. 88 % identisch

und besitzen Inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat-kinase Aktivität. Es werden die Inositolpyrophosphate IP₇ und IP₈ gebildet (Desai *et al.*, 2014). Es sind die bisher einzigen bekannten Kinasen in Arabidopsis, die Inositolphosphodieester bilden (Laha *et al.*, 2015).

1.3.2 Bedeutung von IPPs als sekundäre Botenstoffe

IPPs erlangten erstmals großes wissenschaftliches Interesse als sekundäre Botenstoffe bzw. Signalmoleküle durch ihre Bedeutung bei der intrazellulären Calciumfreisetzung in tierischen Organismen (Berridge, 1993; Tsui & York, 2010). Viele Zellstimulationen wirken auf Membranrezeptoren die an PLC gekoppelt sind. Die PLC spaltet daraufhin PIP₂ in DAG und IP₃, welches ins Cytosol freigesetzt wird. IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum reagieren auf diesen IP₃-Anstieg mit der Freisetzung von Calciumionen (Ca²⁺). Dieser IP₃/Ca²⁺-Pathway ist in verschiedenen Prozessen wie der Fertilisation, Proliferation, Kontraktion, zellulären Metabolismus, Sekretion und Informationprozessierung in neuronalen Zellen beteiligt (Berridge, 2009).

In Pflanzen wurden überzeugende IP₃-Rezeptoren, die für eine Calciumfreisetzung verantwortlich sind, bislang nicht entdeckt (Krinke *et al.*, 2007). Die IP₃ oder IP₆ initiierte Calciumfreisetzung ist zwar unbestritten, aber der zugrunde liegende molekulare Mechanismus scheint anders als im tierischen System zu funktionieren.

Seit der Entdeckung der Calciumfreisetzung durch IP₃ wurden aber auch viele weitere Funktionen für IPPs und deren bildenden Enzyme herausgefunden und publiziert.

In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde IPK1 als Regulator des mRNA-Exports am Kernporenkomplex identifiziert (York *et al.*, 1999). Dabei aktivieren IP₆ und GLE1 gemeinsam durch Bindung an die RNA-abhängige ATPase Dbp5 (DEAD-box protein 5) den mRNA-Export (Alcazar-Roman *et al.*, 2006). Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde die IPK1 und deren Produkt IP₆ als wichtiger Regulator des mRNA-Kernexports identifiziert (H. S. Lee *et al.*, 2015).

IPK2 ist in Hefe für die Bildung eines aktiven ArgR-Mcm1 Komplex verantwortlich, der für die Transkription argininregulierter Gene wichtig ist (Odom *et al.*, 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IPK2 in Hefe durch Veränderung der Chromatinremodellierungskomplexe SWI/SNF und INO80 einen Einfluss auf Phosphat-responsive Gene (Pho5) hat (Steger *et al.*, 2003). Für IP₄ und IP₅ konnte *in vitro* gezeigt

werden, dass sie die Nukleosomenmobilisierung durch den SWI/SNF-Komplex der Hefe stimulieren (Shen *et al.*, 2003). Es gibt auch Hinweise, dass IPK2 die Aktivität des Chromationremodellierungskomplex Remodels Structure of Chromatin (RSC) beeinflusst. KCS1 bildet in Hefe pyrophosphoryliertes IP₆ und scheint einen Einfluss auf die Endocytose und die Telomerhomöostase zu haben (Saiardi *et al.*, 2002; Saiardi *et al.*, 2005). VIP1 bildet in Hefe ein anderes Inositolpyrophosphat IP₇, welches als Signalmolekül bei der Regulation phosphatresponsiver Gene eine Rolle spielt (Y. S. Lee *et al.*, 2008).

In Mäusen (*Mus musculus*) spielen IPK1 und IPK2 eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung (Verbsky *et al.*, 2005; Frederick *et al.*, 2005). Bei homozygoten Knock-out-Mäusen (ES-Linien) kommt es zur Letalität während der frühen Embryonalentwicklung. IPK1 scheint einen Einfluss auf die Nährstoffabsorption der Embryonen und die Versorgung und Produktion mit wichtigen Entwicklungsfaktoren zu haben. IP6K1 ist für die Synthese der Inositolpyrophosphate IP₇ und IP₈ verantwortlich und zeigt bei homozygoten Knock-out-Mäusen verschiedene Defekte (Bhandari *et al.*, 2008). So sind die männlichen Mäuse steril und kleiner als Wildtyp-Mäuse. Neben dem reduzierten Gewicht haben die Mäuse eine ca. 65 – 70 % geringere Insulinkonzentration im Blutplasma. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IP₇ in Mäusen eine wichtige Rolle bei der exozytotischen Insulinfreisetzung aus pankreatischen β -Zellen spielt (Illies *et al.*, 2007). In pankreatischen β -Zellen kann Glukose einen transienten IP₆-Anstieg und intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung durch Inhibierung von Proteinphosphataseaktivitäten bewirken (Larsson *et al.*, 1997). Defekte in der IHPK1, als menschliches Homolog, konnten als ein Auslöser der Diabetes mellitus Typ II beim Menschen identifiziert werden (Kamimura *et al.*, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass IP₆ menschliche HEK293-Zellen vor TNF α - und Fas-induzierter Apoptose schützt (Verbsky & Majerus, 2005).

Im Zebrafisch (*Danio rerio*) führt ein Knock-down des *IPK1*-Gens zum Verlust der lateralen Asymmetrie. Sämtliche viszerale Organe wie Herz, Verdauungstrakt, Pankreas und Leber zeigen Positionsdefekte (Essner *et al.*, 2002; Essner *et al.*, 2005). Neben anderen Faktoren scheint auch Ca²⁺ bei der links-rechts Asymmetrie in Hühnern und Mäusen eine Rolle zu spielen (McGrath *et al.*, 2003; Raya & Izpisua Belmonte, 2004).

Im Schleimpilz (*Dictyostelium discoideum*) reguliert IP6K katalysierte IP₇-Synthese die cAMP-induzierte Chemotaxis (Luo *et al.*, 2003).

Eine besondere Rolle spielt IP₆ beim RNA-Editing. Es bindet im katalytischen Zentrum der menschlichen Adenosindeaminase ADAR2 und sorgt als Kofaktor für die Stabilität und katalytische Aktivität beim RNA-Editing (Macbeth *et al.*, 2005). Auch bei einem anderen Enzym ADAT1, das für t-RNA Editing verantwortlich ist, wurde IP₆ als Kofaktor identifiziert. Die Bedeutung der IPPs wurde durch die Funktion als Kofaktor noch weiter gesteigert.

Die Bedeutung von IPPs in Pflanzen ist bisher kaum untersucht. Es wurden dynamische Änderungen von IPPs und PIs beim Salzstress beschrieben (I. Heilmann *et al.*, 1999; DeWald *et al.*, 2001). Auch beim Hitzestress und bei mechanischer Verwundung scheinen IPPs und PIs eine Rolle zu spielen (Mosblech *et al.*, 2008; Mishkind *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden IPPs auch mit gravitropen Krümmungsreaktionen in Verbindung gebracht (Perera *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2001). In bisher unveröffentlichten Transkript-Array-Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ingo Heilmann wurden IAA- und JA-induzierte Genexpression in *ipk1-1*-Pflanzen untersucht. Diese Pflanzen weisen veränderte IPP-Konzentrationen auf und es wurde eine verminderte Induktion IAA-abhängiger Gene nach Gravistimulation und eine erhöhte Induktion JA-abhängiger Gene nach Verwundung gemessen. Die Genexpression der JA-induzierten Gene *AOS*, *WRKY70* und *T18K17.7* zeigte sich nach Verwundung in *ipk1-1*-Pflanzen erhöht (Mosblech *et al.*, 2011). Außerdem konnte in Raupenfraßexperimenten eine verringerte Gewichtszunahme von *Plutella xylostella* Larven bei Fütterung auf *ipk1-1*-Pflanzen gemessen werden (Mosblech *et al.*, 2011). Diese Experimente lassen auf eine gesteigerte Defensivantwort in *ipk1-1*-Pflanzen schließen. Es gibt also einige Hinweise, dass Änderungen in IPPs und deren Vorläufermolekülen den PIs in Pflanzen bei verschiedenen Stressantworten von Bedeutung sind. Während die Rolle von IPPs bei der JA-Ile-Wahrnehmung in vorherigen Arbeiten untersucht wurde, sind bislang keine Informationen über die Rolle von IPPs bei der IAA-Wahrnehmung bekannt. Weiterhin ist bislang unklar, ob und wie das Verhältnis von IPPs wie IP₅ und IP₆ einen regulatorischen Einfluss auf die Balance von Wachstum und Abwehr der Pflanzen haben.

1.4 Zielstellung

Die beiden IPPs IP_5 und IP_6 sind durch eine einzige enzymatische Reaktion ineinander umwandelbar. Sie sind beide Kofaktoren unterschiedlicher Phytohormonrezeptoren. IP_6 im IAA-Rezeptor TIR1 und IP_5 im JA-Ile-Rezeptor COI1. In dieser Arbeit sollte zunächst die Bedeutung des IP_6 in der IAA-Wahrnehmung untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob es ein funktionaler Kofaktor ist, der die Perzeption beeinflusst. Des Weiteren sollte auf die Frage eingegangen werden, ob die Balance der beiden IP_5 und IP_6 Kofaktoren eine Art Wippe oder Schalter zwischen der IAA- und JA-Ile-Wahrnehmung ist. Außerdem besteht Interesse an der subzellulären Verteilung der Inositolphosphat und ihrer Schlüsselenzyme, um das Verständnis über die Art und Weise der Signalintegration und Transduktion durch diese Signalmoleküle zu erweitern.

Um den Einfluss der beiden Kofaktoren in Arabidopsis zu untersuchen, sollte zunächst der IPP-Stoffwechsel moduliert werden. Dafür sollten Überexpressionslinien von IPK1 und IPK2 erzeugt und eine *ipk1-1* t-DNA Insertionslinie verwendet werden. Diese Linien sollten sich in ihren IPP-Konzentrationen unterscheiden und als Grundlage für physiologische Experimente und Expressionsanalysen dienen. Anhand der transgenen Pflanzen sollte getestet werden, ob die Modulierung des IPP-Stoffwechsels mit veränderter Wahrnehmung von IAA oder JA-Ile einhergeht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Dokumentation INTAS Gel IX Imager HP Scanjet 3500 c	Intas, Göttingen, D Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA
Elektrophoresezubehör Agarose Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gaschromatographie Shimadzu GC-2010 Plus	Shimadzu, Kyoto, JPN
HPLC Analytik Dionex Ultimate 3000 Series Merck-Hitachi LaChrom L-7100 ProPac™ SAX-10 (4x250 mm) ProPac™ SAX-10G (4x50 mm)	Dionex, Sunnyvale, CA, USA Merck, Darmstadt, D Dionex, Sunnyvale, CA, USA Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Inkubator INNOVA 44	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Mikroskope Axio Imager.M1 LSM 510	Carl Zeiss, Jena, D Carl Zeiss, Jena, D
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech jetzt GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
qPCR-Cycler Rotor Gene Q	Qiagen, Hilden, D

Spannungsgeber Consort E143	Consort, Turnhout, BEL
Scanner HP Scanjet 3500c	Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA
Thermocycler T Professional Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Thermoshaker Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischzentrifugen Biofuge pico Centrifue 5417R	Heraeus, Hanau, D Eppendorf AG, Hamburg, D
Waagen Sartorius research Chyo MK-500c	Sartorius AG, Göttingen, D YMC Co., Kyoto, JPN

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarose	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	VWR International, Radnor, PA, USA
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
DNA Größenmarker (GeneRuler 1kb)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Eisen (III)-chlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D

Indol-3-Essigsäure (IAA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
IPP-Standards	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
D- <i>myo</i> -Inositol-(1,4,5)-trisphosphat • 3 Na (Reinheit > 98%, lyophilisiert)	Vertrieb Deutschland: Biomol GmbH, D
D- <i>myo</i> -Inositol-(1,3,4,5)-tetraphosphat • 8 Na (Reinheit > 98%, lyophilisiert)	
D- <i>myo</i> -Inositol-(1,3,4,5,6)- pentakisphosphat • 5 Na (Reinheit > 98%, lyophilisiert)	
D- <i>myo</i> -Inositolhexakisphosphat • 2 Na (Reinheit > 95%)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, D
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Methanol	VWR International, Radnor, PA, USA
Methyljasmonat (MeJA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Methylpiperazin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Murashige & Skoog-Medium (MS) mit Vitaminen	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Natriumnitrat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (PCI)	Roth, Karlsruhe, D
RNAlater	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
5-Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, D

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 3: Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneJET Gel Extraciton Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4 Software und Programme (EDV)

Tabelle 4: Software und Programme

Programm / Website	Verwendungszweck
Microsoft Office 2007 (Word, Excel, Powerpoint)	Textverarbeitung, Datenauswertung und Diagramme, Präsentationen
NCBI Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Sequenzdatenbank
MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)	Sequenzvergleich Software
Protein Molecular Weight Calculator (www.sciencegateway.org/tools/)	Proteinmassenberechnung
NEBcutter V2.0	Restriktionsprogramm

(http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)	
DoubleDigest Calculator (https://www.lifetechnologies.com/.../double-digest-calculator-thermo-scientific.html)	Plasmidverdau
Aramemnon (http://aramemnon.uni-koeln.de/)	Arabidopsis Datenbank
ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/)	Bildprozessierung und -analyse
Rotor-Gene 6	qRT-PCR Auswertung
ZEN 2012	Digitale Bildbearbeitungssoftware
Photoshop CS5.1	Digitale Bildbearbeitungssoftware
Chromleon 5.8	HPLC Analysesoftware
GCsolution & GCMS Postrun Analysis	GC Analysesoftware

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
YFP.BamHI.for	ATGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
YFP.NotI.rev	ATGCGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT
AtIPK1.SalI.for	ATGCGTCGACATGGAGATGATTTTGGAGGAG
AtIPK1-stop.BamHI.rev	ATGCGGATCCGCTGTGGGAAGGTTTTGAGTT
AtIPK1.BamHI.rev	ATGCGGATCCTTAGCTGTGGGAAGGTTTTGA
AtIPK2.SalI.for	ATGCGTCGACATGCTCAAGGTCCCTGAACAC
AtIPK2-stop.BamHI.rev	ATGCGGATCCGCGCCCGTTCTCAAGTAGGG
AtIPK2_BamHI_revII	ATGCGGATCCCTAGCGCCCGTTCTCAAGTAG

Für die Erstellung der qRT-PCR Primer wurde das Primer-BLAST Tool der NCBI Homepage genutzt. Als Suchkriterien wurde eine PCR-Produktlänge zwischen 70 – 150 Nukleotiden, eine Schmelztemperatur zwischen 57 °C – 63 °C und die Überspannung von Exons gewählt.

Tabelle 6: Oligonukleotide für qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
qPCR_ACT8_for	ATCTTCATCGTCGTGGTTCTTG
qPCR_ACT8_rev	GCGAATCCAGCCTTAACCAT
qPCR_UBC10_for	ACATCATGTAGCGCAGGTCC
qPCR_UBC10_rev	CCGGAGGGAAATGGATGGTT
qPCR_PDF1.2_for	AAGTTTGCTTCCATCATCACCC
qPCR_PDF1.2_rev	ATTGCCGGTGCGTCGAAAG
qPCR_VSP1_for	AAACCTCTTGGAACCTCGGGA
qPCR_VSP1_rev	TTCGATCCGTTTGGCTTGAG
qPCR_JR3_for	GCTACAGGGCACAGTGGTTC
qPCR_JR3_rev	ACACTCCAGCCTCCACAATC
qPCR_LBD29_for	TCGCTGTGAAGCCGCTATTA
qPCR_LBD29_rev	TCACAACCTGTTGTTGGAGAGC
qPCR_LBD17_for	ACGTGAAGCCGCTACTACAA
qPCR_LBD17_rev	TCACAACCTTGTGTTGGAGGGAA
qPCR_SAU15_for	AGGGAATCATCGTCGACACC
qPCR_SAU15_rev	AAGTATGAAACCGGCACCACA

2.1.6 Nährmedien

2.1.6.1 LB-Medium (*Lysogeny Broth Medium,*)

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Pepton (Trypton)	1 % (w/v)
Natriumchlorid	1 % (w/v)

Mit ddH₂O bis 1000 ml auffüllen

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

1,5 % (w/v) Micro-Agar für Festmedium zugeben

2.1.6.2 SD-Medium

Hefemedium ohne Aminosäuren	0,17 % (w/v)
Ammoniumsulfat	0,5 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)

1x Aminosäure Stammlösung

Mit ddH₂O bis 1000 ml auffüllen

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

2 % (w/v) Micro-Agar für Festmedium zugeben

10x Aminosäurelösung (ohne Leucin und Tryptophan):

L-Adenin, L-Arginin, L-Histidin, L-Methionin, L-Serin, L-Uracil	je 200 mg l ⁻¹
L-Isoleucin, L-Lysin, L-Tyrosin	je 300 mg l ⁻¹
L-Phenylalanin	500 mg l ⁻¹
L-Valin	1500 mg l ⁻¹

2.1.6.3 Halbkonzentriertes MS-Medium (Murashige & Skoog)

Murashige & Skoog Medium (mit Vitaminen)	0,22 (w/v)
Saccharose	1 % (w/v)

pH 5,8 mit KOH einstellen

Mit ddH₂O bis 1000 ml auffüllen

Autoklavieren für 15 min bei 121 °C

0,8 % (w/v) Micro-Agar für Festmedium zugeben

2.1.7 Pflanzenlinien

Die für die Experimente verwendeten Pflanzenlinien sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 7: Pflanzenlinien

Bezeichnung	Art	Transgen	Herkunft	Referenz
Col-0 (Wildtyp)	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Columbi- a-0	-		
<i>ipk1-1</i>	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Columbi- a-0	T-DNA Insertion im ipk1-Gen	Dr. John York, Duke University Durham, NC, USA	Stevenson -Paulik <i>et al.</i> , 2005
IPK1-OE	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Colum- bia-0	35S Promoter; Überexpression Inositolpen- takisphosphat-2 Kinase	Diese Arbeit	
IPK2-OE	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Colum- bia-0	35S Promoter; Überexpression Inositoltrisphos- phat-1,6 Kinase	Diese Arbeit	
IPK1- OE::eYFP	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Colum- bia-0	35S Promoter; Überexpression Inositoltrisphos- phat-1,6 Kinase fusioniert mit eYFP	Diese Arbeit	
IPK2- OE::eYFP	<i>A. thaliana</i> Ökotyp Colum- bia-0	35S Promoter; Überexpression Inositolpentakis- phosphat-2 Kina- se fusioniert mit eYFP	Diese Arbeit	

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung und Erzeugung transgener Arabidopsispflanzen

Zur Erzeugung transgener Arabidopsispflanzen mit veränderten IPP-Stoffwechsel wurden cDNA-Konstrukte für verschiedene relevante Enzyme erstellt und in Col-0-Wildtyppflanzen eingebracht. Die Klonierung wurde mit dem Gateway Klonierungssystem von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Als Eintrittsvektor wurde der pEntry-E Vektor verwendet. Nach Amplifikation der zu klonierende Fragmente durch PCR, wurden diese durch spezifische Restriktionsenzyme geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen pEntry-E Vektor ligiert. Anschließend erfolgte eine Transformation der Plasmide in den *E. coli* Stamm DH5a zur Erzeugung der Entry-Klone. Die Entry-Plasmide wurden mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Fisher Scientific isoliert und zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech nach Konstanz geschickt. Nach Verifizierung der Sequenz wurde die Clonase Reaktion mit dem Gateway LR Clonase II Enzyme Mix durchgeführt und das Fragment so in den pCambia3300.1Gs Zielvektor inseriert. Anschließend wurde das Plasmid in *A. tumefaciens* transformiert und durch die Blütentauchmethode in *A. thaliana* Wildtyppflanzen des Ökotyps Columbia-0 transformiert. Die so erzeugten transgenen Pflanzen sind konstitutive Überexpressionslinien mit 35S-Promoter. Es wurden vier Pflanzenlinien generiert die IPK1, IPK2, IPK1::eYFP und IPK2::eYFP überexprimieren.

Die reifen und geernteten Samen der transformierten Pflanzen wurden ausgesät und die heranwachsenden Pflanzen durch mehrmaliges Besprühen mit dem Herbizid Glufosinat (Firma Bayer; Handelsname Basta) auf die Insertion der Resistenzkassette ins Genom selektiert. Zur Verifizierung wurde eine Genotypisierung mit promotorspezifischen Primern durchgeführt.

2.2.2 Anzucht und Ernte von *Arabidopsis thaliana*

Zur oberflächlichen Sterilisierung der Pflanzensamen wurden diese für 15 min in einer 6 %-igen (w/v) Natriumhypochloritlösung mit 0,3 % (w/v) Triton X-100 geschwenkt. Anschließend wurden die Samen über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C stratifiziert. Die Aussaat erfolgte, je nach experimenteller Anforderung, entweder auf Petrischalen mit ½ MS-Medium oder Erde (Pikiersubstrat 1 von Klasman). Die Anzucht erfolgte sowohl

in Pflanzenkammern, als auch im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (7000 Lux Lichtintensität mit 16 h Lichtphase bei 21 °C und 8 h Dunkelheit bei 18 °C). Je nach Experiment wurden juvenile oder adulte Pflanzen verwendet. Juvenile Pflanzen wurden für 7 Tage auf ½ MS-Platten und adulte Pflanzen für 5 Wochen auf Erde angezogen. Geerntetes Pflanzenmaterial wurde in 1,5 ml Reagiergefäße oder 15 ml Falcons überführt und durch sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzol-Methode. Dabei wurde ca. 100 mg Pflanzenmaterial mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Es wurde direkt im Mörser 1 ml Trizollösung (siehe Trizollösung) auf das Pulver gegeben und für ca. 5 min aufgetaut. Anschließend wurde es in ein 2 ml 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 18407 x g und 4 °C, um die Zelltrümmer zu sedimentieren, und Überführung des Überstands in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß. Anschließend wurden 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (v/v 24:1) zugegeben, für 15 s kräftig geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde erneut für 15 min bei 18407 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase mit der RNA in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde ½ Volumen Isopropanol und ½ Volumen Hochsalzlösung (bestehend aus 0,8 M Natriumcitrat und 1,2 M Natriumchlorid) zugegeben. Durch Invertieren wurde der Ansatz gemischt und zur vollständigen Fällung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 18407 x g und 4 °C diente der Pelletierung der RNA. Der Überstand wurde abgenommen und entsorgt und das RNA-Pellet mit 1 ml 75 %-iger (v/v) Ethanollösung zweimal gewaschen. Abschließend wurde die Ethanollösung entfernt, das RNA-Pellet für 10 min bei 50 °C im Heizblock getrocknet und in 20 µl RNase-freiem, bidest. Wasser resuspendiert.

Trizollösung:

Stammlösung	Volumen	Endkonzentration
Roti-Phenol	3,8 ml	38 % (v/v)
4 M Guanidiniumthiocyanat	2 ml	0,8 M
4 M Ammoniumthiocyanat	1 ml	0,4 M
3 M Natriumacetat (pH 5)	334 µl	0,1 M
Glycerin	500 µl	5 % (v/v)
ddH ₂ O (RNase-frei)	ad 10 ml	

Die cDNA wurde mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific aus 1 µg isolierter RNA synthetisiert.

2.2.4 Gravitrope Wurzelkrümmungsexperimente

Die verschiedenen transgenen Linien wurden für 7 Tage auf ½ MS-Agarplatten im Dunkeln angezogen. Sie wurden kurz eingescannt und in einer um 135 ° nach links rotierten Position für weitere 24 h im Dunkeln inkubiert, um den gravitropen Stimulus zu initiieren. Anschließend wurden die Platten erneut eingescannt und die Wurzelspitzenkrümmung und Hypokotylkrümmung mit dem Programm ImageJ anhand der eingescannten Bilder ausgewertet.

2.2.5 Blattflächenanalyse

Für die Analyse der Blattflächen wurden die transgenen Arabidopsislينien in der Pflanzenkammer unter Mitteltagbedingungen (16 h Licht & 8 h Dunkel) für 5 Wochen angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen von oben fotografiert und die Bilder zur Auswertung mit ImageJ verwendet. Zur Kalibrierung wurden die Durchmesser der Blumentöpfe gemessen und zur Flächenanalyse die Bilder bichromatisch konvertiert (schwarz & weiß).

2.2.6 Wurzelkulturen von *A. thaliana*

Um für die Analytik mehr Probenmaterial von Wurzeln zu erhalten, wurden Arabidopsis Wurzelkulturen angesetzt. Dafür wurden die sterilisierten Samen in 1 l Kolben mit 250 ml Wurzelmedium gegeben. Anschließend wurden die Kolben zum Abdunkeln in Alufolie eingewickelt und für 4 – 5 Wochen bei Raumtemperatur und 80 rpm geschüttelt. Für die Ernte wurden die Pflanzen entnommen und kurz auf Küchenpapier zum Trocknen abgetupft. Anschließend wurden die grünen Pflanzenteile abgeschnitten, die Wurzeln in 50 ml Falcons überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Wurzelmedium:

MS-Medium	0,44 % (w/v)
MES	0,05 % (w/v)
Saccharose	1 % (w/v)

ddH₂O bis 1000 ml auffüllen

Mit 1 M KOH auf pH 5,7 einstellen

Autoklavieren für 15 min bei 121 °C

2.2.7 Verwundungsexperimente mit *A. thaliana*

Für die Verwundungsexperimente wurden Wildtyppflanzen und die verschiedenen transgenen Linien für 5 Wochen bei 12 h Licht und 12 h Dunkelheit angezogen, um das Rosettenwachstum zu fördern. Die mechanische Verwundung der Pflanzen erfolgte an den Blättern, indem quer zur Mittelrippe mit einer Pinzette ca. 5 bis 6 mal entlang der Mittelrippe gequetscht wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die verwundeten Blätter mit einer Schere abgeschnitten und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.8 Infiltration von *N. tabacum* Blättern

Die Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert und 50 ml Übernachtskulturen bei 28 °C und 200 rpm angezogen. Die Kulturen wurden am nächsten Morgen bei

3148 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Bakterienpellets in Agrobakterieninokulationsmedium (AIM; bestehend aus 10 mM MgCl₂ & 5 mM MES (pH 5,8)) zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 resuspendiert. Etwa 10 min vor der Inokulation wurde der Bakterienlösung 150 µM Acetosyringone zugegeben und kurz geschwenkt. Für die Inokulation wurde die Bakterienlösung mit 10 ml Einwegspritzen ohne Aufsatz aufgezogen und in die Unterseite der Tabakblätter injiziert. Dabei wurden je sechs Stellen mit ca. 3 cm Durchmesser pro Blatt inokuliert. Nach 24 h wurde die Epidermis der transfizierten Stellen vorsichtig mit Skalpell und Pinzette abgezogen und zur Mikroskopie auf Objektträger aufgebracht.

2.2.9 Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudien

2.2.9.1 Split-Ubiquitin System

Für die Hefe-2-Hybrid Tests wurde ein Split-Ubiquitin-basiertes System (Johnsson & Varshavsky, 1994) von Dualsystems Biotech (Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz) verwendet (Stagljar *et al.*, 1998). Bei dem Split-Ubiquitinsystem werden die zu untersuchenden Proteine mit den N-terminalen und C-terminalen Teil eines Ubiquitins in Beute- und Köderkonstrukten fusioniert. Durch Interaktion der zu untersuchenden Proteine wird das geteilte Ubiquitin rekonstituiert und der daran gebundene Transkriptionsfaktor LexA-VP16 proteolytisch abgespalten. LexA-VP16 aktiviert die Reportergene *His3*, *Ade2* und *lacZ* was Interaktionstests ermöglicht.

Die cDNA für α -Importine 1 bis 6 (außer 5) wurden als Beutekonstrukte in den pPR3N Vektor mit dem N-terminalen Teil des Ubiquitins kloniert. Die cDNA für die beiden Kinasen IPK1 und IPK2 wurden als Köderkonstrukte in den pBR3C Vektor mit dem C-terminalen Teil des Ubiquitins plus LexA-VP16 Transkriptionsfaktor kloniert. Als Positivkontrolle wurden Hefen mit pAI-Alg5 Plasmid und als Negativkontrolle mit pDL2-Alg5 Plasmid transformiert und eingesetzt. Die für die Interaktionsstudien interessanten Plasmidkombinationen wurden mittels Lithiumacetat-Methode (Gietz *et al.*, 1995) in den *S. cerevisiae* Stamm NMY51 transformiert. Die Selektion erfolgte durch leucin- und tryptophanvermittelte Auxotrophien des pPR3N und pBR3C Plasmids. Dafür wurden die transformierten Hefen auf SD –LW Platten ausplattiert und für 3 bis 4 Tage im 30 °C Brutschrank inkubiert.

2.2.9.2 Beurteilung des selektiven Wachstums (Tropftest)

Das selektive Wachstum der transformierten Hefestämme wurde anhand der Koloniebildung verschiedener Zellverdünnungen beurteilt. Die Zellen wurden in 1x TE-Puffer zur OD₆₀₀ von 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴ verdünnt und je 3 µl der Verdünnungen auf SD –LW und SD –LWH Platten getropft. Die Platten wurden für 4 Tage im 30 °C Brutschrank inkubiert und anschließend mit dem Scanner eingescannt. Nur bei Proteininteraktion erfolgte das Wachstum auf den SD –LWH Platten.

10x TE-Puffer:

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

pH Wert von 7,5 einstellen & ddH₂O bis 1000 ml auffüllen

Autoklavieren für 15 min bei 121 °C

2.2.9.3 ONPG-Test (*o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid-Test)

Neben der Betrachtung des selektiven Wachstums kam auch der enzymatische Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität als Reporter für eine erfolgreiche Protein-Protein-Interaktion eingesetzt. Wenn eine Interaktion stattfindet, wird das Enzym β-Galaktosidase (*lacZ* Gen) durch die Freisetzung des Transkriptionsfaktors LexA-VP16 vermehrt exprimiert. Beim ONPG-Test wird der Farbstoff *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (kurz ONPG) durch das Enzym β-Galaktosidase gespalten und die Gelbfärbung des ansonsten farblosen Substrats gemessen.

Für den ONPG-Test wurde eine Pipettenspitze Hefekultur von einer SD –LT Platte gekratzt und in 125 µl Z-Puffer gelöst. 25 µl wurden für die Bestimmung der OD₆₀₀ und die übrigen 100 µl für den ONPG-Test verwendet. Die 100 µl Hefekultur im Z-Puffer wurden in 96-Well Platten pipettiert und nach Zugabe von 12,5 µl Chloroform und 25 µl ONPG-Lösung (4 mg ml⁻¹ in Z-Puffer) direkt in den Plate-Reader gestellt. Die Messung der OD₄₂₀ wurde sofort gestartet und für 30 min durchgeführt. Die Berechnung der Miller-Einheiten erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Miller – Einheiten} = \frac{1000 * V_{max}}{\text{Volumen} * OD_{600}}$$

Z-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	40 mM
NaH ₂ PO ₄	60 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
pH Wert von 7,0 einstellen	

2.2.10 Nachweis exprimierter Proteine in biologischen Proben

2.2.10.1 Proteinextraktion aus infiltrierten *N. tabacum* Blättern

Das infiltrierte Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Anschließend wurde auf ca. 100 µg gemörsertes Pflanzenpulver 150 µl Aufschlusspuffer gegeben, kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 18407 x g für 10 min und die Überführung des löslichen Überstands (Lösliche Fraktion; LF) in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß. Das Sediment (Pelletfraktion, PF) wurde als Kontrolle für die SDS-PAGE und die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

Aufschlusspuffer:

Chemikalie	Konzentration
Hepes (pH 7,5)	50 mM
Natriumchlorid	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
	pH 7,5 eingestellt
	DTT & PMSF frisch zugegeben

2.2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford, 1976). Es wurden 990 µl Bradford-Reagenz in Einwegküvetten pipettiert und 10 µl Proteinextrakt hinzugegeben und kurz gemischt. Die Reaktion wurde für 3 min im Dunkeln inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm Wellenlänge im Photospektrometer gemessen. Nach Abzug des Nullwertes durch Messung einer Reaktion mit Puffer wurde die Proteinkonzentration anhand einer Kalibriergerade bestimmt. Die Kalibrierung wurde mit BSA verschiedener Konzentrationen (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg ml⁻¹) durchgeführt.

Bradford Reagenz:

Coomassie Brilliant Blau G-250	50 mg
Methanol	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	100 ml
ddH ₂ O	850 ml

2.2.10.3 Elektrophoretische Trennung von Proteingemischen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen dient der Auftrennung von Proteinen ihrem Molekulargewicht entsprechend. Es wurden je 15 µg Protein mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 98 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben und 5 µl Marker mit einer Hamiltonspritze in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgel (8 x 10 cm) aufgetragen und in eine SE250 Elektrophoreseapparatur von Hoefer eingespannt. Es wurde SDS-Laufpuffer bis zur Oberkante der Apparatur aufgefüllt und das SDS-Gel bei 35 mA und 300 V für 30 min laufen gelassen. Zur Färbung der Protein wurden die SDS-Gele in einer kleinen Plastikschaale mit Coomassie Färbelösung überschichtet, kurz in der Mikrowelle aufgekocht (Achtung Deckel!) und für 20 min geschwenkt. Anschließend wurde die Coomassielösung abgegossen und das SDS-Gel mit Entfärbelösung überschichtet und für 10 min geschwenkt. Die Entfärbelösung wurde abgegossen und das SDS-Gel noch jeweils dreimal mit entsalztem Wasser übergossen und für 5 min geschwenkt. Eventuell wurde die Färbung und Entfärbung wiederholt, bis die gewünschte Sichtbarkeit der Proteinbanden im SDS-Gel erreicht war. Die gefärbten SDS-Gele wurden eingescannt.

Trenngel (10 %-ig für 4 Gele / 6 ml pro Gel):

30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid Lösung	8 ml
1,88 M Tris/HCl Puffer (pH 8,8)	4,8 ml
ddH ₂ O	6,4 ml
0,5 % (w/v) SDS	4,8 ml
TEMED	20 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	120 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS für 20 min polymerisieren lassen

Sammelgel (5 %-ig für 4 Gele / 2 ml pro Gel):

30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid Lösung	1,33 ml
0,625 M Tris/HCl Puffer (pH 6,8)	1,6 ml
ddH ₂ O	3,47 ml
0,5 % (w/v) SDS	1,6 ml
TEMED	8 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	40 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS für 1 – 2 h polymerisieren lassen

SDS-Laufpuffer (10x):

Tris Base	250 mM
Glycine	1,9 M
SDS	1 % (w/v)
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Coomassie Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blau R250	1 g
Methanol	400 ml
Eisessig	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Entfärbelösung:

Ethanol	400 ml
Eisessig	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

2.2.10.4 Immundetektion von Proteinen (Western Blot)

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurde ein Nassblot durchgeführt und dafür die Apparatur Mini Trans-Blot Cell von Biorad verwendet. Für den Transfer der Proteine wurden zweimal Whatmanpapier und eine Protran BA85 Nitrocellulosemembran von GE Healthcare Life Sciences auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Es wurde erst ein Whatmanpapier, dann die Nitrocellulosemembran, dann das SDS-Gel und noch eine Schicht Whatmanpapier in Transferpuffer übereinandergelegt und in die Blottingschiene eingelegt (Abbildung 7). Die Schiene wurde in richtiger Orientierung (SDS-Gel/Membran; -/+) in die Blottingapparatur gestellt und mit Transferpuffer aufgefüllt.

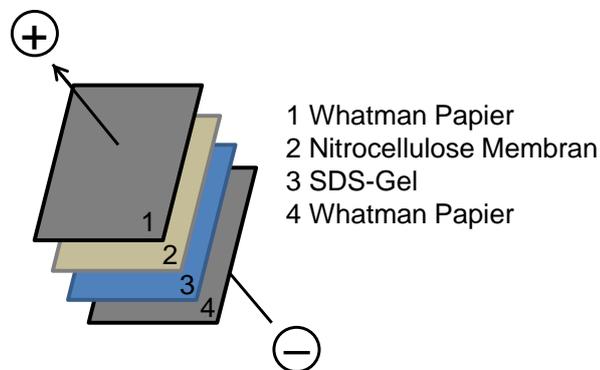


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Western Blot

Der Nassblot wurde für 1 h bei 60 V und 400 mA durchgeführt. Die Nitrocellulosemembran wurde in eine Plastikschiene überführt und kurz mit 1x TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran zum Blockieren für 1 h mit 5 % BSA (w/v) in 1x TBS-Puffer für 1 h geschwenkt. Danach wurde sie über Nacht mit 1:5000 (v/v) verdünntem primärem Antikörper (Anti-GFP IgG Rabbit von Invitrogen) in 1x TBS + 5 % (w/v) BSA im Kühlraum (4 °C) geschwenkt. Am nächsten Tag wurde

sie zum Waschen dreimal für je 10 min in 1x TBS-Puffer geschwenkt. Es folgte die Behandlung mit dem 1:15000 (v/v) verdünnten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase von Sigma Aldrich) in 1x TBS-Puffer für 2 h. Anschließend wurde nochmal in 1x TBS-Puffer für 10 min und in AP-Puffer für 15 min geschwenkt. Es folgte die Inkubation mit Färbelösung für ca. 10 min, um die Alkalische Phosphatasereaktion zu starten. Nachdem die Banden sichtbar wurden, wurde die Färbelösung abgegossen und mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, um die Färbereaktion zu stoppen. Die entwickelten Membranen wurden eingescannt.

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
ddH ₂ O	ad 1000 ml

10x TBS-Puffer:

Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
NaCl	500 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml

AP-Puffer (Alkalische Phosphatase):

Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Färbelösung:

AP-Puffer	15 ml
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (50 mg/ml in 100 % DMF)	52,5 µl
Natriumnitro-Tetrazoliumblau (75 mg/ml in 70 % DMF)	67,5 µl

2.2.11 Mikroskopie

Für die Mikroskopie wurden zwei Mikroskope verwendet, ein konfokales Lasermikroskop (Zeiss LSM 510) oder ein Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager.M1). Die untersuchten Fusionsproteine waren mit dem gelbfluoreszierenden Protein (YFP) fusioniert. Dieser Fluoreszenzmarker ist eine Variante des grünfluoreszierenden Proteins (GFP), welches erstmals 1961 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Bei der Arbeit mit dem LSM 510 wurde der Argonlaser zur Anregung des YFP bei einer Wellenlänge von 514 nm verwendet. Zur Detektion wurde ein MBS 458/514 Filter und ein Emissionswellenlängenbereich von 524 – 539 nm gewählt, um ein spezifisches, intensives Signal zu erhalten. Es wurde hauptsächlich in 40-facher und 63-facher Vergrößerung mikroskopiert. Bei der Mikroskopie mit dem Axio Imager.M1 Mikroskop wurde eine Quecksilberlichtquelle mit Filter zur Anregung, und ein Axio 46HE YFP Filterset für Detektion der Emission verwendet. Es wurde in 20-facher und 40-facher Vergrößerung mikroskopiert.

2.2.12 IPP-Analytik

Zur Quantifizierung von IPPs wurde ein spezielles Extraktionsverfahren und eine HPLC von Dionex (Ultimate 3000 Series) verwendet. Die Analysen erfolgten im Mikromaßstab mit Injektionsvolumen von 1 µl – 100 µl. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

2.2.12.1 Extraktion von IPPs

Der Zellaufschluss erfolgte wie für die Mikroanalytik üblich durch Mörsern des biologischen Materials in flüssigem Stickstoff. Je 500 mg feingemörsertes, gefrorenes Pulver wurde anschließend in 2 ml Reagiergefäße transferiert. Für die saure Extraktion der IPPs wurde ein modifiziertes Protokoll von Stevenson-Paulik (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005) verwendet. Das gefrorene Pulver wurde mit 100 μl 0,5 N HCl, 125 μl 2 M KCl, 125 μl Chloroform und 372 μl Chloroform:Methanol (v/v 1:2) versetzt. Die nun aufgetauten Proben wurden dann für 10 s gemischt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung von wässriger und organischer Phase wurde für 10 min bei 15871 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase (ca. 800 μl) wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und direkt zur HPLC Analyse eingesetzt.

2.2.12.2 Auftrennung von IPPs mittels HPLC

Um die einzelnen IPPs aus dem Gemisch von Salzen und anderen niedermolekularen Substanzen zu trennen, wurde ein HPLC-System von Dionex (Ultimate 3000 Series) eingesetzt. Die Verwendung der HPLC-Technik erlaubt die Analyse und Quantifizierung von IPPs aus verschiedenen Gewebeproben. Es wurden pro Lauf je 100 μl Probe von den 800 μl Gesamtextraktionsvolumen injiziert. Als Laufmittel A wurde 10 mM Methylpiperazin (pH 4) und als Laufmittel B 1 M NaNO_3 (pH 4) verwendet. Die Trennung, durch starken Anionenaustausch, erfolgte durch eine ProPacTM SAX-10G (4x50 mm) Vorsäule und eine ProPacTM SAX-10 (4x250 mm) Hauptsäule mit Hilfe eines komplexen Elutionsprofils. Um die Phosphatverbindungen sichtbar zu machen, erfolgte eine Nachsäulenderivatisierung mit einem Farbreagenz bestehend aus 0,015 % (w/v) FeCl_3 und 0,15 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure. Die Flussrate der Laufmittel betrug 0,5 ml min^{-1} und die des Farbreagenzes 0,3 ml min^{-1} . Die Mischung erfolgte durch ein T-Verbindungsstück nach der Hauptsäule und wurde durch einen statischen Mixer mit einem Mischvolumen von 5 μl verbessert. Dabei kommt es durch eine Komplexierungsreaktion der IPPs mit dem Farbreagenz zur Entfärbung der Lösung und damit negativen Peaks im Chromatogramm. Die Detektion erfolgte bei 550 nm im UV/Vis-Detektor.

Um die Trennung eines IPP-Gemischs aus einem sauren Extrakt von biologischen Proben zu erreichen musste ein komplexer Gradient für den HPLC-Lauf verwendet

werden. Die Trennung erfolgte über starke Anionen-Wechselwirkung mit sogenannten SAX-Säulen. In unserer Analysemethode wurden als Laufmittel A: 10 mM Methyalpiperazin (pH 4) und als Laufmittel B: 1 M NaNO₃ (pH 4) eingesetzt. Der HPLC-Gradient ist in der nachfolgenden Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: HPLC-Gradient

Komplexer Gradient zur Trennung von IPPs. Anteil an Laufmittel A in % (gelb) und Laufmittel B in % (grün) verändern sich über eine Laufzeit von 62,5 min. Die Flussrate (blau) liegt konstant bei 0,5 ml min⁻¹.

Um die korrekten Retentionszeiten der verschiedenen IPPs zu bestimmen wurden HPLC-Läufe mit einem IPP-Gemisch durchgeführt. Dieser HPLC-Standard bestand aus je 25 nmol I(1,4,5)P₃, I(1,3,4,5)P₄, I(1,3,4,5,6)P₅ und IP₆ (Abbildung 9). Es wurde vor und nach den Messungen von biologischen Proben Standardläufe durchgeführt, um eventuelle Retentionszeitverschiebungen zu berücksichtigen.

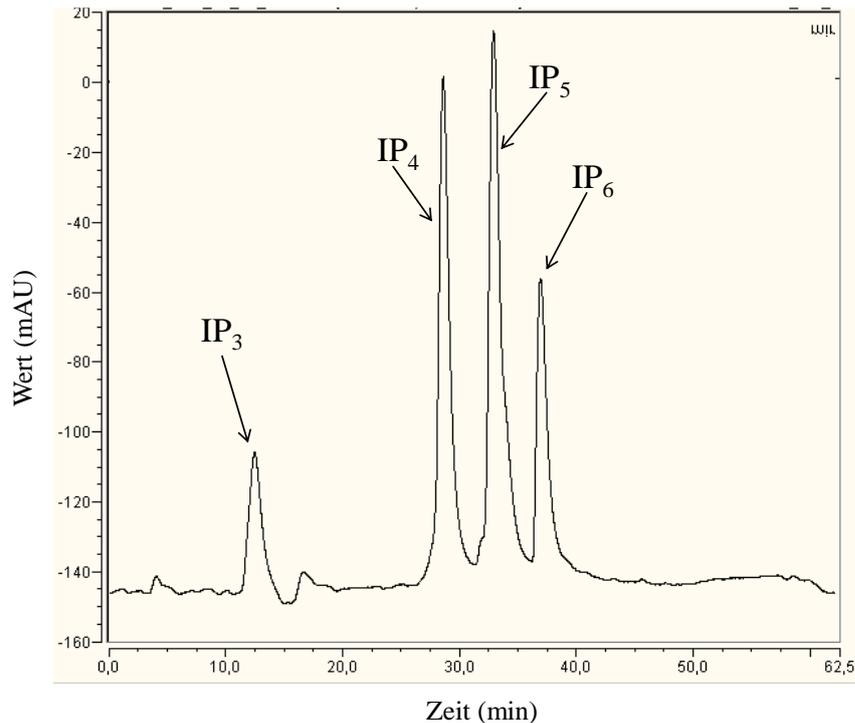


Abbildung 9: HPLC-Standard: IPP-Gemisch

Ein Gemisch aus je 25 nmol I(1,4,5)P3, I(1,3,4,5)P4, I(1,3,4,5,6)P5 und IP6. Das HPLC-Programm hatte eine Laufzeit von 62,5 min.

Der IPP-Konzentration in Samen ist um ein Vielfaches höher als in anderen Geweben von Arabidopsis. Zur Etablierung der HPLC-Analytik wurden in ersten HPLC-Läufen die IPP-Konzentratione von Wildtyp- und *ipk1-1*-Samen gemessen (Abbildung 10). Auffällig ist die Verringerung des IP₆-Peaks und die Bildung des IP₄- und IP₅-Peaks in *ipk1-1*-Samen. Diese Messungen wurden mit einem anderen HPLC-Programm durchgeführt, weshalb die Laufzeit 80 min betrug.

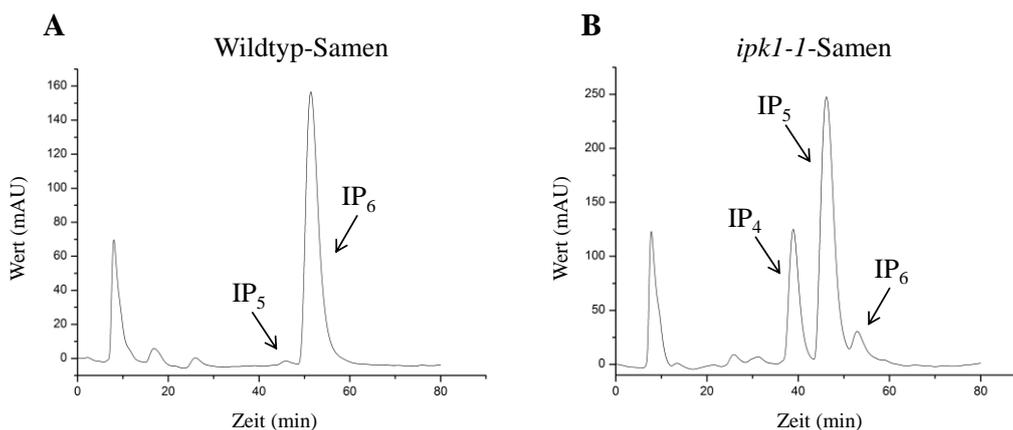


Abbildung 10: HPLC-Chromatogramme für IPP-Analyse in Arabidopsissamen

HPLC-Chromatogramme der IPP-Analyse aus **A)** Wildtyp-Samen und **B)** *ipk1-1*-Samen. Das HPLC-Programm hatte eine Laufzeit von 80 min.

2.2.12.3 Quantifizierung von IPPs

Zur Quantifizierung der IPPs in den Proben wurde die Chromeleon Software von Dionex verwendet. Es musste bei den Laufeinstellungen darauf geachtet werden, dass negative Peaks integriert werden können. Die Integration erfolgte manuell und die Kalkulation wurde mit Excel durchgeführt. Durch Standardläufe mit einem IPP-Gemisch bestehend aus den vier IPPs: I(1,4,5)P₃, I(1,3,4,5)P₄, I(1,3,4,5,6)P₅ und IP₆ wurde eine Kalibriergerade erstellt und zur Kalkulation verwendet.

2.2.13 PI-Analytik

Neben der Analyse der IPPs wurden auch Analysen von PIs ,als wichtige Vorläufermoleküle, durchgeführt. Alle Arbeiten mit Chloroform und Hexan wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die Analyse der Phospholipide wurde durch Kombination von Lipidtrennung mittels Dünnschichtchromatographie, Derivatisierung der Fettsäuren und Analyse der Fettsäuren mittels Gaschromatographie durchgeführt.

2.2.13.1 Extraktion von PIs

Für die Lipidextraktion aus pflanzlichem Gewebe wurde dieses zuerst gewogen und anschließend durch Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Dem fein gemörsten Pflanzenpulver wurde 1 ml Chloroform/Methanol (1:2, v/v) zugegeben und

das gefrorene Pulver darin aufgetaut. Der Lipidextrakt wurde in ein neues Glasgefäß mit Teflondeckel überführt und 250 µl 0,5 M EDTA und 500 µl 2,4 M HCl zugegeben. Nach kräftigem Vortexen für 5 s wurde der Lipidextrakt für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Chloroform zugegeben und für 5 s gemischt. Zur schnelleren Phasentrennung wurde bei 197 x g für 2 min zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde mit Hilfe einer Glaspasteurpipette in ein neues Glasgefäß überführt. Für eine Reextraktion verbleibender Lipide in der wässrigen Phase, wurden dieser erneut 500 µl Chloroform zugegeben und erneut gemischt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde erneut mit Glaspasteurpipetten abgenommen und mit der bereits überführten organischen Phase vereinigt. Der organische Lipidextrakt wurde im Stickstoffstrom komplett getrocknet und in 100 µl Chloroform aufgenommen.

2.2.13.2 Separation von PIs

Die Trennung der verschiedenen PIs wurde mit Kieselgelplatten durchgeführt (TLC Silica gel 60; 20 x 20 cm; Merck). Als Laufmittel wurden für die PI Trennung 45 ml Chloroform, 45 ml Methanol, 4 ml Ammoniumhydroxid und 11 ml bidest. Wasser gemischt. Für die PIP und PIP₂ Trennung wurden als Laufmittel 65 ml Chloroform, 25 ml Methanol und 8 ml 96 %-ige Essigsäure gemischt. In die Glaskammern mit den Laufmitteln wurden je ein 22 x 22 cm großes Stück Whatmanpapier gestellt und die Kammern für ca. 2 h äquilibriert, um eine gesättigte Lösungsmittelatmosphäre zu schaffen. Für die PI-Trennung wurden 10 µl der Lipidextrakte auf einer 1 cm breiten Linie in 3 cm Höhe aufgetragen. Zusätzlich wurden Standards von PI und PS auf der linken Seite der Dünnschichtplatte aufgetragen. Für die PIP und PIP₂ Trennung wurden 50 µl Lipidextrakt ebenfalls in 3 cm Höhe und PIP, PIP₂, PC und Lyso-PC Standards auf der linken Seite aufgetragen. Die Dünnschicht wurden für ca 1 h – 1,5 h in die Laufkammern gestellt, bis die Laufmittelfront ca. 3 cm unterhalb der Oberkante verlief. Sie wurden herausgenommen und für 5 min unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde die linke Seite der Dünnschichtplatten (Standards) mit Hilfe eines Glasschneiders abgetrennt und für 5 s in eine Kupfersulfat-Lösung (10 g CuCO₄ x 5 H₂O; 0,8 % (v/v) H₃PO₄ in 100 ml H₂O) getaucht. Nach kurzem Trocknen (ca. 30 s) wurden sie für 10 min bei 180 °C auf einer Heizplatte erhitzt, um die Standards sichtbar zu machen. Mit Hilfe des sichtbaren Standardteils wurden die aufgetrennten PI, PIP und PIP₂

Bereiche auf dem rechten Teil der Platten mit einem dünnen Spatel ausgekratzt und in neue Glasgefäße überführt.

2.2.13.3 Transmethylierung von Fettsäuren isolierter Lipidklassen

Die Transmethylierung der Fettsäuren so isolierter Lipidklassen erfolgte mit Natriummethoxid (Hornung et al., 2002). Dem ausgekratzen Silicagel mit Lipiden wurden je 5 μl 1 mg ml^{-1} Tripentadecanoin (Tri 15:0) als interner Standard zugegeben. Anschließend wurde den Proben 333 μl Toluol/Methanol (1:2) und 167 μl 0,5 M Natriummethoxid zugesetzt, für 5 s gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Zum Abstoppen der Transmethylierungsreaktion wurden 100 μl 5 M NaCl und 2 ml n-Hexan zugegeben und kurz gemischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 197 x g wurde die obere Phase in ein neues Glasgefäß überführt und unter dem Stickstoffstrom bis zur Trockenheit eingedampft. Abschließend wurden die transmethylierten Proben in 150 μl Acetonitril aufgenommen, in GC-Gefäße überführt, erneut unterm Stickstoffstrom eingedampft und in 10 μl Acetonitril als Messvolumen aufgenommen.

2.2.13.4 Quantifizierung der lipidassoziierten Fettsäuren mittels Gaschromatographie

Die GC-Analyse wurde mit dem Gerät Shimadzu GC-2010 Plus mit Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} verwendet. Zur Trennung wurde die Säule Agilent J&W DB-23 (30 m x 0,25 mm; Festphase: Cyanopropyl Polysiloxane; Filmdicke: 0,25 μm) von Agilent Technologies verwendet. Es wurde 1 μl Probe im Split-Modus bei 250 °C injiziert. Der Temperaturgradient war 150 °C für 1 min, von 150 °C auf 200 °C mit 8 °C min^{-1} , von 200 auf 250 °C mit 4 °C min^{-1} und 250 °C halten für 10 min. Die Fettsäurequantifizierung erfolgte anhand des internen Tripentadecanoin-Standards mit dem Programm GCMS Postrun Analysis.

2.2.14 Quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Echtzeit-RT-PCR wurde 1:10 verdünnte cDNA aus 1 μg transkribierter RNA eingesetzt. Als Referenz wurden aktinspezifische Primer und

ubiquitinspezifische Primer eingesetzt. Es wurde der Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) Kit von Thermo Scientific für die qRT-PCR verwendet.

qRT-PCR Reaktionsansatz:

SYBR Green Reaktionsmix (2X)	7,5 µl
bideest. Wasser	5 µl
Primer (10 µM)	1,5 µl
cDNA (1:10)	1 µl

Die Reaktionen folgten folgendem Programm.

qRT-PCR Laufprogramm:

95 °C 10	10 min	
95 °C	10 s	} 45 Zyklen
60 °C	15 s	
72 °C	20 s	
72 °C	90 s	
72 °C zu 99 °C	1 °C alle 5 s	

Die Analyse der qPCR-Läufe wurde mit dem Programm Rotor-Gene 6 von Qiagen durchgeführt. Die vom Programm berechneten CT-Werte der Gene (Threshold 0,05) wurden in Excel kopiert und die relative Genexpression mit der Δ CT-Methode nach folgender Formel berechnet. Für die Referenzgene wurde ein CT-Wert aus dem geometrischen Mittel beider CT-Werte (von Aktin und Ubiquitin) gebildet.

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-(CT_{\text{Referenzgene}} - CT_{\text{Analysegene}})}$$

3. Ergebnisse

3.1 Distribution von IPPs in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana*

Bislang ist über die Verteilung von höheren IPPs in Pflanzen wenig bekannt. Um einen Eindruck über die Verteilung von IPPs in *A. thaliana* zu bekommen, wurden die IP₅- und IP₆-Konzentrationen verschiedener Gewebe untersucht und Proben von Blüten, Stengeln und Blättern 6 Wochen alter Pflanzen analysiert (Abbildung 11). Für die Messung von Wurzelproben wurden die Pflanzen in Flüssigkulturen mit einem speziellen Wurzelmedium angezogen (siehe 2.2.6).

Beim Vergleich der Chromatogramme von Arabidopsissamen und Arabidopsisblättern fielen die wesentlich geringeren IPP-Konzentrationen in den Blättern auf (Abbildung 11B/C). Die Abundanz war sehr gering und lag nahe der Sensitivitätsgrenze. Ein weiteres Problem waren Schwankungen der Basislinie. Diese wurden mit der Verwendung eines statischen Mixers (ca. 5 µl Mischkammer) für die Nachsäulenderivatisierung behoben. Die Trennung der IPPs über die Retentionszeit war vollständig. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen bis zur Basislinie integriert und mit Hilfe der Standards die Stoffmenge pro Frischgewicht berechnet.

Die IP₅-Konzentration in den Wurzeln war mit ca. 0,25 nmol g⁻¹ (Fg) am geringsten (Abbildung 11D). In den Stengeln und Blättern betrug die IP₅-Konzentration ca. 0,75 nmol g⁻¹ (Fg). Am höchsten war er in den Blüten mit ca. 4 nmol g⁻¹ (Fg). Die IP₆-Konzentration war in den Wurzeln mit ca. 3 nmol g⁻¹ (Fg) ebenfalls am geringsten (Abbildung 11E). Im Stengel konnten ca. 11 nmol g⁻¹ (Fg) und in den Blättern ca. 5 nmol g⁻¹ (Fg) gemessen werden. Die höchste IP₆-Konzentration wurde mit ca. 100 nmol g⁻¹ (Fg) in Blüten gemessen.

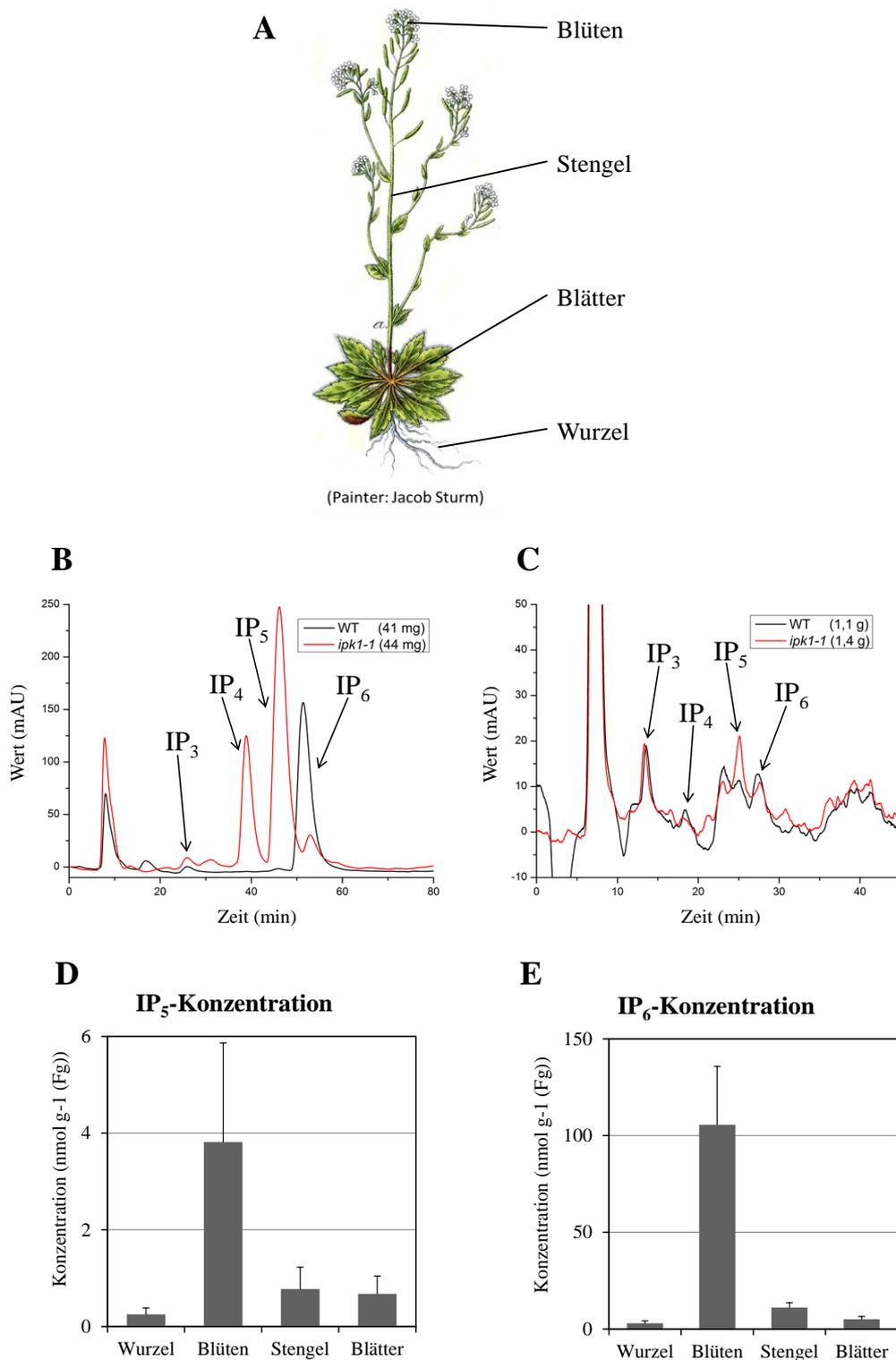


Abbildung 11: Verteilung von IP₅ und IP₆ in Geweben von Arabidopsis

A) *Arabidopsis thaliana* Zeichnung von Jacob Sturm. HPLC-Chromatogramme der IPP-Analyse im Vergleich: B) Arabidopsisissamen und C) Arabidopsisisblätter. Chromatogramme von Wildtyppflanzen (schwarz) und *ipk1-1*-Pflanzen (rot) sind übereinander gelegt. Die Frischgewichte der Proben sind in der Legende angegeben. Die Laufzeiten variieren aufgrund verschiedener HPLC-Programme (ältere Messungen) D) IP₅- und E) IP₆-Konzentrationen verschiedener Pflanzengewebe von Arabidopsis. Es wurden Wurzel-, Blüten-, Stengel- und Blattproben von 6 Wochen alten Wildtyppflanzen analysiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

3.2 Charakterisierung IPP-modulierter Pflanzen

3.2.1 Genexpression von IPK1 und IPK2 in den transgenen Linien

Die Überprüfung der basalen IPK1- und IPK2-Genexpression wurde mittels qRT-PCR Messungen durchgeführt. Es wurden die Transkriptlevel von Blättern 5 Wochen alter Pflanzen analysiert. Die relative Genexpression von IPK1 war in den *ipk1-1*-Pflanzen mit ca. 0,19 gegenüber dem Wildtyp mit ca. 0,41 signifikant reduziert. Die IPK1-OE-Pflanzen zeigten mit ca. 1,75 eine sehr stark erhöhte IPK1-Expression. IPK2-OE-Pflanzen zeigten keine veränderte IPK1-Expression im Vergleich zum Wildtyp. Für die basale IPK2-Expression wurden im Wildtyp, den *ipk1-1*-Pflanzen und den IPK1-OE-Pflanzen ähnlichen Transkriptmengen von ca. 0,57, 0,63 und 0,49 gemessen. Die IPK2-OE-Pflanzen wiesen eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte IPK2-Expression von ca. 2,12 auf. Es wurde in den jeweiligen Überexpressionslinien eine erhöhte IPK1- und IPK2-Expression und in den *ipk1-1*-Pflanzen eine verringerte IPK1-Expression gemessen.

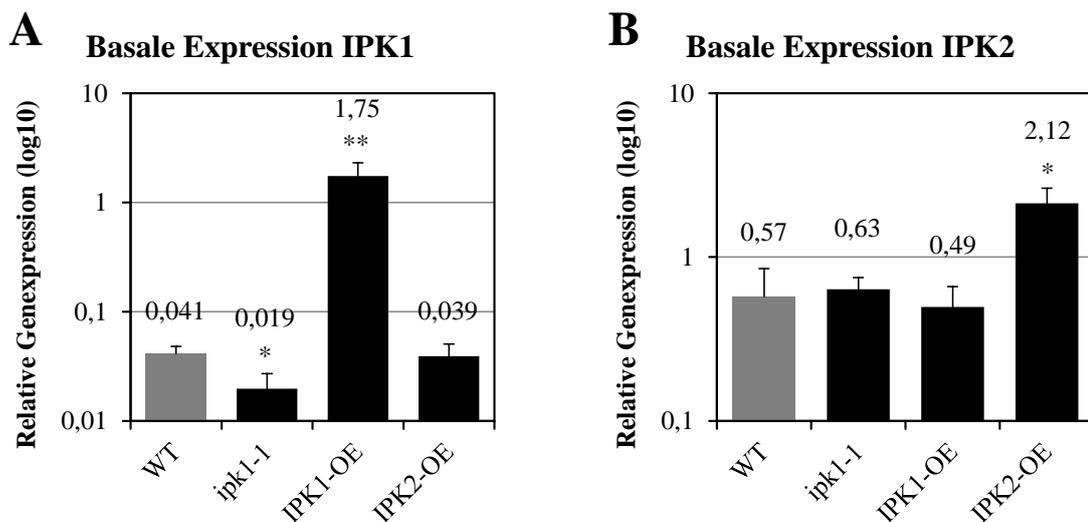


Abbildung 12: Basale Transkriptmengen von IPK1 und IPK2 in IPP-modulierten Pflanzen

Relative Genexpression berechnet nach Δ CT-Methode mit $2^{-\Delta CT}$ -Werten auf y-Achse von **A)** IPK1 und **B)** IPK2 in Blättern von 5 Wochen alten Pflanzen. Es wurden die IPK1- und IPK2-Transkriptlevel von Wildtyp, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE bestimmt. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.2.2 Basale IPP-Konzentrationen

Um die Modulierung der IPP-Konzentrationen in den verschiedenen Linien zu überprüfen, wurden die basalen IP_5 - und IP_6 -Konzentrationen bestimmt. Dafür wurden Blätter 5 Wochen alter Pflanzen analysiert (Abbildung 13). Die IP_5 -Konzentrationen im Wildtyp (Abbildung 13A) lagen bei ca. $1,5 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) und in den IPK1-OE bei ca. $1,9 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg). In den IPK2-OE-Pflanzen war die IP_5 -Konzentration mit ca. $2,4 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) ebenfalls nur leicht erhöht. Eine signifikante Erhöhung der IP_5 -Konzentration ($p < 0,001$) konnte mit ca. 8 nmol g^{-1} (Fg) in den *ipk1-1*-Pflanzen gemessen werden. Die IP_6 -Konzentration (Abbildung 13B) liegt in den Wildtyppflanzen bei ca. $5,1 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg). Die *ipk1-1*-Pflanzen haben mit ca. $2,9 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) eine signifikant niedrigere IP_6 -Konzentration als der Wildtyp. Für die IPK1-OE und IPK2-OE-Pflanzen konnten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte IP_6 -Konzentrationen ($p < 0,05$) von ca. $7,6 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) gemessen werden.

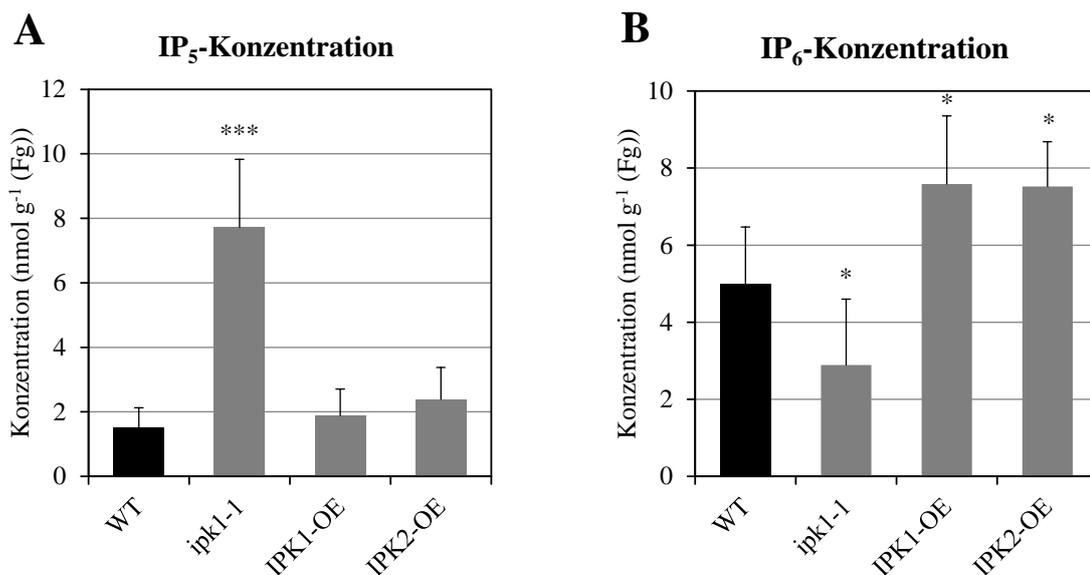


Abbildung 13: Basale IP_5 - und IP_6 -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen

Basale **A)** IP_5 - und **B)** IP_6 -Konzentration in verschiedenen Pflanzen mit verändertem IPP-Stoffwechsel. Es wurden die Linien WT, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE analysiert. Zur Analyse wurden Blätter von 5 Wochen alten Pflanzen verwendet. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Die Experimente wurden sechsmal durchgeführt.

3.2.3 PI-Gehalte

PIs sind Vorläufermoleküle des IPP-Stoffwechsels. Um die PI-Gehalte der IPP-modulierten Pflanzen zu untersuchen, wurde eine Lipidextraktion, gefolgt von der

Transmethylierung der assoziierten Fettsäuren und gaschromatographischer Analyse, durchgeführt (König *et al.*, 2008).

Es wurden die Gehalte an PI, PIP und PIP₂ bestimmt (Abbildung 14). Der PI-Gehalt der Wildtyppflanzen betrug ca. 17 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg), der PIP-Gehalt ca. 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) und der PIP₂-Gehalt ca. 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg). Die IPK1-OE-Linie wies mit einem PI-Gehalt von ca. 13 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg), einem PIP-Gehalt von ca. 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) und einem PIP₂-Gehalt von ca. 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) ähnlich Werte auf. Die *ipk1-1* und IPK2-OE-Linien hatten erhöhte PI-Gehalte im Vergleich zum Wildtyp. Der PI-Gehalt der *ipk1-1*-Pflanzen betrug ca. 42 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg), der PIP-Gehalt ca. 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) und der PIP₂-Gehalt ca. 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg). In den IPK2-OE-Pflanzen wurde ein PI-Gehalt von ca. 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg), ein PIP-Gehalt von ca. 3,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) und ein PIP₂-Gehalt von ca. 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Fg) gemessen.

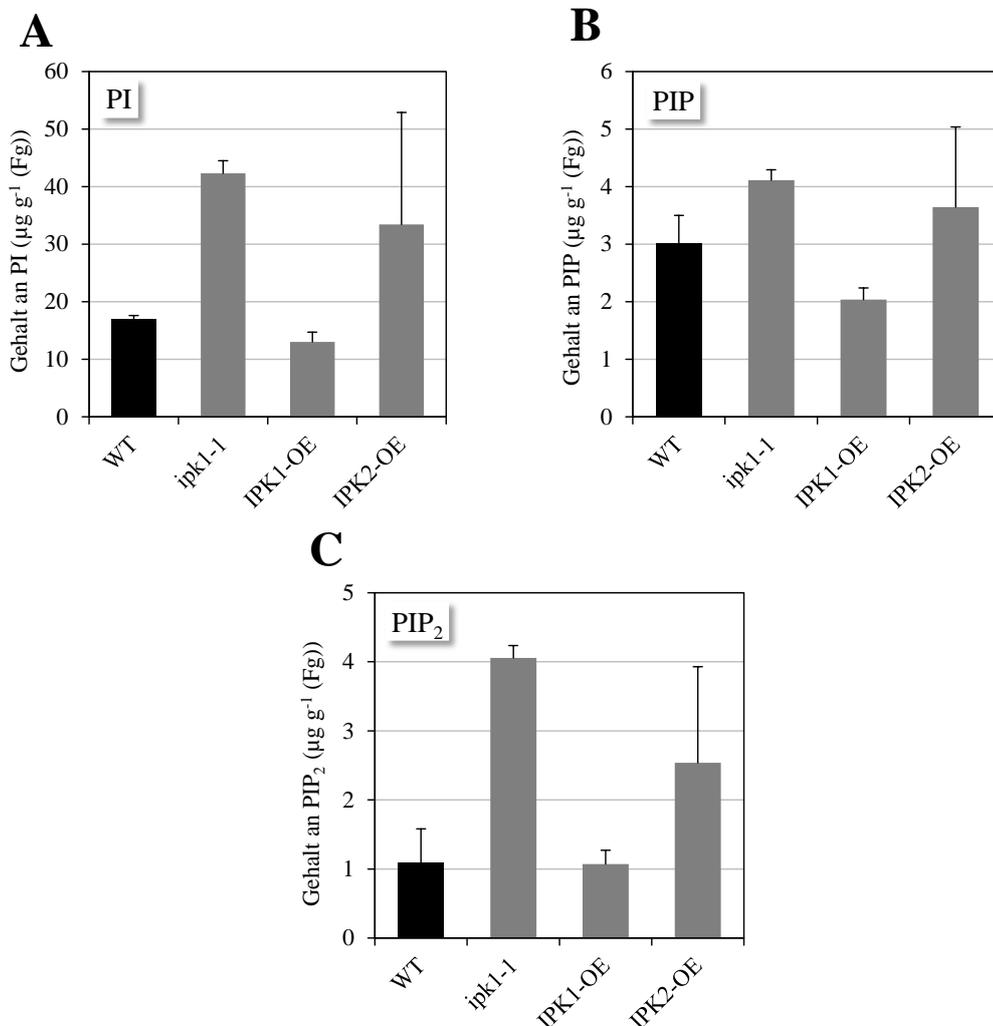


Abbildung 14: PI-Gehalt IPP-modulierter Pflanzen

Die A) PI, B) PIP und C) PIP₂ von Wildtyp, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE wurden bestimmt. Dafür wurden die Pflanzen 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen und die PIs extrahiert, separiert und mittels GC analysiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

3.2.4 Phytohormonkonzentrationen

Um den Einfluss des IPP-Stoffwechsels auf die Phytohormonkonzentration in den verschiedenen Linien zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Abteilung Biochemie der Pflanze der Georg-August-Universität Göttingen eine Phytohormonanalyse durchgeführt. Es wurden die Konzentrationen von 22 verschiedenen Substanzen gemessen. Nachfolgend sind die Werte für die drei Phytohormone IAA, JA und SA dargestellt (Abbildung 15). Im Anhang finden sich die Werte aller weiteren gemessenen Hormone und Derivate.

Die Messung der IAA-Konzentration ergab im Wildtyp ca. $0,01 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg). Die *ipk1-1*-Pflanzen zeigten mit ca. $0,025 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) leicht erhöhte und die IPK1-OE-Pflanzen mit $0,004 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) leicht geringere Konzentrationen. Signifikante Unterschiede bei der IAA-Konzentration konnten in den IPK2-OE-Pflanzen gemessen werden. Diese zeigten mit ca. $0,25 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) eine etwa 25-fach erhöhte IAA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp. Die JA-Konzentration von Wildtyp- und IPK1-OE-Pflanzen lag bei ca. $0,03 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg). Die *ipk1-1*-Pflanzen zeigten mit ca. $0,045 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) leicht erhöhte Werte und die IPK2-OE mit ca. $0,055 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) signifikant erhöhte Werte. Bei der SA-Messung konnten für Wildtyp-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen Konzentrationen von ca. $0,15 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) gemessen werden. In den *ipk1-1*-Pflanzen war die Konzentration mit ca. $1,1 \text{ nmol g}^{-1}$ (Fg) etwa 8-fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Die relativen Gehalte von 12COOH-JA-Ile war in *ipk1-1*-Pflanzen gegenüber den anderen Pflanzen ca. 30-fach erhöht (siehe Anhang Tabelle 12).

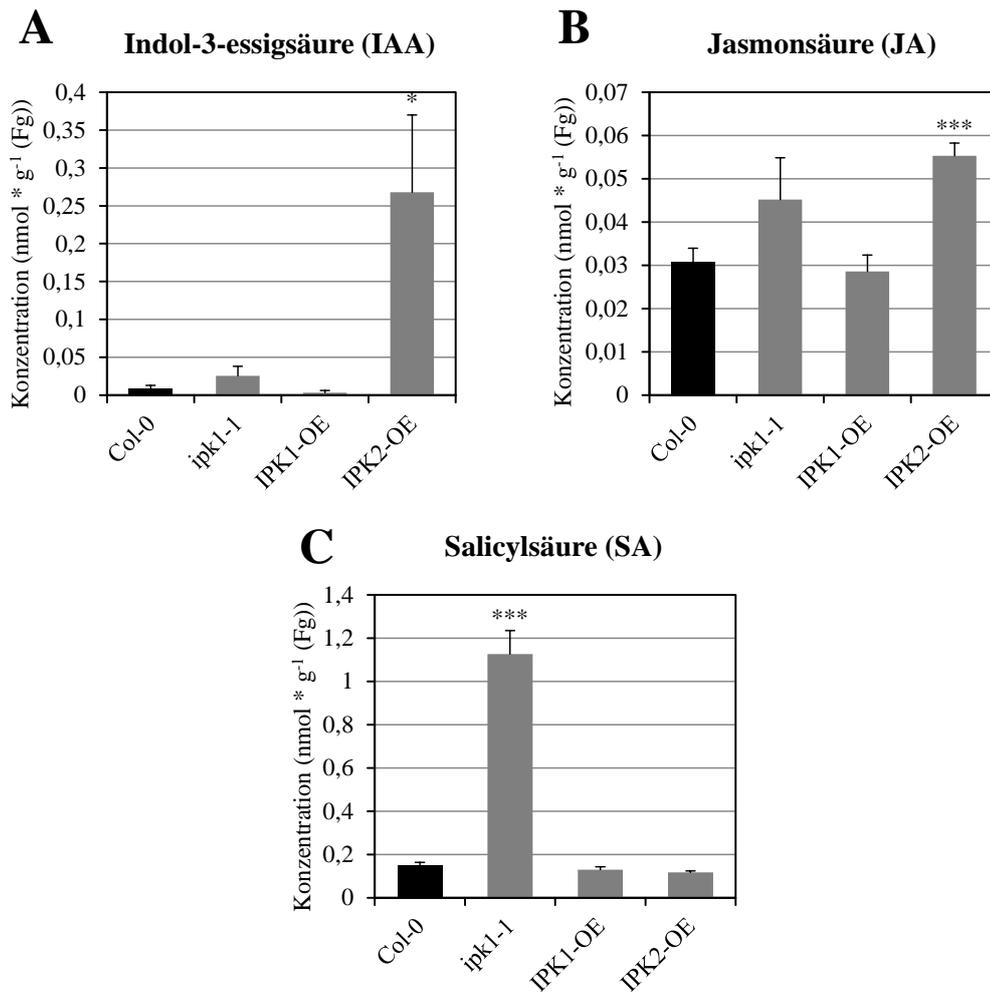


Abbildung 15: Phytohormonkonzentration IPP-modulierter Pflanzen

Es wurden die Phytohormonkonzentrationen von Wildtyp (Col-0), *ipk1-1*-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen untersucht. Die Konzentrationen von **A**) IAA, **B**) JA und **C**) SA sind in den Diagrammen dargestellt. Weitere Phytohormonkonzentrationen sind im Anhang aufgeführt. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Es wurden drei biologische Replikate analysiert.

3.3 Dynamische Änderungen der IPP-Konzentrationen

In vorherigen Arbeiten wurde beschrieben, dass IP_3 sich in Pflanzen dynamisch ändert, die Stressfaktoren ausgesetzt sind, deren Signalleitung über IAA oder JA erfolgt (Perera *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006; Mosblech *et al.*, 2008). Bislang ist unklar, ob solche dynamischen Änderungen auch für IPPs höherer Ordnung beobachtet werden können, wie z.B. für IP_5 und IP_6 . Um diese Frage zu klären, wurden Pflanzen Stressbedingungen unterworfen, die für die IAA- und JA-Signalleitung relevant sind.

3.3.1 Temperaturinduzierte Änderung von IPPs

Es gibt Hinweise, dass eine Erhöhung der Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die IAA-Signalleitung von Pflanzen hat (Franklin *et al.*, 2011; J. Sun *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob IAA-abhängige Prozesse einen Einfluss auf die Konzentrationen der IP₅- und IP₆-Kofaktoren haben, wurden Temperaturverschiebungsexperimente an 5 Wochen alten Wildtyppflanzen durchgeführt. Die Temperatur wurde für eine und zwei Stunden von 21 °C auf 28 °C angehoben und die IPPs aus Blattproben analysiert (Abbildung 16). Es konnte sowohl ein signifikanter Anstieg der IP₅-Konzentration als auch der IP₆-Konzentration gemessen werden. Die IP₅-Konzentration stieg von ca. 1,25 nmol g⁻¹ (Fg) über ca. 1,5 nmol g⁻¹ (Fg) nach einer Stunde auf ca. 2,2 nmol g⁻¹ (Fg) nach zwei Stunden. Der Anstieg der IP₆-Konzentration war noch deutlicher von ca. 5,1 nmol g⁻¹ (Fg) über 7,0 nmol g⁻¹ (Fg) nach einer Stunde auf 9,1 nmol g⁻¹ (Fg) nach zwei Stunden.

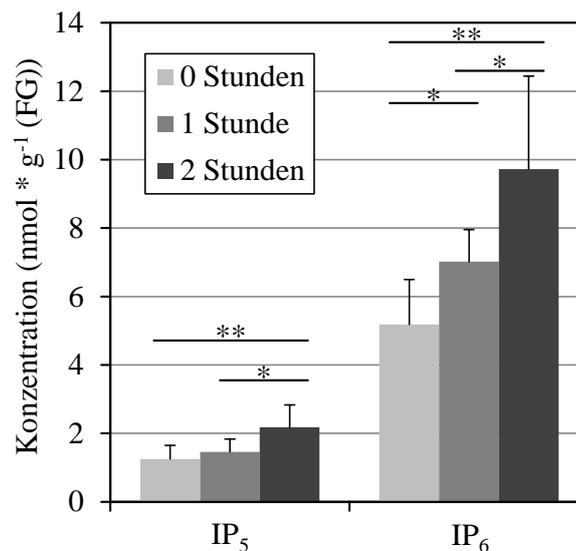


Abbildung 16: Temperaturinduzierte Veränderung von IP₅- und IP₆-Konzentrationen in Arabidopsis

Änderung der IP₅- und IP₆-Konzentration nach 0 h, 1 h und 2 h Temperaturanstieg von 21 °C auf 28 °C. Es wurden 5 Wochen alte Wildtyppflanzen verwendet und die IPPs aus Blättern analysiert. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, p<0,05; **, p<0,01). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.3.2 Dynamische Änderungen von IPPs nach Verwundung

Die mechanische Verwundung von Pflanzen induziert eine JA-abhängige Stressantwort (Li *et al.*, 2002, Koo & Howe, 2009). Der Einfluss von Stress auf die Bildung von IP₅ und IP₆ sollte untersucht werden. Es wurden Verwundungsexperimente mit 5 Wochen

alten Col-0-, *ipk1-1*-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen durchgeführt. Es wurden die IP₅- und IP₆-Konzentrationen von verwundeten Blättern nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min analysiert (Abbildung 17).

Die IP₅-Konzentrationen aller Linien unterlagen einer gewissen Schwankung während der verschiedenen Zeitpunkte. Der IP₅-Konzentration des Wildtyps (Abbildung 17A) zeigte nach 15 min einen Anstieg von ca. 2,2 nmol g⁻¹ (Fg) auf 4,5 nmol g⁻¹ (Fg), fiel nach 30 min, stieg nach 45 min erneut an und erreichte nach 60 min einen Wert von ca. 2,2 nmol g⁻¹ (Fg). Ähnlichen Schwankungen unterlag die IP₅-Konzentration der *ipk1-1*-Linie (Abbildung 17B). Sie sank nach 15 min von 5,1 nmol g⁻¹ (Fg) auf 2,1 nmol g⁻¹ (Fg), stieg nach 30 min erneut, sank nach 45 min wieder und erreichte nach 60 min ca. 6,1 nmol g⁻¹ (Fg). Bei der IPK1-OE-Linie (Abbildung 17C) waren die Schwankungen der IP₅-Konzentrationen weniger stark ausgeprägt. Nach 15 min sank die IP₅-Konzentration von 4,5 nmol g⁻¹ (Fg) auf 2,5 nmol g⁻¹ (Fg). Sie stieg dann nach 30 min und 45 min wieder leicht auf 3,9 nmol g⁻¹ (Fg) und erreichte nach 60 min einen Wert von ca. 2,2 nmol g⁻¹ (Fg). Die IPK2-OE-Linie (Abbildung 17D) zeigte die geringsten Schwankungen. Nach 15 min wurde ein Anstieg der IP₅-Konzentration von 3,6 nmol g⁻¹ (Fg) auf 4,8 nmol g⁻¹ (Fg) gemessen. Nach 30 min sank sie wieder leicht und stieg nach 45 min und 60 min wieder auf 4,0 nmol g⁻¹ (Fg).

Die IP₆-Konzentrationen zeigten in den Wildtyp-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen generell einen Anstieg nach 60 min. Beim Wildtyp stieg die IP₆-Konzentration von 5,4 nmol g⁻¹ (Fg) auf 8,5 nmol g⁻¹ (Fg) nach 15 min, sank nach 30 min leicht, stieg dann nach 45 min wieder und erreichte nach 60 min ca. 9,7 nmol g⁻¹ (Fg). Die IPK1-OE-Pflanzen starteten bei 9,0 nmol g⁻¹ (Fg) und sanken dann zunächst nach 15 min und 30 min auf 7,2 nmol g⁻¹ (Fg). Anschließend erfolgte ein Anstieg nach 45 min auf 10,1 nmol g⁻¹ (Fg). Nach 60 min wurde ein Wert von 13,3 nmol g⁻¹ (Fg) erreicht. Für die IPK2-OE-Pflanzen wurden sinkende IP₆-Konzentrationen von 7,7 nmol g⁻¹ (Fg) auf 6,2 nmol g⁻¹ (Fg) nach 15 min gemessen. Anschließend folgte ein kontinuierlicher Anstieg der Konzentration nach 30 min, 45 min und 60 min bis zu einem Wert von ca. 12,9 nmol g⁻¹ (Fg). Die *ipk1-1*-Linie startete mit geringerer IP₆-Konzentration von 3,7 nmol g⁻¹ (Fg), stieg nach 15 min und 30 min leicht auf 5,9 nmol g⁻¹ (Fg), sank aber nach 45 min und 60 min wieder und erreichte einen Wert von 3,8 nmol g⁻¹ (Fg). Damit zeigten die *ipk1-1*-Pflanzen als einzige keinen Anstieg von IP₆ nach 60 min.

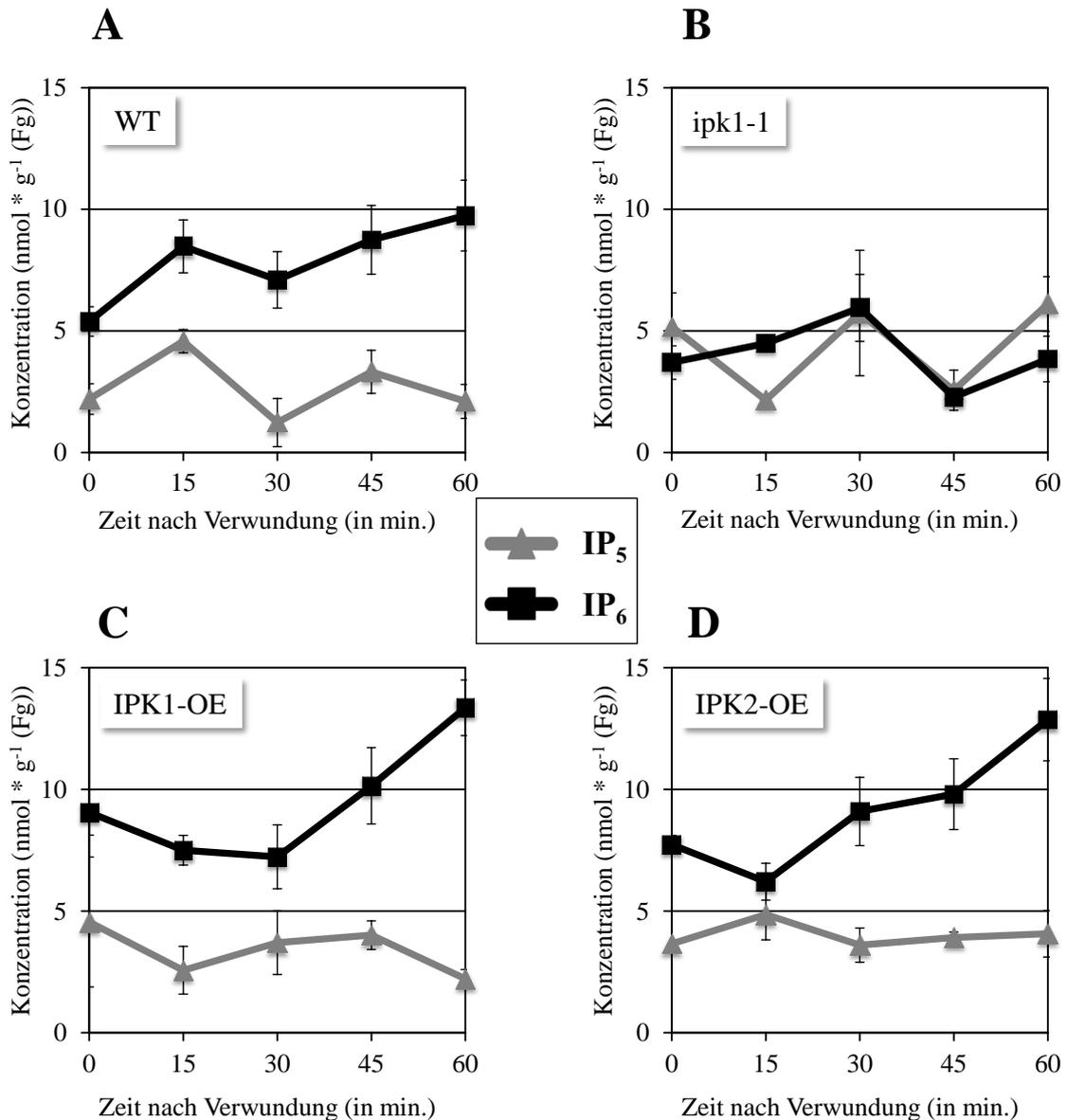


Abbildung 17: Dynamische Veränderung von IP₅- und IP₆-Konzentrationen nach Verwundung

Es wurden 5 Wochen alte Arabidopsispflanzen **A**) Wildtyppflanzen, **B**) *ipk1-1*-Pflanzen, **C**) IPK1-OE-Pflanzen und **D**) IPK2-OE-Pflanzen mit einer Pinzette an der Hauptader von Blättern verwundet und die IP₅- (graue Dreiecke) und IP₆-Konzentrationen (schwarze Quadrate) analysiert. Die dynamische Veränderung der IP₅- und IP₆-Konzentrationen wurde 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min nach Verwundung gemessen. Die Experimente wurden sechsmal durchgeführt und Standardfehler angegeben.

3.4 Phänotypische Konsequenzen der IPP-Modulierung

3.4.1 IAA-abhängige Effekte

Eine grundlegende Fragestellung dieser Arbeit war, ob Pflanzen mit verändertem IPP-Stoffwechsel veränderte physiologische Antworten zeigen, die von IAA oder JA abhängen. Daher wurden die transgenen Pflanzen mit veränderten IPP-Konzentrationen (siehe 3.2.2) hinsichtlich verschiedener Wachstumsparameter und Geninduktionsmuster untersucht.

3.4.1.1 Wurzellängen

Das Phytohormon IAA ist u.a. entscheidend an Wachstum und Entwicklung der Wurzel beteiligt (Fu & Harberd, 2003; Overvoorde *et al.*, 2010). Deshalb wurden die Wurzellängen der verschiedenen IPP-modulierten Pflanzen miteinander verglichen. Zur Bestimmung der Wurzellängen wurden die verschiedenen Pflanzenlinien für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in Phytoschränken (16 h Licht & 8 h Dunkel; 7000 Lux) angezogen. Sie wurden eingescannt und mit dem Programm ImageJ analysiert (Abbildung 18). Die Kalibrierung erfolgte anhand der Plattenlänge und zur Messung der Hauptwurzellänge wurde das Werkzeug „segmentierte Linie“ verwendet.

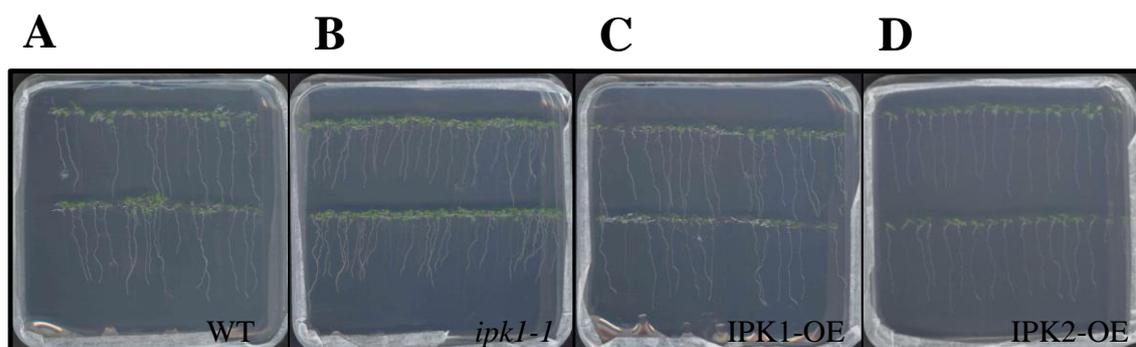


Abbildung 18: Wurzellängen verschiedener IPP-modulierter Pflanzen

Die Pflanzenlinien A) WT, B) *ipk1-1*, C) IPK1-OE und D) IPK2-OE wurden für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in Phytoschränken (16 h Licht & 8 h Dunkel, 7000 Lux) angezogen. Sie wurden eingescannt und die Hauptwurzellänge mit ImageJ analysiert.

Wildtyppflanzen hatten nach 7 Tagen eine Hauptwurzellänge von ca. 25 mm und *ipk1-1*-Pflanzen zeigten eine signifikant verminderte Wurzellänge von ca. 18 mm. Die beiden Überexpressionslinien IPK1-OE und IPK2-OE hatten mit ca. 28 mm und ca. 29 mm signifikant längere Wurzeln.

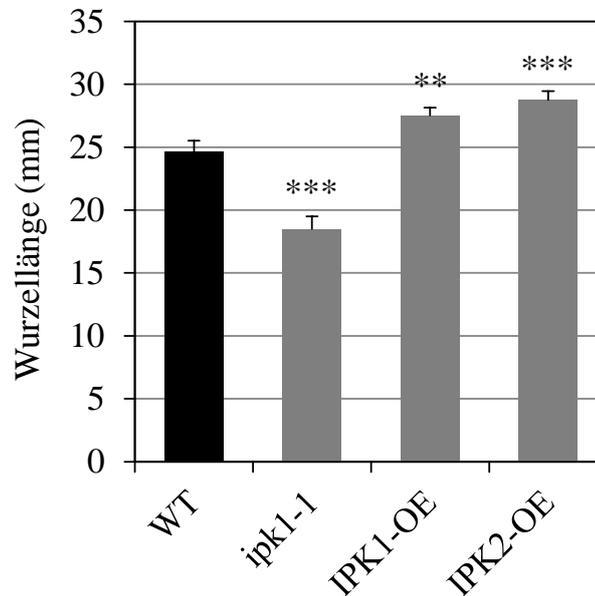


Abbildung 19: Mittlere Wurzellänge IPP-modulierter Pflanzen

Mittlere Wurzellängen von Wildtyp-, *ipk1-1*-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen. Es wurden ca. 60 – 100 Pflanzen für die Auswertung mit dem Programm ImageJ gemessen. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.4.1.2 Hemmung des Wurzelwachstums

Ein weiteres Experiment sollte den Einfluss von IAA- und MeJA-Applikation auf die Hemmung des Wurzelwachstums in den verschiedenen Linien untersuchen. Für die Wachstumshemmung mit IAA wurden die Pflanzen für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten angezogen und auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten mit 100 nM IAA umgesetzt. Nach einer Woche Wachstum mit IAA wurden die Platten eingescannt und mit ImageJ die Länge der Hauptwurzel gemessen. Für die Wachstumshemmung mit MeJA wurden die Pflanzen für 2 Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten mit und ohne 100 μ M MeJA wachsen gelassen. Anschließend wurden die Platten eingescannt und mit ImageJ die Wurzellängen gemessen.

Die Hemmung des Wurzelwachstums der transgenen Linien wurde mit der Hemmung des Wurzelwachstums von Wildtyppflanzen verglichen (Abbildung 20). Dazu wurden

die Werte unbehandelt/behandelt mit Excel berechnet und die Werte des Wildtyps auf 100 % gesetzt. Eine stärkere Hemmung und somit höhere Sensitivität entsprechen Werte über 100 % und eine schwächere Hemmung und somit geringeren Sensitivität entsprechen Werte unter 100 %. Bei der IAA-Behandlung zeigten *ipk1-1*-Pflanzen eine schwächere Hemmung von ca. 90 %. Die IPK1-OE und IPK2-OE zeigten mit ca. 104 % und 103 % eine stärkere Hemmung und somit höhere Sensitivität als Wildtyppflanzen. Für die Wurzelwachstumshemmung mit MeJA konnte ein umgekehrtes Muster beobachtet werden. Die *ipk1-1*-Pflanzen zeigten mit ca. 110 % eine stärkere Hemmung und höhere Sensitivität als Wildtyppflanzen. Bei den Überexpressionslinien IPK1-OE und IPK2-OE konnte mit ca. 90 % eine schwächere Hemmung und somit niedrigere Sensitivität beobachtet werden.

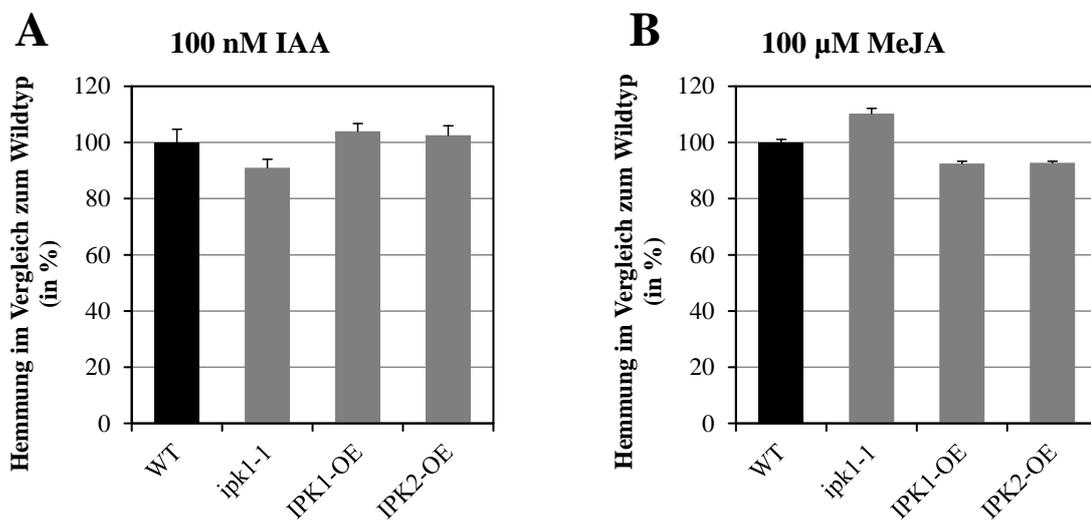


Abbildung 20: Relative Hemmung des Wurzelwachstums bei IPP-modulierten Pflanzen durch IAA und MeJA

Es wurden A) 100 nM IAA und B) 100 µM MeJA eingesetzt und die Hemmung des Wurzelwachstums verglichen. Dafür wurden insgesamt 343 Pflanzen für die Hemmung mit IAA und 271 Pflanzen für die Hemmung mit MeJA gemessen. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

3.4.1.3 Blattflächen

IAA beeinflusst die Entwicklung, das Wachstum und die Morphologie von Blättern (Keller *et al.*, 2004; Scarpella *et al.*, 2010). Ein Experiment das wachstumsbedingte, IAA-vermittelte Unterschiede der IPP-modulierten Pflanzen erfassen sollte, war die Blattflächenanalyse. Die verschiedenen Linien (WT, *ipk1-1*, IPK1-OE & IPK2-OE) wurden für 1 Woche auf ½ MS-Medium angezogen. Sie wurden senkrecht aus ca. 1 m Abstand fotografiert und mit dem Programm ImageJ analysiert. Dafür wurden die

Farben binär transformiert (grün entspricht schwarz und restliche Farben weiß). Zur Kalibrierung wurde der Maßstab anhand der Blumentöpfe bestimmt und die Blattflächen mittels Flächenanalyse der Schwarzwerte in cm^2 analysiert (Abbildung 21).

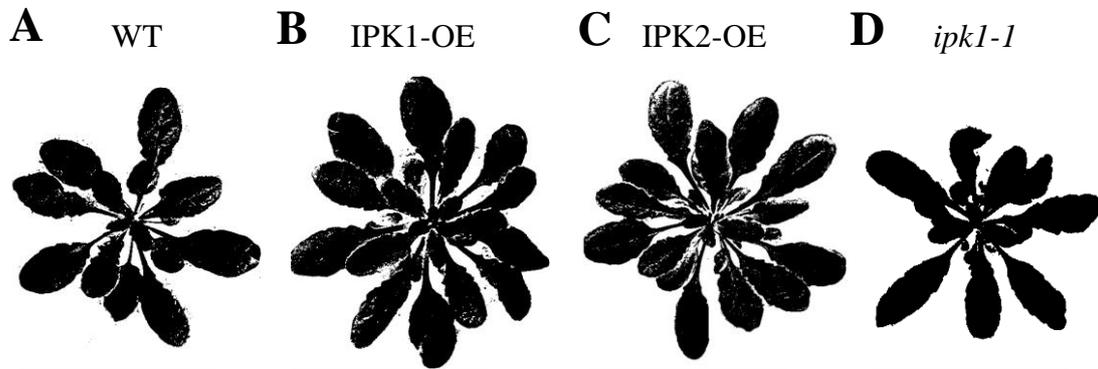


Abbildung 21: Blattflächen IPP-modulierter Pflanzen

Es wurden die Blattflächen von A) Wildtyp-, B) IPK1-OE-, C) IPK2-OE- und D) *ipk1-1*-Pflanzen miteinander verglichen. Dafür wurden je 15 Pflanzen pro Linie mit Hilfe von ImageJ analysiert (Maßstabsbalken entspricht 7,5 cm).

Die Mittelwerte der Blattflächen verschiedener Pflanzenlinien wurden miteinander verglichen (Abbildung 22). Dabei hatte die *ipk1-1*-Linie eine signifikant verringerte Blattfläche von ca. 21 cm^2 pro Pflanze im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 28 cm^2 pro Pflanze. Die IPK1-OE- und IPK2-OE-Linien hingegen wiesen signifikant erhöhte Blattflächen von ca. 37 cm^2 und ca. 42 cm^2 pro Pflanze im Vergleich zum Wildtyp auf.

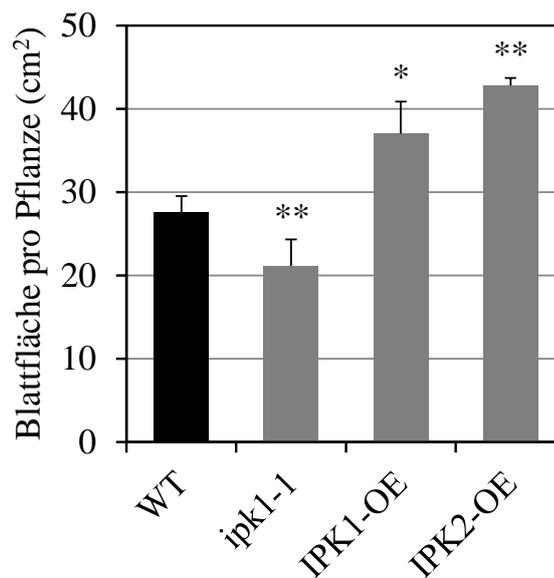


Abbildung 22: Blattflächenmessung IPP-modulierter Pflanzen

Blattfläche pro Pflanze in cm^2 ; Standardfehler als Fehlerbalken; Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.4.1.4 Gravitrope Krümmung

Der Einfluss von IAA auf gravitrope Prozesse ist gut untersucht (Band *et al.*, 2012). Interessanterweise scheinen auch IPPs in diese Prozesse involviert zu sein (Perera *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006). Deshalb wurde die gravitrope Krümmungsreaktion der verschiedenen IPP-modulierten Pflanzen getestet und verglichen. Dafür wurden die Pflanzen für 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten in einer Dunkelkammer angezogen. Anschließend wurden sie kurz eingescannt und sofort wieder senkrecht um 135° rotiert aufgestellt. Nach 24 h wurden sie erneut eingescannt und die Krümmung der Wurzelspitzen und des Hypokotyls mit dem Programm ImageJ ausgewertet (Abbildung 23).

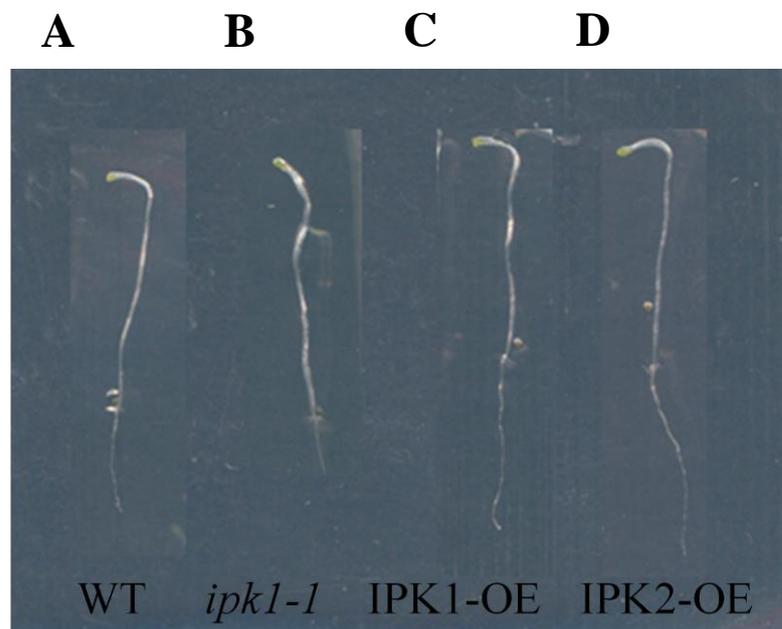


Abbildung 23: Gravitrope Krümmung IPP-modulierter Pflanzen nach 24 h

Die verschiedenen IPP-modulierten A) Wildtyp-, B) *ipk1-1*-, C) IPK1-OE- und D) IPK2-OE-Pflanzen wurden nach 24 h gegenübergestellt.

Bei der Analyse der Krümmungswinkel zeigte die *ipk1-1*-Linie eine verringerte gravitrope Krümmung im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 24). Die Werte für die Wurzelspitzen- und Hypokotylkrümmung waren ca. 35° und ca. 60° verglichen mit ca. 42° und ca. 64° beim Wildtyp. Die IPK1-OE- und IPK2-OE-Linien wiesen signifikant erhöhte Krümmungswinkel im Vergleich zum Wildtyp auf. Der Winkel für die Wurzelspitzen- und Hypokotylkrümmung betrug bei der IPK1-OE-Linie ca. 53° und ca. 70° und bei der IPK2-OE-Linie ca. 49° und ca. 72° .

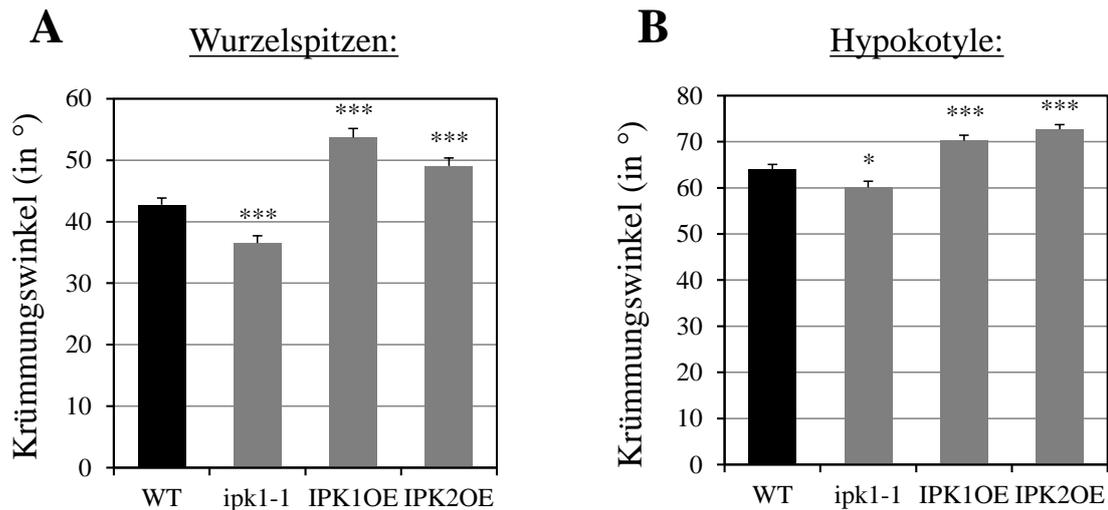


Abbildung 24: Krümmungswinkel von Wurzelspitzen und Hypokotylen

Es wurden die gravitropen Krümmungsreaktionen von Wildtyp, *ipk1-1*-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen gemessen. Dafür wurden die Pflanzen für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium im Dunkeln angezogen und anschließend für 24 h um 135° gedreht. Die Krümmungswinkel von **A)** Wurzelspitzen und **B)** Hypokotylen wurden mit ImageJ gemessen. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Experimente wurden viermal durchgeführt.

3.4.2 Induktionsmuster IAA-abhängiger Gene

Um direkte, phytohormoninduzierte Antworten in den transgenen Linien zu untersuchen, wurden qRT-PCR Experimente durchgeführt und die Induktion verschiedener Gene quantitativ erfasst. Dafür wurden die Pflanzen für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten angezogen und für 30 min auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten mit Phytohormonen umgesetzt. Für die IAA-Induktion wurde 100 nM IAA, für die JA-Induktion 100 μ M MeJA und als Kontrolle 0,1 % (v/v) DMSO eingesetzt. Als Referenzgene wurden *AKT8* (Aktin) und *UBC10* (Ubiquitin) verwendet und mittels geometrischem Mittel die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte berechnet. Es wurden die IAA-induzierbaren Gene *LBD29* (AT3G58190; Lateral Organ Boundaries-Domain 29), *LBD17* (AT2G42440; Lateral Organ Boundaries-Domain 17) und *SAUR15* (AT4G38850; Small Auxin Upregulated 15) gemessen. Für alle Gene wurde sowohl die Kontrolle, als auch die Kreuzreaktion mit dem anderen Phytohormon getestet. Für die Diagramme wurde die relative Genexpression auf der y-Achse und die IP_5 - bzw. IP_6 -Konzentration auf der x-Achse aufgetragen.

In Abbildung 25 ist die Korrelation der IAA-induzierten Gene mit IP_6 dargestellt. Dabei zeigt sich nach der Behandlung mit IAA (blaue Vierecke) eine Induktion durch erhöhte

relative Genexpressionen verglichen mit der Kontrolle (rote Quadrate) oder der MeJA-Behandlung (grüne Dreiecke). Interessanterweise zeigt die *ipk1-1*-Linie die niedrigsten relativen Genexpressionen nach IAA-Induktion und weist auch die niedrigsten IP_6 -Konzentrationen auf. Bei den Wildtyppflanzen konnte eine höhere Genexpression IAA-induzierter Gene nach IAA-Behandlung als bei den *ipk1-1*-Pflanzen gemessen werden und auch die IP_6 -Konzentration war in diesen Pflanzen höher. Die beiden Überexpressionslinien IPK1-OE und IPK2-OE zeigten die höchste Genexpression IAA-induzierter Gene nach IAA-Behandlung und hatten auch die höchsten IP_6 -Konzentrationen. Es konnte eine lineare Regression mit den Datenpunkten durchgeführt werden. Dabei zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Stärke der IAA-Induktion und der IP_6 -Konzentration. Die berechneten Korrelationskoeffizienten lagen für die *LBD29*-Korrelation bei $r=0,95$, für die *LBD17*-Korrelation bei $r=0,58$ und für die *SAUR15*-Korrelation bei $r=0,85$.

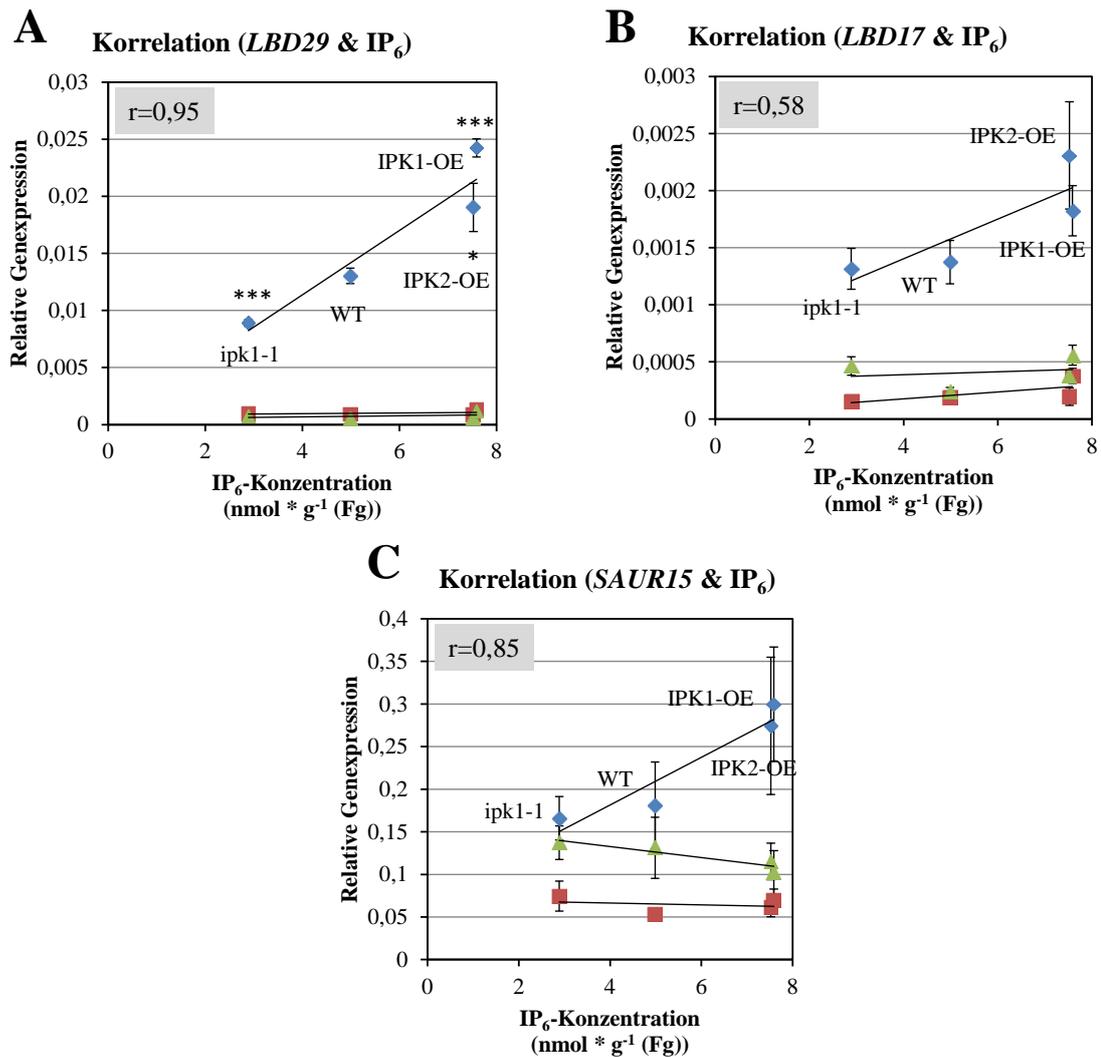


Abbildung 25: Korrelation von IAA-induzierter Genexpression und IP_6 -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen

Behandlung der transgenen Linien mit 100 nM IAA (blaue Vierecke), mit 100 μ M MeJA (grüne Dreiecke) und 0,1 % (v/v) DMSO-Kontrolle (rote Quadrate). Es sind die relative Genexpression der IAA-induzierten Gene **A**) *LBD29*, **B**) *LBD17* und **C**) *SAUR15* mit $2^{-\Delta CT}$ -Werten (berechnet nach ΔCT -Methode) auf der y-Achse und die IP_6 -Konzentrationen auf der x-Achse aufgetragen. Eine lineare Regression zeigt den Zusammenhang beider Faktoren. Der Korrelationskoeffizient r ist als mit grauem Hintergrund links oben in jedem Diagramm angegeben. Er ist ein Maß für die Linearität der Datenpunkte. Werte über 0,7 deuten auf starke Linearität hin. Die Korrelationsgraphen beruhen auf Daten aus Abbildung 13 (x-Achse) und Abbildung 41 (y-Achse). Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Standardfehler). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.4.3 Defensivantwort der Pflanzen (Caterpillar performance test)

Um den Einfluss veränderter IPP-Konzentrationen auf JA-abhängige Verteidigungsprozesse zu untersuchen, wurden Raupenfraßexperimente durchgeführt. Diese Experimente wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Axel Mithöfer vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena durchgeführt. Dafür wurden ca. 10 Tage alte *Spodoptera littoralis* Raupen für 7 Tage auf die Blätter der verschiedenen IPP-modulierten Pflanzen gesetzt und deren Gewichtszunahme gemessen (Abbildung 26). Es konnte eine verminderte Gewichtszunahme von ca. 0,035 g in den *ipk1-1*-Pflanzen verglichen mit ca. 0,038 g in Wildtyppflanzen gemessen werden. Die Gewichtszunahme der Raupen auf IPK1-OE-Pflanzen war mit ca. 0,058 g signifikant erhöht und wies gleiche Werte auf wie die Gewichtszunahme der Raupen auf *coi1-t*-Pflanzen (Mosblech *et al.*, 2011), welche keinen funktionalen JA-Ile-Rezeptor besitzen. Interessanterweise konnte in früheren Caterpillar performance tests eine signifikant verstärkte Defensivantwort von *ipk1-1*-Pflanzen gegenüber *Plutella xylostella* Raupen festgestellt werden (Mosblech *et al.*, 2011).

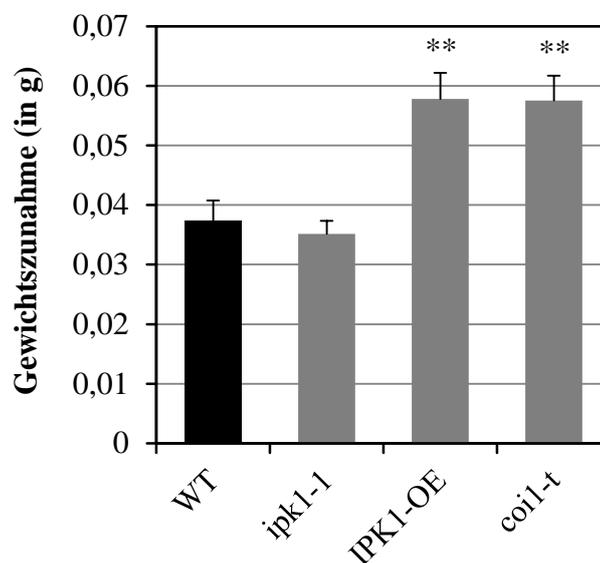


Abbildung 26: Caterpillar performance test mit *S. littoralis*

Biologischer Test der JA-abhängigen Verteidigung gegen den Herbivor *Spodoptera littoralis*. Es wurden ca. 10 Tage alte Raupen auf die Blätter von 5 Wochen alten Pflanzen (Wildtyp, *ipk1-1*, IPK1-OE und *coi1-t*) gesetzt. Die Gewichtszunahme der Raupen wurde nach 7 Tagen gemessen. Je 40-50 Raupen von 20 Pflanzen wurden gewogen. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (**, $p < 0,01$; Standardfehler). Die Experimente wurden zweimal von der AG Mithöfer (MPI Jena) durchgeführt.

3.4.4 Induktionsmuster JA-abhängiger Gene

Zur Untersuchung der JA-abhängigen Geninduktion wurden qRT-PCR Experimente mit den transgenen Linien durchgeführt und die Induktion verschiedener Gene quantitativ erfasst. Dafür wurden die Pflanzen für 1 Woche auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten angezogen und für 30 min auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarplatten mit Phytohormonen umgesetzt. Für die JA-Induktion wurden 100 μM MeJA, für die IAA-Induktion 100 nM IAA, und als Kontrolle 0,1 % (v/v) DMSO eingesetzt. Es wurden die Referenzgene *AKT8* (Aktin) und *UBC10* (Ubiquitin) verwendet und mittels des geometrischen Mittels die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte berechnet. Für die JA-Induktion wurden die JA-induzierbaren Gene *VSP1* (AT5G24780; Vegetative Storage Protein 1), *PDF1.2* (AT5G44420; Plant Defensin 1.2) und *JR3* (AT1G51760; Jasmonic Acid Responsive 3) gemessen. In Abbildung 27 sind die Korrelationsgraphen der JA-induzierbaren Gene dargestellt. Es konnte nach MeJA-Behandlung (blaue Vierecke) eine Erhöhung der Genexpression gegenüber der Kontrolle (rote Quadrate) und der Behandlung mit IAA als Gegenhormon (grüne Dreiecke) gemessen werden. Beim Wildtyp und der IPK1-OE-Linie wurden für alle drei Gene (*VSP1*, *PDF1.2* und *JR3*) fast gleiche relative Genexpressionen und IP₅-Konzentrationen nach MeJA-Behandlung gemessen. Mit Anstieg der IP₅-Konzentration in den IPK2-OE-Linien wurde ebenfalls ein Anstieg in der JA-induzierten Genexpression für die Gene *VSP1* und *PDF1.2* gemessen. Nur beim *JR3*-Gen zeigte sich keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp und der IPK1-OE-Linie. Die *ipk1-1*-Pflanzen mit stark erhöhten IP₅-Konzentrationen zeigten auch erhöhte JA-induzierte Genexpression verglichen mit den WT und IPK1-OE-Linien. Allerdings war die Induktion beim *VSP1*-Gen auf gleichem Niveau wie die den IPK2-OE-Pflanzen und beim *PDF1.2*-Gen sogar geringer. Es zeigte sich keine vollständige lineare Abhängigkeit zwischen steigenden IP₅-Konzentrationen und stärkerer JA-induzierter Genexpression.

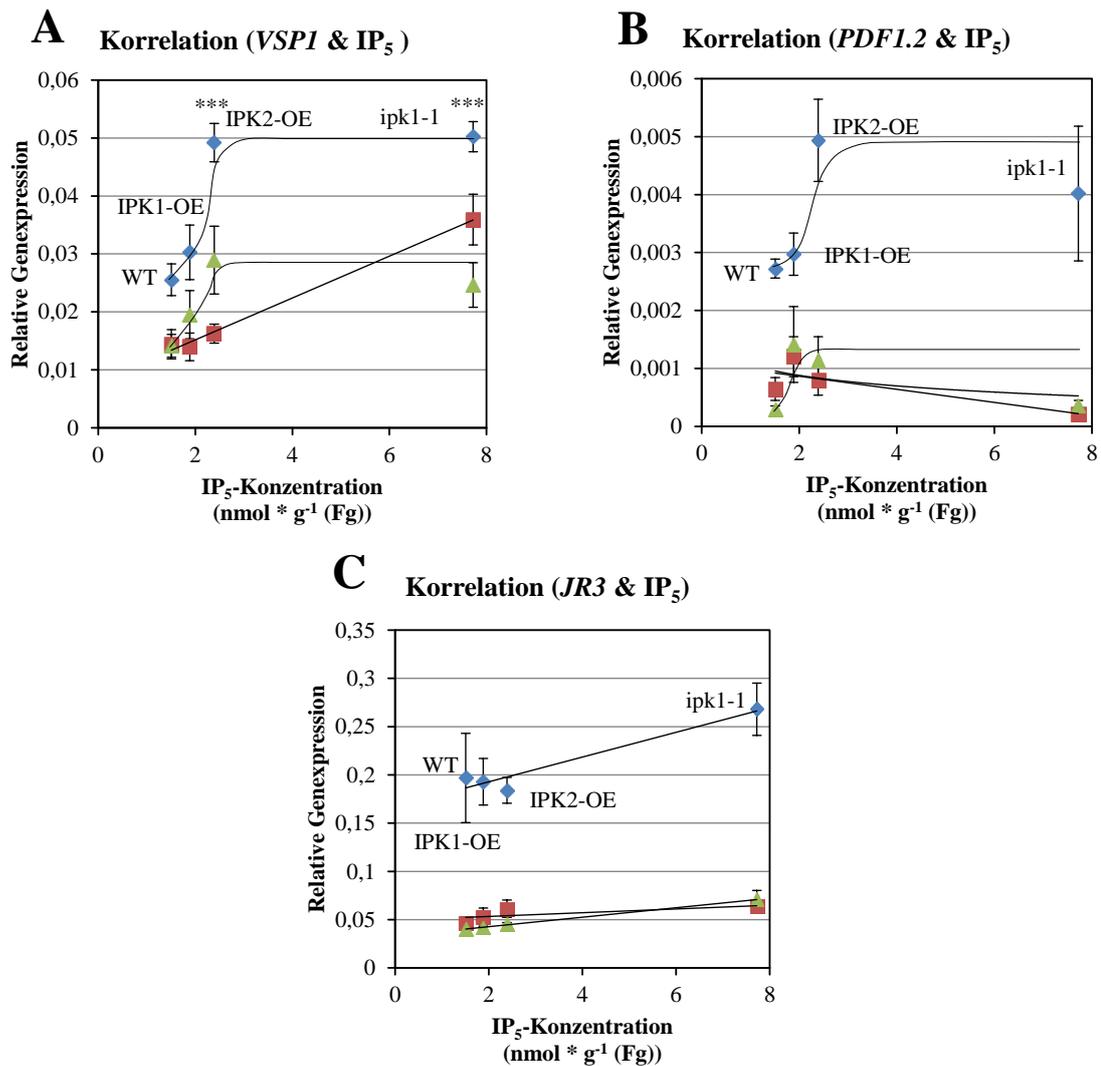


Abbildung 27: Korrelation von JA-induzierter Genexpression und IP_5 -Konzentration in IPP-modulierten Pflanzen

Behandlung der transgenen Linien mit 100 μ M MeJA (blaue Vierecke), mit 100 nM IAA (grüne Dreiecke) und 0,1 % (v/v) DMSO-Kontrolle (rote Quadrate). Es sind die relative Genexpression der MeJA-induzierten Gene **A**) *VSP1*, **B**) *PDF1.2* und **C**) *JR3* mit $2^{-\Delta CT}$ -Werten (berechnet nach ΔCT -Methode) auf der y-Achse und die IP_5 -Konzentrationen auf der x-Achse aufgetragen. Eine lineare Regression zeigt den Zusammenhang beider Faktoren. Die Korrelationsgraphen beruhen auf Daten aus Abbildung 13 (x-Achse) und Abbildung 42 (y-Achse). Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Standardfehler). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.4.5 Korrelation physiologischer IAA-Antworten mit IP₆-Konzentration

Um eine Verbindung zwischen den physiologischen IAA-abhängigen Unterschieden der IPP-modulierten Pflanzen und der Konzentration des IAA-Rezeptor Kofaktors IP₆ aufzuzeigen, wurden Korrelationsgraphen erstellt. Dafür wurden die physiologischen Messungen der verschiedenen Linien auf die y-Achse und die IP₆-Konzentrationen auf die x-Achse aufgetragen. Für alle drei IAA-abhängigen Prozesse konnten mit ansteigenden IP₆-Konzentrationen auch steigende IAA-Antworten beobachtet werden. So zeigte die *ipk1-1*-Linie mit den niedrigsten IP₆-Konzentrationen von ca. 2,9 nmol g⁻¹ (Fg) auch die geringsten Blattflächen, Wurzellängen und gravitropen Krümmungswinkel. Die Wildtyppflanzen wiesen mit ca. 5,1 nmol g⁻¹ (Fg) eine höhere IP₆-Konzentration auf und zeigten auch größere Blattflächen, Wurzellängen und gravitrope Krümmungswinkel als die *ipk1-1*-Pflanzen. Für die IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen konnten mit ca. 7,6 und 7,5 nmol g⁻¹ (Fg) die höchsten IP₆-Konzentrationen gemessen werden. Sie zeigten auch die stärksten physiologischen IAA-abhängigen Wachstumseffekte und hatten die größten Blattflächen, Wurzellängen und gravitropen Krümmungswinkel. Interessanterweise konnte ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen steigenden IP₆-Konzentrationen und IAA-abhängigen Wachstumseffekten beobachtet werden, welcher sich auch bei den Induktionsmustern IAA-abhängiger Gene zeigte. Ein Maß für die Linearität von Datenpunkten stellt der Korrelationskoeffizient dar. Wenn er einen Wert von -1 annimmt, ist ein linear sinkender Zusammenhang gegeben. Bei einem Wert von 1 ist ein linear steigender Zusammenhang erfüllt. Werte von 0 weisen auf keinerlei Linearität der Daten und Werte größer als r=0,7 weisen auf eine starke Linearität hin. Der berechnete Korrelationskoeffizient für die Korrelation zwischen Blattflächen und IP₆-Konzentration ergab einen Wert von r=0,96. Für die Korrelation von Wurzellänge und IP₆-Konzentration wurde ein Wert von r=0,98 berechnet und für die gravitrope Wurzelkrümmung einen Wert von r=0,97 (Abbildung 28).

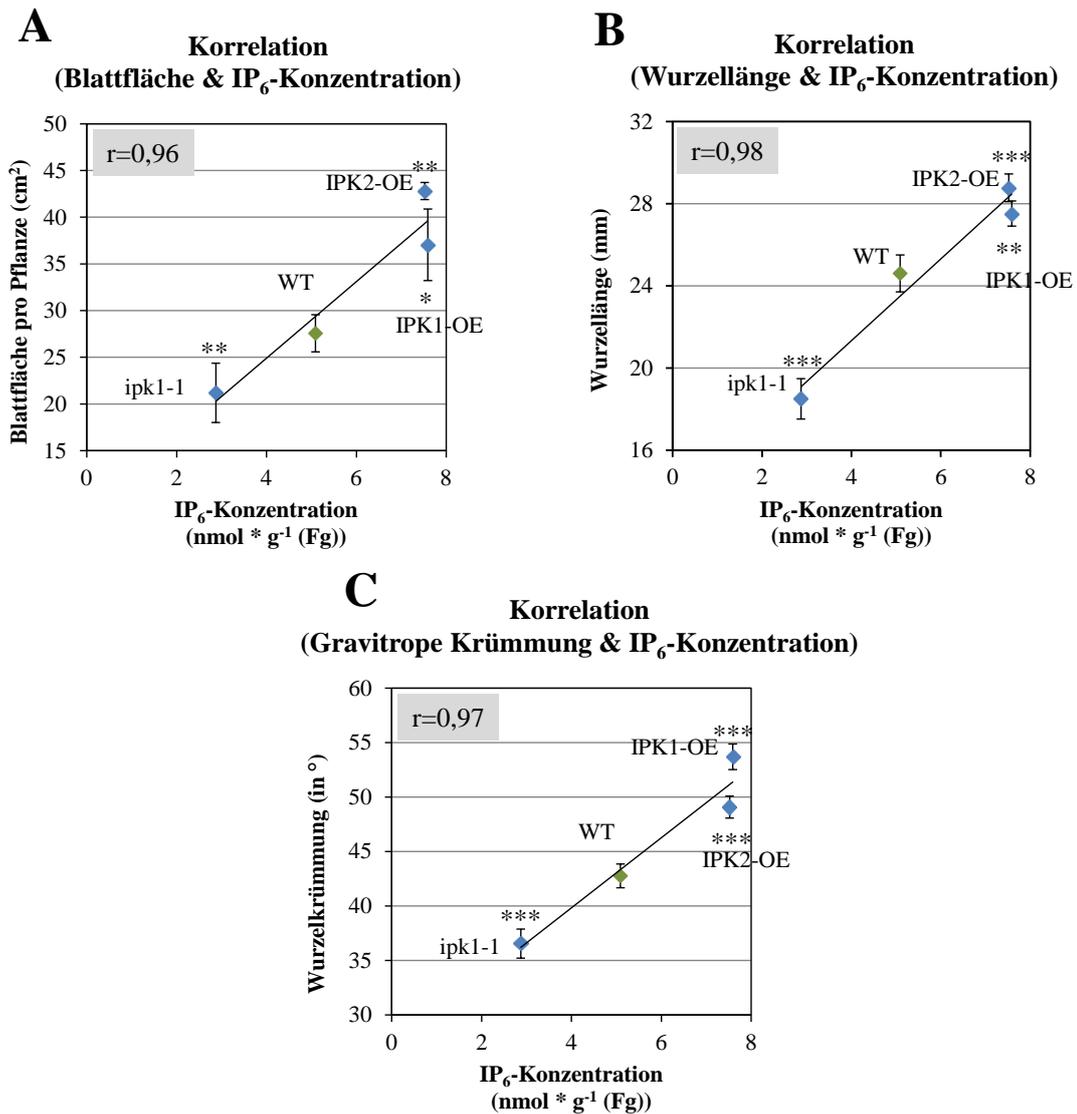


Abbildung 28: Korrelation zwischen IAA-abhängigen Wachstumseffekten und IP₆-Konzentration

Korrelationsgraphen zwischen den IAA-abhängigen Wachstumseffekten **A**) Blattflächengröße, **B**) Wurzellängen und **C**) gravitropische Wurzelkrümmung und IP₆-Konzentrationen der IPP-modulierten Pflanzen. Es wurden die Werte der physiologischen Messungen auf der y-Achse und die Werte der IP₆-Konzentration auf der x-Achse aufgetragen. Die Werte der verschiedenen Pflanzenlinien wiesen starke Linearität auf und berechnete Korrelationskoeffizienten mit $r > 0,95$ bestätigten die Vermutung. Die Korrelationsgraphen beruhen auf Daten aus Abbildung 13 (x-Achse) und Abbildung 22, Abbildung 18 und Abbildung 23 (y-Achse).

Die bisherigen Daten weisen auf eine funktionale Rolle der IPPs, IP_5 und IP_6 , bei der Phytohormonperzeption durch die FBPs COI1 und TIR1 hin. Die Daten zeigen jedoch auch, dass die IPP-Konzentrationen der Pflanzen allein, nicht notwendigerweise ein Indikator für die Sensitivität der Pflanzen gegenüber JA oder IAA sind. So haben beispielsweise IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen ähnliche IP_5 - und IP_6 -Konzentrationen, jedoch verschiedene IAA- und JA-Konzentrationen und unterschiedlich ausgeprägte Antworten. Dies könnte mit Unterschieden in der Kompartimentierung der einzelnen Schritte der IPP-Bildung zusammenhängen. Da der Hauptweg zur Synthese von IPPs an der Plasmamembran mit der PLC-vermittelten Spaltung von PI(4)P oder PI(4,5)P₂ beginnt, entstehen die ersten Intermediate der IPP-Bildung im Cytoplasma. Andererseits sind die Phytohormonrezeptoren COI1 und TIR1 im Nukleus angesiedelt, woraus sich die Frage ergibt, wie die Verbindung zwischen cytosolischer und nukleärer IPP-Bildung beschaffen ist. Im nächsten Abschnitt sollten daher die Lokalisierung der Enzyme IPK1 und IPK2 untersucht und ihre mögliche Kernlokalisierung geklärt werden.

3.5 Lokalisationsstudien

Um die subzelluläre Verteilung von IPK1 und IPK2 zu untersuchen, wurden die Enzyme als translationale Fusionen mit C-terminalen eYFP-Markierungen in Pflanzenzellen exprimiert und die Fluoreszenzverteilung mikroskopisch verfolgt.

3.5.1 Heterologe Expression und subzelluläre Lokalisation von IPK1 und IPK2 in *N. tabacum* Epidermiszellen

Die beiden Fusionsproteine *AtIPK1::eYFP* und *AtIPK2::eYFP* wurden mit Hilfe von Agrobakterien (*A. tumefaciens*) in die Unterseite von Tabakblättern (*N. tabacum*) infiltriert. Nach 24 h wurden die infizierten Stellen mit dem LSM 510 von Zeiss mikroskopiert (Abbildung 29).

Das *AtIPK1::eYFP* Fusionsprotein zeigte dabei ein starkes Lokalisierungssignal im Nukleus und im Cytoplasma. Für das *AtIPK2::eYFP* Fusionsprotein wurde eine spezifische Lokalisierung im Nukleus (ohne Nukleoli), in der Kernhülle und im Cytoplasma beobachtet. Die eYFP-Kontrolle zeigte eine diffuse Lokalisierung im Cytoplasma und im Kern.

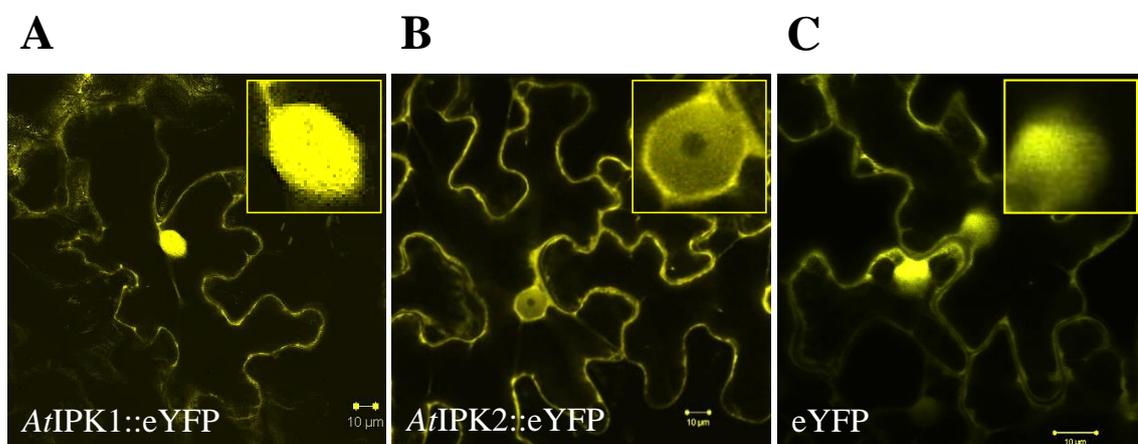


Abbildung 29: Transiente Expression von *AtIPK1::eYFP*, *AtIPK2::eYFP* in *N. tabacum* Blättern

Transiente Expression von A) *AtIPK1::eYFP*, B) *AtIPK2::eYFP* und C) eYFP in Tabakepidermiszellen 24 h nach der Transformation. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop Zeiss LSM 510 aufgenommen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

Zur Untersuchung der strukturellen Integrität der *AtIPK1::eYFP* und *AtIPK2::eYFP* Fusionsproteine wurden Gewebeproben der transienten Expression in Tabakblättern

analysiert. Es wurde eine Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen den eYFP-Marker durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten deutliche Banden auf den für die Fusionsproteine relevanten Höhen der Markerspuren (Abbildung 30). So konnte für das *AtIPK1::eYFP* Protein (3. Spur in Abbildung 30) auf Höhe von etwa 70 kDa (77,7 kDa berechnete Masse) und für das *AtIPK2::eYFP* Fusionsprotein (4. Spur in Abbildung 30) auf Höhe von etwa 60 kDa (60,7 kDa berechnete Masse) eine deutliche Bande detektiert werden. Für die eYFP-Kontrolle konnte auf Höhe von etwa 27 kDa (27 kDa berechnete Masse) eine Bande detektiert werden.

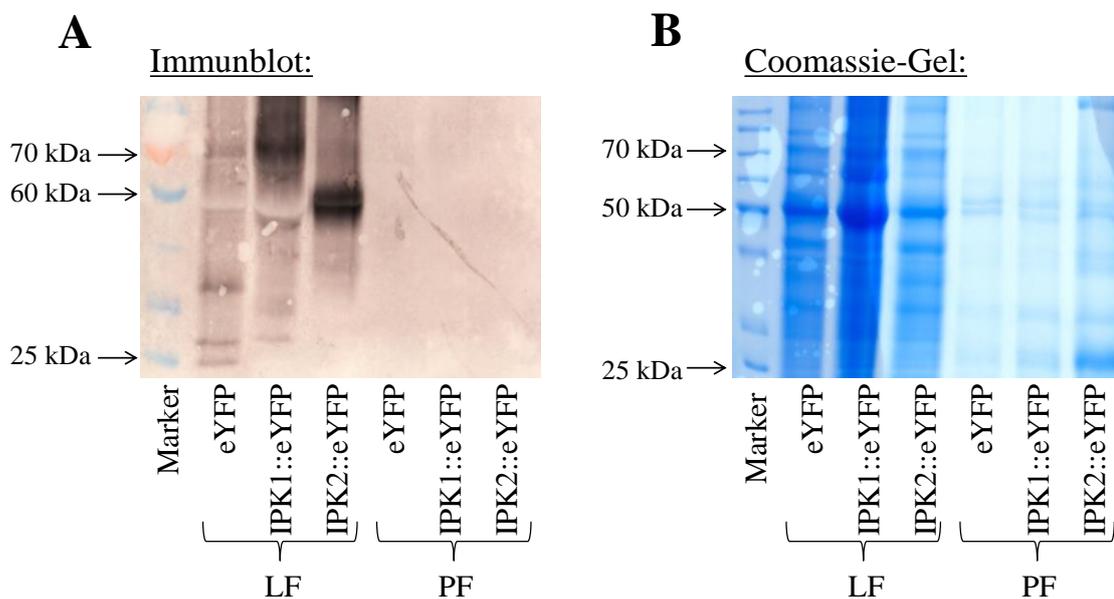


Abbildung 30: Immundetektion eYFP-markierter Proteine aus infiltriertem *N. tabacum* Blattmaterial

A) Immunblot und B) Coomassie-Gel von infiltriertem *N. tabacum* Blattmaterial. Untersuchung der Integrität von IPK1::eYFP und IPK2::eYFP Fusionskonstrukten. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

3.5.2 Subzelluläre Lokalisation von IPK1 und IPK2 in *A. thaliana*

Nachdem die ersten Lokalisierungsstudien der IPKs mittels transients Expression in Tabakepidermiszellen durchgeführt worden waren, folgte auch die Untersuchung in stabil transformierten Arabidopsislinien. Dafür wurden die Pflanzen für 7 Tage auf ½ MS-Agarplatten in der Phytokammer bei Langtagbedingungen angezogen. Die Mikroskopie wurde mit dem Zeiss LSM 510 durchgeführt. Es wurden Wurzelzellen

mikroskopiert, um Autofluoreszenzprobleme durch Chloroplasten im grünen Gewebe zu umgehen (Abbildung 31).

Das *AtIPK1::eYFP* Fusionsprotein zeigte eine deutliche Kernlokalisierung mit Ausnahme der Nukleoli und eine cytoplasmatische Lokalisierung. Für die *AtIPK2::eYFP* Variante konnte ebenfalls eine Kernlokalisierung mit Aussparung der Nukleoli und eine Lokalisierung im Cytoplasma beobachtet werden.

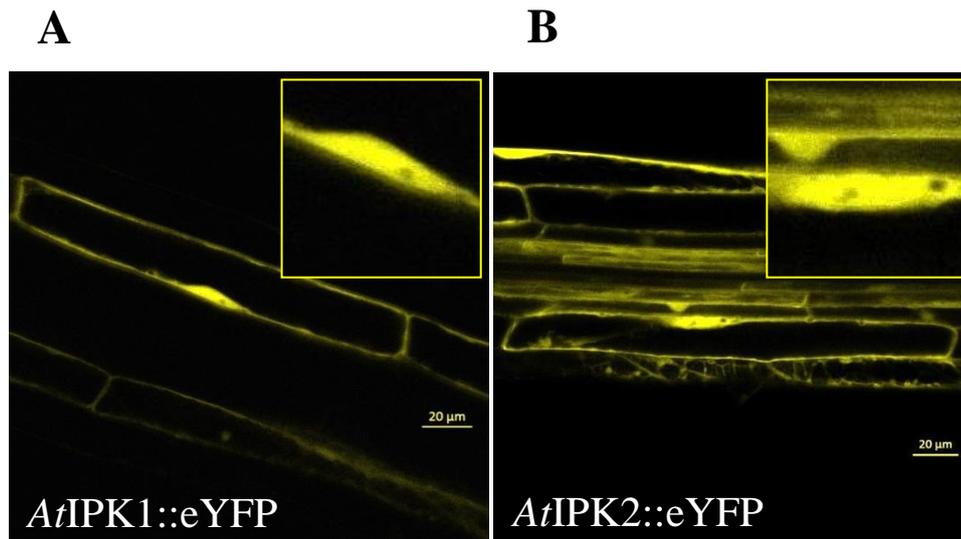


Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisation von *AtIPK1::eYFP* und *AtIPK2::eYFP* in Arabidopsis-Wurzelzellen

Lokalisation von A) *AtIPK1::eYFP* und B) *AtIPK2::eYFP* in Wurzelzellen stabil transformierter Arabidopsislinien. Es wurden 7 Tage alte Pflanzen mit dem Zeiss LSM 510 mikroskopiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

3.5.3 Bioinformatische Analyse von Kernlokalisierungssignalen und subzellulärer Lokalisation

Die Beobachtung, dass IPK1 und IPK2 im Nukleus lokalisieren, wirft die Frage auf, ob diese Lokalisation auf aktivem Kernimport beruht oder ein Artefakt der Überexpression der fluoreszenzmarkierten Proteine ist. Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene webbasierte Programme zur Vorhersage von Kernlokalisierungssignalen und subzellulärer Lokalisation von IPK1 und IPK2 verwendet. Die Ergebnisse der Programme cNLS Mapper (Tabelle 8), NLStradamus (Tabelle 9), NucPred (Tabelle 10) und Distill (Tabelle 11) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisationsignalen durch cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>):

Protein	Aminosäuresequenz und Vorhersagewert	Vorhersage
IPK1	331- <u>PICKEGKPLEAELSLHALPLDESLKIVKEY</u> 2-Teilige NLS; Wert 6,5 von 10	Überwiegende Kernlokalisierung
IPK1	<u>KHVDAGVRVSVSKEFLECVDKKVTKQRP</u> 2-Teilige NLS; Wert 4,7 von 10	Kernlokalisierung und Cytoplasmalokalisierung
IPK2	<u>EEYFKKCIKKDRQTTT</u> <u>VS</u> <u>LGFRVSGFKIFDH</u> 2-Teilige NLS; Wert 2,4 von 10	Mögliche Kernlokalisierung und Cytoplasmalokalisierung

Tabelle 9: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisationsignalen durch NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>):

Protein	Aminosäuresequenz und Vorhersagewert	Vorhersage
IPK1	35-VGKVIRIQKARRNDKAIKNAN-55 Ausschlusswert 0,1	Mögliches Kernlokalisierungssignal
IPK2	Keine NLS auch bei niedrigem Ausschlußwert	–

Tabelle 10: Ergebnis der Vorhersage von Kernlokalisierungssignalen durch NucPred (<https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>):

Protein	Vorhersagewert für NLS	Vorhersage
IPK1	NucPred Score 0,27 von 1,0 nur schwache NLS vorhergesagt	Kernlokalisierung möglich
IPK2	NucPred Score 0,02 von 1,0 nur schwache NLS vorhergesagt	Kernlokalisierung möglich

Tabelle 11: Ergebnis der Vorhersage von subzellulärer Lokalisation durch Distill (<http://distill.ucd.ie/distill/>):

Protein	Vorhersage
IPK1	Subzelluläre Lokalisation: Nukleus; mittleres Vertrauen
IPK2	Subzelluläre Lokalisation: Nukleus; hohes Vertrauen

Die bioinformatische Auswertung der IPK1- und IPK2-Sequenzen ergab Hinweise auf das mögliche Vorhandensein von Kernlokalisierungssignalen. Im Folgenden sollten daher diese putativen Kernlokalisierungssignale auf Funktionalität getestet werden.

3.5.4 Mutation und Lokalisationsstudien putativer Kernlokalisierungssignale

Es wurden drei putative Kernlokalisierungssignale der IPK1 und ein putatives Kernlokalisierungssignal der IPK2 mutiert, um deren Funktionalität zu testen (Abbildung 32). Dafür wurde durch zielgerichtete Mutagenese der relevanten cDNA-Sequenzen die für ein Kernlokalisierungssignal wichtigen basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) zum Alanin (A) mutiert. Bei der putativen NLS1 der IPK1 wurden die vier basischen Aminosäuren K43A R45A R46A und K49A substituiert. Die putative NLS2 der IPK1 wurde an vier Position zu K120A K121A K124A und R126A verändert. Für die Elimination der NLS3 wurden die beiden Aminosäuren K334A und K337A verändert. Bei der IPK2 wurden die drei Aminosäuren K122A, K123A und R125A in der putativen NLS1 substituiert.

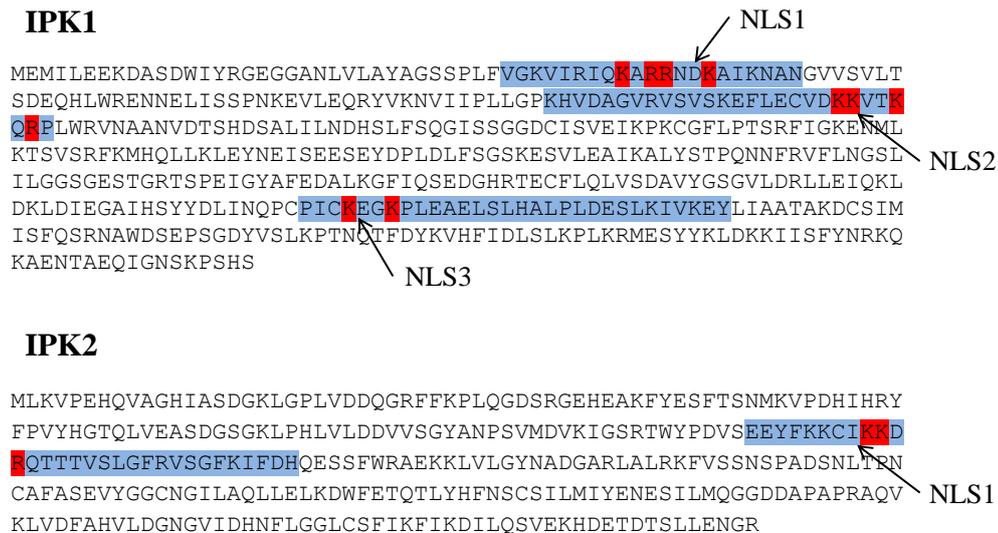


Abbildung 32: Aminosäuresequenz von IPK1 und IPK2 mit den putativen NLS

Aminosäuresequenz von IPK1 und IPK2 mit den putativen NLS (blau) und den substituierten Aminosäuren (rot).

Die so veränderten Varianten von IPK1 und IPK2 wurden als Fusionsproteine zu C-terminalen eYFP-Markierungen in Pflanzenzellen exprimiert und ihre subzelluläre Verteilung verfolgt. Alle drei mutierten IPK1-Varianten mit veränderten putativen NLS1, NLS2 und NLS3 zeigten keine veränderte Lokalisierung gegenüber der unmutierten IPK1 (siehe Abschnitt 3.2.1). Es konnte eine starke Kernlokalisierung und eine cytoplasmatische Lokalisierung der IPK1-Varianten in den Tabakepidermiszellen beobachtet werden (Abbildung 33).

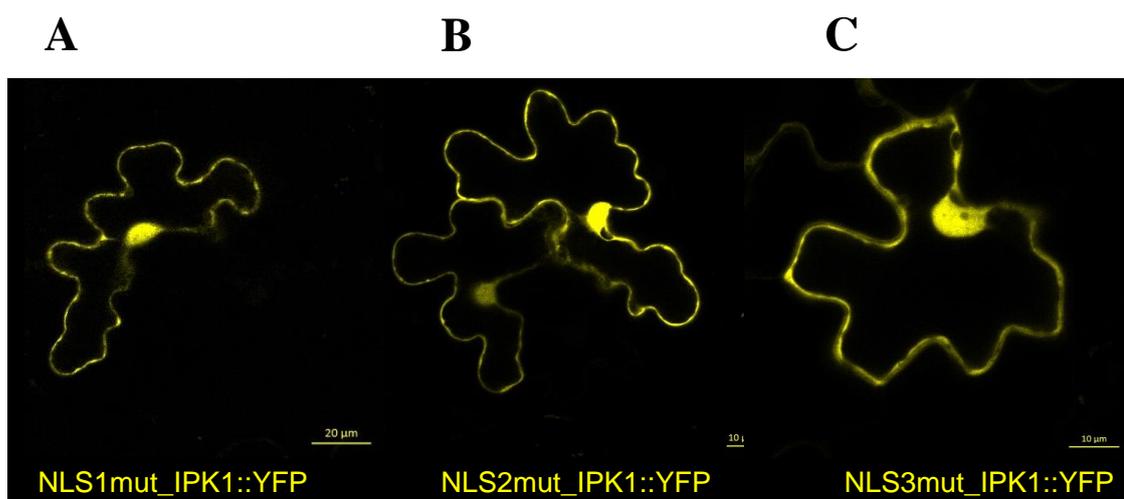


Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation mutierter IPK1-Varianten in Tabakepidermiszellen

Subzelluläre Lokalisation der mutierten IPK1 Varianten in Tabakepidermiszellen. Mit Mutation basischer Aminosäuren in putativer A) NLS1, B) NLS2 und C) NLS3 (siehe Abbildung 32).

Auch die mutierte IPK2-Variante mit veränderter putativer NLS1 zeigte die gleiche Lokalisierung wie die unmutierte Variante (Abbildung 34). Es wurde eine spezifische Kernverteilung (ohne Nukleoli), eine Lokalisierung in der Kernhülle und im Cytoplasma für dieses Konstrukt beobachtet. Die eYFP-Kontrolle zeigte eine diffuse Kern- und Cytoplasmalokalisierung.

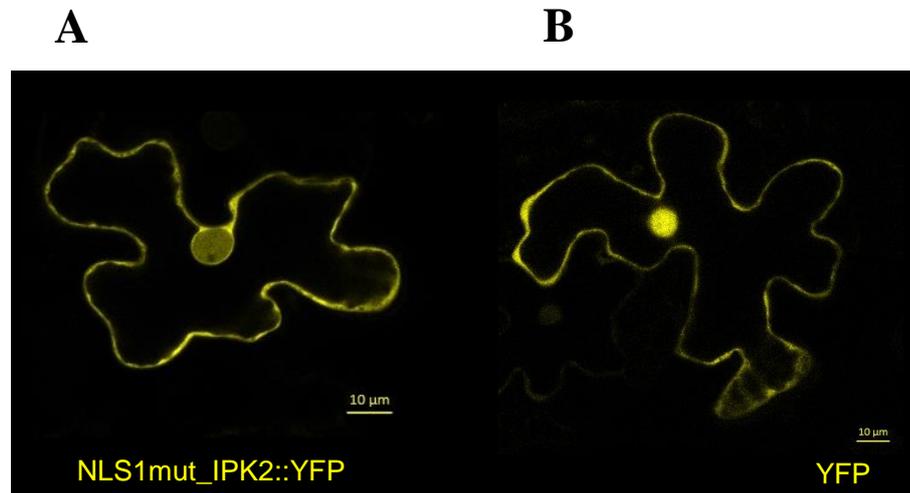


Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation von mutierter IPK2-Variante und eYFP-Kontrolle in Tabakepidermiszellen

Subzelluläre Lokalisation der A) mutierten IPK2 mit veränderter putativer NLS1 und der B) eYFP-Kontrolle in Tabakepidermiszellen.

Die Daten weisen darauf hin, dass entweder die veränderten NLS von IPK1 und IPK2 noch funktional waren oder dass die Kernlokalisierung der Enzyme nicht von der putativen NLS abhängt.

3.5.5 Interaktionstest zwischen IPKs und α -Importinen

Ein weiteres Kriterium für eine biologisch relevante Kernlokalisierung ist die Interaktion von Proteinen mit den Adapterproteinen des aktiven Kernimportapparates, den α -Importinen. Um eine mögliche Interaktion zwischen den IPKs und α -Importinen zu testen wurde das Split-Ubiquitin-basierte Hefe-2-Hybrid-System verwendet. Es wurden sowohl Tropftests als auch ONPG-Tests durchgeführt (Abbildung 35). Das pBR3C Plasmid mit IPK1 und IPK2 wurde jeweils mit den pAI, pDL2 und pPR3N mit den α -Importinen kotransformiert. Es konnte bei beiden IPKs ein starkes Wachstum für die Positivkontrollen und ein schwaches Wachstum für die Negativkontrollen beobachtet werden. Die IPK1 zeigte bei den SD –LWH Interaktionstestplatten vor allem bei Kotransformation mit α -Importin 3, 4 und 6 starkes Wachstum bis zur zweiten Verdünnung. Bei der IPK2 konnte vor allem bei der Kotransformation mit α -Importin 1, 4 und 6 starkes Wachstum bis zur zweiten und dritten Verdünnung auf den SD –LWH Platten beobachtet werden.

Beim ONPG-Test konnte – ähnlich wie bei den Tropftests – eine hohe Basalaktivität der Negativkontrolle beobachtet werden. Die IPK1-Interaktion mit der Positivkontrolle zeigte eine Aktivität von fast 600 Miller-Einheiten und die Negativkontrolle von ca. 300 Miller-Einheiten. Bei der Interaktion mit den α -Importinen 2, 4 und 6 konnte eine Aktivität von mehr als 500 Miller-Einheiten gemessen werden, was auf eine Interaktion hinweisen könnte. Für die IPK2 konnte bei den α -Importinen 1 und 6 mit ca. 350 Miller-Einheiten eine ähnlich hohe Aktivität wie bei der Postivkontrolle gemessen werden. Zusammenfassend zeigte die Überschneidung von Tropftest und ONPG-Test das die IPK1 möglicherweise mit α -Importin 4 und 6 interagiert. Die IPK2 zeigte bei beiden Tests eine mögliche Interaktion mit α -Importin 1 und 6.

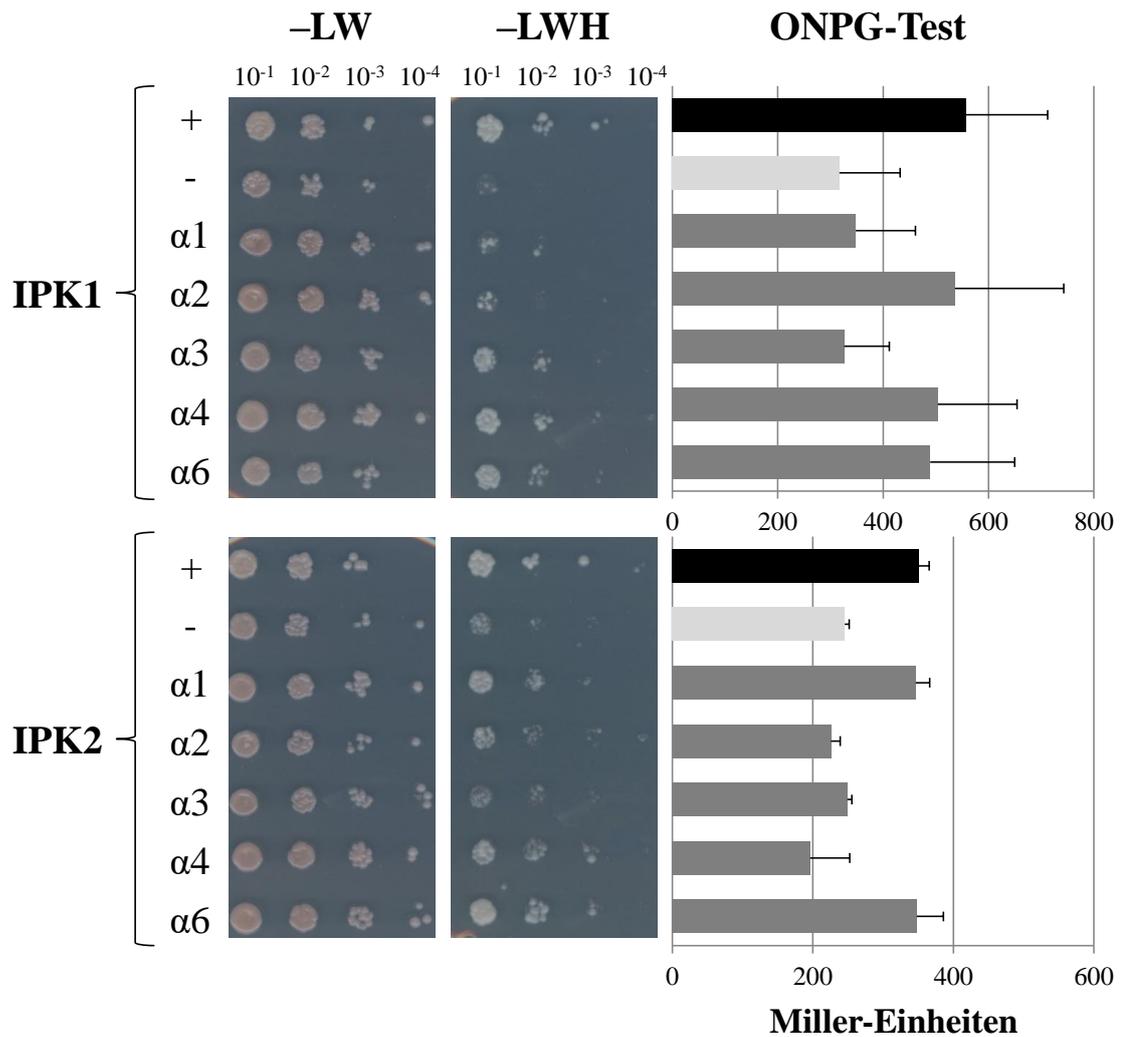


Abbildung 35: Interaktionstest von IPK1 und IPK2 mit α -Importinen aus Arabidopsis

Interaktionstest von IPK1 und IPK2 mit den α -Importinen 1, 2, 3, 4 und 6 aus *A. thaliana*. Es wurden Tropftest mit den Verdünnungen der OD_{600} von 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} auf SD -LW Platten als Wachstumskontrolle und auf SD -LWH als Interaktionstest aufgetropft und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Der ONPG-Test zeigt die Aktivität in Miller-Einheiten. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

Insgesamt klären die Ergebnisse der Substitutionsexperimente der NLS und die Interaktionsstudien die Frage nach der biologischen Relevanz der Kernlokalisierung von IPK1 und IPK2 nicht abschließend.

3.6 Sensitivität IPP-modulierter Pflanzen gegenüber verschiedenen Hormonkonzentrationen

Um den Einfluss der veränderten IP_5 - und IP_6 -Konzentrationen in den Pflanzen auf die Sensitivität gegenüber IAA und JA zu untersuchen, wurden qRT-PCR Messungen mit verschiedenen Hormonkonzentrationen durchgeführt. Die verschiedenen Linien WT, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE wurden für 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen und für die Hormonbehandlung für 30 min auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit verschiedenen IAA- und MeJA-Konzentrationen umgesetzt. Für die IAA-Behandlung wurden IAA-Konzentrationen von 0, 50, 100 und 200 nM und für die JA-Behandlung wurden MeJA-Konzentrationen von 0, 25, 50 und 100 μ M gewählt. Die qRT-PCR Messungen wurden von Chris-Oliver Schulze im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt und die relative Genexpression des IAA-induzierbaren Gens *IAA5* und des JA-induzierbaren Gens *VSP1* gemessen (Abbildung 36). Ubiquitin wurde als Referenzgen verwendet.

Das IAA-induzierbare Gen *IAA5* zeigte sowohl in den Wildtyppflanzen (grün) als auch in den *ipk1-1*-Pflanzen (orange) eine starke, lineare Induktion bei 50 nM und 100 nM IAA mit ca. 0,003 und ca. 0,006 als $2^{-\Delta CT}$ -Werte. Bei 200 nM IAA wurde keine weitere Erhöhung der relativen Genexpression bei WT- und *ipk1-1*-Pflanzen gemessen. Die IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen zeigten auch einen starken, linearen Anstieg mit zunehmenden IAA-Konzentrationen mit ca. 0,0025 als $2^{-\Delta CT}$ -Wert bei 50 nM IAA, ca. 0,004 bei 100 nM IAA und ca. 0,0075 als $2^{-\Delta CT}$ -Wert bei 200 nM IAA-Konzentration. Insgesamt waren alle Linien ähnlich in ihrer Sensitivität gegenüber IAA und zeigten fast lineare Sensitivitätskurven.

Bei der JA-Sensitivität zeigten die *ipk1-1*-Pflanzen eine leicht erhöhte relative Genexpression bei 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M MeJA-Konzentration mit $2^{-\Delta CT}$ -Werten von ca. 1,05, ca. 1,55 und ca. 1,8. Die anderen Linien zeigten bei 25 μ M MeJA fast gleiche $2^{-\Delta CT}$ -Werte von ca. 0,7. Bei den Wildtyppflanzen konnten bei 50 μ M MeJA Werte von ca. 1,3 und bei 100 μ M MeJA Werte von ca. 1,6 gemessen werden. Die IPK1-OE- und IPK2-OE-Linien lagen mit $2^{-\Delta CT}$ -Werten von ca. 1,0 bei 50 μ M MeJA und ca. 1,4 bei 100 μ M MeJA etwas unterhalb der anderen Linien. Es konnte insgesamt eine leichte Abflachung der Kurven mit steigenden MeJA-Konzentrationen beobachtet werden.

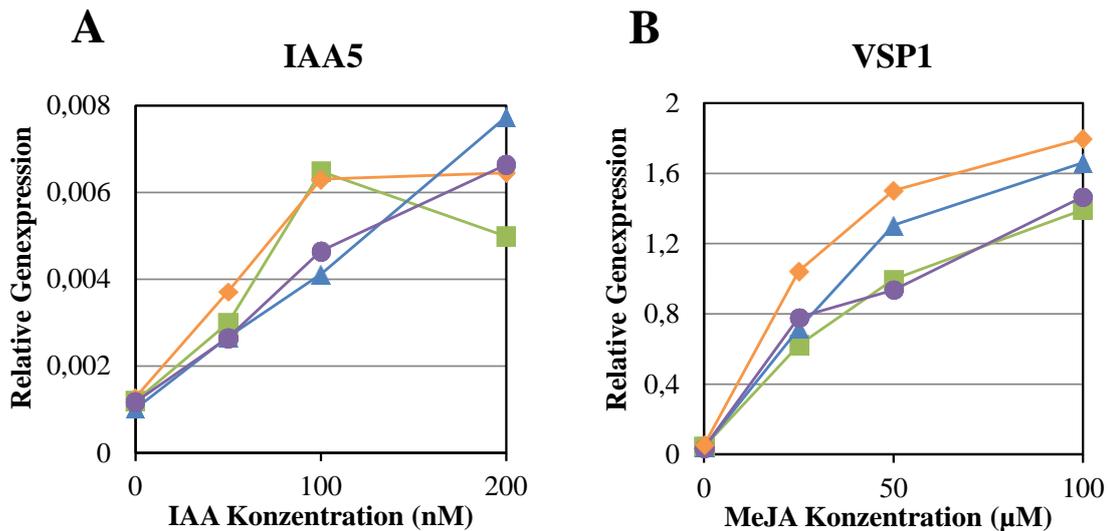


Abbildung 36: Sensitivität IAA- und JA-abhängiger Genexpression in IPP-modulierten Pflanzen

Es wurden die verschiedenen Linien WT (grün), *ipk1-1* (orange), IPK1-OE (blau) und IPK2-OE (violett) für 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit verschiedenen IAA- (0 nM, 50 nM, 100 nM und 200 nM) und MeJA-Konzentrationen (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M) für 30 min. Die Induktionsstärke der IAA-Antwort und der JA-Antwort wurde als relative Genexpression mit $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert (berechnet nach ΔCT -Methode) des **A) IAA5**-Gens und des **B) VSP1**-Gens angegeben. Die Experimente wurden vom Bachelorstudenten Chris-Oliver Schulze unter Verwendung des *UBC10*-Gens als Referenz durchgeführt. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

Mögliche Sensitivitätsunterschiede der verschiedenen Linien sind in den gewählten Phytohormonbereichen gering.

3.7 Kompetitionsstudien

Eine grundlegende Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass IPPs funktionelle Kofaktoren der Hormonrezeptoren TIR1 und COI1 sind. Da beide Rezeptoren FBPs in SCF-Komplexen sind, sollte untersucht werden, ob bei geeigneter Stimulation die FBPs um die Elemente des SCF-Komplex konkurrieren. Die Veränderung der IP_5 - und IP_6 -Balance in den Pflanzen könnte dabei zu einer veränderten Präferenz für IAA oder JA-Ile führen. Durch gleichzeitige Applikation beider Hormone sollte untersucht werden, ob eine Antwort zugunsten der anderen unterdrückt werden würde. Die Pflanzen wurden für 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten angezogen und anschließend für 30 min mit 100 nM IAA, 100 μ M MeJA und 100 nM IAA + 100 μ M MeJA zusammen inkubiert. Es wurden die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte von hormonbehandelten durch $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte von

unbehandelten Proben dividiert, um die Induktionsfaktoren zu berechnen. Um die IAA-Antwort in den Pflanzen zu untersuchen wurden die Induktionsfaktoren vom *LBD29*-Gen und für die JA-Antwort wurden die Induktionsfaktoren vom *VSP1*-Gen verglichen.

Die *LBD29*-Induktionsfaktoren waren bei der Behandlung mit 100 nM IAA + 100 μ M MeJA reduziert gegenüber der alleinigen Behandlung mit 100 nM IAA (Abbildung 37). Es zeigte sich beim Wildtyp eine leichte Reduktion von ca. 8-facher auf ca. 6-fache Induktion. Auch die *ipk1-1*-Pflanzen wiesen eine leichte Reduktion von ca. 9-fach auf ca. 7-fache Induktion auf. Eine stärkere Reduktion der IAA-Antwort konnte bei den IPK1-OE-Pflanzen beobachtet werden, deren Induktionsfaktoren von ca. 22 auf ca. 13 sanken. Die IPK2-OE-Pflanzen zeigten die stärkste Reduktion der *LBD29*-Induktionsfaktoren von ca. 22 auf ca. 8.

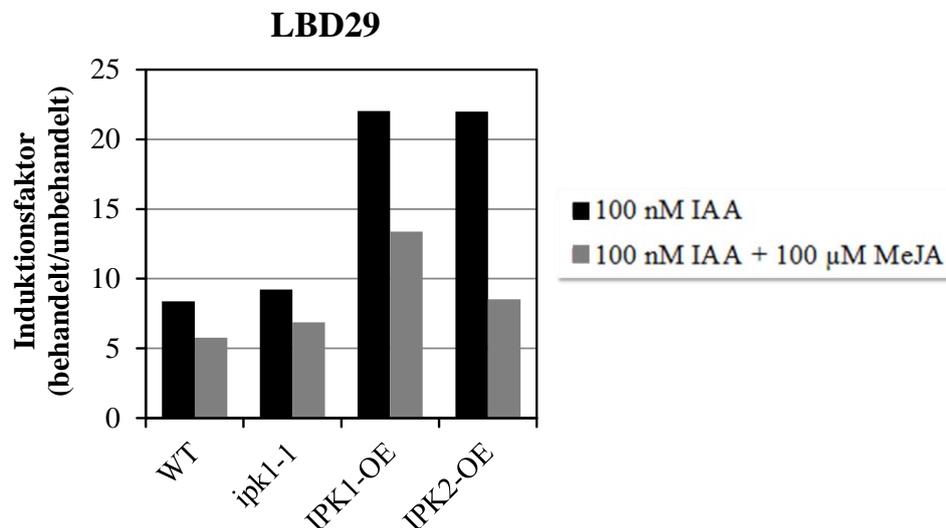


Abbildung 37: IAA-Antwort bei simultaner IAA- und MeJA-Applikation

Es wurden 7 Tage alte Pflanzen (WT, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE) für 30 min mit 100 nM IAA (schwarz) und 100 nM IAA + 100 μ M MeJA (grau) inkubiert. Die qRT-PCR Messungen wurden mit dem IAA-induzierbaren Gen *LBD29* durchgeführt. Die IAA-Antwort wurde durch Berechnung der Induktionsfaktoren bestimmt. Dafür wurden die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte (berechnet nach ΔCT -Methode) von hormonbehandelten durch $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte von unbehandelten Proben dividiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

Bei der übergeordneten JA-Antwort zeigte sich bei drei Linien keine Reduktion der *VSP1*-Induktionsfaktoren nach Behandlung mit beiden Phytohormonen (Abbildung 38). Es konnte sogar ein leichter Anstieg beim Wildtyp von ca. 1,75 auf ca. 2,0; bei den *ipk1-1*-Pflanzen von ca. 1,4 auf ca. 1,55 und bei den IPK1-OE-Pflanzen von ca. 2,1 auf ca. 2,4 festgestellt werden. Die IPK2-OE-Pflanzen zeigten als einzige eine Reduktion

der JA-Antwort bei der Behandlung mit beiden Phytohormonen. Die Induktionsfaktoren reduzierten sich von ca. 3,0 auf ca. 1,7.

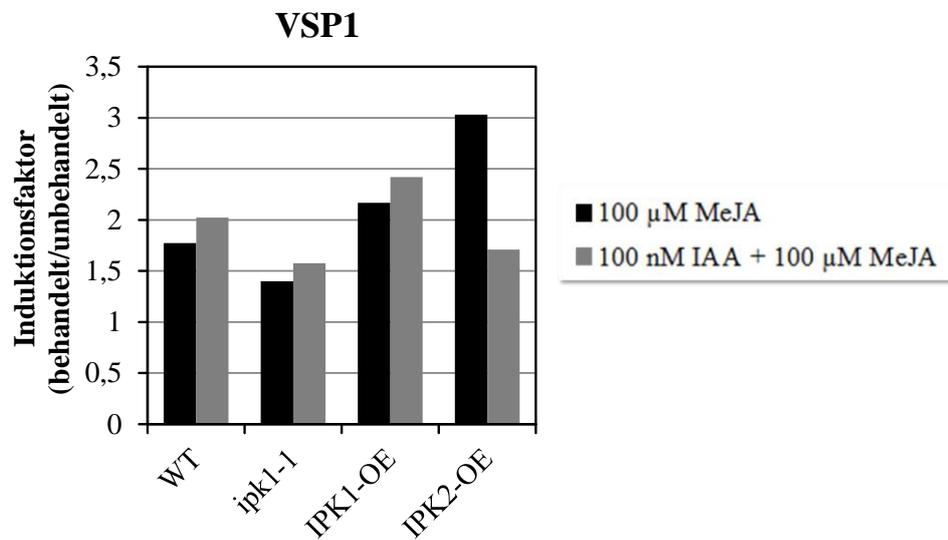


Abbildung 38: JA-Antwort bei simultaner IAA- und MeJA-Applikation

Es wurden 7 Tage alte Pflanzen (WT, *ipk1-1*, IPK1-OE und IPK2-OE) für 30 min mit 100 μ M MeJA (schwarz) und 100 nM IAA + 100 μ M MeJA (grau) inkubiert. Die qRT-PCR Messungen wurden mit dem IAA-induzierbaren *VSP1*-Gen durchgeführt. Die IAA-Antwort wurde durch Berechnung der Induktionsfaktoren bestimmt. Dafür wurden die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte (berechnet nach ΔCT -Methode) von hormonbehandelten Proben durch $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte unbehandelter Proben dividiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

4. Diskussion

IPPs mit Signalwirkung wurden für verschiedene eukaryotische Organismen beschrieben (Berridge, 2009; Tsui & York, 2010). Für Pflanzen wurden bereits Änderungen von IPP-Konzentrationen nach unterschiedlichen Stressbedingungen dokumentiert, z.B. für IP₃ (Perera *et al.*, 1999; Mosblech *et al.*, 2008), denen aber bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte. Änderungen von IP₃-Konzentrationen wurden zunächst im Rahmen einer IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung diskutiert, es zeigte sich aber, dass ein IP₃-sensitiver Ca²⁺-Kanal in Pflanzen womöglich nicht existiert (Krinke *et al.*, 2007). Daher wurden andere mögliche Funktionen für IPPs angenommen, vor allem für die IPPs höherer Ordnung, IP₅ und IP₆.

4.1 Signalintegration der IPPs

Das Verständnis über IPP₅ hat sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt. Es begann mit der Entdeckung des IP₃ als Signalmolekül für die intrazelluläre Calciumfreisetzung und wandelte sich über Einflüsse der IPPs bei der Chromatinremodellierung, Telomerhomöostase, Phosphathomöostase, mRNA-Export, RNA-Editing bis hin zur Zellzykluskontrolle und Bedeutung als Kofaktor in Enzymen und Rezeptoren (Tsui & York, 2010). Es wurde die Vielseitigkeit der IPPs als Signalmoleküle in Eukaryoten offenbart. Eine wichtige Frage, die dabei allerdings vernachlässigt wurde, ist wie die Signalintegration und -transduktion dieser Moleküle abläuft. Denn die IPP-Bildung erfolgt – soweit bisher bekannt – an der Plasmamembran (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005), aber die gebildeten IP₅- und IP₆-Moleküle werden als Kofaktoren des TIR1- und COI1-Rezeptors im Nukleus benötigt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind PIs Vorläufermoleküle der IPPs. In Pflanzen wird das Molekül PIP₂ an der Plasmamembran durch die PLC gespalten und so IP₃ freigesetzt (Delage *et al.*, 2013) (Abbildung 39). Die PIP₂-Mengen in Pflanzen unterliegen stressabhängigen Schwankungen und werden z.B. bei Salzstress und Hitzestress schnell erhöht (van Leeuwen *et al.*, 2007; Mishkind *et al.*, 2009). Diese Änderungen korrelieren auch mit Änderungen von IP₃-Konzentrationen (I. Heilmann *et al.*, 1999; König *et al.*, 2007). Das freigesetzte IP₃ wird entweder im Cytosol oder Nukleus durch die IPK2 und IPK1 phosphoryliert, so dass IP₄, IP₅ und IP₆ gebildet werden. Es ist bekannt, dass die COI1- und TIR1-Rezeptorkomplexe im Nukleus gebildet werden und dort den Abbau von Transkriptionsrepressoren einleiten (Withers

et al., 2012; Tao *et al.*, 2005; Hayashi, 2012). Auch die Kofaktoren IP₅ und IP₆ müssen in den Nukleus gelangen. Allerdings ist unklar, ob sie durch einfache Diffusion, aktiven Transport oder „Huckepack“- Mechanismus in den Nukleus gelangen oder direkt im Nukleoplasma gebildet werden.

In Lokalisationsstudien wurde die subzelluläre Verteilung von IPK1 und IPK2 untersucht. Frühere Veröffentlichungen deuteten bereits auf eine nukleäre Lokalisation der Enzyme hin (Xia *et al.*, 2003). IPK1 und IPK2 aus Arabidopsis wurden als Fusionsproteine mit C-terminalem eYFP-Marker zuerst transient in Tabakepidermiszellen exprimiert. Beide Kinasen zeigten eine Lokalisierung im Nukleus und Cytosol, allerdings war die Kernlokalisierung der IPK2 moderater als die der IPK1, was möglicherweise eine konditionale Lokalisierung der IPK2 indizieren könnte. So könnte IPK2 zwischen Nukleus und Cytosol hin und her transportiert werden. Die subzelluläre Lokalisation wurde auch in stabil transformierten Arabidopsislinien untersucht. Dabei zeigten sowohl IPK1 als auch IPK2 eine starke Lokalisation im Nukleus und im Cytoplasma. Die nukleäre Lokalisation der IPKs könnte ein Zeichen für die Notwendigkeit der spezifischen Bildung der höheren IPPs im Kern sein. Um einen möglichen Mechanismus für den Kernimport der Kinasen zu identifizieren, wurden bioinformatische Sequenzanalysen durchgeführt. Vorhergesagte putative Kernlokalisierungssignale (NLS) bestätigten sich in weiteren Lokalisationsstudien nicht. Hinweise auf einen importinabhängigen Kernimport für IPK1 und IPK2 lieferten Hefe-2-Hybrid-Interaktionstests. Die bisher verfügbaren Daten belegen einen aktiven, Importin-vermittelten Kernimport nicht, schließen ihn jedoch auch nicht aus.

Interessanterweise wurde herausgefunden, dass die ITPK-1 im Nukleus mit dem COP-9-Signalosom (CSN) interagiert, welches die Aktivität von SCF-Komplexen durch Neddylierungs- und Deneddylierungsreaktionen reguliert (Y. Sun *et al.*, 2002). Es wäre denkbar, dass auch andere IPKs wie IPK1 und IPK2 indirekt die SCF-Komplexe regulieren.

Die Lokalisation der IPKs in mehreren Kompartimenten könnte ein Hinweis auf eine differenzierte Bildung von höheren IPPs im Cytosol und im Nukleus sein. Es könnten, wie auch bei PIs bekannt (Gonzales & Anderson, 2006; M. Heilmann & Heilmann, 2015), zwei verschiedene, separierte IPP-Pools in beiden Kompartimenten existieren. Dies würde zu unterschiedlichen IP₅- und IP₆-Konzentrationen im Nukleus führen. Auch eine schrittweise Bildung von IPPs im Cytosol bis zu einer bestimmten

Phosphorylierungsstufe und finale Phosphorylierung im Nukleus wären denkbar. Das leicht schwächere IPK2::eYFP Fluoreszenzsignal im Nukleus bei der transienten Expression in *N. tabacum* könnte ein Indiz für einen möglichen Shuttling-Mechanismus darstellen. Die duale Lokalisierung der Kinasen könnte zudem auf unterschiedliche Funktionen von IPPs im Cytosol und im Kern hindeuten.

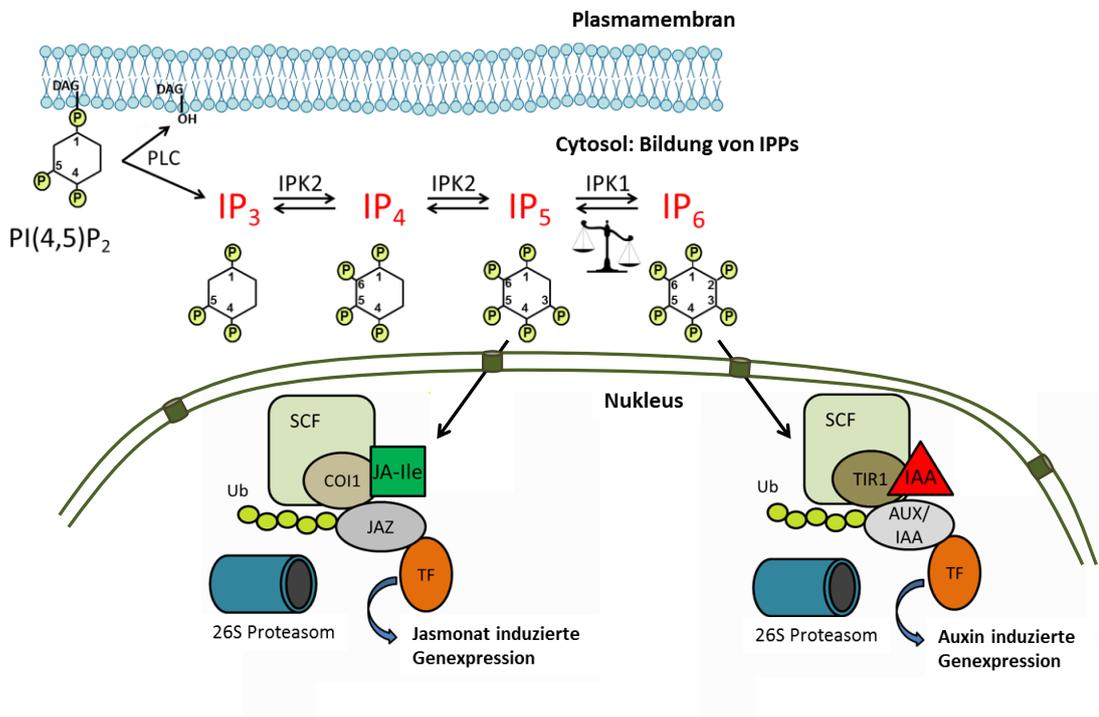


Abbildung 39: IPP-Bildung und Integration

Schematische Darstellung der IPP-Bildung im Cytosol und der möglichen Integration höherer IPPs (IP₅ und IP₆) in den Nukleus.

Interessante Veränderungen zeigten sich bei den PI-Gehalten der IPP-modulierten Pflanzen. Diese Vorläufermoleküle der IPPs waren in den *ipk1-1*-Pflanzen und IPK2-OE-Pflanzen verändert (Abbildung 14). Die Änderungen entsprachen denen, die bereits für *ipk1-1*-Pflanzen bestimmt wurden (A. Mosblech Dissertation). Die PI-, PIP- und PIP₂-Gehalte waren gegenüber den Wildtyppflanzen und IPK1-OE-Pflanzen erhöht. PI war um den Faktor 2, PIP um den Faktor 1,3 und PIP₂ um den Faktor 4 erhöht. Das könnte auf eine Feedback-Regulation der PIs durch die löslichen IPPs oder die IPP-bildenden Kinasen hindeuten.

Die ubiquitäre Präsenz der IPPs spiegelt die universale Rolle dieser sekundären Botenstoffe bei der Signaltransduktion wider. Die Verteilung der IPPs IP₅ und IP₆ in Arabidopsis ist im vegetativen Gewebe relativ uniform in Wurzeln, Blättern und

Stengeln (Abbildung 11). Im reproduktiven Gewebe wie Blüten, Schoten und Samen steigen die IP_5 - und IP_6 -Konzentration stark bis zum ca. 10000-fachen an. Die Akkumulation von IP_5 und IP_6 in reproduktivem Gewebe weist auf eine Funktion der IPPs als Phosphat- und Energiespeicher hin, die bereits in verschiedenen Arbeiten postuliert wurde (Raboy *et al.*, 2001).

Die für die Signalintegration so wichtigen löslichen IPPs unterliegen dynamischen Schwankungen die im Kontext der JA- und IAA-Antwort mit Verwundungs- und Temperaturinduktionsexperimenten untersucht wurden. In Verwundungsexperimenten sollten JA-induzierte dynamische Veränderungen der IPPs innerhalb einer Stunde untersucht werden. Es war bereits bekannt, dass mechanische Verwundung bei Arabidopsis zu einem starken Anstieg von JA und IP_3 führt (Mosblech *et al.*, 2008). Die Messung der IP_5 -Konzentrationen in den verschiedenen Pflanzenlinien zeigte starke Schwankungen (Abbildung 17). Diese Schwankungen könnten auf den Verbrauch und die Neubildung der IP_5 -Kofaktoren zur Bildung neuer COI1-JAZ Rezeptorkomplexe hindeuten. Bei der Messung der IP_6 -Konzentration nach Verwundung konnte in allen Linien außer der *ipk1-1*-Linie ein Anstieg der IP_6 -Konzentration nach 60 min gemessen werden (Abbildung 17). Interessanterweise wurde bei Messungen anderer IPPs ein leichter Anstieg von IP_8 vier Stunden nach 50 μ M MeJA-Behandlung gemessen (Laha *et al.*, 2015).

Um IAA-induzierte dynamische Veränderungen von IPPs zu untersuchen, wurden Temperaturänderungsexperimente durchgeführt. Die Konzentrationen von IP_5 und IP_6 wurden eine und zwei Stunden nach Temperaturerhöhung von 21 °C auf 28 °C gemessen. Interessanterweise stiegen sowohl die IP_5 - und die IP_6 -Konzentration signifikant ($p < 0,01$) an (Abbildung 16). Diese dynamischen Änderungen der IPPs und schnellen Erhöhungen der IP_6 -Level zeigen die Bedeutung der IPPs in Signaltransduktionsprozessen auf.

4.2 Modulierung des IPP-Stoffwechsels

Zur Modulierung des IPP-Stoffwechsels in Arabidopsis wurde in dieser Arbeit die Expression der Schlüsselenzyme IPK1 und IPK2 verändert. Es wurden Überexpressionslinien IPK1-OE und IPK2-OE erzeugt, die vor allem erhöhte IP_6 -Konzentrationen aufwiesen. Des Weiteren wurden *ipk1-1*-Mutanten mit erhöhten IP_5 -

und verringertem IP_6 -Konzentrationen verwendet (Abbildung 13). Interessanterweise waren die Veränderungen der IP_5 - und IP_6 -Konzentrationen wesentlich geringer als die Veränderungen der Transkriptmengen von *IPK1* und *IPK2* in den transgenen Linien (Abbildung 12). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Pflanzen große Variationen von IP_5 - und IP_6 -Konzentrationen nicht tolerieren und die IPP-Bildung möglicherweise auf posttranslationaler Ebene regulieren. Eine solche Regulation könnte zum Beispiel durch erhöhten Abbau von *IPK1* und *IPK2* erfolgen. Auch eine Modulierung der *IPK1*- und *IPK2*-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung ist möglich.

4.3 IPPs als funktionale Kofaktoren von COI1 und TIR1

Die beiden IPPs IP_5 und IP_6 sind durch einen enzymatischen Schritt ineinander überführbar. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass sie als Kofaktoren in zwei unterschiedlichen Phytohormonrezeptoren COI1 und TIR1 fungieren. In einer denkbaren Rolle als funktionale Kofaktoren könnten IP_5 und IP_6 das Umschalten zwischen der Funktion von COI1 und TIR1 und somit zwischen Wachstum und Abwehr steuern.

Um die regulatorischen Einflüsse von IPPs auf das pflanzliche Wachstum beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob IP_5 und IP_6 einen erkennbaren funktionalen Beitrag zur Rezeptorfunktion von COI1 und TIR1 leisten. Eine Reihe von Experimenten wurden durchgeführt, um den Einfluss von IPPs auf die IAA-Wahrnehmung über TIR1 zu klären. Dafür wurden transgene Pflanzen erzeugt, die veränderte IP_6 -Konzentrationen aufwiesen, und mit diesen Pflanzen dann physiologische und transkriptionelle IAA-Antworten untersucht.

In den physiologischen Experimenten zeigte sich konsistent, dass eine Erhöhung der IP_6 -Konzentration IAA-abhängige Wachstumseffekte verstärkt. So war das Wurzelwachstum in *IPK1*-OE- und *IPK2*-OE-Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen erhöht (Abbildung 19) und auch die Blattflächen waren vergrößert (Abbildung 22). Ein gegenläufiger Effekt konnte bei Pflanzen mit verringerter IP_6 -Konzentration beobachtet werden, die verringertes Wurzelwachstum und geringere Blattflächen aufwiesen.

Auch die Expressionsanalysen von IAA-induzierbaren Genen bestätigten das in Pflanzen mit niedrigeren IP₆-Konzentrationen die IAA-induzierbare Genexpression verringert ist und in Pflanzen mit hohen IP₆-Konzentrationen erhöht.

Die JA-Antwort der IPP-modulierten Pflanzen wurde mit Caterpillar performance tests untersucht. Es konnte eine leicht verringerte Gewichtszunahme der Raupen auf *ipk1-1*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abbildung 26). Diese Pflanzen mit erhöhten IP₅-Konzentrationen scheinen eine verstärkte JA-abhängige Verteidigungsantwort hervorzurufen, denn die verstärkte Verteidigungsantwort von *ipk1-1*-Pflanzen wurde auch bei Caterpillar performance tests mit *Plutella xylostella* Raupen beobachtet (Mosblech *et al.*, 2011). Das gemessene Raupengewicht auf IPK1-OE-Pflanzen mit erhöhten IP₆-Konzentrationen war erhöht und lag ähnlich hoch wie bei Verwendung JA-Ile-insensitiver *coi1-t*-Mutanten, was auf eine abgeschwächte Verteidigungsantwort bei verstärkter IPK1-Expression hinweist. Die verringerte Defensivantwort der IPK1-OE-Pflanzen gegenüber *S. littoralis*, könnte eventuell durch eine Absättigung des COI1-Rezeptors mit IP₆ entstehen, denn es ist bekannt das verschiedene IPPs im COI1-Rezeptor binden können (Sheard *et al.*, 2010; Laha *et al.*, 2015). Dies könnte die Aktivität des COI1-Rezeptors senken. Es ist aber auch möglich, dass die überexprimierte IPK1 einfach IP₅ als Substrat wegfängt, so dass weniger IP₅ als Kofaktor für die COI1-Rezeptoren zur Verfügung steht, wodurch deren Funktionalität reduziert wird.

Die IAA-Sensitivität wurde durch Bestimmung der IAA-induzierten Genexpression bei verschiedenen IAA-Konzentrationen untersucht. Interessanterweise stieg die Expression von *IAA5* bis 100 nM IAA stärker in den Pflanzen mit geringeren IP₆-Konzentrationen als in den Pflanzen mit höheren IP₆-Konzentrationen. Bei den IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen wurde ein durchgängig linearer Anstieg beobachtet, der bei 200 nM IAA auch die Pflanzen mit geringeren IP₆-Konzentrationen übertraf. Allerdings wurde für das Sensitivitätsexperiment das *IAA5*-Gen als IAA-induzierbares Gen gemessen. Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsrepressor von IAA-induzierten Genen, der durch die TIR1/AFB Rezeptorkomplexe abgebaut wird. Dabei kann eine verstärkte Feedback Reaktion in den Pflanzen mit hohen IP₆-Konzentrationen zu einer abgeschwächten *IAA5*-Expression geführt haben.

Die Experimente zur Untersuchung JA-abhängiger Genexpressionen zeigten interessanterweise ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die IP₅-Kofaktoren. So war die

VSP1- und *PDF1.2*-Genexpression nach 30 min Behandlung mit 100 μ M MeJA in den *ipk1-1*-Pflanzen mit stark erhöhten und den IPK2-OE-Pflanzen mit leicht erhöhten IP₅-Konzentrationen stärker induziert als in Wildtyp- und IPK1-OE-Pflanzen (Abbildung 42). Die *JR3*-Genexpression war zudem in den IPK2-OE-Pflanzen stärker induziert als in den anderen Pflanzen. Für die Korrelationsdiagramme der JA-abhängigen Genexpression mit den IP₅-Konzentrationen der Pflanzen ergab sich dadurch ein interessanter Kurvenverlauf. So zeigte sich ein annähernd sigmoidaler Zusammenhang zwischen steigender IP₅-Konzentration in den IPP-modulierten Pflanzen und der *VSP1*- und *PDF1.2*-Genexpression (Abbildung 27). Dieser Verlauf könnte eine Substratsättigungskurve darstellen, bei der die COI1-Rezeptoren vollständig mit IP₅-Kofaktoren gesättigt sind und eine weitere Steigerung der IP₅-Konzentration keinen Einfluss mehr auf die JA-Antwort hat. Mit Hilfe einer stöchiometrischen Analyse könnte dieser Effekt bestätigt werden, denn es wird pro Rezeptor ein IP₅-Molekül gebunden. In unseren IPP-Messungen konnten wir ab einer IP₅-Konzentration von ca. 2,4 nmol g⁻¹ (Fg) keine weitere Steigerung der JA-Induktion messen (Abbildung 27). Aktuell werden in Kooperation mit Prof. Dr. Sacha Baginsky von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Massenspektrometrieexperimente durchgeführt, um die Rezeptorkonzentrationen von TIR1/AFBs und COI1 in den IPP-modulierten Pflanzen zu quantifizieren. Diese Ergebnisse könnten helfen die zugrunde liegenden Ursachen der beobachteten Effekte besser zu verstehen.

Die verschiedenen physiologischen und transkriptionellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass IP₅ und IP₆ eine wichtige Funktion bei der JA-Ile- und IAA-Perzeption in Arabidopsis haben. Es werden durch modulierte IP₅- und IP₆-Konzentrationen JA- und IAA-abhängige Prozesse verstärkt und abgeschwächt. Die Intensität bzw. Stärke der IAA-Antwort ist sowohl in physiologischen Experimenten, als auch in Genexpressionsanalysen direkt abhängig von der IP₆-Konzentration. Hohe Korrelationskoeffizienten deuten darauf hin, dass sogar eine lineare Abhängigkeit zwischen steigenden IP₆-Konzentrationen und verstärkten IAA-Antworten bestehen könnte. Auch die JA-abhängigen Genexpressionsanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen steigenden IP₅-Konzentrationen und intensivierten JA-Antworten hin. Anhand der experimentellen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass sowohl IP₅ als auch IP₆ funktionale Kofaktoren ihrer Phytohormonrezeptoren sind und eine wichtige Rolle bei der JA-Ile- und IAA-Perzeption spielen. Ein weiterer Hinweis, der die Bedeutung von

IP₆ unterstützt, ist die Tatsache, dass Arabidopsispflanzen ohne IPK1 nicht überlebensfähig sind (Kuo *et al.*, 2014).

4.4 Dynamik und Stabilität der FBPs

IPPs unterliegen dynamischen Änderungen, die durch verschiedene Stimulationen, wie z.B. Gravistimulation oder Verwundung, ausgelöst werden (Perera *et al.*, 1999; Mosblech *et al.*, 2008). Es konnten in dieser Arbeit IP₅- und IP₆-Konzentrationsänderungen sowohl bei IAA-induzierten, als auch bei JA-induzierten Prozessen gemessen werden (Abbildung 16; Abbildung 17). Die Faltung und somit strukturelle Bildung der COI1- und TIR1-Rezeptoren wird durch die Bindung der IP₅- und IP₆-Kofaktoren ermöglicht (Tan *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010). Allerdings können die IPP-Kofaktoren zumindest im Fall des COI1-Rezeptors in bestehende SCF-Komplexe gebunden werden (Sheard *et al.*, 2010). Die IPP-bildenden Kinasen könnten die Kofaktoren möglicherweise direkt in der Nähe der Rezeptorkomplexe bilden, wie z.B. die Assoziation der ITPK-1 mit dem COP-9-Signalosom vermuten lässt (Y. Sun *et al.*, 2002). Des Weiteren könnten eventuell auch verschiedene IPPs z.B. um die COI1-Bindung konkurrieren, und somit die Phytohormonwahrnehmung beeinflussen. So zeigt der COI1-Rezeptor z.B. auch mit IP₄ als gebundenem Kofaktor Aktivität (Sheard *et al.*, 2010). Doch nicht nur eine Konkurrenz der IPPs müsste für die Balance von IAA- und JA-Ile-Perzeption in Betracht gezogen werden, sondern auch die Konkurrenz der verschiedenen FBPs wie z.B. TIR1/AFBs und COI1 um die weiteren Untereinheiten des SCF-Komplexes selbst.

Es könnte sein, dass verringerte IP₆-Konzentrationen die Zahl der aktiven TIR1-Komplexe verringert und somit die der COI1-Komplexe erhöht. Dies wäre für die Pflanzen eine einfache Möglichkeit JA-Antworten einzuschalten und die Balance wieder auf Kosten der IAA-Antwort zu verschieben. Zudem weisen vorläufige Ergebnisse zur *in vitro*-Assemblierung von TIR1-SCF-Komplexen darauf hin, dass in Abwesenheit von IP₆ kein funktionales TIR1-Protein gebildet wird (Calderon-Villalobos, unveröffentlicht). Trifft dies zu, würde eine verringerte IP₆-Konzentration eine verringerte TIR1-Bildung nach sich ziehen.

Es scheinen mehrere IPPs die COI1-JAZ1-Interaktion mit Coronatin zu unterstützen. So konnte gezeigt werden, dass I(1,4,5,6)P₄, I(1,3,4,5,6)P₅, I(1,2,4,5,6)P₅, IP₆ und IP₇ die

Rezeptoraktivität beeinflussen (Sheard *et al.*, 2010; Laha *et al.*, 2015). Das legt die Vermutung nahe, dass mehrere IPPs um die COI1-Bindung konkurrieren und unabhängig voneinander eine JA-Antwort auslösen. Auch die steigenden IP₆-Konzentrationen nach Verwundung würden diese Vermutung unterstützen. Die vermutliche Evolution des COI1-Rezeptors aus den TIR1/AFB-Rezeptoren könnte durch die Regulation der Balance unterstützt und vorangetrieben worden sein. Einen Hinweis, dass die IPPs wichtige Regulatoren der Funktion von COI1 und TIR1 sind, ergaben Phytohormonmessungen, die in Kooperation mit der AG Feussner an der Universität Göttingen durchgeführt wurden.

Es konnten in den IPK2-OE-Pflanzen erhöhte IAA- (25-fach) und JA-Konzentrationen (2-fach) im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abbildung 15). Auch in den *ipk1-1*-Pflanzen wurden erhöhte IAA-, JA- und zusätzlich auch SA- und 12COOH-JA-Ile-Konzentrationen gemessen. Die IPK1-OE-Pflanzen zeigten leicht verringerte IAA-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp. Das könnte bestätigen, dass eine Feedback-Regulation besteht und zeigt zudem, dass ein Zusammenhang zwischen den IPPs bzw. Kinasen und den korrespondierenden Phytohormonen existiert. Dabei könnte IP₅ für die IAA- und JA-Bildung eine wichtige Rolle spielen, denn beide Phytohormone waren in Pflanzen mit erhöhten IP₅-Konzentrationen ebenfalls erhöht.

4.5 Zusammenspiel oder Konkurrenz von IPPs

Die funktionale Beteiligung von IP₅ und IP₆ an der Wahrnehmung von IAA und JA-Ile durch COI1 und TIR1 lässt die Frage nach der Kontrolle der Hormonantworten durch Konversion von IP₅ und IP₆ relevant erscheinen.

Um diese Schaltfunktion der IPPs zu testen, wurde eine gleichzeitige IAA- und MeJA-Applikation und deren Einfluss auf die jeweilige Geninduktion untersucht. In den Überexpressionslinien der Kinasen IPK1-OE und IPK2-OE, mit erhöhten IP₆-Konzentrationen, wurde bei gleichzeitiger IAA- und MeJA-Applikation eine stärkere Induktion des IAA-abhängigen *LBD29*-Gens gemessen als im Wildtyp und *ipk1-1*-Pflanzen (Abbildung 37). Für die Induktion des JA-abhängigen *VSP1*-Gens konnte in Wildtyp-, *ipk1-1*-, und IPK1-OE-Pflanzen sogar eine leicht erhöhte Genexpression bei Applikation beider Phytohormone im Vergleich zur alleinigen MeJA-Applikation gemessen werden (Abbildung 38). In den IPK2-OE-Pflanzen wurde dagegen eine um

den Faktor 2 reduzierte Genexpression gemessen. Das zeigt, dass es eine wechselseitige Beeinflussung beider Phytohormone gibt. Um diese Beobachtungen zu erklären, muss die molekulare Maschinerie der E3-Ubiquitinligasen berücksichtigt werden, in denen COI1 und TIR1 agieren. Die abgeschwächte IAA-Antwort bei gleichzeitiger MeJA-Applikation weist auf eine mögliche Konkurrenz des JA-Ile-Rezeptors COI1 mit dem IAA-Rezeptor TIR1 um die Komponenten des SCF-Komplexes hin.

Insgesamt weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass IPPs funktionale Kofaktoren der Phytohormonrezeptoren TIR1 und COI1 sind. Es bleibt zu klären, ob die Kofaktoren die Bindung der Ubiquitinierungs-Zielproteine begünstigen, die Stabilität der E3-Ligasen beeinflussen, oder beides.

5. Zusammenfassung

IAA und JA sind wichtige Phytohormone, die bei der pflanzlichen Entwicklung eine große Rolle spielen. IAA ist vor allem beim Wachstum von Pflanzen, JA bei der Verteidigung gegen Fraßfeinde von Bedeutung. Für die IAA-Wahrnehmung ist der TIR1-Rezeptor und für die JA-Ile-Wahrnehmung der COI1-Rezeptor verantwortlich. Beide Rezeptoren agieren als FBPs in E3-Ubiquitinligasekomplexen und vermitteln den proteasomalen Abbau transkriptioneller Repressoren. Durch Strukturanalysen von COI1 und TIR1 wurden die IPPs IP₅ und IP₆ als Kofaktoren identifiziert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss und die Bedeutung der IPP-Kofaktoren auf die IAA und JA-Ile-Wahrnehmung untersucht.

Die Produktion von IP₅ und IP₆ wird durch die IPKs IPK1 und IPK2 reguliert, welche ubiquitär in allen Geweben und während aller Entwicklungsstadien exprimiert werden. Beide IPKs sind nukleär und cytosolisch lokalisiert und zeigten in Hefe-2-Hybrid-Tests eine mögliche α -Importin-Interaktion. IP₅ und IP₆ sind ebenfalls ubiquitär vorhanden und werden verstärkt in reproduktivem Gewebe gebildet. Dynamische Änderungen von IP₅ und IP₆ sind stressbedingt. Es konnten erhöhte IP₆-Konzentrationen nach Verwundung und erhöhte IP₅- und IP₆-Konzentrationen nach Temperaturerhöhung gemessen werden. Um den Einfluss von IP₅ und IP₆ auf die Phytohormonwahrnehmung zu untersuchen wurden *ipk1-1*-, IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen mit modulierten IPP-Konzentrationen erzeugt. Mit diesen Pflanzen wurden physiologische Tests und Genexpressionuntersuchungen durchgeführt. IAA-abhängige Wachstumseffekte und gravitrope Krümmungsreaktionen waren in IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen mit erhöhter IP₆-Konzentration verstärkt und in *ipk1-1*-Pflanzen mit verringerter IP₆-Konzentration vermindert. Die relative Genexpression IAA-induzierter Gene war in IPK1-OE- und IPK2-OE-Pflanzen erhöht und in *ipk1-1*-Pflanzen verringert. Es konnte somit eine lineare Korrelation zwischen IAA-induzierten Antworten und IP₆-Konzentration der IPP-modulierten Pflanzen belegt werden. In Raupenfraßexperimenten zeigten *ipk1-1*-Pflanzen mit hohen IP₅-Konzentrationen ein erhöhtes und IPK1-OE-Pflanzen mit hohen IP₆-Konzentrationen ein verringertes Verteidigungsvermögen. Die relative Genexpression JA-induzierter Gene war in IPK2-OE- und *ipk1-1*-Pflanzen mit hohen IP₅-Konzentrationen erhöht. Zwischen JA-induzierter Genexpression und IP₅-Konzentrationen der IPP-modulierten Pflanzen konnte ein sigmoidaler Zusammenhang gezeigt werden, welcher auf eine COI1-Rezeptorsättigung mit IP₅ hinweisen könnte. Bei gleichzeitiger IAA- und MeJA-Applikation konnte eine verminderte IAA-Antwort

bei nahezu gleichbleibender JA-Antwort gemessen werden. Die Sensitivität der verschiedenen IPP-modulierten Pflanzen gegenüber verschiedenen IAA- und MeJA-Konzentrationen unterschied sich kaum voneinander. In weiteren Experimenten konnten in *ipk1-1*- und IPK2-OE-Pflanzen erhöhte PI-Gehalte, erhöhte IAA- und JA-Konzentrationen und in *ipk1-1*-Pflanzen zusätzlich erhöhte 12COOH-JA-Ile- und SA-Konzentrationen gegenüber Wildtyppflanzen gemessen werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass IP₅- und IP₆- funktionale Kofaktoren des COI1- und TIR1-Rezeptors sind. IP₅ und IP₆ beeinflussen maßgeblich die IAA- und JA-Antwort in Arabidopsis. Dabei könnten die Kofaktoren in bereits gebildeten Komplexen binden und so dynamisch deren Aktivität beeinflussen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sie direkt einen Einfluss auf die Rezeptorkomplexbildung haben und deren Abundanz regulieren.

6. Anhang

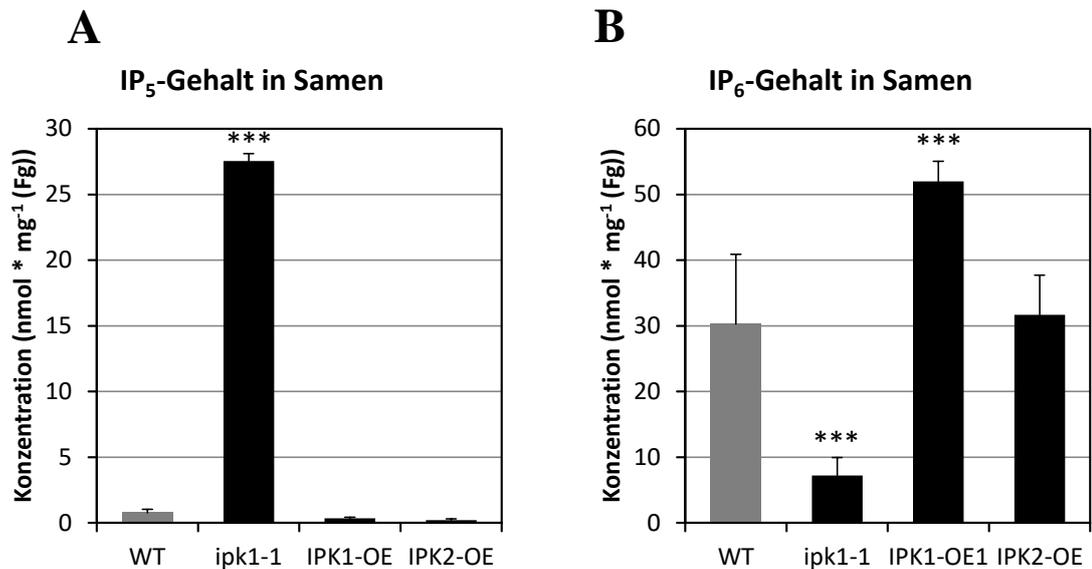


Abbildung 40: IP₅- und IP₆-Konzentration in Arabidopsisssamen

Messung von **A)** IP₅- und **B)** IP₆-Konzentrationen in Arabidopsisssamen. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Standardabweichung). Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

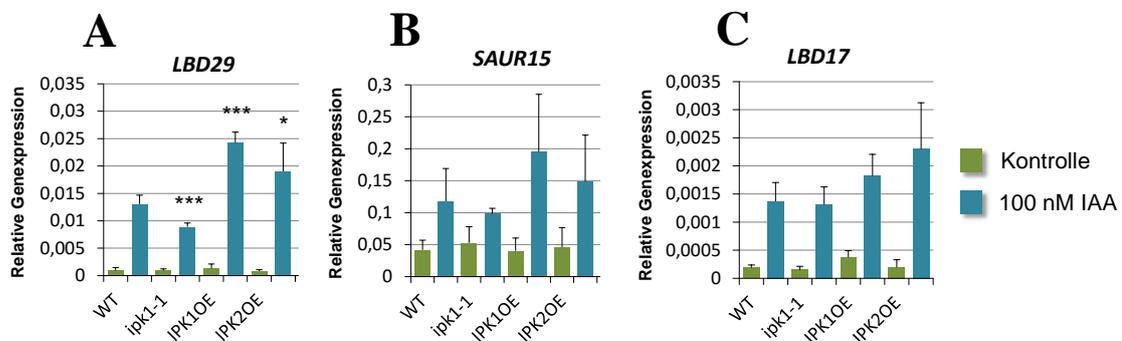


Abbildung 41: IAA-induzierte Genexpression von IAA-induzierbaren Genen

Behandlung der transgenen Linien mit 100 nM IAA (blau) und 0,1 % (v/v) DMSO-Kontrolle (grün). Es ist die relative Genexpression der IAA-induzierbaren Gene **A)** *LBD29*, **B)** *SAUR15* und **C)** *LBD17* dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Standardfehler). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

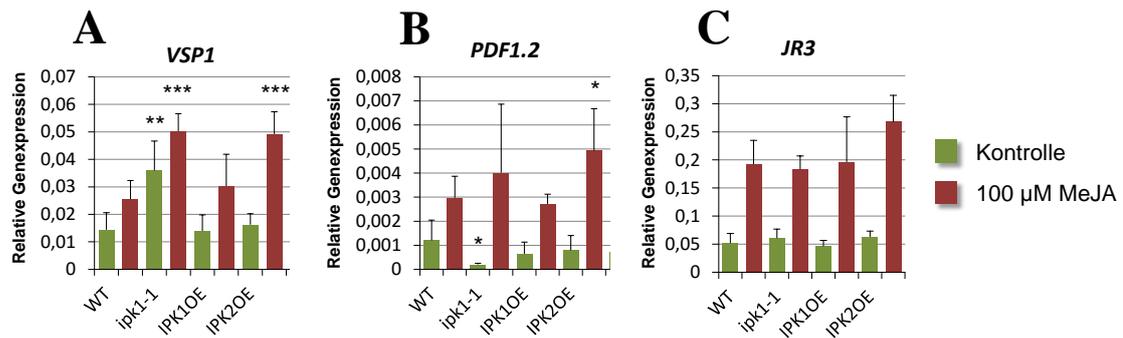


Abbildung 42: Relative Genexpression von JA-induzierbaren Genen nach MeJA-Behandlung

Behandlung der transgenen Linien mit 100 μM MeJA (blau) und 0,1 % (v/v) DMSO-Kontrolle (grün). Es ist die relative Genexpression der JA-induzierbaren Gene **A**) *VSP1*, **B**) *PDF1.2* und **C**) *JR3* dargestellt. Signifikante Unterschiede zur Wildtypkontrolle wurden über einen zweiseitigen Student's T-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Standardfehler). Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

Tabelle 12: Phytohormonmessungen IPP-modulierter Pflanzen

Phytohormon	Col-0	<i>ipk1-1</i>	IPK1-OE	IPK2-OE
SA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,151 ±0,030	1,127 ±0,188	0,130 ±0,034	0,118 ±0,017
ICA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,088 ±0,025	0,431 ±0,209	0,058 ±0,008	0,118 ±0,064
RA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,512 ±1,146	5,589 ±2,592	4,398 ±3,823	2,965 ±2,310
IAA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,009 ±0,009	0,025 ±0,022	0,003 ±0,007	0,268 ±0,250
Camalexin [nmol g ⁻¹ (Fg)]	1,961 ±0,825	0,887 ±0,477	0,620 ±0,441	0,855 ±0,447
JA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,031 ±0,008	0,045 ±0,017	0,029 ±0,009	0,055 ±0,007
11_12OH-JA [relativ]	4,071 ±1,337	7,022 ±2,898	3,422 ±1,719	5,955 ±2,688
OPC4 [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,077 ±0,014	0,030 ±0,028	0,107 ±0,030	0,159 ±0,061
ABA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,039 ±0,010	0,016 ±0,004	0,034 ±0,003	0,039 ±0,008
dinor-oPDA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	3,359 ±1,232	8,268 ±8,678	6,537 ±3,856	8,779 ±4,584
oPDA [nmol g ⁻¹ (Fg)]	6,767 ±0,913	13,405 ±10,607	7,873 ±0,838	9,007 ±2,560
SAG [nmol g ⁻¹ (Fg)]	6,053 ±2,331	362,954 ±54,349	6,173 ±1,026	4,013 ±0,718
12-HSO4-JA [relativ]	0,098 ±0,023	0,147 ±0,038	0,075 ±0,013	0,084 ±0,034
JA-Val [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,001 ±0,001	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,003 ±0,003
JA-IleLeu [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,006 ±0,004	0,001 ±0,001	0,002 ±0,001	0,006 ±0,004
12OH-JA-Ile [relativ]	0,103 ±0,104	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,065 ±0,094

12COOH-JA-Ile [relativ]	0,628 ±0,031	14,505 ±14,213	0,407 ±0,063	0,417 ±0,243
JA-Phe [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,001 ±0,001	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,002 ±0,002
12-O-Gluc-JA [relativ]	3,494 ±1,247	17,496 ±10,202	4,895 ±0,751	6,725 ±3,910
ABA-GE [nmol g ⁻¹ (Fg)]	0,007 ±0,005	0,002 ±0,003	0,005 ±0,002	0,008 ±0,002
Glucobrassicin [nmol g ⁻¹ (Fg)]	47,531 ±7,547	16,326 ±12,185	32,290 ±4,958	40,221 ±16,566
4M- Glucobrassicin [nmol g ⁻¹ (Fg)]	64,526 ±19,845	17,454 ±24,683	41,031 ±4,951	32,949 ±7,895

Literaturverzeichnis

1. **Agranoff BW:** Cyclitol confusion. *Trends Biochem Sci* 1978, **3**:N283 - N285.
2. **Alcazar-Roman AR, Tran EJ, Guo S, Wentz SR:** Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nature cell biology* 2006, **8**(7):711-716.
3. **Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ:** SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 1996, **86**(2):263-274.
4. **Band LR, Wells DM, Larrieu A, Sun J, Middleton AM, French AP, Brunoud G, Sato EM, Wilson MH, Peret B et al:** Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(12):4668-4673.
5. **Berridge MJ:** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993, **361**(6410):315-325.
6. **Berridge MJ:** Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1793**(6):933-940.
7. **Bhandari R, Juluri KR, Resnick AC, Snyder SH:** Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(7):2349-2353.
8. **Bohnert H, Jensen RG:** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol* 1996, **14**:89 - 97.
9. **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976, **72**:248-254.
10. **Brearley CA, Hanke DE:** Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters in the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrrhiza* L. *The Biochemical journal* 1996, **314** (Pt 1):227-233.
11. **Calderon-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M:** Auxin perception--structural insights. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(7):a005546.
12. **Cardozo T, Pagano M:** The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, **5**(9):739-751.
13. **Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR et al:** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 2007, **448**(7154):666-671.
14. **Coley PD, Bryant JP, Chapin FS, 3rd:** Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 1985, **230**(4728):895-899.
15. **Delage E, Puyaubert J, Zachowski A, Ruelland E:** Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol

- 4,5-bisphosphate: convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. *Progress in lipid research* 2013, **52**(1):1-14.
16. **Desai M, Rangarajan P, Donahue JL, Williams SP, Land ES, Mandal MK, Phillipy BQ, Perera IY, Raboy V, Gillaspay GE:** Two inositol hexakisphosphate kinases drive inositol pyrophosphate synthesis in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2014, **80**(4):642-653.
 17. **Deshaies RJ:** SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual review of cell and developmental biology* 1999, **15**:435-467.
 18. **DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H:** Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant physiology* 2001, **126**(2):759-769.
 19. **Dharmasiri S, Dharmasiri N, Hellmann H, Estelle M:** The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis. *The EMBO journal* 2003, **22**(8):1762-1770.
 20. **Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ:** Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 2005, **132**(6):1247-1260.
 21. **Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ, Brueckner M:** Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 2002, **418**(6893):37-38.
 22. **Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD et al:** Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(50):20231-20235.
 23. **Frederick JP, Mattiske D, Wofford JA, Megosh LC, Drake LY, Chiou ST, Hogan BL, York JD:** An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(24):8454-8459.
 24. **Fu X, Harberd NP:** Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 2003, **421**(6924):740-743.
 25. **Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD:** The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(17):11519-11524.
 26. **Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA:** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 1995, **11**(4):355-360.
 27. **Gillaspay GE:** The cellular language of myo-inositol signaling. *The New phytologist* 2011, **192**(4):823-839.
 28. **Gonzales ML, Anderson RA:** Nuclear phosphoinositide kinases and inositol phospholipids. *Journal of cellular biochemistry* 2006, **97**(2):252-260.
 29. **Hamilton JG, Zangerl AR, DeLucia EH, Berenbaum MR:** The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters* 2001, **4**:86-95.

30. **Hayashi K:** The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant & cell physiology* 2012, **53**(6):965-975.
31. **Heilmann I, Perera IY, Gross W, Boss WF:** Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant physiology* 1999, **119**(4):1331-1340.
32. **Heilmann M, Heilmann I:** Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. *Biochimica et biophysica acta* 2015, **1851**(6):759-769.
33. **Hipps PP, Holland WH, Sherman WR:** Identification and measurement of chiro-inositol in the American cockroach, *Periplaneta Americana* L. *Biochemical and biophysical research communications* 1972, **46**(5):1903-1908.
34. **Horbowicz M, Brenac P, Obendorf RL:** Fagopyritol B1, O-alpha-D-galactopyranosyl-(1-->2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 1998, **205**(1):1-11.
35. **Illies C, Gromada J, Fiume R, Leibiger B, Yu J, Juhl K, Yang SN, Barma DK, Falck JR, Saiardi A et al:** Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells. *Science* 2007, **318**(5854):1299-1302.
36. **Irvine RF:** Inositide evolution - towards turtle domination? *The Journal of physiology* 2005, **566**(Pt 2):295-300.
37. **Johnsson N, Varshavsky A:** Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(22):10340-10344.
38. **Kamimura J, Wakui K, Kadowaki H, Watanabe Y, Miyake K, Harada N, Sakamoto M, Kinoshita A, Yoshiura K, Ohta T et al:** The IHPK1 gene is disrupted at the 3p21.31 breakpoint of t(3;9) in a family with type 2 diabetes mellitus. *Journal of human genetics* 2004, **49**(7):360-365.
39. **Keller CP, Stahlberg R, Barkawi LS, Cohen JD:** Long-term inhibition by auxin of leaf blade expansion in bean and *Arabidopsis*. *Plant physiology* 2004, **134**(3):1217-1226.
40. **König S, Hoffmann M, Mosblech A, Heilmann I:** Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer chromatography and gas chromatography. *Analytical biochemistry* 2008, **378**(2):197-201.
41. **König S, Mosblech A, Heilmann I:** Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007, **21**(9):1958-1967.
42. **Koo AJ, Howe GA:** The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 2009, **70**(13-14):1571-1580.
43. **Krinke O, Novotna Z, Valentova O, Martinec J:** Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *Journal of experimental botany* 2007, **58**(3):361-376.

44. **Kuo HF, Chang TY, Chiang SF, Wang WD, Charng YY, Chiou TJ:** Arabidopsis inositol pentakisphosphate 2-kinase, AtIPK1, is required for growth and modulates phosphate homeostasis at the transcriptional level. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2014, **80**(3):503-515.
45. **Laha D, Johnen P, Azevedo C, Dynowski M, Weiss M, Capolicchio S, Mao H, Iven T, Steenbergen M, Freyer M *et al*:** VIH2 Regulates the Synthesis of Inositol Pyrophosphate InsP8 and Jasmonate-Dependent Defenses in Arabidopsis. *The Plant cell* 2015, **27**(4):1082-1097.
46. **Larner J:** D-chiro-inositol--its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *International journal of experimental diabetes research* 2002, **3**(1):47-60.
47. **Larsson O, Barker CJ, Sjöholm A, Carlqvist H, Michell RH, Bertorello A, Nilsson T, Honkanen RE, Mayr GW, Zwiller J *et al*:** Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* 1997, **278**(5337):471-474.
48. **Lee HS, Lee DH, Cho HK, Kim SH, Auh JH, Pai HS:** InsP6-Sensitive Variants of the Gle1 mRNA Export Factor Rescue Growth and Fertility Defects of the ipk1 Low-Phytic-Acid Mutation in Arabidopsis. *The Plant cell* 2015, **27**(2):417-431.
49. **Lee YS, Huang K, Quiocho FA, O'Shea EK:** Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nature chemical biology* 2008, **4**(1):25-32.
50. **Li L, Li C, Lee GI, Howe GA:** Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(9):6416-6421.
51. **Loewus FA, Loewus MW:** *myo*-Inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 1983, **34**:137 - 161.
52. **Loewus FA, Murthy PPN:** *Myo*-inositol metabolism in plants. *Plant Science* 2000, **150**:1 - 19.
53. **Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R:** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant cell* 2004, **16**(7):1938-1950.
54. **Luo HR, Huang YE, Chen JC, Saiardi A, Iijima M, Ye K, Huang Y, Nagata E, Devreotes P, Snyder SH:** Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in Dictyostelium via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P₃ interactions. *Cell* 2003, **114**(5):559-572.
55. **Macbeth MR, Schubert HL, Vandemark AP, Lingam AT, Hill CP, Bass BL:** Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science* 2005, **309**(5740):1534-1539.
56. **McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M:** Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 2003, **114**(1):61-73.
57. **Michell RH:** Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008, **9**(2):151-161.

58. **Michell RH:** Inositol and its derivatives: their evolution and functions. *Advances in enzyme regulation* 2011, **51**(1):84-90.
59. **Mishkind M, Vermeer JE, Darwish E, Munnik T:** Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP accumulation at the plasma membrane and nucleus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2009, **60**(1):10-21.
60. **Morré DJ, Boss WF, A. LF:** Inositol Metabolism in Plants. *Wiley-Liss*, 393 p, New York 1990:393 p.
61. **Mosblech A, König S, Stenzel I, Grzeganeck P, Feussner I, Heilmann I:** Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular plant* 2008, **1**(2):249-261.
62. **Mosblech A, Thurow C, Gatz C, Feussner I, Heilmann I:** Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2011, **65**(6):949-957.
63. **Murthy PP:** Inositol phosphates and their metabolism in plants. *Sub-cellular biochemistry* 1996, **26**:227-255.
64. **Nakazato H, Okamoto T, Nishikoori M, Washio K, Morita N, Haraguchi K, Thompson GA, Jr., Okuyama H:** The glycosylphosphatidylinositol-anchored phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* is a purple acid phosphatase. *Plant physiology* 1998, **118**(3):1015-1020.
65. **Obendorf RL:** Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation. *Seed Sci Res* 1997, **7**:63 - 74.
66. **Odom AR, Stahlberg A, Wentz SR, York JD:** A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 2000, **287**(5460):2026-2029.
67. **Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T:** Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(6):a001537.
68. **Perera IY, Heilmann I, Boss WF:** Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(10):5838-5843.
69. **Perera IY, Heilmann I, Chang SC, Boss WF, Kaufman PB:** A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant physiology* 2001, **125**(3):1499-1507.
70. **Perera IY, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss WF:** A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. *Plant physiology* 2006, **140**(2):746-760.
71. **Peterbauer T, Puschenreiter M, Richter A:** Metabolism of galactosylononitol in seeds of *Vigna umbellata*. *Plant Cell Physiol* 1998, **39**:334 - 341.
72. **Qin ZX, Chen QJ, Tong Z, Wang XC:** The *Arabidopsis* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase, AtItpk-1, is involved in plant photomorphogenesis under red light conditions, possibly via interaction with COP9 signalosome. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 2005, **43**(10-11):947-954.

73. **Raboy V, Young KA, Dorsch JA, Cook A:** Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal of Plant Physiology* 2001, **158**(4):489-497.
74. **Raya A, Izipisua Belmonte JC:** Unveiling the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Mechanisms of development* 2004, **121**(9):1043-1054.
75. **Redman AM, Cipollini Jr. DF, Schultz JC:** Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 2001, **126**:380-385.
76. **Saiardi A, Resnick AC, Snowman AM, Wendland B, Snyder SH:** Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(6):1911-1914.
77. **Saiardi A, Sciambi C, McCaffery JM, Wendland B, Snyder SH:** Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(22):14206-14211.
78. **Santner A, Calderon-Villalobos LI, Estelle M:** Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* 2009, **5**(5):301-307.
79. **Scarpella E, Barkoulas M, Tsiantis M:** Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(1):a001511.
80. **Schwechheimer C, Calderon Villalobos LI:** Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. *Current opinion in plant biology* 2004, **7**(6):677-686.
81. **Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J et al:** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 2010, **468**(7322):400-405.
82. **Shen X, Xiao H, Ranallo R, Wu WH, Wu C:** Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* 2003, **299**(5603):112-114.
83. **Slovin JP, Bandurski RS, Cohen JD:** Control of hormone synthesis and metabolism. *P J J Hooykaas (Ed) Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, Elsevier, Amsterdam* 1999, **Chapter 5. Auxins**:115 - 141.
84. **Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S:** A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(9):5187-5192.
85. **Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Went SR, O'Shea EK:** Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 2003, **299**(5603):114-116.
86. **Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou ST, Frye RA, York JD:** Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(35):12612-12617.

87. **Stevenson-Paulik J, Odom AR, York JD:** Molecular and biochemical characterization of two plant inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinases. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(45):42711-42718.
88. **Streeter JG:** Carbohydrates in Soybean Nodules: II. DISTRIBUTION OF COMPOUNDS IN SEEDLINGS DURING THE ONSET OF NITROGEN FIXATION. *Plant physiology* 1980, **66**(3):471-476.
89. **Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C:** PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS genetics* 2012, **8**(3):e1002594.
90. **Sun Y, Wilson MP, Majerus PW:** Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(48):45759-45764.
91. **Sweetman D, Johnson S, Caddick SE, Hanke DE, Brearley CA:** Characterization of an Arabidopsis inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (AtIPK1). *The Biochemical journal* 2006, **394**(Pt 1):95-103.
92. **Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N:** Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007, **446**(7136):640-645.
93. **Tan X, Zheng N:** Hormone signaling through protein destruction: a lesson from plants. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2009, **296**(2):E223-227.
94. **Tao LZ, Cheung AY, Nibau C, Wu HM:** RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *The Plant cell* 2005, **17**(8):2369-2383.
95. **Tsui MM, York JD:** Roles of inositol phosphates and inositol pyrophosphates in development, cell signaling and nuclear processes. *Advances in enzyme regulation* 2010, **50**(1):324-337.
96. **van Leeuwen W, Vermeer JE, Gadella TW, Jr., Munnik T:** Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2007, **52**(6):1014-1026.
97. **Verbsky J, Lavine K, Majerus PW:** Disruption of the mouse inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene, associated lethality, and tissue distribution of 2-kinase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(24):8448-8453.
98. **Verbsky J, Majerus PW:** Increased levels of inositol hexakisphosphate (InsP6) protect HEK293 cells from tumor necrosis factor (alpha)- and Fas-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(32):29263-29268.
99. **Withers J, Yao J, Mecey C, Howe GA, Melotto M, He SY:** Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(49):20148-20153.
100. **Xia HJ, Brearley C, Elge S, Kaplan B, Fromm H, Mueller-Roeber B:** Arabidopsis inositol polyphosphate 6-/3-kinase is a nuclear protein that

- complements a yeast mutant lacking a functional ArgR-Mcm1 transcription complex. *The Plant cell* 2003, **15**(2):449-463.
101. **Xu J, Brearley CA, Lin WH, Wang Y, Ye R, Mueller-Roeber B, Xu ZH, Xue HW:** A role of Arabidopsis inositol polyphosphate kinase, AtIPK2alpha, in pollen germination and root growth. *Plant physiology* 2005, **137**(1):94-103.
102. **Yang DL, Yao J, Mei CS, Tong XH, Zeng LJ, Li Q, Xiao LT, Sun TP, Li J, Deng XW et al:** Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(19):E1192-1200.
103. **York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB, Went SR:** A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 1999, **285**(5424):96-100.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich natürlich recht herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Heilmann bedanken. Ohne seinen großen Einsatz und sein Engagement hinsichtlich der Finanzierung und Realisierung des Projekts wäre diese Doktorarbeit nicht entstanden. Die zahlreichen Diskussionen und Ideen zur Umsetzung von Experimenten und zur Bearbeitung von Fragestellungen haben mir sehr weitergeholfen. Er hatte immer ein offenes Ohr und ich fühlte mich in seiner Obhut sehr gut aufgehoben. Vielen lieben Dank Ingo.

Ein großes Dankeschön gilt auch unseren Kooperationspartnern Dr. Luz Irina A. Calderon Villalobos, Dr. Axel Mithöfer und Prof. Dr. Ivo Feussner, mit deren Hilfe wir einige spannende Experimente durchführen und Ideen für das Projekt austauschen konnten.

Ich möchte mich auch recht herzlich bei meiner Mentorin Prof. Dr. Sabine Rosahl bedanken. Die vielen interessanten Gespräche und Ideen für Experimente haben mir sehr geholfen und mich unterstützt. Vielen Dank dafür.

Ein großer Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Einzelförderung des Projekts und dem Sonderforschungsbereich 648 (SFB648) für die Finanzierung des Projekts B13 und die vielen interessanten Soft-Skill-Kurse, die im Rahmen des Doktorandenprogramms angeboten wurden.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern des SFB648 für die vielen interessanten Diskussionen bei Workshops und Vorträgen bedanken.

Für das zur Verfügung stellen des *ipk1-1*-Saatguts möchte ich mich bei Dr. John York bedanken.

Ein sehr großes Dankeschön gilt auch Mareike Heilmann für ihre große Hilfe und Unterstützung im Labor. Sie hat mir immer bei den vielen kleinen und großen Fragen des Laboralltags weitergeholfen und durch ihre vielen Konstrukte oft die Arbeit erleichtert. Vielen lieben Dank.

Ein riesengroßer Dank gilt natürlich auch unserer Arbeitsgruppe, die durch ihre lockere Art und ihren großen Zusammenhalt auch die anstrengenden Tage immer aufgelockert hat. Also vielen lieben Dank auch an Katharina, Feng, Willy, Teresa, Irene, Marion, Johanna und die ehemaligen Doktoranden Lars, Franzi und Jenny.

Ich möchte mich auch recht herzlich bei meinen Forschungsgruppenpraktikanten und Bachelorstudenten Christin Münch, Lena Munzel und Chris-Oliver Schulze bedanken, die mich bei verschiedenen Experimenten tatkräftig unterstützt haben.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Jenny, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der dreieinhalb Jahre immer unterstützt haben. Sie haben mir auch in den schwierigen Phasen weitergeholfen und mich sehr oft motiviert.

Lebenslauf

Tobias Heinz

Geburtsdatum: 04.05.1984
Geburtsort: Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1990 – 1993 Grundsschule „Hanns Eisler“ in Halle (Saale)
1993 – 2003 Trotha Gymnasium „Hanns Eisler“ in Halle (Saale)

Zivildienst

08/2003 – 06/2004 Universitätsklinikum Halle (Saale)

Studium

2004 – 2005 Bioinformatik Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2005 – 2011 Biochemie Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit in der Abteilung Allgemeine Mikrobiologie bei Prof. Dr. Gary Sawers mit dem Titel:
Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines FNR-ähnlichen Proteins aus *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*
2012 – aktuell Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Zelluläre Biochemie bei Prof. Dr. Ingo Heilmann

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift