

Funktionelle Analyse von *glucosinolate content and composition* Mutanten *gcc8/SULTR1;2* und *gcc7/IQD1*

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Jakob Quegwer

geb. am 07.07.1987 in Görlitz

Gutachter:

Prof. Dr. Steffen Abel

Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale

Prof. Dr. Edgar Peiter

Matin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

PD Dr. Tamara Gigolashvili

Universität zu Köln

Verteidigung am 01.04.2022 in Halle/Saale

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
Teil I – Allgemeine Einleitung	1
1 Bedeutung von Schwefel als Pflanzennährstoff	1
2 Sulfataufnahme und -metabolismus	2
3 Regulierung von Nährstoffaufnahme und Stoffwechsel bei Sulfatmangel	5
4 Biosynthese und Funktion von Glukosinolaten	7
5 Screen für <i>glucosinolate content and composition (gcc)</i> -Mutanten	12
Teil II – SULTR1;2 (<i>gcc8</i>)	15
1 Einleitung	15
1.1 Kartierung von <i>gcc8 - SULTR1;2</i>	15
1.2 SULTR1;2 als Transzeptor in <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.3 Zielstellung	20
2 Ergebnisse	21
2.1 Einfluss von Selenatstress auf Wurzelwachstum	21
2.2 Glukosinolatgehalt und Allelismustest	23
2.3 Glukosinolatgehalt in <i>sultr1;2</i> -Mutanten bei unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit	25
2.4 Expression von Sulfatmangelmarkergenen in <i>gcc8</i>	27
2.5 Gehalt von Aminosäuren und OAS in Col-0 und <i>gcc8</i> bei unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit	29
2.6 Einfluss verschiedener Sulfattransporter auf Glukosinolatgehalt	31
2.7 Generierung und Analyse von verschiedenen Varianten und Allelen von SULTR1;2	33
2.8 Komplementierung von <i>gcc8</i> mit <i>SULTR1;2-GFP</i> -Konstrukten	35
2.9 Glukosinolatgehalt in <i>gcc8</i> -Komplementationslinien	36
3 Diskussion	39
3.1 Auswirkungen von <i>gcc8</i> auf den Sulfattransport	39
3.2 Auswirkungen von <i>gcc8</i> auf Glukosinolat- und Sulfatmetabolismus	40
3.3 Die potenzielle Funktion von SULTR1;2 als Transzeptor	41
3.4 Ausblick	45

Teil III – IQD1 (<i>gcc7</i>)	49
1 Einleitung.....	49
1.1 Die IQ67-Domänen-Familie	49
1.2 Calmodulin und die Ca ²⁺ -Signalkette in <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
1.3 KLCR-Proteine	54
1.4 WRKY-Transkriptionsfaktoren.....	54
1.5 Zielstellung	55
2 Ergebnisse.....	56
2.1 Generierung von <i>IQD1</i> -Überexpressionslinien	56
2.2 Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von <i>IQD1</i>	57
2.3 Vergleichende Analysen von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Missexpressionslinien.....	59
2.4 Glukosinolatgehalt von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Missexpressionslinien	63
2.5 Rolle von <i>IQD1</i> in Phytohormon-vermittelter Pflanzenabwehr und	66
Verwundungsantwort	66
2.6 Expression von <i>IQD1</i> -verwandten Genen nach Verwundung	68
2.7 Interaktion von KLCR-Proteinen mit <i>IQD1</i> und <i>WRKY21</i> in Hefe	69
2.8 Subzelluläre Lokalisation von <i>WRKY21</i> und <i>KLCR2</i> in Abhängigkeit von <i>IQD1</i> ..	71
2.9 Interaktion von <i>WRKY21</i> , <i>KLCR2</i> , <i>CaM2</i> und <i>IQD1 in planta</i>	74
2.10 Transaktivierung von <i>pCYP83B1</i> über <i>WRKY21</i>	75
2.11 Expression von <i>CYP83B1</i> in verschiedenen Mutantenlinien	78
2.12 Mutation der CaM-Bindedomäne von <i>WRKY21</i>	79
2.13 Subzelluläre Lokalisation von <i>WRKY21</i> -Varianten.....	81
2.14 Interaktion von <i>WRKY21</i> -Varianten mit <i>CaM2 in planta</i>	83
2.15 Generierung von Multigenvektoren für <i>pCYP83B1</i> Transaktivierungsexperimente	84
mit <i>WRKY21</i> -Varianten, <i>KLCR2</i> , <i>CaM2</i> und <i>IQD1</i>	84
3 Diskussion	87
3.1 Charakterisierung von <i>gcc7</i> und <i>IQD1</i> -Missexpressionslinien.....	87
3.2 Einfluss von <i>IQD1</i> -Missexpression auf Glukosinolatchemotyp und	88
Pflanzenabwehr	88
3.3 Die Rolle von <i>IQD1</i> im Zellkern und im Komplex mit <i>KLCR2</i> und <i>WRKY21</i>	89
3.4 Einfluss der Ca ²⁺ -Signalkette auf GSL-Biosynthesegen <i>CYP83B1</i>	91
Teil IV	94
1 Material.....	94
1.1 Medien.....	94
1.2 Mangel- und Überschussmedien	95
1.3 Pflanzenlinien	96
1.4 Bakterienstämme.....	96
1.5 Oligonukleotide.....	97
1.6 Vektoren	103

1.7	Puffer und Lösungen	104
1.8	Kits und Enzyme.....	105
2	Methoden.....	106
2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
2.1.1	Sterilisierung der Samen.....	106
2.1.2	Anzucht unter sterilen Bedingungen	106
2.1.3	Anzucht auf Erde	106
2.2	Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i>	106
2.3	Kultivierung von Bakterien	107
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	107
2.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	107
2.4	DNA-Isolierung	107
2.5	RNA Isolierung und cDNA Synthese.....	107
2.5.1	RNA Isolierung	107
2.5.2	DNase-Verdau.....	108
2.5.3	cDNA Synthese	108
2.6	Polymerase Kettenreaktionen	109
2.6.1	Standard-PCR	109
2.6.2	<i>Site directed mutagenesis</i> (SDM)	110
2.6.3	Quantitative <i>real time</i> (qRT) PCR	110
2.6.4	Etablierung qRT-PCR Oligonukleotide.....	111
2.7	Gelelektrophorese	111
2.8	Gelextraktion	112
2.9	Sequenzierung	112
2.10	Klonierung	112
2.10.1	<i>Gateway</i> Klonierung	112
2.10.2	Klonierung von DNA-Fragmenten in den pENTRY-Vektor	112
2.10.3	Klonierung von DNA-Fragmenten in den pDONOR-Vektor – BP-Reaktion	113
2.10.4	Mobilisierung von DNA-Fragmenten in Destinationsvektoren – LR-Reaktion.....	113
2.11	<i>Golden-Gate</i> -Klonierung	114
2.12	Transformation von Bakterien	114
2.12.1	Chemisch-kompetente <i>Escherichia coli</i>	114
2.12.2	Chemisch-kompetente <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	115
2.12.3	Elektrisch-kompetente <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	115
2.13	Hefe-2-Hybrid Analysen.....	115
2.13.1	Erzeugung kompetenter Hefezellen.....	115

2.13.2	Transformation von kompetenten Hefezellen.....	115
2.13.3	Interaktionsexperimente.....	116
2.14	Transformation von Pflanzen.....	116
2.14.1	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	116
2.14.2	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	116
2.15	Genotypisierung.....	117
2.15.1	Identifikation von T-DNA-Insertionen.....	117
2.15.2	CAPS.....	117
2.16	Kreuzung der Pflanzen.....	117
2.17	Histochemische GUS-Analyse in Pflanzen.....	117
2.18	GUS-Assay.....	118
2.19	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford).....	119
2.20	Plasmid Isolierung aus <i>E. coli</i>	119
2.21	Verifizierung von Plasmiden.....	119
2.22	Messung der Wurzellänge.....	119
2.23	Glukosinolatmessungen.....	120
2.24	Phytohormonmessungen.....	121
3	Quellenverzeichnis.....	123
4	Anhang.....	140
5	Danksagung.....	154
6	Lebenslauf.....	155
7	Eidesstattliche Erklärung.....	157

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Schwefelassimilation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Abb. 2: Schema der Glukosinolatbiosynthese in <i>A. thaliana</i> für indolische und aliphatische GSL	8
Abb. 3: Schema des Glukosinolat-Myrosinase-Systems („Senfölbombe“)	10
Abb. 4: Funktionsweise des Screens für <i>gcc</i> -Mutanten	13
Abb. 5: Kartierung und Modell von <i>SULTR1;2</i> im Genom von <i>A. thaliana</i>	16
Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise von Kanälen, Transportern, Rezeptoren und Transzeptoren	17
Abb. 7: Wurzellänge von <i>sultr1;2</i> -Mutantenlinien bei Selenatstress und Sulfatmangel	22
Abb. 8: Allelismustest mit den in der Arbeit verwendeten <i>sultr1;2</i> -Allelen (<i>gcc8</i> , <i>sel1-15</i> und <i>sel1-16</i>)	24
Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve von Glukosinolatgehalt in Wildtyp und <i>sultr1;2</i> -Mutantenlinien bei unterschiedlichen Sulfatgehalt im Medium	25
Abb. 10: Transkriptanalyse von Sulfatmangelmarkergenen <i>BGLU28</i> und <i>SDI1</i> in Wildtyp und <i>gcc8</i> bei unterschiedlichem Sulfatgehalt im Medium.....	28
Abb. 11: Gehalt von Cystein, Methionin und OAS in Col-0 und <i>gcc8</i> bei unterschiedlichem Sulfatgehalt im Medium	30
Abb. 12: Genmodelle von <i>SULTR1;1</i> und <i>SULTR1;3</i> und Position der T-DNA-Insertionen ..	31
Abb. 13: Glukosinolatgehalt von Col-0 und <i>sultr1</i> -Mutantenlinien	32
Abb. 14: Generierte und verwendete <i>SULTR1;2</i> -Varianten und -Allele.....	34
Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von <i>SULTR1;2</i> -Varianten mit C-terminaler GFP-Fusion in <i>A. thaliana</i> zur Komplementation von <i>gcc8</i>	35
Abb. 16: Glukosinolatgehalt von Col-0, <i>gcc8</i> und Komplementationlinien.....	38
Abb. 17: Entkopplung von Transport- und Signalfunktion bei Sulfattranszeptoren <i>SUL1</i> und <i>SUL2</i> in <i>S. cerevisiae</i>	44
Abb. 18: Funktionelle Analyse von <i>SULTR1;2</i> in <i>S. cerevisiae</i>	46
Abb. 19: Funktionelle Analyse der STAS-Domäne in <i>SULTR1;1</i> und <i>SULTR1;2</i>	48
Abb. 20: Transkriptanalyse von <i>IQD1</i> in Wildtyp und Mutantenlinien	56
Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von <i>IQD1</i> mit N- bzw. C-terminaler GFP-Fusion in	58
Abb. 22: Genmodell von <i>IQD1</i> und <i>RH57</i> und Position der verwendeten T-DNA-Insertionslinien	59
Abb. 23: Transkriptanalyse von <i>RH57</i> in Wildtyp und Mutantenlinien	60
Abb. 24: Semi-quantitative RT-PCR von <i>RH57</i> in Wildtyp und Mutantenlinien	60
Abb. 25: Wurzelphänotypen von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Mutantenlinien	62
Abb. 26: Glukosinolatgehalt von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Missexpressionslinien	64
Abb. 27: Glukosinolatgehalt von <i>IQD1</i> -Missexpressionslinien	65

Abb. 28: <i>IQD1</i> -Promotoraktivität in Keimlingen nach MeJA-Behandlung	66
Abb. 29: <i>IQD1</i> -Expression in Col-0 nach Verwundung oder Behandlung mit MeJA oder Wasser	67
Abb. 30: Promotoraktivität von <i>IQD1 – 4</i> nach Verwundung	69
Abb. 31: Interaktionsstudien via Hefe-2-Hybrid Analyse für KLCR-Proteine	71
Abb. 32: Subzelluläre Lokalisation von YFP-WRKY21 und RFP-KLCR2 in Abhängigkeit von <i>IQD1</i> in <i>N. benthamiana</i>	73
Abb. 33: WRKY21-Interaktionsstudie in <i>N. benthamiana</i> via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	75
Abb. 34: Transaktivierungsstudie für <i>pCYP83B1</i> mit WRKY21 und KLCR2 via β -Glucuronidase (GUS) Färbereaktion	76
Abb. 35: Transaktivierungsstudie für <i>pCYP83B1</i> mit WRKY21 und KLCR2 via β -Glucuronidase (GUS) Assay	77
Abb. 36: Transkriptanalyse von <i>CYP83B1</i> in Wildtyp- und Mutantenlinien.....	78
Abb. 37: Mutationen der CaMBD von WRKY21	79
Abb. 38: Aminosäureaustausch der WRKY21 Varianten in der Helix der CaMBD	81
Abb. 39: Subzelluläre Lokalisation von GFP-WRKY21-Varianten und RFP-CaM im Zellkern in <i>N. benthamiana</i>	82
Abb. 40: CaM2-WRKY21-Interaktionsstudie in <i>N. benthamiana</i> via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	83
Abb. 41: Schema für die Generierung von Multigenvektoren durch das Golden-Gate-Klonierungssystem.....	86
Abb. 42: Modell für mögliche regulatorische Funktion des WRKY21-KLCR2-IQD1-Komplexes für die <i>CYP83B1</i> -Expression.....	93

Abb. A 1: Aminosäuresequenzhomogenität zwischen Sulfattransportern in <i>A. thaliana</i> und <i>S. cerevisiae</i> sowie SULTR-STAS-Domänen	140
Abb. A 2: Subzelluläre Lokalisation von SULTR1;2-Varianten mit C- bzw. N-terminaler Fluoreszenzmarkierung in <i>N. benthamiana</i>	141
Abb. A 3: Transkriptanalyse von <i>IQD1</i> in Wildtyp, <i>gcc7</i> und <i>p35S:IQD1</i> -Linien	142
Abb. A 4: Schotenphänotypen von <i>IQD1</i> -Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp	143
Abb. A 5: Glukosinolatgehalt von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Missexpressionslinien auf Erde.....	144
Abb. A 6: Glukosinolatgehalt von <i>IQD1</i> - und <i>RH57</i> -Missexpressionslinien nach Jasmonatbehandlung	145
Abb. A 7: Phytohormongehalt von Col-0 und <i>gcc7</i> nach Verwundung	146
Abb. A 8: Promotoraktivität von <i>IQD1</i> und <i>IQD3</i> nach Verwundung.....	147
Abb. A 9: Interaktionsstudien via Hefe-2-Hybrid Analyse für WRKY-Proteine	148
Abb. A 10: Expressionsdomänen von <i>IQD 1-4</i> und <i>KLCR 1-3</i> in adulten Pflanzen	149
Abb. A 11: Expressionspotenzial für <i>IQD</i> und <i>KLCR</i> während der Pflanzenentwicklung.....	150
Abb. A 12: Expressionsmuster von <i>IQD1</i> und <i>KLCR</i> während der Pflanzenentwicklung.....	151
Abb. A 13: Expressionspotenzial für <i>WRKY21</i> , <i>IQD1</i> , <i>CYP83B1</i> , <i>KLCR2</i> und <i>CaM2</i> während der Pflanzenentwicklung.....	152
Abb. A 14: Expressionsmuster von <i>WRKY21</i> , <i>IQD1</i> , <i>CYP83B1</i> , <i>KLCR2</i> und <i>CaM2</i> während.. der Pflanzenentwicklung.....	153

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien	94
Tab. 2: Konzentration von Basta und Antibiotika in Selektionsmedien.....	95
Tab. 3: Kombination von MgSO ₄ und MgCl ₂ in Medien für Sulfat-Dosis-Wirkungsbeziehung	95
Tab. 4: Liste der verwendeten <i>A. thaliana</i> Mutantenlinien.....	96
Tab. 5: Liste der verwendeten Bakterienstämme.....	96
Tab. 6: Oligonukleotide für Amplifizierung	97
Tab. 7: Oligonukleotide für Expressionsanalysen	98
Tab. 8: Oligonukleotide für semi-qRT-PCR.....	99
Tab. 9: Oligonukleotide für Genotypisierung.....	100
Tab. 10: Oligonukleotide für CAPS-Genotypisierung	101
Tab. 11: Oligonukleotide für SDM.....	101
Tab. 12: Oligonukleotide für Vektorsequenzierung	102
Tab. 13: Liste der verwendeten Vektoren	103
Tab. 14: MS-Parameter der MRM-Transition für GSL-Messung	121

Abkürzungen

1MOI3M	1-methoxyindole-3-ylmethyl
3MSOP	3-methylsulfinylpropyl
3MTP	3-methylthiopropyl
4MOI3M	4-methoxyindole-3-ylmethyl
4MSOB	4-methylsulfinylbutyl
4MTB	4-methylthiobutyl
4OHI3M	4-hydroxyindol-3-ylmethyl
5MSOP	5-methylsulfinylpentyl
5MTP	5-methylthiopentyl
6MSOH	6-methylsulfinylhexyl
6MTH	6-methylthiohexyl
7MSOH	7-methylsulfinylheptyl
7MTH	7-methylthioheptyl
8MSOO	8-methylsulfinyloctyl
8MTO	8-methylthiooctyl
ABA	Abscisinsäure
ACC	Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
ADP	Adenosindiphosphat
APK	APS Kinase
APR	APS Reduktase
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	ATP Sulfurylase
ATS	<i>Arabidopsis thaliana</i> solution
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCAT	<i>Branched-Chain amino acid Aminotransferase</i>
BGLU	β -Glucosidase-Protein
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
Ca ²⁺	Kalziumion
CaM	Calmodulin
CaMBD	CaM-Bindedomäne
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CML	<i>CaM-like</i> Protein
CMU	<i>Cellulose-Microtubule Uncoupling</i> Protein
CNGC	<i>cyclic nucleotid gated channels</i>
Col-0	Columbia-0 Ökotyp
CSC	Zellulose-Synthase-Komplex (<i>cellulose synthase complex</i>)
CYP	Cytochrom P450-Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ESP	<i>Epithiospecifier</i> -Protein
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FG	Frischgewicht
Gap1	<i>General amino acid permease 1</i>
<i>gcc</i>	<i>Glucosinolate Content and Composition</i>
GSH	Glutathion
GSL	Glukosinolate
GST	<i>Gluthatione-S-Transferase</i>

Abkürzungen

GUS	β-Glucuronidase
I3M	Indole-3-ylmethyl
IAA	Indol-3-Essigsäure
IPM1	<i>Isopropylmalate Isomerase 1</i>
IPMDH	<i>Isopropylmalate Dehydrogenase</i>
IQD	<i>IQ67 Domain Protein</i>
JA	Jasmonat
JA-Ile	Jasmonat-Isoleucin
KHC	<i>Kinesin-1 Heavy Chain Protein</i>
KLC	<i>Kinesin Light Chain Protein</i>
KLCR	<i>Kinesin Light Chain Related Protein</i>
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Ler-0	Landsberg-0 Ökotyp
LSU1	<i>Response to Low Sulfur 1</i>
MAM	<i>Methylthioalkylmalate synthase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MRM	Multireaktions-Monitoring-Modus
MS	Massenspektrometrie
MT	Mikrotubuli
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NQO1	<i>NAD(P)H:-Quinone Oxidoreductase-1</i>
NRT	<i>Nitrate Transceptor</i>
OAS	O-Acetyserin
OAS-TL	OAS Thiolyase
OPDA	12-oxo-Phytodienonsäure
<i>pad2-1</i>	<i>Phytoalexin-Deficient mutant 2-1</i>
PAPS	3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEN2	Penetration2
PHO84	<i>Phosphate transporter 84</i>
PKA	Proteinkinase A
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RH57	<i>RNA Helicase 57</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
S	Sulfat
S ⁻²	Sulfid
SAT	Serin Acetyltransferase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SiR	Sulfit Reduktase
SDI1	<i>Sulfate Deficiency Induced 1</i>
SDM	<i>Site directed mutagenesis</i>
Sel	Selenat
<i>sel1</i>	<i>Selenate Resistant 1-Mutante</i>
SLIM1	<i>Sulfur Limitation 1</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SOT	Sulfotransferase
STAS	<i>Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist</i>
SUL	<i>Sulfate transporter-Protein</i>

SULTR	Sulfate Transporter
SUR1	<i>S-alkyl-thiohydroximate lyase 1</i>
S-Zellen	<i>sulfur-rich cells</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TGG	<i>Thioglucoside glucohydrolase</i>
TMD	Transmembrandomäne
TPR	Tetra-Tricopeptid-Wiederholungen
UGT	<i>UDP-Glycosyltransferase superfamily</i> Protein
Ws-0	Wassilewskaija-0 Ökotyp
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Glukosinolate (GSL) sind schwefelhaltige spezialisierte Pflanzeninhaltsstoffe und spielen bei der Schädlingsabwehr eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer antikarzinogenen Wirkung sind sie darüber hinaus für die menschliche Ernährung von Bedeutung. GSL werden in spezifischen Zellen und Zellkompartimenten getrennt von Myrosinase gespeichert. Myrosinase können GSL hydrolysieren, was zur Bildung von vielfältigen bioaktiven Verbindungen führt. Einige Verbindungen schädigen bei einer Attacke die Fraßfeinde direkt, andere können als Signalstoff für Nützlinge dienen. In *Arabidopsis thaliana* ist die GSL-Biosynthese gut untersucht und eignet sich so als Modell, um die Regulierung des spezialisierten Stoffwechsels in Pflanzen zu analysieren. Um neue Regulatoren der GSL-Biosynthese zu identifizieren, wurden in einem Screen aus verschiedenen Mutantenpopulationen mehrere Linien mit verändertem GSL-Gehalt isoliert. Diese Studie konzentriert sich auf die genauere funktionelle Analyse der Mutantenlinien *Glucosinolate Content and Composition 7* (*gcc7*) und *gcc8*.

Eine Punktmutation in *gcc8* führt zu einem vorzeitigen Stopkodon in *SULTR1;2* (At1g78000) und zum Funktionsverlust des primären Sulfattransporters *SULTR1;2*. Sulfat ist die wichtigste Schwefelquelle für Pflanzen und wird über die Wurzel aufgenommen. Als Bestandteil unter anderem von Cystein und Methionin ist der Makronährstoff Schwefel essenziell für das Pflanzenwachstum. Die Reduktion des aufgenommenen Sulfats ist energieaufwendig, daher ist es für Pflanzen von großer Bedeutung die Sulfataufnahme und der interne Schwefelgehalt zu regulieren. Ein Schwefelsensor in Pflanzen ist bisher nicht bekannt, allerdings wurde für *SULTR1;2* in der Vergangenheit eine Funktion als Transzeptor vermutet und diskutiert.

Mithilfe des neuen *SULTR1;2*-Allels *gcc8* wurde in dieser Arbeit die Funktion von *SULTR1;2* für den GSL- und Sulfatmetabolismus untersucht. Von allen getesteten Sulfattransportern hatte *SULTR1;2* den größten Einfluss auf den GSL-Gehalt in *A. thaliana*. Die internen Konzentrationen von Cystein, Methionin und OAS waren im Vergleich zum Wildtyp (WT) nicht verändert. Analog zu Schwefeltranszeptoren in *Saccharomyces cerevisiae* wurden mehrere *SULTR1;2*-Varianten mit verschiedenen Einzelnukleotidaustauschen generiert, welche potenziell die Transport- und Signalfunktion entkoppeln. Die *SULTR1;2*-Varianten zeigten unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen und Effekte auf den GSL-Gehalt *in planta*. Weitere Experimente können dazu dienen, mit den Varianten im heterologen Hefesystem die Signalfunktion unabhängig vom Transport zu analysieren. So kann untersucht werden, wie eine mögliche *SULTR1;2*-Funktion als Schwefelsensor die Regulierung der GSL-Biosynthese als spezialisierter Metabolismus beeinflusst.

Die *gcc7*-Mutante enthält eine *activation tagged* T-DNA-Insertion, welche zur Überexpression von *IQD67 Domain 1* (*IQD1*) (At3g09710) führt. Die pflanzenspezifische IQD-Proteinfamilie zeichnet sich durch eine konservierte, 67 Aminosäure (AS) lange Domäne mit mehreren überlappenden Calmodulin (CaM)-bindenden Motiven aus. CaM binden Ca^{2+} , einen der wichtigsten sekundären Botenstoffe in Eukaryoten, und übersetzen Ca^{2+} -Signale in zelluläre Antworten. Mit 33 Mitgliedern bilden IQD-Proteine eine der größten bekannten CaM-bindenden Proteinfamilie in Pflanzen und spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Ca^{2+} -Signalkette. Wie viele IQD-Proteine ist *IQD1* an Mikrotubuli (MT) und im Zellkern lokalisiert. Bisher wurden IQD-Funktionen vor allem bei der Koordination von Zell- und Pflanzenwachstum in Verbindung mit dem Zytoskelett beschrieben. In dieser Arbeit wurde erstmals die Funktion von *IQD1* im Zellkern und für die Genexpression untersucht. Die neu generierten *IQD1*-Missexpressionslinien wiesen keinen veränderten GSL- oder Phytohormongehalt auf. Für eine Rolle von *IQD1* in der Pflanzenabwehr sprach allerdings die lokale Promotorinduktion nach Verwundung. In Interaktionsstudien wurde gezeigt, dass *IQD1* zusammen mit *CaM2*, *KLCR2* und *WRKY21* einen Komplex im Zellkern bilden kann. Mithilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) wurde demonstriert, dass die subzelluläre Lokalisation des Komplexes von der Anwesenheit der einzelnen Proteine beeinflusst wird. *WRKY21* besitzt eine CaM-Bindedomäne (CaMBD) und reguliert die

Genexpression des GSL-Biosynthesegens *CYP83B1*. Transaktivierungsexperimente zeigten, dass KLCR2 die Funktion von WRKY21 beeinflusst. Um die Funktion des IQD1-KLCR2-WRKY21-CaM2-Komplexes für die Genexpression genauer untersuchen zu können, wurden Multigenvektoren mit verschiedenen Kombinationen der Proteine generiert. Die Generierung von WRKY21-CaMBD-Deletionsmutanten ermöglicht zusätzlich die Bedeutung der Ca²⁺-Signalkette zu betrachten. Mit diesen Experimenten kann zum ersten Mal ein Modell für die Funktion von IQD-Proteinen als Gerüstprotein im Zellkern untersucht werden. So kann diese Arbeit zum weiteren fundamentalen Verständnis der Regulierung der GSL-Biosynthese und des Schwefelmetabolismus in *A. thaliana* beitragen.

Summary

Glucosinolates are sulfur containing specialized metabolites playing a crucial role in plant defense of Cruciferous. Due to their anticarcinogen effects they might have a positive impact on health and are important for human nutrition. GSLs are stored separately from myrosinases in specific cell types and cell organelles. Myrosinases hydrolyse GSLs and give rise to a variety of bioactive compounds. Those compounds can harm a pest directly during an attack or serve as a signal for its natural enemies. In *Arabidopsis thaliana* the GSL biosynthesis is well studied which makes a suitable model to study regulation processes of the specialized metabolism in plants. To identify new regulators for the GSL biosynthesis a screen was performed and several mutant lines with altered GSL content from independent mutant populations were isolated. His study focuses on further functional characterization of the mutants *Glucosinolate Content and Composition 7 (gcc7)* and *gcc8*.

The point mutation in *gcc8* leads to a premature stop codon in *SULTR1;2* (At1g7800) and to a loss of function of the most important sulfate transporter *SULTR1;2*. Sulfate is the primary sulfur source for plants and is taken up via the roots. As an ingredient of Cystein and Methionin the macro nutrient sulfur plays a crucial role for plant growth. It is taken up in its oxidized form and the reduction is highly energy consuming. So sulfate uptake and the internal sulfur content needs to be regulated. In plants so far there is no sulfur sensor described, but for *SULTR1;2* a function as sulfur transceptor was discussed in the past.

Using the new allele *gcc8* in this study the *SULTR1;2* function in the GSL and sulfat metabolism was analysed. Compared to all other tested sulfate transporters *SULTR1;2* had the greatest impact on the GSL content in *A. thaliana*. Internal concentrations of Cystein, Methionin and OAS were not altered compared to wildtype plants. Analog to sulfur transceptors in *Saccharomyces cerevisiae* several *SULTR1;2* variants were generated with single nucleotide exchanges which potentially uncouple transport and signaling function. The *SULTR1;2* variants showed different subcellular localisation and effects on the GSL content *in planta*. Those variants can be used in a heterologous yeast system to analyse transport and signaling functions independently. Those experiments enable further studies how the potential *SULTR1;2* function as sulfur sensor regulate the GSL biosynthesis as an example for a specialized metabolism.

The *gcc7* mutant contains an activation tagged T-DNA insertion which leads to a elevated transcription level of the *IQ67 Domain 1 (IQD1)* (At3g09710) gen locus. Members of the plant specific IQD protein family bear a conserved 67 amino acid domain containing several overlapping Calmodulin (CaM) binding motifs. CaMs bind Ca^{2+} one of the most important secondary messenger in eucaryots and transduce Ca^{2+} signals into cellular responses. With 33 members IQDs form one of the largest known CaM binding protein family in plants and might play a role in Ca^{2+} signaling cascades. Like other IQDs also IQD1 is associated with microtubules (MT) and localised to the nucleus. So far mainly IQD functions in coordination of cell and plant growth connected with the cytoskeleton were described. Fort he first time this work focuses on the nuclear IQD1 function in gene expression. Newly generated *IQD1* misexpression lines showed no altered GSL or phytohormone content compared to the wild type. However *IQD1* was locally induced upon wounding which indicates a role in plant defense. Colocalisation and interaction studies showed that IQD1 could form a nuclear complex with CaM2, KLCR2 and WRKY21. BiFC analyses demonstrated that the subcellular localisation of the complex depends on the presence of the individual proteins. WRKY21 contains a CaM binding domain (CaMBD) and regulates the expression of the GSL biosynthesis gene *CYP83B1*. Transactivation experiments showed an inhibitory effect of KLCR2 on the WRKY21 activity. To dissect the IQD1-KLCR2-WRKY21-CaM2 complex function in gene expression in more detail multigene vectors with different combinations of the proteins were generated. The generation of WRKY21-CaMBD-deletion mutants further more allows to analyses the influence of Ca^{2+} signal cascades. In this study a model for the IQD1

function as scaffold protein in the nucleus is described.

By adding IQD1 as an possible nuclear regulator of GSL biosynthesis genes and the further functional analysis of SULTR1;2 this work contributes to the fundamental understanding of the regulation of the GSL biosynthesis and the sulfur metabolism in *A. thaliana*.

Teil I – Allgemeine Einleitung

1 Bedeutung von Schwefel als Pflanzennährstoff

Als autotrophe Organismen müssen Pflanzen alle benötigten chemischen Elemente aus ihrer Umgebung aufnehmen und verarbeiten können. Damit bilden sie die Grundlage in der Nahrungskette für heterotrophe Lebewesen wie den Menschen. Diese sind darauf angewiesen, dass Pflanzen Kohlenstoff aus Kohlendioxid, Stickstoff mithilfe von stickstofffixierenden Bakterien, Sulfat und weitere Nährstoffe aus dem Boden für sie verfügbar machen. Neben den primären bzw. zentralen Stoffwechselmetaboliten zeichnen sich viele Pflanzen durch eine sehr hohe Vielfalt an chemischen Verbindungen aus, welche teilweise ausschließlich von Pflanzen im sekundären bzw. spezialisierten Stoffwechsel synthetisiert werden können. Schwefel (S), Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphor (P), Kalium (K), Kalzium (Ca) und Magnesium (Mg) zählen zu den Makronährstoffen für Pflanzen. Diese Elemente sind auch für zentrale Metabolite notwendig und sind essenziell für das Pflanzenwachstum. Ebenfalls essenziell, wenn auch in geringer Zahl benötigt, sind Mikronährstoffe wie Eisen (Fe), Kupfer (Cu), Natrium (Na), Zink (Zn), Aluminium (Al), Molybdän (Mo), Bor (B), Mangan (Mn), Kobalt (Co) und Selen (Se).

Schwefel gehört zusammen mit Sauerstoff (O) und Selen zur 6. Hauptgruppe im Periodensystem der Elemente. Es kann schwerlösliche Metallverbindungen wie Pyrit (FeS_2) Bleiglanz (PbS) oder Zinkblende (ZnS) bilden oder auch elementar vorkommen. In der belebten Natur und im Boden kommt Schwefel hauptsächlich in der oxidierten Form als Sulfat vor. Zusammen mit Kalzium (Ca^{2+}) kann das Sulfation schwerlösliches CaSO_4 bilden. Viele Sulfate wie z.B. Natriumsulfat oder Kupfersulfat sind dagegen gut wasserlöslich. Freies Sulfat kann von Pflanzen über die Wurzel direkt aufgenommen werden, um anschließend reduziert und in den Metabolismus der Pflanze eingebracht zu werden (Takahashi *et al.*, 2011). Die erste schwefelhaltige organische Verbindung, die in der Pflanze synthetisiert wird, ist die Aminosäure (AS) Cystein (Leustek *et al.*, 2000). Sie ist zum einen Ausgangsstoff für andere schwefelhaltige Verbindungen, zum anderen bilden Cystein und Methionin die Gruppe der schwefelhaltigen Vertreter der proteinogenen AS. Sie gehören zu den zentralen sulfathaltigen Verbindungen und sind grundlegende Bausteine von Proteinen und wichtig für die Funktion von Enzymen. Durch die Oxidation von Thiolgruppen zweier Cysteine können Proteine Disulfidbrücken bilden (Fass & Thorpe, 2018). Dadurch kann die Tertiärstruktur der Proteine stabilisiert werden, was oft essenziell für ihre Funktionalität ist. Disulfidbrücken sind reversibel und können durch Reduktion wieder aufgelöst werden. Glutaredoxine und Thioredoxine sind kleine Proteine, die dafür Elektronen von geeigneten Reduktionsmitteln wie Glutathion (GSH) auf verschiedene Elektronakzeptoren übertragen können (Martin *et al.*, 2005). So können sie die Aktivität eines Zielproteins beeinflussen.

Auch unter den vielen sogenannten spezialisierten Pflanzeninhaltsstoffen finden sich eine Reihe schwefelhaltiger Verbindungen. Glukosinolate (GSL), die ausgehend von verschiedenen AS synthetisiert werden, spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden (Wittstock & Burow, 2010). Für den Menschen sind sie vor allem für den Geschmack verschiedener Nahrungsmittel aus der Familie der Kreuzblütler wie Senf, Kresse oder Kohl wichtig. Darüber hinaus wurden antikarzinogene Effekte für sie beschrieben (Halkier & Gershenzon, 2006). Andere Beispiele für schwefelhaltiger Verbindungen sind Allin, Allicin und Diallyldisulfide, die in Knoblauch enthalten sind (Jones *et al.*, 2004). Die Vitamine B1 und H (Thiamin bzw. Biotin) sind ebenfalls schwefelhaltige Verbindungen, welche für eine gesunde Ernährung wichtig sind. Das Tripeptid GSH ist sowohl für Pflanzen als auch für Tiere von besonderer Bedeutung (Ketterer *et al.*, 1983). Es besteht aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin und dient in Pflanzen unter anderem der Detoxifikation der reaktiven Sauerstoffspezies

H₂O₂. Die freien Thiolgruppen (R-SH) zweier GSH Moleküle werden dabei von H₂O₂ oxidiert und bilden eine Disulfidbrücke zwischen ihnen aus (GSSG) (Noctor *et al.*, 2012). Anschliessend wird diese Verbindung durch die GSH-Reduktase mithilfe von NADPH wieder zu GSH reduziert. Durch eine Erhöhung der H₂O₂ Produktion in der Pflanze kann das GSH:GSSG-Verhältnis in Blättern von 20 auf fast 1 fallen (Mhamdi *et al.*, 2010). Der GSH-Status kann dadurch als Marker für den oxidativen Stress in der Pflanze dienen (Noctor *et al.*, 2012). Die hohe Konzentration von GSH legt bereits eine zentrale Rolle der Verbindung nahe. In der Tat führt GSH-Mangel bei Ratten innerhalb weniger Tage zum Tod durch Organversagen (Meister, 1994) und in *A. thaliana* zur Embryoletalität (Cairns *et al.*, 2006). *A. thaliana pad2-1* (*phytoalexin-deficient 2-1*)-Mutanten, die verringerte GSH-Gehalte aufweisen, zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen und geringere GSL-Gehalte (Parisy *et al.*, 2006; Schlaeppli *et al.*, 2008).

Neben der Bildung von Disulfidbrücken spielt Cystein eine weitere wichtige Rolle für die Funktionalität vieler Enzyme. In Proteinen können über die schwefelhaltigen Seitenketten von Cystein mit verschiedenen Metallen wie Eisen, Kupfer, Nickel oder Molybdän Metall-Schwefel-Cluster gebildet werden, welche oft als katalytisch aktive Stellen in Enzymen fungieren. In Pflanzen und Algen sind Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern Teil der Elektronentransportkette der lichtabhängigen Reaktion der Photosynthese (Buchnan, 1991). Dort werden Elektronen durch eine Reihe von Donatoren und Akzeptoren entlang der Thylakoidmembran in Chloroplasten geleitet. Die Eisen-Schwefel-Zentren werden durch die Elektronenaufnahme reduziert und durch Elektronenabgabe an den nächsten Akzeptor wieder oxidiert. Am Ende dieser Kette steht das Ferredoxin mit einem [Fe₂S₂]-Cluster. Dieses Protein bindet an einer Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, um NADP⁺ zu NADPH zu reduzieren. Darüber hinaus ist dieser Prozess mit einem Protonentransport über die Membran verbunden. Die Energie der dadurch entstehenden protonmotorischen Kraft ($\Delta\mu_{H^+}$) wird für die Phosphorylierung von ADP zu ATP verwendet. Schwefel spielt damit eine entscheidende Rolle in einem der wichtigsten Prozesse in der Natur zur Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie.

2 Sulfataufnahme und -metabolismus

Die Aufnahme von Sulfat aus dem Boden sowie der intra- und interzelluläre Transport werden durch Sulfattransporter vermittelt (Buchner *et al.*, 2004). In der Natur sind drei verschiedene Gruppen von Sulfattransportern bekannt. Anhand des Transportmechanismus werden ATP-abhängige ABC Transporter, Sulfat/Anion (Cl⁻, CO₃²⁻, Oxalat)-Antiporter und Na⁺ (H⁺)/Sulfat-Symporter unterschieden (Gigolashivi & Kopriva, 2014). Während in Grünalgen alle drei Typen zu finden sind, besitzen höhere Pflanzen nur letztere (Takahashi, 2012). Pflanzliche Sulfattransporter (SULTRs) sind Membranproteine mit zwölf Transmembrandomänen (TMDs) und einer *Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist* (STAS)-Domäne (Zhang *et al.*, 2014). Diese kann Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und reguliert die Transportaktivität (Shibagaki & Grossmann, 2004). Im Genom von *A. thaliana* sind zwölf SULTRs kodiert, welche aufgrund ihrer Funktionalität in vier Gruppen eingeordnet werden können (Buchner *et al.*, 2004). Die erste Gruppe umfasst drei hoch affine SULTRs. SULTR1;1 und SULTR1;2 sind in der Wurzel aktiv und für die Sulfataufnahme aus dem Boden verantwortlich (Takahashi *et al.*, 2000; Shibagaki *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2002). SULTR1;2 ist der wichtigste Transporter für die Sulfataufnahme und bewerkstelligt bei ausreichender Sulfatverfügbarkeit etwa 80% des Transports aus dem Boden in die Wurzel (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003). Wenn genügend Sulfat aufgenommen werden kann, sind die *SULTR1;2*-Transkriptmengen höher als die von *SULTR1;1* (Fizames *et al.*, 2004). Die Expression von *SULTR1;1* ist stärker reguliert und wird bei Sulfatmangel induziert (Yoshimoto

et al., 2002). Da *SULTR1;1* eine geringere Aufnahmekapazität als *SULTR1;2* besitzt, weisen *sultr1;2*-Mutanten erhöhte *SULTR1;1*-Transkriptlevel und einen verringerten Sulfatgehalt auf (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003). Die *sultr1;1sultr1;2*-Doppelmutante kann bei geringer Verfügbarkeit kaum Sulfat aufnehmen und zeigt schwere Wachstumsdefizite (Yoshimoto, 2007; Baberon *et al.*, 2008). Der dritte hochaffine Transporter *SULTR1;3* ist im Unterschied zu den oben genannten Transportern im Phloem aktiv und ist für die *source-sink* Verteilung von Sulfat innerhalb der Pflanze wichtig (Yoshimoto *et al.*, 2003).

Die Gruppe 2 umfasst zwei *SULTRs* mit geringer Affinität, welche im Leitgewebe lokalisiert sind und dort den Sulfattransport über längere Distanzen innerhalb der Pflanze ermöglichen (Takahashi *et al.*, 2000). Die Funktion der *SULTRs* in Gruppe 3 ist teilweise noch nicht bekannt. Aufgrund der Lokalisation einiger Transporter an plastidären Membranen liegt der Sulfattransport in Plastiden als Funktion nahe (Gigolashvili & Kopriva, 2014). *SULTR3;5* transportiert selbst kein Sulfat, jedoch scheint es die Funktion von *SULTR2;1* zu beeinflussen, da die Koexpression von *SULTR3;5* in Hefe die Transportkapazität von *SULTR2;1* erhöht (Kataoka *et al.*, 2004). Die Mitglieder der Gruppe 4 sind im Tonoplasten lokalisiert. Sie vermitteln den Sulfattransport aus der Vakuole (Takahashi, 2019).

Das Inkorporieren von Schwefel nach der Aufnahme ist mit hohem Energieaufwand verbunden (Takahashi *et al.*, 2011). Im Sulfat liegt Schwefel in der oxidierten Form vor. Die meisten organischen Verbindungen enthalten allerdings reduzierten Schwefel. Die Assimilation umfasst daher die Reduktion und anschließend den Einbau in organische Verbindungen. Dieser energieraufwendige Prozess hängt von ATP und reduzierenden Verbindungen ab, welche in Pflanzen durch Photosynthese generiert werden (Martin *et al.*, 2005). Parasitär lebende Organismen scheinen die Fähigkeit zur Sulfatreduktion sehr früh zu verlieren und sparen auf diese Weise die dafür nötige Energie (Kopriva *et al.*, 2012; Patron *et al.*, 2008). Daher spielen Pflanzen zusammen mit Pilzen und Bakterien, die Schwefel assimilieren können, eine grundlegende Rolle im biogeochemischen Schwefelkreislauf.

Nachdem Sulfat von Pflanzen aufgenommen wurde, kann es via Plasmodesmata von der Epidermis über Cortex- und Endodermiszellen zum Leitgewebe und schließlich in alle Pflanzenteile transportiert werden (Takahashi *et al.*, 2011). In der Zelle kann es dann entweder in die Vakuole als Speicher transportiert oder direkt assimiliert werden. Sulfat muss zu Beginn der Assimilation durch die ATP Sulfurylase (ATPS) aktiviert werden (Kopriva *et al.*, 2012). Dabei wird das Pyrophosphat in ATP durch Sulfat ersetzt und es entsteht Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) (Abb. 1). APS bildet den Scheidepunkt zwischen zentralem Sulfatstoffwechsel, in dem schließlich Cystein und GSH als erste organische Schwefelverbindungen gebildet werden, und spezialisiertem Sulfatstoffwechsel, in dem durch Sulfatierung beispielsweise GSL synthetisiert werden (Mugford *et al.*, 2011). Im zentralen Sulfatstoffwechsel wird APS durch die APS Reduktase (APR) zu Sulfit und anschließend mittels Sulfit Reduktase (SiR) zu Sulfid reduziert. Die Sulfatreduktion findet in Chloroplasten statt, da APR und SiR ausschließlich dort lokalisiert sind, während ATPS auch im Zytosol zu finden ist (Rotte *et al.*, 2000). Sulfid bildet die Ausgangsverbindung für die anschließende Cysteinsynthese. Diese wird durch zwei Enzyme bewerkstelligt, die zusammen den Cystein-Synthase-Komplex bilden (Wirtz *et al.*, 2001). Im ersten Schritt wird aus L-Serin und Acetyl-CoA durch eine Serin Acetyltransferase (SAT) O-Acetyserin (OAS) gebildet. Im zweiten Schritt wird durch eine OAS Thiolyase (OAS-TL) das Sulfid unter Bildung von Cystein in OAS inkorporiert. SAT ist nur im Komplex mit OAS-TL aktiv, während OAS-TL durch die Bindung inaktiviert wird. OAS lässt den Komplex dissoziieren und Sulfid wirkt stabilisierend. Aufgrund des Einflusses von Sulfid und OAS ist die Regulation des Cystein-Synthase-Komplexes also mit dem Sulfatstoffwechsel der Pflanze verbunden (Saito, 2004). SAT und OAS-TL sind in allen Pflanzenteilen exprimiert und kommen in verschiedenen Isoformen vor, die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen (Wirtz & Hell, 2006). In *A. thaliana* sind SAT1, SAT3 und SAT5 die Hauptisoformen in Chloroplasten, Mitochondrien bzw. im Zytosol. Die ebenfalls zytosolischen SAT2 und SAT4 weisen eine deutlich geringeres Expressionslevel auf. Zusammen mit den drei OAS-TL-

Isoformen OAS-TL A (Zytosol), B (Chloroplasten) und C (Mitochondrien) kann Cystein in all diesen Kompartimenten synthetisiert werden (Takahashi *et al.*, 2011). Untersuchungen von *sat*-Quadrupelmutanten zeigten, dass eine der fünf SAT-Isoformen trotz verringertem Wachstum für die Cysteinsynthese ausreicht. Ein *knock out* aller SAT-Isoformen ist jedoch lethal (Watanabe *et al.*, 2008). Cystein bildet die erste organische Verbindung im zentralen Sulfatstoffwechsel und kann anschließend über weitere Schritte zur Synthese von GSH oder Methionin verwendet werden. Methionin und Cystein sind essenzielle AS und daher auch für die Ernährung des Menschen von besonderer Bedeutung.

Für den spezialisierten Sulfatstoffwechsel wird APS von der APS Kinase (APK) phosphoryliert und zu 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) umgewandelt (Mugford *et al.*, 2009). PAPS spielt eine wichtige Rolle als Sulfatdonor bei der Synthese von schwefelhaltigen spezialisierten Pflanzeninhaltsstoffen wie GSL und bei der Proteinsulfatierung. Die Verbindungen aus dem zentralen Sulfatstoffwechsel sind essenziell für alle Pflanzen in grundlegenden Prozessen, wie Cystein für die Proteinbiosynthese oder GSH als zentraler Baustein für Stressantworten in Pflanzen. Darüber hinaus spielen spezialisierte sulfatierte Verbindungen eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Fitness. Somit ist es für Pflanzen wichtig, die Aufnahme und Verteilung von Schwefel genau zu kontrollieren.

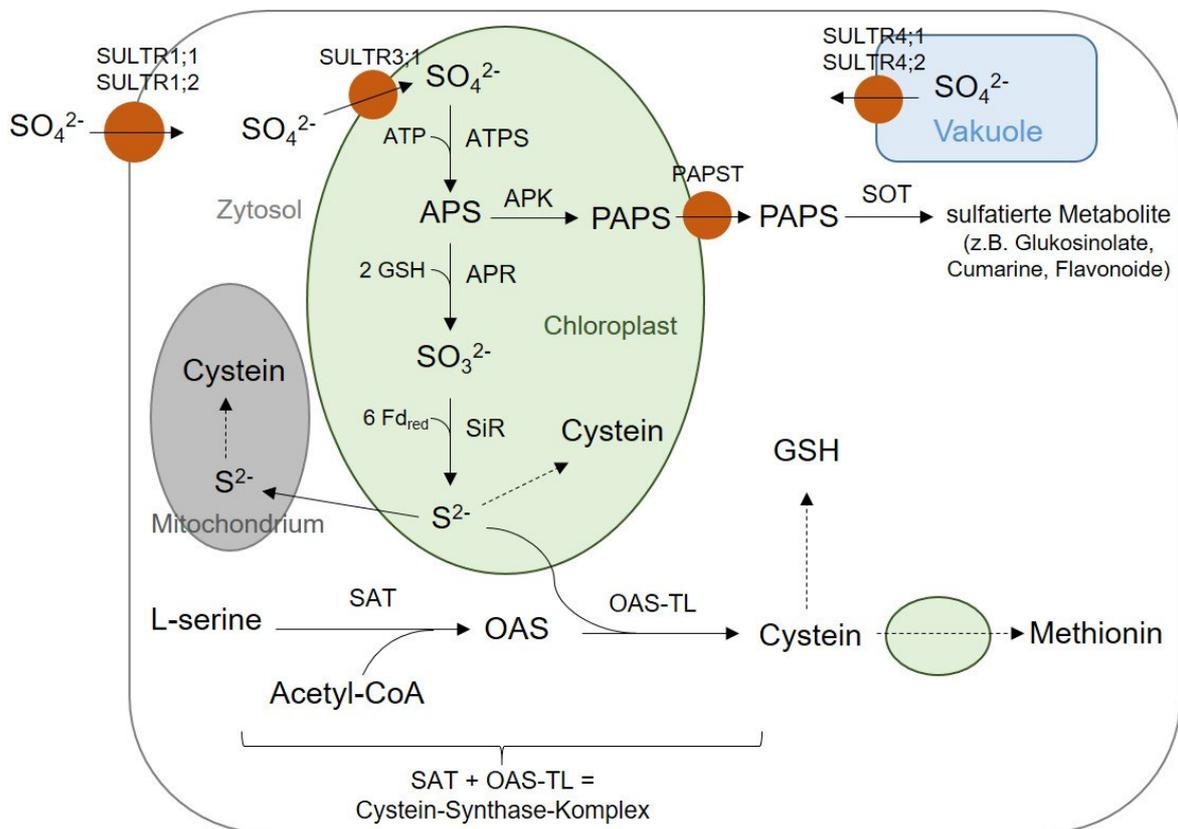


Abb. 1: Schema der Schwefelassimilation in *Arabidopsis thaliana*

Aufnahme und intrazellulärer Transport von Sulfat in der Pflanzenzelle. Sulfat wird in Chloroplasten reduziert. Die Cysteinsynthese kann im Zytosol, in Chloroplasten oder Mitochondrien stattfinden. Die Vakuole kann als Sulfatspeicher dienen. PAPS dient als Sulfatdonor für spezialisierte sulfatierte Verbindungen. SULTR – Sulfattransporter; ATP – Adenosyltriphosphat; ATPS – ATP Sulfurylase; APS – Adenosin 5'-Phosphosulfat; GSH – Glutathion; APR – APS Reduktase; Fd_{red} – reduziertes Ferredoxin; SiR – Sulfit Reduktase; SAT – Serin Acetyltransferase; OAS – O-Acetylserin; OAS-TL – OAS Thiolyase; APK – APS Kinase; PAPS - 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat; PAPST – PAPS-Transporter; SOT – Sulfotransferase. Die durchbrochenen Pfeile zeigen einen Prozess mit mehreren, nicht dargestellten Zwischenprodukten. Braune Kreise symbolisieren Transporter.

3 Regulierung von Nährstoffaufnahme und Stoffwechsel bei Sulfatmangel

Schwefel ist ein wichtiger Makronährstoff für Pflanzen, der nicht immer in ausreichendem Maße im Boden verfügbar ist. Der pH-Wert des Bodens ist ein entscheidender Faktor für die Sulfatverfügbarkeit. In sauren Böden ist die Verfügbarkeit stark eingeschränkt. Da freies Sulfat gut wasserlöslich ist, kann es leicht aus dem Boden ausgewaschen werden, beispielsweise durch starken Regen. Für Pflanzen ist die Regulierung der Sulfataufnahme daher grundlegend für eine stabile Schwefelhomöostase. Bei geringer Sulfatverfügbarkeit im Boden muss die Aufnahme über die Wurzel verstärkt werden. Im Gegensatz dazu muss die Aufnahme bei ausreichender Menge von reduziertem Schwefel in der Pflanze unter Umständen verringert werden. Diese Kontrolle des Sulfattransports ist wichtig, da zum einen die Reduktion von Schwefel viel Energie benötigt und die Reaktion daher reguliert werden muss, zum anderen da stark erhöhte Konzentrationen von reduzierten Schwefelverbindungen toxisch wirken können (Martin *et al.*, 2005). Die Sulfataufnahme wird somit durch externe Faktoren wie die Verfügbarkeit im Boden sowie interne Signale beeinflusst (Takahashi *et al.*, 2011).

Unter Sulfatmangel wird die Sulfataufnahmekapazität der Pflanze stark erhöht (Davidian & Kopriva, 2010). Die Transkriptmengen von *SULTR1;1* und *SULTR1;2*, welche die Transporter zur Sulfataufnahme aus dem Boden kodieren, steigen (Yoshimoto *et al.*, 2002). Zusätzlich wird Sulfat durch *SULTR2;1* und *SULTR3;5* aus dem Apoplasten sowie durch *SULTR4* aus der Vakuole als wichtigster Sulfatspeicher mobilisiert (Kataoka *et al.*, 2004a; Kataoka *et al.*, 2004b). Während einer längeren Phase von Sulfatmangel kommt es in der Pflanze zur OAS-Akkumulation, was ebenfalls zu einer erhöhten *SULTR*-Transkriptmenge und Aufnahmekapazität führt (Smith *et al.*, 1997). Dem entgegengesetzt wird bei einer erhöhten Konzentration von reduziertem Schwefel über eine negative Rückkopplung die Aufnahmekapazität verringert. Dies kann auch nach der Zugabe von Cystein oder GSH beobachtet werden (Vauclare *et al.*, 2002). Die Sulfataufnahme in Pflanzen ist also zu einem großen Teil bedarfsgetrieben reguliert (Lappartient & Touraine, 1996). Diesem Konzept folgend konnte in Maiswurzeln beobachtet werden, dass Kadmiumstress ebenfalls zu erhöhter Transkriptmenge der Sulfattransporter führte (Nocito *et al.*, 2006). Zur Detoxifizierung werden die Schwermetalle in der Pflanze von GSH chelatiert, was zu einem erhöhten Sulfatbedarf führt.

In der Vergangenheit konnten auch einige genetische Komponenten für die Regulation der Sulfataufnahme identifiziert werden. So wurde das *Sulfur-Responsive Element* (SURE) zunächst im Promotor von *SULTR1;1* und später auch bei anderen Schwefelmangel-induzierten Genen gefunden (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). Dieses 16 bp lange Motiv ist notwendig und ausreichend, um die Expression der entsprechenden Gene bei Sulfatmangel zu induzieren. Ausserdem wurde der Transkriptionsfaktor *Sulfur Limitation 1* (SLIM1) als wichtiger Faktor beschrieben (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). SLIM1 kontrolliert unter anderem die Expression von *SULTR1;2*, *SULTR1;1* und *SULTR4;2*. Er gehört zu der Familie von *ETHYLEN-INSENSITIVE-LIKE*-Transkriptionsfaktoren, allerdings wurde bisher keine Verbindung zur Ethylen-Signalkette gefunden. Die stärkere Induzierbarkeit von *SULTR1;1* im Vergleich zu *SULTR1;2* könnte durch die Abwesenheit von SURE im Promotor von *SULTR1;2* erklärt werden. Demnach reguliert SLIM1 die Expression der Sulfattransporter in Abhängigkeit der Sulfatverfügbarkeit, während ein zusätzlicher Mechanismus die Expression von *SULTR1;1* in der Sulfatmangelantwort kontrolliert (Davidian & Kopriva, 2010). Neben der transkriptionellen Regulierung spielen bei der Sulfataufnahme auch posttranskriptionelle Modifikationen eine Rolle. Ein Hinweis dafür ist die Beobachtung in *sultr1;1sultr1;2*-Mutanten, welche mit Konstrukten von *SULTR1;1* bzw. *SULTR1;2* unter Kontrolle von konstitutiven Promotoren komplementiert wurden. Obwohl die Menge der mRNA konstant war, stieg die Zahl der Transporter in diesen Pflanzen bei Sulfatmangel (Yoshimoto

et al., 2007).

Auf Mangel von bestimmten Nährstoffen reagieren Pflanzen teilweise mit starken und charakteristischen Anpassungen von Wurzelwachstum und -architektur (Osmont *et al.*, 2007). Im Fall von Phosphatmangel wird in *A. thaliana* das Wachstum der Primärwurzel gedrosselt und der Seitenwurzel begünstigt (Ticconi & Abel, 2004). So können höhere Bodenschichten besser ausgebeutet werden. Im Gegensatz dazu wurden bei Sulfatmangel nur sehr schwache Veränderungen der Wurzelarchitektur beobachtet (Gruber *et al.*, 2013). Obwohl sich die Biomasse von Spross und Wurzel bei Sulfatmangel stark verringert, verändert sich die gesamte Wurzellänge kaum. In Abwesenheit von Schwefel im Medium konnte eine leichte Erhöhung des Primärwurzelwachstums sowie der Seitenwurzeldichte beobachtet werden. Gleichzeitig war die Länge der Seitenwurzel allerdings verringert.

Bei schwankender Sulfatverfügbarkeit im Boden muss nicht nur die Sulfataufnahme, sondern auch der Fluss des aufgenommenen Sulfats im Schwefelstoffwechsel streng kontrolliert werden. Dafür ist die Weiterverarbeitung von APS entweder durch APR für den zentralen Stoffwechsel oder APK zur Synthese von spezialisierten Schwefelverbindungen die entscheidende Stelle. Die Rolle und Funktion von APR in *A. thaliana* ist gut untersucht (Martin *et al.*, 2005). Das Protein besteht aus einer katalytisch aktiven N-terminalen Domäne mit Eisen-Schwefelcluster und einer C-terminalen Domäne, welche die Interaktion mit GSH als Elektronendonator vermittelt (Kopriva *et al.*, 2001). APR wurde als ein Schlüsselenzym für die Sulfatverteilung in der Pflanze identifiziert. Durch Analysen in Wurzelzellen und die Inhibierung des Enzyms konnte gezeigt werden, dass die APR-Aktivität zu etwa 90% den Strom von internem Sulfat steuert (Vauclare *et al.*, 2002). Die wichtigste der drei Isoformen in *A. thaliana* ist APR2 und eine verringerte Aktivität oder ein *knock out* von APR2 führt zur Akkumulation von Sulfat in Blättern (Loudet *et al.*, 2007). Die Überexpression von APR führt dagegen zur Akkumulation von reduzierten Schwefelverbindungen. Jedoch kommt es dabei nicht zu einer gleichzeitigen Erhöhung des Cystein- oder GSH-Gehalt (Martin *et al.*, 2005). Bei einer hohen Konzentration von reduziertem Schwefel ist der Gehalt von OAS als Kohlenstoffakzeptor für Schwefel der limitierende Faktor für die Cysteinsynthese. Die APR-Aktivität in *A. thaliana* wird durch eine Rückkopplung über die GSH-Konzentration kontrolliert. Die Zugabe von GSH und Cystein, das in der Pflanze teilweise zu GSH umgewandelt wird, bewirkt neben der Verringerung der Sulfataufnahme eine Reduktion der APR-Expression und Proteinaktivität (Vauclare *et al.*, 2002). Diese inhibierende Wirkung ist spezifisch für APR und konnte für kein anderes Enzym in der Sulfatreduktion oder SATs beobachtet werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die energieaufwendige Schwefelreduktion über die Verfügbarkeit der im Verlauf der Schwefelassimilation synthetisierten Verbindungen reguliert wird. Auf diese Weise kann durch die Anpassung der Reduktionsrate der Gehalt von reduzierten Schwefelverbindungen wie GSH konstant gehalten werden.

Wenn APS nicht durch APR reduziert wird, kann es durch APK phosphoryliert und schließlich zur Synthese von PAPS genutzt werden. PAPS ist ein aktivierter Sulfatdonor für die Bildung von sulfatierten Verbindungen und Proteinsulfatierung. In *A. thaliana* sind vier APK-Isoformen beschrieben (Mugford *et al.*, 2009). Die plastidären APK1 und APK2 sind für den größten Anteil der PAPS-Synthese verantwortlich. So zeigt die *apk1apk2*-Doppelmutante neben einem verringerten Wachstum auch signifikant geringere Gehalte von sulfatierten GSL. Die Übertragung der Sulfatgruppe von PAPS auf desulfo-GSL durch Sulfotransferasen (SOT) ist der letzte Schritt der Glukonsinolatebiosynthese, doch auch weitere Verbindungen wie Cumarine und Flavonoide werden auf diese Weise gebildet (Klein & Papaenbrock, 2004). In einer Studie konnte die Triplemutante *apk1apk3apk4* nicht isoliert werden, da diese *knock out*-Kombination lethal ist (Mugford *et al.*, 2010). Die Sulfatierung von Proteinen kann essenziell für ihre Funktionalität sein. So wurde gezeigt, dass Phytosulfokine (PSK), die bei der Zellteilung und im Wurzelwachstum eine Rolle spielen, im nichtsulfatierten Zustand eine drastisch verringerte biologische Aktivität aufweisen (Sauter 2015). Diese Beobachtungen zeigen, wie essenziell Sulfatierungsreaktionen für das Überleben der Pflanze sind.

4 Biosynthese und Funktion von Glukosinolaten

GSL sind spezialisierte Pflanzeninhaltsstoffe, welche vor allem von Vertretern der Brassicaceae, Capparaceae, Tovariaceae, Moringaceae und Resedaceae gebildet werden. Aber auch bei Familien außerhalb der Brassicales, bei Vertretern der Caricaceae, Euphorbiaceae, Gyrotomonaceae, Limnathaceae, Salvadoraceae und Tropaeolaceae, wurden sie nachgewiesen (Fenwick *et al.*, 1983; Brown & Morra 1997). GSL verleihen einer Reihe von Pflanzen wie Kohl oder Kresse ihren typischen Geschmack und machen diese damit zu wichtigen Bausteinen der menschlichen Ernährung (Halkier & Gershenzon, 2006). In einer anderen landwirtschaftlich bedeuteten Pflanze, dem Raps, wurde dagegen der Anteil der Inhaltsstoffe durch Züchtung verringert (Griffiths *et al.*, 1998). Neben dem Einfluss auf den Geschmack wird auch eine positive Wirkung von GSL auf die Gesundheit als Antikarzinogen diskutiert (Zhang & Tang, 2007). Für Pflanzen ist ihre wichtigste Funktion die Abwehr von Fraßfeinden (Wittstock *et al.*, 2003). Dabei ist die biologische Aktivität von GSL vor allem ihren Abbauprodukten zuzuschreiben.

GSL können anhand der AS, aus denen sie gebildet werden, in drei Gruppen unterteilt werden. Aliphatische GSL können ausgehend von Ala, Leu, Ile, Val oder Met synthetisiert werden. Trp ist die Ausgangsverbindung für die Synthese von indolischen GSL und aromatische GSL werden ausgehend von Phe oder Tyr gebildet (Sonderby *et al.*, 2010; Fahey *et al.*, 2001). In *A. thaliana* wurden etwa 40 verschiedene Verbindungen nachgewiesen (Kliebenstein *et al.*, 2001; Reichelt *et al.*, 2002; Wittstock & Halkier 2002). Dabei handelt es sich größtenteils um von Met abgeleitete aliphatische, aber auch um indolische GSL (Kliebenstein *et al.*, 2001; Agerbirk *et al.*, 2009).

Die Schritte der Biosynthese von GSL und die beteiligten Enzyme sind weitgehend erforscht (Grubb & Abel 2006; Sonderby *et al.*, 2010). Die Synthese kann in drei Phasen unterteilt werden: die Seitenkettenverlängerung, die Bildung der Kernstruktur und die Seitenkettenmodifizierung (Halkier & Du, 1997) (Abb. 2).

Bevor die Bildung der Kernstruktur beginnt, durchläuft Methionin mindestens einmal eine Seitenkettenverlängerung. Dafür wird es zunächst durch die *Branched-Chain amino acid Aminotransferase 4* (BCAT4) deaminiert. Anschließend erfolgt eine Verlängerung um eine Methylgruppe durch einen Durchlauf bestehend aus folgenden Teilen: Eine *Methylthioalkylmalate synthase* (MAM)-vermittelte Kondensation mit Acetyl-CoA, anschließend eine Isomerisierung durch eine *Isopropylmalate Isomerase* (IPMI) und schließlich eine oxidative Decarboxylierung durch eine *Isopropylmalate Dehydrogenase* (IPMDH). Danach kann das Molekül durch BCAT3 entweder transaminiert werden und als Homo-Methionin die Kernbildung beginnen oder vorher weitere Male den Kreislauf der Seitenkettenverlängerung durchlaufen.

Der erste Schritt der Kernbildung ist eine Umwandlung der AS zu einem Aldoxim durch Enzyme der Cytochrom P450 79 (CYP79)-Familie. Durch CYP83-Enzyme wird das Aldoxim anschließend zu einer aktivierten Verbindung wie Nitriloxide ($R\equiv CNO$) oder aci-Nitro-Verbindungen ($R=CNO_2$) oxidiert und mit GSH als Schwefeldonor verbunden. Letzteres kann nonenzymatisch oder via *Gluthatione-S-Transferase* (GST) geschehen. Das so entstandene S-Alkylthiohydroximat wird durch *S-alkyl-thiohydroximate lyase 1* (SUR1) zu einer Thiohydroximsäure konvertiert, welche über *UDP-Glucosyltransferases* (UGTs)-vermittelte Glykosylierung an der Sulfatgruppe zu einem Desulfo-GSL umgewandelt wird. Der letzte Schritt für diesen Teil der Biosynthese ist die Sulfatierung durch SOT, wodurch eine funktionelle GSL-Verbindung entsteht. Als Sulfatdonor dient dabei PAPS. Die darauf folgende Seitenkettenmodifikation ist von großer Bedeutung, da die biologische Aktivität von GSL maßgeblich von der Struktur ihrer Seitenketten abhängt. Bei aliphatischen GSL kommen Oxidation, Hydroxylierung, Alkenylierung und Benzoylation vor. Bei indolischen GSL umfassen die Modifikationen Hydroxylierung und Methoxylierung (Sonderby *et al.*, 2010). Genauso wie

die Seitenkettenverlängerung trägt auch die sekundäre Modifikation der Seitenkette zu einem breiten Spektrum an unterschiedlichen GSL und einem spezifischen GSL-Profil einer Pflanze bei (Fahey *et al.*, 2001).

Während die Prozesse der GSL-Biosynthese sehr gut untersucht sind, ist nur relativ wenig über mögliche Regulatoren bekannt. *Arabidopsis Myb Transcription factor 1* (ATR1/MYB34) wurde als einer der wichtigsten Regulatoren der Biosynthese von indolischen GSL beschrieben (Celenza *et al.*, 2005). Bald darauf wurden weitere MYB-Transkriptionsfaktoren

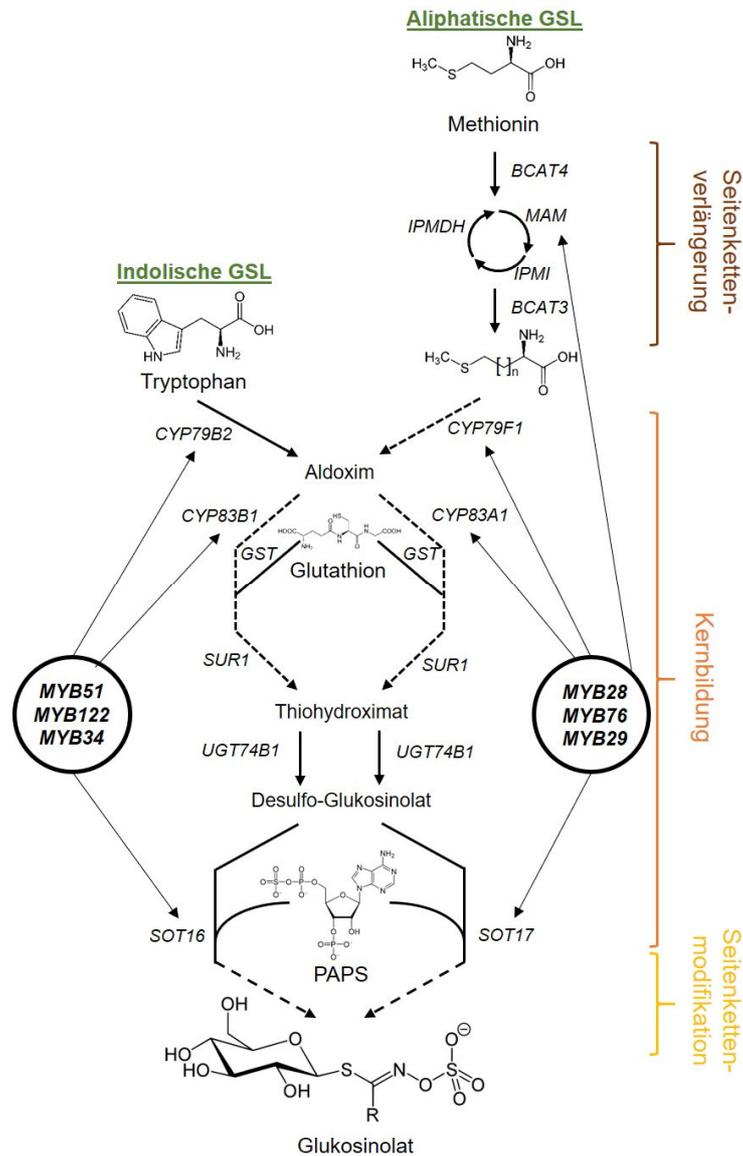


Abb. 2: Schema der Glukosinolatbiosynthese in *A. thaliana* für indolische und aliphatische GSL

Indolische und aliphatische GSL werden ausgehend von Tryptophan bzw. Methionin gebildet. Methionin kann mehrere Seitenkettenverlängerungen durchlaufen, bevor es in den Prozess der Kernbildung eintritt. Glutathion und PAPS dienen als Sulfatdonoren. Durch die Seitenkettenmodifikation kann ein breites Spektrum verschiedener GSL in der Pflanze synthetisiert werden. BCAT – Branched-Chain amino acid Aminotransferase; MAM – Methylthioalkylmalate synthase; IPMI – Isopropylmalate Isomerase; IPMDH – Isopropylmalate Dehydrogenase; CYP – Cytochrom P450; GST - Glutathione-S-Transferase; SUR – S-alkyl-thiohydroximate lyase; UGT – UDP-Glucosyltransferase; SOT – Sulfotransferase; PAPS - 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat. Die Pfeile ausgehend von den MYB-Transkriptionsfaktoren weisen auf die von ihnen positiv regulierten Enzyme. Die durchbrochenen Pfeile zeigen Prozesse mit mehreren, nicht dargestellten Zwischenprodukten.

mit ähnlicher Funktion bekannt. So konnten neben MYB34 noch MYB51 und MYB122 als wichtigste Faktoren für die Synthese von indolischen GSL beschrieben werden (Gigolashvili *et al.*, 2007a). MYB28, MYB29 und MYB76 wurden als positive Regulatoren für die Produktion von aliphatischen GSL identifiziert (Gigolashvili *et al.*, 2007b; Gigolashvili *et al.*, 2008). Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren führt in *A. thaliana* zu erhöhten Konzentrationen von indolischen bzw. aliphatischen GSL und induziert die Expression mehrerer GSL-Biosynthesegene (Abb. 2). Die erhöhte Expression von *MYB28* bzw. *MYB51* führt zusätzlich zu erhöhter Resistenz gegenüber Fraßfeinden. Alle *MYB* sind vor allem in teilungsaktiven Geweben sowie in ausgewachsenen Blättern exprimiert und werden teilweise (*MYB28* und *MYB51*) durch Berührung und Verwundung induziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MYB28* und *MYB29* durch Glukose induziert werden kann (Miao *et al.*, 2012). Sie spielen damit wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei Verknüpfung der GSL-Biosynthese mit der Kohlenhydratverfügbarkeit in der Pflanze. Obwohl gezeigt wurde, dass SLIM1, ein Hauptregulator der Sulfatmangelantwort in *A. thaliana*, die Expression von *MYB* verringern kann, ist die Transkriptmenge von *MYB34*, *MYB51* und *MYB122* bei geringer Sulfatverfügbarkeit unverändert und wird dagegen bei geringem GSL-Gehalt erhöht (Frerigmann & Gigolashvili, 2014).

Für die biologische Aktivität von GSL sind vor allem ihre reaktiven Abbauprodukte verantwortlich. Sie entstehen durch die hydrolytische Spaltung intakter GSL durch Myrosinasen. Diese Enzyme spalten GSL in Glukose und eine instabile schwefelhaltige Restverbindung, dem Aglukon (Halkier & Greshenzon, 2006). Dieses kann durch nichtenzymatische Umlagerung oder über *Epithiospecifier*-Proteine (ESPs) und in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen zu einer Vielzahl von Verbindungen wie Isothiocyanate, Thiocyanate, Nitrile, Epithionitrile oder Oxazolidin-2-Thione umgewandelt werden (Fahey *et al.*, 2001; Wittstock & Burow, 2010) (Abb. 3). Isothiocyanate sind die am häufigsten gebildeten Verbindungen. Sie entstehen durch die Umlagerung der Seitenkette an das Stickstoffatom. Wenn die Seitenkette der GSL eine Hydroxylgruppe am C-2 Atom besitzt, sind die gebildeten Isothiocyanate instabil und bilden schließlich Oxazolidin-2-Thione. Thiocyanate werden nur aus wenigen GSL gebildet. An der Bildung von Nitrilen und Epithionitrilen sind zusätzlich ESPs beteiligt (Kuchernig *et al.*, 2012). Für ESPs selbst wurde bisher keine katalytische Aktivität beschrieben. Die Bildung der reaktiven Verbindung findet daher wahrscheinlich nur in Anwesenheit von Myrosinasen statt.

In *A. thaliana* sind sechs Isoformen typischer Myrosinasen (*Thioglucoside glucohydrolase* (TGG) 1-6) beschrieben (Chhajed *et al.*, 2019). Sie weisen ein konserviertes Glutamin in der AS-Sequenz auf, welches für die Bindung der Glukose bei aliphatische GSL und damit für die Myrosinaseaktivität essenziell ist (Wittstock & Burow, 2010). Die Funktion von TGG1 und TGG2 sind am besten untersucht. Sie sind in Blättern sowie in Blüten exprimiert und dort für die Abwehr von Fraßfeinden verantwortlich. Das zeigt die stark beeinträchtigte Abwehrfähigkeit aufgrund der verringerten Myrosinaseaktivität in *tgg1tgg2*-Doppelmutanten (Barth & Jander, 2006). Während TGG2 nur in phloemassoziierten Zellen zu finden ist, ist TGG1 zusätzlich in Stomata lokalisiert. Die genaue Rolle von Myrosinasen in Spaltöffnungen ist noch nicht klar, aber Mutationen von *TGG1* und *TGG2* beeinflussen den Mechanismus der Spaltöffnungen und die Zellgröße (Islam *et al.*, 2009; Ahuja *et al.*, 2016). Weitere *Arabidopsis* Myrosinasen sind in der Wurzel (*TGG4* und *TGG5*) und in Pollen (*TGG3* und *TGG6*) exprimiert (Chhajed *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2002). Bei *TGG3* und *TGG6* handelt es sich jedoch wahrscheinlich um Pseudogene. Neben diesen klassischen Myrosinasen sind außerdem atypische Myrosinasen wie Penetration2 (PEN2) und PYK10/BGLU23 in *A. thaliana* beschrieben. Bei ihnen ist das konservierte Glutamin durch eine Glutaminsäure ersetzt. Zwei konservierte basische AS ermöglichen hier die Bindung von GSL. Beide Enzyme können die Bindung zwischen Schwefel und Glukose spalten und bevorzugen dafür indolische GSL (Chhajed *et al.*, 2019). PEN2 ist in Epidermiszellen von Blättern aktiv. Dort spielt es eine Rolle für die Abwehr gegenüber dem Mehltreiberpilz *Blumeria graminis hordei* (Bednarek *et al.*, 2009).

Die durch PEN2 gebildeten Abbauprodukte von 4-Methoxyindol-3-ylmethyl (4MOI3M) werden über den ABC-Transporter PEN3 aus der Zelle in den Apoplasten transportiert und wirken dort als antimikrobielle Toxine (Lipka *et al.*, 2005). PYK10 ist in der Wurzel lokalisiert (Nakano *et al.*, 2017). Myrosinasen sind jedoch nicht allein für die Pflanzenabwehr von Bedeutung. Die beiden β -Glukosidasen BGLU28 und BGLU30 sind für den Abbau von GSL bei Sulfatmangel verantwortlich (Zhang *et al.*, 2020). So dienen GSL der Pflanze als Schwefel- und Stickstoffreserve.

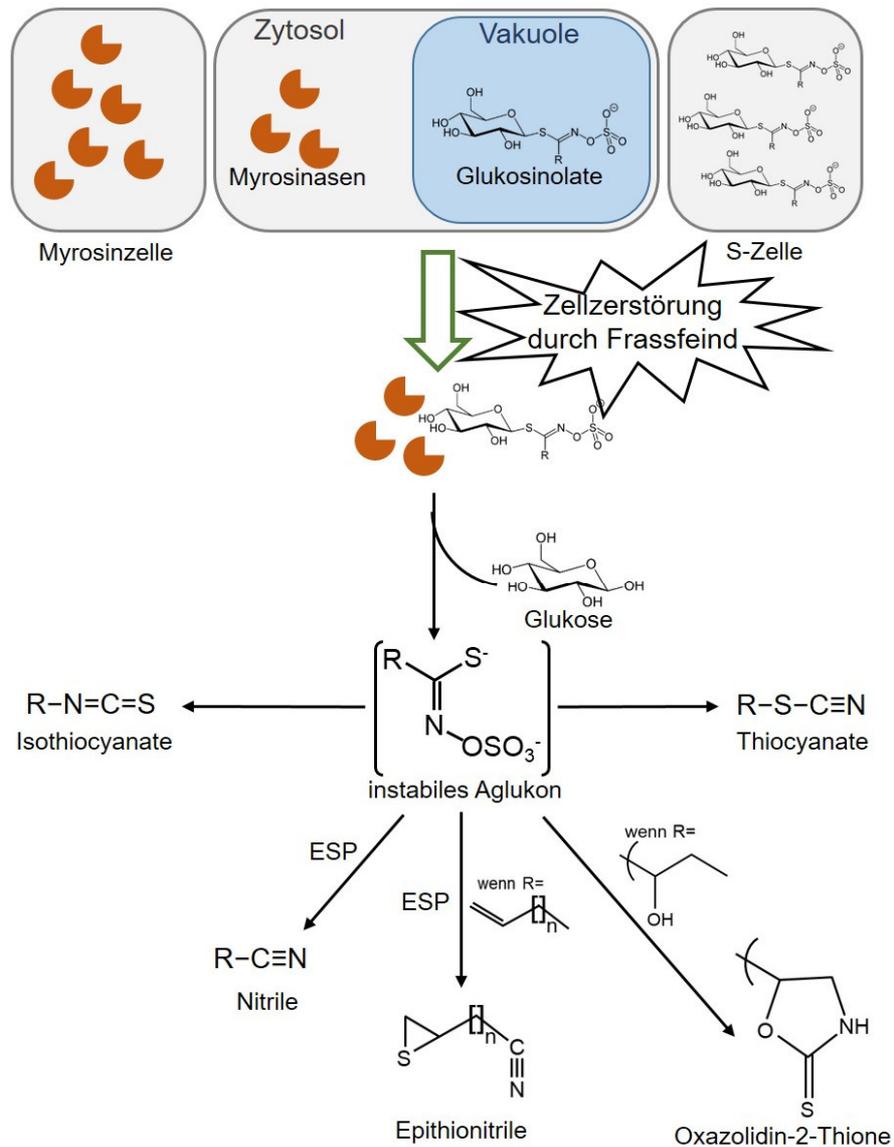


Abb. 3: Schema des Glukosinolat-Myrosinase-Systems („Senfölbombe“)

Glukosinolate und Myrosinasen werden getrennt gespeichert. Dies kann durch die Akkumulation in spezialisierten Zellen oder durch intrazelluläre Separation erreicht werden. Nach dem Zusammentreffen von GSL und Myrosinasen werden aus dem instabilen Aglukon durch nonenzymatische Umlagerungen oder über ESPs (*Ethiospecifier* Proteine) unterschiedliche bioaktive Verbindungen gebildet.

Die prominenteste Funktion von GSL ist die Abwehr von Fraßfeinden. Vor allem Isothiocyanate wirken auf diese toxisch (Wittstock *et al.*, 2003). Damit die Bildung der reaktiven Verbindung nur im Falle einer Attacke stattfindet, werden Myrosinasen und GSL getrennt in der Pflanze gespeichert. GSL werden in hoher Konzentration in *sulfur-rich cells* (S-Zellen) akkumuliert. Diese langezogenen Zellen befinden sich in Blättern um das Leitgewebe sowie im Blütenstiel zwischen Phloem und der Endodermis (Koroleva *et al.*, 2000; Koroleva *et al.*, 2010). Myrosinasen sind dagegen in hoher Konzentration in den Myrosinzellen gespeichert (Chhajer *et al.*, 2019). Diese Idioblasten sind assoziiert mit dem Leitgewebe in den Blättern, sowie in anderen Pflanzenorganen (Ueda *et al.*, 2006; Shirikawa & Hara-Nishimura, 2018). So findet man sie auch in der Nähe von S-Zellen. Neben dieser interzellulären Verteilung ist auch die intrazelluläre Trennung von Myrosinasen und GSL essenziell für ihre Funktion. Während GSL vorrangig in der Vakuole gespeichert werden, befinden sich die Myrosinasen im Zytosol (Bones & Rossiter, 1996). Durch die mechanische Einwirkung bei einer Attacke von Fraßfeinden werden die Zellen zerstört, die beiden Komponenten treffen aufeinander und bilden die reaktiven Abbauprodukte wie Isothiocyanate. Dieses GSL-Myrosinase-System wird auch als „Senfölbombe“ bezeichnet (Lüthy & Matile, 1984; Kissen *et al.*, 2009).

Die daraufhin gebildeten Isocyanate, aber auch intakte GSL und Myrosinasen, werden von den Schädlingen in großer Menge relativ zur Körpermasse aufgenommen. Isothiocyanate sind durch ihre $-N=C=S$ -Gruppe stark elektrophile Verbindungen. Ihre biologische Wirkung erzielen sie wahrscheinlich vor allem durch die Reaktion des Kohlenstoffs mit zellulären nucleophilen Verbindungen. Aminogruppen spielen dabei wohl die größte Rolle. So reagieren sie leicht mit Aminogruppen von Proteinen. Darüber hinaus können Disulfidbindungen in Proteinen von Isothiocyanaten aufgespalten werden (Kawakishi & Kaneko, 1985 & 1987). Damit beeinträchtigen sie die Struktur und Funktion von Proteinen. Ausserdem führten Isothiocyanate bei Experimenten in Zellkulturen zu einem Rückgang von GSH und weiteren Thiolen, die eine wichtige Rolle beim Schutz von Zellen gegen oxidativen Stress spielen (Zhang *et al.*, 2005). Weiterhin zeigten Versuche, dass Isothiocyanate zu erhöhtem Aufkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Schädigungen von Mitochondrien führen können. All das resultiert in erhöhtem oxidativen Stress für die Zellen, was zu DNA-Schädigungen oder sogar zum Zelltod führen kann. Diese toxische Wirkung auf Fraßfeinde ist mehrfach demonstriert worden. In Präferenzexperimenten fressen Raupen eher Pflanzen mit geringerem GSL-Gehalt (Levy *et al.*, 2005). Ausserdem kann man einen negativen Effekt auf das Wachstum von Fraßfeinden feststellen. Raupen, die sich von Pflanzen mit hohem GSL-Gehalt ernähren, weisen eine geringere Größe auf, als Artgenossen auf Pflanzen mit weniger Abwehrstoffen. Um die Bildung von Isothiocyanaten zu verhindern oder deren negativen Folgen zu umgehen, haben vor allem Spezialisten, die sich nur von einer oder wenigen Pflanzenarten ernähren, verschiedene Mechanismen entwickelt. Die Raupe der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) bildet eine Sulfatase, die GSL durch Abspaltung des Sulfats zu Desulfo-GSL umwandelt. Letztere werden von Myrosinasen nicht umgesetzt und einfach ausgeschieden (Ratzka *et al.*, 2002). Eine andere Strategie findet man bei der Raupe des kleinen Kohlweißlings (*Pieris rapae*). Sie besitzt ein Enzym, das eine Funktion ähnlich der ESPs besitzt und die Bildung von Nitrilen nach der Spaltung von GSL begünstigt, um so weniger Isothiocyanate zu bilden (Wittstock *et al.*, 2004).

Neben dem abwehrenden Effekt können GSL auch als Erkennungsmittel wirken. Die Abbauprodukte können verschiedene Spezialisten anlocken. Bei einem Feldversuch zeigte sich, dass Flohkäfer (*Phyllotreta sp.*) und Rüsselkäfer (*Ceutorhynchus sp.*) von Isothiocyanaten angezogen wurden (Görnitz, 1956). Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass für die anziehende Wirkung die genaue Zusammensetzung der Stoffe von Bedeutung ist. Vermutlich erkennen Insekten daran bestimmte Brassicales Arten. Für die Pflanze hat das zum einen den negativen Effekt, dass sie von spezialisierten Fraßfeinden als Nahrungsquelle und Ort der Eiablage gefunden werden (Miles *et al.*, 2005). Zum anderen können auch natürliche Feinde der Schädlinge die Pflanzen so identifizieren. Die Brackwespe *Cotesia*

rubeluca ist ein Parasitoid des großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae*). Sie legt ihre Eier in den lebenden Raupen des Falters ab. Die Larven ernähren sich von der Hämolymphe des Wirts, was schließlich zu dessen Tod führt. Die Wespe wird auf ihrer Suche nach den Raupen durch Isothiocyanate geleitet, die durch den Fraß an der Pflanze freigesetzt wurden (Geervliet *et al.*, 1994). Für die Kohlweißling-Brackwespe (*Cotesia glomerata*) dient der Kot und das Gespinnst der Raupen zusätzlich zu zerstörten Blattgeweben als Orientierung (Mattiacci & Dicke, 1995). So können GSL und ihre Abbauprodukte als „Hilferuf“ der Pflanze an Nützlinge dienen.

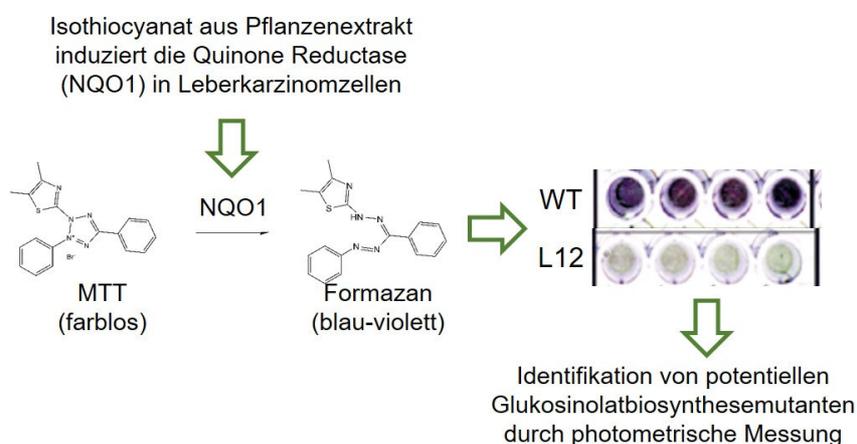
Für den Menschen sind GSL und ihre Abbauprodukte als potenzielle antikarzinogene und chemoprotektive Verbindungen wertvoll (Juge *et al.*, 2007). Bereits in den 1970er Jahren wurde diese positive Wirkung von Isothiocyanaten auf die Gesundheit beschrieben (Wattenberg, 1977). Später konnte in einer Reihe von Experimenten mit Nagetieren eine antikarzinogene Wirkung in mehreren Organen wie Darm, Lunge, Magen und Blase beobachtet werden (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012). Dieser Effekt entsteht durch mehrere Wirkungen der Isothiocyanate wie die erhöhte Expression von detoxifizierenden Phase-2-Enzymen, die Inhibierung des Zellzyklus und Induktion von Apoptose (Gamet-Payraastre, 2006). Durch Isothiocyanate wird die Aktivität von elektrophilen Prokarzinogenen inhibiert, welche Schäden an Proteinen und der DNA verursachen können. Sie induzieren die Transkription von zytoprotektiven Phase-2-Enzymen, die die Detoxifizierung durch die Bindung von nukleophilen Verbindungen wie GSH an die elektrophilen Verbindungen katalysieren (Talalay *et al.*, 1978). Brokkoliextrakt wurde als wirkungsvollster Aktivator für die Transkription der *NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1* (NQO1) in Leberkarzinomzellen von Mäusen identifiziert (Prochaska *et al.*, 1992). Als wichtigste bioaktive Verbindung wurde dabei das Isothiocyanat Sulforaphan beschrieben, das aus 4-methylsulfinylbutyl (4MSOB) gebildet wird (Zhang *et al.*, 1992). Sulforaphan wurde daraufhin das am meisten untersuchte Isothiocyanat als potenter Aktivator für zytoprotektive Enzyme bei Säugetieren und dem Menschen. So wurden viele Studien zur Wirkung auf die menschliche Gesundheit mit Brokkolisprossen-Präparaten durchgeführt (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012). Dabei zeigte sich unter anderem, dass Isothiocyanate den Metabolismus und die Ausscheidung von Prokarzinogenen aus der Umwelt begünstigen können (Kensler *et al.*, 2005; Kensler *et al.*, 2012). Diese Studien legen nahe, dass der Verzehr von Brokkoli aufgrund der darin enthaltenen GSL durch die erhöhte Detoxifizierung den Körper vor der schädlichen Wirkung von Umweltgiften schützen kann.

5 Screen für *glucosinolate content and composition (gcc)*-Mutanten

Das GSL-Myrosinase-System der Brassicales gehört zu den am besten untersuchten chemischen Pflanzenabwehrmechanismen mit Bedeutung für die menschliche Ernährung und Gesundheit. Die genaue Kenntnis aller Schritte der Biosynthese macht den GSL-Stoffwechsel zu einem sehr gut geeigneten Modellprozess, um die Regulierung des spezialisierten Stoffwechsels in Pflanzen zu erforschen (Sonderby *et al.*, 2010; Halkier & Gershenzon, 2006). Mit dem Ziel neue Regulatoren des GSL-Metabolismus in *A. thaliana* zu identifizieren, wurde in Vorarbeiten ein Screen zur effektiven Bestimmung des GSL-Gehalts bei einer großen Anzahl an Individuen etabliert (Gross *et al.*, 2000). Der Screen ermöglichte die Suche nach Mutanten mit verändertem GSL-Gehalt in Mutantenpopulationen, welche in der Regel mehrere tausend Individuen umfassen. Die Grundlage für diesen Test war die aktivierende Wirkung von Sulforaphan auf die Quinon Reduktase NQO1 in Leberkarzinomzellen (Hepa 1c1c7) von Mäusen (Prester *et al.*, 1993). NQO1 spielt bei der Detoxifizierung von Karzinogenen eine Rolle. Das Isothiocyanat Sulforaphan ist von 4MSOB abgeleitet, dem häufigsten GSL in

A. thaliana.

Im Screen wurde der Grad der NQO1-Induktion durch Sulphoraphan und die Aktivität der Reduktase über eine Quinon-abhängige Farbreaktion bestimmt (Prochaska & Santamaria, 1988). Dabei wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch NQO1 zu dem blau-violetten und wasserunlöslichen Formazan reduziert. Nach Zugabe von Myrosinase und Pflanzenextrakten bzw. Blattstücken aus WT-Pflanzen und GSL-Biosynthesemutanten zeigte sich in den Hepa 1c1c7 Zellkulturen eine 4MSOB-abhängige NQO1-Induktion (Gross *et al.*, 2000). Durch die unterschiedliche Intensität der Färbereaktion konnten in dem Screen über photometrische Messungen der Zellkulturen potenzielle Mutanten mit verändertem GSL-Gehalt unter der hohen Anzahl an Kandidaten ermittelt werden (Abb. 4). Durch anschließende genauere Bestimmung des GSL-Gehaltes potenzieller Mutanten konnte gezeigt werden, dass eine geringe NQO1-Aktivität, ausgelöst durch geringere 4MSOB-Konzentration, mit einer verringerten Abundanz weiterer, vor allem aliphatischer GSL, einhergeht (Grubb *et al.*, 2002). Auf diese Art und Weise konnten eine Reihe von *glucosinolate content and composition (gcc)*-Mutanten mit verändertem GSL-Profil identifiziert werden.

**Abb. 4: Funktionsweise des Screens für *gcc*-Mutanten**

Das Isothiocyanat Sulforaphan wird ausgehend von 4MSOB gebildet und induziert die Aktivität der Quinone Reduktase NQO1 in Leberkarzinomzellen. So aktivieren 4MSOB-haltige Pflanzenextrakte in Leberkarzinomzellkulturen die NQO1-abhängige Umsetzung von farblosen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blau-violettem Formazan. Auf der rechten Seite ist die Färbung der Zellkulturen nach Zugabe von Pflanzenextrakt aus Wildtyp (WT) und einer potenziellen Mutantenlinie mit geringem GSL-Gehalt (L12) gezeigt (Grubb *et al.*, 2002).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von zwei Mutantenlinien, die in diesem Screen identifiziert wurden. Die Linien stammen aus verschiedenen Mutantenpopulationen. Die *gcc8*-Mutante zeigt einen stark verringerten GSL-Gehalt und wurde in einer Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutantenpopulation identifiziert (Grubb *et al.*, 2002). Für die Generierung dieser Mutantenpopulation wurden Samen mit dem Mutagen EMS behandelt und auf die Weise viele, zufällige Einzelnukleotidaustausche induziert. Für einen zweiten Screen wurde Saatgut verwendet, in dessen Erbgut über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Übertragung *activation tagged* T-DNA-Insertionen eingefügt wurden (Wang *et al.*, 2002). Dieser Prozess findet ebenfalls ungerichtet statt. Aus dieser Mutantenpopulation wurde über den Screen die *gcc7*-Mutante mit erhöhtem GSL-Gehalt identifiziert (Levy *et al.*, 2005). Durch anschließende Sequenzierung der Mutanten konnte *gcc8* als neues *knock out*-Allel des Sulfattransporters *SULTR1;2* beschrieben werden (Ramamoorthy, 2015), während in *gcc7* das

später als *IQ67-Domain 1 (IQD1)* bezeichnete Gen überexprimiert war (Levy *et al.*, 2005). Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von SULTR1;2 und IQD1 für die GSL-Biosynthese und den Sulfathaushalt in *A. thaliana* zu untersuchen. Da die Proteine sehr unterschiedliche Funktionen haben, wird die Betrachtung der Mutanten im Folgenden in getrennten Abschnitten vorgenommen.

Teil II – SULTR1;2 (*gcc8*)

1 Einleitung

1.1 Kartierung von *gcc8* - *SULTR1;2*

Über Sequenzierung der nächsten Generation (*next generation sequencing*) wurde die Position der EMS-induzierten Mutation in *gcc8* lokalisiert (Ramamoorthy, 2015). Bei der Sequenzierung über alle fünf Chromosomen wurde ein Bereich lokalisiert, der signifikant weniger Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP – *single nucleotide polymorphisms*) aufweist als der Rest (Abb. 5). 20 SNP in dieser Region wurden als Kandidaten für die *gcc8*-Mutation angesehen. Mehrere Kandidaten konnten bei genauerer Betrachtung ausgeschlossen werden, da sie sich in intergenetischen Bereichen bzw. Introns befanden oder es sich um synonyme Mutationen handelte. Von den übrigen fünf Kandidaten waren zwei SNP nicht in der Kartierungspopulation enthalten. Zwei weitere Mutationen hatten keinen Einfluss auf den GSL-Gehalt. Diese Loci wurden daher ausgeschlossen. Die Mutation, welche zum *gcc8*-Chemotyp führt, konnte auf diese Weise in At1g178000 lokalisiert werden. Dieser Genlocus kodiert den Sulfattransporter SULTR1;2. Er hat zwölf TMD und eine C-terminale STAS-Domäne (Zhang *et al.*, 2014). In *gcc8* führt ein Austausch von Guanin (G) zu Adenosin (A) in der Nukleotidsequenz zu einem vorzeitigen Stopkodon an Position 81 in der AS-Sequenz. Der N-terminale Teil, der aus der Translation dabei hervorgeht, ist sehr wahrscheinlich funktionslos. Es sind bereits weitere *sultr1;2*-Allele mit Punktmutationen bekannt wie *sel1-15* und *sel1-16*, welche die Funktion des Transporters ebenfalls beeinträchtigen (Zhang *et al.*, 2014). Allerdings wird hier die gesamte Gensequenz während der Genexpression transkribiert und translatiert. Da SULTR1;2 der wichtigste Transporter in *A. thaliana* für die Sulfataufnahme aus dem Boden ist, erscheint eine verringerte Konzentration von schwefelhaltigen Verbindungen wie GSL in Pflanzen ohne funktionellem SULTR1;2 einleuchtend (Gigolashvili & Kopriva, 2014). Darüber hinaus wird SULTR1;2 allerdings auch eine Rolle in der Signalkette für die Sulfatmangelantwort in der Pflanze nachgesagt (Zheng *et al.*, 2014). Welchen Einfluss einzelne AS für eine Signalfunktion haben, ist bisher unbekannt.

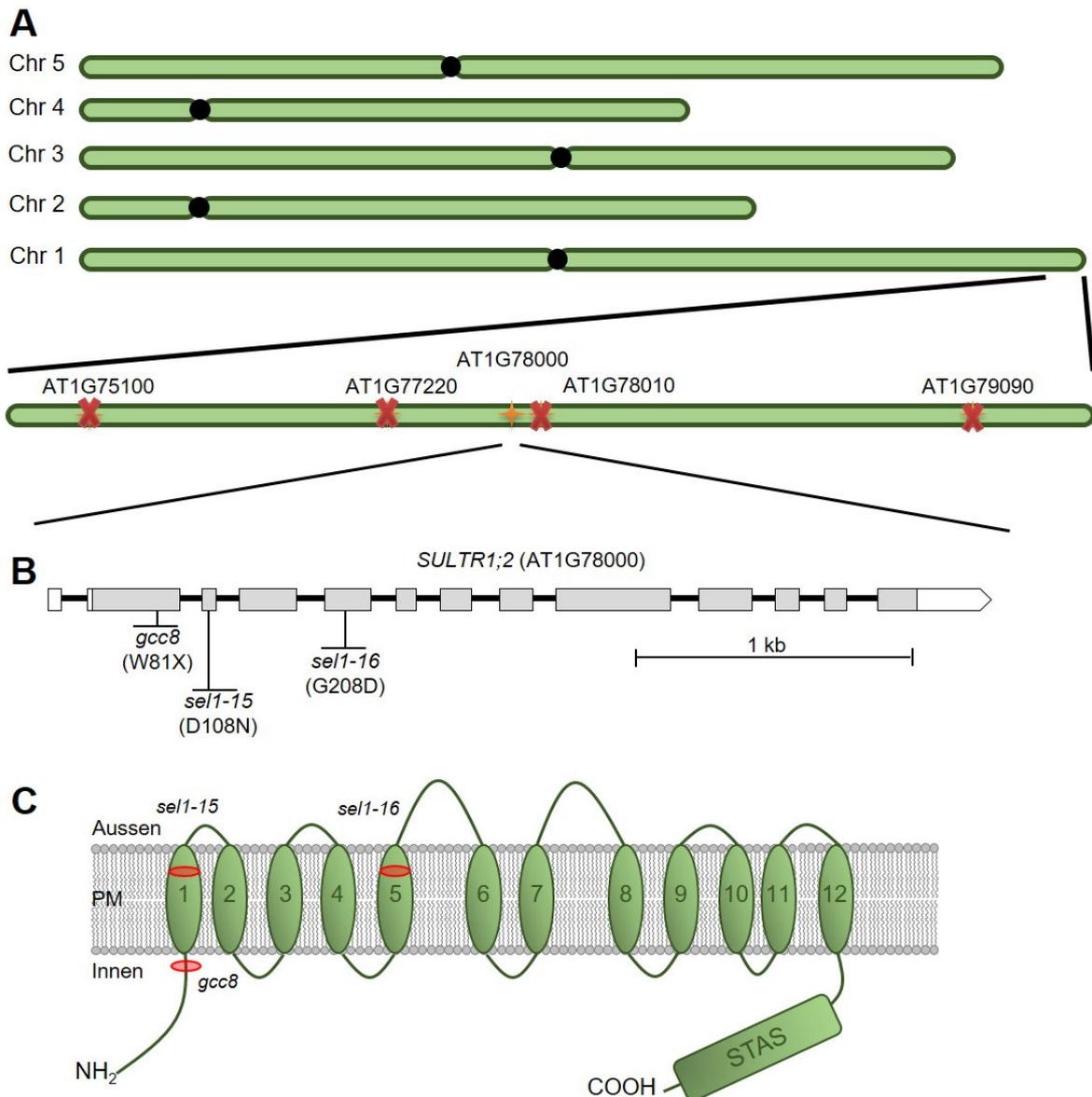


Abb. 5: Kartierung und Modell von *SULTR1;2* im Genom von *A. thaliana*

A Die durch Sequenzierung der nächsten Generation ermittelte Position von *gcc8* am Ende von Chromosom 1. Dargestellt sind ebenfalls Loci, welche als potenzielle *gcc8*-Kandidaten getestet und ausgeschlossen wurden. **B** Genmodell von *SULTR1;2* mit Position und AS-Austausch der in der Arbeit verwendeten Mutantenlinien. Dargestellt sind Exons (graue Boxen), Introns (schwarze Balken) und nichttranslatierte Regionen (weiße Boxen). **C** Proteinmodell von *SULTR1;2* nach Zhang *et al.* (2014). Die transmembranen Domänen sind nummeriert (1-12), die STAS-Domäne befindet sich am C-Terminus, PM = Plasmamembran. Die Positionen der in B gezeigten Mutationen sind mit rot markiert.

1.2 SULTR1;2 als Transzeptor in *Arabidopsis thaliana*

Pflanzenzellen brauchen Kanäle, Transporter und Rezeptoren für ihre Integrität und die Versorgung mit Nährstoffen. Diese Proteine befinden sich in der Plasmamembran und besitzen Domänen außerhalb und innerhalb der Zelle. Kanäle und Transporter sind in der Lage nur bestimmte Verbindungen die Membran passieren zu lassen. Die Selektivität kann durch die Interaktion mit dem Liganden und schlicht durch die Größe des Kanals gewährleistet werden. Bei Transportern wird durch die Bindung des zu transportierenden Moleküls eine Konformationsänderung bewirkt. Auf diese Weise wird der Weg für diese oder chemisch ähnliche Verbindungen freigemacht. Rezeptoren weisen strukturelle Ähnlichkeit zu Transportern auf. Auch sie binden bestimmte Moleküle außerhalb der Zelle. Die anschließende Konformationsänderung bewirkt eine Signalweiterleitung ins Zellinnere oft über Proteine, welche mit der zellinternen Domäne des Rezeptors interagieren (Abb. 6; Diallinas, 2017).

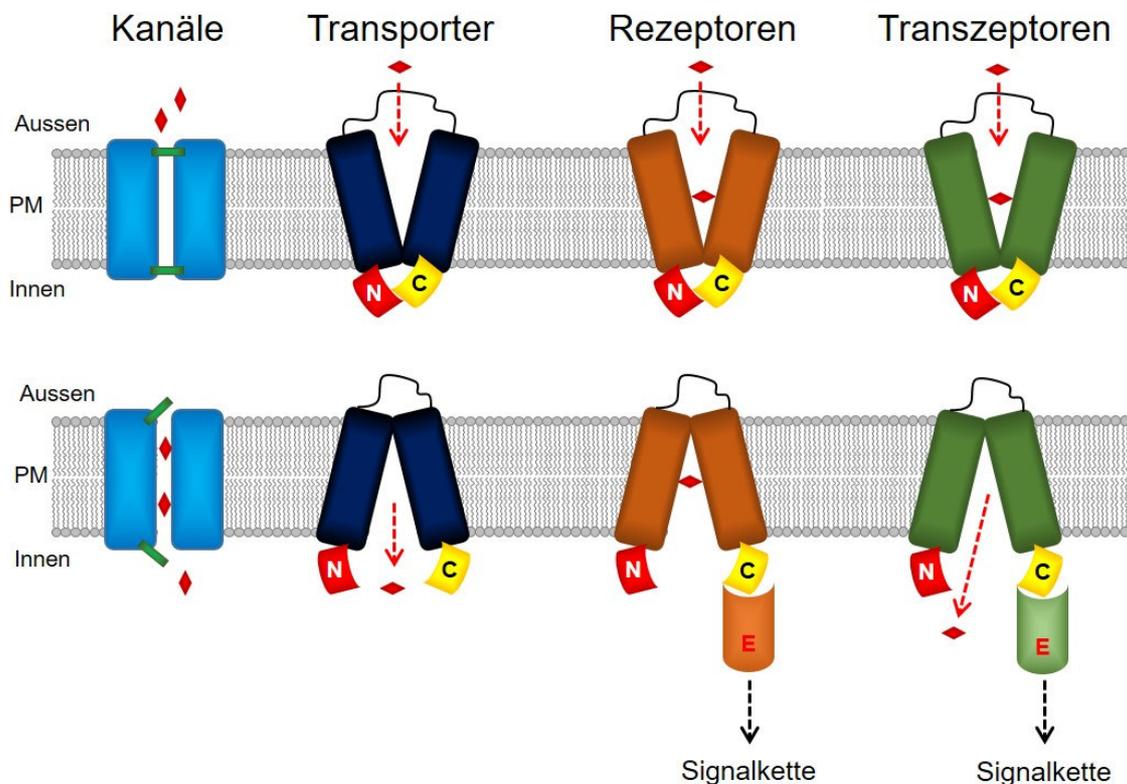


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise von Kanälen, Transportern, Rezeptoren und Transzeptoren

Der Transport über Kanäle kann über das Öffnen und Schließen kontrolliert werden (grüne Rechtecke). Für Transporter, Rezeptoren und Transzeptoren ist der Wechsel von nach außen geöffneter (oben) zu nach innen geöffneter Konformation (unten) dargestellt. Die Konformationsänderung wird durch die Bindung des Substrats (rote Rhomben) initiiert. In dem Schema wird die Domäne am C-Terminus von Rezeptoren und Transzeptoren als Interaktionsdomäne mit zellinternen Effektoren für die Signalweiterleitung bei nach innen geöffneter Konformation dargestellt. Die Interaktion induziert eine zellinterne Signalweiterleitung. PM = Plasmamembran, C = C-Terminus, N = N-Terminus, E = Effektoren für zellinterne Signalweiterleitung. Darstellung verändert nach Diallinas (2017).

In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere Proteine beschrieben, welche die Funktion von Transportern und Rezeptoren verbinden. Sie wurden daraufhin als Transzeptoren bezeichnet. Bei ihnen wird durch die Konformationsänderung sowohl der Transport des Moleküls bewerkstelligt als auch eine Signalkette im Inneren der Zelle in Gang gesetzt. Das erste Mal wurde diese Doppelfunktion beim AS-Transporter *General amino acid permease 1* (Gap1) in *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet. Neben der Transportfunktion ist Gap1 auch für die Aktivierung des Proteinkinase K (PKA)-Signalweges notwendig (Donaton *et al.*, 2003). Dies konnte in Zellen, welche zunächst unter AS-Mangel wuchsen, nach der Zugabe von AS gezeigt werden. Ein weiterer Transzeptor in Hefe ist der Phosphattransporter PHO84. Auch er aktiviert den PKA-Signalweg nach Phosphatzugabe zu Zellen, welche unter Phosphatmangel angezogen wurden. Außerdem konnte bei beiden Transzeptoren die Signal- und die Transportfunktion voneinander entkoppelt werden. Demonstriert wurde das mit den nicht transportierten Agonisten L-Leu-Gly bei Gap1 (Popova *et al.*, 2010) und Glycerol-3-Phosphat bei PHO84 (van Zeebroeck *et al.*, 2009). Diese Verbindungen sind chemisch ähnlich zu den transportierten AS bei Gap1 bzw. zu Phosphat bei PHO84. Obwohl sie die Membran nicht passieren, wurde nach ihrer Zugabe der PKA-Signalweg aktiviert. Also war der Transport der Verbindungen für die Signalkette nicht notwendig, sondern allein die Bindung an die AS- bzw. Phosphatbindestelle der Membranproteine. Die Sulfattransporter SUL1 und SUL2 in *S. cerevisiae* sind ortholog zu SULTRs in Pflanzen und zeigen ebenfalls Eigenschaften von Transzeptoren (Kankipati *et al.*, 2015). Wenn Hefezellen auf Glukosemedium unter Sulfatmangel angezogen werden, kommt es zu einem Wachstumsstopp und die Zellen verharren in der G₀-Phase des Zellzyklus. Außerdem wird der PKA-Signalweg gedrosselt, was zu erhöhter Stresstoleranz und Akkumulation von Glykogen und Trehalose als Schutz- und Reservekohlenhydrate führt. Bei anschließender Zugabe von Sulfat kommt es zur schnellen Aktivierung verschiedener Zielproteine über den PKA-Signalweg. So wird beispielsweise Trehalase aktiviert, welche die Trehalosereserven mobilisiert. Die Trehalosemobilisierung ist somit ein gutes Maß für die Nährstoff-induzierte Aktivierung des PKA-Signalweges *in vivo* (Giots *et al.*, 2003).

In der unter Sulfatmangel angezogenen Hefedoppelmutante *sul1Δsul2Δ* wurde nach Sulfatzugabe eine geringere Trehalosemobilisierung sowie eine erhöhte Hitzstresstoleranz im Vergleich zum WT festgestellt (Kankipati *et al.*, 2015). Für WT-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des nichttransportierten Agonisten D-Glucosamin-2-Sulfat anstatt Sulfat ebenfalls zur Aktivierung des PKA-Signalweges führt. Genauso wie SULTRs sind auch SULs Symporter und transportieren Protonen zusammen mit Sulfat durch die Membran (Cherest *et al.*, 1997). Die essenziellen Protonenbindestellen in den TMDs sind oft in den Transporterfamilien konserviert. Die wahrscheinlichsten AS, die bei der Protonenbindung eine Rolle spielen, sind die geladenen Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D). Der Austausch von Glutaminsäure zu Glutamin (Q) an der Position 427 in SUL1 (SUL1^{E427Q}) und 443 in SUL2 (SUL2^{E443Q}) führt zum Verlust der Transportfunktion der Proteine. Zellen von *sul1Δsul2Δ*-Mutanten, welche entweder SUL1^{E427Q} oder SUL2^{E443Q} exprimierten, zeigten nach Sulfatzugabe allerdings eine Aktivierung des PKA-Signalweges (Kankipati *et al.*, 2015). SUL1^{E427Q} und SUL2^{E443Q} funktionieren also ausschließlich als Sulfatsensor. So konnte auch hier Transport und Signalfunktion voneinander entkoppelt werden. Interessanterweise ist die Position von Glutaminsäure auch in *Arabidopsis* SULTR-Proteinen konserviert. Das könnte bedeuten, dass sie auch in Pflanzen für den Transport essenziell sind. In *A. thaliana* ist SULTR1;2 der wichtigste Sulfattransporter für die Aufnahme von Sulfat aus dem Boden. Ähnlich wie SULs besitzen auch SULTRs mehrere TMDs mit hochkonservierten AS wie Glutaminsäure und Asparaginsäure an mehreren Positionen. Das könnte ein Hinweis sein, dass die Sulfattransporter in Pflanzen eine ähnliche Funktionsweise wie in Hefen haben. Auch in Pflanzen sind bereits Nährstofftransporter mit Sensorfunktion bekannt. In *A. thaliana* wurde für *Nitrate Transceptor 1.1* (NRT1.1) eine Transzeptorfunktion beschrieben (Bouguyon *et al.*, 2015). Der Nitrattransporter ist notwendig für die Induktion von Genen der primären

Nitratantwort wie *NRT2.1*. Diese Induktion ist unabhängig von der Nitrataufnahme. Das zeigten Analysen einer Mutante mit einer Punktmutation, welche die Transportfunktion unterdrückte (Ho *et al.*, 2009).

Nicht nur aufgrund der Ähnlichkeit zu SULs wurde auch für SULTR1;2 bereits eine mögliche Funktion als Transzeptor diskutiert (Zheng *et al.*, 2014). Die Analyse der Mutantenlinien *sel1-15* und *sel1-16* gab Hinweise auf eine mögliche Signalfunktion von SULTR1;2 (Zhang *et al.*, 2014). Die Allele wurden in β -Glucuronidase (GUS)-Reporterlinien für das Sulfatmangel Markergen β -Glucosidase 28 (*BGLU28*) identifiziert (Dan *et al.*, 2007). Bei *sel1-15* kommt es durch eine Punktmutation zu einem Austausch von Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) (D108N) in der ersten TMD und bei *sel1-16* ist in der fünften TMD Glycin (G) durch Asparaginsäure (G208D) ausgetauscht (Abb. 5). Die Asparaginsäure an der Position der *sel1-15*-Mutation ist sowohl in der ersten Gruppe der SULTR in *A. thaliana* (Abb. 14) als auch bei einigen Sulfattransportern in Reis konserviert. Das Glycin an Position 208 ist sogar bei orthologen Proteinen von *Drosophila* und dem Menschen zu finden (Zheng *et al.*, 2014). Die Mutationen beeinträchtigen die Sulfataufnahme bei SULTR1;2. Die geringere interne Sulfatkonzentration in den Pflanzen führt zu einer erhöhten *BGLU28*-Expression. Nur wenn die Pflanzen auf Medium mit hoher Sulfatkonzentration von 10 mM angezogen wurden, erreichten die Mutanten eine ähnliche interne Sulfatkonzentration wie WT-Pflanzen. Die Sulfataufnahme konnte unter diesen Bedingungen vermutlich von SULTR1;1 bewerkstelligt werden. Interessanterweise zeigten die Mutantenlinien trotz WT-ähnlicher interner Sulfatkonzentrationen weiterhin eine erhöhte *BGLU28*-Expression. *Sel1-15* und *sel1-16* verhalten sich also auch bei ausreichender Sulfatversorgung wie unter Nährstoffmangel und aktivieren die Sulfatmangelantwort. Die Aufnahme und Verarbeitung von Cystein war in den Mutanten nicht beeinträchtigt und konnte als Schwefelquelle dienen. So unterschied sich beispielsweise der GSH-Gehalt von Mutanten und WT-Pflanzen nicht, wenn sie auf Medium mit Cystein als Schwefelquelle wuchsen. Dennoch zeigten *sel1-15* und *sel1-16* eine höhere Expression von den Sulfatmangelmarkergenen *BGLU28*, *Response to Low Sulfur 1 (LSU1)* und *Sulfur Deficiency Induced 1 (SDI1)*. Die verminderte Sensitivität auf sulfatinduzierte Repression der Gene der Sulfatmangelantwort durch die Mutation in SULTR1;2 legt eine Rolle nahe, die über die Transportfunktion hinausgeht. So könnte SULTR1;2 auch als Sensor für den Sulfatstatus in der Pflanze fungieren.

Bei der Frage, wie die Signalweiterleitung in die Zelle funktioniert, könnte die zytosolische STAS-Domäne von besonderer Bedeutung sein. Strukturell ähnelt die sie dem bakteriellen anti- σ -faktor Antagonisten SpoIIAA in *Bacillus subtilis*, welcher SpoIIAB bindet (Ho *et al.*, 2003). Die STAS-Domäne ist ein gemeinsames Merkmal von Sulfattransportern der *Solute carrier 26a (SLC26A)*-Familie (Aravind & Koonin, 2000) und kann Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Mutationen oder Deletion der Domäne beeinträchtigten die Funktionalität von SULTR1;2, da sie für die Membranlokalisierung des Transporters notwendig ist (Shibagaki & Grossmann, 2006). Darüber hinaus könnte SULTR1;2 über die Interaktion von OAS-TL mit der STAS-Domäne eine sensorische und regulatorische Funktion bei der Cysteinsynthese und dem Schwefelmetabolismus spielen (Shibagaki & Grossmann, 2010; Zheng *et al.*, 2014). OAS-TL bildet mit SAT den Cystein-Synthase-Komplex und katalysiert die Cysteinsynthese aus reduziertem Sulfid (S^{2-}) und OAS. Die Bindung von OAS-TL an die STAS-Domäne, welche durch OAS begünstigt wird, führt zu erhöhter OAS-TL-Aktivität und stark reduzierter Transportaktivität von SULTR1;2 (Abb. 19). Möglicherweise kann die Pflanze über diesen Mechanismus die Sulfataufnahme drosseln, wenn nicht genügend Energie für die Sulfatreduzierung zur Verfügung steht. Ohne S^{2-} kommt es zur Akkumulation von OAS und damit zur Interaktion von OAS-gebundenem OAS-TL mit der STAS-Domäne. So wird die SO_4^{2-} -Aufnahme reduziert, obwohl möglicherweise ausreichend Nährstoffe im Boden vorhanden sind. Wenn S^{2-} wieder zur Verfügung steht, sinkt die OAS-Konzentration durch die Cysteinsynthese und die Bindung von OAS-TL und der STAS-Domäne löst sich. Durch sich wiederholende Zyklen von Interaktion und Dissoziation könnte so der interne Schwefelstatus

mit der Kapazität zur SO_4^{2-} -Reduzierung koordiniert werden. Interessanterweise ist die STAS-Domäne von SULTR1;1 nicht in der Lage die Bindung zu OAS-TL zu vermitteln. Diese Spezifität der Interaktion bestärkt die Möglichkeit einer Sensor- oder Regulatorfunktion des Sulfattransporters SULTR1;2. Der Mechanismus einer Sulfattranszeptorfunktion von SULTR1;2 ist noch zu erforschen.

1.3 Zielstellung

Da SULTR1;2 bereits als wichtigster Transporter für die Sulfataufnahme in *A. thaliana* beschrieben wurde, liegt es nahe, dass Mutationen in diesem Genlokus einen Einfluss auf den Schwefelmetabolismus haben. In dieser Studie wurde zunächst die Ursächlichkeit der *gcc8*-Mutation in SULTR1;2 für den verringerten GSL-Gehalt validiert. Weiterhin wurden die Effekte weiterer *SULTR1;2*-Allele mit *gcc8* verglichen. Dafür wurden die bereits untersuchten Mutanten *sel1-15* und *sel1-16* ebenfalls in die Analysen zum GSL-Metabolismus einbezogen. Außerdem wurde überprüft, ob *gcc8* die für *sel1*-Mutanten typische erhöhte Selenatresistenz aufweist. Um den Einfluss von *gcc8* auf den Schwefelmetabolismus der Pflanze zu untersuchen, wurden zusätzlich zu GSL auch Gehalte von zentralen Schwefelverbindungen gemessen.

In der Vergangenheit wurde bereits eine Rolle von SULTR1;2 als Sulfatsensor in der Pflanze vermutet. Diese Studie beschäftigt sich vor allem mit der GSL-Biosynthese und deren Regulation. Um die Effekte der Transport- und einer möglichen Sensorfunktion von SULTR1;2 auf den GSL-Metabolismus zu überprüfen, wurden Komplementationslinien mit unterschiedlichen SULTR1;2-Varianten etabliert und untersucht.

Damit erweitert diese Studie das Verständnis einer potenziellen Transzeptorfunktion von SULTR1;2 und bildet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zum Mechanismus der Signalfunktion. Bisher wurde kein Sulfattranszeptor in Pflanzen beschrieben. Diese Arbeit fokussiert erstmalig die Transport- und Signalfunktion von SULTR1;2 auf die Regulation des GSL-Metabolismus in *A. thaliana*.

2 Ergebnisse

2.1 Einfluss von Selenatstress auf Wurzelwachstum

Für eine funktionelle Analyse wurden *gcc8*-Mutanten auf Standard- und Sulfatmangelmedium mit bereits bekannten *sultr1;2*-Mutanten verglichen. Für mehrere *sel*-Mutanten mit anderen *sultr1;2*-Allelen wurde eine erhöhte Toleranz gegenüber Selenatstress beschrieben (Shibagaki *et al.*, 2002; El Kassis *et al.*, 2007). Um zu testen, ob für *gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16* der gleiche Effekt zu beobachten ist, wurden für die vorliegende Studie Keimlinge auf Medium mit unterschiedlichen Sulfat- bzw. Selenatkonzentrationen angezogen und anschließend die Wurzellängen verglichen (Abb. 7). Da *sel1-15* und *sel1-16* in einer *pBGLU28:GUS*-Reporterlinie identifiziert wurden, wurden sowohl Col-0 als auch *pBGLU28:GUS* als WT- bzw. Kontrolllinien in diesem Experiment verwendet.

Auf Medium mit 1,6 mM Sulfat (+S) und ohne Selenat (-Sel) wies Col-0 im Durchschnitt die längsten Wurzeln auf, während die Wurzellänge bei *gcc8* signifikant kürzer war. Die Kontrolllinie *pBGLU28:GUS*, *sel1-15* und *sel1-16* unterschieden sich dagegen nicht untereinander. Für die Keimlinge von Col-0 und *pBGLU28:GUS*, die auf Medium ohne Sulfat (-S) und -Sel angezogen wurden, wurde kein Unterschied bei der Wurzellänge beobachtet. Alle Mutantenlinien waren dagegen signifikant kürzer. Mit 10 µM Selenat (+Sel) bei gleichzeitiger Abwesenheit von Sulfat im Medium wurden aufgrund der Akkumulation von Selenat und dessen toxischer Wirkung für alle Genotypen sehr kurze Wurzeln beobachtet. Die geringsten Wurzellängen zeigten der WT und die Kontrolllinie, während die Mutanten eine geringere Inhibierung des Wurzelwachstums aufwiesen. Im Vergleich zu Col-0 und *pBGLU28:GUS* waren die Wurzeln von *gcc8* und *sel1-15* im Durchschnitt doppelt und bei *sel1-16* etwa dreimal so lang.

Die erhöhte Selenatstressresistenz in den *sultr1;2*-Mutanten ist auf die geringere Transportkapazität in der Wurzel zurückzuführen. Der *knock out* von *SULTR1;2* erschwert die Sulfataufnahme über die Wurzel, was möglicherweise der Grund für das verringerte Wurzelwachstum bei *gcc8* bei ausreichender Sulfatverfügbarkeit (+S) sein könnte. Ohne Sulfat im Medium müssen die Pflanzen interne Sulfatquellen mobilisieren. Wegen der verringerten Sulfataufnahmekapazität der Mutanten können diese vermutlich weniger sulfathaltige Verbindungen in den Samen speichern und die Keimlinge zeigen daher den beobachteten Wurzelwachstumsdefizit verglichen mit dem WT auf -S/-Sel-Medium. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten deutet darauf hin, dass die verschiedenen Mutationen unterschiedlich starke Effekte haben. Die verringerte Wurzellänge von *gcc8* im Vergleich zu Col-0 unter Standardbedingungen könnte auf das vorzeitige Stopkodon in *gcc8* zurückzuführen sein. Die Mutation unterbindet die Bildung von *SULTR1;2* vollständig. In *sel1-15* und *sel1-16* könnte dagegen möglicherweise noch partielle Funktionalität vorhanden sein. Eine sekundäre Mutation in *gcc8*, die zu einer Veränderung im Wurzelwachstum führt, ist unwahrscheinlich, da die Mutante mehrmals rückgekreuzt wurde.

Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur kann Selenat anstelle von Sulfat über *SULTRs* in die Wurzel aufgenommen werden (El Kassis *et al.*, 2007). Auf -S/+Sel-Medium nehmen Col-0 und *pBGLU28:GUS* ausschließlich Selenat über die Wurzel auf, was eine starke Inhibierung des Wurzelwachstums zur Folge hat. Die Mutanten können den Transport aus dem Medium nur über *SULTR1;1* bewerkstelligen. Das führt ebenfalls zu einem stark verringerten Wurzelwachstum verglichen mit dem Wachstum auf Medium ohne Selenat. Allerdings mobilisieren die Mutanten möglicherweise im größeren Maße die internen Sulfatquellen, was das Ausmaß der Inhibierung des Wurzelwachstums verringern könnte.

Diese Ergebnisse zeigen die erhöhte Toleranz gegenüber Selenatstress bei *gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16* und bestätigen *gcc8* als *sultr1;2-knock out*-Mutante, die sich ähnlich wie bereits bekannte Mutanten verhält.

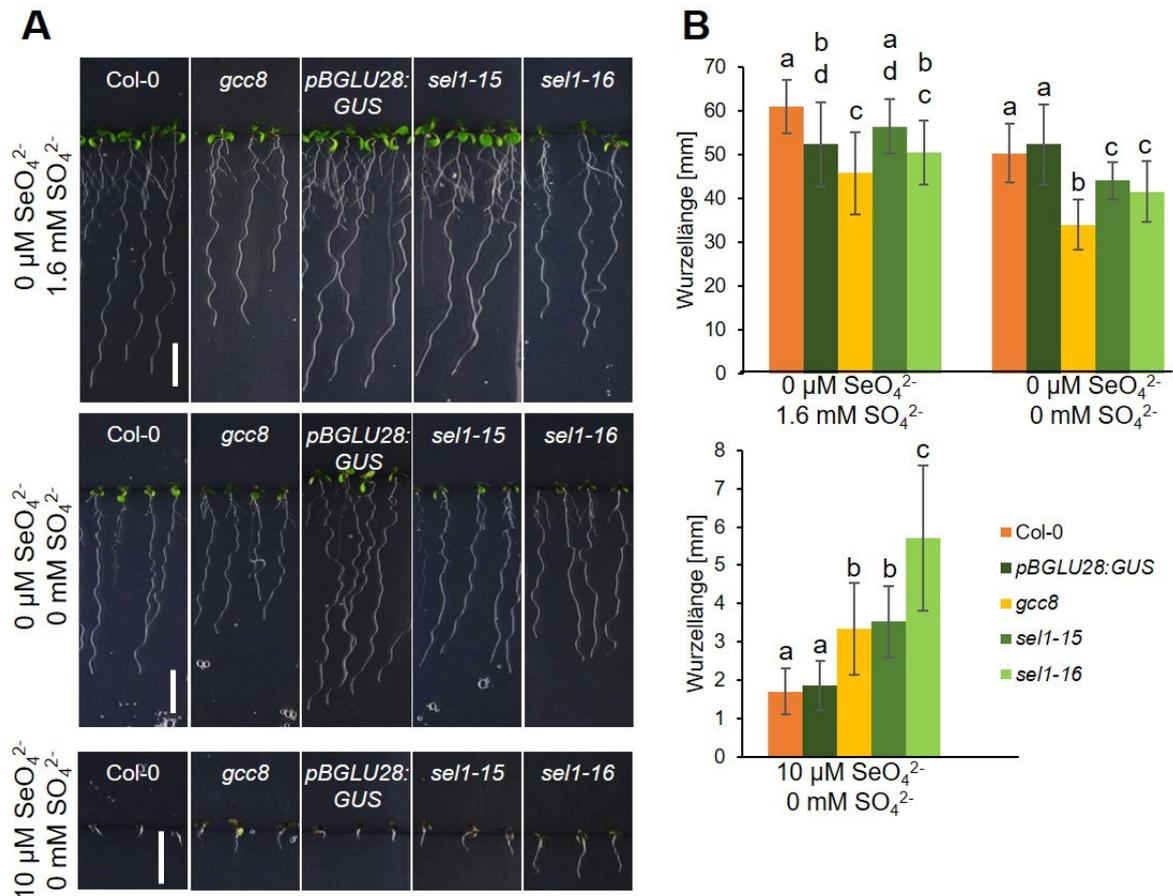


Abb. 7: Wurzellänge von *sultr1;2*-Mutantenlinien bei Selenatstress und Sulfatmangel

A Wurzelwachstum bei zwei Wochen alten Keimlingen von Col-0, *gcc8*, *pBGLU28:GUS*, *sel1-15* und *sel1-16* vertikal angezogen auf ATS-Medium mit unterschiedlicher Selenat- und Sulfatkonzentrationen. Maßstab = 1 cm **B** Wurzellänge der in A gezeigten Linien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden 10 - 19 Pflanzen pro Genotyp und Behandlung gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Behandlung, berechnet durch einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

2.2 Glukosinolatgehalt und Allelismustest

Um zu testen, ob die rezessive *gcc8*-Mutation in *SULTR1;2* für den reduzierten GSL-Gehalt ursächlich ist, wurde ein Allelismustest mit den bekannten *sultr1;2-knock out*-Allelen *sel1-15* und *sel1-16* durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen manuell gekreuzt. Alle Samen der F1-Generation waren damit heterozygot für die parentalen *SULTR1;2*-Allele. Über den Allelismustest wurde der Einfluss der Allele auf den GSL-Gehalt getestet. Dazu erfolgte die Messung der GSL-Gehalte von Keimlingen der erzeugten F1-Generation sowie der homozygoten *sultr1;2*-Mutanten und Col-0 im Sproß und in der Wurzel (Abb. 8). Mithilfe von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) wurden dabei 12 aliphatische (3-Methylthiopropyl, 3-Methylsulfinylpropyl, 6-Methylsulfinylhexyl, 6-Methylthiohexyl, 5-Methylthiopentyl, 5-Methylsulfinylpentyl, 7-Methylsulfinylheptyl, 7-Methylthioheptyl, 8-Methylthiooctyl, 8-Methylsulfinyloctyl, 4-Methylthiobutyl, 4-Methylsulfinylbutyl) und 4 indolische (4-Hydroxyindol-3-ylmethyl, 4-Methoxyindol-3-ylmethyl, 1-Methoxyindol-3-ylmethyl, Indol-3-ylmethyl) GSL erfasst. Diese sind die häufigsten GSL im *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (Brown *et al.*, 2003).

Im Spross zeigten Col-0 und die drei Rückkreuzungen (Col-0 x *gcc8*; Col-0 x *sel1-15*; Col-0 x *sel1-16*) den gleichen Gesamtgehalt von aliphatischen GSL (Abb. 8A). Der Gehalt in den homozygoten Mutantenlinien (*gcc8*, *sel1-15*, *sel1-16*) betrug etwa ein Drittel im Vergleich zum WT. Die Kombinationen der verschiedenen *sultr1;2*-Allele in der F1-Generation (*gcc8* x *sel1-15*; *gcc8* x *sel1-16*; *sel1-15* x *sel1-16*) zeigten vergleichbare Werte. Für die indolischen GSL ist der Unterschied im Spross zwischen den verschiedenen Genotypen geringer als für die aliphatischen GSL (Abb. 8B). Im WT wurde die höchste Konzentration gemessen. Die Werte der homozygoten Mutanten und der Rückkreuzungen lagen darunter, waren aber vergleichbar mit Col-0.

In der Wurzel wurde bei Col-0 der höchste Wert für die Konzentration von aliphatischen GSL gemessen. Die homozygoten Mutantenlinien wiesen ein Viertel bis ein Fünftel der WT-Konzentration auf und auch die F1-Kreuzungen der Mutanten zeigten ähnliche Werte. Bei den heterozygoten F1-Kreuzungen wurden verringerte aliphatische GSL-Gehalte im Vergleich zu Col-0 beobachtet, was für eine *SULTR1;2*-Dosisabhängigkeit des Chemotyps in der Wurzel spricht. Bei allen Linien wiesen die GSL 4-Methylsulfinylbutyl (4MSOB) und 4-Methylthiobutyl (4MTB) im Spross die höchste Konzentration auf, während in der Wurzel 8-Methylsulfinyloctyl (8MSOO) und 8-Methylthiooctyl (8MTO) dominierten. Der Gehalt indolischer GSL in der Wurzel war bei Col-0 und den Rückkreuzungen vergleichbar. Die homozygoten Mutanten zeigten geringere Werte, wenngleich nur *gcc8* und *sel1-16* signifikant unterschiedlich zum WT waren. Die F1-Kreuzungen der verschiedenen *sultr1;2*-Allele waren dagegen alle signifikant geringer und wiesen etwa die Hälfte der WT-Konzentration auf. Unabhängig vom Genotyp waren Indol-3-ylmethyl (I3M) im Spross und 1-Methoxyindol-3-ylmethyl (1MIO3M) in der Wurzel die GSL mit der höchsten Konzentration.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die *sultr1;2*-Mutationen einen stärkeren Effekt auf den Gehalt von aliphatischen GSL haben als auf indolische. Dieser Unterschied wird vor allem im Spross sichtbar. Die Wiederherstellung des WT-Chemotyps der aliphatischen GSL im Spross durch die Rückkreuzung der Mutanten mit Col-0 zeigt, dass es sich bei *sultr1;2* um eine rezessive Mutation handelt. Die vergleichbaren GSL-Gehalte von homozygoten Mutanten und der F1-Kreuzungen der verschiedenen Allele sind ein starkes Indiz dafür, dass die Mutationen in *SULTR1;2* ursächlich für den verringerten GSL-Gehalt sind. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass *SULTR1;2* einen stärkeren Effekt auf den GSL-Gehalt in der Wurzel hat, sodass bereits der Verlust eines funktionellem Allels in den F1-Kreuzungen zu verringerten Gehalten aliphatischer GSL führt.

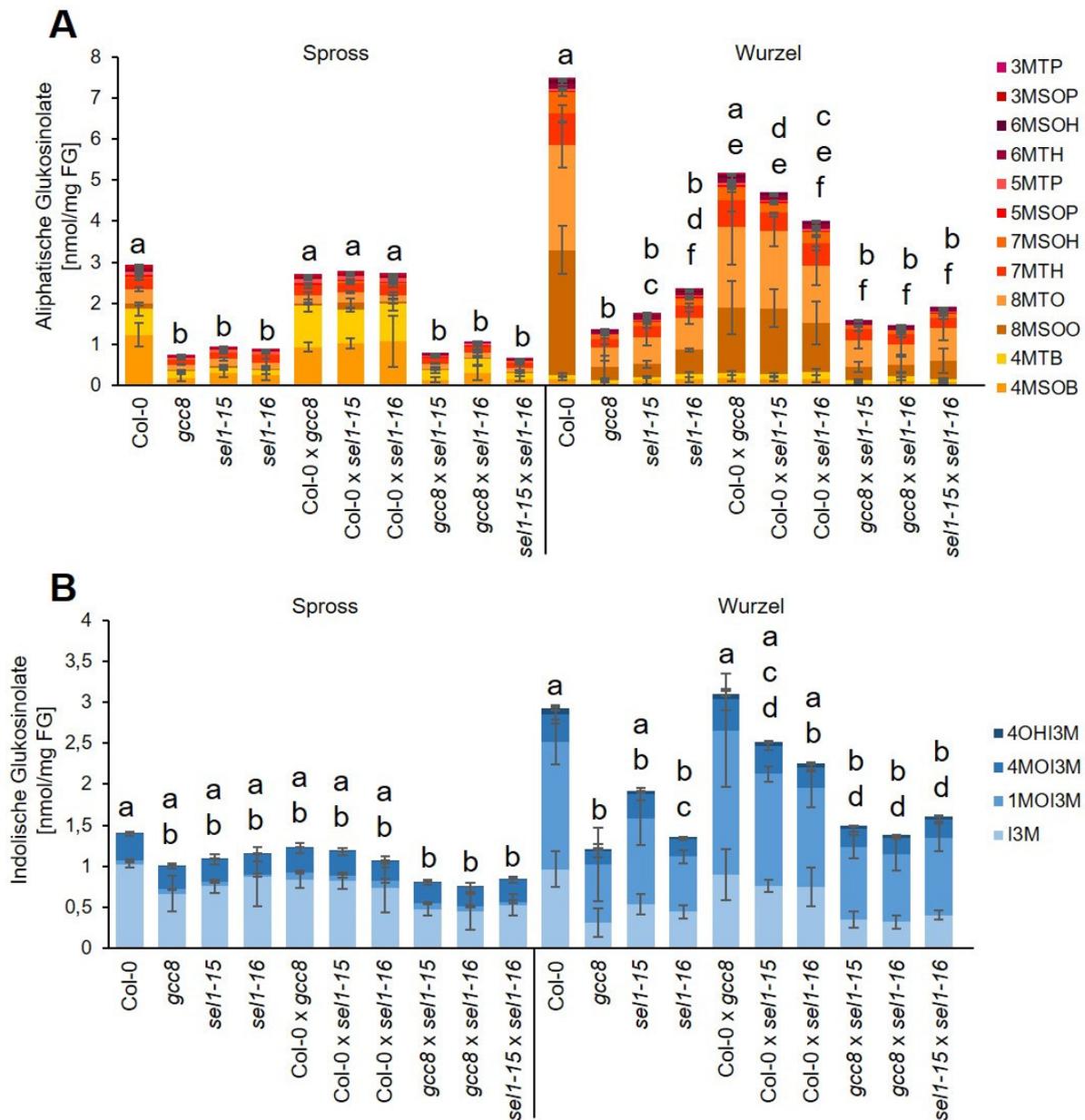


Abb. 8: Allelismustest mit den in der Arbeit verwendeten *sultr1;2*-Allelen (*gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16*)

Gehalt der aliphatischen (A) und indolischen (B) GSL pro Frischgewicht (FG) in Spross- bzw. Wurzelgewebe. Die Pflanzen wurden zehn Tage vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL (3-Methylthiopropyl (3MTP), 3-Methylsulfinylpropyl (3MSOP), 6-Methylsulfinylhexyl (6MSOH), 6-Methylthiohexyl (6MTH), 5-Methylthiopentyl (5MTP), 5-Methylsulfinylpentyl (5MSOP), 7-Methylsulfinylheptyl (7MSOH), 7-Methylthioheptyl (7MTH), 8-Methylthiooctyl (8MTO), 8-Methylsulfinyloctyl (8MSOO), 4-Methylthiobutyl (4MTB), 4-Methylsulfinylbutyl (4MSOB), 4-Hydroxyindol-3-ylmethyl (4OHI3M), 4-Methoxyindol-3-ylmethyl (4MOI3M), 1-Methoxyindol-3-ylmethyl (1MOI3M), Indol-3-ylmethyl (I3M)). Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe zusammenaddiert. Es wurden vier biologische Replikate mit je fünf bis acht Individuen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test getrennt für aliphatische bzw. indolische GSL in Spross und Wurzel durchgeführt. Verschiedene Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede ($P > 0,05$).

2.3 Glukosinolatgehalt in *sultr1;2*-Mutanten bei unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit

GSL sind schwefelhaltige spezialisierte Pflanzenabwehrstoffe und können bei Sulfatmangel auch als interne Schwefelquelle dienen (Falk *et al.*, 2007). Um die Abhängigkeit der GSL-Biosynthese von der Sulfatverfügbarkeit und der Aufnahmekapazität zu testen, wurden WT und *sultr1;2*-Mutantenlinien auf Medium mit aufsteigender Sulfatkonzentration angezogen und anschließend der GSL-Gehalt in Spross und Wurzel mithilfe von LC/MS gemessen (Abb. 9).

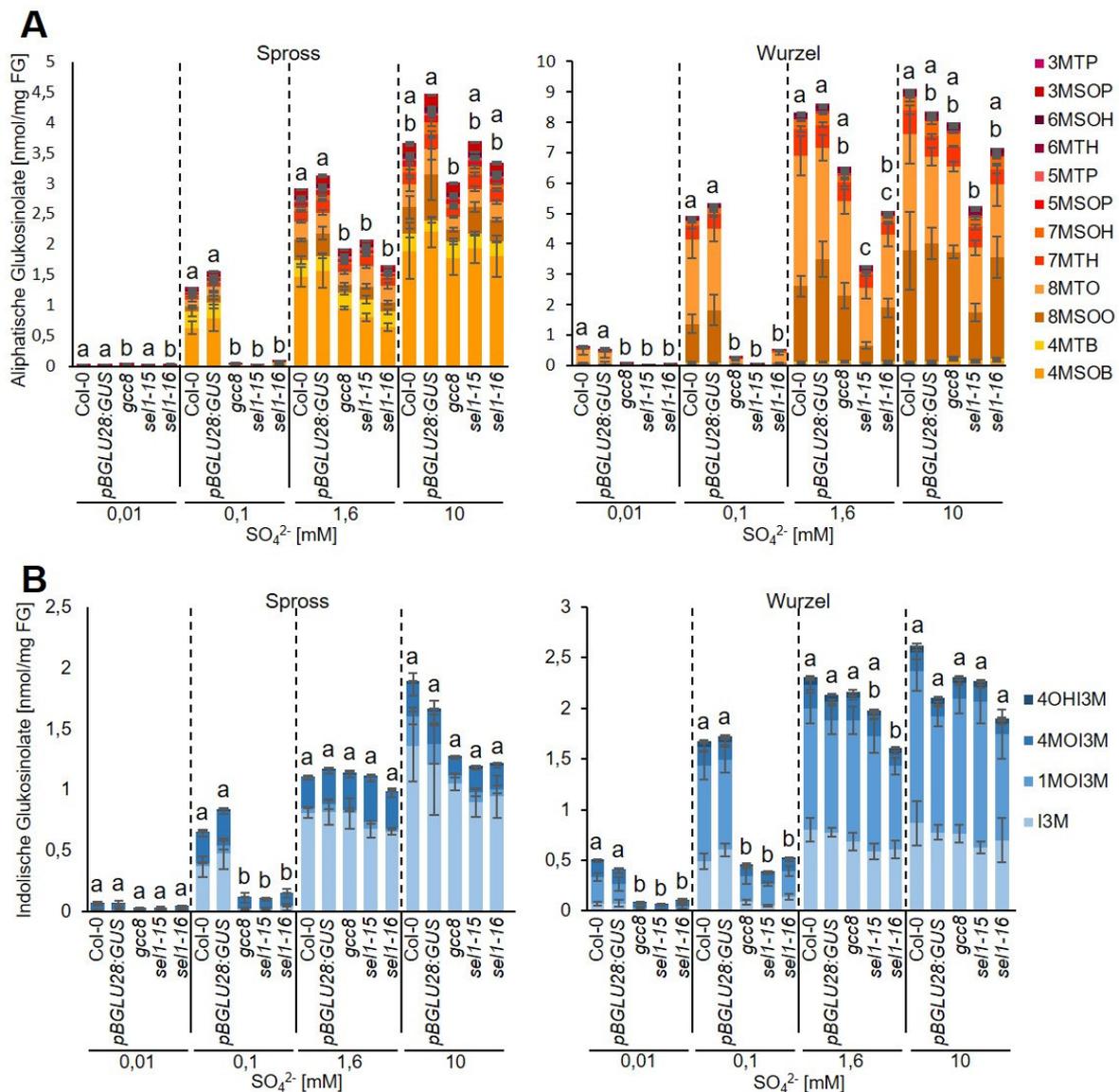


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve von Glukosinolatgehalt in Wildtyp und *sultr1;2*-Mutantenlinien bei unterschiedlichen Sulfatgehalt im Medium

Gehalt der aliphatischen (**A**) und indolischen (**B**) GSL pro Frischgewicht (FG) in Spross- bzw. Wurzelgewebe. Die Pflanzen wurden zehn Tage vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL. Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe zusammenaddiert. Es wurden vier biologische Replikate mit je fünf bis elf Individuen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test getrennt für jede Sulfatkonzentration, für aliphatische bzw. indolische GSL in Spross und Wurzel durchgeführt. Verschiedene Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$).

In diesem Experiment wurden die GSL-Gehalte bei starkem und moderatem Sulfatmangel (0,01 mM bzw. 0,1 mM SO_4^{2-}) sowie bei hoher Sulfatverfügbarkeit (10 mM SO_4^{2-}) mit der Standardkonzentration (1,6 mM SO_4^{2-}) verglichen. Für Col-0 wurden unter Standardbedingungen vergleichbare Werte zum vorhergehenden Experiment gemessen, welches mit der gleichen Konzentration durchgeführt wurde (Abb. 8). Außerdem wurde ein stärkerer Effekt auf den Gehalt von aliphatischen GSL beobachtet. Im Spross zeigten WT und die Kontrolllinie *pBGLU28:GUS* signifikant erhöhte aliphatische GSL-Werte im Vergleich zu den *sultr1;2*-Mutanten. In der Wurzel wiesen alle Mutantenlinien geringere GSL-Konzentrationen auf. Allerdings unterschieden sich nur die Werte von *sel1-15* und *sel1-16* signifikant von *pBGLU28:GUS*. Für die indolischen GSL wurden in Spross und Wurzel kaum Unterschiede bei 1,6 mM SO_4^{2-} im Medium beobachtet.

Unter starkem Sulfatmangel waren die Gehalte von aliphatischen und indolischen GSL im Vergleich zum Standard-Sulfatgehalt des Anzuchtmediums stark reduziert. Col-0 und *pBGLU28:GUS* zeigten vier- bis fünffach höhere GSL-Werte in der Wurzel im Vergleich zu *gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16*. Im Spross waren kaum Unterschiede zwischen den Linien zu beobachten. Bei 0,1 mM SO_4^{2-} wurden dagegen in Spross und Wurzel deutliche Unterschiede zwischen den WT bzw. Kontrolllinie im Vergleich zu den *sultr1;2*-Mutanten gemessen. Col-0 und *pBGLU28:GUS* wiesen signifikant höhere aliphatische und indolische GSL-Konzentrationen als *gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16* auf. Die Mutanten unterschieden sich nicht untereinander. Bei der hohen Sulfatkonzentration von 10 mM zeigte sich die Tendenz, dass die Mutantenlinien geringere Werte als die zugehörigen WT- bzw. Kontrolllinien aufwiesen. Dieser Trend war bei aliphatischen und indolischen GSL zu beobachten. Statistisch signifikante Unterschiede wurde allerdings nur für die aliphatischen GSL zwischen *pBGLU28:GUS* und *gcc8* im Spross bzw. Col-0 und *sel1-15* in der Wurzel festgestellt.

Diese Messungen zeigen, dass bei einer sehr geringen Sulfatverfügbarkeit im Medium (0,01 mM) der GSL-Gehalt lediglich in der Wurzel durch die bessere Aufnahmekapazität von Col-0 und *pBGLU28:GUS* erhöht wurde. Bei moderatem Sulfatmangel (0,1 mM) zeigten die Mutanten deutlich geringere Gehalte von aliphatischen und indolischen GSL sowohl im Spross als auch in der Wurzel. Unter diesen Wachstumsbedingungen wurden in einer Studie allerdings vergleichbare interne Konzentrationen von Sulfat für *pBGLU28:GUS*, *sel1-15* und *sel1-16* beobachtet (Zhang *et al.*, 2014). Das lässt vermuten, dass nicht die verringerte Aufnahmekapazität in den Mutanten, sondern eine Deregulierung der Sulfatmangelantwort zu der drastischen Verringerung der GSL-Konzentration führte.

Der Vergleich indolischer und aliphatischer GSL-Gehalte bei höheren Sulfatkonzentrationen im Medium zeigte einen größeren Unterschied zwischen den Genotypen bei aliphatischen GSL. Da diese ausgehend von Methionin gebildet werden, enthalten sie ein Schwefelatom mehr als indolische GSL, für die Tryptophan die Ausgangsverbindung darstellt. Es ist daher denkbar, dass die Biosynthese von aliphatischen GSL bei geringerem internen Sulfatgehalt stärker reguliert ist und sich damit eine geringere Aufnahmekapazität vor allem auf den Gehalt der aliphatischen GSL auswirkt.

In dieser Arbeit wurden Keimlinge auf Medium mit sehr hohem Sulfatgehalt (10 mM) angezogen, um zu testen, ob sich der GSL-Gehalt zwischen den Genotypen unterscheidet, obwohl alle Linien genügend Sulfat aufnehmen können. Zhang *et al.* (2014) zeigten, dass unter diesen Bedingungen der interne Sulfatgehalt in *pBGLU28:GUS*, *sel1-15* und *sel1-16* vergleichbar ist. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich vor allem im Spross die Tendenz, dass die Mutanten trotz ausreichender Sulfatversorgung verringerte GSL-Konzentrationen aufwiesen (Abb. 9A). Möglicherweise ist diese Beobachtung auf den Verlust von SULTR1;2 zurückzuführen und könnte ein Hinweis auf eine Funktion von SULTR1;2 als Teil einer Signalkette zur Regulierung der Sulfatmangelantwort sein.

2.4 Expression von Sulfatmangelmarkergenen in *gcc8*

Im Zuge der Sulfatmangelantwort bei *A. thaliana* werden durch die erhöhte Expression von Sulfattransporter- und Myrosinasegenen die Aufnahmekapazität der Wurzeln erhöht bzw. interne Sulfatquellen mobilisiert. *BGLU28* kodiert eine Myrosinase, die bei geringer Sulfatverfügbarkeit vermutlich eine Rolle beim Abbau von GSL zur Schwefelrückgewinnung spielt (Zhang *et al.*, 2020). *BGLU28* sowie ein weiteres Sulfatmangelmarkergen (*SDI1*) weisen unter Sulfatmangelbedingungen stark erhöhte Transkriptmengen auf (Hirai *et al.*, 2003). Daher werden sie als interne Indikatoren für den Sulfatstatus der Pflanze genutzt. Um die Sulfatmangelantwort in Col-0 und *gcc8* bei unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit zu vergleichen, wurden Keimlinge der Linien auf Medium mit unterschiedlichen Sulfatgehalten angezogen und anschließend Transkriptanalysen für die beiden Sulfatmangelmarkergene *BGLU28* und *SDI1* durchgeführt. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen sind in Abb. 10 relativ zum Transkriptlevel in Col-0 bei 1,6 mM im Medium dargestellt, da dies die Standardsulfatkonzentration im ATS-Medium in dieser Studie war.

Bei Standard-Sulfatverfügbarkeit (1,6 mM SO_4^{2-}) und Sulfatüberangebot (10 mM SO_4^{2-}) im Medium zeigte *gcc8* eine signifikant höhere *BGLU28*-Transkription im Vergleich zu Col-0, während bei geringerer Sulfatverfügbarkeit kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt wurde (Abb. 10A). In beiden Linien konnte unter Sulfatmangel (0,01 mM bzw. 0,1 mM SO_4^{2-}) eine starke Induktion von *BGLU28* im Vergleich zu Standardbedingungen beobachtet werden. Auch für *SDI1* zeigte sich eine deutlich erhöhte Transkriptmenge bei geringer Sulfatverfügbarkeit bei Col-0 und *gcc8* (Abb. 10B). Obwohl bei höheren Sulfatgehalten im Medium (1,6 mM bzw. 10 mM SO_4^{2-}) die *SDI1*-Expressionsrate in *gcc8* tendenziell höher war als im WT, wurden hier keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet. Die erhöhte Expression der Markergene spricht für eine starke Induktion der Sulfatmangelantwort in beiden Linien. Unter Standardbedingungen (1,6 mM SO_4^{2-}) zeigte sich jedoch eine erhöhte *BGLU28*-Expression in der *sultr1;2*-Mutante. Das spricht dafür, dass SULTR1;1 den Verlust von SULTR1;2 für die Sulfataufnahme nicht vollständig kompensiert. Messungen des internen Sulfatgehalts von *sel1-15* und *sel1-16*-Mutanten in einer anderen Studie bestätigen diese Annahme (Zhang *et al.*, 2014). Auch bei hohem Sulfatgehalt im Medium (10 mM SO_4^{2-}) war das *BGLU28*-Transkriptlevel in *gcc8* im Vergleich zu Col-0 erhöht. Also ist auch bei hoher Sulfatverfügbarkeit die Sulfatmangelantwort in *gcc8*-Mutanten aktiviert. Messungen deuten allerdings auf vergleichbare interne Sulfatgehalte in WT und *sultr1;2*-Mutanten, welche auf Medium mit 10 mM SO_4^{2-} angezogen wurden (Zhang *et al.*, 2014).

Möglicherweise ist die Regulierung der Sulfatmangelantwort in *gcc8* aufgrund des Verlustes von SULTR1;2 beeinträchtigt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Rolle von SULTR1;2 als Sulfatsensor in der Pflanze sein.

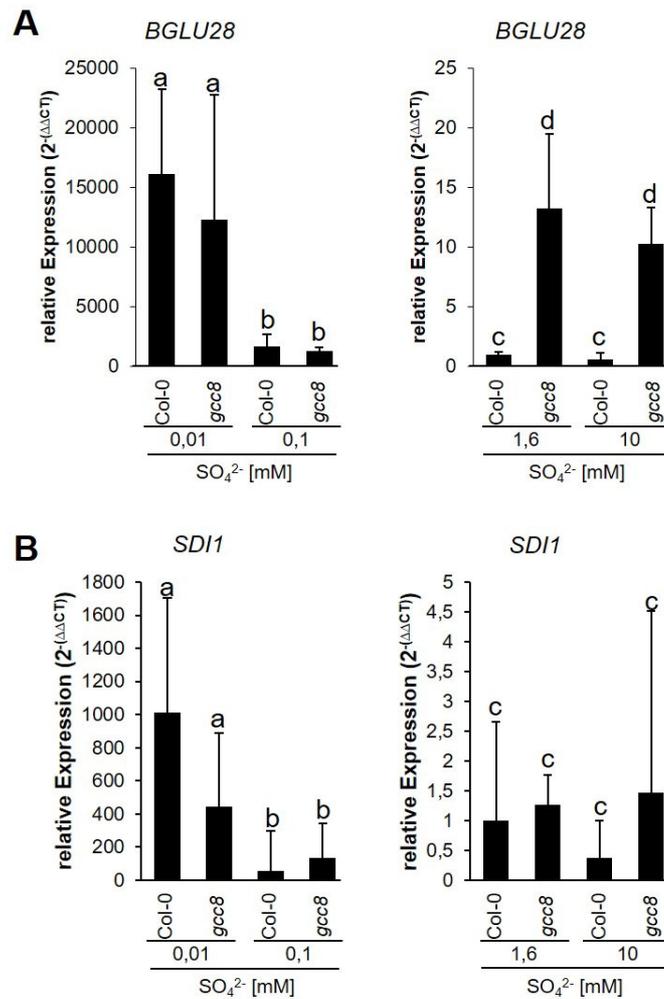


Abb. 10: Transkriptanalyse von Sulfatmangelmarkergenen *BGLU28* und *SDI1* in Wildtyp und *gcc8* bei unterschiedlichem Sulfatgehalt im Medium

qRT-PCR-Analyse für *BGLU28*- (A) und *SDI1*- (B) Transkripte im Sprossgewebe von Col-0 und *gcc8*. Die Pflanzen wurden 10 Tage vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmenge ($2^{-\Delta\Delta CT}$) relativ zum Expressionslevel in Col-0 bei 1,6 mM SO_4^{2-} . Es wurden jeweils drei biologische Replikate gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien, berechnet auf Grundlage der ΔCT -Werte durch einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

2.5 Gehalt von Aminosäuren und OAS in Col-0 und *gcc8* bei unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Verlust von SULTR1;2 in *A. thaliana* auf den zentralen Sulfatstoffwechsel unter Sulfatmangel hat, wurden WT-Pflanzen und *gcc8*-Mutanten auf Medium mit unterschiedlicher Sulfatverfügbarkeit angezogen. Anschließend wurden die Gehalte von Cystein, Methionin und OAS via LC/MS im Spross und in der Wurzel gemessen. Cystein ist die erste organische Verbindung, in welche Schwefel im Zuge des zentralen Sulfatstoffwechsels inkorporiert wird (Mugford *et al.*, 2011). Sie dient als Ausgangsverbindung für die Bildung weiterer AS wie Methionin und anderer schwefelhaltigen Verbindungen. OAS dient bei der Cysteinsynthese als Akzeptor für das in Chloroplasten reduzierte Sulfid (Abb. 1). Beim Gehalt von Cystein zeigten sich weder im Spross noch in der Wurzel signifikante Unterschiede zwischen Col-0 und *gcc8* (Abb. 11). Lediglich bei 0,01 mM SO_4^{2-} im Medium wurde in der Wurzel *gcc8* eine tendenziell erhöhte Cysteinkonzentration im Vergleich zum WT beobachtet. Auch die veränderte Sulfatverfügbarkeit wirkte sich kaum auf die gemessenen Gehalte aus. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Methionin. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien oder den Behandlungen beobachtet. Die OAS-Konzentration war bei geringem Sulfatgehalt im Medium (0,01 mM) im Spross und in der Wurzel im Vergleich zu den anderen Behandlungen stark erhöht. In der Wurzel war dieser Effekt deutlicher als im Spross. Außerdem wurde bei 0,01 mM und 0,1 mM SO_4^{2-} im Medium eine erhöhte OAS-Konzentration bei *gcc8* beobachtet verglichen mit Col-0.

Diese stark erhöhten OAS-Gehalte sind eine direkte Folge des Sulfatmangels und sind mit einem Mangel an reduziertem Schwefel in den Zellen zu erklären. Wenn die Pflanze sehr wenig Sulfat aufnimmt, liegt auch wenig reduziertes Sulfid in der Pflanze vor, welches zusammen mit OAS Cystein bildet. Da OAS ständig zurückgewonnen wird, akkumuliert die Verbindung ohne Sulfid. Der Unterschied zwischen WT und *gcc8* beim OAS-Gehalt kommt vermutlich durch den verringerten Sulfattransport in der *sultr1;2*-Mutante zustande. Die vergleichbaren OAS-Gehalte bei Standardbedingungen (1,6 mM SO_4^{2-}) und Sulfatüberschuss (10 mM SO_4^{2-}) spricht dafür, dass unter diesen Bedingungen genügend Sulfid in der Pflanze vorhanden ist. Der konstante Gehalt von Cystein und Methionin legt nahe, dass SULTR1;2 keinen Effekt auf Biosynthese der AS hatte, während unter Sulfatmangel der Gehalt von GSL deutlich verringert war (Abb. 9). Daher ist zu vermuten, dass der Schwefelmetabolismus durch unterschiedliche Signalwege reguliert wird. Die Regulation des zentralen Schwefelmetabolismus ist scheinbar unabhängig von SULTR1;2. Die Induktion von Sulfatmangelgenen und Reduktion von GSL im Zuge der Sulfatmangelantwort ist dagegen möglicherweise ein Resultat der SULTR1;2-Signalfunktion.

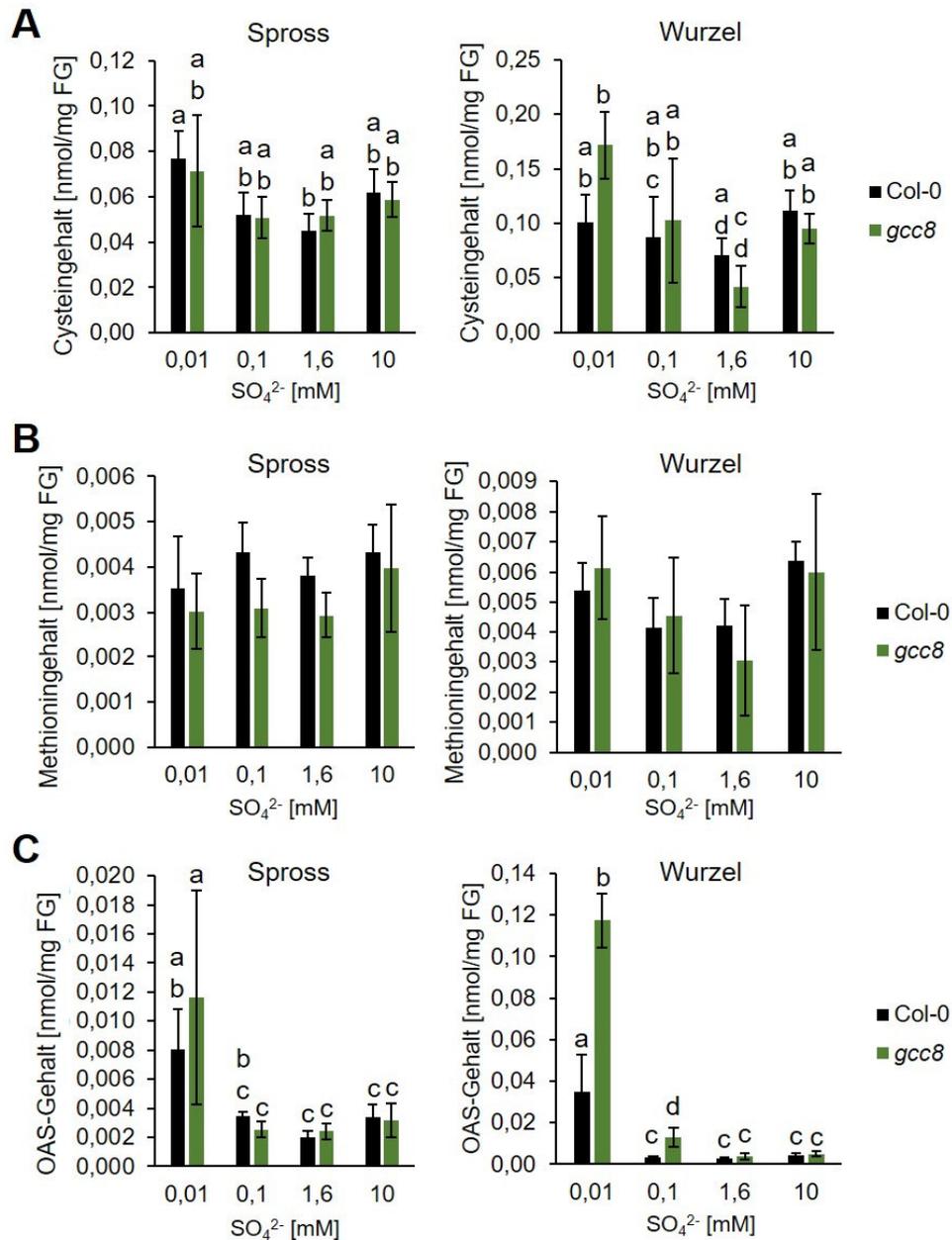


Abb. 11: Gehalt von Cystein, Methionin und OAS in Col-0 und *gcc8* bei unterschiedlichem Sulfatgehalt im Medium

Gehalt der AS Cystein (A) und Methionin (B) sowie der Cysteinvorstufe OAS (C) pro Frischgewicht (FG) in Spross- bzw. Wurzelgewebe. Die Pflanzen wurden zwei Wochen vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Verbindungen. Es wurden drei oder vier biologische Replikate gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test in Spross und Wurzel durchgeführt. Verschiedene Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$). Für den Methioningehalt wurden keine Unterschiede festgestellt.

2.6 Einfluss verschiedener Sulfattransporter auf Glukosinolatgehalt

SULTR1;2 ist für *A. thaliana* der wichtigste Transporter für die Sulfataufnahme aus dem Boden. Die beiden nächstverwandten Proteine SULTR1;1 und SULTR1;3 weisen eine AS-Sequenzähnlichkeit von 73% bzw. 84% auf (Abb. A 1). Während SULTR1;1 ebenfalls in der Wurzel die Sulfataufnahme aus der Rhizosphäre bewerkstelligt, ist SULTR1;3 im Inneren der Wurzel lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Phloembeladung und damit beim Sulfattransport innerhalb der Pflanze. Um zu untersuchen welchen Einfluss die nah verwandten Transporter auf den GSL-Gehalt der Pflanze haben, wurden neben Col-0 und *gcc8* zusätzlich *sultr1;1*- und *sultr1;3*-T-DNA-Insertionslinien für GSL-Messungen herangezogen (El Kassis *et al.*, 2007). Die T-DNA-Insertionen der Mutantenlinien befinden sich bei *sultr1;1* im 9. Exon und bei *sultr1;3* im 1. Exon (Abb. 12).

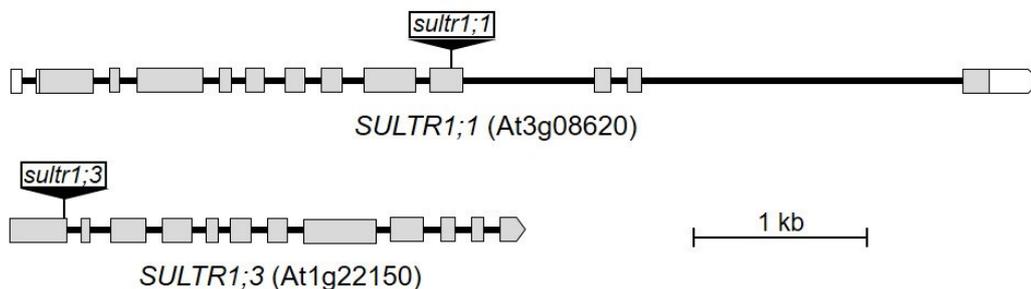


Abb. 12: Genmodelle von *SULTR1;1* und *SULTR1;3* und Position der T-DNA-Insertionen

Positionen der T-DNA-Insertionen für die, in der Arbeit verwendeten, Mutantenlinien *sultr1;1* (SALK_093256) und *sultr1;3* (SALK_018910). Dargestellt sind Exons (graue Boxen), Introns (schwarze Balken) und nichttranslatierte Regionen (weiße Boxen).

Im Spross war die Konzentration der aliphatischen GSL in *gcc8* etwa halb so groß wie in Col-0. Die Gehalte der T-DNA-Linien *sultr1;1* und *sultr1;3* lagen zwischen WT und *gcc8* (Abb. 13A). In der Wurzel zeigte sich ein ähnliches Verhältnis. Obwohl *sultr1;1* und *sultr1;3* tendenziell geringere Konzentrationen als Col-0 aufwiesen, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Linien beobachtet. Der Gehalt für aliphatische GSL bei *gcc8* war dagegen deutlich geringer.

Bei den indolischen GSL im Spross wurden für Col-0, *gcc8* und *sultr1;1* vergleichbare Werte gemessen (Abb. 13B). Lediglich *sultr1;3* zeigte im Vergleich zum WT einen signifikant geringeren Gehalt. In der Wurzel wurde für *gcc8* die geringste Konzentration gemessen, welche deutlich geringer war als im WT. Die *sultr1;1*- und *sultr1;3*-Mutantenlinien wiesen intermediäre Werte auf und unterschieden sich statistisch nicht von den anderen Genotypen. Diese Ergebnisse zeigen, dass SULTR1;2 den größten Einfluss auf den Gehalt aliphatischer GSL sowohl im Spross als auch in der Wurzel hat. Für die indolischen GSL traf dies lediglich in der Wurzel zu. Die *sultr1;1*-Mutation hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf den GSL-Chemotyp. Der Verlust von *SULTR1;3* wirkte sich vor allem auf den GSL-Gehalt im Spross aus. Da Sulfat ausschließlich über die Wurzel aufgenommen wird, ist der Transport über das Leitgewebe essenziell für die Verteilung von Sulfat in der Pflanze. *SULTR1;3* ist in Blättern sowie in der Wurzel lokalisiert und spielt für die Phloembeladung eine wichtige Rolle (Yoshimoto *et al.*, 2003). Dies legt nahe, dass *SULTR1;3* den internen Sulfattransport von sulfatreicheren Geweben wie Blätter und Wurzel in sulfatverbrauchende Gewebe bewerkstelligt. Ohne funktionelle *SULTR1;3* ist dieser Transport stark beeinträchtigt und so ist

der Sulfatmangel im Sprossgewebe von *sultr1;3* möglicherweise höher als in der Wurzel, wo das aus dem Boden aufgenommene Sulfat direkt metabolisiert werden kann. Der Einfluss von SULTR1;3 auf die interne GSL-Verteilung in *A. thaliana* war bisher nicht bekannt und wurde in dieser Studie zum ersten Mal gezeigt.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieses Experiments nahe, dass SULTR1;2 den stärksten Einfluss auf den GSL-Gehalt, insbesondere aliphatischer GSL, in der Pflanze hat.

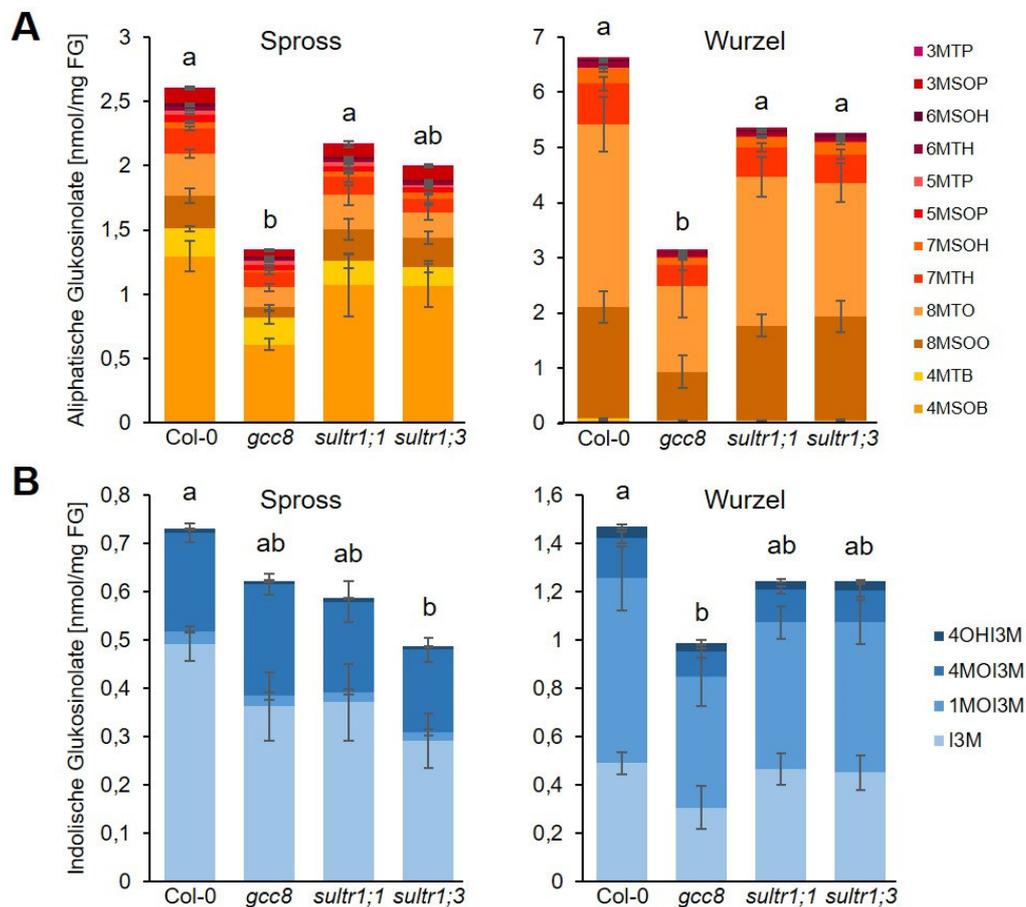


Abb. 13: Glukosinolatgehalt von Col-0 und *sultr1*-Mutantenlinien

Gehalt der aliphatischen (A) und indolischen (B) GSL pro Frischgewicht (FG) in Spross- bzw. Wurzelgewebe. Die Pflanzen wurden zehn Tage vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL. Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe zusammenaddiert. Es wurden vier biologische Replikate gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA mit Tukey post-hoc-Test getrennt für aliphatische bzw. indolische GSL in Spross und Wurzel durchgeführt. Verschiedene Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede ($P > 0,05$).

2.7 Generierung und Analyse von verschiedenen Varianten und Allelen von SULTR1;2

Aus den Experimenten dieser Arbeit und weiteren Studien gibt es Hinweise auf eine Signalfunktion von SULTR1;2 bei der Wahrnehmung des Sulfatstatus in der Pflanze. Auch in *S. cerevisiae* wurde für die Sulfattransporter SUL1 und SUL2 neben ihrer Rolle im Transport eine Signalfunktion im PKA-Signalweg beschrieben. *Arabidopsis* SULTRs und Hefe SULs gleichen sich mit mehreren TMDs in ihrer Struktur und weisen mehrere stark konservierte Abschnitte in der AS-Sequenz auf. Allerdings ist die Funktionsweise in Hefe bisher besser untersucht. Für eine funktionelle Untersuchung und Analyse von Transport- und Signalfunktion in *A. thaliana* wurden in dieser Arbeit neue *SULTR1;2*-Varianten generiert (Abb. 14).

In Hefe konnte gezeigt werden, dass durch spezifische AS-Austausche bei SUL1 bzw. SUL2 der Sulfattransport und die Signalfunktion im PKA-Signalweg voneinander getrennt manipuliert werden können (Kankipati *et al.*, 2015). Der Austausch von Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) an der Position 124 in SUL1 führt zur Inhibierung der Transport- sowie der Signalfunktion. Im Gegensatz dazu wird durch das Ersetzen von Glutaminsäure (E) mit Glutamin (Q) an der Stelle 427 in SUL1 bzw. 443 in SUL2 nur der Sulfattransport dramatisch beeinträchtigt, während die Signalfunktion erhalten bleibt. Diese negativ geladenen AS (D und E) sind auch in *Arabidopsis* SULTRs stark konserviert (Abb. 14A). Um zu testen, ob bei *SULTR1;2* ebenfalls analog zu SUL1 und SUL2 Transport und Signalfunktion getrennt verändert werden können, wurden mittels SDM *SULTR1;2*-Varianten mit dem gleichen AS-Austausch an den jeweiligen konservierten Positionen generiert. Dabei entsprach der Austausch von D zu N an der Position 93 in *SULTR1;2* (*SULTR1;2*^{D93N}) der Variante, welche in Hefe weder Transport- noch Signalfunktion zeigte. Der Austausch an Position 372 von E zu Q (*SULTR1;2*^{E372Q}) führte an entsprechender Stelle in Hefe zum Blockieren des Sulfattransports, während die Signalfunktion über den PKA-Signalweg erhalten blieb (Abb. 14A).

Die Mutation in *gcc8* führt zu einem vorzeitigen Stopkodon und somit wird kein funktionelles *SULTR1;2* exprimiert. Bei *sel1-15* und *sel1-16* dagegen führen die Einzelnukleotidaustausche vermutlich nicht zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Da die Mutanten jedoch einen ähnlichen GSL-Chemotyp wie *gcc8* zeigen, könnten diese Mutationen möglicherweise essenzielle Positionen betreffen und damit ebenfalls bei der funktionellen Analyse von *SULTR1;2* hilfreich sein. In Abb. 14B sind alle Positionen der Mutationen in den Mutantenlinien dargestellt. Der AS-Austausch in *SULTR1;2*^{D93N} und *sel1-15* betrifft die erste TMD. Die Mutation in *sel1-16* befindet sich in der fünften, die von *SULTR1;2*^{E372Q} in der neunten TMD. Die genaue Struktur von *SULTR1;2* ist nicht bekannt. Aufgrund der ähnlichen Struktur zu SULs sind jedoch sowohl D93N als auch E372Q mutmaßlich am äußeren Bereich der jeweiligen TMD. Damit befinden sie sich direkt an der Öffnung des Transporters. Die negativ geladenen AS an dieser Position in einem H⁺/Sulfat-Symporter könnten eine wichtige Funktion für den Transport als Protonenbindestelle haben. Daher bieten diese neu generierten *SULTR1;2*-Varianten das Potenzial, die Funktionsweise des Sulfattransporters in *A. thaliana* genauer zu untersuchen.

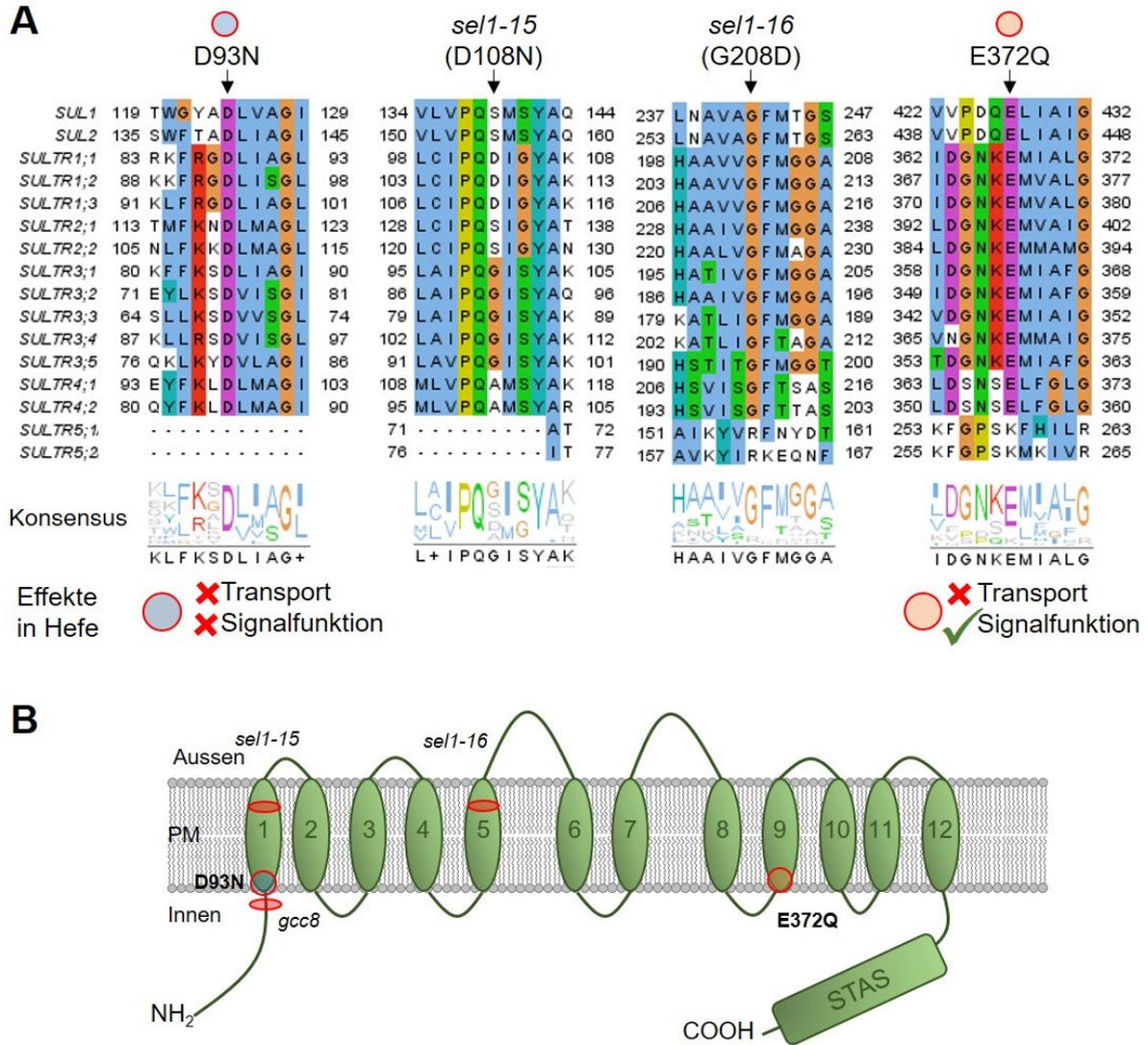


Abb. 14: Generierte und verwendete SULTR1;2-Varianten und -Allele

A Die Position des jeweiligen AS-Austauschs in *SULTR1;2*-Allelen *sel1-15* und *sel1-16* sowie in mittels SDM generierten Konstrukten zur *gcc8*-Komplementation. Die Anordnung zeigt Ausschnitte aus der AS-Sequenz um die entsprechenden Positionen der Mutationen bei verschiedenen Sulfattransportern bzw. ähnlichen Proteinen in *S. cerevisiae* (SUL1 und SUL2) und in *A. thaliana* (SULTRs). Der Pfeil zeigt die Position der Mutation an. Gleiche Farben zeigen ähnliche Eigenschaften der AS an. Das Konsensusfeld stellt den Grad der Konservierung der AS bei den Proteinen dar. In Hefe wird durch die Mutation analog zu D93N die Transport- und Signalfunktion von SUL1 gestört. Durch die Mutation analog zu E372Q wird in SUL1 und SUL2 spezifisch der Sulfattransport unterbunden, die Signalfunktion bleibt jedoch erhalten. **B** Proteinmodell von SULTR1;2. Dargestellt sind die Positionen der in A abgebildeten Mutationen und *gcc8*. (Nach Zhang *et al.*, 2014)

2.8 Komplementierung von *gcc8* mit *SULTR1;2-GFP*-Konstrukten

Die Punktmutation in *gcc8* führt zu einem vorzeitigen Stopkodon in der mRNA. Aus diesem Grund wird in der Mutante vermutlich kein SULTR1;2-Protein gebildet. Daher ist diese Mutantenlinie geeignet, um sie für Komplementationsversuche mit *SULTR1;2*-Konstrukten zu verwenden. Auf diese Weise war es möglich, den Einfluss der neu generierten Mutationen (D93N und E372Q) auf die SULTR1;2-Funktion in *A. thaliana* zu untersuchen. Dazu wurden *gcc8*-Komplementationslinien etabliert, bei denen die kodierenden Sequenzen der SULTR1;2-Varianten mit einem C-terminalen GFP-Tag unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) exprimiert wurde (*p35S::SULTR1;2-GFP*). Bei der Transformation wurden die *SULTR1;2*-Konstrukte zusammen mit dem *bar*-Gen, welches die Resistenz gegenüber dem Herbizid Basta vermittelt, auf die Pflanze übertragen. Mittels Bastaselektion wurden in der T2-Generation je drei unabhängige Linien mit einer Kopie des jeweiligen *SULTR1;2*-Konstrukts (*p35S::SULTR1;2-GFP*, *p35S::SULTR1;2^{D93N}-GFP* bzw. *p35S::SULTR1;2^{E372Q}-GFP*) identifiziert. In Abb. 15 sind die Konstrukte schematisch dargestellt. Um zu testen, ob die GFP-Konstrukte in den Pflanzen exprimiert wurden und die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurden Blätter von zwei Wochen alten, stabil transformierten Komplementationslinien mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop analysiert.

Das WT-Konstrukt (*SULTR1;2-GFP*) und *SULTR1;2^{E372Q}-GFP* weisen eine Lokalisation an der Zellmembran auf (Abb. 15A+C). Die *SULTR1;2*-Variante mit D93N-Mutation wurde dagegen im Zytosol beobachtet (Abb. 15B).

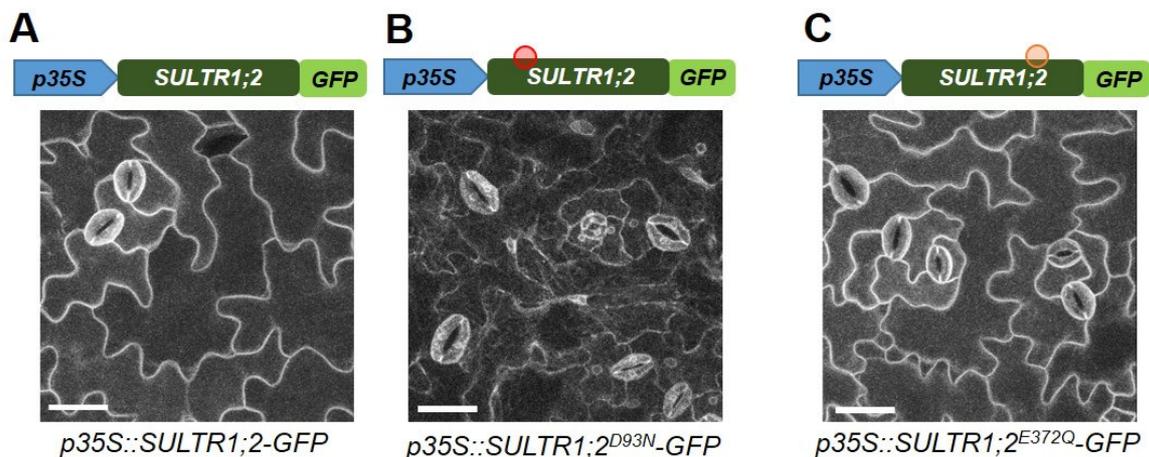


Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von *SULTR1;2*-Varianten mit C-terminaler GFP-Fusion in *A. thaliana* zur Komplementation von *gcc8*

Lokalisation von *SULTR1;2-GFP* (A), *SULTR1;2^{D93N}-GFP* (B) und *SULTR1;2^{E372Q}-GFP* (C) in der Blattepidermis von zwei Wochen alten Keimlingen von stabil transformierten *gcc8*-Pflanzen. Oben sind die Modelle der Konstrukte dargestellt, welche zur Generierung von Komplementationslinien verwendet wurden. Die Kreise zeigen die Position der Mutation in der kodierenden Sequenz an. Maßstab = 20 µm

Die veränderte Lokalisation von *SULTR1;2^{D93N}-GFP* legt nahe, dass diese Variante den Sulfattransport in die Zelle nicht bewerkstelligen kann. Die Mutation verhindert möglicherweise die korrekte Lokalisation des Proteins in der Zellmembran, was die Funktion als Transporter unterbindet. Dies könnte erklären, warum eine analoge Mutation in Hefe SULs zu einem Verlust der Transportfunktion führt (Abb. 14; Kankipati *et al.*, 2015). *SULTR1;2-GFP* und *SULTR1;2^{E372Q}-GFP* zeigen dagegen die erwartete Membranlokalisation. Ein Verlust der Transportfunktion von *SULTR1;2^{E372Q}-GFP* ist also nicht auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation zurückzuführen.

2.9 Glukosinolatgehalt in *gcc8*-Komplementationslinien

Aufgrund der Abwesenheit des SULTR1;2-Proteins in *gcc8* waren die Komplementationslinien geeignet, um die Funktionalität der neu generierten SULTR1;2-Varianten in *A. thaliana* zu untersuchen. Um zu testen, welchen Einfluss *p35S::SULTR1;2-GFP*, *p35S::SULTR1;2^{D93N}-GFP* und *p35S::SULTR1;2^{E372Q}-GFP* auf den GSL-Gehalt von *gcc8* haben, wurden stabil transformierte homozygote Komplementationslinien (S1;2-GFP, S1;2^{D93N}-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP) auf ATS-Medium mit unterschiedlichem Sulfatgehalt angezogen. Durch die Bestimmung der GSL-Konzentration im Spross und in der Wurzel wurde analysiert, welche Konstrukte die *sultr1;2*-Mutante komplementieren (Abb. 16).

Die in diesem Experiment gemessenen GSL-Gehalte für Col-0 und *gcc8* sind vergleichbar mit den Werten aus der vorhergehenden Betrachtung der Sulfat-Dosis-Wirkungs-Kurve für GSL (Abb. 9). Allerdings wurden bei höherer Sulfatverfügbarkeit (1,6 mM und 10 mM SO₄²⁻) vor allem in der Wurzel ein signifikant verringerter GSL-Gehalt in *gcc8* im Vergleich zum WT beobachtet. Auf Kontrollmedium (1,6 mM SO₄²⁻) wiesen die Komplementationslinien S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP im Spross erhöhte Werte für die aliphatischen GSL im Vergleich zum WT auf. Sowohl *gcc8* als auch S1;2^{D93N}-GFP lagen dagegen deutlich darunter. Für die indolischen GSL wurden im Spross dagegen nur bei S1;2^{D93N}-GFP eine geringere GSL-Konzentration im Vergleich zu den anderen Linien beobachtet. In der Wurzel wiesen unter Standardbedingungen die beiden Komplementationslinien S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP ähnliche oder höhere Werte für sowohl aliphatische als auch indolische GSL als der WT auf. In *gcc8* und S1;2^{D93N}-GFP wurden signifikant geringere Werte gemessen. Unter starkem Sulfatmangel (0,01 mM SO₄²⁻) waren in allen Linien die GSL-Gehalte stark reduziert im Vergleich zum Kontrollmedium. Im Spross wies S1;2-GFP dabei einen tendenziell erhöhten Wert relativ zu den anderen Linien auf. Auch in der Wurzel wurden sehr geringe GSL-Gehalte gemessen, allerdings zeigten Col-0, S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP verglichen mit *gcc8* und S1;2^{D93N}-GFP erhöhte Werte. Mit 0,1 mM SO₄²⁻ im Medium wurde im Spross ein deutlicher Unterschied zwischen Col-0, S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP im Vergleich zu *gcc8* und S1;2^{D93N}-GFP registriert werden. In der Wurzel zeigten sich diese Unterschiede noch deutlicher. Col-0, S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP wiesen höhere Werte auf, unterschieden sich aber auch untereinander signifikant. Für S1;2-GFP wurden die höchsten Gehalte gemessen.

Obwohl tendenziell auch bei Sulfatüberschuss (10 mM SO₄²⁻) im Medium die aliphatische GSL-Konzentration im Spross von *gcc8* und S1;2^{D93N}-GFP geringer, in S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP dagegen höher war als beim WT, konnte kein signifikanter Unterschied der Linien zu Col-0 festgestellt werden. Die Gehalte der indolischen GSL im Spross war bei allen Linien bei 10 mM SO₄²⁻ im Medium vergleichbar. In der Wurzel unterschieden sich die GSL-Gehalte mitunter deutlicher als im Sprossgewebe. Col-0, S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP zeigten Werte, die signifikant höher waren im Vergleich zu *gcc8* und S1;2^{D93N}-GFP. Für die indolischen GSL lagen die Gehalte der Komplementationslinien S1;2-GFP und S1;2^{E372Q}-GFP signifikant über dem WT, wie bereits unter Kontrollbedingungen beobachtet.

Die Ergebnisse aus diesem Experiment legen nahe, dass SULTR1;2^{D93N}-GFP nicht in der Lage ist *gcc8* zu komplementieren. In der potenziellen Komplementationslinie S1;2^{D93N}-GFP wurden kaum veränderte GSL-Gehalte im Vergleich zu *gcc8* beobachtet. Das spricht dafür, dass die D93N-Mutation die Funktion von SULTR1;2 maßgeblich beeinträchtigt. Bei der zytologischen Analyse mithilfe eines konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops wurde SULTR1;2^{D93N}-GFP im Zytosol beobachtet (Abb. 15). Aufgrund dieser veränderten Lokalisation im Vergleich zu SULTR1;2-GFP ist das Protein vermutlich nicht in der Lage, Sulfat aus dem Medium in die Zelle zu transportieren. So blieben der Sulfatstatus und die GSL-Konzentration der Komplementationslinie im Vergleich zu *gcc8* unverändert.

SULTR1;2-GFP und SULTR1;2^{E372Q}-GFP waren dagegen an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 15). Die Komplementationslinien mit diesen Konstrukten zeigten vor allem bei ausreichender und hoher Sulfatverfügbarkeit deutlich höhere GSL-Konzentrationen als

gcc8. Das legt nahe, dass diese GFP-getaggten SULTR1;2-Konstrukte in der Lage waren, *gcc8* zu komplementieren.

SULTR1;2^{E372Q} wurde in diesem Experiment benutzt, um zu testen, ob mit dieser Mutation die Transportfunktion von SULTR1;2 unabhängig von der potenziellen Funktion als Sulfatsensor in der Pflanze zu verändern ist. Da sich die Komplementationslinie S1;2^{E372Q}-GFP jedoch sehr ähnlich wie S1;2-GFP verhält, ist es anhand der Daten dieses Experiments nicht möglich, einen Effekt der E372Q-Mutation auf die Transportfunktion festzustellen. Jedoch widersprechen die Ergebnisse nicht der These, dass der Transport in SULTR1;2^{E372Q}-GFP unterbunden ist, während eine Signalfunktion erhalten bleibt. Vermutlich reicht die Transportkapazität von SULTR1;1 bei höherer Sulfatverfügbarkeit für eine ausreichende Sulfatkonzentration in den Pflanzen aus. Die intakte Funktion von SULTR1;2^{E372Q}-GFP als Sulfatsensor führt dann möglicherweise zu einer Komplementation des GSL-Chemotyps. Dies unterscheiden die Komplementationslinie S1;2^{E372Q}-GFP von *sel1-15* und *sel1-16*, bei denen trotz ausreichender Sulfatkonzentration verringerte GSL-Konzentrationen beobachtet wurden (Abb. 9). Da in diesem Experiment kein Effekt eindeutig auf eine veränderte Transport- bzw. Signalaktivität für SULTR1;2^{E372Q}-GFP zurückzuführen war, müssen diese Funktionen in Zukunft in einem anderen System, beispielsweise in Hefe, spezifischer analysiert werden (Abb. 18).

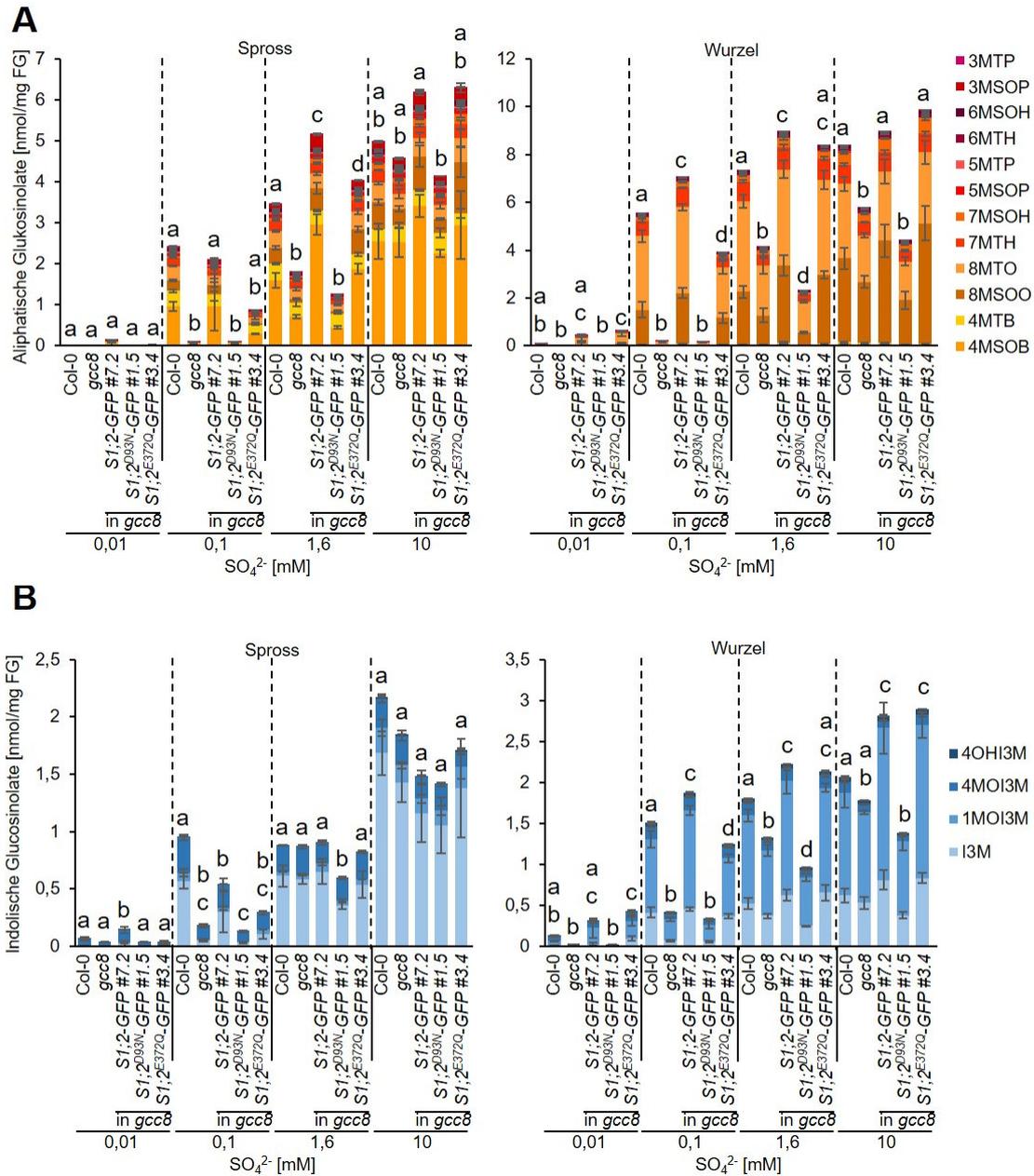


Abb. 16: Glukosinolatgehalt von Col-0, *gcc8* und Komplementationlinien

Gehalt der aliphatischen (A) und indolischen (B) GSL pro Frischgewicht in Spross- bzw. Wurzelgewebe. Die Pflanzen wurden zehn Tage vertikal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL. Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe zusammenaddiert. Es wurden zwei bis vier biologische Replikate mit je sieben bis elf Individuen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test getrennt für jede Sulfatkonzentration, für aliphatische bzw. indolische GSL in Spross und Wurzel durchgeführt. Verschiedene Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$).

3 Diskussion

3.1 Auswirkungen von *gcc8* auf den Sulfattransport

Beim Screen für *gcc*-Mutanten zeigte *gcc8* sehr geringe Gehalte des häufigsten GSL in Col-0, 4MSOB aber auch anderer GSL (Grubb *et al.*, 2002). In einer Vorarbeit wurde die Mutation von *gcc8* am Ende des Chromosoms 1 lokalisiert und als Allel von *SULTR1;2* identifiziert (Abb. 5) (Ramamoorthy, 2015). *SULTR1;1* und *SULTR1;2* sind für die Sulfataufnahme über die Wurzel in *A. thaliana* verantwortlich, wobei *SULTR1;2* als wichtigster Sulfattransporter beschrieben wurde (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *gcc8* eine verringerte Sulfataufnahmekapazität im Vergleich zu Col-0 aufweist. Bei Selenatstress wiesen *gcc8*-Mutanten eine verringerte Inhibierung des Wurzelwachstums im Vergleich zum WT auf (Abb. 7). Dies ist ein indirekter Nachweis für die beeinträchtigte Sulfataufnahmekapazität. Der Unterschied im Wurzelphänotyp zeigt an, dass das toxische Selenat, welches chemisch ähnlich zu Sulfat ist und ebenfalls über *SULTR1;2* in die Pflanze transportiert wird, von *gcc8* in geringeren Mengen aufgenommen wird. Dies führt zu einer verringerten Hemmung des Wurzelwachstums in *gcc8* im Vergleich zu Col-0. Eine ähnliche Reaktion zeigten auch die Mutanten *sel1-15* und *sel1-16*. Diese und weitere *sultr1;2*-Allele wurden in der Vergangenheit bereits aufgrund der erhöhten, *sultr1;2*-vermittelten Selentoleranz identifiziert (Rose *et al.*, 1997; Shibagaki *et al.*, 2002; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; El Kassis *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014).

Darüber hinaus weisen die beobachteten Defizite im Wurzelwachstum bei *gcc8* unter Sulfatmangel und bei Standardanzuchtsbedingungen auf eine klare *SULTR1;2*-Abhängigkeit der Sulfatversorgung von *A. thaliana* hin. Das Ausmaß der Wachstumsinhibierung scheint dabei allelabhängig zu sein, denn *sel1-15* und *sel1-16* zeigen einen schwächeren Effekt (Abb. 7). Möglicherweise haben die Mutationen unterschiedlich starke Effekte auf die Funktion. Um dies zu bewerten, wären genauere Analysen der Transportkapazität von *sel1-15* und *sel1-16* beispielsweise in Hefe nötig. Auch Baberon *et al.* (2008) stellen bei dem *sultr1;2*-Allel *sel1-8* keinen Unterschied im Wurzelwachstum fest. Das gleiche galt für die analysierte *sultr1;1*-T-DNA-Insertionslinie. Lediglich die *sultr1;1sultr1;2*-Doppelmutante zeigte unter Sulfatmangel verringertes Wurzelwachstum.

Möglicherweise ist die Beobachtung auch abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze. Baberon *et al.* (2008) führten ihre Analysen mit neun Tage alten Keimlingen durch. In diesem frühen Stadium können die Keimlinge möglicherweise noch auf Sulfatreserven aus Samen zurückgreifen, während diese nach zwei Wochen, dem in der vorliegenden Studie betrachteten Zeitpunkt, aufgebraucht sind und die Wachstumsunterschiede sichtbar werden. Interessanterweise zeigen jedoch adulte *gcc8*-Pflanzen auf Erde keine makroskopischen Veränderungen im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp und obwohl *SULTR1;1* und *SULTR1;2* die einzigen Sulfattransporter in der Wurzel sind, ist auch die *sultr1;1sultr1;2*-Doppelmutante lebensfähig und bildet keimfähige Samen aus. Dies wirft die Frage auf, ob es sich bei den von Baberon *et al.* (2008) untersuchten Allelen um tatsächliche *knock out*-Allele handelt. So könnte die Punktmutation in *sel1-8* zwar den Transport beeinträchtigen, aber nicht vollständig verhindern. Durch die Expression von *sel1-8* konnte allerdings der $\Delta sul1/\Delta sul2$ -Hefestamm nicht komplementiert werden (Shibagaki *et al.*, 2002), was für einen Verlust der Transportfunktion bei *sel1-8* spricht. Alternativ legt die Beobachtung bei *sultr1;1sultr1;2* nahe, dass *A. thaliana* auch unabhängig von *SULTR1;2* ihren Schwefelbedarf zumindest zum Teil abdecken kann. Beispielsweise können die Pflanzen über AS Permeasen (AAPs) auch Cystein und Methionin aus dem Boden aufnehmen (Fisher *et al.*, 1998; Svennerstam *et al.*, 2011; Dinkeloo *et al.*, 2018). Für *sel1-15* und *sel1-16* wurde gezeigt, dass die Cysteinaufnahme unabhängig von *SULTR1;2* ist und mit steigender Cysteinverfügbarkeit die Transkriptmenge

des Sulfatmangelmarkergens *BGLU28* in WT und *sultr1;2* sinkt (Zhang *et al.*, 2014). Dies ist ein Zeichen dafür, dass Cystein als Schwefelquelle für *A. thaliana* dienen kann. In natürlicher Umgebung ist Sulfat allerdings die wichtigste Schwefelquelle für Pflanzen (Takahashi *et al.*, 2011), was die Bedeutung von SULTR1;2 unterstreicht.

3.2 Auswirkungen von *gcc8* auf Glukosinolat- und Sulfatmetabolismus

Mit einem Allelismustest wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Mutation von *gcc8* allelisch zu bereits beschriebenen *se/1*-Mutanten ist und wie sich die unterschiedlichen Allele auf den GSL-Gehalt auswirken. Dabei zeigte sich eine klare Abhängigkeit des GSL-Chemotyps von der SULTR1;2-Funktionalität vor allem für aliphatische GSL (Abb. 8). Für die verschiedenen Allele wurde unter Standardbedingungen ein ähnlicher Effekt auf den GSL-Gehalt beobachtet. Der Verlust von SULTR1;2 hatte allerdings teilweise gewebespezifische Auswirkungen. So wurde in der Wurzel eine dosisabhängige Wirkung von *SULTR1;2* auf den Gehalt von aliphatischen GSL beobachtet. Die F1-Kreuzungen mit Col-0 und einem *sultr1;2*-Allel zeigten intermediären aliphatischen GSL-Gehalt in der Wurzel, während dieser im Spross mit Col-0 vergleichbar war (Abb. 8). Dies könnte darauf hinweisen, dass die SULTR1;2-Aktivität die GSL-Verteilung innerhalb der Pflanze beeinflussen kann. Andererseits könnte der beobachtete Effekt auch darauf zurückzuführen sein, dass der verringerte GSL-Gehalt in *sultr1;2*-Mutanten nicht ausschließlich aufgrund beeinträchtigter Biosynthese sondern auch durch erhöhten Abbau durch Myrosinasen wie *BGLU28* zustande kommt. Transkriptanalysen zeigen eine deutlich erhöhte *BGLU28*-Transkriptmenge in *gcc8* im Vergleich zu Col-0 unter Standardbedingungen (Abb. 10). Im Gegensatz dazu war die Transkriptmenge von *SDI1* in *gcc8* nicht signifikant erhöht. *SDI1* ist ein Sulfatmangelmarkergen und das kodierte Protein wirkt als Repressor der GSL-Biosynthese bei Sulfatmangel (Arabi *et al.*, 2016). Auf diese Weise kann der Sulfatverbrauch von zentralem und spezialisiertem Sulfatmetabolismus in Abhängigkeit der Sulfatverfügbarkeit angepasst werden. Die Ergebnisse der Transkriptanalysen weisen darauf hin, dass SULTR1;2 die GSL-Nettobiosynthese möglicherweise vor allem durch die Veränderung des GSL-Abbaus, beispielsweise mittels *BGLU28*, nicht jedoch durch unmittelbare Beeinträchtigung der GSL-Biosynthese beeinflusst.

Mit dieser Funktionsweise könnte auch die Beobachtung erklärt werden, dass die Gehalte der aliphatischen GSL tendenziell stärker durch SULTR1;2 beeinflusst werden im Vergleich zu indolischen (Abb. 8, Abb. 9). Aliphatische GSL enthalten jeweils zwei Schwefelatome, während indolische nur eins besitzen. Möglicherweise könnten aus diesem Grund aliphatische GSL auch bevorzugt für die Sulfatmobilisierung unter Sulfatmangelbedingungen genutzt und abgebaut werden. Wenn der Verlust von SULTR1;2 vor allem eine erhöhte Sulfatremobilisierung aus GSL zur Folge hat, wäre der Abbau aliphatischer GSL also die ergiebiger Schwefelquelle. In Übereinstimmung zu dieser Theorie wurden unter Standardbedingungen deutlichere Unterschiede zwischen WT und *sultr1;2*-Mutanten im Gehalt der aliphatischen GSL im Vergleich zu den indolischen beobachtet (Abb. 8, Abb. 9). Die Bedeutung von *BGLU28* bei der Sulfatmobilisierung und die stark erhöhte Expression bei Sulfatmangel wurden bereits mehrfach demonstriert (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014). Möglicherweise wird über die differenzielle Expression von Myrosinasen reguliert, welche GSL im Zuge der Sulfatmangelantwort abgebaut werden. So reagieren einige Myrosinasen mit unterschiedlicher Präferenz mit den verschiedenen Klassen von GSL (Chhajed *et al.*, 2019). Allerdings wurden *BGLU28* und *BGLU30* in einer aktuellen Studie als zwei der wichtigsten Myrosinasen zur Sulfatmobilisierung aus GSL unter Sulfatmangel identifiziert (Zhang *et al.*, 2020). So zeigen *bglu28/bglu30* Doppelmutanten unter Sulfatmangel

deutlich höhere GSL-Gehalte und beeinträchtigt Wachstum im Vergleich zum WT. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung einer ausgewogenen Kontrolle der Myrosinaseaktivität für das Pflanzenwachstum. Der Effekt der Myrosinaseaktivität auf den GSL-Gehalt in *sultr1;2*-Mutanten macht sich vor allem bei höherer Sulfatverfügbarkeit bemerkbar. So wurden nur bei 1,6 mM und 10 mM SO_4^{2-} im Medium zumindest tendenziell ein unterschiedlicher Effekt des SULTR1;2-Verlustes auf aliphatische bzw. indolische GSL beobachtet (Abb. 9). Bei geringerer Sulfatverfügbarkeit (0,1 mM SO_4^{2-}) ist wahrscheinlich der geringere Sulfatgehalt aufgrund der verringerten Sulfataufnahmekapazität in *sultr1;2* entscheidender für den GSL-Gehalt. Daher ist bei 0,01 mM und 0,1 mM SO_4^{2-} der Einfluss auf den Gehalt aliphatischer und indolischer GSL vergleichbar (Abb. 9).

Allerdings zeigt SULTR1;2 bei 0,01 mM SO_4^{2-} im Medium einen gewebespezifischen Effekt auf den GSL-Gehalt (Abb. 9). Bei diesem starken Sulfatmangel waren GSL im Spross aller Linien kaum detektierbar. In der Wurzel zeigten die Kontrolllinien dagegen einen signifikant höheren GSL-Gehalt im Vergleich zu den Mutantenlinien. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass das in die Wurzel aufgenommene Sulfat vermutlich direkt zur GSL-Biosynthese genutzt wurde, noch bevor das Sulfat über die Leitbündel zum Spross transportiert werden konnte.

Zusammenfassend liefert diese Studie Hinweise darauf, dass SULTR1;2 vor allem bei geringerer Sulfatverfügbarkeit den GSL-Gehalt aufgrund der verringerten Sulfataufnahmekapazität beeinflusst. Bei höherer Sulfatverfügbarkeit zeigt sich ein unterschiedlicher Effekt auf aliphatische bzw. indolische GSL, welcher nicht durch die veränderte Aufnahmekapazität erklärt werden kann. Vielmehr weist diese Beobachtung auf eine weitere Möglichkeit für SULTR1;2 hin, den GSL-Haushalt zu beeinflussen. Möglicherweise spielt SULTR1;2 auch in zellulären Signalwegen eine Rolle und ist so beispielsweise bei der Regulierung der Myrosinaseaktivität beteiligt.

3.3 Die potenzielle Funktion von SULTR1;2 als Transzeptor

Unter Standardbedingungen (1,6 mM SO_4^{2-} im Medium) wurden bei *gcc8* stark erhöhte *BGLU28*-Transkriptmengen im Vergleich zu Col-0 beobachtet. Dies ist ein Hinweis auf erhöhten Sulfatmangel in der *sultr1;2*-Mutante. Während der WT also genügend Sulfat aufnahm, konnte SULTR1;1 den Verlust von SULTR1;2 in *gcc8* nicht vollständig ausgleichen. Dies wurde auch bei Messungen des internen Sulfatgehaltes bei ähnlicher Sulfatverfügbarkeit in anderen *sultr1;2*-Mutanten beobachtet (Zhang *et al.*, 2014). Dort zeigten *sel1-15* und *sel1-16* geringere Sulfatgehalte als die WT-Linie. Im Einklang dazu wurden in der vorliegenden Studie auch geringere Gehalte aliphatischer GSL in *gcc8*, *sel1-15* und *sel1-16* gemessen (Abb. 9). Weitere Messungen von Zhang *et al.* (2014) zeigten, dass bei einer hohen Sulfatverfügbarkeit von 10 mM SO_4^{2-} die internen Sulfatgehalte von *sultr1;2*-Mutanten und WT vergleichbar sind. Interessanterweise wiesen die verwendeten Mutantenlinien in dieser Studie jedoch auch unter diesen Bedingungen erhöhte *BGLU28*-Transkriptmengen und tendenziell weniger aliphatische GSL auf. Dies könnte ein Hinweis sein, dass SULTR1;2 nicht nur als Sulfattransporter fungiert, sondern darüber hinaus eine Rolle in der Regulierung der Sulfatmangelantwort spielt. So könnten ohne funktionellem SULTR1;2 in *A. thaliana* eine oder mehrere Signalketten unterbrochen sein, was zu einer Deregulierung der Stressantwort führt. Proteine mit Transport- und Sensor- bzw. Signalfunktion, sogenannte Transzeptoren, wurden in Pflanzen bereits für den Nitratmetabolismus beschrieben (Bouguyon *et al.*, 2015). In Hefe wurde der Mechanismus der Signalfunktion von Phosphat- und Sulfattransportern sehr genau untersucht (Popova *et al.*, 2010; Kankipati *et al.*, 2015). Für die Analyse von Transzeptoren ist es notwendig, die Transportfunktion von der Signalfunktion zu entkoppeln, um beide unabhängig voneinander

manipulieren und untersuchen zu können.

Bei den in dieser Studie generierten SULTR1;2-Varianten SULTR1;2^{D93N} und SULTR1;2^{E372Q} wurden gezielt AS an Positionen ausgetauscht, welche für die SULTR1;2-Funktionalität bedeutend sein könnten. Dafür sprechen Analysen der Sulfattransporter SUL1 und SUL2 in *S. cerevisiae* (Kankipati *et al.*, 2015). Dort führten die analogen Mutationen zu unterschiedlichen Effekten. Der AS-Austausch D124N in SUL1 beeinträchtigte sowohl Transport- als auch die Signalfunktion, welche für die Induktion des PKA-Signalwegs essenziell ist. Während durch die Austausche E427Q und E443Q bei SUL1 bzw. SUL2 zwar der Sulfattransport unterbunden wurde, konnte der PKA-Signalweg allerdings weiterhin induziert werden. Sulfattransporter sind in unterschiedlichen Organismen ähnlich aufgebaut und weisen stark konservierte Abschnitte in der AS-Sequenz auf. Hefe SULs und *Arabidopsis* SULTRs haben mit etwa 25% zwar keine hohe Sequenzhomogenität für die komplette AS-Sequenz, aber sie zeigen Übereinstimmungen beim Vorkommen von TMD und darin enthaltener AS. Die bei SUL1 und SUL2 ausgetauschte Glutaminsäure (E) ist nicht nur in *Arabidopsis* SULTRs stark konserviert (Abb. 14). Auch bei Sulfattransportern in Pilzen und beim Menschen ist die Glutaminsäure an der analogen Stelle zu finden (Kankipati *et al.*, 2015). So könnte diese Position ein wichtiges Merkmal für die Funktionalität der Sulfattransporter sein. Dafür spricht auch die Position der AS am Rand der TMD (Abb. 17). Die Bedeutung von AS in diesen Bereichen wurde bereits für den Phosphattransporter Pho84 in *S. cerevisiae* demonstriert (Popova *et al.*, 2010). Im Zuge des Phosphattransports ist eine Konformationsänderung für die Signalweiterleitung notwendig. Der Austausch bestimmter AS im Bereich der Phosphatbindestelle, welche sich am extrazellulären Rand der TMD befindet, führt zu einer Beeinträchtigung des Transports. Allerdings können Phosphat oder unterschiedliche Agonisten weiterhin an Pho84 binden und bewirken die Konformationsänderung, welche die Signalweiterleitung induziert. Es ist vorstellbar, dass SULs und SULTRs ähnlich funktionieren könnten. Daher sind stark konservierte AS am Rand von TMD geeignete Kandidaten, um durch gezielte Mutationen Transport- und Rezeptorfunktion in Sulfattransportern getrennt zu manipulieren.

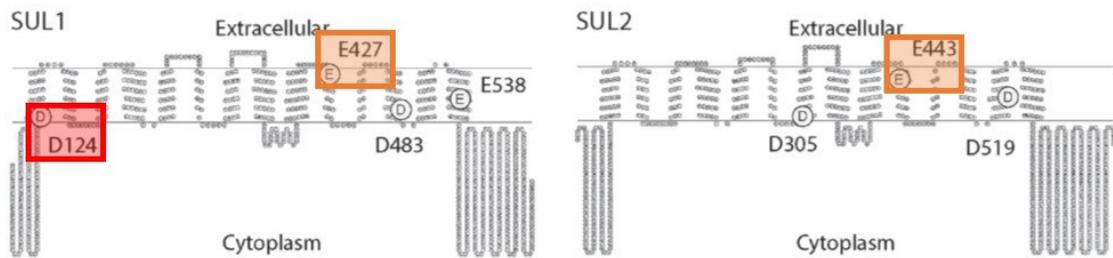
Die zytologische Untersuchung der etablierten SULTR1;2-Varianten in *gcc8* zeigte für SULTR1;2^{D93N}-GFP eine deutlich veränderte subzelluläre Lokalisation (Abb. 15). Während die WT-Variante und SULTR1;2^{E372Q}-GFP entlang der Zellmembran beobachtet wurde, war SULTR1;2^{D93N}-GFP im Zytosol. Diese Veränderung der Lokalisation war bisher nicht bekannt, da sie in Hefe nicht untersucht wurde. Diese Beobachtung könnte allerdings erklären, warum bei SUL1^{D124N} die Transportfunktion beeinträchtigt ist. Um Sulfat in die Zelle transportieren zu können, ist die Membranlokalisierung für einen Transporter essenziell. Membranproteine werden im ER translatiert und dort in die Membran integriert, um anschließend über Vesikeltransport beispielsweise zur Plasmamembran transportiert zu werden (Guna & Hedge, 2018). Die Integration der Proteine in die Membran kann über Signalpeptide oder die erste TMD des Proteins vermittelt werden. Ein Signalpeptid wurde in SULTR1;2 nicht gefunden, allerdings sind für diese oft keine Konsensussequenzen bekannt (Pierleoni *et al.*, 2011). Signalpeptide befinden sich am äußeren N-Terminus. So könnte beispielsweise eine N-terminale GFP-Fusion zu einer veränderten Proteinlokalisierung führen. Bei SULTR1;2 wurden jedoch für N- und C-terminale Fusionsvarianten eine Membranlokalisierung beobachtet (Abb. A 2). Das legt nahe, dass kein Signalpeptid für die Membranintegration von SULTR1;2 benötigt wird. Die Proteinlokalisierung und der posttranslationale Transport kann auch durch die Struktur und die Länge der TMD beeinflusst werden (Cosson *et al.*, 2013). Es ist denkbar, dass der AS-Austausch bei SULTR1;2^{D93N}-GFP die Membranintegration durch die Veränderung in der ersten TMD verhindert, während Varianten mit Mutationen außerhalb der ersten TMD eine WT-ähnliche Membranlokalisierung aufweisen.

Die veränderte subzelluläre Lokalisation beeinträchtigt die SULTR1;2-Funktion in *A. thaliana* maßgeblich. So war SULTR1;2^{D93N}-GFP nicht in der Lage, den GSL-Chemotyp in *gcc8* zu komplementieren (Abb. 16). Diese Beobachtung legt nahe, dass SULTR1;2^{D93N}-GFP keine

Transportfunktion aufweist. Die *gcc8*-Komplementationslinien mit SULTR1;2-GFP und SULTR1;2^{E372Q}-GFP zeigten dagegen WT-ähnliche GSL-Gehalte. Ob und inwiefern der E372Q-Austausch die SULTR1;2-Funktion beeinträchtigt, kann in diesem Experiment nicht eindeutig gezeigt werden. Möglicherweise führt die Mutation in SULTR1;2, analog zu den AS-Austauschen in SUL1 und SUL2 zum Verlust der Transportfunktion ohne die Signalfunktion zu beeinträchtigen. In diesem Fall könnte SULTR1;2^{E372Q}-GFP weiterhin als Sulfatsensor fungieren und die Pflanze über ein SULTR1;2-abhängiges Signal den Sulfatstatus wahrnehmen. Diese Signalfunktion könnte einen erhöhten GSL-Abbau wie in *gcc8* oder S1;2^{D93N}-GFP unterbinden. Um zu testen, ob die Komplementierung des *gcc8*-Chemotyps allein auf der Signalfunktion von SULTR1;2^{E372Q}-GFP zurückzuführen ist, ist es notwendig, die Transportaktivität der Variante zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen D93N und E372Q an den bei Sulfattransportern stark konservierten AS in SULTR1;2 unterschiedliche Effekte haben und dass der Funktionsverlust von SULTR1;2^{D93N}-GFP wahrscheinlich auf eine veränderte Lokalisation zurückzuführen ist. Darüber hinaus ermöglichen die etablierten SULTR1;2-Varianten die Durchführung weiterführender Experimente, um die Effekte der Mutationen auf Transport- und Signalfunktion genauer und unabhängig voneinander zu analysieren.

A



B

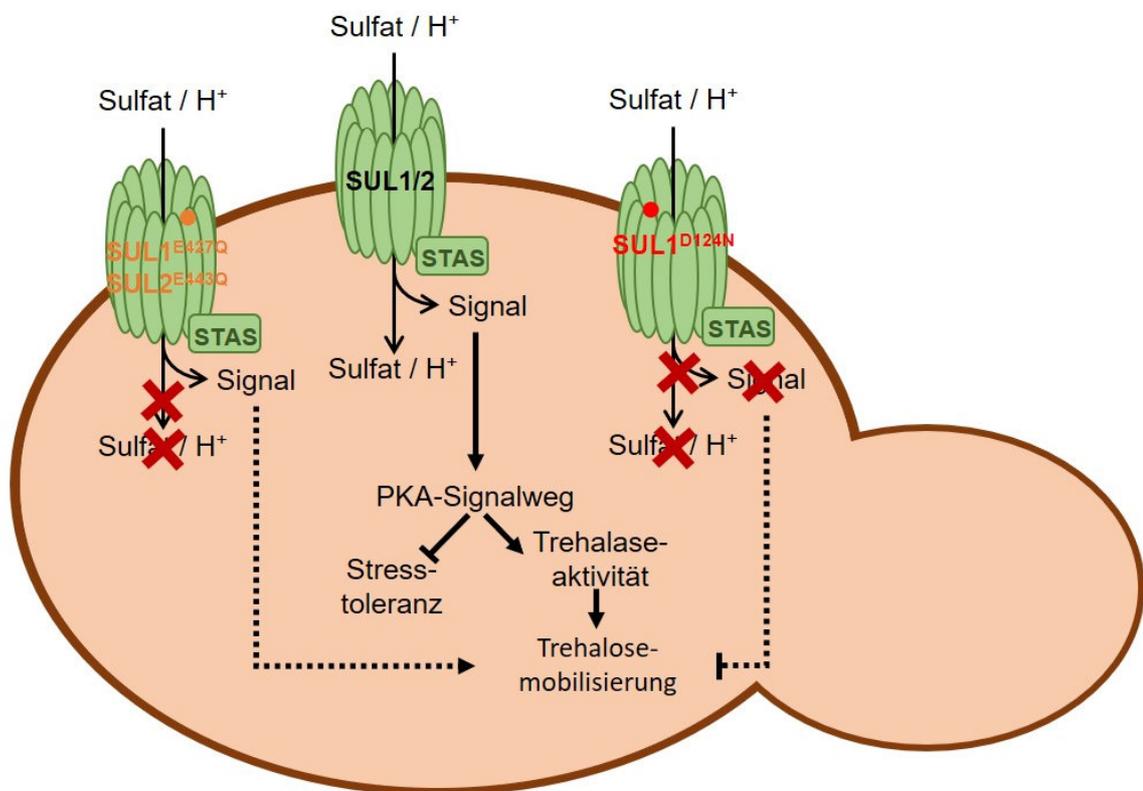


Abb. 17: Entkopplung von Transport- und Signalfunktion bei Sulfattransportern SUL1 und SUL2 in *S. cerevisiae*

A Position der konservierten AS, welche in SUL-Transportern ausgetauscht wurden. **B** Die AS-Austausche haben unterschiedliche Auswirkungen auf die SUL-Funktion in Hefe. Bei SUL1^{E427Q} und SUL2^{E443Q} ist der Sulfattransport beeinträchtigt, während die Signalfunktion unabhängig vom Transport unverändert bleibt. Bei SUL1^{D124N} sind sowohl Transport- als auch Signalfunktion beeinträchtigt.

3.4 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass SULTR1;2 eine wichtige Rolle in der Regulierung des GSL-Gehalts in *A. thaliana* spielt. Die postulierte Transzeptorfunktion von SULTR1;2 konnte dagegen in der Pflanze nicht demonstriert werden. Einerseits existiert mit SULTR1;1 ein zweiter Sulfattransporter, welcher zumindest teilweise die verringerte Transportkapazität bei einem SULTR1;2-Verlust in der Wurzel ausgleichen kann. Andererseits ist die Regulierung des spezialisierten Sulfatstoffwechsels komplex und beinhaltet weitere SULTR1;2-unabhängige Signalketten. Allerdings wurden für die verschiedenen Mutationen der generierten SULTR1;2-Varianten in Komplementationslinien unterschiedliche Effekte auf die GSL-Konzentration beobachtet. Diese SULTR1;2-Varianten können nun für weiterführende Experimente und die genauere Analyse der SULTR1;2-Funktion genutzt werden. In einem weniger komplexen System als *A. thaliana* wäre es möglich, die unterschiedlichen Effekte der Mutationen auf die Transport- und eine mögliche Signalfunktion von SULTR1;2 zu untersuchen.

Ein geeigneter Organismus für diese Analyse wäre *S. cerevisiae*, weil dabei die Prozesse in einem einzelligen System betrachtet werden können. Er besitzt mit SUL1 und SUL2 genau zwei Transporter, welche die gesamte Sulfataufnahme bewerkstelligen. Die *S. cerevisiae* Doppelmutante $\Delta sul1/\Delta sul2$ kann nicht auf Medium überleben, das Sulfat als einzige Schwefelquelle enthält. Jedoch wurde in vorherigen Arbeiten bereits demonstriert, dass *Arabidopsis* SULTRs $\Delta sul1/\Delta sul2$ komplementieren können (Abb. 18A; Yoshimoto *et al.*, 2003; Tomatsu *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2016). Die Sulfattranszeptoren SUL1 und SUL2 sind neben dem Sulfattransport auch für die Aktivierung des PKA-Signalwegs nach Sulfatmangel notwendig. Die Anzucht von Hefezellen in Anwesenheit von Glukose unter Sulfatmangel führt zur Inhibierung des Wachstums in der G1-Phase des Zellzyklus und die Zellen treten in die stationäre G0-Phase ein (Kankipati *et al.*, 2015). Außerdem werden Reservekohlenhydrate wie Trehalose eingelagert und die Zahl der Sulfattransporter in der Plasmamembran erhöht (Abb. 18B). Nach anschließender Zugabe von Sulfat wird SUL-abhängig der PKA-Signalweg aktiviert, welcher zu verschiedenen Umstellungen des Metabolismus führt. Beispielsweise wird die Expression von Trehalase induziert, um die Trehalose zu mobilisieren (Abb. 18B).

Durch die Expression der SULTR1;2-Varianten in $\Delta sul1\Delta sul2$ -Zellen kann die Transport- und Signalfunktion des *Arabidopsis* Transzeptors analysiert werden. So kann überprüft werden, welche Varianten den Hefestamm komplementieren und das Wachstum auf sulfathaltigem Medium ermöglichen. Die Komplementation würde nahelegen, dass die verwendete SULTR1;2-Variante in der Lage ist, Sulfat über die Plasmamembran in die Zelle zu transportieren. Haben die Mutationen der in der Arbeit generierten Varianten den gleichen Effekt wie die analogen AS-Austausche in Hefe, wäre nur WT-SULTR1;2 in der Lage $\Delta sul1/\Delta sul2$ zu komplementieren und das Wachstum zu ermöglichen (Abb. 18C). Eine mögliche Signalfunktion von SULTR1;2 kann über die Aktivierung des PKA-Signalweges in Hefe nachgewiesen werden. So wurde in einer Studie gezeigt, dass *A. thaliana* Ammoniumtransporter (Amt1;1, Amt1;2, Amt1;3) die Ammonium-induzierte PKA-vermittelte Trehalaseaktivierung in $\Delta mep1/\Delta mep2/\Delta mep3$ -Hefemutanten bewerkstelligen konnten (Van Nuland *et al.*, 2006). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass in $\Delta sul1/\Delta sul2$ -Hefestämmen, welche jeweils eine SULTR1;2-Variante exprimieren, auch eine potenzielle Signalwirkung von SULTR1;2 getestet werden kann. Die Aktivierung des PKA-Signalwegs kann in Zellen, welche unter Sulfatmangel angezogen wurden, nach Sulfatzugabe über die Trehalose Mobilisierung analysiert werden (Abb. 18B). Auf diese Weise kann grundsätzlich untersucht werden, ob SULTR1;2 eine Signalfunktion besitzt und daher wahrscheinlich auch in *A. thaliana* als Transzeptor fungiert. Außerdem kann mit diesem Experiment getestet werden, ob der AS-Austausch E372Q in SULTR1;2 den gleichen Effekt hat wie die analogen Mutationen in SUL1 bzw. SUL2 und die Signalfunktion in SULTR1;2^{E372Q} bei gleichzeitigem Verlust der Transportaktivität erhalten bleibt (Abb. 18C). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich

diese Experimente durchzuführen. Sie bergen jedoch das Potenzial eine mögliche Transzeptorfunktion von SULTR1;2 zu demonstrieren, die in der Vergangenheit wiederholt postuliert wurde.

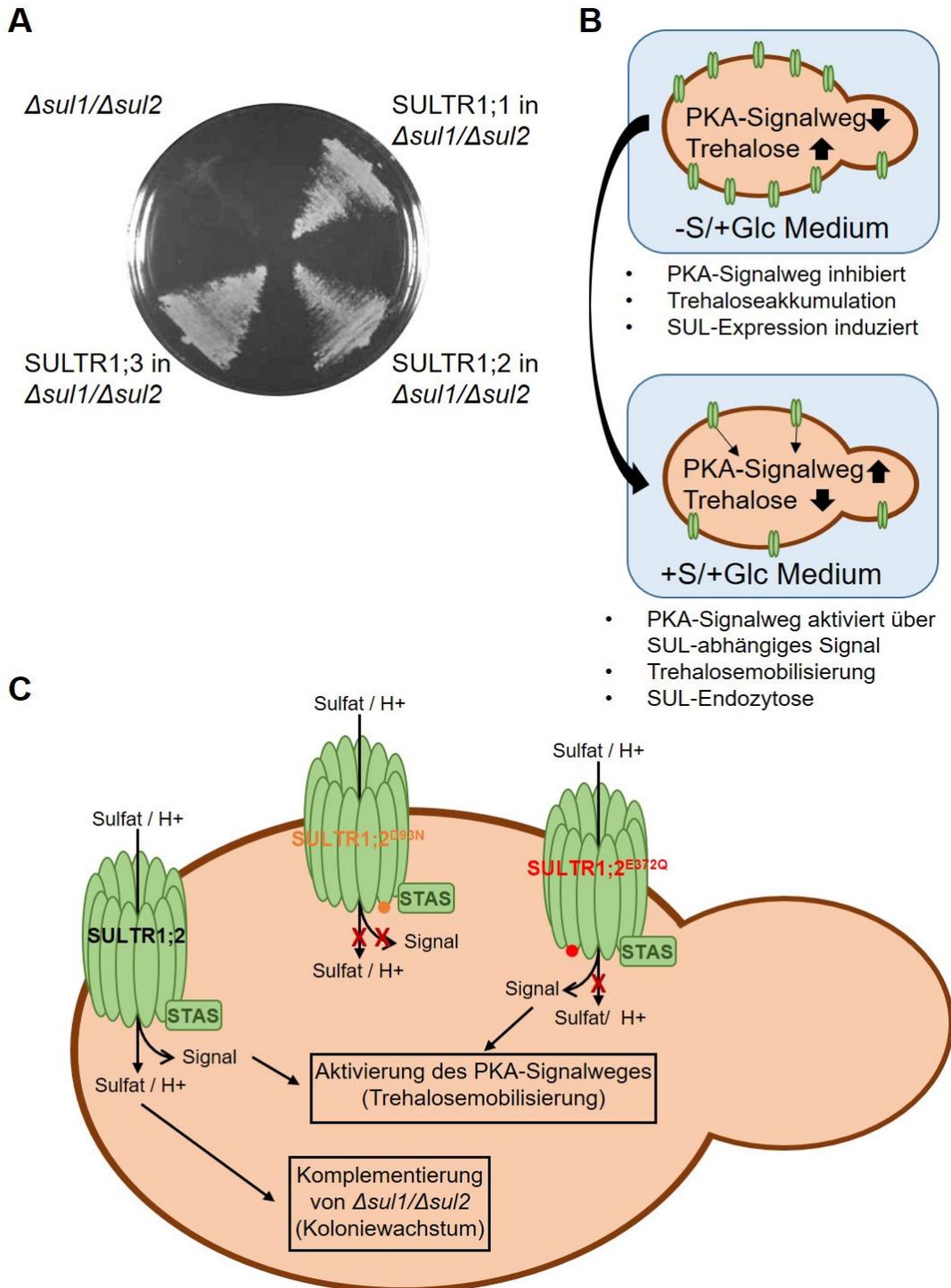


Abb. 18: Funktionelle Analyse von SULTR1;2 in *S. cerevisiae*

A SULTR1;1, SULTR1;2 und SULTR1;3 können den Sulfattransport in Hefe bewerkstelligen und komplementieren den $sul1\Delta sul2\Delta$ -Hefestamm (Yoshimoto *et al.*, 2003) **B** Induktion von Trehaloseabbau über den PKA-Signalweg nach Sulfatmangel in Hefezellen angezogen auf glukosehaltigen Medium. Bei Sulfatmangel wird Trehalose akkumuliert und die Expression von SUL aktiviert. Nach Zugabe von Sulfat wird Trehalose aufgrund der PKA-abhängigen Induktion von Trehalase abgebaut und SUL durch Endozytose von der Plasmamembran entfernt. **C** Modell der unterschiedlichen Funktionalität und der Entkopplung von Transport- und Signalfunktion bei den generierten SULTR1;2-Varianten in Hefe

Bei der Analyse unterschiedlicher *sultr1;2*-Mutanten wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass auch die C-terminale zytosolische STAS-Domäne einen Einfluss auf die Funktion von SULTR1;2 hat (Shibagaki & Grossman, 2010). Beispielsweise weisen die *sultr1;2-knock out*-Allele *sel1-3*, *sel1-7* und *sel1-8* Mutationen im Bereich der STAS-Domäne auf (Shibagaki & Grossman, 2004). Die Studien mit diesen Mutanten demonstrierten, dass die Domäne entscheidend für Transportfunktion sowie die Integration in die Plasmamembran und die Proteinstabilität ist. Darüber hinaus könnte sie eine weitere Rolle im Schwefelstoffwechsel spielen, denn die STAS-Domäne kann Protein-Protein-Interaktionen eingehen und so die Aktivität von SULTR1;2 und dem Interaktionspartner verändern. Interessanterweise wurde OAS-TL, eine Komponente des Cystein-Synthase-Komplexes, als STAS-Interaktor identifiziert und eine mögliche Regulation und Koordination von Sulfattransport und Reduktionsenergie der Zelle postuliert (Shibagaki & Grossman, 2010). Die Bindung von OAS-TL an SULTR1;2 via STAS-Domäne blockiert den Sulfattransport, während die OAS-TL-Aktivität möglicherweise erhöht wird (Abb. 19A). Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Effekt SULTR1;2-spezifisch ist. *In vitro* Experimente zeigten, dass die STAS-Domäne von SULTR1;1 nicht mit OAS-TL interagiert und auch keinen Einfluss auf die Cysteinsynthese hat. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine Rolle von SULTR1;2 bei der Regulation der Sulfataufnahme und der Cysteinsynthese in Abhängigkeit der S²-Konzentration in der Zelle postuliert (Shibagaki & Grossman, 2010). Diese Untersuchungen betrachteten jedoch nicht, welche Rolle die STAS-Domäne für eine mögliche Transzeptorfunktion von SULTR1;2 spielt. In einer vorherigen Studie wurde bereits gezeigt, dass der Austausch der STAS-Domänen von SULTR1;1 und SULTR1;2 einen Einfluss auf die Transportfunktion hat (Shibagaki & Grossman, 2004). Um zu testen, ob die SULTR1;2-STAS-Domäne oder die membranständige Transporterregion für eine mögliche Signalfunktion notwendig ist, wurden STAS-Austausch-Varianten von SULTR1;2 und SULTR1;1 generiert (Abb. 19B). Mit diesen Varianten ist es in Zukunft möglich, sowohl in *A. thaliana* Komplementationslinien als auch in heterologen Systemen wie Hefe die Rolle der STAS-Domäne für die SULTR1;1- und SULTR1;2-Aktivität zu untersuchen. Der zusätzliche Austausch der Promotoren ermöglicht darüber hinaus, den Einfluss der veränderten Expression auf den Sulfatmetabolismus und den GSL-Gehalt zu analysieren.

Diese Experimente, für die im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage geschaffen wurde, können zukünftig einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der SULTR1;2-Funktion in *A. thaliana* und für den gesamten Sulfatstoffwechsel leisten.

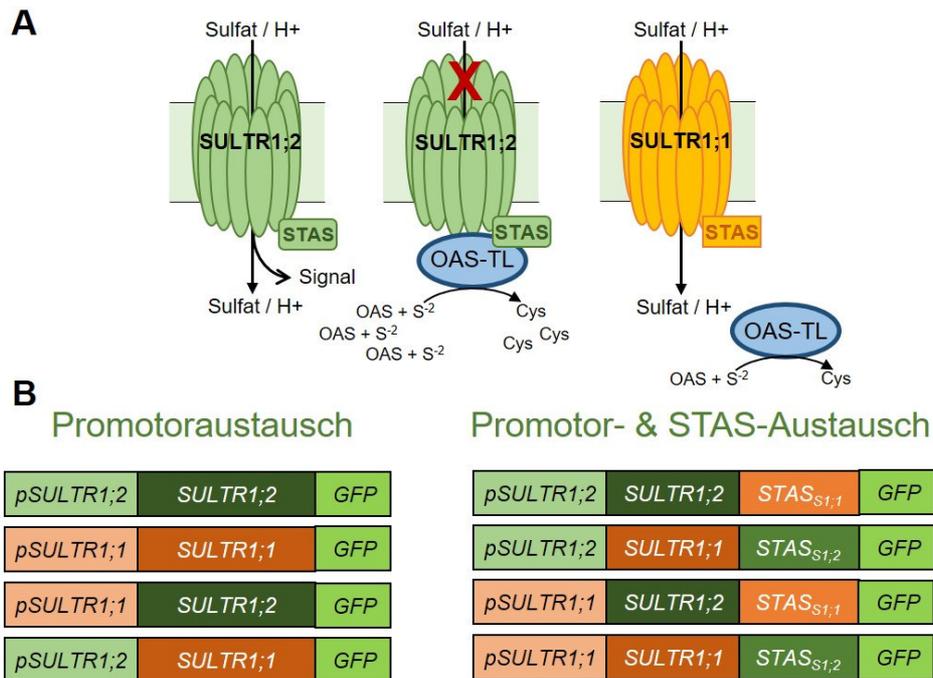


Abb. 19: Funktionelle Analyse der STAS-Domäne in SULTR1;1 und SULTR1;2

A Die STAS-Domäne von SULTR1;2 bindet OAS-TL. Die Interaktion beeinträchtigt den Sulfattransport über SULTR1;2 und erhöht die OAS-TL Aktivität. Bei SULTR1;1 ist die Transportaktivität unabhängig von OAS-TL, da die SULTR1;1-STAS-Domäne nicht mit OAS-TL interagiert. **B** Konstrukte für die funktionelle Analyse der STAS-Domäne und die Untersuchung der Bedeutung der OAS-TL Interaktion für den Sulfatmetabolismus und der GSL-Biosynthese

Teil III – IQD1 (*gcc7*)

1 Einleitung

1.1 Die IQ67-Domänen-Familie

Aus dem Screen einer *activation tagged* T-DNA-Population (Weigel *et al.*, 2000) nach Regulatoren des GSL-Haushalts wurde die Linie *gcc7* identifiziert, welche im Vergleich zum WT erhöhte GSL-Gehalte aufwies. In der *gcc7*-Mutante wurde die T-DNA-Insertion im vierten Exon der *RNA-Helikase 57 (RH57)* lokalisiert (Levy *et al.*, 2005). Diese T-DNA-Insertion beinhaltet vier Kopien des konstitutiv exprimierenden 35S-Promotors, was in *gcc7* die Transkriptmenge des benachbarten Genlokus At3G09710 (*IQD1*) erhöht. Die Überexpression führt zu einem erhöhten GSL-Gehalt und zu verbesserter Abwehr gegenüber dem Fraßfeind *Trichoplusia ni* (Levy *et al.*, 2005). Einige Gene, die Enzyme der GSL-Biosynthese wie CYP83B1 und CYP79B3 kodieren, waren in der Missexpressionslinie stärker exprimiert als in WT-Pflanzen. Außerdem konnte eine erhöhte *IQD1*-Expression nach Verwundung beobachtet werden. All das weist auf eine Rolle von *IQD1* in der Pflanzenabwehr hin. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Die Lokalisation im Nukleus und im Nukleolus lassen eine Funktion in der Genexpression vermuten. Welche Rolle die beobachtete Assoziation an MT für die *IQD1*-Funktion spielt, ist ebenfalls noch offen (Bürstenbinder *et al.*, 2013).

Bei einem Sequenzvergleich in *A. thaliana* und Reis wurden 33 bzw. 29 *IQD1*-verwandte Gene identifiziert (Abel *et al.*, 2005). Die kodierten Proteine zeichnen sich durch eine konservierte 67 AS umfassende Domäne aus, die mehrere, sich überlappende CaM-Bindemotive enthält. Zu diesen Motiven gehören bis zu drei Kopien des namensgebenden IQ-Motivs ([I,L,V]QxxxRxxxx[R,K]) sowie des 1-8-14-Motivs und des 1-5-10-Motivs. Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaft wurden die Proteine als IQ67-Domänen (IQD)-Familie zusammengefasst. IQ-Motive sind allerdings nicht nur bei IQD-Proteinen zu finden. Auch in Myosinen, *cyclic nucleotid gated channels* (CNGC) und *CaM binding transcription activators* (CAMTA), einer Gruppe von CaM-bindenden Transkriptionsfaktoren, sind IQ-Motive vorhanden (Abel *et al.*, 2005). Die Ionenkanäle CNGC haben eine mit der CaMBD überlappende Domäne, die zyklische Nukleotide binden kann (Köhler *et al.*, 2002). Sie könnten dadurch eine Schnittstelle zwischen Ionentransport und der Ca²⁺-Signalkette in der Zelle darstellen. In den Motorproteinen der Myosine wurden IQ-Motive in unterschiedlicher Anzahl in direkter Nähe der Motordomäne lokalisiert (Reddy & Day, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Transportgeschwindigkeit von der Anzahl der IQ-Motive abhängt, da sie mechanisch die Schrittlänge der Motorproteine verlängern (Bähler & Rhoads, 2001; Block, 1996), aber über CaM-Bindung auch die chemo-mechanischen Eigenschaften beeinflussen können (Dominguez *et al.*, 1998; Trybus *et al.*, 1994). CAMTA wurden nicht nur in *A. thaliana* sondern auch in Zellen von *Brassica napus*, *Drosophila melanogaster* und Menschen identifiziert (Bouché *et al.*, 2002). Im N-terminalen Teil besitzen sie ein Kernlokalisierungssignal und zwei DNA-Bindestellen, die CG-1- und TIG-Domäne. Die IQ-Motive befinden sich am C-terminalen Ende. Der erste Vertreter in *A. thaliana* wurde als Ethylen-induziertes CaM-Bindeprotein (EICBP) bezeichnet und zeigte, dass die Ca²⁺-Signalkette über CaM-Bindung an Transkriptionsfaktoren die Genexpression bei Anwesenheit von Ethylen beeinflussen kann (Reddy *et al.*, 2000).

Die IQ67-Domäne weist in Vorhersagen eine für CaMBD typische Helix-Struktur auf. Außerhalb dieser Region zeichnen sich IQD-Proteine durch eine hohe intrinsische Unordnung

aus. In diesem Bereich befinden sich auch weitere konservierte Motive mit unbekannter Funktion, die in IQD-Proteinen vermehrt auftauchen. Anhand von Verteilungsmuster und Vorkommen der Motive wurden die 33 *A. thaliana* IQD-Proteine in insgesamt sieben Untergruppen (Ia, Ib, Ic, II, IIIa, IIIb, IV) eingeteilt. Die Proteine der IQD-Familie in *A. thaliana* sind sehr divers bezüglich ihrer Länge (103-794 AS) und molekularen Masse (11,8 - 86,8 KDa) (Abel *et al.*, 2005). Mit Ausnahme von IQD32, zeichnen sie sich durch einen hohen Anteil der basischen AS Arg und Lys ($17,6\% \pm 2,2\%$) aus und weisen einen hohen isoelektrischen Punkt ($10,3 \pm 0,6$) auf.

IQD-Proteine bilden eine pflanzenspezifische Familie, deren Vertreter bereits in Bryophyten zu finden sind (Abel *et al.*, 2005). Da sie dagegen in Grünalgen fehlen, entwickelten sich IQD wahrscheinlich während des Übergangs der Pflanzen vom Wasser auf das Land. In den Genomen von vielen Angiospermen werden IQD von großen Multigenfamilien kodiert. Im Laufe der Evolution kam es in *A. thaliana* wahrscheinlich durch Genom- und Chromosomduplikation zu einer Diversifizierung der IQD. Die hohe Anzahl von acht Schwestergenpaaren spricht zusätzlich für eine funktionelle Diversifizierung im Zuge der evolutionären Entwicklung.

Obwohl es sich um eine große und weitverbreitete Familie handelt, wurden erste Funktionen einiger weniger IQD erst in den letzten Jahren beschrieben. Bei der Untersuchung zur subzellulären Lokalisation konnte gezeigt werden, dass die meisten IQD mit MT assoziiert sind (Bürstenbinder *et al.*, 2017). Die Beeinflussung des Zytoskeletts ist daher wahrscheinlich ein wichtiger Teil der Funktion von IQD. Die Organisation des Zytoskeletts bestimmt das Zellwachstum und damit auch das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzenorgane. Die Manipulation des Zytoskeletts kann diese Entwicklung stark beeinträchtigen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *IQD16* in *A. thaliana* die Orientierung von kortikalen MT beeinflusst und zu einer veränderten Zellform führt (Bürstenbinder *et al.*, 2017). Makroskopisch konnte bei diesen Pflanzen sowohl ein verlängertes Hypokotyl als auch verlängerte Blätter beobachtet werden. Diese Erkenntnisse bestätigen eine Rolle von IQD in der Regulation vom Wachstum und der Entwicklung in Pflanzen. Diese Hypothese wird weiterhin mit Beispielen aus anderen Pflanzenarten untermauert. In Tomatenpflanzen wurde gezeigt, dass durch eine Retrotransposon-vermittelte Duplikation die Überexpression eines *IQD12*-Homologs maßgeblichen Einfluss auf die Fruchtform hat (Xiao *et al.*, 2008). Die erhöhte Expression führt zu einer deutlichen Verlängerung der Früchte aufgrund veränderter Zellteilung (Wu *et al.*, 2011). In Reis konnte ein ähnlicher Effekt bei *OsIQD14* beobachtet werden. *OsIQD14* ist in der Samenhülle exprimiert und bindet an MT. Die Überexpression führte zu schmalen und verlängerten Körnern, während Mutanten ohne funktionellem *OsIQD14* breitere, kürzere und schwerere Körner aufwiesen (Yang *et al.*, 2018). Phylogenetisch steht *OsIQD14* der Gruppe Ic in *A. thaliana* (IQD15, IQD16, IQD17, IQD18) am nächsten (Abel *et al.*, 2005). Die Überexpression des Reis *IQD* führt auch in *A. thaliana* zu verlängerten und schmalen Kotyledonen ähnlich wie Überexpression von *IQD16*. Auch bei Wassermelonen wurde ein *IQD* als Regulator der Fruchtform identifiziert (Dou *et al.*, 2018). All diese Beispiele für eine Funktion von *IQD* bei der Pflanzenentwicklung machen sie insbesondere für die zielgerichtete Züchtung und potenzielle Steigerung des Ernteertrags bei wichtigen, landwirtschaftlich genutzten Arten interessant. IQD können aber auch eine Rolle in der Pflanzenentwicklung spielen, wenn sie nicht mit MT assoziiert sind. IQD24 und IQD25 sind in der Plasmamembran lokalisiert und dort an bestimmten Bereichen stationär gebunden. Bei GFP-gekoppelten Proteinen wurde keine Bewegung der Membrandomänen beobachtet. Eine veränderte Zellmorphologie in *IQD25*-Überexpressionslinien zeigt eine Funktion in der Entwicklung der Zellform (Bürstenbinder *et al.*, 2017). Welche Rolle dabei die Plasmamembranlokalisation spielt, ist allerdings nicht umfassend untersucht.

Andere Merkmale von IQD könnten weitere Hinweise auf Funktionen der Proteine geben. IQD-Proteine zeichnen sich außerhalb der IQ67-Domäne durch eine hohe intrinsische Unordnung aus. Das bedeutet in Vorhersagen konnte für diese Bereiche keine bestimmte Proteinstruktur

festgestellt werden. Weiterhin befinden sich dort mehrere Motive mit unbekannter Funktion, welche innerhalb der IQD-Familie häufig auftauchen. Diese Eigenschaften sind typischerweise in Gerüstproteinen zu finden (Good *et al.*, 2011). Gerüstproteine können durch die gleichzeitige Bindung verschiedener Interaktionspartner die physikalische Gruppierung von mehreren Komponenten eines Signalweges koordinieren. So werden mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) durch Ste5 in Hefe oder *Kinase Repressor of Ras* (KSR) in Säugetieren räumlich zusammengebracht (Choi *et al.*, 1994; Therrien *et al.*, 1996). Sie sind notwendig für eine effiziente Signalkette (Flatauer *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2009) und können die subzelluläre Lokalisation der MAPK-Kaskade beispielsweise durch Membranverankerung kontrollieren (Winters *et al.*, 2005). Die Interaktion mit Gerüstproteinen ist in einigen Fällen sogar notwendig, um ein Enzym zu aktivieren. So wird die MAPKKK Raf erst durch die Bindung an KSR aktiviert und kann anschließend die MAPKK MEK phosphorylieren (Rajakulendran *et al.*, 2009). Möglicherweise dienen die Motive in den strukturlosen Bereichen der IQD-Proteine als Interaktionsdomänen für bisher unbekannte Interaktionspartner. Daher wäre auch für IQD eine Rolle als Gerüstproteine denkbar (Abel *et al.*, 2013). Indem sie mehrere unterschiedliche Proteine gleichzeitig binden und so räumlich zusammenbringen, könnten sie biochemische Prozesse in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Signalen steuern. Eine solche Funktion konnte für IQD bisher allerdings noch nicht gezeigt werden.

Neben den bereits genannten MT im Zytosol und der Plasmamembran sind viele Vertreter beispielsweise im Zellkern lokalisiert, einige im Nukleus (z.B. IQD10 und IQD28), im Nukleolus (z.B. IQD3 und IQD4) oder in Kernkörperchen (z.B. IQD6 und IQD9). Sowohl für IQD1 als auch für weitere Proteine wurden Kernlokalisierungssignale vorhergesagt (Abel *et al.*, 2005; Bürstenbinder *et al.*, 2017). Das legt die Vermutung nahe, dass diese IQD aktiv in den Kern transportiert werden, um dort eine bisher unbekannte Funktion zu erfüllen. Auch die Bedeutung von IQD in der Zellkernhülle (IQD8 und IQD27) ist noch nicht bekannt.

Neuere Studien konnten zeigen, dass die Expression einiger IQD durch Auxin reguliert wird. Das Phytohormon reguliert eine Vielzahl von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen in Pflanzen (Vanneste & Friml, 2013; Lavy & Estelle, 2016). So wiesen *IQD15*, *IQD16* und *IQD26* in *knock out*-Mutanten des Auxin-abhängigen Transkriptionsfaktors *Auxin Response Factor 5/Monopteros* (*ARF5/MP*) eine verringerte Transkriptmenge auf (Möller *et al.*, 2017). Eine andere Studie identifizierte insgesamt 13 IQD, deren Expression nach Auxin-Behandlung dereguliert war (Wendrich *et al.*, 2018). Zusätzlich konnte dort gezeigt werden, dass Ca^{2+} die Interaktion zwischen IQD-Proteinen und *SPIRAL2* (*SPR2*) beeinflusst. Interessanterweise zeigen Mutanten des MT-assoziierten Proteins *SPR2* vergleichbare Phänotypen wie *IQD16*-Überexpressionslinien. Möglicherweise spricht das für eine Rolle von IQD bei der Verbindung von Auxin- und Ca^{2+} -Signalen in Pflanzen.

Mit 33 Mitgliedern bilden IQD die größte bekannte CaM-bindende Proteinfamilie in *A. thaliana*. Es ist daher überraschend, dass bisher so wenig über ihre Funktion in der Pflanze bekannt ist. In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien veröffentlicht, welche die Bedeutung von IQD in unterschiedlichen Pflanzenarten verdeutlichen. Welche Rolle die CaM-Interaktion für die IQD-Funktion spielt, blieb dabei allerdings noch immer weitestgehend verborgen.

1.2 Calmodulin und die Ca^{2+} -Signalkette in *Arabidopsis thaliana*

Die für die Proteinfamilie namensgebende IQ67-Domäne enthält mehrere CaMBD und ist bei Bryophyten bis hin zu Gräsern wie Reis zu finden. Daher ist zu vermuten, dass die CaM-Interaktion für die Funktion von IQD grundlegend ist. CaM- und CaM-like (CML)-Proteine spielen als Sensoren im Ca^{2+} -Signalweg eine wichtige Rolle (Kudla *et al.*, 2010). Als sekundärer Botenstoff koordiniert Ca^{2+} in allen Eukaryoten eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen. In Pflanzen wird beispielsweise das Pollenschlauchwachstum durch

einen Ca^{2+} -Gradienten gesteuert (Picton & Steer 1985; Yang *et al.*, 2014). In Wurzeln wird durch mechanische Stimuli wie Berührung eine Ca^{2+} -vermittelte Antwort ausgelöst, die das Wachstum beeinflusst (Monhausen *et al.*, 2009). Bei der Verarbeitung und Weiterleitung äußerer Reize spielt der Ca^{2+} -Signalweg eine grundlegende Rolle. Viele hormonelle, biotische oder abiotische Reize führen zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in einer Zelle (Anil & Rao, 2001). Im Ruhezustand wird in der Zelle über ATP-abhängige P-ATPasen und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter ein intrazellulärer Ca^{2+} -Gradient aufrechterhalten (Sanders *et al.*, 2002), daher unterscheidet sich die Ca^{2+} -Konzentration zwischen verschiedenen Zellkompartimenten stark (Stael *et al.*, 2011). Im Zytosol wird die Konzentration mit etwa 100 nM sehr gering gehalten. In der Vakuole und dem endoplasmatischen Retikulum liegen sie bei etwa 80 mM bzw. 2 mM und auch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde im millimolaren Bereich gemessen. Die Plasmamembranen der Zelle und der Kompartimente besitzen Ca^{2+} -permeable Kanäle, die auf unterschiedliche Weise reguliert werden. So gibt es spannungsabhängige Kanäle, die durch De- oder Hyperpolarisation aktiviert werden oder ligandenabhängigen Kanälen (Kudla *et al.*, 2010). Nach der Aktivierung dieser Kanäle können Ca^{2+} -Ionen aus der Vakuole, dem ER oder dem Apoplasten in das Zytosol strömen und dort die Ionenkonzentration erhöhen. Durch ATP-abhängige P-ATPasen und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter werden die Ionen anschließend wieder aus dem Zytosol befördert. Abhängig vom Signal und der Aktivität der Kanäle und Transporter kann die Dauer und Höhe der Konzentrationsänderung unterschiedlich ausfallen und je nach Signalstärke in verschiedener Frequenz auftreten (White *et al.*, 2002; Demidchik & Maathuis, 2007). Die so entstehenden Ca^{2+} -Signaturen können in der Zelle spezifische zelluläre Antworten hervorrufen. In Schließzellen von Stomata konnte gezeigt werden, dass spezifische Muster der Ca^{2+} -Konzentrationsänderung die Schließbewegung regulieren (Allen *et al.*, 2001). Ca^{2+} -Signale können von Zelle zu Zelle weitergegeben werden und zelluläre Stressantworten oder Entwicklungsprozesse in der Pflanze koordinieren.

Die Dekodierung und Verarbeitung der verschiedenen Signale wird von Ca^{2+} -bindenden Proteinen übernommen. Ca^{2+} -Sensoren in Pflanzen werden in vier Klassen eingeteilt: CaM (Klasse A), CaM-like und andere Ca^{2+} -bindende Proteine mit EF-Hand-Motiv (Klasse B), Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (Klasse C) und Ca^{2+} -bindende Proteine ohne EF-Hand-Motiv (Klasse D) (Day *et al.*, 2002). Die in Klasse A, B und C vorkommenden EF-Hand-Motive umfassen 29 AS und weisen eine Helix-Loop-Helix Struktur auf. Der von E- und F- α -Helix flankierte Loop enthält ein unterschiedlich stark konserviertes AS-Muster, welches die Ca^{2+} -Bindung vermittelt (Lewit-Bentley & Rety, 2000; La Verde *et al.*, 2018). In *A. thaliana* wurden etwa 250 Proteine identifiziert, welche über sogenannte EF-Hand-Motive Ca^{2+} -Ionen binden können (Day *et al.*, 2002). Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPK) können durch ihre Kinasedomäne in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Signalen bestimmte Zielproteine phosphorylieren und so deren Funktion steuern (Kudla *et al.*, 2010). Dagegen besitzen CaM- und CML-Proteine neben EF-Hand-Motiven keine weiteren Domänen. CaM weisen zwei globuläre Bereiche mit je zwei EF-Hand-Motiven auf, welche durch einen flexibleren Bereich verbunden sind. Die vier stark konservierten CaM-Isoformen in *A. thaliana* werden von insgesamt sieben Loci kodiert (CaM1/4, CaM2/3/5, CaM6, CaM7). Die Isoformen unterscheiden sich nur in wenigen AS, was allerdings zu unterschiedlichen Affinitäten gegenüber Zielproteinen führen kann. Die 50 CML sind dagegen weniger stark konserviert und enthalten ein bis sechs EF-Hand-Motive (McCormack *et al.*, 2005; La Verde *et al.*, 2018). Die Bindung von Ca^{2+} durch Chelatierung an den Sensorproteinen führt zur Veränderung deren Struktur und der biochemischen Eigenschaften (Bhattacharya *et al.*, 2004). So wird zwischen Apo- und Ca^{2+} -CaM unterschieden. Damit ist jeweils die Konformation ohne bzw. mit gebundenen Ca^{2+} -Ionen gemeint. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur interagieren CaM und CML abhängig von der Präsenz oder der Abwesenheit von Ca^{2+} mit einer Vielzahl von Proteinen und können so biochemische Prozesse in der Zelle steuern. Die Interaktion mit anderen Proteinen kann die Funktionen der Bindungspartner beeinflussen. So können beispielsweise aufgrund der

veränderten Proteinstruktur bestimmte Bindungsstellen frei werden oder die CaM-Interaktion die Bindung zu einem anderen Protein beeinträchtigen. Auf diese Art und Weise können die Ca^{2+} -Signaturen aufgrund eines externen Reizes von Ca^{2+} -Sensoren wie CaM und CML in spezifische Stressantworten in der Pflanze übersetzt werden. In der Vergangenheit wurden viele CaM und CML-bindende Proteine (CaMBP) identifiziert. Darunter befanden sich unter anderem Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren und Zytoskelett-assoziierte Proteine (Zeng *et al.*, 2015). Die Vielzahl der möglichen Interaktionspartner und die große funktionelle Bandbreite zeigt die Komplexität dieser Regulationsprozesse.

Die CaM-Bindung kann über verschiedene Motive vermittelt werden. CaMBD weisen die Struktur einer amphiphilen α -Helix auf (O'Nei & DeGrado, 1990; Crivici & Ikura, 1995). Das bedeutet, dass die Helix sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche aufweist. Diese Trennung kommt durch die konservierten Abstände von hydrophoben AS in den klassischen CaM-Bindemotiven zustande und kann in einer helikalen Radprojektion sichtbar gemacht werden (Abb. 38) (O'Nei & DeGrado, 1990; Park *et al.*, 2005; DeFalco *et al.*, 2016). Die CaM-Bindemotive 1-8-14 und 1-5-10 sind nach dem typischen Abstand zwischen den hydrophoben AS benannt (Rhoads & Friedberg, 1997). Sie binden vor allem Ca^{2+} -CaM, während IQ-Motive die Bindung mit Apo-CaM vermitteln (Rhoads & Friedberg, 1997; Bähler & Rhoads, 2002). Nicht alle CaMBD zeigen klassische 1-8-14, 1-5-10 oder IQ-Motive, jedoch binden die stark konservierten CaM an die sehr variablen Bindemotive mit hoher Affinität (O'Nei & DeGrado, 1990).

Aufgrund der CaMBD in der IQ67-Domäne liegt die Vermutung nahe, dass IQD direkte Interaktoren für CaM sind und so eine Rolle bei der Ca^{2+} -Signalkette in der Pflanze spielen könnten. In der Tat konnte in Hefe die Interaktion von IQD1 mit verschiedenen CaM-Isoformen nachgewiesen und für mehrere IQD bei Koexpressionsanalysen eine Kolo-kalisation mit CaM2 beobachtet werden, was auf eine Interaktion *in vivo* hinweisen könnte. (Bürstenbinder *et al.*, 2013; Bürstenbinder *et al.*, 2017). In einer Studie zu *OsIQD14* konnte die phänotypische Veränderung der Körnerform, die durch erhöhte Expression des IQDs hervorgerufen wurde, durch die Überexpression von *OsCaM1* vollständig aufgehoben werden (Yang *et al.*, 2018). Das zeigt eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen IQD und CaM.

In einem Hefe-2-Hybridsystem wurde die Interaktion von IQD1 und IQD20 mit den meisten CaM-Isoformen und viele CML getestet (Bürstenbinder *et al.*, 2013). Dabei wurden Interaktionen von IQD1 mit allen getesteten CaM beobachtet jedoch mit keinem der CML. Für IQD20, das fast nur die IQ-Domäne enthält, zeigte sich ein anderes Bild. Hier wurde in Hefe die Interaktion mit CaM2 und CML13 nachgewiesen. Das unterstützt die Annahme, dass IQD-Proteine spezifische CaM/CML-Bindungen eingehen können. Die Interaktion mit CaM2 wurde ebenfalls in *N. benthamiana* mit Hilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) unter anderem für IQD1 und IQD20 bestätigt. Außerdem konnten mit dieser Methode auch die zellulären Kompartimente visualisiert werden, in denen die Interaktion stattfindet. Für IQD1 war ein Signal an MT, im Zellkern und im Nukleolus sichtbar, was der vorher beobachteten Lokalisation von IQD1 entspricht. IQD20 war zusammen mit CaM2 an der Plasmamembran in Subdomänen zu sehen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass unterschiedliche Bindungsaffinitäten und Lokalisationen die Wirkung von IQD mit CaM in der Ca^{2+} -Signalkette orchestrieren können.

1.3 KLCR-Proteine

Die IQD-Familie zeichnet sich durch mehrfach auftretende Motive unbekannter Funktion aus. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass IQD-Proteine neben CaM auch mit weiteren Proteinen interagieren könnten. In einem Hefe-2-Hybrid-Screen mit cDNA aus *A. thaliana* Blüten, bei dem nach neuen IQD1-Interaktoren gesucht wurde, konnte *Kinesin Light Chain related 1* (KLCR1) als Bindungspartner identifiziert werden (Bürstenbinder *et al.*, 2013). Über einen Sequenzvergleich wurden zwei nahe Verwandte ermittelt, KLCR2 und KLCR3.

Arabidopsis KLCR zeigen Ähnlichkeiten zu den Kinesinuntereinheiten *Kinesin Light Chain* (KLC) in Säugetieren. Kinesine sind Motorproteine, die Prozesse wie den intrazellulären Transport von Vesikeln oder Organellen entlang von MT oder Chromosomsegregation ermöglichen (Reddy, 2001; Barton & Goldstein, 1996). Motorproteine der Kinesin-1-Gruppe sind Tetramere aus einem Homodimer zweier *Kinesin-1 Heavy Chain* (KHC) und zweier KLC-Proteine (Marx *et al.*, 2009). KHC besitzen die Motoraktivität, während die KLC die Kinesinaktivität regulieren und die Ladung binden. KLCR weisen im N-terminalen Bereich putative Heptad-Wiederholungen auf (Bürstenbinder *et al.*, 2013). In KLC dienen diese zur Bindung der KHC über deren *Coiled-Coil*-Motiv. Am C-Terminus besitzen KLCR mehrere Tetra-Tricopeptid-Wiederholungen (TPR). Diese TPR-Domänen können Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und sind in Kinesinen wichtig für die Bindung der Ladung. Durch Sequenzvergleiche der Motordomäne wurden 61 Kinesine in *A. thaliana* identifiziert (Reddy & Day, 2001). Bisher wurde jedoch keine funktionelle KHC in Pflanzen beschrieben. Daher ist unklar, ob KLCR analoge Funktionen zu KLC in Säugetieren haben.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass KLCR1 von IQD1 vom Zytosol an die MT rekrutiert werden kann (Bürstenbinder *et al.*, 2013). Weiterhin wurde eine Funktion der auch als *Cellulose-Microtubule Uncoupling*-Proteine (CMU) bezeichneten KLCR bei der Regulierung des Zellwachstums beschrieben (Liu *et al.*, 2016). Durch die Stabilisierung der kortikalen MT an der Plasmamembran ermöglichen KLCR die korrekte Koordination des Zellwandaufbaus durch Zellulose-Synthase-Komplexe (CSC). CSC bilden Zellulosefibrillen und bewegen sich dabei entlang von MT (Lei *et al.*, 2013). Der *knock out* von *KLCR1* und *KLCR2* führte in *A. thaliana* zu veränderter Organisation des Zytoskeletts und veränderter Zellform im Hypokotyl.

Für KLCR2 gibt es darüber hinaus Hinweise auf eine Rolle in der Pflanzenabwehr (Mukthar *et al.*, 2011). In der Studie wurde KLCR2 als Ziel von Effektoren zweier unterschiedlicher Pathogene (*Pseudomonas syringae* und *Hyaloperonospora arabidopsidis*) identifiziert. Für eine Infektion müssen Pathogene gezielt Proteine hemmen, welche in der Pflanzenabwehr eine Rolle spielen. Da beide untersuchten Organismen im Laufe der Evolution Effektoren gegen KLCR2 hervorgebracht haben, kann vermutet werden, dass KLCR2 einer Infektion entgegenwirkt. Der Mechanismus dabei ist aber unbekannt. Ein in der Studie erstelltes Interaktionsnetzwerk führt unter anderen auch WRKY21 als KLCR2-Interaktor auf. Der Transkriptionsfaktor als Bindungspartner könnte auf eine weitere Funktion von KLCR2 im Kern hinweisen. Diese könnte möglicherweise zusätzlich durch IQD1 beeinflusst werden.

1.4 WRKY-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren umfasst in *A. thaliana* 74 Mitglieder (Pandey & Somssich, 2009). Sie binden mit ihrer WRKY-Domäne (WRKYGQK) an W-Boxen (T)TGAC(C/T) in den Promotoren von Zielgenen und kontrollieren so deren Expression (Ciolkowski *et al.*, 2008). Für einige Vertreter wurde eine Rolle in der Pflanzenabwehr beschrieben (Eulgem & Somssich, 2007). Sie können dabei als positive oder negative Regulatoren wirken. So sind *wrky33*-Mutanten susceptibler bei einer Infektion mit *Botrytis cinerea* (Zheng *et al.*, 2007), während *knock out* von *WRKY11* und *WRKY17* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* führt (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Der

potenzielle KLCR2-Interaktor WRKY21 gehört zu der Gruppe IId innerhalb der WRKY-Familie (Park *et al.*, 2005). Alle Vertreter dieser Gruppe zeichnen sich durch eine CaM-Bindedomäne (CaMBD) aus und könnten in Abhängigkeit der Ca²⁺-Signalkette die Pflanzenabwehr steuern. In der Tat wurden auch für WRKY21 bereits Hinweise auf eine Rolle in der Pflanzenabwehr gefunden. In einem *Yeast-1-Hybrid-Screen* wurden WRKY-Transkriptionsfaktoren als potenzielle Regulatoren von GSL-Biosynthesegenen getestet (Li *et al.*, 2014). Dabei konnte die Bindung von WRKY21 an die Promotoren von *CYP83B1*, *Isopropylmalate Isomerase 1 (IPMI1)* und *UDP-Glycosyltransferase superfamily protein (UGT)* nachgewiesen werden. Die Beteiligung an der GSL-Biosynthese und eine mögliche Kontrolle über CaM macht WRKY21 besonders interessant im Zusammenhang mit der funktionellen Charakterisierung von IQD1 in der Pflanzenabwehr. Die Kontrolle der Expression von GSL-Biosynthesegenen über KLCR2 und WRKY21 in Abhängigkeit von Ca²⁺-Signalen wäre eine mögliche Funktion von IQD1 im Zellkern. Zusammengefasst sind CaM-Proteine, KLCR2 und WRKY21 vielversprechende Kandidaten für Interaktoren, welche für die IQD1-Funktion in der Zelle von Bedeutung sind.

1.5 Zielstellung

Ausgehend von den vorherigen Studien (Levy *et al.*, 2005; Abel *et al.*, 2005) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von IQD1 in der GSL-Biosynthese und der Pflanzenabwehr weitgehender untersucht. Die Etablierung verschiedener *IQD1*-Missexpressionslinien und die Messung von aliphatischen und indolischen GSL ermöglichte die Analyse von *IQD1*-abhängigen chemo- und phänotypischen Veränderungen. Darüber hinaus wurde die Funktion von *IQD1* in der Verwundungsantwort getestet.

Für eine funktionelle Charakterisierung wurden auch potenzielle IQD1-Interaktoren in die Analyse mit einbezogen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass KLCR1 von IQD1 im Zytosol an die MT rekrutiert werden kann. Für den nahen Verwandten KLCR2 wurde eine Funktion in der Pflanzenabwehr postuliert (Mukthar *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde der Transkriptionsfaktor WRKY21, der die Expression von GSL-Biosynthesegenen kontrolliert, als KLCR2-Interaktor identifiziert (Li *et al.*, 2014). Um eine mögliche Funktion von IQD1 im Zellkern zu analysieren, wurde in zytologischen Experimenten untersucht, wie sich IQD1, KLCR2 und WRKY21 gegenseitig bei ihrer Kernlokalisierung beeinflussen. Das Ziel war es, einen Mechanismus für die Funktionsweise von IQD1 und dessen Interaktionspartnern im Zellkern zu ergründen. In dieser Studie wurde zum ersten Mal der Fokus auf die Rolle eines Vertreters der IQD-Familie im Zellkern gelegt. Damit wird das Verständnis über die Funktion dieser größten CaM-bindenden Proteinfamilie in *A. thaliana* um einen wichtigen Aspekt erweitert.

2 Ergebnisse

2.1 Generierung von *IQD1*-Überexpressionslinien

Um die Funktion von *IQD1* für die Regulation der GSL-Biosynthese und der pflanzlichen Abwehr zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Generierung von unabhängigen Überexpressionslinien begonnen. Da die ursprünglichen in Levy *et al.* (2005) verwendeten *IQD1*-Überexpressionslinien aufgrund von Gen-*Silencing* für die Analysen nicht mehr zur Verfügung standen, wurden neue Rekapitulationslinien etabliert, bei denen die kodierende Sequenz unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) exprimiert wurde (*p35S:IQD1*).

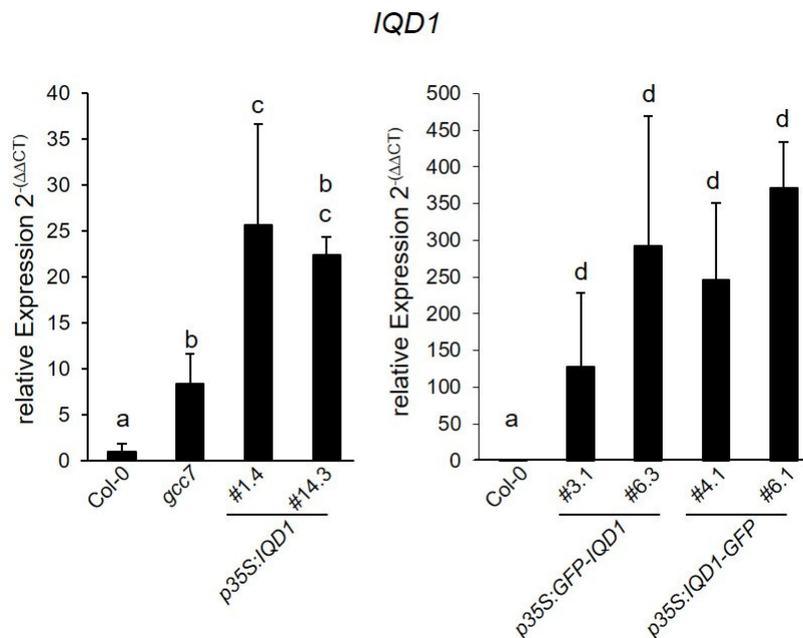


Abb. 20: Transkriptanalyse von *IQD1* in Wildtyp und Mutantenlinien

qRT-PCR-Analyse der *IQD1*-Transkriptmengen in Sprossgewebe von Wildtyp (Col-0), *activation tagged* Linie *gcc7*, *IQD1*-Überexpressionslinien (*p35S:IQD1* Linie #1.4, #14.3) und *IQD1*-Überexpressionslinien mit N- bzw. C-terminaler GFP-Fusion (*p35S:GFP-IQD1* Linie #3.1, #6.3 bzw. *p35S:IQD1-GFP* Linie #4.1, #6.1). Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmenge ($2^{-(\Delta\Delta CT)}$) relativ zu Col-0. Es wurden jeweils drei biologische Replikate mit jeweils 10 - 15 Individuen gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien, berechnet auf Grundlage der ΔC_T -Werte durch einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

Zusätzlich wurden Überexpressionslinien von N- bzw. C-terminal GFP-fusioniertem *IQD1* generiert (*p35S:GFP-IQD1* und *p35S:IQD1-GFP*), um die subzelluläre Lokalisation und einen möglichen Einfluss des GFP-Tags zu untersuchen. Mit der Insertion des *IQD1*-Überexpressionskonstrukts wird das *bar*-Gen ebenfalls in das Pflanzengenom eingebaut. Dieses vermittelt eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Basta. Durch die Bastaselektion in der T1-Generation wurden zunächst jeweils 26, 11 und 21 unabhängige Linien für *p35S:IQD1*, *p35S:GFP-IQD1* und *p35S:IQD1-GFP* identifiziert. Um Linien mit hoher Expressionsstärke zu identifizieren, wurden *p35S:GFP-IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien zusätzlich auf GFP-Fluoreszenzintensität selektiert. In der T2-Generation wurden mittels Segregationsanalysen über Bastaresistenz Linien mit einer einzelnen Insertion identifiziert.

Ausgehend davon wurden in der T3-Generation 12, 4 bzw. 3 unabhängige homozygote Linien von *p35S:IQD1*, *p35S:GFP-IQD1* und *p35S:IQD1-GFP* generiert. Die transgenen Überexpressionslinien *p35S:IQD1* wurden anschließend über qRT-PCR hinsichtlich der *IQD1*-Transkriptmenge im Vergleich zum WT und *gcc7* untersucht (Abb. A 3). Alle analysierten *p35S:IQD1*-Linien zeigten eine erhöhte *IQD1*-Expression im Vergleich zum WT. Die Linie #7.3 wies mit einer sechsfachen Erhöhung der *IQD1*-Transkriptmenge im Vergleich zum WT den geringsten Wert auf und lag damit noch unter der Expressionsstärke in *gcc7*-Mutanten (etwa achtfach höher als im WT). Die Akkumulation der *IQD1*-Transkriptmenge der Linien #4.3, #5.5 und #8.1 betrug das 11- bis 17-fache des WT. Die stärkste Erhöhung der Expressionsrate war in den Linien #1.4 und #14.3 mit 25- und 22-facher Erhöhung im Vergleich zum WT bzw. etwa dreifacher Erhöhung im Vergleich zu *gcc7* zu beobachten. Zusätzlich wurden je zwei unabhängige transgene *p35S:GFP-IQD1*- (#3.1 und #6.3) und *p35S:IQD1-GFP*- (#4.1 und #6.1) Linien analysiert, um einen möglichen Einfluss des GFP-Tags auf die *IQD1*-Funktion und die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen. Die *p35S:GFP-IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien wiesen die 15- bis 44-fache bzw. die 5- bis 16-fache *IQD1*-Transkriptmenge im Vergleich zu *gcc7* oder den *p35S:IQD1*-Linien auf (Abb. 20). Das spricht dafür, dass durch die Vorselektion auf GFP-Fluoreszenz vor allem stark überexprimierende Linien selektiert wurden. Um eine mögliche dosisabhängige Wirkung von *IQD1* zu untersuchen, wurden für die weiteren Analysen die beiden unabhängigen *p35S:IQD1*-Linien #1.4 und #14.3, sowie die analysierten *p35S:GFP-IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien ausgewählt, da diese Linien unterschiedlich erhöhte *IQD1*-Transkriptmengen im Vergleich zu Col-0 und *gcc7* aufweisen. Da für *IQD1* keine T-DNA-Insertionslinie verfügbar ist, sollte eine *knock out*-Linie über CRISPR/Cas generiert werden. Da dies im Rahmen der Arbeit allerdings nicht gelang, stand für die Analysen neben den Überexpressionslinien im Col-0 Hintergrund nur die *IQD1-knock out*-Linie ABB8 (*iqd1-2*) im Ws-0 Ökotyp zur Verfügung (Abb. 22).

2.2 Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von IQD1

Um die subzelluläre Lokalisation von *IQD1* und einen möglichen Einfluss des GFP-Tags in *A. thaliana* zu untersuchen, wurden die Linien *p35S:GFP-IQD1* #3.1 und *p35S:IQD1-GFP* #6.1 unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden die Epidermis der Kotyledonenunterseite und des Hypokotyls von sieben Tage alten Keimlingen analysiert. Beide Linien zeigten eine ähnliche *IQD1*-Lokalisation in den Geweben (Abb. 21). Das stärkste Signal war im Zellkern zu beobachten. Innerhalb des Zellkerns zeigte sich außerdem eine intensivere Fluoreszenz im Bereich des Nukleolus. Zusätzlich war das GFP-Signal entlang filamentöser Strukturen in der Zelle und am Zellkortex erkennbar. Diese Lokalisation ist reminiscent für MT bzw. die Plasmamembran und spricht für eine Assoziation von *IQD1* mit dem Zytoskelett und der Membran. Obwohl sich die generelle subzelluläre Lokalisation zwischen N- und C-terminal fusionierten *IQD1* nicht unterschied, zeigte die *p35S:GFP-IQD1*-Linie eine tendenziell stärkere MT-Lokalisation, während das *IQD1-GFP*-Konstrukt etwas stärker am Zellkortex angegliedert war. Aufgrund der Signalstärke kann angenommen werden, dass *IQD1* neben der Plasmamembran-MT-Verbindungsstelle vor allem im Zellkern und dem Nukleolus lokalisiert ist. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Arbeiten. Dabei wurde für *IQD1-GFP* eine Zellkernlokalisation in Wurzeln beobachtet (Levy *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde mittels Oryzalin-Behandlung die MT-Assoziation von *GFP-IQD1* in *N. benthamiana* und in *A. thaliana* nachgewiesen (Bürstenbinder *et al.*, 2013).

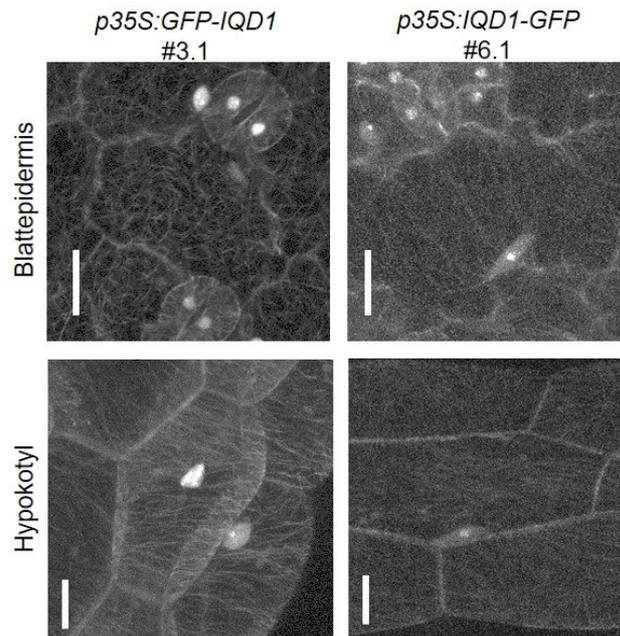


Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von IQD1 mit N- bzw. C-terminaler GFP-Fusion in *A. thaliana*

Lokalisation von GFP-IQD1 bzw. IQD1-GFP in der Epidermis von Kotyledonen und dem Hypokotyl von sieben Tage alten Keimlingen der *p35S:GFP-IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien. Die Pflanzen wurden vertikal auf ATS-Medium angezogen. Maßstab = 20 μ m

2.3 Vergleichende Analysen von *IQD1*- und *RH57*-Missexpressionslinien

Die als *IQD1*-Überexpressionslinie identifizierte *gcc7*-Mutante besitzt eine *activation tagged* T-DNA-Insertion, welche vier 35S-Promotorsequenzen enthält (Weigel *et al.*, 2000). Die Insertion ist im vierten Exon des benachbarten Gens lokalisiert, welches für die RNA-Helikase *RH57* kodiert (Levy *et al.*, 2005). Um mögliche Effekte der *IQD1*-Überexpression und des potenziellen *knock outs* von *RH57* getrennt zu untersuchen, wurden neben den unabhängigen *IQD1*-Überexpressionslinien zusätzlich zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien mit einer Insertion im *RH57*-Genlokus in die Analysen eingeschlossen (Abb. 22). Die Linie *rh57-1* wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten als Kontrolllinie verwendet und enthält eine Insertion abwärts der *gcc7*-Insertion zwischen dem 8. und 9. Exon (Levy *et al.*, 2005). Ausserdem wurde mit *rh57-4* eine weitere Linie etabliert, bei der sich die Insertion aufwärts von *gcc7* im zweiten Exon befindet.

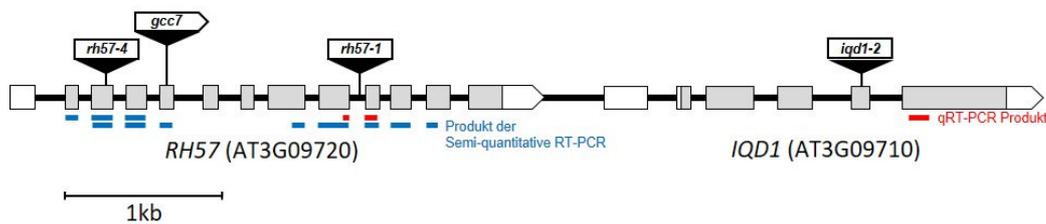


Abb. 22: Genmodell von *IQD1* und *RH57* und Position der verwendeten T-DNA-Insertionslinien

Positionen der T-DNA-Insertionen für die in der Arbeit verwendeten Mutantenlinien *gcc7*, *rh57-1* (Salk_008887), *rh57-4* (Salk_143440) und *iqd1-2* (ABB8). Dargestellt sind Exons (graue Boxen), Introns (schwarze Balken) und nichttranslatierte Regionen (weiße Boxen). Die roten und blauen Balken unter dem Modell markieren die amplifizierten Bereiche der cDNA für die qRT-PCR- bzw. semi-quantitative RT-PCR-Analyse.

Anschließend wurden über qRT-PCR-Analysen die *RH57*-Transkriptmengen in den *rh57*-T-DNA-Insertionslinien und *gcc7* im Vergleich zu Col-0 untersucht (Abb. 23). Die Linien *rh57-1* und *rh57-2* wiesen im Vergleich zum WT deutlich geringere Transkriptmengen auf und konnten daher als *knock out*-Linien validiert werden. Im Gegensatz dazu wurde für *gcc7* eine 30-fach erhöhte Akkumulation des *RH57*-Amplikon beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass der Bereich abwärts der *gcc7*-Insertion verstärkt exprimiert wurde. In diesem Bereich wurde auch das PCR-Produkt für die Transkriptanalyse amplifiziert (Abb. 22).

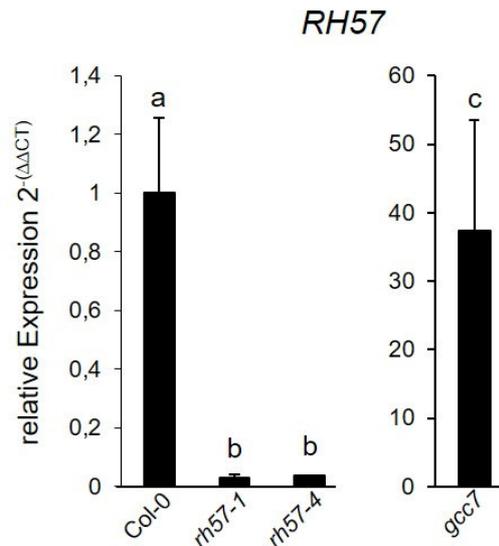


Abb. 23: Transkriptanalyse von *RH57* in Wildtyp und Mutantenlinien

qRT-PCR-Analyse der *RH57*-Transkripten in Sprossgewebe von Wildtyp (Col-0), der *activation tagged* Linie *gcc7* und Kontrolllinien (*rh57-1*, *rh57-4*). Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmenge ($2^{-(\Delta\Delta CT)}$) relativ zu Col-0. Es wurden jeweils drei biologische Replikate mit jeweils 10 - 15 Individuen gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien, berechnet auf Grundlage der ΔC_T -Werte durch einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

Um zu untersuchen, ob die T-DNA-Insertion in der *gcc7*-Linie zu einem Verlust an *RH57*-Volllängentranskript führt, wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Dabei wurden Abschnitte aufwärts, abwärts und um die Position der *gcc7*-Insertion im WT und *gcc7* amplifiziert (Abb. 22). Aufwärts der Insertion wurde eine tendenziell geringere *RH57*-Transkriptmenge bei *gcc7* beobachtet, während sie abwärts der Insertion vergleichbar waren (Abb. 24). An der Position der Insertion wies *gcc7* im Gegensatz zum WT kein PCR-Produkt auf. Die Abwesenheit eines Amplikons in *gcc7* deutet darauf hin, dass in der *activation tagged* Linie an dieser Stelle keine Transkription stattfindet und so nur unvollständige *RH57*-Transkripte entstehen, welche wahrscheinlich nicht zu einem funktionellen Protein führen.

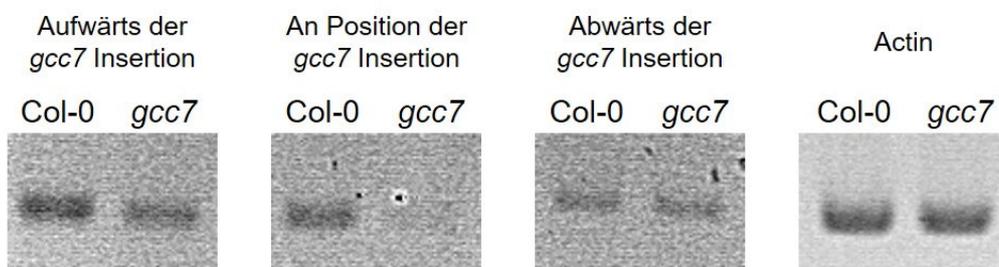


Abb. 24: Semi-quantitative RT-PCR von *RH57* in Wildtyp und Mutantenlinien

Semi-quantitative RT-PCR von *RH57* mit spezifischen Oligonukleotiden für Bereiche aufwärts, an der Position und abwärts der *activation tagged* Insertion von *gcc7*. Für die cDNA-Synthese wurden WT- (Col-0) und *gcc7*-Pflanzen sieben Tage auf ATS-Medium angezogen. Zur Amplifikation wurde eine PCR-Reaktion mit 30 Zyklen durchgeführt. Actin-Oligonukleotide wurden als Kontrolle für die Effizienz der cDNA-Synthese verwendet. Die amplifizierten Bereiche sind in Abb. 22 als blaue Linie dargestellt.

Vorhergehende Arbeiten deuteten auf ein reduziertes Wachstum von *gcc7*-Mutanten im Vergleich zum WT hin (Levy *et al.*, 2005). Um den Einfluss von *IQD1* und *RH57* auf das Wurzelwachstum zu untersuchen, wurden vergleichende Analysen von Keimlingen der *IQD1*-Überexpressions- und *rh57-knock out*-Linien zusammen mit WT und *gcc7* durchgeführt (Abb. 25). Keimlinge der *gcc7*-Linie und der *rh57-knock out*-Linien wiesen signifikant kürzere Wurzeln auf, während die Wurzellängen der *IQD1*-Überexpressionslinien vergleichbar mit Col-0 waren. Das legt nahe, dass die erhöhte *IQD1*-Expression keinen Einfluss auf die Wurzellänge hat. Vielmehr wird das verringerte Wurzelwachstum durch den *knock out* von *RH57* hervorgerufen. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung einer Studie, in der eine Glukose-vermittelte Inhibierung der Keimung und des frühen Wachstums bei *rh57*-Mutanten gezeigt wurde (Hsu *et al.*, 2014).

Eine andere Veränderung im Wurzelphänotyp zeigten die *p35S:GFP-IQD1*-Linien, welche ein schräges Wurzelwachstum aufwiesen. Bei *p35S:IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien war dagegen nur eine schwache Veränderung zu beobachten. Ähnliche Wurzelphänotypen wurden bereits für Mutanten in anderen MT-bindenden Proteinen wie *spiral1* und *lefty1/lefty2* in *A. thaliana* beschrieben (Sedbrook *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2004). Als Teil des Zytoskeletts koordinieren MT auch Wachstumsprozesse in der Pflanzenwurzel. Möglicherweise haben die GFP-Fusionen unterschiedlichen Einfluss auf das Vermögen zur MT-Interaktion von *IQD1*. Interaktionsstudien mit *IQD1*-Fragmenten legen den C-terminalen Bereich als Domäne für die MT-Bindung nahe (Pflug, 2019). So könnte die MT-Interaktion bei *p35S:IQD1-GFP*-Linien beeinträchtigt sein, während bei *p35S:GFP-IQD1*-Linien eine größere Zahl von *IQD1*-Proteinen mit MT interagiert. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung einer stärkeren MT-Assoziation in der *p35S:GFP-IQD1*-Linie #3.1 unterstützt (Abb. 21). Da die *p35S:IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien bei vergleichbarer Expressionsstärke kein schräges Wurzelwachstum aufweisen, ist der Phänotyp in den *p35S:GFP-IQD1*-Linien wahrscheinlich ein Artefakt der N-terminalen GFP-Fusion. Das lässt vermuten, dass die C-terminale Fusion weniger relevant für die Funktion von *IQD1* ist. Bei der Anzucht auf Erde wurden in dieser Arbeit keine signifikanten Wachstumsunterschiede beobachtet. Die *p35S:GFP-IQD1*- und *p35S:IQD1-GFP*-Linien zeigten verglichen mit dem WT jedoch eine Tendenz verkürzte Schoten auszubilden (Abb. A 4). Ob dieser Phänotyp durch verringertes Wachstum oder verminderte Samenproduktion hervorgerufen wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden.

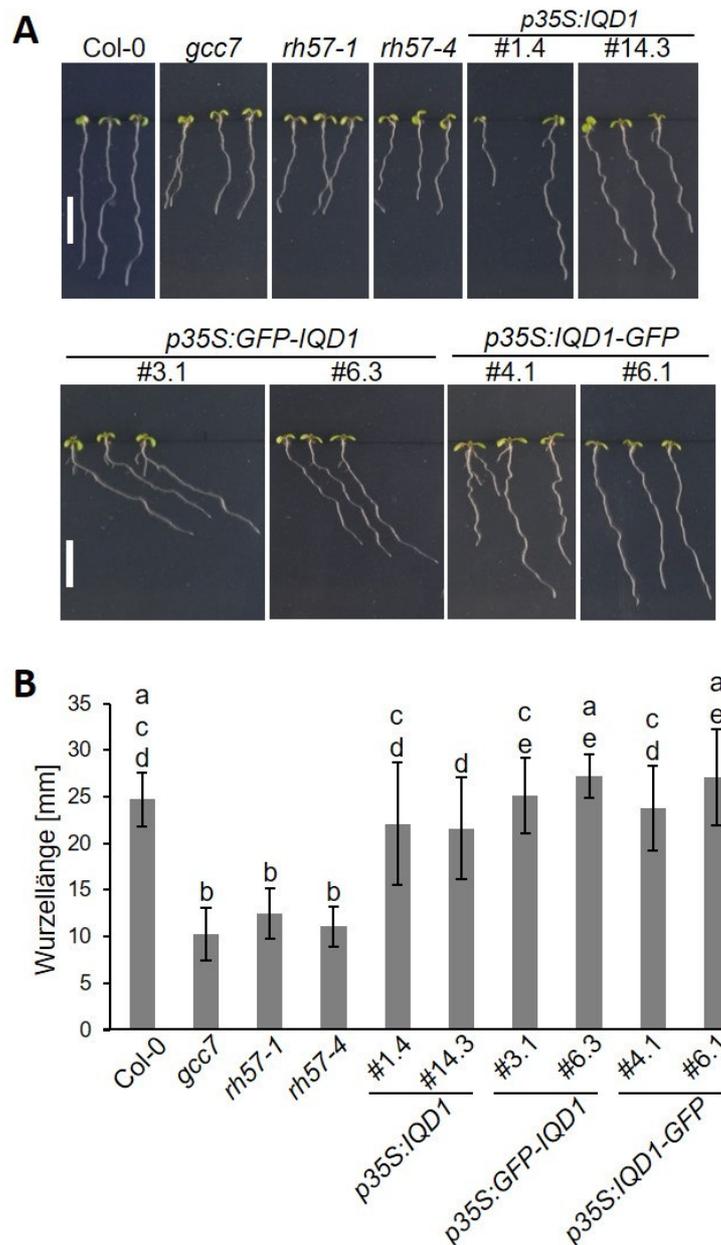


Abb. 25: Wurzelphänotypen von *IQD1*- und *RH57*-Mutantenlinien

A Wurzelwachstum von sieben Tage alten Keimlingen von Col-0, *gcc7*, *rh57-1*, *rh57-4*, *p35S:IQD1*- (#1.4, #14.3), *p35S:GFP-IQD1*- (#3.1, #6.3) und *p35S:IQD1-GFP*-Linien (#4.1, #6.1) auf ATS-Medium in vertikalen Platten. Maßstab = 1 cm **B** Wurzellänge der in A gezeigten Linien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden 30 - 40 Wurzeln pro Linie gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien, berechnet durch einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

2.4 Glukosinolatgehalt von *IQD1*- und *RH57*-Missexpressionslinien

Vorarbeiten zeigten, dass *gcc7* im Vergleich zum WT erhöhte GSL-Gehalte aufweist (Levy *et al.*, 2005). Um zu testen, ob die GSL-Gehalte abhängig von der *IQD1*-Transkriptmenge reguliert werden, wurde mithilfe von LC/MS der GSL-Gehalt im Sprossgewebe von *IQD1*-Überexpressionslinien bestimmt. Als zusätzliche Kontrolle und um den Einfluss von *RH57* zu analysieren, wurden *rh57-knock out*-Linien in die Untersuchung eingeschlossen (Abb. 26). Sowohl *gcc7* als auch *rh57-1* wiesen leicht erhöhte Gehalte an aliphatischen und indolischen GSL auf, die in *rh57-4* allerdings nicht zu beobachten waren. Die untersuchte *p35S:IQD1-GFP*-Linie zeigte dagegen für indolische GSL einen leicht erhöhten Gehalt. Allerdings war keiner der beobachteten Unterschiede statistisch signifikant und es konnte keine Tendenz für eine Funktion von *IQD1* oder *RH57* in der Akkumulation von GSL beobachtet werden.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den publizierten Messungen in Levy *et al.* (2005), in denen eine moderate, aber signifikante Erhöhung der GSL-Konzentration mit steigender *IQD1*-Expression berichtet wurde. Im Gegensatz zu dieser Arbeit basieren die Daten der Vorarbeiten auf Messungen von Desulfo-GSL, welche mittels Auftrennung in einer HPLC und Adsorption unter UV-Licht identifiziert und quantifiziert wurden. Um den GSL-Gehalt der publizierten Linien entsprechend der Vorarbeiten zu analysieren, wurden für Col-0, *gcc7*, *Ws-0* und *iqd1-2* die Gehalte von vier aliphatischen (3MSOP, 8MSOO, 4MTB, 4MSOB) und drei indolischen GSL (4MOI3M, 1MOI3M, I3M) über die gleiche Methode gemessen (Abb. 27). Die *gcc7*-Linie zeigte einen leicht erhöhten Gehalt der aliphatischen GSL im Vergleich zu Col-0. Die *knock out*-Linie *iqd1-2* wies verglichen mit dem entsprechenden WT *Ws-0* tendenziell geringere Gehalte für aliphatische und indolische GSL auf. Allerdings wurden für beide Missexpressionslinien keine signifikanten Unterschiede zu den zugehörigen WT beobachtet. Die Ökotypen unterschieden sich stark in der Zusammensetzung der GSL. Während in Col-0 4MSOB die höchste und 3MSOP die geringste Konzentration bei den aliphatischen GSL aufwies, zeigte sich in *Ws-0* eine umgekehrte Verteilung. In der Tat weist Col-0 im Vergleich zu den meisten anderen Ökotypen eine hohe Konzentration von 4MSOB in den Blättern auf (Witzel *et al.*, 2013). Bei den indolischen GSL waren 4MOI3M und 1MOI3M in *Ws-0* geringer vertreten. Dieses Ergebnis zeigt einen deutlichen Unterschied in der Regulierung der GSL-Biosynthese zwischen den beiden Ökotypen. Mit Rücksicht auf bessere Vergleichbarkeit wurden für weitere GSL-Messungen daher ausschließlich die *IQD1*-Überexpressionslinien im Col-0 Ökotyp analysiert (Abb. 26).

Beim Vergleich der beiden angewendeten Messmethoden zeigten die Messungen der Desulfo-GSL mittels UV-Detektion eine deutlich geringere GSL-Konzentration als die LC/MS-Methode. Aufgrund der höheren Sensitivität und des größeren Spektrums der messbaren GSL wurden weitere Experimente zur GSL-Messung daher ausschließlich mittels HPLC-gekoppelter LC/MS durchgeführt.

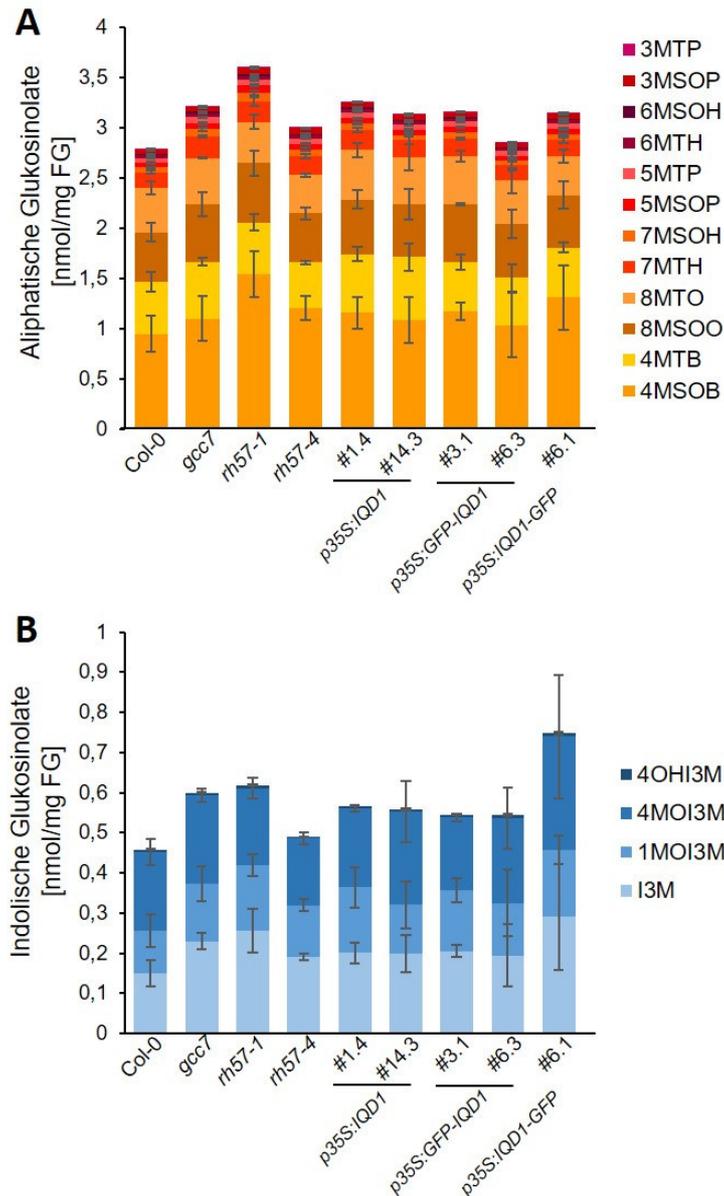


Abb. 26: Glukosinolatgehalt von *IQD1*- und *RH57*-Missexpressionslinien

Gehalt von aliphatischen (A) und indolischen (B) GSL pro Frischgewicht im Sprossgewebe. Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL (3-Methylthiopropyl (3MTP), 3-Methylsulfinylpropyl (3MSOP), 6-Methylsulfinylhexyl (6MSOH), 6-Methylthiohexyl (6MTH), 5-Methylthiopentyl (5MTP), 5-Methylsulfinylpentyl (5MSOP), 7-Methylsulfinylheptyl (7MSOH), 7-Methylthioheptyl (7MTH), 8-Methylthiooctyl (8MTO), 8-Methylsulfinyloctyl (8MSOO), 4-Methylthiobutyl (4MTB), 4-Methylsulfinylbutyl (4MSOB), 4-Hydroxyindol-3-ylmethyl (4OHI3M), 4-Methoxyindole-3-ylmethyl (4MOI3M), 1-Methoxyindole-3-ylmethyl (1MOI3M), Indole-3-ylmethyl (I3M)). Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe addiert. Es wurden drei biologische Replikate mit je 10-15 Individuen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$) berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

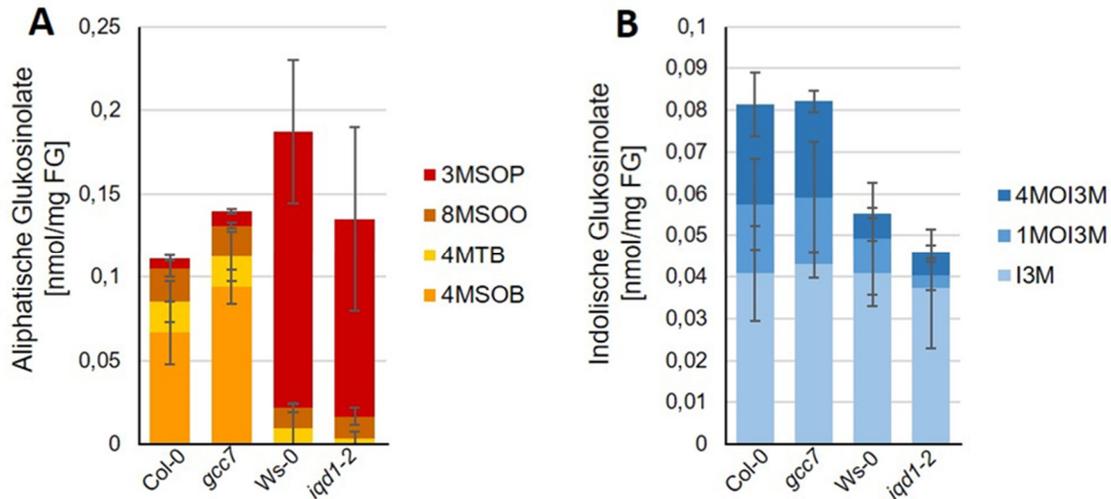


Abb. 27: Glukosinolatgehalt von *IQD1*-Missexpressionslinien

Gehalt von aliphatischen (A) und indolischen (B) GSL pro Frischgewicht im Sprossgewebe von Col-0, *gcc7*, *Ws-0* und *iqd1-2*. Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL (3-methylsulfinylpropyl - 3MSOP, 8-methylsulfinyloctyl - 8MSOO, 4-methylthiobutyl - 4MTB, 4-methylsulfinylbutyl - 4MSOB, 4-methoxyindole-3-ylmethyl - 4MOI3M, 1-methoxyindole-3-ylmethyl - 1MOI3M, indole-3-ylmethyl - I3M). Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe addiert. Es wurden 4 biologische Replikate mit je 10-15 Individuen gemessen. Die Messung erfolgte mit UPLC-gekoppelter UV-Detektion der Desulfo-GSL. Als interne Kontrolle zur Quantifizierung diente Sinigrin. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$) berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Um einen möglichen Einfluss des unmittelbaren Kontaktes mit der Außenwelt auf die Abwehrreaktion der Pflanze und unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die GSL-Akkumulation und zu testen, wurden zusätzlich GSL-Messungen an Pflanzen der *IQD1*- und *rh57*-Missexpressionslinien durchgeführt, die unter nicht sterilen Bedingungen auf Erde angezogen wurden (Abb. A 5). Die *gcc7*-Linie und *p35S:IQD1 #14.3* zeigten tendenziell erhöhte GSL-Gehalte. Für eine der analysierten *p35S:IQD1-GFP*-Linien wurde eine leicht geringere Konzentration von aliphatischen GSL gemessen. Allerdings wurden für keine der analysierten Linien statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT festgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keinen Zusammenhang von *IQD1*-Expression und GSL-Akkumulation. Möglicherweise handelt es sich bei dem erhöhten GSL-Gehalt in *gcc7* um einen konditionellen Chemotyp, der von bisher nicht identifizierten Einflüssen abhängt. Denkbar ist auch, dass die Responsivität auf Umwelteinflüsse in *IQD1*-Missexpressionslinien verändert wird.

Das Phytohormon Jasmonat (JA) beeinflusst die Abwehrreaktion und die GSL-Biosynthese in *A. thaliana* (Guo *et al.*, 2013). Um zu testen, ob die *IQD1*-Transkriptmenge einen Einfluss auf die JA-Responsivität hat, wurde der GSL-Gehalt in *IQD1*-Überexpressionslinien, *gcc7* und *rh57-1* nach Behandlung mit Methyljasmonat (MeJA) gemessen (Abb. A 6). Die MeJA-Behandlung führte bei allen Linien zu einem erhöhten GSL-Gehalt. Für die indolischen GSL zeigten *p35S:IQD1 #1.4* und die analysierte *p35S:IQD1-GFP*-Linie eine geringere Konzentration. Die Ergebnisse zeigen jedoch keine Tendenz für eine veränderte JA-Responsivität der *IQD1*-Überexpressionslinien.

Zusammengenommen geben die Ergebnisse keinen Hinweis auf veränderte GSL-Gehalte in *gcc7*.

2.5 Rolle von *IQD1* in Phytohormon-vermittelter Pflanzenabwehr und Verwundungsantwort

In vorhergehenden Studien wurde für *gcc7* eine erhöhte Resistenz gegenüber Fraßfeinden berichtet. Außerdem wurde gezeigt, dass die *IQD1*-Expression nach einer Behandlung mit JA erhöht war (Levy *et al.*, 2005). Das Phytohormon JA wird bei Attacken durch Fraßfeinde oder Verwundung in der Pflanze verstärkt produziert. Um eine mögliche Rolle von *IQD1* in der Pflanzenabwehr zu untersuchen, wurde der Einfluss von MeJA auf die *IQD1*-Expression in *A. thaliana* analysiert. Für eine gewebespezifische Analyse der Expression wurden sechs Tage alte Keimlinge einer *IQD1*-GUS-Reporterlinie (*pIQD1:GUS*) auf ATS-Medium mit 0 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M und 10 μ M MeJA transferiert (Abb. 28A). Nach anschließender GUS-Färbereaktion war eine Blaufärbung in den Leitgeweben der Blätter, im Hypokotyl und in der Wurzel zu erkennen. Im Hypokotyl der Keimlinge auf Medium mit 10 μ M MeJA konnte eine leichte Intensivierung der GUS-Färbung beobachtet werden. Um den Effekt im Hypokotyl genauer zu untersuchen, wurden Keimlinge für sechs Tage ohne Licht angezogen. Die etiolierten Keimlinge wurden anschließend direkt mit einer 10 μ M MeJA-Lösung besprüht und die Promotoraktivität über die GUS-Färbung in einer Zeitserie beobachtet (Abb. 28B). Zu jedem Zeitpunkt war eine deutliche Blaufärbung im Hypokotyl zu erkennen. Eine eindeutige Veränderung der Färbung zeigte sich über den betrachteten Zeitraum nicht.

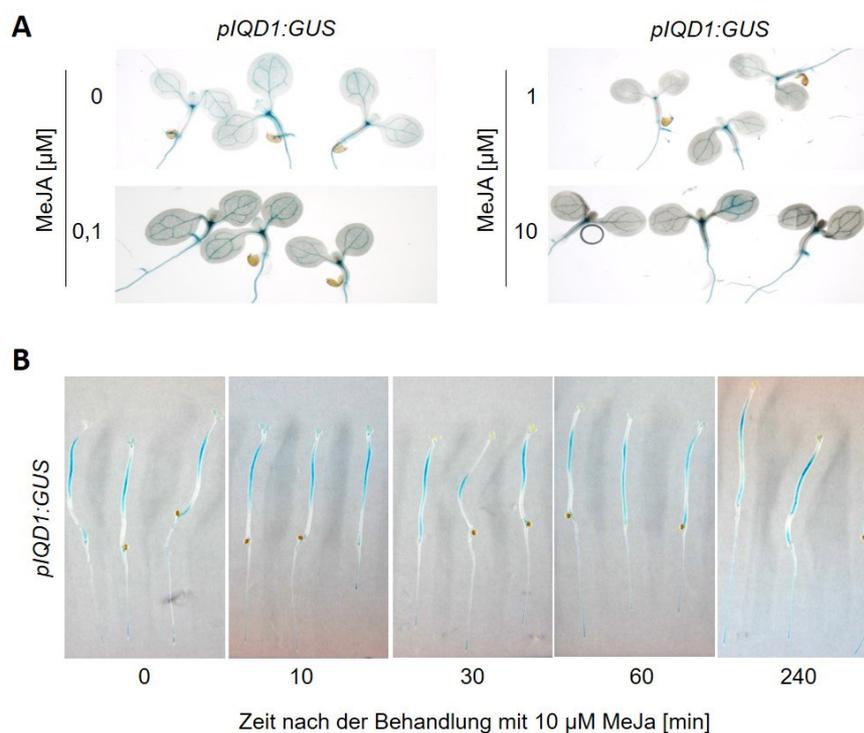


Abb. 28: *IQD1*-Promotoraktivität in Keimlingen nach MeJA-Behandlung

A Sechs Tage alte *IQD1*-GUS-Reporterlinien 24 h nach Transfer von ATS-Medium auf Medium mit unterschiedlichem MeJA-Gehalt. **B** Keimlinge wurden sechs Tage auf ATS-Medium in Dunkelheit angezogen. Die MeJA-Lösung wurde direkt auf die Keimlinge gesprüht. Nach der Behandlung wurden die Keimlinge 4 h in der GUS-Färbelösung inkubiert.

Um die Veränderung der *IQD1*-Expression näher bestimmen zu können, wurden *IQD1*-Transkriptmengen in zwei Wochen alten Col-0-Pflanzen nach Behandlung mit 250 μ M MeJA-, Mock-Lösung und Wasser mittels qRT-PCR gemessen. Um auch den Effekt nach Verwundung zu untersuchen, wurden zusätzlich Pflanzen in die Analyse mit einbezogen, welche mit einer Pinzette quer zu Blattmittelrippe verwundet wurden (Abb. 29). Nach der Behandlung mit MeJA konnte eine tendenziell erhöhte *IQD1*-Expression detektiert werden. Das war auch für die Mock- und Wasser-Behandlung der Fall. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Berührung oder Feuchtigkeit auf den Blättern die *IQD1*-Expression beeinflussen könnte. Auch nach Verwundung stieg die *IQD1*-Transkriptmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht an. All diese Unterschiede sind allerdings statistisch nicht signifikant. Möglicherweise konnte nur ein schwacher Anstieg der *IQD1*-Transkriptmenge nach Verwundung festgestellt werden, weil der Effekt der Verwundung sehr lokal ist oder nur in wenigen Zellen die Expression induziert wird.

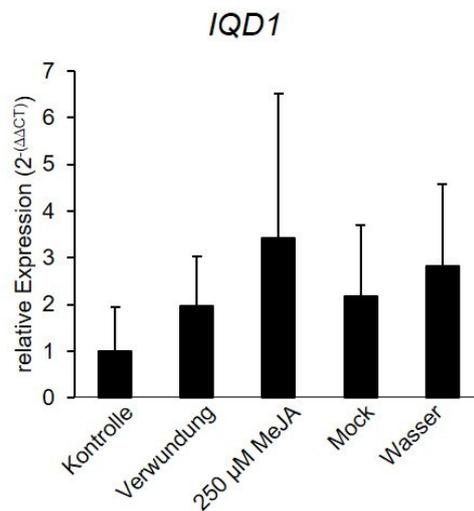


Abb. 29: *IQD1*-Expression in Col-0 nach Verwundung oder Behandlung mit MeJA oder Wasser

IQD1-Transkriptanalyse in Sprossen von zwei Wochen alten Pflanzen, horizontal angezogen auf ATS-Medium, 4 h nach Behandlung (Verwundung, direktes Sprühen von 250 μ M MeJA-, 70%iger (v/v) Ethanollösung (Mock) oder Wasser). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmengen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) relativ zur unbehandelten Kontrolle. Es wurden jeweils drei biologische Replikate mit jeweils neun Individuen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$) auf Grundlage der ΔCT -Werte berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Um zu testen, ob die Responsivität in der Verwundungsantwort durch erhöhte *IQD1*-Expression verändert wird, wurden die Gehalte von JA, JA-Isoleucin (JA-Ile), 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) und Abscisinsäure (ABA) nach Verwundung gemessen (Abb. A 7). Die stärkste Erhöhung wurde für JA und JA-Ile gemessen. Zwischen 30 min und 60 min stieg der JA-Gehalt noch leicht an, während der Gehalt von JA-Ile zu beiden Zeitpunkten vergleichbar war. Der Gehalt von ACC stieg nach 30 min im WT stärker als in *gcc7*. Nach 60 min stieg der Gehalt auf mehr als das 3-fache und unterschied sich nicht mehr von dem Gehalt von *gcc7*. ABA zeigte die geringste Konzentrationserhöhung nach Verwundung. Die Gehalte der Phytohormone unterschieden sich für die Behandlung und verschiedenen Zeitpunkten zwischen WT und *gcc7* statistisch nicht. Eine veränderte Verwundungsantwort bei *gcc7* zeigte sich hier nicht.

2.6 Expression von *IQD1*-verwandten Genen nach Verwundung

IQD1 bildet zusammen mit den nächstverwandten Genen *IQD2*, *IQD3* und *IQD4* die Gruppe IIIb in der phylogenetischen Systematik der IQD in *A. thaliana*. Die Proteine zeichnen sich durch ähnliche Zusammensetzung von Motiven mit unbekannter Funktion aus. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit könnten die Gene teilweise redundante Funktionen besitzen. Daher wurde untersucht, ob ihre Expression durch die Verwundungsantwort in der Pflanze beeinflusst wird. Um die Expressionsdomänen von *IQD1*, *IQD2*, *IQD3* und *IQD4* nach Verwundung zu visualisieren, wurden Blätter von GUS-Reporterlinien mit einer Pinzette verwundet und die Promotoraktivität analysiert (Abb. 30). Für *pIQD1:GUS* ist spezifisch in der Mittelrippe um die Verwundungsstelle eine Blaufärbung zu erkennen. Die Promotoraktivität von *IQD3* wurde durch die Verwundung in einem größeren Bereich der Blattfläche um die Verwundung induziert. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass *IQD1* und *IQD3* eine Funktion in der Verwundungsantwort haben. Die *pIQD2:GUS*-Reporterlinie zeigte keine eindeutige Veränderung der Expressionsdomäne nach Verwundung und *pIQD4* wies keine Aktivität im Blatt auf. Expressionsdaten aus der öffentlich zugänglichen Datenbank *Genvestigator* zeigen jedoch für keine der untersuchten Gene einen Anstieg der Transkriptmengen nach Verwundung. Möglicherweise ergeben sich diese gegensätzlichen Beobachtungen aus einer lokal begrenzten Induktion von *IQD1* und *IQD3*. Um die Veränderung der Promotoraktivität von *IQD1* und *IQD3* in einer Zeitserie zu beobachten, wurden Blätter von je zwei unabhängigen GUS-Reporterlinien von *pIQD1:GUS* (#10.3 und #13.3) und *pIQD3:GUS* (#5.1 und #24.5) sowie eine unabhängige Kontrolllinie (*pPDR4:GUS* #13.2) mit einer Rasierklinge verwundet (Abb. A 8). Anschließend wurden unmittelbar nach der Verwundung bzw. 5 und 15 min später ein Teil der Blätter geerntet und nach einer Fixierung mit Aceton in die GUS-Färbelösung übertragen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Promotoraktivität direkt nach der Verwundung induziert wurde. Auch hier zeigte sich für *pIQD1:GUS* eine lokale GUS-Färbung im Bereich des Leitgewebes, während bei *pIQD3:GUS* ein größerer Bereich um die Verwundungsstelle blau gefärbt war. Diese Daten lassen für *IQD1* eine Rolle in der Verwundungsantwort spezifisch im Bereich der Leitgefäße vermuten. Die zeitgleiche Induktion der Promotoraktivität könnte möglicherweise auf eine partiell redundante Funktion von *IQD1* und *IQD3* in der Verwundungsantwort hindeuten. Allerdings zeigten qRT-PCR-Analysen keinen signifikanten Anstieg der *IQD3*-Expression nach Verwundung. Möglicherweise erscheint die *IQD3*-Induktion in den Reporterlinien durch Positionseffekte der *pIQD3:GUS*-Insertion stärker als sie in der Pflanze vorliegt. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse lag der Fokus der weiteren Arbeit auf der Charakterisierung von *IQD1*.

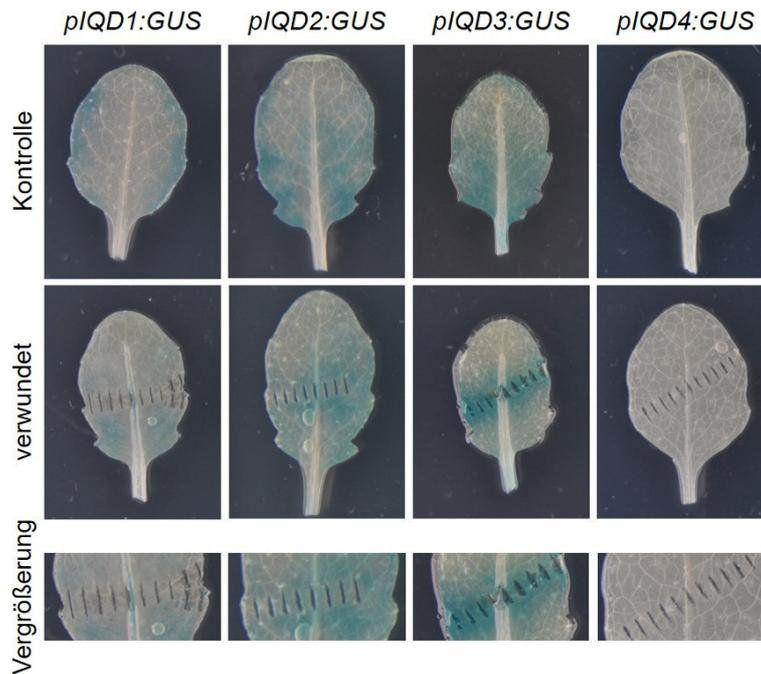


Abb. 30: Promotoraktivität von *IQD1* – 4 nach Verwundung

Rosettenblätter von vier Wochen alten, auf Erde angezogenen *pIQD1:GUS*-, *pIQD2:GUS*-, *pIQD3:GUS*- und *pIQD4:GUS*-Reporterlinien. Die Blätter wurden an der Pflanze mit einer Pinzette quer zur Mittelrippe verwundet und nach einer Fixierung mit 90%igen (v/v) Aceton in den Färbepuffer übertragen. Die GUS-Färbereaktion erfolgte über Nacht. Die untere Reihe zeigt einen vergrößerten Ausschnitt um die Verwundungsstelle.

2.7 Interaktion von KLCR-Proteinen mit IQD1 und WRKY21 in Hefe

IQD1 wurde sowohl im Zytosol an MT als auch im Zellkern und im Nukleolus beobachtet. Die Untersuchungen von GFP-markiertem IQD1 in *A. thaliana* legen außerdem nahe, dass IQD1 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Bisher ist die Funktion von IQD im Zellkern jedoch noch ungeklärt. Möglicherweise findet die Regulation von Prozessen in Abhängigkeit mit weiteren Proteinen statt. In der Arbeitsgruppe wurde daher nach potenziellen Interaktoren gesucht. In Vorarbeiten wurde neben CaM- und CML-Proteinen auch KLCR1 als Interaktionspartner von IQD1 beschrieben (Bürstenbinder *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde beobachtet, dass IQD1 die subzelluläre Lokalisation von KLCR1 beeinflusst. So wird KLCR1 durch IQD1 im Zytosol an die MT und im Zellkern zum Nukleolus rekrutiert (Pflug, 2019). In *A. thaliana* umfasst die KLCR-Familie drei Mitglieder. Sie zeichnen sich unter anderem durch mehrere TPR-Motive aus, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können. Für *k1cr1k1cr2*-Mutanten wurde ein verändertes Muster der kortikalen MT beschrieben, was zu einer veränderten Gestalt der Hypokotylzellen führte (Liu *et al.*, 2016). Die Funktion von KLCR-Proteinen im Zellkern und der Einfluss von IQD-Proteinen sind dagegen bisher unbekannt. Um zu untersuchen, ob neben KLCR1 auch die anderen Vertreter der Familie als Interaktoren in Frage kommen, wurde die Interaktion von IQD1 mit KLCR1, KLCR2 und KLCR3 in einem Hefe-2-Hybrid-Experiment getestet. Dabei wurden Hefezellen mit Vektoren transformiert, die die DNA-Sequenz der Kandidatenproteine enthielten. Die KLCR-Proteine waren bei diesem Ansatz mit der Aktivierungsdomäne und IQD1 mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Als Kontrolle wurden Leervektoren genutzt, welche die Aktivierungsdomäne bzw.

die DNA-Bindedomäne ohne die Sequenz eines Fusionsproteins enthielten. Um die erfolgreiche Transformation zu überprüfen, wurden Hefekolonien auf Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Bei erfolgreicher Transformation wurde die Proteininteraktion über das Wachstum der Hefekolonien auf vierfach-Mangelmedium (ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) untersucht. Abb. 31A zeigt das Hefewachstum auf vierfach-Mangelmedium nach erfolgreicher Transformation. Alle Hefekolonien, die das IQD1- und eines der KLCR-Konstrukte exprimierten, wuchsen auf dem Selektionsmedium. Nach der Transformation mit einem Leervektor waren die Hefezellen dagegen nicht lebensfähig. Diese Beobachtung legt nahe, dass IQD1 mit allen drei KLCR-Proteinen interagieren kann. Das Ausbleiben des Wachstums der Hefekolonien mit Leervektor zeigt, dass die Interaktion der Kandidatenproteine zum Wachstum auf dem Selektionsmedium führt und schließt eine unspezifische Bindung als Ursache für die Aktivierung der Expression aus.

Eine Studie identifizierte KLCR2 als Ziel von Effektoren des gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas syringae* und des biotrophen Oomyzeten *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*) (Mukthar *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde für *klcr2* eine erhöhte Suszeptibilität gegen *Hpa* im Vergleich zum WT beschrieben. Einen Hinweis auf eine mögliche Funktion im Zellkern gab eine Interaktionsstudie aus der gleichen Arbeit, bei der zahlreiche Transkriptionsfaktoren als KLCR2-Interaktoren identifiziert wurden. Dazu gehörte unter anderen auch WRKY21. Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* umfasst 74 Vertreter. Für einige Vertreter wurde bereits eine Funktion in der Pflanzenabwehr beschrieben (Eulgem & Somssich, 2007). Daher war WRKY21 ein vielversprechender Kandidat, der zusammen mit IQD1 und KLCR2 Abwehrantworten in *A. thaliana* regulieren könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde zunächst über Hefe-2-Hybrid-Analysen die Interaktion von WRKY21 mit KLCR1, KLCR2 bzw. KLCR3 getestet (Abb. 31B). Dabei war der WRKY-Transkriptionsfaktor mit der DNA-Bindedomäne fusioniert und konnte nur in Kombination mit KLCR2 das Wachstum der Hefezellen auf dem Selektionsmedium ermöglichen. Für KLCR1 und KLCR3 konnte dagegen keine Interaktion in Hefe festgestellt werden. Die Kontrollen mit Leervektoren zeigten, dass das Wachstum lediglich bei der WRKY21-KLCR2-Interaktion möglich war.

Diese Ergebnisse bestätigen eine Interaktion von WRKY21 und KLCR2 und zeigen, dass IQD1, KLCR2 und WRKY21 möglicherweise einen Komplex bilden könnten, der eine Funktion in der Regulierung der Pflanzenabwehr besitzt.

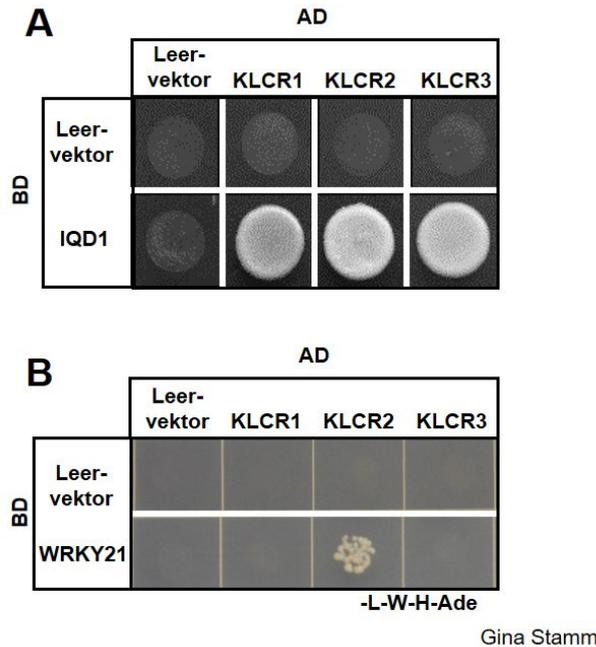


Abb. 31: Interaktionsstudien via Hefe-2-Hybrid Analyse für KLCR-Proteine

Interaktion von KLCR1, KLCR2 und KLCR3 mit **A** IQD1 und **B** WRKY21. Dargestellt ist das Wachstum der Hefestämme auf vierfach-Mangelmedium ohne Leucin (L), Tryptophan (W), Histidin (H) und Adenin (Ade). AD = Aktivierungsdomäne, BD = DNA-Bindedomäne, Leervektor = Vektor mit BD bzw. AD ohne Sequenz für Fusionsprotein. Die Versuche wurden von Gina Stamm durchgeführt.

2.8 Subzelluläre Lokalisation von WRKY21 und KLCR2 in Abhängigkeit von IQD1

Die beobachtete Interaktion von KLCR2 mit IQD1 und WRKY21 in Hefe weist darauf hin, dass diese Proteine möglicherweise zusammen in der Pflanzenzelle wirken könnten. Eine Voraussetzung für eine gemeinsame Funktion ist die Lokalisation der Proteine in denselben Zellkompartimenten. Um die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurden *p35S:YFP-WRKY21*- und *p35S:RFP-KLCR2*-Konstrukte in *N. benthamiana* Blättern transient exprimiert und mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop in Epidermiszellen analysiert (Abb. 32). YFP-WRKY21 wurde nur im Zellkern beobachtet (Abb. 32A). Innerhalb des Zellkerns war das Signal fleckenhaft verteilt, im Nukleolus wurde keine Fluoreszenz detektiert. Die ausschließliche Kernlokalisation ist für einen Transkriptionsfaktor nicht überraschend und wurde für WRKY21 und weitere WRKY-Proteine bereits gezeigt (Zhao *et al.*, 2019; Ciolkowski *et al.*, 2008; Weyhe *et al.*, 2014). Ein genaueres Verteilungsmuster wurde jedoch bisher nicht beschrieben. RFP-KLCR2 war ebenfalls nicht im Nukleolus zu beobachten, wies allerdings im restlichen Teil des Zellkerns eine gleichmäßige Verteilung auf. Zusätzlich war RFP-KLCR2 im Zytosol lokalisiert (Abb. 32B). Mit 99,5 kDa ist RFP-KLCR2 zu groß um passiv durch die Kernporen zu diffundieren, welche nur für Proteine mit maximal 40 kDa durchlässig sind (Patel *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2010). Dies ist ein Hinweis darauf, dass KLCR2 aktiv in den Kern transportiert wird. Um zusätzlich den Einfluss der Proteine auf die Lokalisation ihrer potenziellen Interaktionspartner zu testen, wurden *p35S:IQD1*, *p35S:YFP-WRKY21* und *p35S:RFP-KLCR2* in verschiedenen Kombinationen koexprimiert. Bei gemeinsamer Expression in der Zelle von YFP-WRKY21 und RFP-KLCR2 war das Lokalisationsmuster der Proteine vergleichbar mit der jeweiligen Lokalisation bei getrennter Expression der Konstrukte.

Die Verteilung von RFP-KLCR2 wurde bei Koexpression mit IQD1 dagegen so verändert, dass zusätzlich ein Signal im Nukleolus und an filamentösen Strukturen im Zytosol erkennbar war. Bei der Kombination von YFP-WRKY21 und IQD1 blieb das Muster der WRKY21-Lokalisation weitestgehend unverändert. Allerdings war eine Tendenz zu größeren Flecken mit intensiverer Fluoreszenz zu beobachten. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den vorherigen Kombinationen wurde bei der Koexpression der drei Proteine die Lokalisation von YFP-WRKY21 ebenfalls nicht stark verändert, jedoch waren auch in diesem Fall vermehrt größere Flecken mit stärkerem Signal zu beobachten. Auch in dieser Kombination bewirkte IQD1 ebenfalls die Rekrutierung von RFP-KLCR2 an die Filamente im Zytosol sowie die Erweiterung der Kernlokalisierung in den Nukleolus.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die YFP-WRKY21-Lokalisation unabhängig von RFP-KLCR2 und IQD1 ist. RFP-KLCR2 wurde dagegen durch IQD1 zum Nukleolus und an filamentöse Strukturen im Zytosol rekrutiert, bei denen es sich vermutlich um MT handelt. In einer anderen Studie wurde bei der Kolokalisation von GFP-IQD1 und RFP-KLCR1 auch die Rekrutierung von KLCR1 an die MT und eine veränderte IQD1-Lokalisation im Zellkern beobachtet (Pflug, 2019).

In diesem Experiment ergaben sich erste Hinweise, dass IQD1 einen Einfluss auf die KLCR2-Lokalisation haben könnte. Möglicherweise ist IQD1 so in der Lage, die Funktion von KLCR2 zu regulieren.

2.9 Interaktion von WRKY21, KLCR2, CaM2 und IQD1 *in planta*

Die Analysen zur subzellulären Lokalisation von IQD1, KLCR2 und WRKY21 zeigen, dass alle drei Proteine im Zellkern lokalisiert sind (Abb. 21, Abb. 32). Darüber hinaus wurde die Interaktion von KLCR2 mit IQD1 und WRKY21 in Hefe beobachtet (Abb. 31). Um zu untersuchen, ob eine Interaktion zwischen KLCR2 und WRKY21 *in planta* zu beobachten ist, wurden Analysen mithilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durchgeführt (Abb. 33). Dafür wurde zunächst WRKY21 in Fusion mit einem N-terminalen Teil von YFP (*p35S:nYFP-WRKY21*) zusammen mit KLCR2 mit dem C-terminalen YFP-Teil (*p35S:cYFP-KLCR2*) in *N. benthamiana* transient koexprimiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht.

Ausschließlich im Zellkern wurde ein Fluoreszenzsignal detektiert, das die Interaktion von WRKY21 und KLCR2 anzeigt. Das Signal war nicht gleichmäßig verteilt, sondern bildete ein Muster aus mehreren unterschiedlich großen Punkten. Im Bereich des Nukleolus war kein Signal erkennbar. Die beobachtete Interaktionsdomäne zeigt ein ähnliches Muster wie die subzelluläre Lokalisation von YFP-WRKY21 (Abb. 32A). Da in diesem Experiment die Bindung der beiden YFP-Teile stabil ist, wurde KLCR2 möglicherweise zur WRKY21-Lokalisationsdomäne rekrutiert.

Bei den Koexpressionsanalysen wurde ein Einfluss von IQD1 auf die subzelluläre Lokalisation von KLCR2 beobachtet. Um den Einfluss auf die WRKY21-KLCR2-Interaktion zu testen, wurden *p35S:IQD1* zusammen mit *p35S:nYFP-WRKY21* und *p35S:cYFP-KLCR2* transient exprimiert. Für diese Kombination wurde ein etwas schwächeres Fluoreszenzsignal detektiert. Das Muster unterschied sich jedoch stark. Es war gleichmäßig im Zellkern verteilt und zeigte eine erhöhte Intensität im Nukleolus. Dieses Muster ist reminiscent zur IQD1-Kernlokalisation. Diese Beobachtung legt nahe, dass IQD1 möglicherweise die Interaktionsdomäne von WRKY21 und KLCR2 beeinflusst und beide Proteine zum Nukleolus rekrutieren könnte. WRKY21 besitzt eine CaMBD und die CaM-Bindung wurde *in vitro* bereits demonstriert (Park *et al.*, 2005). Durch die Koexpression von *p35S:RFP-CaM2* wurde der Effekt von CaM auf die WRKY21-KLCR2-Interaktion untersucht. Das beobachtete Muster unterschied sich abermals von den beiden vorherigen Kombinationen. Es wurde kein Signal im Nukleolus detektiert, während es im restlichen Zellkern gleichmäßig verteilt war. In Vorarbeiten wurde die gleiche subzelluläre Lokalisation für CaM2 beobachtet (Bürstenbinder *et al.*, 2017). Das weist auf einen Einfluss von CaM2 auf die WRKY21-Lokalisation hin. Aufgrund der Ergebnisse aus der Interaktionsstudie mit dem Hefe-2-Hybridsystem wurde *p35S:cYFP-KLCR1* als Negativkontrolle zusammen mit *p35S:nYFP-WRKY21* getestet. In Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen konnte keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen in der Zelle festgestellt werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass IQD1 und CaM2 einen Einfluss auf den WRKY21-KLCR2-Komplex haben können. Möglicherweise könnte ein Komplex aus diesen vier Proteinen die Expression von WRKY21-kontrollierten Genen regulieren.

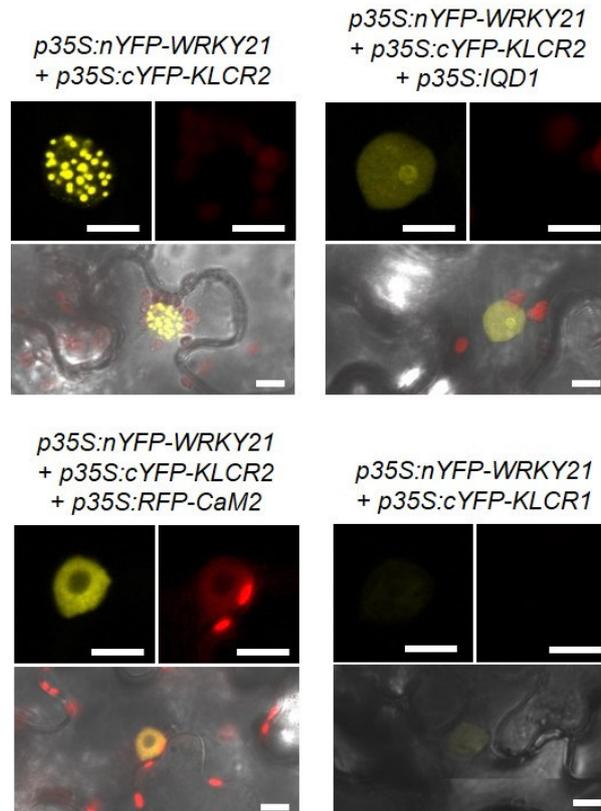


Abb. 33: WRKY21-Interaktionsstudie in *N. benthamiana* via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Für alle Kombinationen ist jeweils das YFP-Signal (oben links) und das RFP-Signal (oben rechts) im Zellkern dargestellt. Darunter ist ein größerer Ausschnitt der Zelle mit Hellfeld abgebildet. Alle Konstrukte wurden unter Kontrolle eines 35S-Promotors transient exprimiert. KLCR1 wurde als Negativkontrolle genutzt, da im Hefe-2-Hybridsystem keine Interaktion beobachtet werden konnte. nYFP = N-terminaler YFP-Teil, cYFP = C-terminaler YFP-Teil. Maßstab = 10 μ m

2.10 Transaktivierung von *pCYP83B1* über WRKY21

Die Ergebnisse der zytologischen Studien in dieser Arbeit könnten auf eine gemeinsame Funktion von WRKY21, KLCR2 und IQD1 im Zellkern deuten. Obwohl Hinweise aus anderen Studien eine Rolle in der Pflanzenabwehr nahe legen, ist der Funktionsmechanismus noch nicht klar. Allerdings ist für WRKY21 als Transkriptionsfaktor bekannt, dass er die Genexpression im Zellkern reguliert. In einer Studie wurde unter anderem der Promotor des GSL-Biosynthesegens *CYP83B1* als Zielpromotor von WRKY21 identifiziert (Li *et al.*, 2014). Um zu untersuchen, wie WRKY21 die Expression von *CYP83B1* reguliert und ob KLCR2 als direkter Interaktionspartner die Funktion des Transkriptionsfaktors beeinflusst, wurden Transaktivierungsstudien mit einem *pCYP83B1:GUS*-Konstrukt in *N. benthamiana* durchgeführt (Abb. 34). Dazu wurde *pCYP83B1:GUS* allein oder mit *p35S:YFP-WRKY21* und *p35S:RFP-KLCR2* in *N. benthamiana* Blättern transient exprimiert. Durch die Fusion mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen war es möglich, die Anwesenheit der Proteine zu überprüfen. Die Promotoraktivität konnte anschließend über eine GUS-Färbe-Reaktion visualisiert werden, bei der der Ausgangsstoff X-Gluc durch das GUS-Enzym zu einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) umgewandelt wurde. Blätter, in denen *pCYP83B1:GUS* allein exprimiert wurde, zeigten nur vereinzelte Bereiche mit schwacher

Blaufärbung. Zusammen mit *p35S:YFP-WRKY21* konnte dagegen in den Bereichen der transienten Expression eine intensive Blaufärbung beobachtet werden. Die zusätzliche Expression von *p35S:RFP-KLCR2* zeigte eine vergleichbare Blaufärbung. Diese Beobachtungen bestätigen *CYP83B1* als Zielgen von WRKY21 und zeigen, dass der Transkriptionsfaktor den Promotor aktiviert. Für KLCR2 wurde in diesem Versuch kein zusätzlicher Effekt beobachtet.

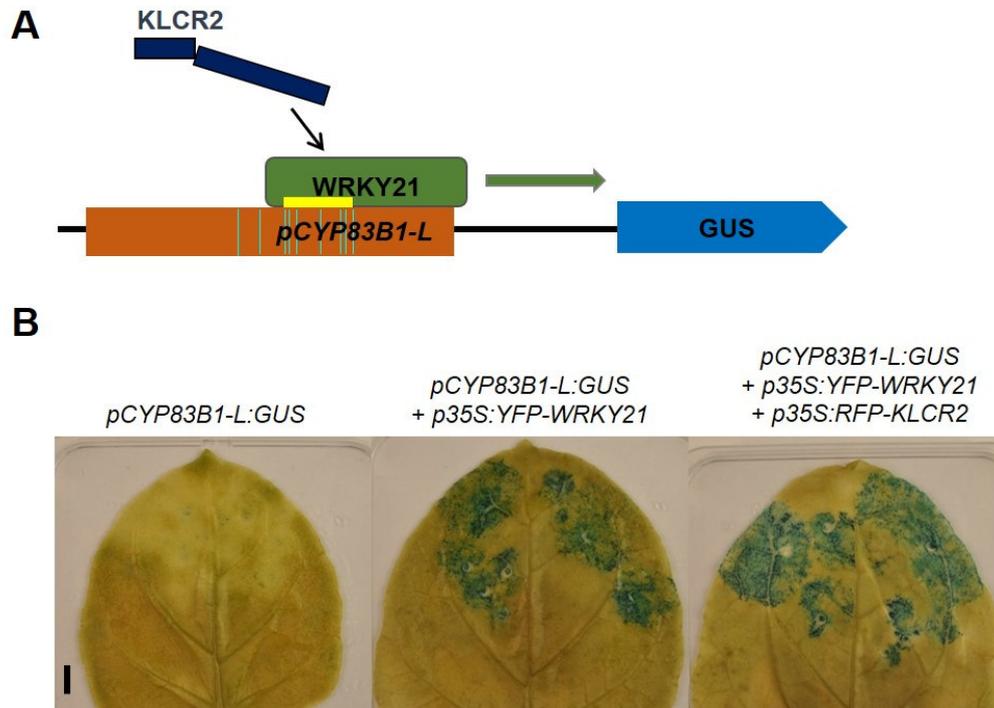


Abb. 34: Transaktivierungsstudie für *pCYP83B1* mit WRKY21 und KLCR2 via β -Glucuronidase (GUS) Färbereaktion

A Modell für die Aktivierung des Promotors in *pCYP83B1-L:GUS* via WRKY21 unter Einfluss von KLCR2. türkis = W-Boxen, gelb = WRKY-Domän **B** GUS-Färbung in sechs Wochen alten *N. benthamiana* Blättern, drei Tage nach der Infiltration mit *A. tumefaciens* Lösung. Die Konstrukte wurden wie angegeben in verschiedenen Kombinationen transient transformiert. Die Färbereaktion wurde über Nacht durchgeführt. Maßstab = 1 cm

Um die *pCYP83B1*-Aktivität genauer zu ermitteln, wurde die Expressionsstärke in Abhängigkeit von WRKY21 und KLCR2 in einem weiteren Experiment über ein Fluoreszenzsignal quantifiziert (Abb. 35). Dazu wurden ebenfalls *pCYP83B1:GUS*, *p35S:YFP-WRKY21* und *p35S:RFP-KLCR2* in *N. benthamiana* transient exprimiert. Mit dem Extrakt der Blätter wurde anschließend eine GUS-abhängige Reaktion angesetzt, bei der 4-MUG zum fluoreszierenden 4-MU umgewandelt wurde (Abb. 35B). Die anschließend gemessene Fluoreszenzintensität gab Aufschluss über die Menge von GUS-Enzym im Blattextrakt und damit über die *CYP83B1*-Promotoraktivität. Die Fluoreszenz wurde dabei nach 20 min, 40 min, 60 min und 80 min gemessen. Für *pCYP83B1:GUS* mit *p35S:YFP-WRKY21* wurden die höchsten Fluoreszenzwerte gemessen. Die zusätzliche Expression von *p35S:RFP-KLCR2* führte zu verringerter Fluoreszenz. In Blättern, die nur *pCYP83B1:GUS* exprimierten, wurde ein deutlich geringeres Signal detektiert. Diese Aktivität ist möglicherweise auf die Bindung von *N. benthamiana* Transkriptionsfaktoren an dem Promotor zurückzuführen. Die geringste Fluoreszenz wurde jedoch in Extrakten aus Blättern mit *pCYP83B1:GUS* und *p35S:RFP-KLCR2* beobachtet. Als Negativkontrollen wurden die Extrakte aus unbehandelten Blättern sowie der GUS-Reaktionspuffer gemessen. Sie zeigten

kaum detektierbare Signale. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der GUS-Färbereaktion in Blättern zeigten die Fluoreszenzmessungen, dass WRKY21 die *pCYP83B1*-Aktivität induziert. KLCR2 scheint die Promotoraktivität dagegen negativ zu beeinflussen.

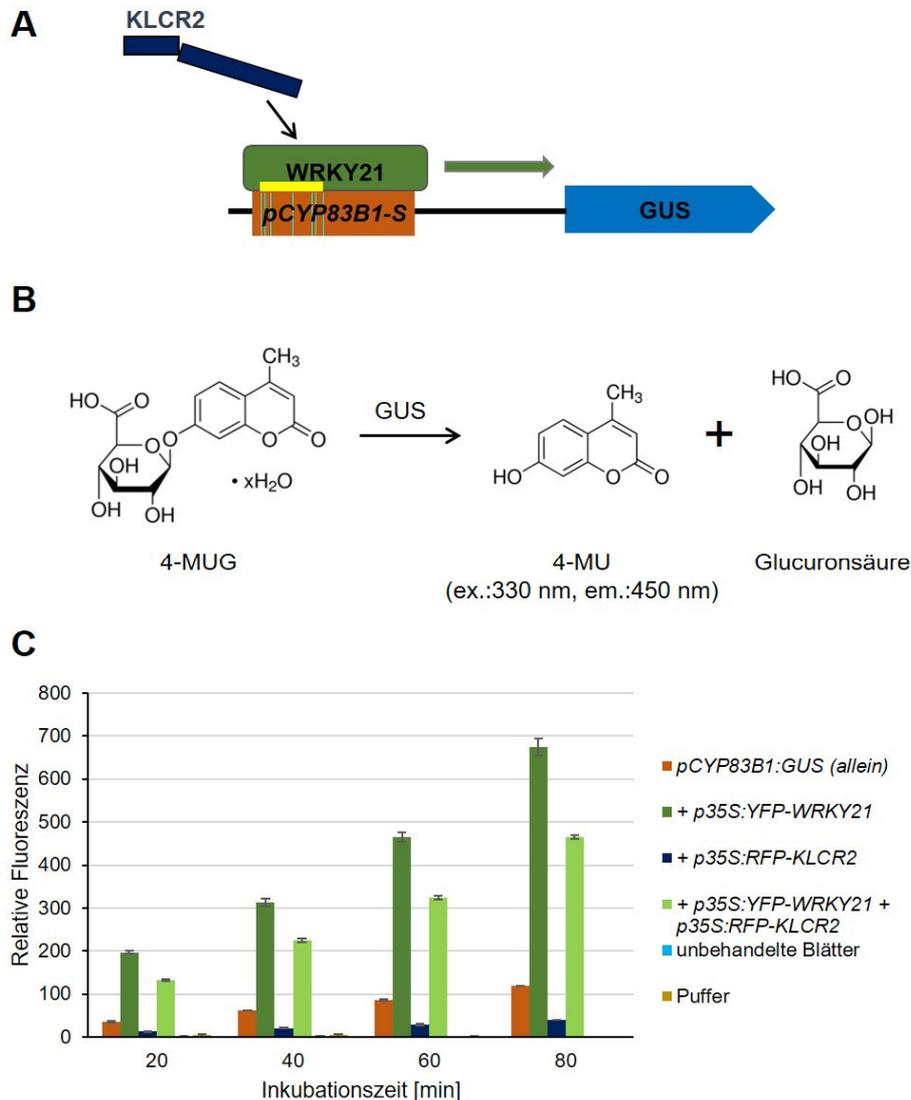


Abb. 35: Transaktivierungsstudie für *pCYP83B1* mit WRKY21 und KLCR2 via β -Glucuronidase (GUS) Assay

A Modell für die Aktivierung des Promotors in *pCYP83B1-S:GUS* via WRKY21 unter Einfluss von KLCR2. türkis = W-Boxen, gelb = WRKY-Domäne. **B** Hydrolytische Spaltung der Glycosidbindung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) durch GUS, wodurch das Fluorophor 4-methylumbelliferone (4-MU) entsteht. **C** Fluoreszenzsignal von 4-MU im Extrakt von *N. benthamiana* Blättern. Die Konstrukte wurden wie angegeben in verschiedenen Kombinationen für 48 h unter Kontrolle eines 35S-Promotors transient exprimiert. Es wurden jeweils drei verschiedene Blätter einer Pflanze mit *A. tumefaciens* Lösung infiltriert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Fluoreszenz nach unterschiedlicher Inkubationszeit für die GUS-Reaktion mit 4-MUG im Blattextrakt. (n = 1, t = 3)

2.11 Expression von *CYP83B1* in verschiedenen Mutantenlinien

Die Interaktions- und Transaktivierungsstudien mit WRKY21, KLRC2 und IQD1 zeigen, dass die drei Proteine einen Komplex im Zellkern bilden könnten, der möglicherweise die WRKY21-Funktion reguliert. Da diese Versuche in transient transformierten *N. benthamiana* durchgeführt wurden, war es möglich, den Einfluss der einzelnen Proteine unabhängig von potenziellen Regulatoren aus *A. thaliana* zu analysieren. Allerdings ist es nicht möglich, anhand der Ergebnisse dieser Experimente eine Aussage über die Relevanz eines potenziellen WRKY21-KLRC2-IQD1-Komplexes in *A. thaliana* zu treffen. Um zu testen, ob die *CYP83B1*-Expression in *A. thaliana* abhängig von den untersuchten Proteinen reguliert wird, wurden *CYP83B1*-Transkriptmengen über qRT-PCR-Analysen im Sprossgewebe von *iqd1*-, *wrky21*- und *klcr2*-Missexpressionslinien gemessen (Abb. 36). Alle Linien vom Col-0 Ökotyp (*gcc7*, *wrky21-2*, *klcr2-2*) wiesen vergleichbare Transkriptmengen wie der WT auf. Die *IQD1*-knock out-Linie *iqd1-2* zeigte eine tendenziell geringere *CYP83B1*-mRNA-Abundanz. Verglichen mit Ws-0 wurde jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die veränderte Expression der einzelnen Gene allein keinen Einfluss auf die *CYP83B1*-Expression in *A. thaliana* hat. In Vorarbeiten wurde dagegen eine erhöhte *CYP83B1*-Transkriptmenge in der *IQD1*-Überexpressionslinie *gcc7* beschrieben (Levy *et al.*, 2005). Die T-DNA-Insertion von *wrky21-2* ist im Promotorbereich lokalisiert. Daher ist die Bildung eines funktionellen WRKY21-Proteins nicht ausgeschlossen, so könnte der Effekt der Insertion in dieser Linie gering ausfallen. Möglicherweise sind die Formierung und Funktion des Komplexes auch von weiteren Bedingungen und äußeren Einflüssen abhängig. So wäre auch eine Ca²⁺-abhängige Regulation über CaM denkbar.

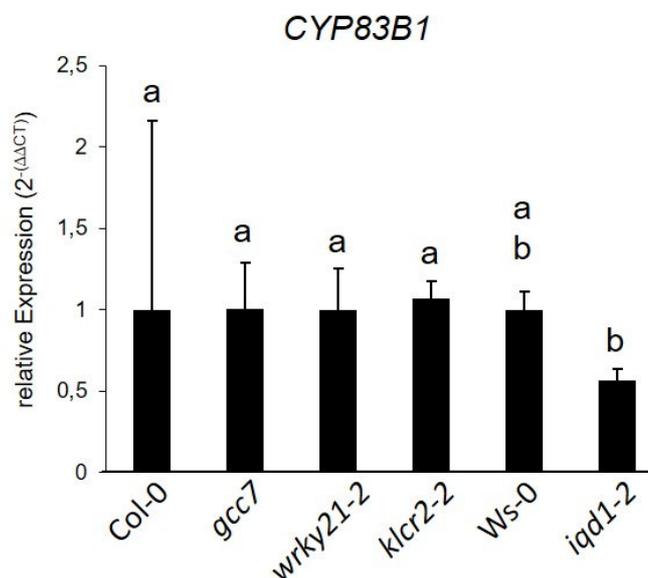


Abb. 36: Transkriptanalyse von *CYP83B1* in Wildtyp- und Mutantenlinien

qRT-PCR-Analyse für *CYP83B1* im Sprossgewebe von *iqd1*, *wrky21* und *klcr2*-Missexpressionslinien. Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der ΔC_T -Werte relativ zu Col-0. Es wurden jeweils drei oder vier biologische Replikate gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien, berechnet auf Grundlage der ΔC_T -Werte durch einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

2.12 Mutation der CaM-Bindedomäne von WRKY21

WRKY21 besitzt im N-terminalen Bereich eine CaM-Bindedomäne (CaMBD). Die CaM-Bindung wurde in einer vorherigen Studie *in vitro* demonstriert (Park *et al.*, 2005). Bei den Interaktionsstudien im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus ein Einfluss von CaM2 auf die subzelluläre Lokalisation von WRKY21 beobachtet. Möglicherweise wird die WRKY21-Aktivität ebenfalls über die Interaktion mit CaM reguliert. Um zu untersuchen, ob die Funktion von WRKY21 von der CaM-Bindung beeinflusst wird, wurden via Einzel-Nukleotid-Mutation (SDM) WRKY21-Varianten etabliert, welche potenziell ein verringertes CaM-Bindungsvermögen aufweisen. Um AS zu identifizieren, die für die CaM-Bindung in WRKY21 eine Rolle spielen, wurde das CaM-Bindungsvermögen verschiedener WRKY21-Varianten mithilfe der Datenbank *Calmodulin target database* (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) vorhergesagt. In der Studie von Park *et al.* (2005) wurden bereits AS identifiziert, die für die CaM-Bindung im WRKY21-verwandten WRKY7 verantwortlich sind. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden potenzielle CaMBD-Deletionsvarianten von WRKY21 generiert (Abb. 37). Für die WRKY21(RR)-Variante wurden die analogen AS ausgetauscht, welche bei WRKY7 zum Verlust der CaM-Bindung führten. Ein verringertes CaM-Bindungsvermögen wurde jedoch für die Variante nicht vorhergesagt. Allerdings identifizierten Park *et al.* (2005) und die Datenbank jeweils unterschiedliche Bereiche als CaMBD (Abb. 37A). Für WRKY21(A) mit dem AS-Austausch von Arginin zu Alanin an Position 65 in dem erweiterten Bereich der CaMBD sagte die Datenbank eine signifikante Veränderung des CaM-Bindungsvermögens voraus. Durch den zusätzlichen Austausch von Phenylalanin und Leucin an Position 48 bzw. 55 durch Arginin bei WRKY21(RRA) ging dieser Effekt weitestgehend verloren. Der Austausch zu Alanin anstatt Arginin an Position 48 in WRKY21(ARA), bewirkte laut Datenbank jedoch ebenfalls eine starke Beeinträchtigung der CaM-Bindung. Dagegen änderte sich das Bindungsvermögen bei WRKY21(AR) im Vergleich zum WT WRKY21 nicht.



Abb. 37: Mutationen der CaMBD von WRKY21

A AS-Sequenz von WRKY21. Der gelb markierte Bereich umfasst die vorhergesagte CaMBD bei Park *et al.* (2005). Die konservierten AS, welche in der Studie für WRKY7 Δ CaMBD mutiert wurden, sind unterstrichen. Der Bereich mit dem höchsten Wert für CaM-Bindung von der Datenbank *Calmodulin target database* (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) ist blau markiert. Die WRKY-Domäne ist grau unterlegt. **B** Position und AS-Austausch der WRKY21-Varianten innerhalb der CaMBD zur Unterdrückung der CaM-Bindung. Der CaMB-Wert zeigt die Voraussage der *Calmodulin target database* für eine CaM-Bindung der Varianten. Ein hoher Wert bedeutet dabei eine hohe, ein geringer Wert eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Bindung.

Trotz großer Variabilität in der AS-Sequenz zeichnen sich CaMBD allgemein durch eine helikale Struktur und basisch amphiphile Eigenschaften aus (O'Neil & DeGrado, 1990). Die Trennung von Bereichen mit negativ geladenen, basischen AS und unpolaren, hydrophoben AS in der Helix begünstigt dabei die CaM-Bindung. Um die Veränderung durch die AS-Austausche innerhalb der Helix zu untersuchen, wurden die Bereiche der CaMBD für die WRKY21-Varianten in Form von helikalen Radprojektionen dargestellt (Abb. 38A). Für die CaMBD im WT-WRKY21 ist ein Bereich zu erkennen, in dem fünf hydrophobe AS (V45, V59, F48, L55 und V51) nahe bei einander liegen. Auf der gegenüberliegenden Seite der Helix bilden vier AS (R47, R50, H61, R65) einen eher positiv geladenen, basischen Bereich. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Helix in einen hydrophoben und einen positiv geladenen Bereich eingeteilt. Durch die Mutationen bei WRKY21 (RR) wurden zwei in der Helix benachbarte unpolare AS (Phenylalanin und Leucin) jeweils durch positiv geladenes Arginin ersetzt. In WRKY21 (AR) wurde das Phenylalanin mit dem kleineren, ebenfalls unpolaren Alanin ausgetauscht. Allerdings ist Alanin weniger hydrophob als Phenylalanin. In der Radprojektion kann man erkennen, dass die Mutationen zum AS-Austausch im hydrophoben Bereich der Helix führten. Das bewirkt die Aufhebung der Trennung in einen hydrophoben und positiv geladenen Teil der Helix. Dieser Verlust der amphiphilen Eigenschaften der CaMBD könnte bedeuten, dass die CaM-Bindung in diesen Varianten beeinträchtigt ist. Dafür sprechen die experimentellen Untersuchungen von WRKY7. Die Voraussage der Datenbank widerspricht jedoch dieser These. Bei der Mutation in WRKY21(A), welche laut der Datenbank zu dem Verlust des CaM-Bindungsvermögens führt, wurde Arginin an der Position 65 durch Alanin ersetzt. Möglicherweise haben Veränderungen im basischen Bereich der Helix einen größeren Effekt auf die CaM-Bindung als im hydrophoben.

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen in der AS-Sequenz zu einer veränderten Proteinstruktur in diesem Bereich führen, wurden die Varianten der CaMBD bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur verglichen (Abb. 38B). Dazu wurden mithilfe der Software *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) die Proteinstrukturen der Varianten für den analysierten Bereich der CaMBD berechnet und mit der WT-Struktur verglichen. Die Varianten WRKY21(RR) und WRKY21(AR) zeigten nur eine teilweise Deckung mit CaMBD des WT. Allerdings hatten die Mutationen keinen Einfluss auf die Helixstruktur. Für alle Varianten, welche den R65A-AS-Austausch enthielten, wurden keine strukturellen Veränderungen im Vergleich zum WT vorausgesagt. Das deutet darauf hin, dass die Manipulation der Bindungsstelle nur über die Verteilung der AS-Ladung auf der Helix erreicht wird, während die Struktur in diesem Bereich und damit die gesamte Proteinstruktur unverändert bleibt.

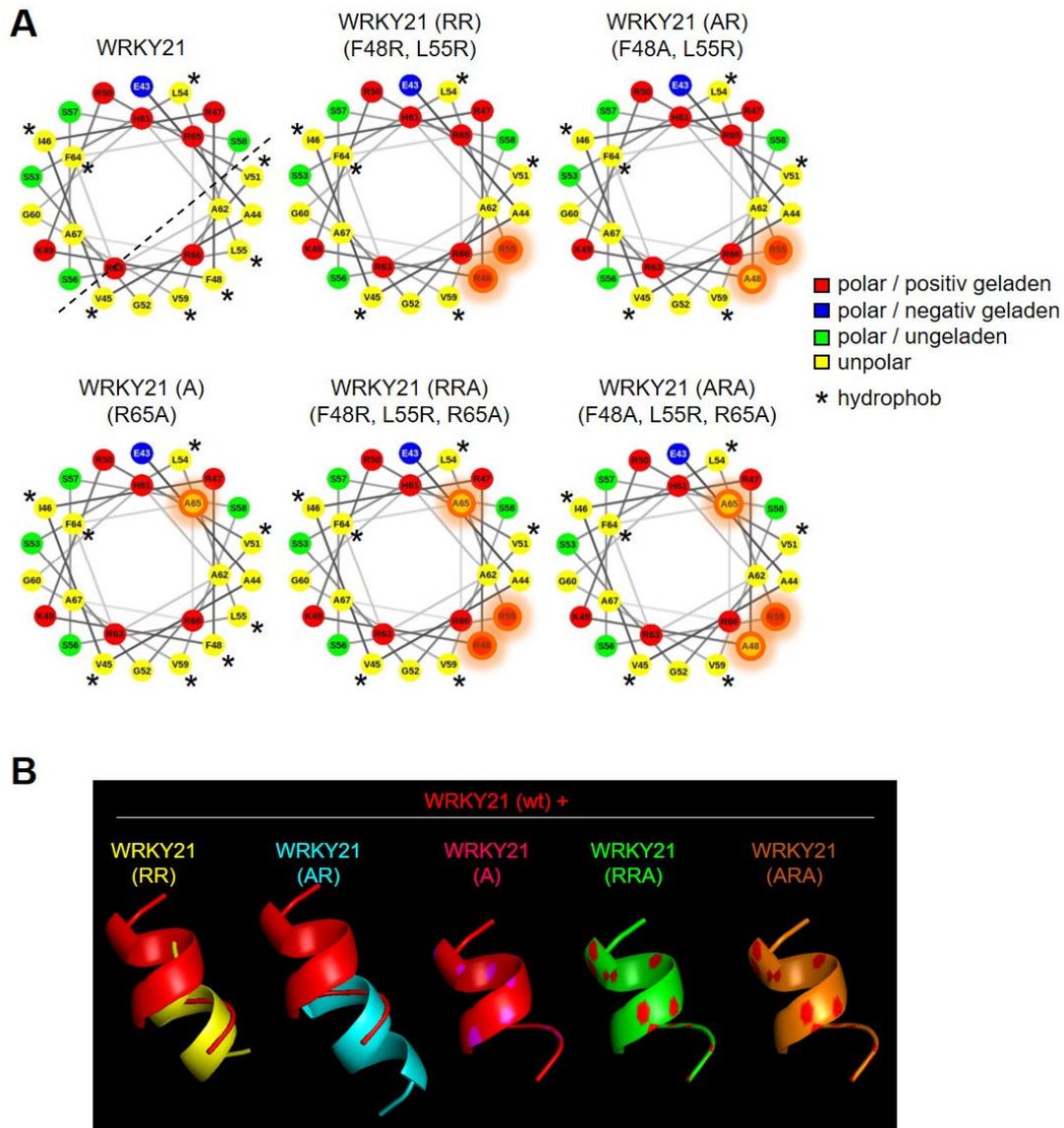


Abb. 38: Aminosäureaustausch der WRKY21 Varianten in der Helix der CaMBD

A Helikale Radprojektion der CaMBD in WRKY21-Varianten. Dargestellt sind die 25 AS der vorausgesagten CaM-Bindungstelle aus Abb. 37. Die veränderten AS sind mit einem Ring markiert. Die Linie teilt die Helix der WT-Sequenz in einen vermuteten positiv geladenen und einen hydrophoben Teil. Die Darstellung wurde auf [http:// lbqp.unb.br/NetWheels/](http://lbqp.unb.br/NetWheels/) erstellt. **B** Strukturvergleich der CaMBD in WRKY21-Varianten. Mithilfe von *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) wurden die Strukturen der CaMBD modelliert und mit dem WT verglichen. Die Modelle der Varianten sind in verschiedenen Farben dargestellt. WRKY21(wt) - rot, WRKY21(RR) – gelb, WRKY21(AR) – cyan, WRKY21(A) – magenta, WRKY21(RRA) – grün, WRKY21(ARA) – orange

2.13 Subzelluläre Lokalisation von WRKY21-Varianten

Aufgrund der Hinweise auf einen Einfluss von CaM auf die subzelluläre Lokalisation von WRKY21 (Abb. 33) wurde der Effekt der potenziell veränderten CaM-Bindung in den WRKY21-Varianten in zytologischen Untersuchungen analysiert. Für Kollokalisationsstudien wurden dabei *N. benthamiana* Blätter mit fluoreszenz-markierten Konstrukten der WRKY21-Varianten (*p35S::GFP-WRKY21*, *p35S::GFP-WRKY21(RR)*, *p35S::GFP-WRKY21(AR)*,

p35S:GFP-WRKY21(A), *p35S:GFP-WRKY21(RRA)*) und CaM2 (*p35S:RFP-CaM2*) transient transformiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde anschließend unter einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet. Wie bereits in vorherigen Experimenten beobachtet, war GFP-WRKY21 ausschließlich im Zellkern in einer gefleckten Struktur und nur außerhalb des Nukleolus lokalisiert. Das Signal von RFP-CaM2 hatte in den Zellen eine sehr geringe Intensität. Es war im Zellkern gleichmäßig verteilt, im Nukleolus allerdings nicht detektierbar. Alle GFP-WRKY21-Varianten waren ebenfalls lediglich im Zellkern zu beobachten. Das Fluoreszenzsignal bei *p35S:GFP-WRKY21(RR)* war auf wenige Punkte im Zellkern beschränkt. Außerdem war es die einzige Variante, welche zusätzlich im Bereich des Nukleolus lokalisiert war. RFP-CaM2 wurde dagegen nicht im Nukleolus detektiert und in den Interaktionsstudien wurde eine Verschiebung des WRKY-KLRC2-Komplexes zum Nukleolus nur in Anwesenheit von IQD1 beobachtet (Abb. 39). Die Beobachtung für GFP-WRKY21(RR) könnte auf eine IQD1-unabhängige Verschiebung der Lokalisation hindeuten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Phänomen jedoch nicht weiterführend untersucht werden. Die anderen WRKY21-Varianten zeigten ähnliche Lokalisationsmuster wie WT-WRKY21. GFP-WRKY21(AR) wies jedoch ein schwaches Signal auf. Die Lokalisation von GFP-WRKY21(A) glich dem WT am stärksten. GFP-WRKY21(RRA) wies mehrere größere Bereiche mit intensiverer Fluoreszenz auf, wie bereits in vorherigen Experimenten beobachtet (Abb. 32). Dabei handelt es sich möglicherweise um Aggregate der Fluoreszenz-markierten Proteine, welche sich aufgrund der hohen Expressionsstärke und der daraus folgenden erhöhten Proteinmenge in der Zelle bilden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die verschiedenen Mutationen bei WRKY21 die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors nicht prinzipiell beeinflussen.

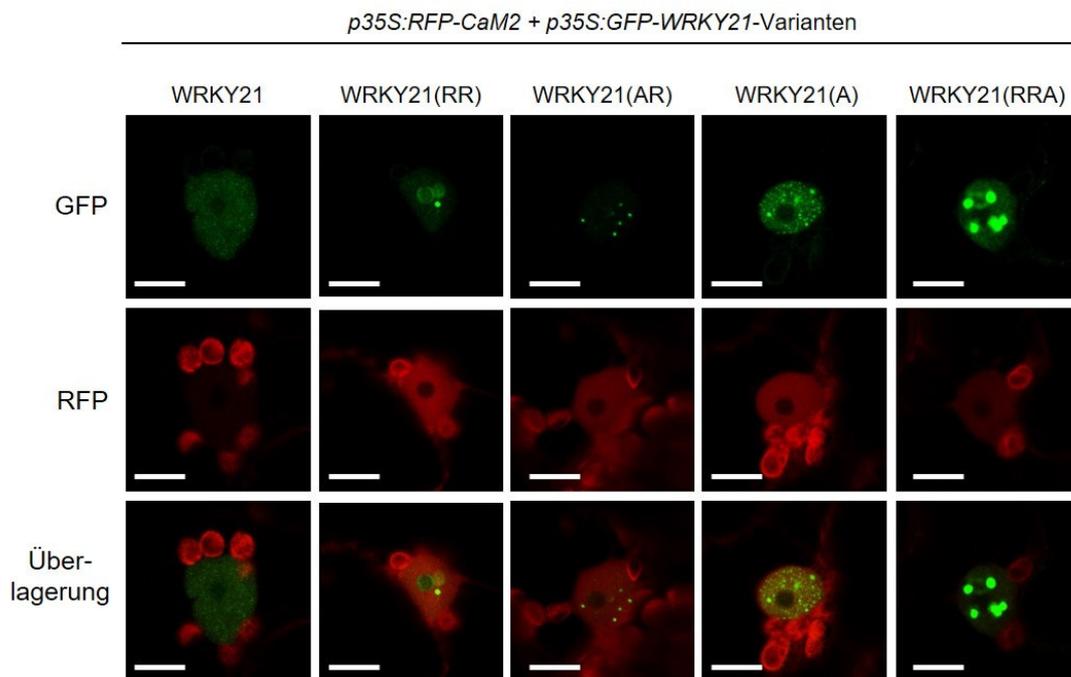


Abb. 39: Subzelluläre Lokalisation von GFP-WRKY21-Varianten und RFP-CaM im Zellkern in *N. bentamiana*

Fluoreszenzsignal von GFP-WRKY21 (GFP-Kanal) und RFP-CaM2 (RFP-Kanal) im Nukleus. Das Autofluoreszenzsignal in den Chloroplasten im RFP Signal ist unspezifisch und RFP-CaM2 unabhängig. In der untersten Reihe ist die Überlagerung beider Kanäle dargestellt. Maßstab = 10 µm

2.14 Interaktion von WRKY21-Varianten mit CaM2 *in planta*

Mithilfe von BiFC-Analysen wurde untersucht, ob die CaM-Bindung der potenziellen CaMBD-Deletionsmutanten durch die Mutationen *in planta* beeinträchtigt wurde. Dafür wurden *p35S:cYFP-WRKY21*, *p35S:cYFP-WRKY21(AR)*, *p35S:cYFP-WRKY21(A)* und *p35S:cYFP-WRKY21(RRA)* mit *p35S:nYFP-CaM2* transient in *N. benthamiana* exprimiert (Abb. 40). Für *p35S:cYFP-WRKY21(RR)* konnten keine positiven *A. tumefaciens* Zellen isoliert werden. Das YFP-Signal im Zellkern der Epidermiszellen mit dem WT-WRKY21 und CaM2 zeigte die Interaktion zwischen den beiden Konstrukten an. Der Bereich der Interaktion ist der gesamte Zellkern, den Nukleolus ausgenommen. Damit ist er deckungsgleich mit der Lokalisation der beiden Proteine aus den vorangegangenen Experimenten (Abb. 32). WRKY21(AR) zeigte ein schwaches Signal, welches aber ebenfalls im Zellkern mit einem vergleichbaren Muster zum WT auftrat. Bei WRKY21(A) war dagegen kein sichtbares Signal in der Zelle detektierbar. Diese Beobachtung spricht für eine Beeinträchtigung der CaM-Bindung. Dies würde die Vorhersage der *in silico* Daten für WRKY21(A) bestätigen, während danach für WRKY21(AR) ein schwächerer Effekt zu erwarten war. WRKY21(RRA) wies ein starkes YFP-Signal im Zellkern auf. Darüber hinaus zeigte sich eine veränderte Lokalisation im Zellkern, da ebenfalls ein YFP-Signal im Bereich des Nukleolus beobachtet wurde. Das spricht dafür, dass der Austausch der AS zu keiner Veränderung der CaM-Bindung führt, aber möglicherweise einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation hat.

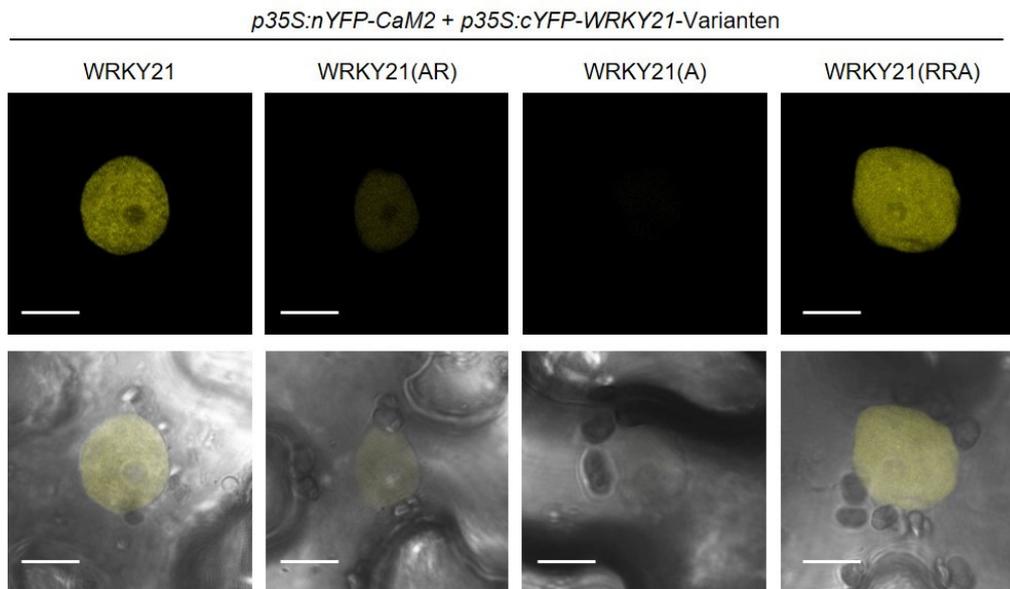


Abb. 40: CaM2-WRKY21-Interaktionsstudie in *N. benthamiana* via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Die obere Reihe zeigt für jede Kombination das YFP-Signal im Zellkern. Die untere Reihe zeigt eine Überlagerung des YFP-Signals mit einer Hellfeldaufnahme. nYFP = N-terminaler YFP-Teil, cYFP = C-terminaler YFP-Teil. Maßstab = 10 µm

2.15 Generierung von Multigenvektoren für *pCYP83B1* Transaktivierungsexperimente mit *WRKY21*-Varianten, *KLCR2*, *CaM2* und *IQD1*

Nach den Hinweisen auf veränderte CaM-Bindung der *WRKY21*-Varianten in den BiFC-Experimenten war es mit diesen Konstrukten möglich, die *WRKY21*-Aktivität in Abhängigkeit der CaM-Bindung zu untersuchen. Da die Transaktivierungsexperimente den Einfluss von *WRKY21* auf *pCYP83B1* zeigten, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau entworfen, um zusätzlich die *WRKY21*-Varianten und den Einfluss von *IQD1* und *CaM2* auf die Funktion des potenziellen Komplexes in der Regulierung der Genexpression zu testen. Die transiente Koexpression mehrerer Gene von unabhängigen Vektoren in *N. benthamiana* birgt allerdings einen Nachteil. Da während der Transformation der *Agrobacterium*-vermittelte Einbau der Gensequenzen ins Pflanzengenom ungerichtet stattfindet, ist es möglich, dass in unterschiedlichen Zellen einzelne der infiltrierten Gene unterschiedlich stark oder gar nicht exprimiert werden. Dies könnte in der Folge zu uneindeutigen Beobachtungen führen. Um sicherzustellen, dass alle gewünschten Sequenzen in den Zellen exprimiert werden können, wurden via *Golden-Gate*-Klonierung Vektoren generiert, die die verwendeten Gensequenzen in unterschiedlicher Kombination enthalten (Abb. 41). Beim *Golden-Gate*-Klonierungssystem stehen mehrere Vektoren für die unterschiedlichen hierarchischen Level der Vektorgenerierung zur Verfügung (Weber *et al.*, 2011). Aus den Vektoren können mithilfe der Restriktionsenzyme *BsaI*- oder *BpiI*-Module mit spezifischen Nukleotidüberhängen freigesetzt werden. In einer Restriktions-Ligations-Reaktion mit einer T4-Ligase und dem erforderlichen Restriktionsenzym können so mehrere Module mit passenden Nukleotidüberhängen in einem Vektor des nächsthöheren Levels in fester Reihenfolge und Orientierung kombiniert werden (Engler *et al.*, 2008). Um auf diese Weise Multigenvektoren zu generieren, wurden in dieser Studie Vektoren für Level -1, Level 0; Level 1 und Level 2 verwendet (Tab. 13). Die Vektoren der Module für den verwendeten Promotor, Terminator, die N-terminalen Tags und Leersequenzen (*dummys*) sowie die benötigten Leervektoren standen bereits im Vorfeld zu Verfügung. Um die gewünschten Konstrukte generieren zu können, mussten die kodierenden Sequenzen von *WRKY21*, *KLCR2*, *IQD1* und *CaM2* in das passende Level 0-Modul mobilisiert werden. Aufgrund der erforderlichen Restriktions-Ligations-Reaktionen für die Vektorgenerierung können nur Sequenzen ohne interne *BsaI*- oder *BpiI*-Schnittstelle für ein Modul verwendet werden. *WRKY21* und *CaM2* enthielten keine der Erkennungssequenzen und wurden nach Amplifikation mit entsprechenden Oligonukleotiden über eine Restriktions-Ligations-Reaktion direkt in den Level 0-Vektor für kodierende Sequenzen mobilisiert. *IQD1* und *KLCR2* enthielten dagegen je eine *BsaI*-Schnittstelle. Um die *BsaI*-Erkennungsstelle in *IQD1* zu verändern, wurden die Teile oberhalb und unterhalb der Schnittstelle zunächst in verschiedene Level-1-Vektoren mobilisiert. Dabei wurde die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide so modifiziert, dass die Restriktionsstelle entfernt wurde ohne die AS-Sequenz zu verändern. Anschließend konnten *IQD1_A* und *IQD1_B* in einem Level 0-Modul zusammengefügt und nun für die *Golden-Gate*-Klonierung verwendet werden. Die *BsaI*-Erkennungsstelle in *KLCR2* lag aufwärts des Stopkodons und konnte durch SDM über den Oligonukleotid für die Amplifikation entfernt werden. Da jedoch die Effizienz der Restriktions-Ligations-Reaktion mit zunehmender Länge der Gensequenz abnimmt, wurden für *KLCR2* ebenfalls zunächst eine 986 bp (*KLCR2_A*) bzw. 1006 bp (*KLCR2_B*) lange Sequenz in Level -1-Vektoren mobilisiert. Die putative Promotorsequenz von *CYP83B1* weist zwei *BpiI*-Erkennungsstellen auf. Da allerdings unklar ist, wie sich ein Nukleotidaustausch auf die Promotoraktivität auswirkt, wurde das Promotorkonstrukt nicht für die Vektorgenerierung verwendet. Die generierten Level 0-Module der kodierenden Sequenz wurden mit Modulen für einen 35S-Promotor, den entsprechenden Terminator und unterschiedlichen N-terminalen Tags in Level 1-Vektoren zusammengefügt (Abb. 41). Die GFP-, Myc-, FLAG- und HA-Tags ermöglichen den Nachweis

der einzelnen Proteine nach transienter Expression in der Pflanze. Bei der Kombination der Level 1-Module in einem Level 2-Vektor bestimmen die spezifischen Nukleotidüberhänge die Orientierung und Reihenfolge der Konstrukte. Mithilfe von passenden Modulen mit Blindsequenzen wurden über die Restriktion-Ligations-Reaktion verschiedene Kombinationen der WRKY21-Varianten mit KLCR2, CaM2 und IQD1 generiert (Abb. 41). Bei ersten Versuchen der Koinfiltration von *pCYP83B1:GUS* und den generierten Multigenvektoren wurde allerdings keine 4-MUG-Fluoreszenz in Blattextrakten detektiert. Möglicherweise ist die Transformationseffizienz der Multigenvektoren aufgrund ihrer Größe stark verringert. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Versuchsbedingungen weiter zu modifizieren. Jedoch stehen die Vektoren für weitere Experimente zur Verfügung. So ist es möglich, die Rolle der Proteine in dem Komplex bei der Genexpression zu untersuchen. Ausserdem können in Zukunft weitere potenzielle Regulatoren durch das *Golden-Gate*-Klonierungssystem auf Multigenvektoren kombiniert werden.

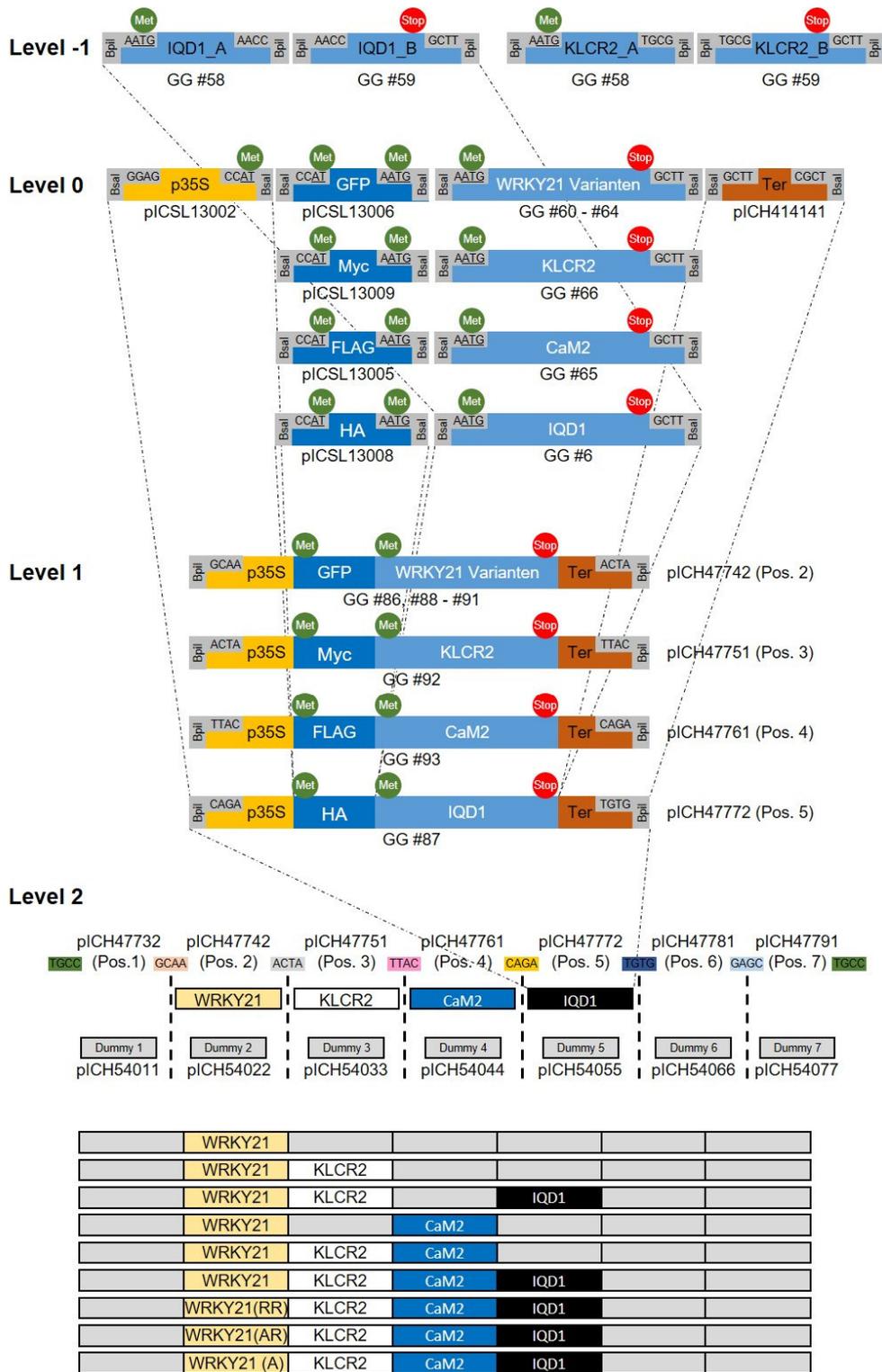


Abb. 41: Schema für die Generierung von Multigenvektoren durch das Golden-Gate-Klonierungssystem

Dargestellt sind die verwendeten Module für Level -1, Level 0, Level 1 und Level 2. Das jeweils verwendete Restriktionsenzym und die spezifischen Nukleotidüberhänge sind in den grauen Kästen dargestellt. Die Bezeichnung für die Ursprungsvektoren, befindet sich unter den Modulen. Die grünen und roten Kreise zeigen einen Transkriptionsstart bzw. ein Stopkodon an. Die durchbrochenen Linien zeigen den Weg der Generierung des Level 1-Moduls für *IQD1*. Bei Level 2 sind alle zur Verfügung stehenden Level 1-Module an ihrer jeweiligen Position vereinfacht dargestellt. Unten sind alle generierten Level 2-Multigenvektoren zusammengestellt.

3 Diskussion

3.1 Charakterisierung von *gcc7* und *IQD1*-Missexpressionslinien

In einem Screen nach neuen Regulatoren für die GSL-Biosynthese in *A. thaliana* wurde unter anderen die Mutantenlinie *gcc7* mit einem erhöhten GSL-Gehalt isoliert (Levy *et al.*, 2005). Durch eine *activation tagged* T-DNA-Insertion ist die Transkriptmenge von *IQD1* in *gcc7* erhöht. Bei der Charakterisierung der *gcc7*-Mutante wurde ein positiver Einfluss der *IQD1*-Überexpression auf den GSL-Gehalt und die Resistenz gegenüber Fraßfeinden beobachtet. Die im Rahmen der vorliegenden Studie etablierten unabhängigen Rekapitulationslinien zeigten höhere *IQD1*-Transkriptmengen verglichen mit *gcc7* (Abb. 20). Die höchsten Werte, welche für Linien mit einem GFP-Fusionskonstrukt beobachtet wurden, sind wahrscheinlich auf die Selektionsmethode zurückzuführen. Während die *p35S:IQD1*-Linien lediglich auf die Anwesenheit des Konstrukts getestet wurden, konnten unter den GFP-Linien zusätzlich noch die Mutanten mit der intensivsten Fluoreszenz selektiert werden. Zusammen mit den Transkriptionsanalysen legen diese Beobachtungen nahe, dass eine höhere *IQD1*-Expression auch zu einer höheren Proteinmenge führt. Aufgrund der T-DNA-Insertion in *gcc7* im *RH57*-Genlokus aufwärts von *IQD1* wird kein vollständiges mRNA-Transkript der Helikase gebildet und so ist es unmöglich beobachtete Effekte eindeutig auf den Verlust von *RH57* oder der *IQD1*-Überexpression zurückzuführen. Die etablierten Rekapitulationslinien ermöglichen eine dosisabhängige Analyse von *IQD1* und die Untersuchung des Einflusses von *IQD1*, unabhängig von dem *RH57-knock out* in *gcc7* (Abb. 24). Bei der Generierung der Rekapitulationslinien wurde das *IQD1*-Konstrukt ungerichtet an einem zufälligen Ort im Genom inseriert. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass diese Insertion ebenfalls in der Nähe von *RH57* stattfindet. Da es sich um unabhängige Linien handelt, ist außerdem davon auszugehen, dass sich die Konstrukte der verschiedenen Linien an unterschiedlichen Positionen im Genom befinden. So kann ein Effekt einer sekundären Mutation (*second site mutation*) nahezu ausgeschlossen werden.

Bei der ersten Charakterisierung wurde für *gcc7*-Mutanten ein verringertes Sprosswachstum beschrieben (Levy *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde ein verringertes Wurzelwachstum bei Keimlingen beobachtet. Dabei fiel auf, dass dieser Phänotyp bei *gcc7*- und *rh57*-Mutanten, nicht aber bei *IQD1*-Überexpressionslinien zu beobachten war. Dies lässt den Schluss zu, dass nicht die erhöhte *IQD1*-Transkriptmenge sondern die nichtfunktionelle Helikase in *gcc7* die Ursache für das veränderte Wachstums ist. Diese Hypothese wird von einer Studie untermauert, welche eine Funktion von *RH57* in der Glukose-vermittelten ABA-Akkumulation in Keimlingen demonstrierte (Hsu *et al.*, 2014). *rh57*-Mutanten zeigten ein verringertes Wachstum auf Medium mit einer Glukosekonzentration von über 3%. Hohe Glukosekonzentrationen führen zu einer Akkumulation des Phytohormons ABA, was eine Inhibierung der Keimung und des Keimlingwachstums zur Folge hat (Gibson, 2004). *RH57* wirkt über eine negative Rückkopplung dieser Inhibierung entgegen. Der Verlust von *RH57* macht die Mutanten hypersensitiv gegenüber Glukose und ABA. Möglicherweise wurde die in dieser Studie beobachtete Inhibierung des Wurzelwachstums von *gcc7*- und *rh57*-Mutanten ebenfalls durch die Anzucht auf zuckerhaltigem ATS-Medium hervorgerufen und ist unabhängig von der *IQD1*-Überexpression.

Ein anderer Effekt auf den Wurzelphänotyp wurde bei den Mutanten mit N-terminalen GFP-fusionierten *IQD1*-Konstrukten beobachtet. Diese zeigten bei Anzucht auf vertikal gelagerten ATS-Platten ein schräges Wurzelwachstum (Abb. 25). Das deutlich veränderte Wurzelwachstum ist wahrscheinlich eine Folge einer Beeinträchtigung der Organisation des Zytoskeletts, welches viele Wachstumsprozesse steuert (Oliva & Dunand, 2007). Bei dem Wachstum auf der Oberfläche des ATS-Mediums könnte auch eine veränderte Reaktion auf

Berührung in der Wurzelspitze, welche über die Ca^{2+} -Signalkette koordiniert wird, den Wurzelphänotyp beeinflussen (Massa *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde der gleiche Phänotyp bereits bei *knock out*-Mutanten des IQD1-Interaktors KLCR2 beschrieben (Plötner, 2015). Darüber hinaus wiesen auch *iqd2*-Mutanten beim Wachstum auf Medium mit erhöhter Agarosekonzentration ein schräges Wurzelwachstum auf. Diese Beobachtung könnte eine gemeinsame Zytoskelett-assoziierte Rolle von KLCR2 mit IQD2 oder IQD1 bei der Koordination des Wurzelwachstums nahelegen.

Die Bedeutung von IQD1 für diesen Prozess ist besonders spekulativ, da das Wurzelwachstum spezifisch bei den N-terminal fusionierten Mutantenlinien verändert war. Dies könnte bedeuten, dass die GFP-Fusion die Interaktion zwischen IQD1 und MT beeinflusst. Ein Hinweis darauf ist der in Abb. 21 beobachtete Unterschied in der MT-Lokalisation von N- bzw. C-terminalen GFP-fusionierten IQD1-Konstrukten. Da verlässliche Strukturanalysen für IQD-Proteine fehlen, ist der Effekt der unterschiedlichen Fusionen auf die Proteinstruktur und die Funktionalität schwer abzuschätzen. Zytologische Analysen in *N. benthamiana* und Interaktionsstudien mit IQD1-Fragmenten zeigten, dass der C-terminale Bereich des Proteins die MT-Bindung vermittelt (Pflug, 2019). Inwiefern die Lage oder Exposition dieses Bereiches durch die GFP-Fusion verändert wird, ist nicht bekannt. Eine Manipulation des Zytoskeletts über die Bindung an MT würde eine Funktion von IQD1 im Pflanzenwachstum und der Entwicklung nahelegen. Die Bedeutung für die GSL-Biosynthese ist dagegen nicht bekannt.

3.2 Einfluss von *IQD1*-Missexpression auf Glukosionalchemotyp und Pflanzenabwehr

Trotz der teilweise stark erhöhten *IQD1*-Transkriptmenge zeigten die Rekapitulationslinien im Gegensatz zu der vorhergehenden Studie (Levy *et al.*, 2005) keine Veränderungen des GSL-Gehaltes verglichen mit dem WT. Das gilt für aliphatische sowie indolische GSL (Abb. 26). Die *gcc*-Mutantenlinien wurden im ursprünglichen Screen über den 4MSOB-Gehalt identifiziert. In *A. thaliana* weist 4MSOB den höchsten Gehalt in den Pflanzen auf und hat so den größten Einfluss auf den Gesamtgehalt (Brown *et al.*, 2003). Jedoch unterschieden sich die Messwerte der unterschiedlichen Linien auch für 4MSOB nicht. Mit den in dieser Studie generierten Linien war der für *gcc7* beschriebene GSL-Chemotyp nicht reproduzierbar.

Standardmäßig wurden Keimlinge in dieser Studie auf ATS-Medium angezogen, während bei Levy *et al.* (2005) MS-Medium benutzt wurde. Allerdings zeigte ein erneuter Versuch mit MS-Medium vergleichbare Ergebnisse zu den auf ATS-Medium gewachsenen Pflanzen. Der spezialisierte Stoffwechsel der Pflanze wird von unterschiedlichen Umweltfaktoren reguliert. Welche Einflussfaktoren möglicherweise zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben können, war nicht zu ermitteln. Die Hinweise auf eine Rolle von IQD1 im GSL-Haushalt konnte auf diesem Weg in der Arbeit nicht erhärtet werden.

Eine Rolle von IQD1 in der Pflanzenabwehr ist damit allerdings nicht auszuschließen. Die erhöhte Resistenz von *gcc7*-Mutanten gegenüber Fraßfeinden muss nicht zwangsläufig auf einen erhöhten GSL-Gehalt zurückzuführen sein. So wurde ebenfalls festgestellt, dass die Expression von *IQD1* bei Verwundung und JA-Behandlung induziert wurde (Levy *et al.*, 2005). *IQD1*-Transkriptanalysen in Col-0 zeigten eine nicht signifikant erhöhte Expression nach Verwundung oder Behandlung mit MeJA im Spross von zwei Wochen alten Keimlingen (Abb. 29). Um eine tendenzielle Erhöhung der *IQD1*-Transkriptmenge zu induzieren, war bereits das Sprühen von Wasser ausreichend. Das lässt vermuten, dass die *IQD1*-Expression durch exogene Einflüsse stimuliert werden könnte. Möglicherweise fällt der Effekt bei den Transkriptmengen jedoch gering aus, da die gesamten Sprosse verwendet wurden, während die *IQD1*-Expression nur lokal induziert ist. Dafür sprechen Beobachtungen in älteren

Pflanzen. Nach Verwundung wurde in *pIQD1:GUS*-Reporterlinien eine Induktion der *IQD1*-Promotoraktivität vor allem im Bereich des Leitgewebes und der Blattmittelrippe festgestellt (Abb. 30, Abb. A 8). Dieser für die Pflanze kritische Bereich der Blätter wird vor Fraßfeinden besonders geschützt und auch GSL werden spezifisch in der Nähe des Leitgewebes synthetisiert (Nintemann *et al.*, 2018). Da in Reporterlinien die Position des GUS-Konstrukts im Pflanzengenom die Responsivität und damit die Intensität der GUS-Färbung beeinflussen kann, ist es schwer den Effekt auf die Expression zu quantifizieren. Allerdings kann man gewebespezifische Veränderungen der Expression beobachten. So könnten die Ergebnisse in dieser Arbeit dafür sprechen, dass durch Verwundung eine lokal begrenzte Induktion von *IQD1* im Bereich der Leitgewebe stattfindet.

Obwohl der GSL-Chemotyp von *gcc7* in dieser Studie also nicht bestätigt werden konnte, gibt es dennoch Hinweise, dass *IQD1* für die Verwundungsantwort und damit auch bei der Abwehr von Fraßfeinden eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise hat *IQD1* eine sehr lokale regulatorische Funktion in spezifischen Zellen. Um diese Theorie genauer zu untersuchen, muss die Rolle von *IQD1* im Kern und der Einfluss auf die Genexpression genauer zu betrachtet werden.

3.3 Die Rolle von *IQD1* im Zellkern und im Komplex mit *KLCR2* und *WRKY21*

Für erste *IQD*-Proteine wurden in der Vergangenheit Funktionen bei der Koordination von Wachstum und Entwicklung in Verbindung mit der MT-assoziierten Lokalisation beschrieben (Bürstenbinder *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2018; Mitra *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2011; Dou *et al.*, 2018). Ihre Rolle im Zellkern blieb dabei allerdings weitestgehend unbekannt. Die Kernlokalisation von *IQD1* und der Einfluss auf die Pflanzenabwehr könnten auf eine regulatorische Funktion bei der Genexpression hinweisen. Dabei ist auch eine Verbindung zu Ca^{2+} -Signalketten denkbar, wie sie bereits für andere Proteine beschrieben wurde. So agiert *CaM7* im Zellkern direkt als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von licht-induzierten Genen in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Signalen (Kushwaha *et al.*, 2008; Kudla *et al.*, 2010). Auch für *CAMTA*-Transkriptionsfaktoren, welche ebenfalls *IQ*-Motive enthalten, wurde eine Funktion in der Ca^{2+} -abhängigen Regulation der Genexpression vermutet (Bouché *et al.*, 2002; Abel *et al.*, 2005). Obwohl keine bekannten DNA- oder RNA-Bindemotive in *IQD*-Proteinen gefunden wurden, konnte für *IQD1* *in vitro* die Bindung von einsträngiger DNA beobachtet werden (Abel, 2005; Bürstenbinder *et al.*, 2013). Weiterhin weisen *IQD* mit ihrem basischen isoelektrischen Punkt und hoher Threonin- und Serinfrequenz Eigenschaften von *Splicing*-Faktoren auf (Chaudhary *et al.*, 1991). Direkte Hinweise auf eine Kontrolle der Genexpression als Transkriptionsfaktor oder eine Rolle bei posttranslationalen Modifikationen für *IQD1* fehlen jedoch bisher. Möglicherweise hat *IQD1* über andere Proteine einen indirekten Einfluss auf Prozesse im Zellkern. In der Vergangenheit wurde *KLCR1* als direkter Interaktionspartner von *IQD1* identifiziert und demonstriert, dass *IQD1* *KLCR1* aus dem Zytosol an MT rekrutiert (Bürstenbinder *et al.*, 2013). In der vorliegenden Studie konnte zusätzlich die Interaktion von *KLCR2* mit *IQD1* in Hefe gezeigt werden. Die veränderte *KLCR2*-Lokalisation sowohl im Kern als auch im Zytosol bzw. an den MT in Abhängigkeit von *IQD1* weist auf einen möglichen regulatorischen Einfluss von *IQD1* auf *KLCR2* hin (Abb. 32). Darüber hinaus war *KLCR2* ein interessanter Kandidat für die Analysen dieser Arbeit, da es als Ziel von Effektoren unterschiedlicher Pflanzenpathogene identifiziert wurde, was eine zusätzliche Funktion von *KLCR2* in der Pflanzenabwehr nahelegt (Mukhtar *et al.*, 2011). Ein Interaktionsnetzwerk aus der gleichen Studie zeigte unter anderem den Transkriptionsfaktor *WRKY21* als möglichen Bindungspartner für *KLCR2*. *WRKY21* gehört innerhalb der *WRKY*-

Familie zur Gruppe IId, deren Vertreter sich durch eine CaM-Bindedomäne auszeichnen (Park *et al.*, 2005). In Hefe-2-Hybrid-Experimenten konnte die Interaktion zwischen KLCR2 und WRKY21 bestätigt werden (Abb. 31). Im Unterschied zu IQD1, das mit allen KLCR-Proteinen eine Bindung eingehen konnte, interagierte WRKY21 lediglich mit KLCR2. Diese Beobachtung könnte für eine spezifische Funktion der KLCR2-WRKY21-Interaktion sprechen. Für mehrere Vertreter der WRKY-Familie wurden bereits Funktionen in der Pflanzenabwehr beschrieben. Somit ist WRKY21 ein vielversprechender Kandidat für eine Beteiligung an einem potenziellen Komplex mit KLCR2 und IQD1 im Zellkern, der einen regulatorischen Einfluss auf die Pflanzenabwehr ausübt. Die Kolokalisations- und Interaktionsstudien in dieser Arbeit zeigen, dass KLCR2, WRKY21 und IQD1 im Zellkern lokalisiert sind und somit einen Komplex bilden können (Abb. 32, Abb. 33). IQD1 könnte dabei einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität ausüben. In den Experimenten wurde eine Veränderung der Lokalisation von KLCR2 und WRKY21 in Abhängigkeit von IQD1 beobachtet. In Anwesenheit von IQD1 waren KLCR2 und WRKY21 im Nukleolus zu beobachten. Der Nukleolus spielt vor allem eine Rolle für die Synthese von Ribosomen und damit für die Translation. Allerdings wurde in der Vergangenheit das Spektrum der möglichen Nukleolusfunktionen erweitert und so gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung bei der Abwehr von Viren und anderer Pathogene (Kalinina *et al.*, 2018). Allerdings bedeutet für den Transkriptionsfaktor WRKY21, der im Zellkern meistens außerhalb des Nukleolus beobachtet wird, eine nukleolare Lokalisation wahrscheinlich eine Beeinträchtigung der Aktivität.

Um den Einfluss des WRKY21-KLCR2-IQD1-Komplexes auf die Genexpression zu analysieren wurde in Transaktivierungsversuchen die Promotoraktivität von *CYP83B1* untersucht. Die Promotorregion von *CYP83B1* wurde neben *ISOPROPYLMALAT ISOMERASE 1 (IPM1)* und einer *UDP-Glykosyltransferase (UGT)* mithilfe des Hefe-1-Hybridsystems als WRKY21-Ziel identifiziert (Li *et al.*, 2014). In einer vorherigen Studie wurde bereits eine Deregulation der *CYP83B1*-Expression in Abhängigkeit der *IQD1*-Transkriptmenge beobachtet (Levy *et al.*, 2005). Die Transaktivierungsstudien in dieser Arbeit bestätigten *pCYP83B1* als WRKY21-Ziel und zeigten, dass WRKY21 die Promotoraktivität aktivierte (Abb. 34, Abb. 35). Die Anwesenheit von KLCR2 im Zellkern verringerte dagegen die Promotoraktivität. Bei den Transaktivierungsstudien liegt aufgrund der Überexpression eine große Menge an KLCR2-Proteinen in der Zelle vor. Die veränderte Promotoraktivität kann in diesem Fall vermutlich auf einen unmittelbaren KLCR2-Effekt zurückgeführt werden, da keine anderen Faktoren die Expression des Arabidopsisgens *CYP83B1* in der Tabakzelle beeinflusst. Die geringe *pCYP83B1*-Aktivierung ohne WRKY21 ist möglicherweise auf *N. benthamiana* WRKY-Proteine zurückzuführen, welche die W-Boxen des Promotors erkennen und ihn so in geringem Maße induzieren können. Der Mechanismus für die Beeinträchtigung von WRKY21 durch KLCR2 ist nicht bekannt. Da allerdings eine direkte Interaktion der Proteine bereits gezeigt wurde, ist eine unmittelbare Beeinflussung wahrscheinlich (Abb. 33). Eine detailliertere Interaktionsstudie mit dem Ziel, die Bereiche der KLCR2-WRKY21-Interaktion innerhalb der Proteine zu identifizieren, zeigte, dass der N-Terminus von WRKY21 zur Interaktion mit KLCR2 diente (Abb. A 9). In diesem Bereich befindet sich auch die CaM-Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors. Es ist deshalb denkbar, dass die CaM-Bindung für die WRKY21-Aktivität eine Rolle spielt. In diesem Fall könnte KLCR2 regulatorisch auf den Transkriptionsfaktor einwirken, indem es durch die Interaktion im N-terminalen Bereich die CaM-Bindung an der gleichen Stelle verhindert.

Bei *CYP83B1*-Transkriptionsanalysen in *A. thaliana* Missexpressionslinien von *IQD1*, *WRKY21* und *KLCR2* wurden allerdings keine Unterschiede zum Col-0 WT beobachtet (Abb. 36). Dieses Ergebnis passt zu dem unveränderten GSL-Gehalt in *IQD1*-Überexpressionslinien (Abb. 26). Es ist denkbar, dass sich die Überexpression oder Auslöschung einzelner Gene nicht in einer signifikant veränderten Expression niederschlagen, weil die Regulierung für *CYP83B1* weitaus komplexer ist als die Kontrolle über den IQD1-KLCR2-WRKY21-Komplex. Bei Li *et al.* (2014) wurden 49 weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche an den

putativen *CYP83B1*-Promotor binden. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Expression eines Enzyms aus dem GSL-Biosyntheseweg von mehreren Faktoren beeinflusst wird, da unterschiedliche Einflüsse die Pflanze zur Akkumulation oder verringerter Biosynthese von spezialisierten Abwehrstoffen anregen können. Möglicherweise kommt die Wirkung des hier untersuchten Komplexes nur unter bestimmten Bedingungen zum Tragen und ist daher nur schwer isoliert in *A. thaliana* zu beobachten. Weiterhin ist zu beachten, dass in den untersuchten Missexpressionslinien ähnliche Gene die Funktion des beeinträchtigten Gens zumindest teilweise übernehmen könnten. Beispielsweise ist beim Verlust von *IQD1* der nahe Verwandte *IQD2* ebenfalls in der Lage eine Bindung mit *KLCR2* einzugehen (Pflug, 2019) und so eventuell die Funktionalität dieses System zu erhalten.

Ein grundlegender Aspekt bei der Charakterisierung eines *IQD1-KLCR2-WRKY21*-Komplexes ist die Frage, wo und wann in der Pflanze alle beteiligten Proteine zusammen auftreten. Die subzellulären Experimente in *N. benthamiana* zeigen, dass alle Proteine im Zellkern lokalisiert sind. Um die Expressionsdomänen der Gene in *A. thaliana* zu identifizieren, wurden sechs Wochen alte Pflanzen mit GUS-Reportern unter anderem für *IQD1* und *KLCR2* untersucht (Abb. A 10). Zusätzlich wurden Expressionsdaten für die untersuchten Gene aus öffentlich zugänglichen Datenbanken zusammen getragen (Abb. A 13, Abb. A 14). Diese Daten zeigen eine breite räumliche sowie zeitliche Verteilung der Expressionsdomänen der beteiligten Gene. So ist eine zeitgleiche Expression beispielsweise in Rosettenblättern von jüngeren Pflanzen wahrscheinlich. Zusätzlich ist in Betracht zu ziehen, dass unter bestimmten Umständen, wie z.B. bei Verwundung, einzelne Gene aktiviert werden können und so abhängig von den herrschenden äußeren Einflüssen die GSL-Biosynthese regulieren könnten. Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die GSL-Biosynthese über ein *IQD1-KLCR2-WRKY21*-Komplex in *A. thaliana* reguliert werden könnte. Am Beispiel von *CYP83B1* konnte gezeigt werden, dass *WRKY21* die Expression induziert, während *KLCR2* die *WRKY21*-Aktivität inhibiert (Abb. 42). Der genaue Mechanismus des gesamten Komplexes ist allerdings unbekannt. Ihn isoliert zu untersuchen, könnte eine Herausforderung sein, da der Prozess vermutlich von einer Vielzahl anderer Einflüsse überdeckt wird, welche auf den spezialisierten Stoffwechsel einwirken können.

3.4 Einfluss der Ca^{2+} -Signalkette auf GSL-Biosynthesegen *CYP83B1*

Ihre charakteristische IQ-Domäne mit mehreren CaM-Bindungsmotiven legt nahe, dass IQD-Proteine eine Rolle in der Ca^{2+} -Signalkette spielen könnten. Bisher konnte eine Verbindung nur in einer Studie gezeigt werden (Yang *et al.*, 2018). Allerdings ist anzunehmen, dass Ca^{2+} -Signale auch die Aktivität des Komplexes aus *WRKY21*, *KLCR2* und *IQD1* beeinflussen. Denn neben *IQD1* besitzt *WRKY21* ebenfalls eine CaMBD und auch für *KLCR2* wurde bereits gezeigt, dass es *in vitro* mit CaM interagiert (Park *et al.*, 2005; Pflug, 2019). Außerdem zeigen sie eine gemeinsame Kernlokalisierung sowie überlappende Expressionsdomänen (Abb. A 13, Abb. A 14).

Um den Einfluss von Ca^{2+} -Signalen überprüfen zu können, wurde in dieser Arbeit die CaMBD in *WRKY21* so verändert, dass das CaM-Bindungsvermögen signifikant beeinträchtigt wurde. Die Manipulation des Transkriptionsfaktors wurde favorisiert, da er die Genexpression direkt reguliert und so der deutlichste Effekt zu erwarten war. Auf Grundlage einer Studie zum CaM-Bindungsvermögen von *WRKY7* und öffentlich zugänglichen Datenbanken zur Voraussage des CaM-Bindungsvermögens wurden fünf *WRKY21*-Varianten bestimmt, welche als CaM-Bindung-Deletionsmutanten etabliert wurden (Abb. 37). Bei *in silico* Modellierung zeigten die Varianten keine Veränderungen der Proteinstruktur durch die Mutationen (Abb.

38). Diese Beobachtung ist wichtig und stellt sicher, dass die CaM-Bindung lediglich über die veränderten Wechselwirkungen der AS in der Helix beeinträchtigt wird.

Drei der getesteten WRKY21-Varianten waren wie WT-WRKY21 überlappend mit CaM2 im Zellkern außerhalb des Nukleolus lokalisiert (Abb. 39). Die nukleolare Lokalisation von GFP-WRKY21(RR) könnte einen Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors darstellen. Allerdings konnte nicht untersucht werden, wie der AS-Austausch die veränderte Lokalisation bewirken könnte. In dieser Studie wurde die Rekrutierung von WRKY21 sonst lediglich zusammen mit KLCR2 in Anwesenheit von IQD1 beobachtet (Abb. 33).

Obwohl für alle etablierten WRKY21-Varianten ein verringertes CaM-Bindungsvermögen vorausgesagt wurde, zeigten nur WRKY21(AR) und WRKY(A) in BiFC-Analysen deutlich Unterschiede im Vergleich zum WT (Abb. 40). Die *CaM target database* erkennt insgesamt 176 bekannte, vor allem klassische CaM-Bindemotive wie 1-8-14, 1-5-10 oder IQ-Motive (Yap *et al.*, 2000). WRKY-Proteine weisen jedoch keine dieser klassischen Motive auf (Park *et al.*, 2005). Der genaue Einfluss einzelner AS auf die CaM-Bindung vor allem bei untypischen CaMBD ist schwer exakt vorauszusagen. Daher können *in silico* Daten hilfreich sein, müssen aber unbedingt experimentell überprüft werden. Durch die Etablierung im Rahmen dieser Studie liegen nun mit WRKY21(A) und WRKY21(AR) zwei potenzielle CaMBD-Deletionsvarianten des Transkriptionsfaktors für eine weiterführende funktionelle Analyse vor.

Mithilfe des modularen *Golden-Gate*-Klonierungssystems wurden Multigenvektoren etabliert, welche IQD1, KLCR2, CaM sowie die WRKY21-Varianten in unterschiedlichen Kombinationen kodieren. Mit diesen Vektoren ist es in Zukunft möglich, in Transaktivierungsexperimenten einen Funktionsmechanismus des potenziellen Komplexes am Beispiel der Regulation des GSL-Biosynthesegens *CYP83B1* zu analysieren (Abb. 42). In weiterführenden Experimenten kann mit Hilfe von CaMBD-Deletionsmutanten von IQD1 oder KLCR2 in diesem System der Einfluss der CaM-Interaktion weiterführend untersucht werden. Allerdings stellt vor allem die Mutation von IQD mit mehreren überlappenden CaM-Bindungsmotiven eine Herausforderung dar. Jedoch besitzt das in dieser Studie etablierte System das Potenzial den Einfluss der Ca²⁺-Signalkette nicht nur für IQD1 sondern in angepasster Form auch für weitere IQD zu entschlüsseln.

Teil IV

1 Material

1.1 Medien

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	pH	Zusammensetzung		Organismus	Referenz
ATS (<i>Arabidopsis thaliana</i> solution)	5,6	5 mM	KNO ₃	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lincoln <i>et al.</i> , 1990
		2,5 mM	KPO ₄		
		2 mM	MgSO ₄		
		2 mM	Ca(NO ₃) ₂		
		50 µM	Fe-EDTA		
		70 µM	H ₃ BO ₃		
		14 µM	MnCl ₂		
		0,5 µM	CuSO ₄		
		1 µM	ZnSO ₄		
		0,2 µM	Na ₂ MoO ₄		
		10 µM	NaCl		
		0,05 µM	CoCl ₂		
		10 g/l	Saccharose		
5 g/l	Agarose / Agargel				
LB (<i>lysogeny broth</i>)	7,5	10 g/l	Bacto Trypton	<i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Elbing und Brent, 2001
		10 g/l	NaCl		
		5 g/l	Hefeextrakt		
SOC, Variante des SOB (super optimal broth)	7,0	2% (w/v)	Bacto Trypton	<i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Sambrook und Russel, 2001
		0,5% (w/v)	Hefeextrakt		
		0,05% (w/v)	NaCl		
		2,5 mM	KCl		
		10 mM	MgCl ₂		
		20 mM	Glucose		
YPAD (Hefeextrakt- Pepton- Dextrose mit Adenin)	8	20 g/l	DifcoPepton	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		10 g/l	Hefeextrakt		
		100 mg/l	Adenin-hemisulfat		
		17g/l	Agar (optional)		
		2% (w/v)	Glukose		
SD (synthetically defined media)		3,4 g/l	Hefe Stickstoff Basis (YNB)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hersteller: MP Biomedicals
		10 g/l	Ammoniumsulfat		
		40 g/l	Dextrose		
		17 g/l	Agar		

Für die Anzucht unter sterilen Wachstumsbedingungen wurden die Medien vor Gebrauch 20 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert. Für das Festmedium zum Kultivieren von Bakterien auf Platten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zu dem LB-Medium gegeben. Antibiotika oder Basta für die Selektion sowie Glukose im YPAD Medium wurden mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm) nach dem Autoklavieren und Abkühlung zu dem noch flüssigen Medium zugegeben.

SD-Medium wurde entsprechend des Herstellerprotokolls hergestellt. Für die Vorselektion der Hefekolonien wurde SD-Medium ohne Leucin (L) und Tryptophan (W) benutzt. Um die Stärke der Interaktion zu untersuchen, wurden die positiv vorselektierten Kolonien auf SD-Medium ohne L, W und Histidin (H) sowie Medium ohne L, W, H und Adenin (Ade) angezogen.

Tab. 2: Konzentration von Basta und Antibiotika in Selektionsmedien

Selektion mit	Konzentration	Organismus
Basta	25 µl/l	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Kanamycin	50 µg/ml	
Rifampicin	100 µg/ml	<i>Escherichia coli</i> ,
Spectinomycin	75 µg/ml	<i>Agrobacterium</i>
Carbencilin	50 µg/ml	<i>tumefaciens</i>
Gentamycin	25 µg/ml	

1.2 Mangel- und Überschussmedien

Um *A. thaliana* unter Ausschluss von Sulfat oder bei unterschiedlicher Sulfatkonzentration im Medium anzuziehen, wurde das oben beschriebene ATS Protokoll für Mangelmedien angepasst. Dafür wurden zunächst MgSO₄, CuSO₄, und ZnSO₄ durch MgCl₂, CuCl₂ bzw. ZnCl₂ ersetzt, um sulfatfreies Medium zu erhalten. Für die unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen wurden folgende Kombinationen aus magnesiumhaltigen Nährstofflösungen verwendet:

Tab. 3: Kombination von MgSO₄ und MgCl₂ in Medien für Sulfat-Dosis-Wirkungsbeziehung

	MgSO ₄	MgCl ₂
0,01 mM SO ₄ ²⁻	0,01 mM	1,6 mM
0,1 mM SO ₄ ²⁻	0,1 mM	1,5 mM
1,6 mM SO ₄ ²⁻	1,6 mM	
10 mM SO ₄ ²⁻	10 mM	

Für die Selenatstressexperimente wurden zu sulfatfreiem Medium 10 mM Na₂SeO₄ dazu gegeben.

1.3 Pflanzenlinien

Die Experimente wurden mit *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) durchgeführt, mit Ausnahme von *iqd1-2* (Ws-0) und GT6935 (Ler). Die verwendeten T-DNA-Insertionslinien *sultr1;1* (SALK_093256), *sultr1;3* (SALK_018910), *rh57-1* (SALK_008887), *rh57-2* (SALK_143440), *rh57-3* (SALK_042728), *wrky21-2* (SAIL_564_C07) und *k1cr2-2* (SALK_148296) wurden über *The Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen. Weitere verwendete Mutantenlinien waren im Labor vorhanden.

Tab. 4: Liste der verwendeten *A. thaliana* Mutantenlinien

Pflanzenlinien	Ökotyp	Beschreibung	Referenz
<i>gcc8</i>	Col-0	frühzeitiges Stopkodon - W81X	Grubb <i>et al.</i> , 2002
<i>sel1-15</i>	Col-0	AS-Austausch - D108N	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>sel1-16</i>	Col-0	AS-Austausch - G208D	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>pBGLU28:GUS</i>	Col-0	WT-Hintergrund von <i>sel1-15</i> und <i>sel1-16</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>iqd1-1D / gcc7</i>	Col-0	Insertion im 4. Exon von <i>RH57</i>	Levy <i>et al.</i> , 2005
<i>iqd1-2 / ABB8</i>	Ws-0	Insertion im 4. Exon von <i>IQD1</i>	Levy <i>et al.</i> , 2005
GT6935	Ler	Insertion mit GUS-Sequenz in <i>IQD1</i> Promotor	Levy <i>et al.</i> , 2005

1.4 Bakterienstämme

Tab. 5: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bakterien	Stamm	Genotyp / Resistenzen	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> λ -	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	Rifampicin, Gentamycin	
	GV3101pK	Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PJ69-4 α	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 trp1-901</i> <i>his3-200gal4</i> Δ <i>gal80</i> Δ GAL-ADE <i>2lys2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-LacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

1.5 Oligonukleotide

Tab. 6: Oligonukleotide für Amplifizierung

Überhänge für Vektorklonierungen sind rot markiert.

pENTR (CACC), pDONR (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC)

Bezeichnung	Genlokus	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
IQD108	<i>IQD1</i> (At3g09710)	CACCATGGTTAAAAAGCGAAATGGC	kodierende Sequenz
IQD109	<i>IQD1</i> (At3g09710)	TCACGGCGTTCTCTCTGC	kodierende Sequenz
IQD475	<i>CaM2</i> (At2g41110)	ATGGCGGATCAGCTCACA	kodierende Sequenz
IQD476	<i>CaM2</i> (At2g41110)	TCACTTAGCCATCATAACCTTCAC	kodierende Sequenz
IQD300	<i>KLCR1</i> (At4g10840)	CACCATGCCAGCAATGCCAGGT	kodierende Sequenz
IQD301	<i>KLCR1</i> (At4g10840)	TCAGAACTTGAAACCGAGGC	kodierende Sequenz
IQD326	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	CACCATGGACGTAGGAGAGAGCAATG	kodierende Sequenz
IQD327	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	TCAATAAACCGGTCTCTGTCC	kodierende Sequenz
IQD328	<i>KLCR3</i> (At1g27500)	CACCATGGAAGGAGGGTCTGTTAATG	kodierende Sequenz
IQD329	<i>KLCR3</i> (At1g27500)	TTAACGAAGAGCTGAAGAAGAAGTG	kodierende Sequenz
IQD1103	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	ATGGAGGAGATAGAAGGAACAAAC	kodierende Sequenz
IQD1104	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	TTAAGTTGTTATAGCTTGAGATGGC	kodierende Sequenz
IQD1194	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CTGAGCTCGATTTGGTTGAT	Promoterregion <i>pCYP83B1-L</i>
IQD1195	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CATTTTTTCTGTTTACTT	Promoterregion <i>pCYP83B1-L</i>
IQD1196	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CTCGATGATCATTCTTCTTC	Promoterregion <i>pCYP83B1-S</i>
IQD1197	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTTTTTCTGTTTACTTACT	Promoterregion <i>pCYP83B1-S</i>
IQD238	<i>IQD1</i> (At3g09710)	CACCCTCAAATTTTGTCTTTTATATTTCTT	Promoterregion
IQD239	<i>IQD1</i> (At3g09710)	CTCGTCGCCGTTCTATGTTT	Promoterregion
IQD174	<i>IQD2</i> (At5g03040)	CACCGTAAGCGTGTATTAACACACATACT	Promoterregion
IQD175	<i>IQD2</i> (At5g03040)	CTCTATGTAATCCTTCACAGAGAAGAA	Promoterregion
IQD176	<i>IQD3</i> (At3g52290)	CACCTCTCATTAGAAAATTAATACAAATGC	Promoterregion
IQD177	<i>IQD3</i> (At3g52290)	TTCTTAGTTTCTTCTTCTCAAATGATC	Promoterregion
IQD178	<i>IQD4</i> (At2g26410)	CACCAAATACAGAGAAATCCTGTGAAGTCA	Promoterregion
IQD179	<i>IQD4</i> (At2g26410)	TTTCTCCTGAAATTTTCAGACAAAT	Promoterregion
P015	<i>PDR4</i> (At1g23000)	CACCAAGCTAACCAATATAATGTAATCACG	Promoterregion

P016	<i>PDR4</i> (At1g23000)	GGCTTAAGAAGAAAGAATAAGAGAAAT	Promoterregion
IQD302	<i>KLCR1</i> (At4g10840)	CACCGGTTTCAGTGGAATTAAGAACAAG	Promoterregion
IQD303	<i>KLCR1</i> (At4g10840)	GAATGTGTCTCTCTGTGGGAAGT	Promoterregion
IQD856	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	CACCGATTACGAACGAATGTATTTTACG	Promoterregion
IQD857	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	GGCCTCCAAAACCTCACAACCTCAAT	Promoterregion
IQD1045	<i>KLCR3</i> (At1g27500)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CGAAAAATCGCTGACTTTGGG	Promoterregion
IQD1046	<i>KLCR3</i> (At1g27500)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTTCTTTATTTTCGAATAAACAGCTATC	Promoterregion
ST_023	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGTCGTC AAGAGCTCACCTGTGG	kodierende Sequenz
ST_024	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TCAGACCTCGTTGGAGAGTTTTGG	kodierende Sequenz
ST_025	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC GACCTCGTTGGAGAGTTTTGGACAGC	kodierende Sequenz ohne Stopkodon

Tab. 7: Oligonukleotide für Expressionsanalysen

Bezeichnung	Genlokus	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
A015	<i>PP2A</i> (At1g13320)	AGCCAACTAGGACGGATCTGGT	qRT-PCR Referenzgen
A016	<i>PP2A</i> (At1g13320)	CTATCCGAACCTTCTGCCTCATTA	qRT-PCR Referenzgen
IQD1088	<i>IQD1</i> (At3g09710)	GGGTTGGAGCTGGTTAGAGA	qRT-PCR
IQD1089	<i>IQD1</i> (At3g09710)	TGTCGTTGTTGGTGGTGTTT	qRT-PCR
IQD1480	<i>RH57</i> (At3g09720)	CTGCATACATCCACAGGATTGGAC	qRT-PCR
IQD1481	<i>RH57</i> (At3g09720)	AAGTTATCGCTTCTCCGCTCCTTC	qRT-PCR
IQD1871	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	GGCAACAAACCATGTCGTATCAAG	qRT-PCR
IQD1872	<i>CYP83B1</i> (At4g31500)	CGTTGACACTCTTCTTCTCTAACCG	qRT-PCR
IQD1640	<i>BGLU28</i> (At2g44460)	TCACCTTCTTCTCGCTCATGCC	qRT-PCR
IQD1641	<i>BGLU28</i> (At2g44460)	CCAATCTGACCGTCTTGAGTCTTG	qRT-PCR
IQD1875	<i>SDI1</i> (At5g48850)	TAAACCTACCAAAACCGCTCG	qRT-PCR
IQD1876	<i>SDI1</i> (At5g48850)	CCACCCCAAGTTACCCAGTAA	qRT-PCR

Tab. 8: Oligonukleotide für semi-qRT-PCR

Bezeichnung	Genlokus	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
IQD1493	<i>RH57</i> (At3g09720)	ATGGAGAAAAGCTCATATTTTC	semi qRT-PCR (Produkt aufwärts der <i>gcc7</i> -Insertion)
IQD1494	<i>RH57</i> (At3g09720)	CTCCATTTGACGATTAAGTTCC	semi qRT-PCR (Produkt aufwärts der <i>gcc7</i> -Insertion)
IQD379	<i>RH57</i> (At3g09720)	ACGGAGGATGATGATTCCAA	semi qRT-PCR (Produkt an Position der <i>gcc7</i> -Insertion)
IQD690	<i>RH57</i> (At3g09720)	TGTTACCGGAAACATGAATGC	semi qRT-PCR (Produkt an Position der <i>gcc7</i> -Insertion)
IQD692	<i>RH57</i> (At3g09720)	TCTCAAAGCTGTGGTGTGATG	semi qRT-PCR (Produkt abwärts der <i>gcc7</i> -Insertion)
IQD654	<i>RH57</i> (At3g09720)	ATAGCCACTGATGTGATTGCC	semi qRT-PCR (Produkt abwärts der <i>gcc7</i> -Insertion)
A005	<i>Actin2</i> (At3g18780)	CAAAGACCAGCTCTTCCATC	semi qRT-PCR Referenzgen
A006	<i>Actin2</i> (At3g18780)	CTGTGAACGATTCCTGGACCT	semi qRT-PCR Referenzgen

Tab. 9: Oligonukleotide für Genotypisierung

Bezeichnung	Genlokus	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
A004		ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	<i>left border</i> Oligonukleotid für SALK-Linien
A002		GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAG CCTTGCTTCC	<i>left border</i> Oligonukleotid für SAIL-Linien
A009		ATAATAACGCTGCCGACATCTACA TTT	<i>left border</i> Oligonukleotid für GABI-KAT-Linien
A011		CGTGTGCCAGGTGCCACGGAAT AGT	<i>left border</i> Oligonukleotid für Abb8
IQD379	<i>RH57</i> (At3g09720)	ACGGAGGATGATGATTCCAA	T-DNA-Insertion (<i>gcc7</i>)
IQD380	<i>RH57</i> (At3g09720)	CACGACCCTGGGATAAAGAA	T-DNA-Insertion (<i>gcc7</i>)
IQD715	<i>RH57</i> (At3g09720)	GGATTGATGTGATATCTAGATCCG	T-DNA-Insertion (<i>gcc7</i>) <i>border Primer</i>
IQD692	<i>RH57</i> (At3g09720)	TCTCAAAGCTGTGGTGTGATG	T-DNA-Insertion <i>rh57-1</i> (SALK_00887)
IQD693	<i>RH57</i> (At3g09720)	TCAGTACCGGTGGATTCAGAC	T-DNA-Insertion <i>rh57-1</i> (SALK_00887)
IQD690	<i>RH57</i> (At3g09720)	TGTTACCGGAAACATGAATGC	T-DNA-Insertion <i>rh57-2</i> (SALK_143440)
IQD691	<i>RH57</i> (At3g09720)	AAGAAACAATCCAGTTCACG	T-DNA-Insertion <i>rh57-2</i> (SALK_143440)
IQD653	<i>RH57</i> (At3g09720)	ACCGGTTTGATTAACCCAAC	T-DNA-Insertion <i>rh57-3</i> (SALK_42728)
IQD654	<i>RH57</i> (At3g09720)	ATAGCCACTGATGTGATTGCC	T-DNA-Insertion <i>rh57-3</i> (SALK_42728)
IQD240	<i>IQD1</i> (At3g09710)	CTGATGGAAGGATCGGTTGT	T-DNA-Insertion <i>iqd1-2</i> (ABB8)
IQD241	<i>IQD1</i> (At3g09710)	GAGCTCTTGGCCTCATCATC	T-DNA-Insertion <i>iqd1-2</i> (ABB8)
IQD1288	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	TCTGCATTTAGCAACACTTATGC	T-DNA-Insertion <i>wrky21-2</i> (SAIL_564_C07)
IQD1289	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	AAGGAGAGGTTTCGAGAAAACG	T-DNA-Insertion <i>wrky21-2</i> (SAIL_564_C07)
IQD375	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	GATTTGGAGTTGAGGCATTTG	T-DNA-Insertion <i>klocr2-2</i> (SALK_148296)
IQD376	<i>KLCR2</i> (At3g27960)	CCAAAGCAACAGAGGAATGAG	T-DNA-Insertion <i>klocr2-2</i> (SALK_148296)
A013		CGTCCTGTAGAAACCCCAAC	Detektion von GUS- Gensequenz
A014		CGGTTTTTCACCGAAGTTCA	Detektion von GUS- Gensequenz
A038		TGCTGCTGCCCGACAACCAC	Detektion von cYFP in pDest-VYCE
IQD551		AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	Detektion von GFP in pB7WGF2 (2430)
IQD552		ACGTAAACGGCCACAAGTTC	Detektion von GFP in pB7WGF2 (2615)
ST_003	<i>SULTR1;1</i> (At4g08620)	TATAGGTTTCGTTTTCGCGATC	T-DNA-Insertion <i>sultr1;1</i> (Salk_093256)
ST_004	<i>SULTR1;1</i> (At4g08620)	TTTGTGAGCTTGAATTTAAAACG	T-DNA-Insertion <i>sultr1;1</i> (Salk_093256)
ST_005	<i>SULTR1;3</i> (At1g22150)	ATTAGGGTTTGTGTTGGGGTC	T-DNA-Insertion <i>sultr1;3</i> (Salk_018910)
ST_006	<i>SULTR1;3</i> (At1g22150)	TTTTTGGCAAACAGGTTGAC	T-DNA-Insertion <i>sultr1;3</i> (Salk_018910)

Tab. 10: Oligonukleotide für CAPS-Genotypisierung

Bereiche mit Sequenzveränderung sind unterstrichen.

Bezeichnung	Genbereich	5' -> 3' Sequenz	Verwendung	Enzym	PCR Produkt nach Verdau
ST_011	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GTCTCCAATCCGTCTT CCCGGCCTTCGATAG	<i>gcc8</i>	EcoNI	WT: 192/191 bp + 26/27 bp
ST_013	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	TTCGCCAACTTAGCGT ATCC	<i>gcc8</i>		<i>gcc8</i> : 218 bp
ST_014	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	TCAAGATTCGCCAACT TAGCGTATCCGATAT	<i>sel1-15</i>	EcoRV	WT: 160 bp + 29 bp
ST_016	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CGTAACTACACTTTCA AGAAGTTCC	<i>sel1-15</i>		<i>sel1-15</i> : 189 bp
ST_017	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GCGATAGTGATGGCTG CGCCGCCCATGAAT	<i>sel1-16</i>	Hinfl	WT: 164/167 bp + 30/27 bp
ST_018	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CGAAGCAGCCCTTGG ATTCTTCAG	<i>sel1-16</i>		<i>sel1-16</i> : 194 bp

Tab. 11: Oligonukleotide für SDM

Bereiche mit Sequenzveränderung sind unterstrichen.

Bezeichnung	Genlokus	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
IQD1445	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	GCTGTGATTAGGCGCAAGAGAGTTGGGAGTT TGCGAAGCAGTAGTGTTGG	AS-Austausch F48R und L55R
IQD1446	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	CCAACACTACTGCTTCGCAAACCTCCCAACTCT CTTGCGCCTAATCACAGC	AS-Austausch F48R und L55R
IQD1861	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	GCTGTGATTAGGGCCAAGAGAGTTGGGAGTT TGCGAAGCAGTAGTGTTGG	AS-Austausch F48A und L55R
IQD1862	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	CCAACACTACTGCTTCGCAAACCTCCCAACTCT CTTGGCCCTAATCACAGC	AS-Austausch F48A und L55R
IQD1863	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	GCAGTAGTGTTGGTCATGCTAGGTTTGCAAGA GCTAAGAACTTCAGAGT	AS-Austausch R65A
IQD1864	<i>WRKY21</i> (At2g30590)	ACTCTGAAGTTTCTTAGCTCTTGCAAACCTAG CATGACCAACTACTGCTC	AS-Austausch R65A
ST_077	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CCGGTTTAACCATTGCAAGTCTCTGCATTCT CAGAATATTGGATACGCTAAGTTGGCG	AS-Austausch D108N
ST_078	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CGCCAACTTAGCGTATCCAATATTCTGAGGAA TGCAGAGACTTGCAATGGTTAAACCGG	AS-Austausch D108N
ST_079	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CGATTTCTTTCCACGCGGCTGTGGTTGACT TCATGGGCGGCGCAGCCATCACTATCGC	AS-Austausch G208D
ST_080	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GCGATAGTGATGGCTGCGCCGCCCATGAAGT CAACCACAGCCGCTGGGAAAGGAAATCG	AS-Austausch G208D
ST_019	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CGTAACTACACTTTCAAGAAGTTCCGAGGTAA TCTCATCTCCGGTTTAACCATTGCAAGTC	AS-Austausch D93N
ST_020	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GACTTGCAATGGTTAAACCGGAGATGAGATTA CCTCGGAACTTCTTGAAAGTGTTAGTTACG	AS-Austausch D93N
ST_021	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	GAAAGACTACCAAATCGACGGTAACAAACAGA TGGTAGCATTAGGTATGATGAACGTAG	AS-Austausch E372Q
ST_022	<i>SULTR1;2</i> (At1g7800)	CTACGTTTCATCATACCTAATGCTACCATCTGTT TGTTACCGTCGATTTGGTAGTCTTTC	AS-Austausch E372Q

Tab. 12: Oligonukleotide für Vektorsequenzierung

Bezeichnung	5' -> 3' Sequenz	Verwendung
SeqL-A	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	DONR207
SeqL-B	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	DONR207
M13 uni (-21)	TGTA AACGACGGCCAGT	Gateway Plasmide
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	Gateway Plasmide

1.6 Vektoren

Tab. 13: Liste der verwendeten Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Resistenzen in		Referenz
		Bakterien	Pflanzen	
pENTRdTOPO		Kan		Thermo Fisher
pDONR 221		Kan		Thermo Fisher
pDONR 207		Gent		Thermo Fisher
pBGWFS7	GW:eGFP~GUS	Spec	Basta	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WG2	p35S:GW	Spec	Basta	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WGY2	p35S:YFP~GW	Spec	Basta	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WGF2	p35S:eGFP~GW	Spec	Basta	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7FWG2	p35S:GW~eGFP	Spec	Basta	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pGWB454	p35S:GW~mRFP	Spec	Kan	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB455	p35S:mRFP~GW	Spec	Kan	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pDest-VYNE	p35S:nVenus~GW	Kan, Camp	Hyg	Gehl <i>et al.</i> , 2009
pDest-VYCE	p35S:cVenus~GW	Kan, Camp	Kan	Gehl <i>et al.</i> , 2009
pDest32	GAL4 DNA-Bindedomäne	Gent		Thermo Fisher
pDest22	GAL4 Aktivierungsdomäne	Amp		Thermo Fisher
Golden Gate Vektoren				
pAGM1311	Leervektor	Level -1	Kan	S. Marillonnet
pICH41308	Leervektor für kodierende Sequenz	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICSL13002	35S-Promotor	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICSL30006	N-terminaler GFP-tag	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICSL30009	N-terminaler Myc-tag	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICSL30005	N-terminaler FLAG-tag	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICSL30008	N-terminaler HA-tag	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICH41414	Terminator	Level 0	Spec	S. Marillonnet
pICH47742	Leervektor Pos 2 in Level 2	Level 1	Carb	S. Marillonnet
pICH47751	Leervektor Pos 3 in Level 2	Level 1	Carb	S. Marillonnet
pICH47761	Leervektor Pos 4 in Level 2	Level 1	Carb	S. Marillonnet
pICH47772	Leervektor Pos 5 in Level 2	Level 1	Carb	S. Marillonnet
pAGM8043	Leervektor ab Pos 2	Level 2	Spec	S. Marillonnet
pICH54022	Vektor mit Blindsequenz Pos 2	Level 2	Carb	S. Marillonnet
pICH54033	Vektor mit Blindsequenz Pos 3	Level 2	Carb	S. Marillonnet
pICH54044	Vektor mit Blindsequenz Pos 4	Level 2	Carb	S. Marillonnet
pICH54055	Vektor mit Blindsequenz Pos 5	Level 2	Carb	S. Marillonnet
pICH50914	Vektor mit Blindsequenz Pos 6 +7	Level 2	Carb	S. Marillonnet

1.7 Puffer und Lösungen

DNA-Extraktionspuffer	200 mM TRIS (pH 7,5) 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0,5% (w/v) SDS
<i>Magic Buffer</i>	50 mM TRIS (pH 7,5) 300 mM NaCl 300 mM Saccharose
<i>Orange G</i> DNA-Laufpuffer	663 mM Saccharose 7,7 mM Orange G
Hochsalzlösung	0,8 M Natriumacetat 1,2 M NaCl
10x PCR-Puffer	100 mM TRIS (pH 7,5) 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 1% (v/v) Triton® X-100
Phosphatpuffer (pH 7,2)	342 mM Na ₂ HPO ₄ 158 mM NaH ₂ PO ₄
Infiltrationsmedium	10 mM MES (pH 5,4) 10 mM MgCl ₂ 150 µl/ml Acetosyringon
GUS-Färbepuffer	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆
GUS-Färbelösung	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 25 mM EDTA 0,1% (v/v) Triton® X-100 2 mM X-Gluc
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 25 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS 0,1% (v/v) Triton® X-100 10 mM beta-mercaptoethanol

GUS-Assay Puffer	1 mM 4-methylumbelliferyl b-D-glucuronide (4-MUG) in GUS Extraktionspuffer
GUS-Stop Puffer	0,2 M Na ₂ CO ₃
10x TE-Puffer	0,1 M Tris 0,01 M EDTA
10x LiOAc-Puffer	65,99 g/l LiOAc
Transformationsmix (Hefe-2-Hybrid)	80% (v/v) PEG 4000 50% (w/v) 10% (v/v) 10x TE-Puffer 10% (v/v) 10x LiOAc-Puffer

1.8 Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® RNA Clean-up	Machery Nagel
DNase I	Thermo Fisher Scientific
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
AccuPrime™ Pfx DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Fast SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix	Thermo Fisher Scientific
T4-Ligase	Promega
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
FastDigest Puffer und Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
Bradford-Reagenz, 5X Konzentrat	Serva
DNA Stain G	Serva
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific

2 Methoden

2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

2.1.1 Sterilisierung der Samen

Zur Anzucht der Pflanzen auf ATS-Medium in Platten wurden die Samenoberflächen zunächst sterilisiert. Dazu wurden Samen zweimal zuerst mit 70%igem (v/v) Ethanol und dann mit Wasser gespült. Danach wurde 1%ige (v/v) Natriumhypochloritlösung zu den Samen gegeben und diese etwa 20 min geschüttelt. Anschließend wurden die Samen zweimal mit Wasser gewaschen.

Alternativ wurden Samen in geöffneten 2 ml Reaktionsgefäßen im Exsikkator für 45 min mit Chlorgas sterilisiert. Um das Chlorgas zu erzeugen, wurden 10 ml 37%ige (v/v) rauchende Salzsäure und 6 ml 12%ige (v/v) Natriumhypochloritlösung in einer Glasschale im Exsikkator gemischt. Nach 45 min wurde das Gas für 2 h abgesaugt. Zur vollständigen Verdunstung des Chlorgases wurden die Reaktionsgefäße mit den Samen für mindestens eine weitere Stunde unter der Sterilbank entgast.

2.1.2 Anzucht unter sterilen Bedingungen

Die sterile Anzucht von *A. thaliana* erfolgte auf quadratischen Platten von 12 x 12 cm. Für jede Platte wurden 50 ml autoklaviertes Medium verwendet. Um die sterilisierten Samen auf der Platte zu verteilen, wurden sie in sterile 0,1%ige (w/v) Agarose gebettet und mit einer Pipette auf der Platte verteilt. Anschließend wurden die Platten mit Leukopor verschlossen und zur Stratifikation 48 h bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Das Wachstum der Keimlinge erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) bei 21 °C.

2.1.3 Anzucht auf Erde

A. thaliana Pflanzen wurden auf Einheitserde „Classic Kokos“ (Weißtorf 45%, Ton 20%, Sodentorf 15% Kokosfaser 20%) angezogen. Die Samen wurden auf gut gewässerter Erde ausgesät und anschließend über Nacht bei 4 °C stratifiziert. Die Anzucht erfolgt unter Langtagbedingungen bei 18 – 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 bis 65%.

2.2 Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

Die Pflanzen wurden auf der Einheitserde „Classic Kokos“ bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 bis 75% im Gewächshaus angezogen. Die Temperatur betrug am Tag 23 – 25 °C und in der Nacht 19 – 24 °C.

2.3 Kultivierung von Bakterien

2.3.1 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C über Nacht in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 165 rpm geschüttelt.

2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Zellen von *A. tumefaciens* wurden bei 28 °C über zwei Tage in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt.

2.4 DNA-Isolierung

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzen wurden 2 bis 3 junge Blätter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 400 µl DNA-Extraktionspuffer (siehe 1.7) hinzugefügt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit einem Minipistill im Puffer zerkleinert und 5 min bei 13000 g zentrifugiert. 300 µl vom Überstand wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol vermischt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit 400 µl 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen und nach Abnahme des Ethanols für etwa 8 min getrocknet. Mit 30 bis 50 µl H₂O wurde die DNA anschließend gelöst.

Für die schnelle DNA-Isolierung bei großer Probenzahl wurde das Protokoll nach Dissmeyer & Schnittger (2011) angewendet. Dazu wurden 2 bis 3 sehr junge Blätter in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend 2 Edelstahlkugeln und 500 µl Extraktionspuffer / *Magic Buffer* (siehe 1.7) hinzugefügt. In einer Kugelmühle wurde das Pflanzenmaterial bei 25 Hz für 30 Sek zerkleinert. Der Überstand wurde direkt für die Analysen verwendet.

2.5 RNA Isolierung und cDNA Synthese

2.5.1 RNA Isolierung

Zur Klonierung von kodierenden Bereichen in der DNA und für quantitative Expressionsanalysen wurde RNA aus Pflanzen isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 50 – 100 mg Pflanzenmaterial in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 2 Edelstahlkugeln hinzugefügt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend fand das Zerkleinern des Gewebes in einer Kugelmühle bei 25 Hz für 1 min statt. Auf das gemörserte Material wurden 500 µl TRI Reagent gegeben und das Gemisch durch kurzes vortexen homogenisiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Reaktionsgefäße die Flüssigkeiten gemischt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 12000 g und 4 °C wurden 250 µl von der oberen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden jeweils 125 µl Isopropanol und Hochsalzlösung (siehe 1.7) gegeben und nach 10 min Inkubation für 10 min bei 1200 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des

Überstandes erfolgte das Waschen des Pellets mit 70%igen (v/v) Ethanol mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 7500 g und 4 °C. Danach wurde das Ethanol verworfen und das Pellet für 5 – 8 min unter dem Abzug getrocknet. Das Lösen der RNA erfolgte in 20 – 40 µl H₂O für 10 min bei 65 °C.

2.5.2 DNase-Verdau

Rückstände von genomischer DNA in isolierter RNA wurden durch einen DNaseI-Verdau (Thermo Fisher Scientific) beseitigt. Dazu wurde ein Ansatz von 20 oder 30 µl wie folgt angesetzt.

DNase-Verdau (Ansatz)			
	RNA	1 - 5 µg	
10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	2 µl	3 µl	
	DNaseI	2 µl	3 µl
	autoklaviertes H ₂ O	add. 20 µl	add. 30 µl

Der Verdau wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 2 bzw. 3 µl 50 mM EDTA und eine Inkubation bei 65 °C für 10 min. Zur Aufreinigung der RNA nach dem Verdau wurde das RNA Aufreinigungskit „NucleoSpin® RNA Clean-up“ von Machery Nagel entsprechend der Anleitung verwendet.

2.5.3 cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte über reverse Transkription (RT) mittels Oligo-(dT)-Nukleotiden. Die Menge der eingesetzten RNA war abhängig von der RNA-Konzentration nach der Aufreinigung, welche in der Regel zwischen 2 und 4 µg schwankte. Für jedes Experiment wurden die RNA-Mengen der einzelnen Proben so angepasst, dass jeweils die gleiche Menge RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Dafür wurden im ersten Schritt RNA und Oligonukleotide wie unten beschrieben zusammenpipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei 65 °C wurde der Ansatz für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden Reaktionspuffer RNase Inhibitor, dNTP und die Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 60 min. Anschließend wurde die Reaktion bei 70 °C für 15 min gestoppt.

Reverse Transkription (Ansatz)		
	RNA	1 - 5 µg
	dT-Oligonukleotide	1 µl
	H ₂ O	add. 12,5 µl
5x Reaktionspuffer		4 µl
Rnase Inhibitor (40 U/µl)		0,5 µl
je 40 mM dNTPs		2 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)		1 µl

2.6 Polymerase Kettenreaktionen

2.6.1 Standard-PCR

Zur Vervielfältigung oder zum Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte aus dem Pflanzengenom wurden PCR-Reaktionen entsprechend dem folgenden Protokoll durchgeführt.

PCR-Ansatz:			
10x PCR-Puffer		2 µl	
10 mM dNTP		1 µl	
10 mM Oligonukleotid 1		1 µl	
10 mM Oligonukleotid 2		1 µl	
DNA		2 µl	
5 U/ml DNA-Polymerase		1 µl	
ddH ₂ O	add.	20 µl	

PCR-Programm			
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 Sek	} 30-40x
Oligonukleotidhybridisierung	X °C	30 Sek	
Elongation	72 °C	X min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde die aus *Thermus aquaticus* stammende *Taq*-Polymerase verwendet. Die Hybridisierungstemperatur wurde etwa bei 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide angesetzt. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts angepasst, wobei eine Polymerisationsgeschwindigkeit von 1000 bp pro min angenommen wurde.

Als Ausgangsmaterial wurde in der Regel aufgereinigte DNA verwendet. Alternativ, um DNA-Abschnitte in Bakterienkolonien nachzuweisen, wurden diese direkt als PCR Ausgangsmaterial verwendet. Dazu wurden Teile einzelner Zellkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Selektions-Platte in den PCR Ansatz überführt

Für Klonierungen aus genomischer DNA oder cDNA wurde *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase von Thermo Fisher entsprechend der Anleitung verwendet.

2.6.2 Site directed mutagenesis (SDM)

Um einen gezielten Nukleotidaustausch in eine kodierende Sequenz einzufügen, wurde eine SDM mit der „AccuPrime™ Pfx-DNA-Polymerase“ (Thermo Fisher Scientific) an einem pDONOR-Vektor mit den jeweiligen Zielsequenzen vorgenommen. PCR-Ansatz und -Programm entsprachen folgendem Protokoll:

PCR-Ansatz:			
Pfx Reaction Mix	5,0	µl	
10 mM Oligonukleotid 1	1,5	µl	
10 mM Oligonukleotid 2	1,5	µl	
Vektor	1,0	µl	
Pfx DNA-Polymerase	0,7	µl	
ddH ₂ O	add. 50	µl	

PCR-Programm			
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 Sek	
Oligonukleotidhybridisierung	X °C	30 Sek	18x
Elongation	68 °C	X min	
	4 °C	∞	

Die Hybridisierungstemperatur wurde etwa 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide angesetzt und die Elongationszeit entsprechend der Länge des amplifizierten Abschnitts angepasst.

Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sich die Stelle bzw. Stellen des Nukleotidaustausch in der Mitte befinden. Um eine ausreichend starke Anlagerung zu erreichen, waren die Oligonukleotide 50 bp lang. Eine Übersicht der durchgeführten Austausche und verwendeten Primer finden sich in Tab. 11.

2.6.3 Quantitative real time (qRT) PCR

Analysen zur Expressionsstärke von Genen *in planta* wurden mittels qRT-PCR durchgeführt. Die spezifischen Oligonukleotidpaare (FWD + REV) wurden auf jeweils entweder 1,5 oder 2 mM verdünnt und vermischt. Die cDNA aus Absatz 2.5.3 wurde 1:10 verdünnt. Der 10 µl Ansatz wurde wie folgt pipettiert.

qRT-PCR-Ansatz:			
Fast Sybr Green Mastermix	5	µl	
Oligonukleotidmix (FWD+REV)	0,4	µl	
H ₂ O	3,6	µl	
cDNA (1:10)	1	µl	

Das komplette Programm für die qRT-PCR bestand aus der Vervielfältigung des Zielabschnitts und einer Schmelzkurve. Das Fluoreszenzsignal wurde während der Vervielfältigung nach jedem Zyklus und für die Schmelzkurve ständig bei der Erwärmung von 60 °C auf 95 °C gemessen. Anhand der Schmelzkurve wurde die Produktspezifität der Reaktion überprüft.

qRT-PCR Programm:			
	95°C	20 s	
PCR	95°C	1 s	} 40x
	63°C	20 s	
	95°C	1 s	
Schmelzkurve	60°C	20 s	
	60 - 95°C		+0,1 K/s

2.6.4 Etablierung qRT-PCR Oligonukleotide

Um geeignete und genspezifische Oligonukleotidsequenzen für die Expressionsanalysen zu erhalten, wurden mithilfe der Software *QuantPrime* (www.quantprime.de) oder dem *PrimerQuest Tool* von IDT zunächst verschiedene mögliche Oligonukleotidpaare ermittelt. Mithilfe des *OligoAnalyze* von IDT wurden diese Paare auf intramolekulare Strukturen und intermolekulare Dimerisierung überprüft, die die PCR-Effizienz beeinträchtigen können. Mit geeigneten Paaren wurde eine Effizienzkurve gemessen. Dazu wurden qRT-PCR-Reaktionen mit unterschiedlicher cDNA Verdünnungen (unverdünnt; 1:5; 1:10; 1:50; 1:100; 1:500) durchgeführt und der C_T -Wert bestimmt. Trägt man die logarithmierte cDNA Verdünnung gegen die C_T -Werte auf, kann mithilfe der Trendlinie die Effizienz nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Effizienz} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Anstieg}}\right)} - 1$$

Oligonukleotidpaare, die eine Effizienz zwischen 90 und 100% aufwiesen, wurden für die Expressionsanalysen benutzt.

2.7 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden sie in Agarosegelen mittels Gelelektrophorese separiert. Dabei wurden für DNA-Stücke > 200 bp 0,5%ige und für Fragmente < 200 bp 1%ige Gele benutzt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und kurz abgekühlt. Anschließend wurden etwa 0,5 µl DNA-Stain G (Serva) zugefügt und die Flüssigkeit in die Gelform gegossen. Nach etwa 15 min war das Gel ausgehärtet und konnte für die Elektrophorese benutzt werden. Die Proben wurden in einem 1:5 Verhältnis mit 6x Orange G Laufpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde die „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ oder „100bp plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher) für die längeren bzw. die kürzeren Fragmente benutzt.

Die Elektrophorese wurde je nach erwarteter Fragmentgröße für 15 – 25 min bei 70 V durchgeführt. Die anschließende Visualisierung der DNA-Banden fand unter UV-Licht statt.

Alternativ wurden Experimente mit hoher Probenanzahl durch Kapillargelelektrophorese mithilfe des „QIAxcel Advanced System“ (Qiagen) entsprechend des Herstellerprotokolls ausgewertet.

2.8 Gelextraktion

Um DNA-Abschnitte nach der Elektrophorese aus dem Gel zu isolieren, wurden sie zunächst unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend fand die Aufreinigung mittels „GeneJET Gel Extraction Kit“ entsprechend des Herstellerprotokolls statt.

2.9 Sequenzierung

Plasmidsequenzen wurden von der Firma Eurofins über Sanger-Sequenzierungen ermittelt. Entsprechend der Firmenanweisung wurden Plasmide mit einer Konzentration von 50 - 100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl verschickt. Für die Sequenzierung mit eigenen Oligonukleotiden wurden davon zusätzlich 2 µl in einer Konzentration von 10 pmol / µl hinzugefügt. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit der Software *Clone Manager* durchgeführt.

2.10 Klonierung

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Klonierungssysteme verwendet, zum einen das *Gateway* und zum anderen das *Golden Gate*-System. Zum Erstellen der meisten Klone wie beispielsweise für Fluoreszenzmarkierungen oder Überexpressionenlinien wurde das *Gateway*-Klonierungssystem von Invitrogen verwendet. Um mehrere DNA-Abschnitte auf einen Vektor zu klonieren, wie es bei den Koexpressionsanalysen für die Promotoraktivität bei *pCYP83B1* notwendig war, ist das *Golden Gate*-Klonierungssystem am besten geeignet.

2.10.1 Gateway Klonierung

Um Expressionsvektoren mit dem *Gateway*-Klonierungssystem von Thermo Fisher herzustellen, müssen zunächst DNA-Abschnitte in einen ENTRY- oder DONOR-Vektor mobilisiert werden und können dann über eine LR-Reaktion in Gateway-kompatible Destinationsvektoren kloniert werden. So können verschiedene Expressionsvektoren für Überexpressionen, GUS-Reporter und N- bzw. C-terminale Fluoreszenzmarkierung erzeugt werden.

2.10.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in den pENTRY-Vektor

Für die Klonierung in den pENTR-dTOPO-Vektor wurde das „pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit“ verwendet. Damit ein DNA-Abschnitt in der richtigen Orientierung in den Vektor ligiert wird, muss über das Vorwärts-Oligonukleotid bei der Amplifizierung ein CACC-Überhang an den Abschnitt angehängen werden (Tab. 6). Die Ligation des PCR-Produkts in den Vektor erfolgte nach folgendem Protokoll:

Ansatz TOPO Klonierung	
aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl
Salzlösung	1 µl
ENTRY-Vektor	1 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur Transformation in *E. coli* auf Eis gelagert. Für die Transformation wurde der gesamte Ansatz verwendet.

2.10.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in den pDONOR-Vektor – BP-Reaktion

Eine weitere Möglichkeit der Klonierung war ein DNA-Abschnitt mit spezifischen attB-Überhängen zu klonieren und mit einer BP-Reaktion in DONOR-Vektoren zu mobilisieren (Tab. 6). Für diese Reaktion wurde wie folgt vorgegangen:

Ansatz BP-Reaktion	
aufgereinigtes PCR-Produkt	150 ng
DONOR-Vektor	150 ng
BP-Clonase II	2 µl
TE-Puffer (pH 8,0)	add. 10 µl

Dieser Ansatz wurde 1 - 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl Proteinase K und einer Inkubation bei 37 °C für 10 min gestoppt. Für die Transformation von Bakterien wurden 2 - 5 µl des Ansatzes verwendet.

2.10.4 Mobilisierung von DNA-Fragmenten in Destinationsvektoren - LR-Reaktion

Zur Mobilisierung von DNA-Abschnitten aus dem pENTR-dTOPO-Vektor in einen Destinations-Vektor wurde eine LR-Reaktion nach folgendem Protokoll angesetzt:

Ansatz LR-Reaktion	
pENTRY-Vektor mit DNA-Abschnitt	1 µl (55 ng)
Destinationsvektor	1 µl (55 ng)
LR-Clonase II	1 µl
TE-Puffer (pH 8,0)	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 2 µl Proteinkinase K Lösung und anschließender Inkubation bei 37 °C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden 2 µl von dem Ansatz verwendet.

2.11 Golden-Gate-Klonierung

Das *Golden-Gate*-Klonierungssystem ermöglicht die Kombination von mehreren DNA-Stücken auf einem Vektor (Engler *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2011). So können durch die Transformation eines Bakteriums oder einer Pflanze mit einem Vektor mehrere Gene unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren exprimiert werden. Es gibt Vektoren für verschiedene Level. Um ein gewünschtes Gen oder DNA-Stück zu verwenden, wurde dieses zunächst mit passenden Überhängen amplifiziert und anschließend in einen Level-0 oder Level-1-Vektor mobilisiert. Im nächsten Schritt kann dieses Modul mit einer Vielzahl von weiteren Modulen wie beispielsweise passenden Promotoren und Terminatoren oder Fluoreszenzmarkierungen in einem Level-2-Vektor kombiniert werden. Um mehrere Gene in einer Pflanze zu koexprimieren, wurden mehrere Level-2-Module auf einem Level-3-Vektor zusammengeführt. Der Ansatz und das Programm für die Klonierungsreaktionen sind für jedes Level prinzipiell gleich aber unterscheiden sich bei dem verwendeten Restriktionsenzym (Bsal oder Bpil). Das Protokoll für die Klonierungsreaktion ist im Folgenden dargestellt.

Ansatz Golden Gate			Programm Golden Gate			
Leervektor	20	fmol	1 - 3	2 - 4 h	37 °C	
Insert 1	20	fmol	Fragmente	5 min	50 °C	
Insert 2	20	fmol		5 min	80 °C	
...						
Insert n	20	fmol		2 min	37 °C	50x
T4 Ligase	1	µl	mehr als 3	5 min	16 °C	
Bsal oder Bpil	0.5	µl	Fragmente	5 min	50 °C	
Ligase Puffer	1.5	µl		10 min	80 °C	
H ₂ O	add.	15 µl				

2.12 Transformation von Bakterien

2.12.1 Chemisch-kompetente *Escherichia coli*

Vor der Transformation mit Vektoren wurden chemisch-kompetente TOP10-Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Plasmidlösung hinzugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock, wobei der Zellansatz 30 Sek auf einen Heizblock mit 42 °C und sofort danach wieder auf Eis transferiert wurde. Anschließend wurden 200 µl SOC-Medium zugegeben und bei 37 °C für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Anzucht und Selektion der Bakterienkultur fand nach dem Ausstreichen auf Platten mit LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37 °C statt.

2.12.2 Chemisch-kompetente *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens* Stämme erfolgte über einen Kälteschock. Aliquots von 50 µl kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 – 5 µl Plasmidlösung weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min in flüssigen Stickstoff überführt und danach 5 min lang bei 37 °C gelagert. Ein weiterer Inkubationsschritt folgte nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium bei 28 °C für 2 – 4 h. Die Anzucht erfolgte auf LB-Selektionsplatten bei 28 °C über zwei bis drei Tage.

2.12.3 Elektrisch-kompetente *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrisch kompetente *A. tumefaciens* Stämme wurden über Elektroporation transformiert. Dazu wurden die Zellkulturen auf Eis aufgetaut und etwa 2 µl des aufgereinigten Expressionsvektors dazugegeben. Anschließend erfolgte die Elektroporation in einer geeigneten Küvette bei 2,5 kV. Danach wurden 250 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben und die Suspension zurück in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation bei 28 °C für 1 h wurden 200 µl der Suspension auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Die Anzucht der Zellkolonien bei 28 °C erfolgte über zwei bis drei Tage.

2.13 Hefe-2-Hybrid Analysen

Hefezellen wurden mit Expressionsvektoren transformiert, die ein Beute- bzw. ein Köder-Konstrukt enthalten. Wenn das Beute-Protein mit dem Köder-Protein im Zellkern interagiert werden die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne des GAL4-Komplexes zusammengebracht. So wird ein funktionaler Faktor gebildet, der an spezifische Sequenzen von Reportergenen bindet und deren Expression aktiviert.

2.13.1 Erzeugung kompetenter Hefezellen

Zellen vom Hefestamm PJ69-4α wurden über Nacht in 200 ml YPAD-Medium mit 2% (w/v) Glukose angezogen. Nach einer Zentrifugation mit 5000 rpm wurden die Zellen mit Wasser und anschließend 1xTE/1xLiOAc-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1xTE/1xLiOAc-Puffer resuspendiert.

2.13.2 Transformation von kompetenten Hefezellen

Für die Transformation von kompetenten Hefezellen wurde ein Expressionsvektor (pDest32 bzw. pDest22) verwendet, der den gewünschten DNA-Abschnitt enthielt. 0,4 µl Plasmid-DNA wurden zu 20 µl Hefezellsuspension mit 4 µl (5 mg / ml) einsträngiger DNA gegeben. Anschließend wurden 100 µl Transformationsmix (40% PEG4000 / 1xTE / 1xLiOAc) zu den Zellen hinzugefügt und die Zellsuspension bei 30 °C für 1 h inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 15 min bei 42 °C wurden die Zellen bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend der Transformationsmix abgenommen. Danach wurden 200 µl TE-Puffer zugegeben und 150 µl sofort wieder abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. In den restlichen 50 µl TE-Puffer wurden die Zellen resuspendiert. 10 µl der Suspension wurde auf Vorselektionsplatten (SD-L-W) gegeben und bei 28 °C für drei Tage inkubiert.

2.13.3 Interaktionsexperimente

Vorselektierte positive Transformanten von SD-L-W-Platten wurden in 200 µl TE-Puffer inokuliert und bei 28 °C über Nacht angezogen. 10 µl der Hefekulturen wurden auf SD-L-W-, SD-L-W-H- und SD-L-W-H-Ade-Platten übertragen. Die Zellen wurden auf den Platten für zwei bis fünf Tage bei 28 °C angezogen. Im Falle von Autoaktivierung wurde 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) in einer Konzentration bis zu 200 mM zu den Selektionsplatten hinzugegeben.

2.14 Transformation von Pflanzen

2.14.1 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Das dauerhafte Einfügen eines DNA-Abschnitts in das Genom von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte über die *Floral-Dip* Methode (Clough & Bent 1998). Positiv getestete *A. tumefaciens* Stämme, welche ein Plasmid mit dem gewünschten DNA-Abschnitt enthielten, wurden in 4 ml flüssigem LB-Selektionsmedium über zwei Tage bei 28 °C angezogen. Anschließend wurden die Zellen auf zwei Platten mit LB-Selektionsmedium ausgestrichen und weitere zwei bis drei Tage bei 28 °C kultiviert. Der Zellrasen von den Platten wurde in 60 ml flüssiges LB-Medium überführt und die Suspension auf $OD_{600\text{ nm}} = 2$ eingestellt (Martinez-Trullion *et al.*, 2004). Das Vierfache des Suspensionsvolumens wurde an 5%iger (w/v) Saccharoselösung zugegeben. Anschließend wurde der Lösung Silvet L77 in einer Endkonzentration von 0,03% (v/v) hinzugefügt (Zhang *et al.*, 2006). Für die Transformation wurden die Blüten von etwa 6 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen 15 Sek in dieser Suspension geschwenkt. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte in der T1-Generation. Dafür wurden die Samen der T0-Generation auf Erde ausgesät und nach sieben Tagen dreimal pro Woche mit Basta besprüht (Nakamura *et al.*, 2012). Die Konzentration der Herbizidlösung betrug 400 µl/l.

2.14.2 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Bei der transienten Transformation von *N. benthamiana* wurde neben dem Agrobakterienstamm mit dem gewünschten Vektor auch Zellen verwendet, welche ein Plasmid für die Expression des p19-Proteins enthielten (Win & Kamoun, 2004). Dieser virale Suppressor aus dem *tomato bushy stunt virus* (TBSV) unterdrückt die posttranskriptionale Genstilllegung und verbessert so die transiente Überexpression des Zielgens in der Pflanze (Lakatos *et al.*, 2004). Für eine Transformation wurden Zellen vom p19- bzw. Zielvektor-Stamm in je 4 ml flüssiges LB-Selektionsmedium gebracht. Bei 28 °C wurden anschließend die Zellen mit p19-Plasmid und der Stamm mit dem Zielvektor für 48 h bzw. 24 h im Schüttler angezogen. Danach wurden die Zellkulturen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 2 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Schließlich wurden die Pellets in 1 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und die Suspension auf eine $OD_{600\text{ nm}} = 1$ eingestellt. Die Agrobakterien mit dem Zielgen und dem p19-Plasmid wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Infiltration der *N. benthamiana* Blätter erfolgte mit einer Spritze durch die Blattunterseite. Nach 48 h wurden die infiltrierten Regionen unter dem konfokalen *Laserscanning* Mikroskop analysiert.

2.15 Genotypisierung

2.15.1 Identifikation von T-DNA-Insertionen

Um *A. thaliana* T-DNA-Insertionlinien zu verifizieren, wurden mithilfe des *T-DNA Primer Design Tool* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) des Salk Instituts passende Oligonuklotide, also ein *left primer* (LP) und ein *right primer* (RP), für die einzelnen Linien ermittelt. Dieses Oligonukleotidpaar sowie ein passender *border primer* (BP), also ein Oligonukleotid welches in der *left border* der T-DNA-Insertion bindet, wurden für zwei PCRs mit genomischer DNA der Pflanze verwendet. Um die Existenz der Insertion zu bestätigen, wurden LP und BP kombiniert. Ein PCR Produkt mit diesen Oligonukleotiden zeigt das Vorhandensein einer Insertion an dieser Stelle an. Als Kontrolle und zum Nachweis von Hetero- bzw. Homozygotie der Pflanze wurde zusätzlich eine PCR mit LP und RP durchgeführt. Ein PCR-Produkt nach dieser Reaktion zeigt ein WT-Allel, also die Abwesenheit der Insertion an dieser Stelle an. Erhält man für beide Oligonukleotidkombinationen ein Produkt bedeutet das, dass die Insertion in der getesteten Pflanze heterozygot vorliegt.

2.15.2 CAPS

Um Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) in einer Mutantenlinie nachzuweisen, wurden mit dem *dCAPS Finder 2.0* (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) spezifische Oligonukleotide und passende Restriktionsenzyme identifiziert. Mit der genomischen DNA wurden dann PCR-Produkte erzeugt, welche anschließend mit dem vorher bestimmten Restriktionsenzym verdaut wurden. Abhängig vom gewählten Enzym und Oligonukleotidpaar kann ein erfolgter Schnitt im PCR-Produkt die Anwesenheit oder die Abwesenheit des SNP anzeigen. Eine Übersicht der verwendeten Pflanzenlinien und Oligonukleotide ist in Tab. 4 bzw. Tab. 10 dargestellt.

2.16 Kreuzung der Pflanzen

Für das Kreuzen von Pflanzen mit unterschiedlichen Genotypen wurden etwa 6 Wochen alte, blühende Individuen verwendet. Von der Mutterpflanze wurden zunächst Schoten, offene sowie sehr junge Blüten und das Apikalmeristem entfernt, sodass nur noch geschlossene Blütenknospen vorhanden waren. Von diesen Blütenknospen wurden anschließend Kelch-, Blüten- und Staubblätter entfernt, um das unbefruchtete Pistill freizulegen. Von der Vaterpflanze wurde eine offene Blüte verwendet, um Pollen auf das Pistill zu übertragen. Anschließend wurde die F₁-Generation vermehrt. In der F₂-Generation fand die Identifizierung von doppelt homozygoten Pflanzen statt.

2.17 Histochemische GUS-Analyse in Pflanzen

Expressionsdomänen verschiedener Gene wurden in transgenen *A. thaliana Promotor:GUS*-Linien über eine GUS-Färbereaktion visualisiert. Das Pflanzengewebe der transgenen Linien wurde dazu in eiskaltem 90%igen (v/v) Aceton für 15 – 20 min fixiert. Das Pflanzenmaterial wurde danach mit Färbepuffer gewaschen, welcher anschließend durch X-Gluc enthaltende Färbelösung ersetzt wurde. Damit die Färbelösung in das Gewebe eindringen kann, wurde das Material für 10 min Vakuum infiltriert. Die anschließende

Inkubationszeit bei 37 °C kann variieren und je nach Konstrukt einen Zeitraum von wenigen Stunden bis über Nacht andauern. Um das Chlorophyll aus dem Gewebe zu lösen, wurde das Material mit Ethanol versetzt. Dazu wurde die Färbelösung zunächst entfernt und durch 15%iges (v/v) Ethanol ersetzt, welches schrittweise durch Zugabe von reinem Ethanol auf 30% (v/v), 50% (v/v) und schließlich 70% (v/v) konzentriert wurde. Das Material wurde bei 4 °C über Nacht oder mehrere Tage gelagert und bei Bedarf die Ethanollösung ausgetauscht. Vor der Untersuchung unter dem Mikroskop wurde die Lösung wieder schrittweise auf 15%iges (v/v) Ethanol verdünnt.

2.18 GUS-Assay

Zur quantitativen Analyse der *CYP83B1* Promotoraktivität wurden *N. benthamiana* Pflanzen mit einem *pCYP83B1:GUS*-Reporterkonstrukt transient transformiert. In den Blattextrakten wurde anschließend mithilfe fluorometrischer Analyse die GUS-Aktivität bei der Umsetzung des Substrats 4-MUG zum fluoreszierenden 4-MU bestimmt. Dazu wurde das *pCYP83B1:GUS*-Reporterkonstrukt zusammen mit *IQD1*, *KLCR2* und *WRKY21* in verschiedenen Kombinationen transient in *N. benthamiana* exprimiert. Drei Tage nach der Infiltration wurden die *N. benthamiana* Blätter geerntet und in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial zu Pulver gemörsert und ein Teil zusammen mit 1 ml GUS-Extraktionspuffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 10000 rpm wurden 200 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Über eine Bradford Reaktion wurde die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt. Für die Fluoreszenzmessung wurden 100 µg Protein mit 500 µl GUS-Assay-Puffer vermischt und bei 37 °C unter Aluminiumfolie inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 50 µl von der Lösung abgenommen und in 450 µl Stop-Puffer überführt. Als drei technische Replikate wurden je 150 µl von der gestoppten Lösung in schwarze 96-Well-Platten pipettiert. Die Messung der 4-MU-vermittelten Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem „Varioskan™ Flash Multimode Reader“ bei $\lambda_{\text{Anregung}}=365$ nm und $\lambda_{\text{Emmission}}=455$ nm.

2.19 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford)

Für GUS-Experimente in *N. benthamiana* wurden die Proteinkonzentrationen in Rohextrakten über die Bradford Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Dafür wurde zunächst für 5x Bradford Reagenz (Serva) mit Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt. Um eine Eichkurve erstellen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Referenzprotein BSA hergestellt (0; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100 µg/ml). Die Rohextrakte wurden 1:50, 1:100 und 1:200 verdünnt. In 3 technischen Replikaten wurden je 50 µl von der Eichkurve und dem verdünnten Rohextrakt auf eine transparente 96-Well-Platte übertragen und 200 µl von der 1:4 verdünnten Bradfordlösung dazugegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der Eichkurve konnte dann der Proteingehalt in den Rohextrakten bestimmt werden.

2.20 Plasmid Isolierung aus *E. coli*

Plasmide wurden mit dem „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ von Thermo Scientific entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Die Plasmide wurden dabei in 30 µl Wasser gelöst.

2.21 Verifizierung von Plasmiden

Über die Restriktionsanalyse wurde getestet, ob ein Plasmid den gewünschten DNA-Abschnitt enthält und ob die Transformation von *E. coli* erfolgreich war. Das Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass sich die Restriktionsprodukte in ihrer Größe deutlich unterscheiden und sich mindestens eine Schnittstelle im klonierten DNA-Abschnitt befindet. Letzteres war wichtig, um das klonierte Plasmid vom Leervektor gut unterscheiden zu können. Die Restriktion wurde mit „FastDigest“-Enzymen von Thermo Scientific durchgeführt. Für den Ansatz wurde folgendes Protokoll verwendet:

Ansatz für Restriktionsanalyse	
<i>FastDigest Greenbuffer</i>	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H ₂ O	15 µl
Plasmid	2 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und dann direkt auf ein Gel geladen.

Bei einer positiven Verifizierung von ENTRY- oder DONOR-Vektoren durch die Restriktionsanalyse wurde die Korrektheit des klonierten DNA-Abschnitts anschließend über eine Sequenzierung durch die Firma „Eurofins MWG Operon“ überprüft. Wenn möglich fand die Sequenzierung mit den firmeneigenen Oligonukleotiden M13 (uni) und M13 (-29rev) statt. Für den Plasmid DONR207 wurden eigenen Oligonukleotide verwendet (Tab. 12).

2.22 Messung der Wurzellänge

Die Primärwurzeln von *A. thaliana* wurden mithilfe des Programms „RootDetection“ (<http://www.labutills.de/rd.html>) erfasst. Die Pflanzen wurden dazu für 7 Tage direkt auf ATS-Platten angezogen.

2.23 Glukosinolatmessungen

Für die Bestimmung der GSL-Konzentrationen in den Pflanzen wurden Sinigrin als interner Standard verwendet, da diese Verbindung in Col-0 natürlicherweise nicht vorkommt. Für die Standardlösung wurde zunächst das Sinigrin in einer kleinen Menge Wasser aufgelöst. Anschließend wurde diese Lösung einem 2:1 Methanol-Chloroform Gemisch zugefügt, so dass die Sinigrinkonzentration 20 µg/ml betrug. Um die GSL zu extrahieren, wurden etwa 30 mg Pflanzenmaterial in 2 ml Reaktionsgefäße geerntet, 2 Edelstahlkugeln hinzugefügt und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Danach wurde das Material für eine Minute bei 25 Hz in einer Kugelmühle gemörsert. Nach Zugabe von 450 µl Methanol-Chloroform-Gemisch mit Sinigrin und 150 µl Wasser fand die Extraktion auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde statt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Messung mittels LC-MS/MS wurde eine 1:10 Verdünnung des Extraktes benutzt. Die Separation der Moleküle in der Probe wurde in einem Agilent 1290 Infinity HPLC System bei 35 °C mit einer Nucleoshell RP18 Säule (50 mm x 3 mm, Partikelgröße 2,7 µm) von Macherey-Nagel durchgeführt. Für die Auftrennung wurden 0,2%ige (v/v) Essigsäure (Lösung A) und Acetonitril mit 0,2% (v/v) Essigsäure (Lösung B) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Zur Separation der GSL in den Proben wurde zu Beginn eine Konzentration von 0% B für 0,5 min eingestellt. Anschließend wurde der Anteil von B zunächst über 4 min linear auf 55% und dann innerhalb von 1 min auf 98% erhöht. Dieser Zustand wurde für 1 min konstant gehalten. Danach wurde innerhalb von 0,5 min die Ausgangskonzentration wiederhergestellt und die Säule für 2 min bei 0% B equilibriert. Die Separation der Moleküle über ihr Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und anschließende Detektion wurde durch ein API 3200 Triple-Quadrupole LC-MS/MS System mit Elektrospray Ionisation (ESI) (AB Sciex) im negativen Ionen Modus bewerkstelligt. Für die Ionenquelle wurden folgende Einstellungen gewählt: Gas Gegenstrom (*curtain gas*) 40 psi, Ionisierung -4000 V, Temperatur der Ionenquelle 650 °C, Zerstäubungs- (*nebulizing*) und Dehydrierungs- (*drying*) Gas 60 psi. Die Erfassung der GSL-spezifischen Signale wurde im Multireaktions-Monitoring-Modus (*multiple reaction monitoring mode* - MRM) entsprechend der Bedingungen in Tab. 14 durchgeführt. Das Retentionszeitfenster betrug 90 Sek bei einer Scanzeit für jedes Zielmolekül von 0,1 Sek. Die Fläche der aufgezeichneten Peaks wurde automatisch über den IntelliQuant Algorithmus der Analyst 1.6.2 Software berechnet und bei Bedarf manuell korrigiert. Die Konzentration der GSL in der Probe wurde über Sinigrin als interner Standard berechnet.

Für die Messung von Desulfo-GSL mittels ultraviolett (UV)-Detektion wurden GSL wie oben beschrieben extrahiert. Anschließend wurden der Extrakt auf eine DEAE-Sephadex A-25 Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 20 mM Pyridinacetat und zweimal mit Wasser gespült. Um die GSL zu Desulfo-GSL umzuwandeln wurden sie über Nacht in 100 µl 0,1%iger Sulfatase-Lösung (Sigma) inkubiert. Anschließend wurden die Desulfo-GSL mit zweimal 0,5 ml Wasser eluiert. Die Separation der Desulfo-GSL wurde bei 40 °C in einem Acquity *ultraperformance liquid chromatography* (UPLC) System von Waters mit eine C18 Säule (100 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 1,8 µm) durchgeführt. Für die Auftrennung wurden Wasser (Lösung A) und Acetonitril (Lösung B) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Der Gradient für die Auftrennung wurde wie folgt gewählt: 1% B für 0,6 min; linearer Gradient auf 20% B über 4 min; 20% B für 6 min; linearer Gradient auf 100% B über 6,5 min; 100% B für 8 min. Die Desulfo-GSL wurden über die Absorption bei 226 und 280 nm detektiert. Die Retentionszeiten und UV-Absorptionsspektren der Produkte wurden mit Standardsubstanzen verglichen. Die Quantifizierung erfolgte über Sinigrin als interner Standard.

Tab. 14: MS-Parameter der MRM-Transition für GSL-Messung

DP – *Declustering Potential*, EP – *Entrance Potential*, CEP – *Cell Entrance Potential*, CE – *Collision Potential*, CEX – *Cell Exit Potential*

GSL	MRM-Transition	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CEX [V]	Retentionszeit [min]
3MSOP	422→96	-50	-5,5	-20	-60	0	3,1
3MTP	406→96	-50	-7,5	-28	-64	0	2,1
4MSOB	436→96	-60	-6	-22	-64	0	1
4MTB	420→96	-50	-7,5	-20	-64	0	2,4
5MSOP	450→96	-55	-5,5	-22	-68	0	1,8
5MTP	434→96	-50	-4,5	-22	-58	0	2,9
6MSOH	464→96	-50	-5	-22	-60	0	2,1
6MTH	448→96	-50	-5	-29	-60	0	3,1
7MSOH	478→96	-50	-6,5	-24	-64	0	2,3
7MTH	462→96	-55	-6,5	-22	-66	0	3,6
8MSOO	492→96	-60	-7	-24	-62	0	2,6
8MTO	476→96	-60	-7	-31	-62	0	4,1
1MOI3M	477→96	-50	-4,5	-24	-64	0	3,1
4MOI3M	477→96	-45	-6,5	-24	-56	0	2,8
4OHI3M	463→96	-50	-5	-22	-60	0	2
I3M	447→96	-55	-7,5	-22	-58	0	2,6
Sinigrin	358→96	-40	-6,5	-22	-48	0	1

2.24 Phytohormonmessungen

Für die simultane Messung von mehreren Phytohormonen in einer Probe via LC-MS/MS wurde eine Methode etabliert, welche in Ziegler *et al.* (2014) beschrieben ist.

Zunächst wurden 20 – 80 mg Pflanzenmaterial in 2 ml Reaktionsgefäße geerntet und mit 2 Edelstahlkugeln in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurde das Material für 50 Sek bei einer Frequenz von 50 Hz in einer Kugelmühle gemörsert. Für die Extraktion wurden 200 µl Methanol mit internen Standards für die Phytohormone (2 ng ABA-D₆, jeweils 5 ng IAA-¹³C₆, JA-D₆, trans-zeatin-D₅, trans-zeatin-9-riboside-D₅, 0,75 ng JA-Ile-D₂, 1,5 ng SA-D₄, 30 ng OPDA-D₅, 45 ng ACC-D₄) zu dem Material gegeben und 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 10 min wurde der Überstand für die Derivatisierung benutzt. Dazu wurden 400 µl 0,5 M Na-Borat Puffer (pH 7,9) und 400 µl Fmoc-Cl Lösung (1,4 mg/ml in Aceton) zu dem Überstand der Extraktion gegeben und das Gemisch für 5 min inkubiert. Um restliches Fmoc-Cl zu entfernen, wurde dreimal mit 1 ml n-pentane gespült.

Zu dem Extrakt wurde 1 ml 2%ige (v/v) Essigsäurelösung hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf eine *solid phase extraction* (SPE) 96-Well Platte übertragen. Die Platte wurde vorher mit HR-XC-Granulat (50 mg pro Well) bestückt und mit 1 ml Methanol und anschließend 1 ml Wasser aufbereitet. Nach der Zentrifugation mit dem Extrakt wurden die Wells mit 1 ml Wasser gespült und anschließend die Phytohormone (JA, ABA, ACC, Indol-3-Essigsäure (IAA), JA, 12-oxo-Phytodienonsäure (OPDA), JA-Ile) mit 1 ml Methanol eluiert. Die Eluate wurden auf eine weitere SPE 96-Well Platte mit DEAE-Sephadex (50 mg pro Well) übertragen. Nach dem Waschen mit 1 ml Methanol wurden die Phytohormone mit 1 ml 3 M Essigsäure in Methanol eluiert.

Die Eluate wurden in 2 ml Reaktionsgefäße übertragen und das Lösungsmittel unter Vakuum bei 45°C verdampft. Die getrockneten Rückstände wurden in 40 µl 20%igem (v/v) Methanol gelöst und mit 40 µl Wasser verdünnt. Nach anschließender Zentrifugation mit 10000 g für 10 min wurden die Proben in passende Glasfläschchen für die LC-MS/MS-Analyse übertragen.

Die Separation wurde mit einer Nucleoshell RP18 Säule (50 mm x 3 mm, Partikelgröße 2,7 µm) von Macherey-Nagel in einem Agilent 1290 Infinity HPLC System durchgeführt. Lösung A (0,2% (v/v) Essigsäure in Wasser) und Lösung B (0,2% (v/v) Essigsäure in Acetonitril) hatten eine Flussrate von 0,5 ml/min. Für die Messung der Phytohormone (SA, ABA, ACC, IAA, JA, OPDA, JA-Ile) wurde der Anteil von Lösung B, nach einem anfänglichen Halten der 10% für 0,5 min, über 9 min von 10% auf 80% erhöht. Nach einem weiteren Anstieg auf 98% innerhalb von 0,5 min und einer isokratischen Phase von 1,5 min bei 98% B wurde die Säule bei 10% B für 1 min reequibriert. Das ESI Turbo Ion Spray interface arbeitete im negativen Ionen Modus mit folgenden Parametern: Gas Gegenstrom (*curtain gas*) 50 psi, Ionisierung -4500 V, Temperatur der Ionenquelle 350 °C, Zerstäubungs- (*nebulizing*) und Dehydrierungs- (*drying*) Gas 70 bzw. 50 psi. Die Erfassung der hormonspezifischen Signale wurden im Multireaktions-Monitoring-Modus (*multiple reaction monitoring mode* - MRM) entsprechend der Bedingungen in Ziegler *et al.* (2014) durchgeführt. Das Retentionszeitfenster betrug 90 Sek bei einer Scanzeit für jedes Zielmolekül von 0,1 Sek. Die Fläche der aufgezeichneten Peaks wurde automatisch über den IntelliQuant Algorithmus der Analyst 1.6.2 Software berechnet und bei Bedarf manuell korrigiert. Die Phytohormone wurden mithilfe der internen Standards quantifiziert.

3 Quellenverzeichnis

- Aarabi, F., Kusajima, M., Tohge, T., Konishi, T., Gigolashvili, T., Takamune, M., Sasazaki, Y., Watanabe, M., Nakashita, H., Fernie, A. R., Saito, K., Takahashi, H., Hubberten, H., Hoefgen, R. & Maruyama-Nakashita, A. (2016). Sulfur deficiency–induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants. *Sci Adv*, S. 2: e1601087.
- Abe, T., Thitamadee, S., & Hashimoto, T. (2004). Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, S. 45(2): 211–220.
- Abel, S., Bürstenbinder, K., & Müller, J. (2013). The emerging function of IQD proteins as scaffolds in cellular signaling and trafficking. *Plant Signal Behav*, S. 8:6, e24369.
- Abel, S., Savchenko, T., & Levy, M. (2005). Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *BMC Evol Biol*, S. 5:72.
- Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J., & Jander, G. (2009). Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochem Rev*, S. 8: 101–120.
- Ahuja, I., de Vos, R., Rohloff, J., Stoop, G., Halle, K., Ahmad, S., Hoang, L., Hall, R. D. & Bones, A. (2016). *Arabidopsis* myrosinases link the glucosinolate-myrosinase system and the cuticle. *Sci Rep*, S. 6:38990.
- Allen, G., Chu, S., Harrington, C., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y., Grill, E. & Schroeder, J. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, S. 411: 1053-1057.
- Anil, V., & Rao, K. (2001). Calcium-mediated signal transduction in plants: A perspective on the role of Ca²⁺ and CDPKs during early plant development. *J Plant Physiol*, S. 158: 1237–1256.
- Aravind, L., & Koonin, E. (2000). The STAS domain — a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol*, S. 10(2): R53-55.
- Bähler, M., & Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett*, S. 513: 107-113.
- Barberon, M., Berthomieu, P., Clairotte, M., Shibagaki, N., Davidian, J.-C., & Gosti, F. (2008). Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters SULTR1;1 and SULTR1;2. *New Phytol*, S. 180(3): 608-619.
- Barth, C., & Jander, G. (2006). *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J*, S. 46(4): 549-562.
- Barton, N., & Goldstein, L. (1996). Going mobile: Microtubule motors and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, S. 93(5): 1735-1742.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. & Schulze-Lefert, P. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, S. 323(5910): 101-106.
- Bhattacharya, S., Bunick, C., & Chazin, W. (2004). Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, S. 1742(1-3): 69-79.
- Block, S. (1996). Fifty ways to love your lever: myosin motors. *Cell*, S. 87: 151–157.

- Bones, A., & Rossiter, J. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant*, S. 97: 194-208.
- Bouché, N., Scharlat, A., Snedden, W., Bouchez, D., & Fromm, H. (2002). A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem*, S. 277(24): 21851-21861.
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubes, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zažímalová, E., Hoyerová, K., Nacry, P. & Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1.1. *Nat Plants*, S. 1:15015.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, S. 72: 248-254.
- Brown, P., & Morra, M. (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Adv Agron*, S. 61: 167-231.
- Brown, P., Tokuhisa, J., Reichelt, M., & Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem*, S. 62(3): 471-481.
- Buchanan, B. (1991). Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch Biochem Biophys*, S. 288(1): 1-9.
- Buchner, P., Takahashi, H., & Hawkesford, M. (2004). Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J Exp Bot*, S. 55(404): 1765-1773.
- Bürstenbinder, K., Möller, B., Plötner, R., Stamm, G., Hause, G., Mitra, D., & Abel, S. (2017). The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus. *Plant Physiol*, S. 173(3): 1692-1708.
- Bürstenbinder, K., Savchenko, T., Müller, J., Adamson, A., Stamm, G., Kwong, R., Zipp, B. J., Dinesh, D. C. & Abel, S. (2013). *Arabidopsis* calmodulin-binding protein IQ67-domain 1 localizes to microtubules and interacts with kinesin light chain-related protein-1. *J Biol Chem*, S. 288: 1871-1882.
- Cairns, N., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C., & Meyer, A. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol*, S. 141(2): 446-455.
- Celenza, J., Quiel, J., Smolen, G., Merrih, H., Silvestro, A., Normanly, J., & Bender, J. (2005). The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol*, S. 137(1): 253-262.
- Chaudhary, N., McMahon, C., & Blobel, G. (1991). Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components. *Proc Natl Acad Sci USA*, S. 88(18): 8189-8193.
- Cherest, H., Davidia, J.-C., Thomas, D., Benes, V., Ansoerge, W., & Surdin-Kejan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, S. 145(3): 627-635.
- Chhajed, S., Misra, B., Tello, N., & Chen, S. (2019). Chemodiversity of the Glucosinolate-Myrosinase System at the Single Cell Type Resolution. *Front Plant Sci*, S. 10: 618.

- Choi, K.-Y., Satterberg, B., Lyons, D., & Elion, E. (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, S. 78(3): 499-512.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R., & Somssich, I. (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol*, S. 68: 81–92.
- Clough, S., & Bent, A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 16(6): 735–743.
- Cosson, P., Perrin, J., & Bonifacino, J. (2013). Anchors aweigh: protein localization and transport mediated by transmembrane domains. *Trends Cell Biol*, S. 23(10): 511-517.
- Crivici, A., & Ikura, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, S. 24: 85-116.
- Dan, H., Yang, G., & Zheng, Z.-L. (2007). A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, S. 63: 221–235.
- Davidian, J.-C., & Kopriva, S. (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation-the same or not the same? *Mol Plant*, S. 3(2): 314-325.
- Day, I., Reddy, V., Ali, G., & Reddy, A. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol*, S. 3(10): RESEARCH0056.
- DeFalco, T., Marshall, C., Munro, K., Kang, H.-G., Moeder, W., Ikura, M., Snedden, W. A. & Yoshioka, K. (2016). Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate *Arabidopsis* Cyclic Nucleotide-Gated Channel 12. *Plant Cell*, S. 28(7): 1738-1751.
- Demidchik, V., & Maathuis, F. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol*, S. 175(3): 387-404.
- Diallinas, G. (2017). Transceptors as a functional link of transporters and receptors. *Microb Cell*, S. 4(3): 69-73.
- Ding, Y., Zhou, X., Zuo, L., Wang, H., & Yu, D. (2016). Identification and functional characterization of the sulfate transporter gene *GmSULTR1;2b* in soybean. *BMC Genomics*, S. 17: 373.
- Dinkeloo, K., Boyd, S., & Pilot, G. (2018). Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Semin Cell Dev Biol*, S. 74: 105-113.
- Dinkova-Kostova, A., & Kostov, R. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med*, S. 18(6): 337-347.
- Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2011). Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. *Methods Mol Biol*, S. 779: 93-138.
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K., & Cohen, C. (1998). Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*, S. 94(5): 559-571.
- Donaton, M., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., & Thevelein, J. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid

- sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, S. 50(3): 911-929.
- Dou, J., Zhao, S., Lu, X., He, N., Zhang, L., Ali, A., Kuang, H. & Liu, W. (2018). Genetic mapping reveals a candidate gene (*CIFS1*) for fruit shape in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Theor Appl Genet*, S. 131(4): 947-958.
- El Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., & Davidian, J.-C. (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol*, S. 143(3): 1231-1241.
- Elbing, K., & Brent, R. (1998). Growth in liquid or solid media. *Curr Protoc Protein Sci*, S. A.4B.1-A.4B.3.
- Engeler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, S. 3(11): e3647.
- Eulgem, T., & Somssich, I. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol*, S. 10: 366–371.
- Fahey, J., Zalcmann, A., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem*, S. 56(1): 5-51.
- Falk, K., Tokuisha, J., & Gershenzon, J. (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biol (Stuttg)*, S. 9(5): 573-81.
- Fass, D., & Thorpe, C. (2018). Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chem Rev*, S. 118(3): 1169–1198.
- Fenwick, G., Heaney, R., Mullin, W., & VanEtten, C. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, S. 18(2): 123-201.
- Fischer, W.-N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitkreuz, K., & Frommer, W. (1998). Amino acid transport in plants. *Trend Plant Sci*, S. 3(5): 188-195.
- Fizames, C., Munos, S., Cazettes, C., Nacry, P., Boucherez, J., Gaymard, F., Piquemal, D., Delorme, V., Commes, T., Doumas, P., Cooke, R., Marti, J., Sentenac, H. & Gojon, A. (2004). The *Arabidopsis* root transcriptome by serial analysis of gene expression. Gene identification using the genome sequence. *Plant Physiol*, S. 134(1): 67-80.
- Flatauer, L., Zadeh, S., & Bardwell, L. (2005). Mitogen-activated protein kinases with distinct requirements for Ste5 scaffolding influence signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, S. 25(5): 1793-803.
- Frerigmann, H., & Gigolashvili, T. (2014). Update on the role of R2R3-MYBs in the regulation of glucosinolates upon sulfur deficiency. *Front Plant Sci*, S. 5:626.
- Gamet-Payraastre, L. (2006). Signaling pathways and intracellular targets of sulforaphane mediating cell cycle arrest and apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets*, S. 6(2): 135-45.
- Geervliet, J., Vet, L., & Dicke, M. (1994). Volatiles from damaged plants as major cues in long-range host-searching by the specialist parasitoid *Cotesia rubecula*. *Entomol Exp Appl*, S. 73: 289-297.
- Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.-R., & Hänsch, R. (2009). New Gateway vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant*, S. 2(5): 1051-1058.

- Gibson, S. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol*, S. 8: 93–102.
- Gigolashvili, T., & Kopriva, S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Front Plant Sci*, S. 5:442.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.-P., Müller, C., Weisshaar, B., & Flügge, U.-I. (2007). The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 50(5): 886–901.
- Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusевич, R., Müller, C., & Flügge, U.-I. (2008). HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, S. 177: 627–642.
- Gigolashvili, T., Yatusевич, R., Berger, B., Müller, C., & Flügge, U.-I. (2007). The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 51(2):247-61.
- Giots, F., Donaton, M., & Thevelein, J. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, S. 47(4): 1163-1181.
- Good, M., Tang, G., Singleton, J., Reményi, A., & Lim, W. (2009). The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell*, S. 136(6):1085-1097.
- Good, M., Zalatan, J., & Lim, W. (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, S. 332(6030): 680-686.
- Görnitz, K. (1953). Untersuchungen über in Cruciferen enthaltene Insekten-Attraktivstoffe. *nachrichtenblatt für den deutschen Pflanzenschutzdienst*, S. 7: 81-95.
- Griffiths, D., Birch, A., & Hillman, J. (1998). Antinutritional compounds in the Brasi Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *J Horti Sci*, S. 73 (1): 1-18.
- Gross, H., Dalebout, T., Grubb, C., & Abel, S. (2000). Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, S. 159(2): 265-272.
- Grubb, C., & Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci*, S. 11(2): 89-100.
- Grubb, C., Gross, H., Chen, D., & Abel, S. (2002). Identification of *Arabidopsis* mutants with altered glucosinolate. *Plant Sci*, S. 162(1): 143-152.
- Gruber, B., Giehl, R., Svetlana, F., & von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol*, S. 163(1): 161-179.
- Guna, A., & Hedge, R. (2018). Transmembrane domain recognition during membrane protein biogenesis and quality control. *Curr Biol*, S. 28(8): R498-R511.
- Guo, R., Shen, W., Qian, H., Zhang, M., Liu, L., & Wang, Q. (2013). Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, S. 64(18): 5707-5719.
- Halkier, B., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol*, S. 57: 303-333.

- Halkier, B., & Du, L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trend Plant Sci Rev*, S. 2(11): 425-431.
- Hirai, M., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., & Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J*, S. 33(4): 651-663.
- Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., & Tsay, Y.-F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, S. 138(6): 1184-1194.
- Hsu, Y.-F., Chen, Y.-C., Hsiao, Y.-C., Wang, B.-J., Lin, S.-Y., Cheng, W.-H., Jauh, G.-Y., Harada, J. J. & Wang, C.-S. (2014). AtRH57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of glucose-mediated abscisic acid accumulation during seedling development and additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose. *Plant J*, S. 77(1): 119-135.
- Islam, M., Tani, C., Watanabe-Sugimoto, M., Uraji, M., Jahan, M., Masuda, C., Nakamura, Y., Mori, I. C. & Murata, Y. (2009). Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Cell Physiol*, S. 50(6): 1171-1175.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, S. 144 (4) :1425-36.
- Jones, M., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A., & Collin, H. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J Exp Bot*, S. 55(404): 1903-1918.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I., Roby, D., & Kroj, T. (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, S. 18(11): 3289-3302.
- Juge, N., Mithen, R., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci*, S. 64(9): 1105-1127.
- Kankipati, H., Rubio-Teixeira, M., Castermans, D., Diallinas, G., & Thevelein, J. (2015). Sul1 and Sul2 sulfate transceptors signal to protein kinase A upon exit of sulfur starvation. *J Biol Chem*, S. 290(16): 10430-10446.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, S. 7(5): 193-195.
- Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004). Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol*, S. 136(4): 4198-4204.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M. J., Yamaya, T. & Takahashi, H. (2004). Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, S. 16(10): 2693-2704.
- Kawakishi, S., & Kaneko, T. (1985). Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. *Phytochemistry*, S. 24(4): 715-718.
- Kawakishi, S., & Kaneko, T. (1987). Interaction of Proteins with Allyl Isothiocyanate. *J Agric Food Chem*, S. 35: 85-88.

- Keenan, R., Freymann, D., Stroud, R., & Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, S. 70: 755-775.
- Kensler, T., Chen, J.-G., Egner, P., Fahey, J., Jacobson, L., Stephenson, K., Ye, L., Coady, J. L., Wang, J.-B., Wu, Y., Sun, Y., Zhang, Q.-N., Zhang, B.-C., Zhu, Y.-R., Qian, G.-S., Carmella, S. G.; Hecht, S. S., Benning, L., Gange, S. J., Groopman, J. D. & Talalay, P. (2005). Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, S. 14(11 Pt 1): 2605-2613.
- Kensler, T., Ng, D., Carmella, S., Chen, M., Jacobson, L., Muñoz, A., Egner, P. A., Chen, J. G., Qian, G. S., Chen, T. Y., Fahey, J. W., Talalay, P., Groopman, J. D., Yuan, J.-M. & Hecht, S. (2012). Modulation of the metabolism of airborne pollutants by glucoraphanin-rich and sulforaphane-rich broccoli sprout beverages in Qidong, China. *Carcinogenesis*, S. 33(1): 101-107.
- Ketterer, B., Coles, B., & Meyer, D. (1983). The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect*, S. 49: 59-69.
- Kissen, R., Rossiter, J., & Bones, A. (2009). The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochem Rev*, S. 8: 69-86.
- Klein, M., & Papenbrock, J. (2004). The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *J Exp Bot*, S. 55(404): 1809-1820.
- Kliebenstein, D., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., & Mitchell-Olds, T. (2001). Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol*, S. 126(2): 811-825.
- Köhler, C., Merkle, T., & Neuhaus, G. (1999). Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 18(1): 97-104.
- Kopriva, S., Büchert, T., Fritz, G., Suter, M., Weber, M., Benda, R., Schaller, J., Feller, U., Schürmann, P., Schünemann, V., Trautwein, A. X., Kroneck, P. M. H. & Brunold, C. (2001). Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel iron-sulfur protein. *J Biol Chem*, S. 276(46): 42881-42886.
- Kopriva, S., Mugford, S., Baraniecka, P., Lee, B.-R., Matthewman, C., & Koprivova, A. (2012). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, S. 3: 163.
- Koroleva, O., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M., Tomos, A., & Hedrich, R. (2000). Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol*, S. 124(2): 599-608.
- Koroleva, O., Gibson, T., Cramer, R., & Stain, C. (2010). Glucosinolate-accumulating S-cells in *Arabidopsis* leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. *Plant J*, S. 64(3): 456-469.
- Kuchernig, J., Burow, M., & Wittstock, U. (2012). Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC Evol Biol*, S. 12: 127.
- Kudla, J., Batistic, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, S. 22(3): 541-563.

- Kushwaha, R., Singh, A., & Chattopadhyay, S. (2008). Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell*, S. 20(7): 1747-59.
- La Verde, V., Dominici, P., & Astegno, A. (2018). Towards understanding plant calcium signaling through Calmodulin-like proteins: A biochemical and structural perspective. *Int J Mol Sci*, S. 19(5): 1331.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., & Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J*, S. 23(4): 876-884.
- Lappartient, A., & Touraine, B. (1996). Demand-driven control of root ATP Sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola (The role of phloem-translocated glutathione). *Plant Physiol*, S. 111(1): 147-157.
- Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, S. 143: 3226-3229.
- Lei, L., Li, S., Du, J., Bashline, L., & Gu, Y. (2013). Cellulose synthase Interactive3 regulates cellulose biosynthesis in both a microtubule-dependent and microtubule-independent manner in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, S. 25(12): 4912-4923.
- Leustek, T., Martin, M., Bick, J.-A., & Davies, J. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, S. 51: 141-165.
- Levy, M., Wang, Q., Kaspi, R., Parrella, M., & Abel, S. (2005). *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J*, S. 43(1): 79-96.
- Lewit-Bentley, A., & Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, S. 10(6): 637-643.
- Li, B., Gaudinier, A., Tang, M., Taylor-Teeple, M., Nham, N., Ghaffari, C., Benson, D. S., Steinmann, M., Gray, J. A., Brady, S. M. & Kliebenstein, D. (2014). Promoter-based integration in plant defense regulation. *Plant Physiol*, S. 166(4): 1803-1820.
- Liang, H., Zhang, Y., Matinez, P., Rasmussen, C., Xu, T., & Yang, Z. (2018). The microtubule-associated protein IQ67-Domain5 modulates microtubule dynamics and pavement cell shape. *Plant Physiol*, S. 177(4): 1555-1568.
- Lincoln, C., Britton, J., & Estelle, M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, S. 2(11): 1071-1080.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. & Schulze-Lefert, P. (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, S. 310(5751): 1180-1183.
- Liu, Z., Schneider, R., Kesten, C., Zhang, Y., Somssich, M., Zhang, Y., Fernie, A. R., & Persson, S. (2016). Cellulose-microtubule uncoupling proteins prevent lateral displacement of microtubules during cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, S. 38(3): 305-315.
- Logemann, E., Birkenbihl, R., Ülker, B., & Somssich, I. (2006). An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*, S. 2: 16.

- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V., Koprivova, A., North, K. A., Kopriva, S. & Daniel-Vedele, F. (2007). Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nat Genet*, S. 39(7): 896-900.
- Lüthy, B., & Matile, P. (1984). The mustard oil bomb: Rectified analysis of the subcellular organisation of the myrosinase system. *Biochem Physiol Pflanzen*, S. 179: 5-12.
- Martin, M., Tarczynski, M., Shen, B., & Leustek, T. (2005). The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosynth Res*, S. 86(3): 309-323.
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J., & Herrera-Estrella, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep*, S. 22: 63-70.
- Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2003). Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol*, S. 132(2): 597-605.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., & Takahashi, H. (2006). *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell*, S. 18(11): 3235-3251.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2005). Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J*, S. 42(3):305-314.
- Marx, A., Hoenger, A., & Mandelkow, E. (2009). Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, S. 66(11):958-966.
- Massa, G., Fasano, J., & Gilroy, S. (2003). Ionic signaling in plant gravity and touch responses. *Gravit Space Biol Bull*, S. 16(2): 71-82.
- Mattiacci, L., & Dicke, M. (1995). The parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae) discriminates between first and fifth larval instars of its host *Pieris brassicae* on the basis of contact cues from frass, silk, and herbivore-damaged leaf tissue. *J Insect Behav*, S. 8(4): 485-498.
- McCormack, E., Tsai, Y.-C., & Braam, J. (2005). Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci*, S. 10(8):383-389.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, S. 269(13): 9397-9400.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J.-P. & Noctor, G. (2010). *Arabidopsis* Glutathione Reductase1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol*, S. 153(3): 1144-1160.
- Miao, H., Wei, J., Zhao, Y., Yan, H., Sun, B., Huang, J., & Wang, Q. (2013). Glucose signalling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis. *J Exp Bot*, S. 64(4): 1097-1109.
- Miles, C., del Campo, M., & Renwick, J. (2005). Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, S. 191(2): 147-155.

- Mitra, D., Klemm, S., Kumari, P., Quegwer, J., Möller, B., Poeschl, Y., Pflug, P., Stamm, G., Abel, S. & Bürstenbinder, K. (2019). Microtubule-associated protein IQ67-Domain5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, S. 70(2): 529-543.
- Möller, B., Hove, C., Xiang, D., Williams, N., López, L., Yoshida, S., Smit, M., Datla, R. & Weijers, D. (2017). Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early *Arabidopsis* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 114(12): E2533-E2539.
- Monshausen, G., Bibikova, T., Weisenseel, M., & Gilroy, S. (2009). Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, S. 21(8): 2341-2356.
- Mugford, S., Lee, B.-R., Koprivova, A., Matthewman, C., & Kopriva, S. (2011). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism. *Plant J*, S. 65(1): 96-105.
- Mugford, S., Yoshimoto, N., Reichelt, M., Wirtz, M., Hill, L., Mugford, S., Nakazato, Y., Noji, M., Takahashi, H., Kramell, R., Gigolashvili, T., Flügge, U., Wasternack, C., Gershenzon, J., Hell, R., Saito, K. & Kopriva, S. (2009). Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell*, S. 21(3): 910-927.
- Mukhtar, M., Carvunis, A.-R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M. T., Pevzner, S. J., Donovan, S. E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M. M., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C. J., McDonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., European Union Effectoromics Consortium; Vandenhoute, J., Roth, F. P., Hill, D. E., Ecker, J. R., Vidal, M., Beynon, J., Braun, P. & Dangl, J. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science*, S. 333: 596.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. & Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, S. 104(1): 34-41.
- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y. & Ishiguro, S. (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Biosci Biotechnol Biochem*, S. 74(6): 1315-9.
- Nakano, R., Piślewska-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P., Miyahara, M., Kondo, M., Böttcher, C., Mori, M., Nishimura, M., Schulze-Lefert, P., Hara-Nishimura, I. & Bednarek, P. (2017). PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 89(2): 204-220.
- Nintemann, S., Hunziker, P., Andersen, T., Schulz, A., Burow, M., & Halkier, B. (2018). Localization of the glucosinolate biosynthetic enzymes reveals distinct spatial patterns for the biosynthesis of indole and aliphatic glucosinolates. *Physiol Plant*, S. 163(2): 138-154.
- Nocito, F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J.-C., & Sacchi, G. (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol*, S. 141: 1138-1148.

- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ*, S. 35(2): 454-484.
- Oliva, M., & Dunand, C. (2007). Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in *Arabidopsis*. *New Phytol*, S. 176(1): 37-43.
- O'Neil, K., & DeGrado, W. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci*, S. 15(2): 59-64.
- Osmont, K., Sibout, R., & Hardtke, C. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol*, S. 58: 93-113.
- Pandey, S., & Somssich, I. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, S. 150(4): 1648-1655.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., & Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J*, S. 49(1): 159-172.
- Park, C., Lee, J., Yoo, J., Moon, B., Choi, M., Kang, Y., Lee, S. M., Kim, H. S., Kang, K. Y., Chung, W. S., Lim, C. O. & Cho, M. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett*, S. 579(6): 1545-1550.
- Patel, S., Belmont, B., Sante, J., & Rexach, M. (2007). Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell*, S. 129(1): 83-96.
- Patron, N., Durnford, D., & Kopriva, S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC Evol Biol*, S. 8: 39.
- Pflug, P. (2019). *Biochemical analysis of Arabidopsis thaliana IQ67-Domain Protein 1 and related proteins*. Dissertation, Halle/Saale.
- Picton, J., & Steer, M. (1985). The effects of ruthenium red, lanthanum, fluorescein isothiocyanate and trifluoperazine on vesicle transport, vesicle fusion and tip extension in pollen tubes. *Planta*, S. 163(1): 20-26.
- Pierleoni, A., Martelli, P., & Casadio, R. (2011). MemLoc: predicting subcellular localization of membrane proteins in eukaryotes. *Bioinformatics*, S. 27(9): 1224-1230.
- Plötner, R. (2015). *Function studies and expression analysis of IQD67 – DOMAIN genes in Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Halle/Saale.
- Popova, Y., Thayumanavan, P., Lonati, E., Agrochão, M., & Thevelein, J. (2010). Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 107(7): 2890-2895.
- Pretera, T., Holtzclaw, W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1993). Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 90(7): 2965-2969.
- Prochaska, H., & Santamaria, A. (1988). Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem*, S. 169(2): 328-336.
- Prochaska, H., Santamaria, A., & Talalay, P. (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 89(6): 2394-2398.

- Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F., & Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*, S. 461(7263): 542-545.
- Ramamoorthy, K. (2015). *Identification and characterization of gcc8, a glucosinolate-related mutation of Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Halle/Saale.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D., Mitchell-Olds, T., & Kroymann, J. (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 99(17): 11223-11228.
- Reddy, A. (2001). Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol*, S. 204: 97-178.
- Reddy, A., & Day, I. (2001). Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biol*, S. 2(7): RESEARCH0024.
- Reddy, A., & Day, I. (2001). Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics*, S. 2: 2.
- Reddy, A., Reddy, V., & Golovkin, M. (2000). A calmodulin binding protein from *Arabidopsis* is induced by ethylene and contains a DNA-binding motif. *Biochem Biophys Res Commun*, S. 279(3): 762-769.
- Reichert, M., Brown, P., Schneider, B., Oldham, N., Stauber, E., Tokuhisa, J., Kliebenstein, D. J., Mitchell-Olds, T. & Gershenzon, J. (2002). Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem*, S. 59(6): 663-671.
- Rhoads, A., & Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, S. 11(5): 331-340.
- Rose, A. B. (1997). Selenate-resistant mutants in *Arabidopsis*. In W. Cram, L. DeKok, I. Stulen, C. Brunhold, & H. Rennenberg, *Sulphur Metabolism in Higher Plants* (S. 217-219). Leiden (Niederlande): Backhuys Publishers.
- Rotte, C., & Leustek, T. (2000). Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiol*, S. 124(2): 715-724.
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol*, S. 136(1): 2443-2450.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual - Third Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, S. 14 Suppl: 401-417.
- Sauter, M. (2015). Phytosulfokine peptide signalling. *J Exp Bot*, S. 66(17): 5161-9.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., & Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J*, S. 55(5): 774-786.
- Sedbrook, J., Ehrhardt, D., Fisher, S., Scheible, W.-R., & Somerville, C. (2004). The *Arabidopsis sku6/spiral1* gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell*, S. 16(6): 1506-1520.

- Shibagaki, N., & Grossman, A. (2004). Probing the function of STAS domains of the *Arabidopsis* sulfate transporters. *J Biol Chem*, S. 279(29): 30791-30799.
- Shibagaki, N., & Grossman, A. (2006). The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *J Biol Chem*, S. 281(32): 22964-22973.
- Shibagaki, N., & Grossman, A. (2010). Binding of cysteine synthase to the STAS domain of sulfate transporter and its regulatory consequences. *J Biol Chem*, S. 285(32): 25094-25102.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., & Davies, J. (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J*, S. 29(4): 475-486.
- Shirakawa, M., & Hara-Nishimura, I. (2018). Specialized vacuoles of myrosin cells: chemical defense strategy in Brassicales plants. *Plant Cell Physiol*, S. 59(7): 1309-1316.
- Smith, F., Hawkesford, M., Ealing, P., Clarkson, D., Berg, P., Belcher, A., & Warrilow, A. (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J*, S. 12(4): 875-884.
- Sønderby, I., Geu-Flores, F., & A Halkier, B. (2010). Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci*, S. 15(5): 283-290.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U., & Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot*, S. 63(4): 1525-1542.
- Svennerstam, H., Jämtgård, S., Ahmad, I., Huss-Danell, K., Näsholm, T., & Ganeteg, U. (2011). Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *New Phytol*, S. 191(2): 459-467.
- Takahashi, H. (2019). Sulfate transport systems in plants: functional diversity and molecular mechanisms underlying regulatory coordination. *J Exp Bot*, S. 70(16): 4075-4087.
- Takahashi, H., Buchner, P., Yoshimoto, N., Hawkesford, M., & Shiu, S.-H. (2012). Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Front Plant Sci*, S. 2: 119.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., & Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu Rev Plant Biol*, S. 62: 157-184.
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M., & Saito, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, S. 23(2): 171-182.
- Talalay, P., Batzinger, R., Benson, A., Bueding, E., & Cha, Y.-N. (1978). Biochemical studies on the mechanisms by which dietary antioxidants suppress mutagenic activity. *Adv Enzyme Regul*, S. 17: 23-36.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, S. 22(12): 4084-4097.
- Therrien, M., Michaud, N., Rubin, G., & Morrison, D. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev*, S. 10(21): 2684-2695.

- Ticconi, C., & Abel, S. (2004). Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci*, S. 9(11): 548-555.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N., & Fujiwara, T. (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 104(47): 18807-18812.
- Trybus, K., Waller, G., & Chatman, T. (1994). Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *J Cell Biol*, S. 124(6): 963-969.
- Ueda, H., Nishiyama, C., Shimada, T., Koumoto, Y., Hayashi, Y., Kondo, M., Takahashi, T., Ohtomo, I., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2006). AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. *Plant Cell Physiol*, S. 47(1): 164-175.
- Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenço, A., Quintino, E., Versele, M. & Thevelein, J. (2006). Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol Microbiol*, S. 59(5): 1485-505.
- Van Zeebroeck, G., Bonini, B., Versele, M., & Thevelein, J. (2009). Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Nat Chem Biol*, S. 5(1): 45-52.
- Vanneste, S., & Friml, J. (2013). Calcium: The missing link in auxin action. *Plants (Basel)*, S. 2(4): 650-75.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krähenbühl, U., Op den Camp, R. & Brunold, C. (2002). Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J*, S. 31(6): 729-40.
- Wang, K.-C., Li, H., & Ecker, J. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, S. 14 Suppl: S131-51.
- Wang, Q., Grubb, C., & Abel, S. (2002). Direct analysis of single leaf disks for chemopreventive glucosinolates. *Phytochem Anal*, S. 13(3): 152-7.
- Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M., & Saito, K. (2008). Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, S. 20(9): 2484-96.
- Wattenberg, L. (1992). Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res*, S. 52(7 Suppl): 2085s-2091s.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One*, S. 6(2): e16765.
- Weigel, D., Ahn, J., Blázquez, M., Borevitz, J., Christensen, S., Fankhauser, C., Ferrándiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M., Nguyen, J. T., Sato, S., Wang, Z.-Y., Xia, Y., Dixon, R. A., Harrison, M. J.; Lamb, C. J., Yanofsky, M. F. & Chory, J. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, S. 122(4): 1003-13.
- Wendrich, J., Yang, B.-J., Mijnhout, P., Xue, H.-W., De Rybel, B., & Weijers, D. (2018). IQD proteins integrate auxin and calcium signaling to regulate microtubule dynamics during *Arabidopsis* development. *bioRxiv*.

- Weyhe, M., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Scheel, D., & Lee, J. (2014). Ménage à trois: the complex relationships between mitogen-activated protein kinases, WRKY transcription factors, and VQ-motif-containing proteins. *Plant Signal Behav*, S. 9(8): e29519.
- White, P., Bowen, H., Demidchik, V., Nichols, C., & Davies, J. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta*, S. 1564(2): 299-309.
- Win, J., & Kamoun, S. (2004). *pCB301-p19: A binary plasmid vector to enhance transient expression of transgenes by agroinfiltration*. Von KamounLab: https://kamounlab.dreamhosters.com/pdfs/pCB301_p19.pdf abgerufen
- Winters, M., Lamson, R., Nakanishi, H., Neiman, A., & Pryciak, P. (2005). A membrane binding domain in the ste5 scaffold synergizes with gbetagamma binding to control localization and signaling in pheromone response. *Mol Cell*, S. 20(1): 21-32.
- Wirtz, M., & Hell, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol*, S. 163(3): 273-86.
- Wirtz, M., Berkowitz, O., Droux, M., & Hell, R. (2001). The cysteine synthase complex from plants. Mitochondrial serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* carries a bifunctional domain for catalysis and protein-protein interaction. *Eur J Biochem*, S. 268(3): 686-93.
- Wittstock, U., & Burow, M. (2010). Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book*, S. 8: e0134.
- Wittstock, U., & Halkier, B. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci*, S. 7(6): 263-70.
- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E., Olsen, C., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J. & Vogel, H. (2004). Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 101(14): 4859-64.
- Wittstock, U., Kliebenstein, D., Lambrix, V., Reichelt, M., & Gershenzon, J. (2003). Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *Recent Adv Phytochem*, S. 37: 101-125.
- Witzel, K., Hanschen, F., Schreiner, M., Krumbein, A., Ruppel, S., & Grosch, R. (2013). Verticillium suppression is associated with the glucosinolate composition of *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS One*, S. 8(9): e71877.
- Wu, S., Xiao, H., Cabrera, A., Meulia, T., & van der Knaap, E. (2011). SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns. *Plant Physiol*, S. 157(3): 1175-86.
- Xiao, H., Jiang, N., Schaffner, E., Stockinger, E., & van der Knaap, E. (2008). A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, S. 319(5869): 1527-1530.
- Yang, B., Wendrich, J., De Rybel, B., Weijers, D., & Xue, H.-W. (2020). Rice microtubule-associated protein IQ67-Domain14 regulates grain shape by modulating microtubule cytoskeleton dynamics. *Plant Biotechnol J*, S. 18(5): 1141-1152.
- Yang, X., Wang, S.-S., Wang, M., Qiao, Z., Bao, C.-C., & Zhang, W. (2014). *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the

- actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca²⁺ concentration. *Plant Mol Biol*, S. 86(3): 225-36.
- Yap, K., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., & Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics*, S. 1(1):8-14.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2003). Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, S. 131(4): 1511-7.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Saito, K., & Takahashi, H. (2007). Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiol*, S. 145(2): 378-88.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F., Yamaya, T., & Saito, K. (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J*, S. 29(4): 465-73.
- Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., & Poovaiah, B. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front Plant Sci*, S. 6: 600.
- Zhang, B., Pasini, R., Dan, H., Joshi, N., Zhao, Y., Leustek, T., & Zheng, Z.-L. (2014). Aberrant gene expression in the *Arabidopsis* *SULTR1;2* mutants suggests a possible regulatory role for this sulfate transporter in response to sulfur nutrient status. *Plant J*, S. 77(2): 185-97.
- Zhang, J., Pontoppidan, B., Xue, J., Rask, L., & Meijer, J. (2002). The third myrosinase gene *TGG3* in *Arabidopsis thaliana* is a pseudogene specifically expressed in stamen and petal. *Physiol Plant*, S. 115(1): 25-34.
- Zhang, L., Kawaguchi, R., Morikawa-Ichinose, T., Allahham, A., Kim, S.-J., & Maruyama-Nakashita, A. (2020). Sulfur deficiency-induced glucosinolate catabolism attributed to two β -Glucosidases, BGLU28 and BGLU30, is required for plant growth maintenance under sulfur deficiency. *Plant Cell Physiol*, S. 61(4): 803-813.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc*, S. 1(2): 641-6.
- Zhang, Y., & Tang, L. (2007). Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol Sin*, S. 28(9): 1343-54.
- Zhang, Y., Li, J., & Tang, L. (2005). Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, S. 38(1): 70-7.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.-G., & Posner, G. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 89(6): 2399-403.
- Zhao, K., Chu, S., Zhang, X., Wang, L., Rono, J., & Yang, Z. (2020). AtWRKY21 negatively regulates tolerance to osmotic stress in *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot*, S. 169: 103920.
- Zheng, Z., Qamar, S., Chen, Z., & Mengiste, T. (2006). *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, S. 48(4): 592-605.

- Zheng, Z.-L., Zhang, B., & Leustek, T. (2014). Transceptors at the boundary of nutrient transporters and receptors: a new role for *Arabidopsis* SULTR1;2 in sulfur sensing. *Front Plant Sci*, S. 5: 710.
- Ziegler, J., Quegwer, J., Schubert, M., Erickson, J., Schattat, M., Bürstenbinder, K., Grubb, C. D. & Abel, S. (2014). Simultaneous analysis of apolar phytohormones and 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid by high performance liquid chromatography/electrospray negative ion tandem mass spectrometry via 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization. *J Chromatogr A*, S. 1362: 102-9.

4 Anhang

A

SULTR1;1	SULTR1;2	SULTR1;3	SUL1	SUL2	
	72,74	70,99	26,2	25,95	SULTR1;1
		83,84	24,93	26,78	SULTR1;2
			25,68	26,07	SULTR1;3
				62,49	SUL1
					SUL2

B

SULTR1;2	SULTR1;3	
66,13	64,52	SULTR1;1
	84,68	SULTR1;2

Abb. A 1: Aminosäuresequenzhomogenität zwischen Sulfattransportern in *A. thaliana* und *S. cerevisiae* sowie SULTR-STAS-Domänen

Die Aminosäuresequenzähnlichkeit wurde mithilfe der Software *Jalview* (www.jalview.org) für Vollängen Sulfattransporter (**A**) aus *A. thaliana* (SULTR1;1, SULTR1;2, SULTR1;3), *S. cerevisiae* (SUL1, SUL2) und für die STAS-Domäne von SULTR1;1-3 (**B**) berechnet.

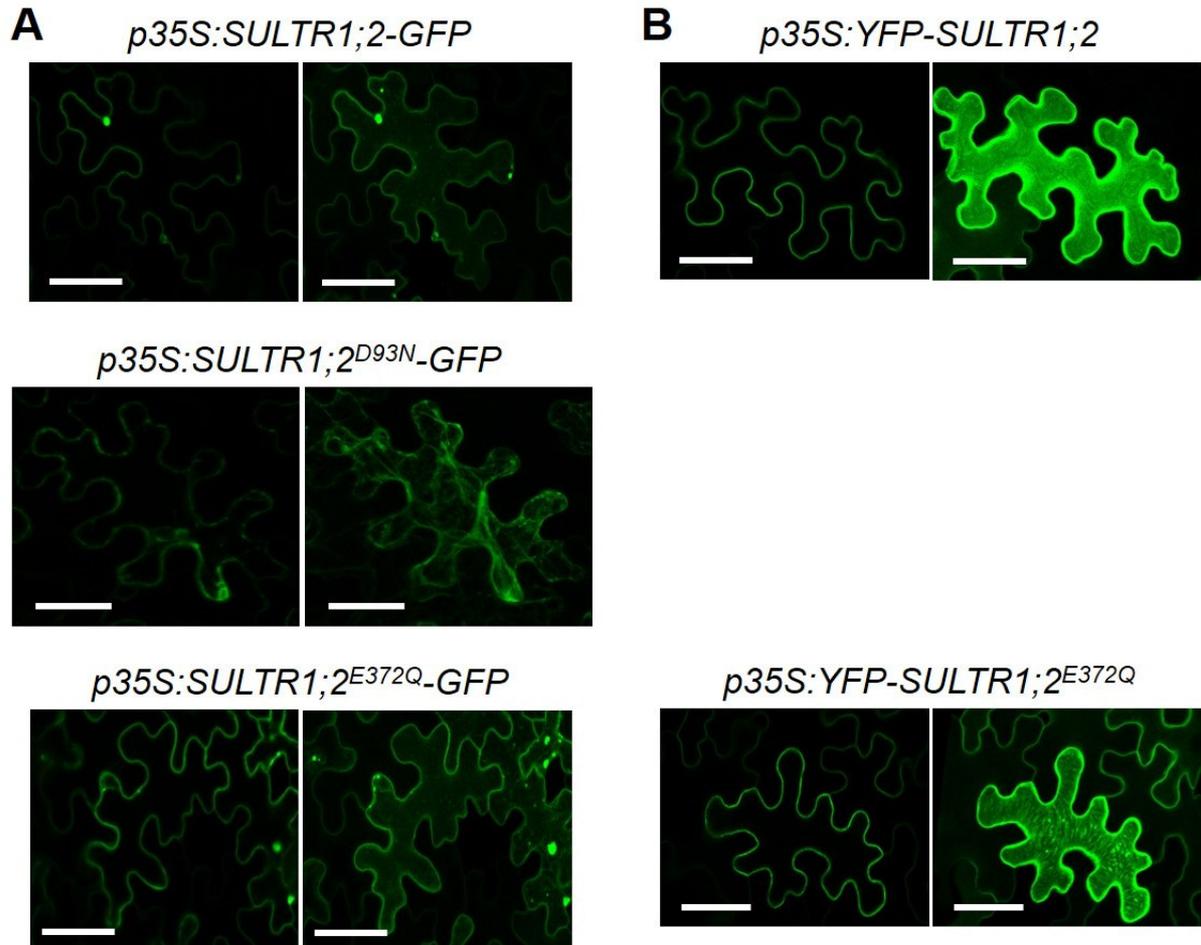


Abb. A 2: Subzelluläre Lokalisation von SULTR1;2-Varianten mit C- bzw. N-terminaler Fluoreszenzmarkierung in *N. benthamiana*

Lokalisation von SULTR1;2-Varianten mit C-terminaler GFP-Fusion (**A**) bzw. N-terminaler YFP-Fusion (**B**) in Epidermiszellen von transient transformierten *N. benthamiana* Blättern. Das linke Bild zeigt jeweils eine Aufnahme einer Ebene im Querschnitt der Zelle. Das rechte Bild zeigt die Überlagerung mehrerer Ebenen über die gesamte Höhe der Zelle. Für das Konstrukt *p35S:YFP-SULTR1;2^{D93N}* wurde kein Fluoreszenzsignal detektiert. Maßstab = 50 µm

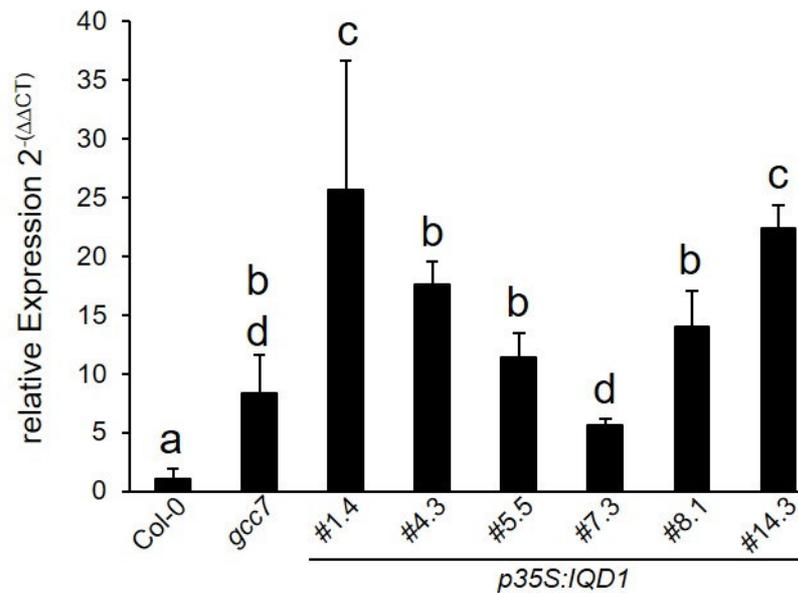


Abb. A 3: Transkriptanalyse von *IQD1* in Wildtyp, *gcc7* und *p35S:IQD1*-Linien

qRT-PCR Analyse der *IQD1*-Transkripte in Sprossgewebe von Wildtyp (Col-0), *activation tagged* Linie *gcc7* und *IQD1*-Überexpressionslinien (*p35S:IQD1* Linie #1.4, #4.3, #5.5, #7.3, #8.1, #14.3). Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmenge ($2^{-\Delta\Delta CT}$) relativ zu Col-0. Es wurden jeweils drei biologische Replikate mit jeweils 10-15 Individuen gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien berechnet auf Grundlage der ΔC_T -Werte durch einfaktorielles ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

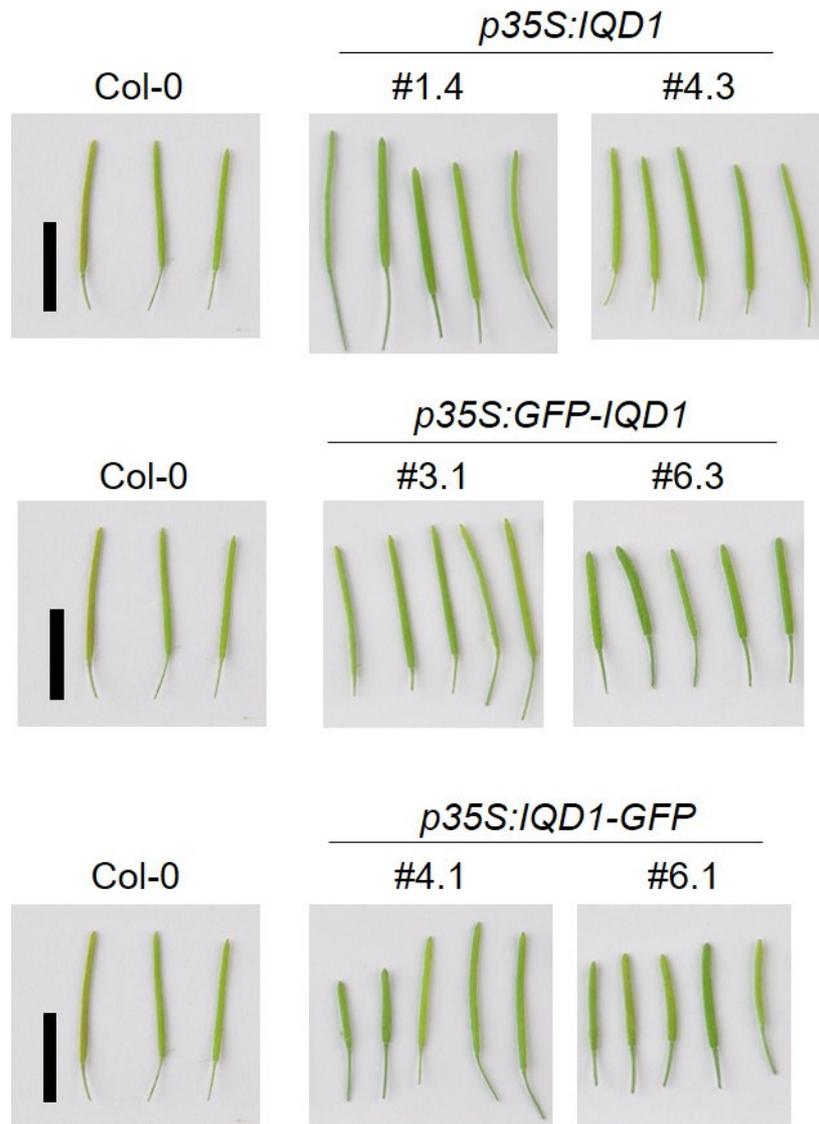


Abb. A 4: Schotenphänotypen von *IQD1*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp

Dargestellt sind reife Schoten vom Haupttrieb adulter Pflanzen. Die Pflanzen wurden sechs Wochen auf Erde angezogen. Maßstab = 1 cm

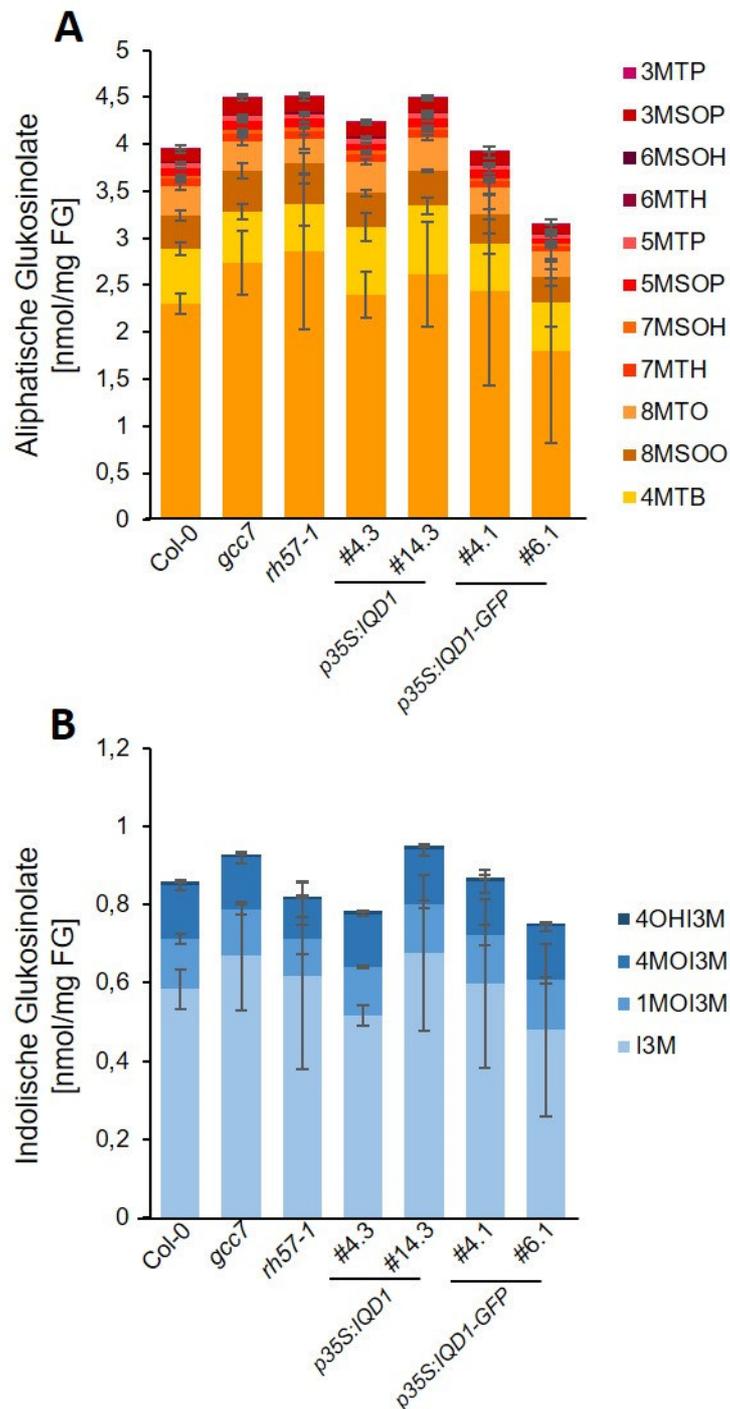


Abb. A 5: Glukosinolatgehalt von *IQD1*- und *RH57*-Missexpressionslinien auf Erde

Die Diagramme zeigen den GSL-Gehalt pro Frischgewicht im Sprossgewebe von Col-0, *gcc7*, *rh57-1*, *p35S:IQD1* (#1.4, #14.3) und *p35S:IQD1-GFP* (#4.1, #6.1) Linien. Die Pflanzen wurden drei Wochen auf Erde angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL. Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe addiert. Es wurden drei bzw. vier biologische Replikate gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$) berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

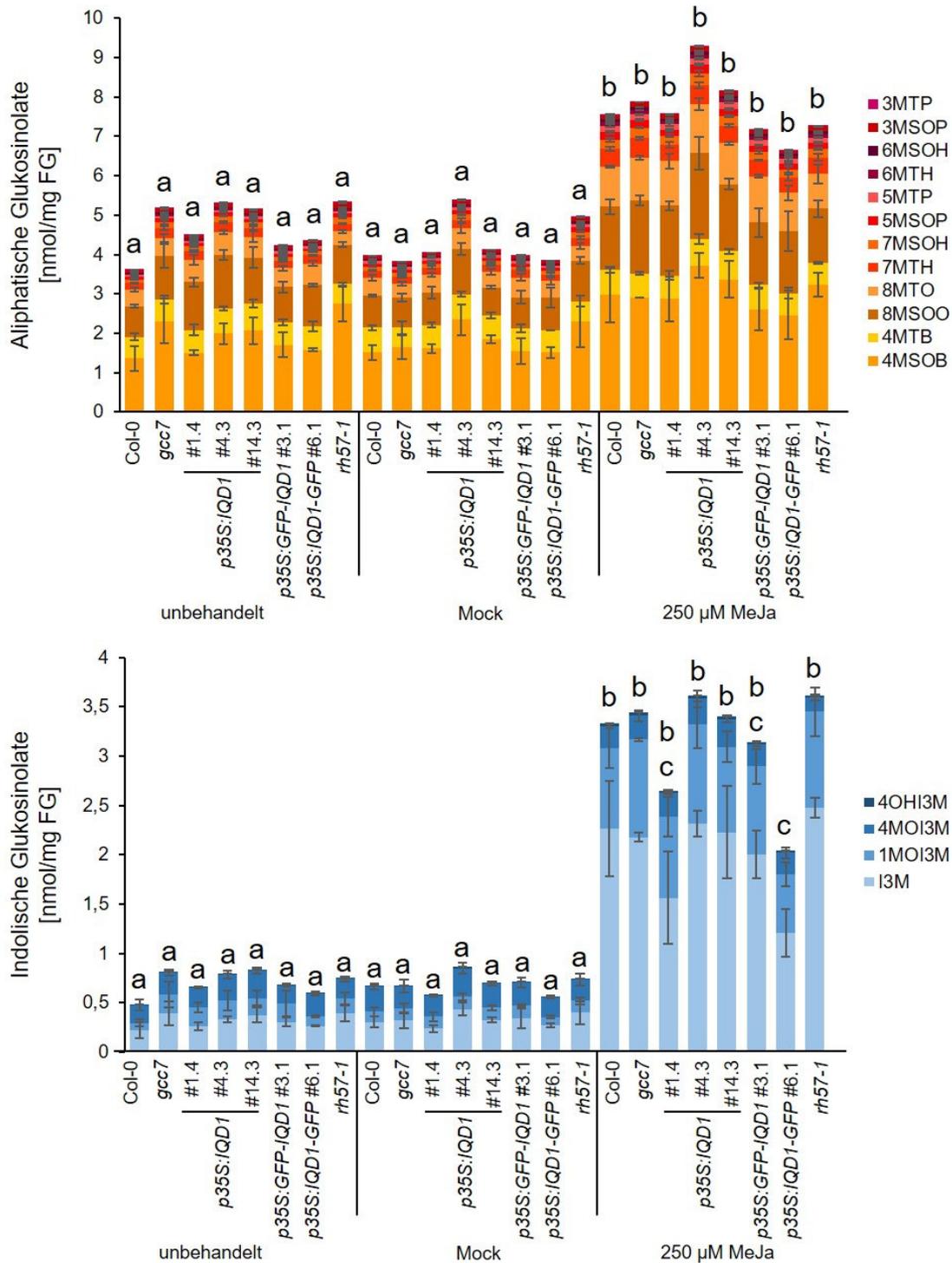


Abb. A 6: Glukosinolatgehalt von *IQD1*- und *RH57*-Missexpressionslinien nach Jasmonatbehandlung

GSL-Gehalt pro Frischgewicht im Sprossgewebe. Die Pflanzen wurden zwei Wochen horizontal auf ATS-Medium angezogen und mit 70% (v/v) Ethanol (Mock) bzw. 250 µM MeJa besprüht. 48 h nach der Behandlung wurden jeweils drei biologische Replikate gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GSL. Für den Gesamtgehalt wurden die Mittelwerte der GSL pro Gruppe addiert. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien berechnet durch einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

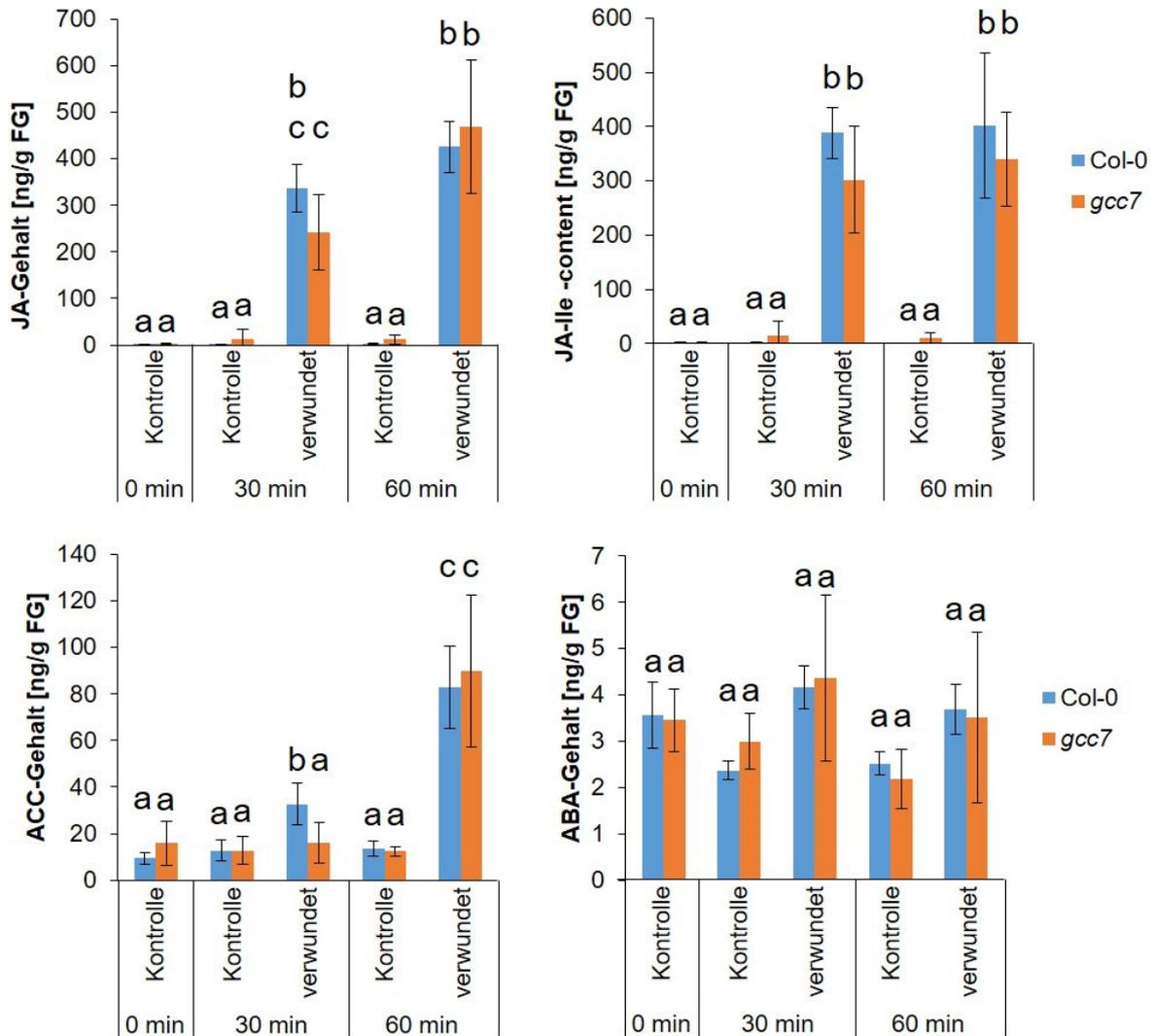


Abb. A 7: Phytohormongehalt von Col-0 und gcc7 nach Verwundung

Gehalt von Jasmonat (JA), Jasmonat-Isoleucin (JA-Ile), 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) und Abscisinsäure (ABA) je Frischgewicht (FG). Die Pflanzen wurden vier Wochen auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Zur Messung wurde das oberirdische Sprossgewebe geerntet. Für die Behandlung wurden die Pflanzen mit einer Pinzette verwundet. Nach 30 bzw. 60 min wurden verwundet und unverwundete Pflanzen (Kontrolle) geerntet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden drei bis fünf biologische Replikate mit je drei Individuen gemessen. Verschiedene Buchstaben symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Linien berechnet durch einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc-Test ($P < 0,05$).

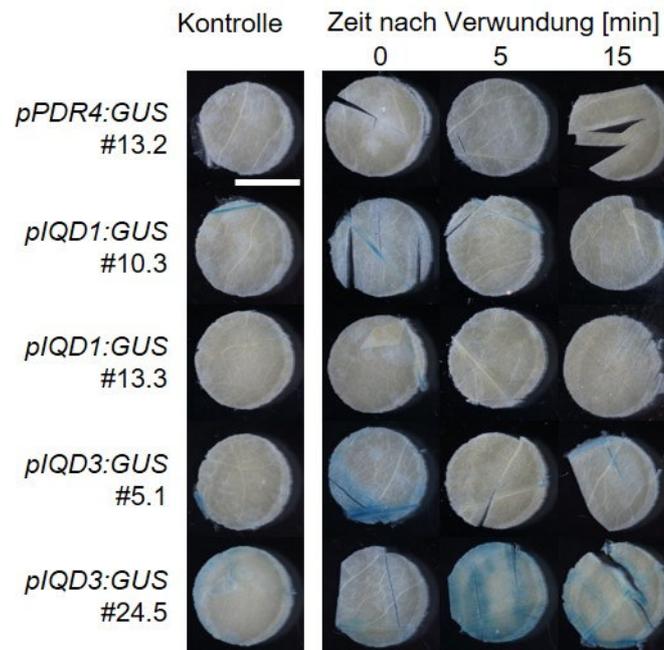


Abb. A 8: Promotoraktivität von *IQD1* und *IQD3* nach Verwundung

Rosettenblätter von sechs Wochen alten auf Erde angezogenen Reporterlinien *pIQD1:GUS* (#10.3, #13.3) und *pIQD3:GUS* (#5.1, #24.5). Die Blätter wurden an der Pflanze mit einer Rasierklinge verwundet. Nach angegebener Zeit wurden Blattstücke mit einem Korkbohrer aus den Blättern entfernt und nach einer Fixierung mit 90%igen (v/v) Aceton in den Färbepuffer übertragen. Als Kontrolle diente eine Linie (*pPDR4:GUS*), für die der gleiche GUS-Vektor verwendet wurde. Maßstab = 5 mm. Die GUS-Färbereaktion erfolgte über Nacht.

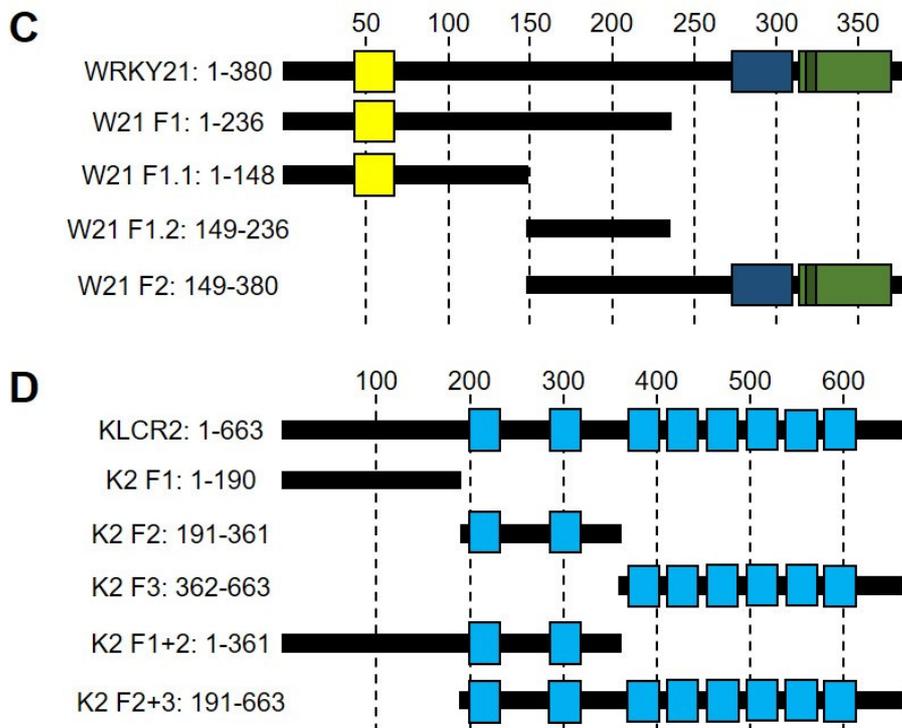
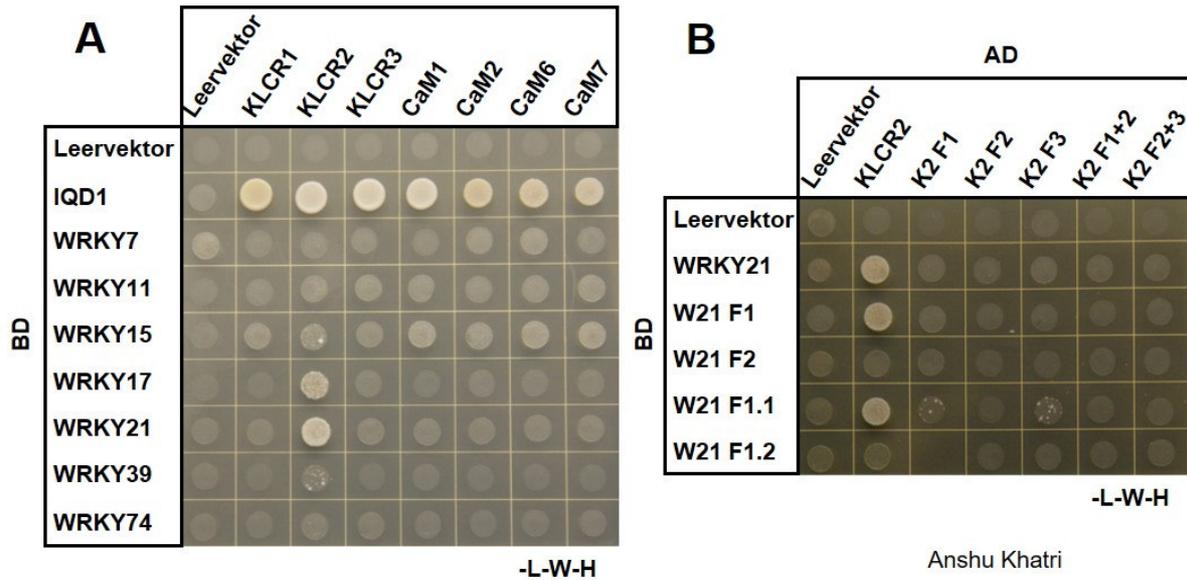


Abb. A 9: Interaktionsstudien via Hefe-2-Hybrid Analyse für WRKY-Proteine

A Interaktion von IQD1 und WRKY Transkriptionsfaktoren der Gruppe IId mit KLCR- und CaM-Proteinen
B Interaktion von WRKY und Fragmente von WRKY21 mit KLCR2 und dessen Fragmente. Dargestellt ist das Wachstum der Hefestämme auf dreifach Mangelmedium (ohne Leucin (L), Tryptophan (W) und Histidin (H)) AD = Aktivierungsdomäne, BD = DNA-Bindedomäne, Leervektor = Vektor mit BD bzw. AD ohne Sequenz für Fusionsprotein. Die Versuche wurden von Anshu Khatri durchgeführt. **C** Proteinmodell von WRKY21 und den in B eingesetzten Fragmenten. Gelb = CaM-Bindungsstelle, blau = Zinkcluster Domäne (pfam10533), grün = WRKY Domäne mit WRKY-Motiv (dunkelgrün) **D** Proteinmodell von KLCR2 und den in B eingesetzten Fragmenten. Hellblau = Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR) Die Länge der Fragmente sind über die AS angegeben.



Abb. A 10: Expressionsdomänen von *IQD 1-4* und *KLCR 1-3* in adulten Pflanzen

Blüten, Schoten, Stengelabschnitte und Blätter sechs Wochen alter Individuen der GUS-Reporterlinien. Die Pflanzenteile wurden nach dem Entfernen von der Pflanze direkt in Färbepuffer übertragen. Die verwundeten Blätter wurden vorher an der Pflanze mit einer Rasierklinge angeritzt. Die GUS-Färbereaktion wurde über Nacht durchgeführt. Maßstab = 1 cm

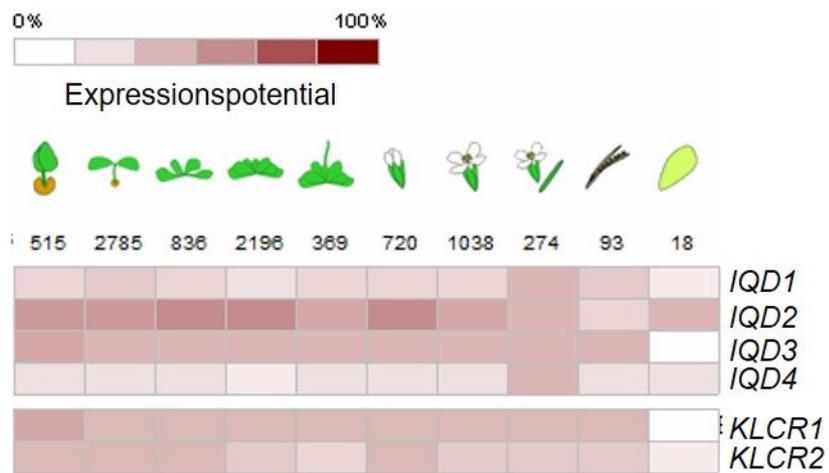


Abb. A 11: Expressionspotenzial für *IQD* und *KLCR* während der Pflanzenentwicklung

Expressionsdaten der Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen zusammengefasst mithilfe von *Genevestigator* (www.genevestigator.com; Hruz *et al.*, 2008). Unter den Symbolen ist die Anzahl der Proben angegeben.

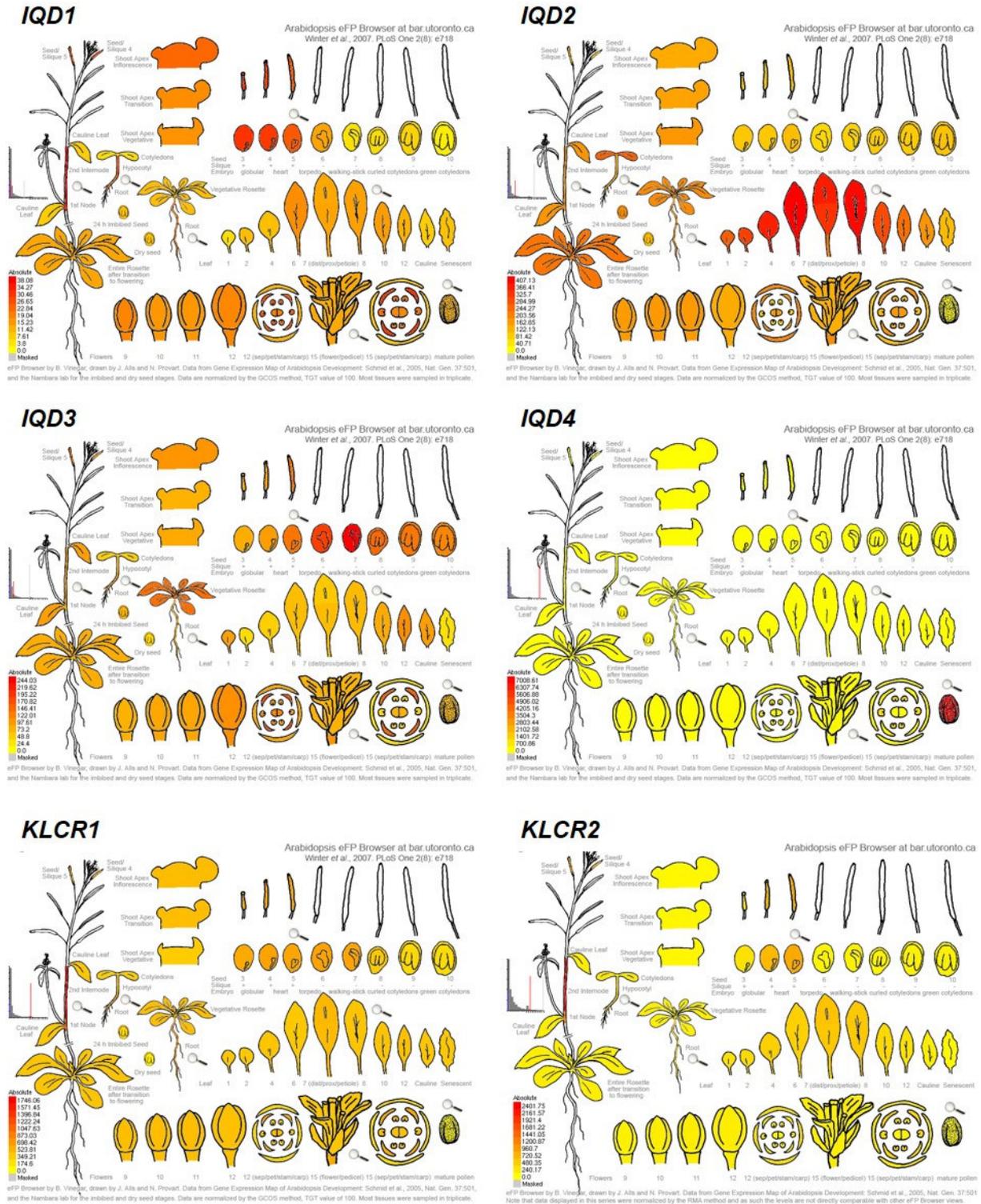


Abb. A 12: Expressionsmuster von *IQD1* und *KLCR* während der Pflanzenentwicklung

Expressionsdaten der Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen zusammengefasst mithilfe des *BAR eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter *et al.*, 2007). Rote Färbung bedeutet eine hohe, gelb eine geringe Expression. Da sich die Expressionsstärken stark unterscheiden, ist die Skala auf das jeweilige Gen bezogen und nicht zum Vergleich der Expressionsstärke zwischen den Genen geeignet.

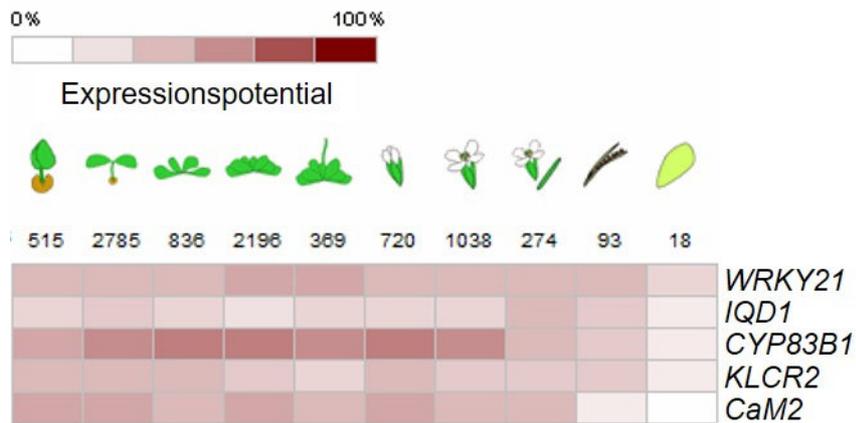


Abb. A 13: Expressionspotenzial für *WRKY21*, *IQD1*, *CYP83B1*, *KLCR2* und *CaM2* während der Pflanzenentwicklung

Expressionsdaten der Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen zusammengefasst mithilfe von *Genevestigator* (www.genevestigator.com; Hruz *et al.*, 2008). Unter den Symbolen ist die Anzahl der Proben angegeben.

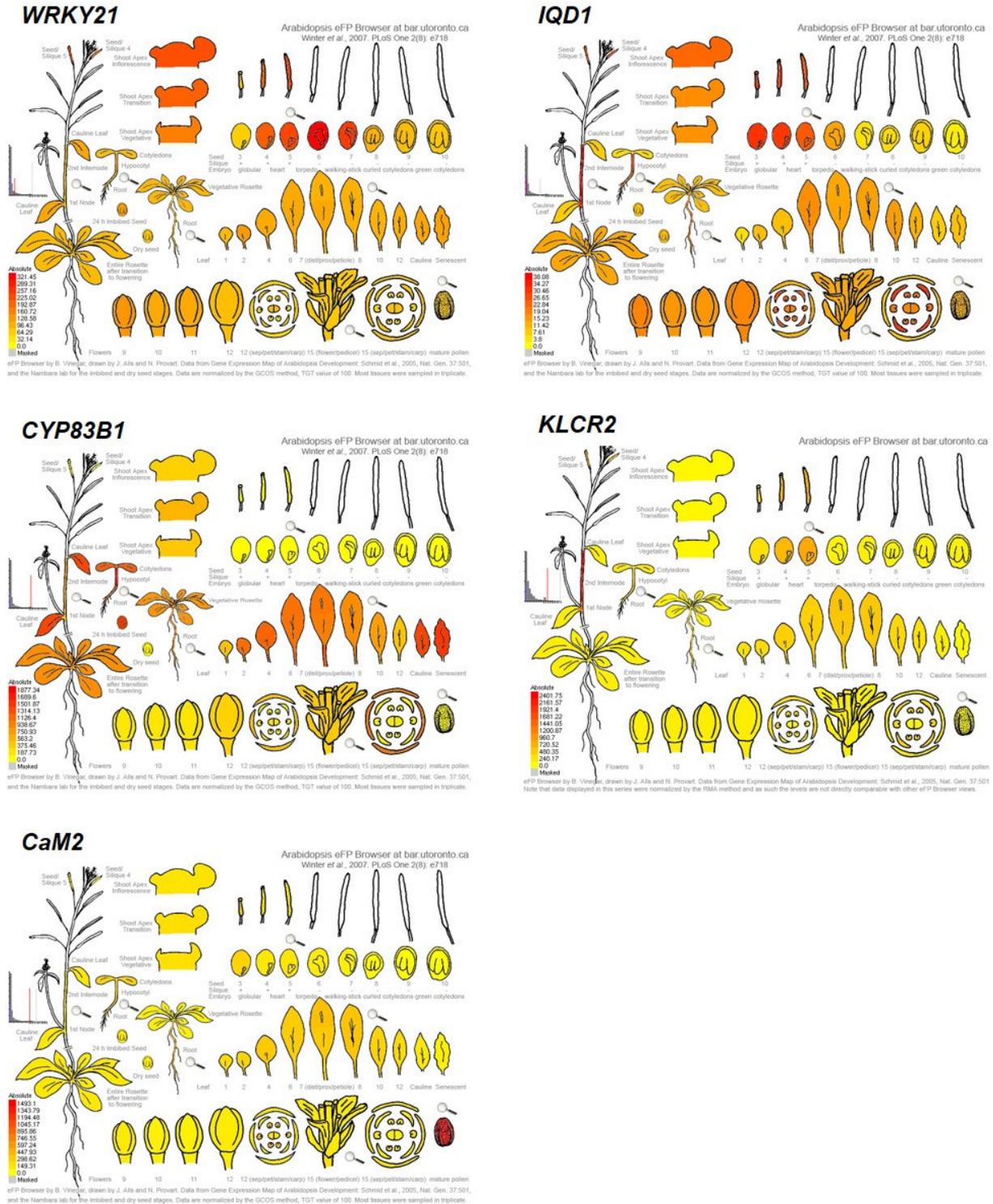


Abb. A 14: Expressionsmuster von WRKY21, IQD1, CYP83B1, KLCR2 und CaM2 während der Pflanzenentwicklung

Expressionsdaten der Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen zusammengefasst mithilfe des *BAR eFP Browser* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Winter *et al.*, 2007). Rote Färbung bedeutet eine hohe, gelb eine geringe Expression. Da sich die Expressionsstärken stark unterscheiden, ist die Skala auf das jeweilige Gen bezogen und nicht zum Vergleich der Expressionsstärke zwischen den Genen geeignet.

5 Danksagung

Zuerst möchte ich Dr. Katharina Bürstenbinder danken für die unermüdliche und exzellente Unterstützung bei allen Aspekten der wissenschaftlichen Arbeit und in den schwierigen Situationen während der gesamten Zeit bis zur Fertigstellung dieser Dissertation. Die unzähligen Ratschläge, Hinweise und Hilfestellungen für Vorträge, Texte und eine wissenschaftlich korrekte Arbeitsweise prägen meine berufliche und persönliche Entwicklung maßgeblich und nachhaltig.

Prof. Dr. Steffen Abel danke ich für die Möglichkeit an diesen interessanten Projekten zu arbeiten sowie für die Unterstützung, Geduld und die wissenschaftliche Freiheit in dieser Zeit.

Prof. Dr. Ingo Heilmann danke ich für den regelmäßigen kritischen Blick auf meine Arbeit, für die motivierenden Diskussionen und Hinweise auf weiterführende Aspekte und Experimente.

Dr. Jörg Ziegler möchte ich für die Ermöglichung und die tolle Zusammenarbeit bei der Messung von Glukosinolaten und Phytohormonen danken.

Außerdem möchte ich allen KollegInnen im Labor für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Vielen Dank Paul Pflug und Marcus Heisters für das langjährige Teilen von Freud und Leid im Laboralltag und Gina Stamm für die ständige Hilfsbereitschaft und beeindruckende Übersicht über alle Laborbestände. Danke an Prathibha Kumari, Dipannita Mitra, Anshu Khatri, Sandra Klemm, Malte Kölling, Lukas Müller, Luise Zergiebel, Romina Plötner sowie Stefan Mielke, Michael Niemeyer, Marlene Zimmer, Martin Weyhe, Juliane Rausche, Fabian Trempel und Philipp Janitza. Durch Euch war das IPB für mich niemals nur ein Arbeitsplatz.

Nicht zuletzt danke ich meinem Bruder und Anne und allen meinen Freunden und Bekannten, die mich in dieser Zeit begleitet haben und bei denen mir immer wieder klar wurde, was neben der Wissenschaft im Leben wichtig ist.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und unter großen Entbehrungen mir immer alles ermöglicht haben. DANKE!

6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jakob Quegwer
Geburtsdatum	07. Juli 1987
Geburtsort	Görlitz

Ausbildung

06/2013 – 12/2018	Doktorand Abteilung „Molekulare Signal Verarbeitung“ Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle/Saale
10/2010 – 05/2013	Master of Science – Biologie (Note: 1,6) Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg (MLU) Masterarbeit: Funktionelle Charakterisierung von <i>Phosphate Deficiency Response 4</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Note: 1,3)
10/2007 - 09/2010	Bachelor of Science – Biologie (Note: 2,0) Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg (MLU) Bachelorarbeit: Auswirkung von Trockenstress auf die Etablierung von ozeanisch und kontinental verbreiteten Pflanzenarten (Note: 1,3)
06/2006	Abitur (Note: 2,4) Joliot-Curie-Gymnasium Görlitz Leistungskurse Mathematik und Biologie

Praktikum

10/2010 – 12/2010	Arbeitsgruppenpraktikum Abteilung für Biodiversität und Biotechnologie (CIBUQ) Universidad del Quindío Armenia, Kolumbien
-------------------	---

Publikationen

Mitra D, Klemm S, Kumari P, Quegwer J, Möller B, Poeschl Y, Pflug P, Stamm G, Abel S, Bürstenbinder K (2019):

Microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 70(2):529-543

(Messung des *IQD5*-Transkriptionsmenge in Rekapitulationslinien via qRT-PCR)

Bürstenbinder K, Mitra D, Quegwer J (2017):

Functions of IQD proteins as hubs in cellular calcium and auxin signaling: A toolbox for shape formation and tissue-specification in plants? *Plant Signal Behav* 12(6):e1331198

(Mitarbeit am Manuskript, Insbesondere bezüglich der Rolle von IQD-Proteinen an MT)

Ziegler J, Quegwer J, Schubert M, Erickson JL, Schattat M, Bürstenbinder K, Grubb CD, Abel S (2014):

Simultaneous analysis of apolar phytohormones and 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid by high performance liquid chromatography/electrospray negative ion tandem mass spectrometry via 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization.

J Chromatogr A 1362:102-9

(Anzucht und Bereitstellung des *Arabidopsis* Pflanzenmaterials sowie Durchführung der Hormonmessungen mittels LC-MS)

Konferenzen

Tagung Molekularbiologie der Pflanzen 2014, Dabringenhausen

Poster - "Insights in the physiological role of *IQD1* in *Arabidopsis thaliana*"

PSSC 2014, Gatersleben

Poster - "Insights in the physiological role of *IQD1* in *Arabidopsis thaliana*"

PSSC 2015, Halle / Saale

Vortrag - "The role of *IQD1* and related genes in plant defense"

PSSC 2016, Gatersleben

Poster - "Plant-specific IQ67 Domain proteins: Novel links between calcium signaling and microtubule organization?"

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den

Jakob Quegwer