

Charakterisierung der Culline AtCUL3a und  
AtCUL3b aus *Arabidopsis thaliana* als Vermittler  
von Stressantworten und deren Einfluss auf  
Entwicklungsprozesse

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Perdita Hano**

Juni 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Hanjo Hellmann  
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am: 19.07.2007

*Für Christian, weil er mich zum Lachen bringt – in Liebe*

*Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben  
und das Unerforschliche zu verehren.*

*Johann Wolfgang von Goethe*

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hanjo Hellmann gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Betreuung. Durch angeregte Diskussionen und neue Ideen hat er meine Arbeit bereichert.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster danke ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern auch für die Tricks und Kniffe, die mir so manches Experiment erleichtert haben.

Mein Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts. Durch das freundliche Betriebsklima und die ständige Hilfsbereitschaft (nicht nur fachlicher Natur) war das Erstellen dieser Arbeit erst möglich.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine jetzigen und ehemaligen Laborkolleginnen und -kollegen Henriette, Anne, Aysegül, Marc, Sascha und Jan Erik. In Labor 109 gab es immer Hilfe, Diskussionsbereitschaft, nicht zuletzt auch immer etwas zu Lachen und last but not least: Gummibärchen.

Der allerbesten TA der Welt, Verena Schade, danke ich für die unermüdliche Unterstützung, für die ein oder andere Überstunde und die perfektsten Northern-Blots die man sich vorstellen kann.

Dem Gewächshaussteam möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen. Besonders bedanke ich mich bei Monika Losensky. Nicht einmal während dieser langen Zeit, hatte sie keine Zeit für meine kleinen (oder auch mal größeren) Sonderwünsche.

Zum Abschluss möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Dasein bedanken.

Ganz am Anfang steht Christian, der beste Footballer in meinem Leben, der mich immer unterstützt und mir Mut zugesprochen hat. Lieber Chrischi: Ohne Dich bin ich nur halb, Dir gilt meine ganze Liebe.

Liebste beste Jette, wofür soll ich mich eigentlich nicht bedanken? Gemeinsame Pausen, Kaffees, Biere, Weine und die ein oder andere durchtanzte Nacht... Deine Freundschaft hat diese Zeit enorm bereichert und ich hoffe das hört auch nicht auf.

Dem „Kücken“ schulde ich jetzt schon seit über 11 Jahren meinen Dank. Stundenlange Telefonate und einige Kiez-Runden waren und sind mir enorm wichtig. Die beste Freundin wohnt in Hamburg!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während der langen Studienzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis	I	
<hr/>		
Inhalt	I	
Abbildungsverzeichnis	IV	
Abkürzungsverzeichnis	V	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Ubiquitin-Proteasom-Weg	1
1.1.1	Culline als zentrale Untereinheiten komplexer E3-Ligasen	3
1.1.2	Der RUB-Modifikations-Weg, CSN und das CAND1 Protein	5
1.1.3	Phytohormon- und Stresssignaltransduktion und die Rolle von Cullin-abhängigen E3-Ligasen	7
1.2	AtCUL3-abhängige E3-Ligasen	11
1.3	BTB/POZ-Proteine als Substratadaptoren in BRC-Komplexen	13
1.4	NPR1: Ein BTB-Protein als potentieller Substratadaptor	15
1.5	Ziel der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Bakterien und Vektoren	21
2.1.4	Enzyme, Reaktions- und Präparations-„Kits“	22
2.1.5	Medien und Lösungen	24
2.2	Methoden	30
2.2.1	Anzuchtbedingungen und Aufbewahrung von <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.2	Anzuchtbedingungen für <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.2.3	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.4	DNA-Präparationen	31
2.2.5	Präparation von kompetenten Zellen aus <i>E. coli</i>	32
2.2.6	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	32
2.2.7	Isolierung von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.2.8	Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA und Northern-Blotting	33
2.2.9	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten und Hybridisierung	34
2.2.10	Präparation des Gesamtproteins aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.12	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.13	Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membran	35

---

2.2.14	Immunodetektion immobilisierter Proteine	35
2.2.15	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	36
2.2.16	Aufreinigung von GST-getagtem Protein aus <i>E. coli</i>	36
2.2.17	Pulldown (Co-Affinitätsaufreinigung)	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Charakterisierung der <i>cul3ako</i> - und <i>cul3bko</i> -Nullmutanten	39
3.1.1	Einfluss von Osmotica, Zuckern und Salzen auf die Keimung	39
3.1.2	Untersuchung der Expression von Genen des Sulfatassimilation	41
3.1.3	Einfluss von erhöhten Temperaturen auf Keimung und Entwicklung	42
3.1.4	Untersuchung der Expression von Hitzeschockgenen	44
3.1.5	Untersuchung der Expression von Hitzeschockfaktoren	46
3.1.6	Spezifität der beobachteten Toleranz bzw. Sensibilität bei den <i>cul3ako</i> und <i>cul3bko</i> Mutanten	47
3.2	Erzeugung einer Doppelmutante mit <i>cul3bko</i> und <i>axr1-12</i> und deren Charakterisierung	49
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung von <i>cul3bko/axr1-12</i> Doppelmutanten	50
3.2.2	Analyse der HSP-Gene in <i>cul3bko/axr1-12</i>	51
3.2.3	Einfluss von Phytohormonen auf <i>cul3bko/axr1-12</i>	52
3.2.4	Molekulare Analyse der Salicylsäureantwort	54
3.3	NPR1 als Substratadaptor	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Die Rolle von AtCUL3 bei der Stressantwort	58
4.1.1	<i>cul3ko</i> ist bei der Keimung toleranter gegenüber hohen Sulfatkonzentrationen und Temperaturen	59
4.1.2	Das HSP-Schutzsystem ist in <i>cul3ko</i> Pflanzen gestört	61
4.2	Die Rolle von AtCUL3 bei der Phytohormonsignaltransduktion	64
4.2.1	<i>cul3bko</i> und <i>cul3bko/axr1-12</i> sind sensitiv gegenüber epi-Brassinolid	64
4.2.2	<i>cul3bko</i> ist hypersensitiv gegenüber Salicylsäure	65
4.2.3	NPR1 interagiert mit <i>cul3bko in vitro</i>	66
4.2.4	Entwicklung eines Modells zur Rolle von AtCUL3b bei der Salicylsäuresignaltransduktion	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassungen</b>	<b>70</b>
5.1	Zusammenfassung	70
5.2	Summary	71
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>73</b>

---

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
7.1	Verwendete Oligonukleotide	91
7.2	Eidesstattliche Erklärung	95
7.3	Lebenslauf	96

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1-1: Schema des Ubiquitin-Proteasom-Wegs.	2
Abb. 1-2: Taxodiagramm der Cullin-Proteinfamilie in <i>A. thaliana</i> .	3
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Cullin-abhängigen E3-Ligasen.	4
Abb. 1-4: Sequenzvergleich einiger Culline mit der Konsensussequenz für eine RUB-Modifikation.	6
Abb. 1-5: Struktur und Funktion von Phytohormonen.	7
Abb. 1-6: Vergleich von AtCUL3 mit HsCUL3.	11
Abb. 1-7: Expressionsmuster von <i>AtCUL3a</i> und <i>AtCUL3b</i> .	12
Abb. 1-8: Schematische Darstellung der BTB/POZ-Proteine.	14
Abb. 1-9: Modell der Wirkungsweise von NPR1.	15
Abb. 3-1: Schematische Übersicht der verwendeten T-DNA Insertionsmutanten.	38
Abb. 3-2: Vergleichendes Keimungsverhalten von <i>cul3ako</i> und <i>cul3bko</i> .	40
Abb. 3-3: Quantifizierung des Keimungsverhaltens von <i>cul3ko</i> .	41
Abb. 3-4: Expressionsanalyse von Genen des Sulfatmetabolismus.	42
Abb. 3-5: Keimungsverhalten von <i>cul3ko</i> bei erhöhten Temperaturen.	43
Abb. 3-6: Phänotyp von <i>cul3ko</i> Pflanzen nach einem Hitzeschock.	44
Abb. 3-7: Zeitabhängige Hitzeschockantwort von <i>cul3ko</i> Nullmutanten.	45
Abb. 3-8: Verzögerte Hitzeschockantwort von <i>cul3ko</i> auf Proteinebene.	46
Abb. 3-9: RT-PCR Analyse von <i>HSF</i> -Genen in Col.0 und <i>cul3bko</i> Mutanten.	47
Abb. 3-10: Wirkung verschiedener Chemikalien auf die Keimung von <i>cul3ko</i> .	48
Abb. 3-11: RT-PCR-Analyse der <i>HSP</i> -Gene in <i>cul3bko</i> nach Induktion mit Canavanin und 2,4-Dinitrophenol.	49
Abb. 3-12: Drei Wochen alte <i>cul3bko/axr1-12</i> -Pflanzen.	50
Abb. 3-13: Zeitabhängige Hitzeschockantwort von <i>cul3bko</i> , <i>axr1-12</i> und <i>cul3bko/axr1-12</i> .	51
Abb. 3-14: Quantitative Darstellungen der Wirkung von Phytohormonen.	53
Abb. 3-15: Wurzellänge von <i>cul3bko/axr1-12</i> - Keimlingen.	54
Abb. 3-16: Expressionsanalyse von <i>PR1</i> , <i>NPR1</i> und <i>LOX2</i> nach SA-Induktion.	55
Abb. 3-17: Pulldown von AtCUL3a und AtCUL3b mit GST-NPR1 Fusionsprotein.	56
Abb. 4-1: Netzwerk der Phytohormonsignaltransduktion bei der Keimung.	59
Abb. 4-2: Modell für die Regulierung der <i>PR1</i> -Expression durch eine Interaktion von NPR1 mit AtCUL3b.	68
Abb. 4-3: Modell des Salicylsäuresignalwegs im Fall eines Knockouts von AtCUL3b.	69

---

**Abkürzungsverzeichnis**

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	MeJA	Methyljasmonat
ABA	Abscisinsäure	MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure	min	Minute
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
BAP	6-Benzylaminopurin	OD	optische Dichte
BL	epi-Brassinolid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
BSA	Bovine Serum Albumin	PEG	Polyethylenglycol
CTAB	Cetyltrimmoniumbromid	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	Umdrehungen pro Minute
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
EDFS	Ethyldiamintetraessigsäure (Fe-Salz)	s	Sekunde
EDTA	Ethyldiamintetraacetat (Na-Salz)	SA	Salicylsäure (Na-Salz)
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
GST	Glutathion-S-Transferase	T	Temperatur
GUS	β-Glucoronidase	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
h	Stunde	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HSP	Hitzeschockprotein	Triton X	Octylphenol-Polyethylenglykolether
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	UBQ	Ubiquitin
JA	Jasmonsäure	ÜNK	Über-Nacht-Kultur
kb	Kilobasen	X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure (Cyclohexylammoniumsalz)