

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemische Pflanzenpathologie

Charakterisierung des Redoxsystems in *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen  
mit gestörter NO-Homöostase

Christian Franz Holzmeister

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. B. Poppenberger-Sieberer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Durner

2. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

Die Dissertation wurde am 23.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.05.2013 angenommen.

**Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:**

Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C.: Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO-homeostasis, *Proteomics*, 11, S.: 1664-1683, 2011

**Weitere Veröffentlichungen:**

Fröhlich A., Gaupels F., Sarioglu H., Holzmeister C., Spannagl M., Durner J., Lindermayr C.: Looking deep inside: Detection of low-abundance proteins in leaf extracts of *Arabidopsis* and phloem exudates of pumpkin, *Plant Physiology*, 159, S.: 902-914, 2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VI</b>
<b>Summary.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Stickstoffmonoxid.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Funktionen von NO in Pflanzen.....	1
1.1.1.1. Einfluss von NO auf die Pflanzenentwicklung und physiologische Prozesse.....	1
1.1.1.2. Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffspezies .....	2
1.1.1.3. Funktion von NO bei der Pathogenabwehr und Zelltod-Induktion .....	4
1.1.2. Biosynthese von NO in Pflanzen .....	6
1.1.3. Wirkungsweise und Signaltransduktion von NO in Pflanzen.....	7
1.1.4. Inaktivierung von NO in Pflanzen.....	11
1.2. <b>Alkohol-Dehydrogenasen.....</b>	<b>14</b>
1.2.1. Klassifizierung von Alkohol-Dehydrogenasen.....	14
1.2.2. Bedeutung von Alkohol-Dehydrogenasen in Pflanzen .....	14
1.2.3. Die duale Funktion von Alkohol-Dehydrogenase 2 .....	15
1.2.4. Physiologische Rolle von GSNO-Reduktase unter Stressbedingungen.....	17
1.3. <b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1. <b>Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Pflanzenlinien .....	21
2.1.2. Bakterienstämme .....	21
2.1.3. Antibiotika .....	22
2.1.4. Enzyme .....	22
2.1.5. Antikörper .....	22
2.1.6. Reaktionssysteme (Kits) .....	23
2.1.7. Oligonukleotide .....	23

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.8.	Vektoren.....	26
2.1.9.	Medien, Puffersysteme und Lösungen .....	28
2.1.10.	Computerprogramme und Webseiten.....	35
2.1.11.	Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.12.	Gerätschaften.....	36
2.2.	<b>Methoden</b> .....	38
2.2.1.	<u>Pflanzliche Methoden</u> .....	38
2.2.1.1.	Anzuchtbedingungen .....	38
2.2.1.2.	Pflanzenaussaat auf Erde .....	38
2.2.1.3.	Pflanzenaussaat unter sterilen Bedingungen .....	38
2.2.1.4.	Behandlung mit Paraquat .....	38
2.2.1.5.	GUS-Färbung von Pflanzengewebe.....	39
2.2.1.6.	NBT-Färbung von Pflanzengewebe .....	39
2.2.1.7.	DAB-Färbung von Pflanzengewebe.....	39
2.2.1.8.	Mikroskopie und Fotografie.....	40
2.2.2.	<u>Mikrobiologische Methoden</u> .....	40
2.2.2.1.	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	40
2.2.2.2.	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	40
2.2.2.3.	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	41
2.2.2.4.	Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	41
2.2.2.5.	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
2.2.2.6.	Bakterieninfektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
2.2.3.	<u>Molekularbiologische Methoden</u> .....	42
2.2.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	42
2.2.3.2.	Isolierung von pflanzlicher RNA .....	43
2.2.3.3.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	43
2.2.3.4.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	43
2.2.3.5.	Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	44
2.2.3.6.	Enzymatischer Verdau von DNA .....	44
2.2.3.7.	Sequenzierung von DNA .....	44
2.2.3.8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
2.2.3.9.	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.2.3.10.	Reverse-Transkriptase(RT)-Polymerase-Kettenreaktion .....	46
2.2.3.11.	Quantitative Echtzeit(qRT)-Polymerase-Kettenreaktion .....	47

2.2.3.12.Klonierung von Superoxid-Dismutasen mit dem GATEWAY-System.....	48
2.2.3.13.Klonierung des Promotor-Reportergenkonstruktes mit dem GATEWAY-System .....	49
2.2.3.14.Klonierungsreaktionen für die Komplementation mit dem GATEWAY-System .....	50
2.2.3.15.Zielgerichtete Mutagenese .....	50
2.2.4. <u>Biochemische Methoden</u> .....	51
2.2.4.1. Isolierung von Proteinen aus Pflanzenmaterial .....	51
2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	52
2.2.4.3. 1D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	52
2.2.4.4. Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese .....	53
2.2.4.5. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen .....	53
2.2.4.6. 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	54
2.2.4.7. Silber-Färbung von Proteinen auf 2D-Gelen .....	54
2.2.4.8. Transfer von Proteinen mittels Western Blot .....	54
2.2.4.9. Immunodetektion von Proteinen .....	55
2.2.4.10.Heterologe Testexpression und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen .....	56
2.2.4.11.Heterologe Überexpression und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen .....	56
2.2.4.12.Behandlung rekombinant hergestellter SODs mit NO-Donoren .....	57
2.2.4.13.Bestimmung der Enzymaktivität von Superoxid-Dismutase.....	58
2.2.4.14.Bestimmung der Enzymaktivität von GSNO-Reduktase .....	59
2.2.4.15.Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion-Reduktase.....	59
2.2.4.16.Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion-Peroxidase.....	60
2.2.4.17.Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion S-Transferase.....	60
2.2.4.18.Bestimmung des Glutathion-Gehaltes .....	60
2.2.4.19.Bestimmung thiolhaltiger Komponenten des Glutathion-Stoffwechsels.....	61
2.2.4.20.Gasphasen-Chemilumineszenz zur Bestimmung von NO-Metaboliten.....	62
2.2.5. <u>Datenverarbeitung und computergestützte Auswertung</u> .....	63
2.2.5.1. Digitalisierung und quantitative Auswertung von 2D-Gelen .....	63
2.2.5.2. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen .....	63
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
3.1. <b>Molekulare Charakterisierung der <i>gsnor</i> Knock-out Linie</b> .....	<b>65</b>
3.1.1. Die Struktur des GSNO-Reduktase Gens.....	65
3.1.2. Eigenschaften und Sequenzvergleich des GSNO-Reduktase Proteins.....	66
3.1.3. Überprüfung der T-DNA Insertion in der <i>gsnor</i> Knock-out Linie .....	67

3.1.4.	Genetische Komplementation der <i>gsnor</i> Knock-out Linie.....	68
3.1.5.	Quantitative Bestimmung von Stickstoffoxiden und Nitrosoverbindungen .....	69
3.1.6.	Analyse der gewebespezifischen Expression des GSNO-Reduktase Gens.....	70
3.2.	<b>Phänotypische Charakterisierung der <i>gsnor</i> Knock-out Linie.....</b>	<b>72</b>
3.2.1.	Einfluss von GSNO-Reduktase auf Keimung und Wurzelwachstum .....	72
3.2.2.	Einfluss von GSNO-Reduktase auf Blatt- und Sprossentwicklung .....	73
3.2.3.	Einfluss von GSNO-Reduktase auf Blüten- und Schotenbildung .....	74
3.3.	<b>Untersuchung der biotischen Stressantwort der <i>gsnor</i> Knock-out Linie nach Pathogeninfektion mittels quantitativer Proteomanalyse.....</b>	<b>76</b>
3.3.1.	Rahmenbedingungen der differentiellen Proteomanalyse .....	76
3.3.2.	Quantitative Auswertung differentiell regulierter Proteine nach Infektion.....	77
3.3.3.	Massenspektrometrische Identifizierung differentiell regulierter Proteine .....	78
3.3.4.	Analyse von Proteinmustern und deren zeitliche Veränderung .....	78
3.3.5.	Vergleich und funktionelle Klassifizierung der identifizierten Proteine .....	81
3.4.	<b>Untersuchung der oxidativen Stressantwort der <i>gsnor</i> Knock-out Linie nach Herbizidbehandlung mit Paraquat.....</b>	<b>83</b>
3.4.1.	Vergleichende Untersuchung der Paraquat-Sensitivität .....	83
3.4.2.	Einfluss reduzierter und erhöhter NO-Gehalte auf Paraquattoleranz .....	86
3.4.3.	Auswirkung von Paraquat auf SOD-Aktivität und Superoxid-Akkumulation.....	88
3.4.4.	Einfluss von Paraquat auf den Glutathiongehalt und die Aktivität Glutathion- abhängiger Enzyme .....	90
3.4.5.	Auswirkung reduzierter und erhöhter Glutathion-Gehalte auf Paraquattoleranz....	93
3.4.6.	Einfluss von NO-Begasung auf die Glutathion-Biosynthese .....	95
3.5.	<b><i>In-vitro</i> Regulation der Aktivität von Superoxid-Dismutasen durch NO.....</b>	<b>97</b>
3.5.1.	Analyse der Genexpression von Superoxid-Dismutasen .....	97
3.5.2.	Klonierung und rekombinante Expression von Superoxid-Dismutasen .....	98
3.5.3.	Überprüfung der heterolog hergestellten Superoxid-Dismutasen.....	101
3.5.4.	<i>In-vitro</i> Regulation der SOD-Aktivität durch Behandlung mit NO-Donoren.....	103
3.5.5.	<i>In-vitro</i> Immunodetektion nitrierter Superoxid-Dismutasen .....	105
3.5.6.	Massenspektrometrische Analyse nitrierter Tyrosinreste am Beispiel der MnSOD	106
3.5.7.	<i>In-silico</i> Modellierung einer 3D-Struktur von MnSOD .....	106
3.5.8.	Strukturelle Bedeutung von Tyrosin 63 für die MnSOD-Aktivität .....	108

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1.	Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität resultiert in einem pleiotrophen Phänotyp und einer veränderten NO-Homöostase .....	110
4.2.	Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität hat keine Auswirkungen auf das Resistenzverhalten gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> .....	114
4.3.	Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität führt zu einer veränderten Proteinexpression nach <i>Pseudomonas syringae</i> -Infektion .....	115
4.4.	Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität vermittelt Toleranz gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress .....	118
4.5.	Interpretationsmöglichkeiten in Bezug auf das induzierte antioxidative System in <i>gsnor</i> Knock-out Linien.....	122
4.6.	MnSOD als Zielprotein für die <i>in-vitro</i> Inhibierung durch Peroxynitrit und strukturelle Aspekte der Nitrierung von Tyrosin 63 .....	126
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>150</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>174</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>176</b>

## Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Radikal, dessen Spezifität als endogenes Signalmolekül sowohl durch seine Synthese als auch seine Degradation determiniert ist. Eine Möglichkeit, die intrazelluläre NO-Konzentration zu kontrollieren, stellt der Abbau von S-Nitrosoglutathion (GSNO) durch das Enzym GSNO-Reduktase dar, welches somit nicht nur eine protektive Wirkung gegenüber nitrosativen Stressbedingungen garantiert, sondern auch einen entscheidenden Einfluss auf die NO-abhängige Signaltransduktion ausübt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, welche Auswirkungen ein Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität einerseits auf die Morphologie dieser Pflanzen und andererseits auf die Abwehrreaktion nach unterschiedlichen Stressbedingungen hat. Für die Untersuchungen standen Knock-out Pflanzen zur Verfügung, die aufgrund einer Insertionsmutagenese kein funktionsfähiges Genprodukt mehr herstellen können. Bei diesen Pflanzen konnte eine höhere Akkumulation von Nitrosothiolen und Nitrat gemessen werden, was eine entscheidende Rolle der GSNO-Reduktase für den NO-Stoffwechsel impliziert. Die Dysregulation der NO-Homöostase hatte einen pleiotrophen Phänotyp zur Folge, der den gesamten Lebenszyklus der *gsnor* Insertionslinie umfasste und in einem kurzwüchsigen und stark verzweigten Habitus resultierte. Die beobachteten Wachstumsdefekte korrelierten darüber hinaus mit den Ergebnissen der Promotor-GUS Studien, die eine konstitutive Expression des GSNO-Reduktase Gens vorzugsweise im vaskulären System aufzeigte. Die dramatischen morphologischen Veränderungen deuten somit darauf hin, dass GSNO-Reduktase und damit die Regulation der NO-Verfügbarkeit von elementarer Bedeutung für die gesamte Pflanzenentwicklung ist.

Um Hinweise auf die Funktion der GSNO-Reduktase bei der Pathogenabwehr zu erhalten, wurde sowohl die R-Gen vermittelte Resistenz als auch die Basisresistenz in Infektionsversuchen mit verschiedenen *Pseudomonas syringae*-Stämmen mittels Proteomanalyse studiert. Je nach Infektionstyp konnten sowohl in Wildtyp-Pflanzen als auch in *gsnor* Insertionslinien charakteristische Veränderungen nach avirulenter und virulenter Infektion auf Proteinebene festgestellt werden, die auf eine ähnliche Abwehrstrategie hindeuten. Allerdings traten auch deutliche Unterschiede hervor, was sich sowohl in der Anzahl als auch dem Übereinstimmungsgrad differentiell regulierter Proteine widerspiegelte und auf Variationen in der Abwehrantwort hindeutet. Eine universelle Bedeutung der GSNO-Reduktase für die biotische Stressantwort lässt sich anhand der erhobenen Daten allerdings



nicht ableiten, zumal in den Mutanten auch keine Unterschiede hinsichtlich der Krankheitssymptome und der bakteriellen Vermehrungsrate beobachtet werden konnten.

Im Gegensatz dazu war der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität hingegen mit einer gesteigerten Toleranz gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress assoziiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Paraquat-tolerante Phänotyp der *gsnor* Insertionslinie auf einen Anstieg des Glutathion-Gehaltes bzw. einer Aktivitätszunahme Glutathion-abhängiger Enzyme zurückzuführen ist. NO scheint dabei über die Regulation des Glutathion-Stoffwechsels eine Stimulation des antioxidativen Systems zu induzieren, was in den transgenen Pflanzen aufgrund der erhöhten endogenen NO-Gehalte einen indirekten „Priming-Effekt“ zur Folge hat. Der positive Einfluss von NO und Glutathion auf die Herbizidverträglichkeit konnte dabei sowohl durch exogene Applikation als auch mit Hilfe von transgenen Pflanzen bestätigt werden. Zusammenfassend betrachtet wäre somit eine Rolle von GSNO-Reduktase als zellulärer Redox-Sensor denkbar, dass über die Regulation NO-abhängiger Signalwege Einfluss auf das Redoxsystem und damit auf die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies nach oxidativer Stressexposition nehmen kann.

Um den Einfluss von NO auf das antioxidative System zu untersuchen, sollte die potentielle Interaktion von NO und Superoxid-Dismutasen näher charakterisiert werden, die als erste Instanzen des antioxidativen Systems gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies fungieren. Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnten einzelne Isoformen dieser Enzymklasse als neue Kandidaten für NO-abhängige posttranslationale Proteinmodifikationen identifiziert werden. In *in-vitro* Experimenten mit dem NO-Donor Peroxynitrit zeigte sich, dass von allen rekombinant hergestellten Superoxid-Dismutasen die drei Isoformen MnSOD, FeSOD3 und CZSOD3 selektiv durch Nitrierung in ihrer Aktivität inhibiert wurden, während nach Nitrosylierung mit dem Donor GSNO keine Beeinträchtigung der Enzymfunktionen feststellbar war. Mittels Massenspektrometrie konnten bei der Isoform MnSOD verschiedene Tyrosinreste als Nitrierungsstellen detektiert werden, wobei speziell eine Modifikation des Tyrosinrestes 63 von zentraler Bedeutung zu sein scheint, da der beobachtete Aktivitätsverlust durch Mutagenese dieser Aminosäure zu einem Großteil wieder aufgehoben werden konnte.

## Summary

Nitric oxide (NO) is a gaseous radical whose specificity as an endogenous signaling molecule is determined both by its synthesis and degradation. One way to control intracellular NO levels is the breakdown of NO storage compound S-nitrosoglutathione (GSNO) by GSNO reductase, turning this enzyme into a key regulator of NO homeostasis, which not only protects from nitrosative stress but also exerts a balancing role in fine-tuning NO signaling.

The aim of this work was to shed light on the physiological importance of this enzyme for plant growth and development as well as defense responses against various stress treatments in *Arabidopsis thaliana* using a reverse genetic approach. Loss of GSNO reductase function caused an accumulation of total nitrosothiol and nitrate content indicating a crucial role of GSNO reductase for NO metabolism. As a consequence of this imbalance, *gsnor* knock-out mutants displayed a pleiotropic phenotype compromising the entire life cycle of these plants with semi-dwarfism and bushy growth as major detrimental habitus implications. The observed growth defects also correlated with results from promoter-GUS studies, which revealed a constitutive expression of GSNO reductase preferably in the vascular system throughout all stages of plant development. Hence, the dramatic morphological changes suggest that GSNO reductase and thus the regulation of NO availability seems to be critical for normal plant growth and development.

To investigate the function of GSNO reductase in disease resistance, both R-gene-mediated resistance and basal resistance was analyzed after infection with bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* using a proteomic approach. Depending on the type of infection characteristic changes of protein regulation could be observed in both wildtype plants and *gsnor* knock-out mutants after treatment with avirulent and virulent *Pseudomonas* strains, indicating a similar defense strategy of both plant lines. On the other hand evaluation of proteomic data also revealed distinct differences between both lines, since the number and the common overlap of differently regulated proteins deviate significantly from each other, suggesting variations in the defense response. However, comparing both plant lines neither the virulent nor the avirulent infection resulted in different disease symptoms or bacterial growth rates between wildtype plants and *gsnor* mutants, demonstrating that the function of GSNO reductase in plant defense response shows some redundancy.

In contrast, loss of GSNO reductase activity was associated with an increased tolerance against paraquat-induced oxidative stress, which could be explained by elevated levels of glutathione and glutathione related enzymes measured in the transgenic plants. In this case the paraquat resistant phenotype of *gsnor* knock-out plants is probably the result of an indirect priming effect mediated by the NO dependent stimulation of the GSH related antioxidative system, since these plants exhibit constitutive higher NO levels compared to wildtype plants. The positive effect of NO and glutathione on counteracting excess oxidative damage triggered by paraquat could be confirmed both via exogenous treatment of wildtype plants with NO donors as well as transgenic plants with altered endogenous NO and glutathione levels. Based on these results, it would be conceivable that GSNO reductase acts as cellular redox sensor, which affects the antioxidative system and thus the accumulation of reactive oxygen species after oxidative stress exposure via regulation of NO-dependent signaling pathways.

To further elucidate the regulatory function of NO on the antioxidative system, the direct interaction of NO and superoxide dismutases was analyzed in more detail, since this class of enzymes belongs to the first line of defense against toxic ROS accumulation by detoxifying superoxide radicals. In this case several isoforms of recombinantly produced superoxide dismutases could be identified as new target proteins for NO-dependent posttranslational modifications *in-vitro*, because treatment with NO donor peroxyntirite resulted in a dose dependent inhibition of MnSOD, FeSOD3 and CZSOD3 by tyrosine nitration. However incubation with NO donor GSNO did not affect enzymatic activities indicating that S-nitrosylation obviously does not play a role in SOD regulation. Using MnSOD for further studies, in total nine different nitrated tyrosine residues were identified in peroxyntirite treated samples by mass spectrometry, while site-directed mutagenesis revealed tyrosine residue 63 as main regulatory nitration site rendering this mutated version significantly less sensitive to peroxyntirite treatment.

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidinsalz
cADPR	Zyklische ADP-Ribose
cDNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholaminopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
C-terminal	Carboxy-terminal
Cys	Cystein
CZSOD	kupfer- und zinkhaltige Superoxid-Dismutase
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyldicarbonat
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FeSOD	eisenhaltige Superoxid-Dismutase
GA	Gibberellinsäure
GC	Guanylat-Zyklase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSNOR	S-Nitrosoglutathion-Reduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion S-Transferase
GUS	β-Glukuronidase
His	Histidin
HR	Hypersensitive Reaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

HRP	Meerrettichperoxidase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JA	Jasmonsäure
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilo Dalton
LC/MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
MALDI-MS	„Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation“-Massenspektrometrie
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
MnSOD	manganhaltige Superoxid-Dismutase
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NPR1	„Nonexpressor-of-Pathogenesis-Related-Genes1“
NR	Nitrat-Reduktase
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR1	„Pathogenesis-Related-Protein1“
PS I	Photosystem I
<i>Pst-avir</i>	<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i> DC3000 (avrRpt2)
<i>Pst-vir</i>	<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i> DC3000
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tyr	Tyrosin
Wt	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glukuronsäure

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abb. 1: Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffspezies .....	4
Abb. 2: Übersicht der NO-Produktion und deren zelluläre Lokalisation in Pflanzen. ....	7
Abb. 3: Möglichkeiten NO-abhängiger posttranslationaler Proteinmodifikationen. ....	9
Abb. 4: Darstellung der Inaktivierungsmöglichkeiten von NO .....	13
Abb. 5: Struktureller Aufbau des GSNO-Reduktase Gens .....	65
Abb. 6: Primärstruktur des GSNO-Reduktase Proteins in verschiedenen Spezies.....	67
Abb. 7: Verifikation der T-DNA Insertion.....	68
Abb. 8: Vergleich von Wt-Pflanze und komplementierter <i>gsnor</i> /GSNOR Linie .....	69
Abb. 9: Bestimmung von NO-Metaboliten.....	70
Abb. 10: Analyse der GUS-Expression unter Kontrolle des GSNO-Reduktase Promotors.....	71
Abb. 11: Phänotypische Unterschiede in der Samenmorphologie und Keimung .....	72
Abb. 12: Phänotypische Unterschiede in der Wurzelmorphologie .....	73
Abb. 13: Phänotypische Unterschiede in der vegetativen Entwicklung .....	74
Abb. 14: Phänotypische Unterschiede in der generativen Entwicklung.....	75
Abb. 15: Auftrennung der Proteinfraction aus Blattmaterial von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	79
Abb. 16: Proteinregulation in Gelabschnitt 1 nach avirulenter Infektion.....	80
Abb. 17: Proteinregulation in Gelabschnitt 2 nach virulenter Infektion.....	81
Abb. 18: Funktionelle Klassifizierung identifizierter Proteine .....	81
Abb. 19: Vergleich der Abwehrreaktionen in beiden Linien .....	82
Abb. 20: Vergleich der Keimung in Gegenwart von Paraquat .....	84
Abb. 21: Vergleich der Schadwirkung nach Vakuuminfiltration von Paraquat .....	85
Abb. 22: Vergleich der Schadwirkung nach Sprühapplikation von Paraquat .....	86
Abb. 23: Keimungsanalyse verschiedener NO-Mutanten in Gegenwart von Paraquat .....	87
Abb. 24: Vergleich der Schadwirkung nach Vorbehandlung mit NO-Donor SNAP .....	88
Abb. 25: Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen .....	89
Abb. 26: Superoxid-Akkumulation nach Sprühapplikation von Paraquat .....	90
Abb. 27: Aktivität von Glutathion-Peroxidase.....	90
Abb. 28: Wasserstoffperoxid-Akkumulation nach Sprühapplikation von Paraquat.....	91
Abb. 29: Bestimmung des Glutathion-Gehaltes.....	92
Abb. 30: Aktivität von Glutathion-Reduktase und Glutathion S-Transferase.....	93
Abb. 31: Keimungsvergleich auf Paraquat-haltigem Medium in Gegenwart von Glutathion .	94

Abb. 32: Keimungsanalyse verschiedener GSH-Mutanten in Gegenwart von Paraquat.....	95
Abb. 33: Quantitative Analyse von Thiolverbindungen der Glutathionsynthese .....	96
Abb. 34: Analyse der Transkriptmengen von SOD-Isoformen mittels RT-qPCR .....	98
Abb. 35: Ergebnis der rekombinanten Produktion von Superoxid-Dismutasen hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit .....	100
Abb. 36: Immunologischer Nachweis rekombinant produzierter SODs .....	101
Abb. 37: Überprüfung der Enzymaktivität rekombinant produzierter SODs.....	102
Abb. 38: Einfluss der <i>in-vitro</i> Behandlung mit Peroxynitrit auf die Aktivität von SOD- Isoformen.....	104
Abb. 39: Immunologischer Nachweis nitrierter Superoxid-Dismutasen .....	105
Abb. 40: 3D-Strukturmodell von MnSOD aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	107
Abb. 41: Einfluss der <i>in-vitro</i> Nitrierung auf die Aktivität von MnSOD Y63F.....	108
Abb. 42: Immunologischer Nachweis der nitrierten MnSOD Y63F-Variante.....	109
Abb. 43: Zusammenhang zwischen Paraquat und der in dieser Arbeit analysierten Komponenten des Redoxsystems .....	122
Abb. 44: Modell zur Funktion von GSNO-Reduktase als Redox-Sensor.....	126
Abb. 45: Vergrößerter Ausschnitt des aktiven Zentrums von MnSOD .....	129

## Tabellen

Tab. 1: Beispiele für charakterisierte Zielproteine mit NO-abhängiger Modifikation.....	11
Tab. 2: Gesamtzahl differentiell produzierter Proteine in beiden Linien .....	77
Tab. 3: Nitrierte Tyrosinreste von MnSOD nach <i>in-vitro</i> Behandlung mit Peroxynitrit.....	106
Tab. 4: Phänotypische Veränderungen in <i>gsnor</i> Knock-out Linien als Folge eines beeinträchtigten Hormon-Haushalts.....	113

## Anhang Abbildungen

Anhang Abb. 1: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 ( <i>avrRpt2</i> ).....	156
Anhang Abb. 2: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 .....	162
Anhang Abb. 3: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von <i>gsnor</i> Knock-out Linien nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 ( <i>avrRpt2</i> ).....	166
Anhang Abb. 4: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von <i>gsnor</i> Insertionslinien nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000.....	170

Anhang Abb. 5: Paraquat-Toleranz von <i>gsnor</i> Knock-out Linien verschiedener Ökotypen ..	171
Anhang Abb. 6: Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen.....	171
Anhang Abb. 7: Ergebnis des Testscreenings hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit rekombinant hergestellter Superoxid-Dismutasen.....	173
Anhang Abb. 8: Einfluss der <i>in-vitro</i> Behandlung mit GSNO auf die Aktivität von SOD- Isoformen .....	173

### **Anhang Tabellen**

Anhang Tab. 1: Keimungsrate und Wachstumsparameter von Wurzeln in beiden Linien....	150
Anhang Tab. 2: Wachstumsparameter von Sprossachsen in beiden Linien .....	150
Anhang Tab. 3: Wachstumsparameter von Schoten in beiden Linien.....	150
Anhang Tab. 4: Differentiell regulierte Proteine in Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 ( <i>avrRpt2</i> ).....	151
Anhang Tab. 5: Differentiell regulierte Proteine in Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000.....	157
Anhang Tab. 6: Differentiell regulierte Proteine in <i>gsnor</i> Knock-out Linien nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000 ( <i>avrRpt2</i> ).....	163
Anhang Tab. 7: Differentiell regulierte Proteine in <i>gsnor</i> Knock-out Linien nach Infektion mit <i>Pst</i> DC3000.....	167



## **1. Einleitung**

### **1.1. Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges, hochreaktives Molekül, das eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung in prokaryotischen und eukaryotischen Lebensformen spielt und als biochemischer Botenstoff eine Vielzahl zellulärer Prozesse direkt oder indirekt reguliert. Die Bedeutung von NO als Signalmolekül wurde erst Mitte der 80er Jahre nachgewiesen, als gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem endothel-abhängigen relaxierenden Faktor (EDRF) zur Erweiterung von Blutgefäßen um NO handelt (Ignarro et al., 1987, Palmer et al., 1987). Die vaskuläre Relaxierung wird dabei indirekt durch die NO-abhängige Aktivierung der Guanylat-Zyklase und die damit verbundene Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP vermittelt. Diese Entdeckung wurde 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet und bildete die Grundlage für eine intensive Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid im menschlichen und tierischen Organismus. Die biologische Wirksamkeit von NO konnte allerdings nicht nur in Säugetieren, sondern ebenfalls in phylogenetisch sehr unterschiedlichen Spezies beobachtet werden (Beligni und Lamattina, 2001). Aufgrund zahlreicher Veröffentlichungen in den letzten Jahren sind mittlerweile auch im pflanzlichen System viele Reaktionen bekannt, bei denen NO-abhängige Signalprozesse eine zentrale Rolle spielen, was die universelle Bedeutung dieses Moleküls unterstreicht (Durner et al., 1998, Delledonne et al., 1998, Wendehenne et al., 2001).

#### **1.1.1. Funktionen von NO in Pflanzen**

In Abhängigkeit von der zellulären Konzentration kann Stickstoffmonoxid einerseits regulatorische Funktionen übernehmen sowie andererseits zellschädigende Eigenschaften besitzen (Beligni und Lamattina, 1999), was im folgenden Kapitel an einigen Beispielen veranschaulicht werden soll. Der Wirkungsbereich von NO in pflanzlichen Systemen umfasst dabei nicht nur Wachstums- und Entwicklungsprozesse, sondern auch Signal- und Schutzfunktionen bei der durch biotische und abiotische Faktoren induzierten Stressantwort.

##### **1.1.1.1. Einfluss von NO auf die Pflanzenentwicklung und physiologische Prozesse**

Seit der Entdeckung von NO in Pflanzen sind mittlerweile zahlreiche physiologische Vorgänge bekannt, bei denen ein Einfluss von NO auf das Pflanzenwachstum während der gesamten Entwicklungsphase von der Keimung bis zur Samenproduktion nachgewiesen werden

konnte. In diesem Zusammenhang wurde die Eigenschaft von NO als potentieller Wachstumsregulator auch in der Literatur bereits diskutiert (Beligni und Lamattina, 2001).

Zu den durch NO regulierten Prozessen zählen beispielsweise eine Verringerung der Samendormanz (Bethke et al., 2004), Induktion der Samenkeimung (Beligni und Lamattina, 2000), Stimulation der Adventivwurzel-Bildung (Pagnussat et al., 2002) und Seitenwurzel-Bildung (Correa-Aragunde et al., 2004), Regulation der gravitropen Wurzelkrümmung (Hu et al., 2005), Hemmung der Hypokotyl- und Internodienbildung (Beligni und Lamattina, 2000), Stimulation des Blattwachstum (Leshem und Haramaty, 1996), Unterdrückung der Blütenbildung (He et al., 2004), Regulation des Pollenschlauch-Wachstums (Prado et al., 2004), Verzögerung der Seneszenz (Leshem et al., 1998) und Beeinträchtigung der Fruchtreifung (Leshem, 2000).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO sowohl die photosynthetische Aktivität (Takahashi und Yamasaki, 2002) als auch die Respiration (Zottini et al., 2002) negativ beeinträchtigt, da es Bestandteile der chloroplastidären und mitochondrialen Elektronen-Transportkette hemmt und damit auch eine effiziente ATP-Produktion verhindert. Der am besten untersuchte Einfluss von NO ist vermutlich die Schließung von Spaltöffnungen (Stomata) und damit die Regulation des Gasaustausches bzw. der Transpiration, was in Kombination mit dem Phytohormon Abszinsäure vermittelt wird (García-Mata und Lamattina, 2001, Neill et al., 2002). NO ist außerdem in der Lage, die zelluläre Eisen-Verfügbarkeit und -Mobilisierung zu erhöhen, was mit einer gesteigerten Chlorophyll-Synthese einhergeht (Graziano et al., 2002) und spielt darüber hinaus eine essentielle Rolle bei der symbiontischen Stickstoff-Fixierung zwischen Leguminosen und Rhizobien (Baudouin et al., 2006).

### **1.1.1.2. Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffspezies**

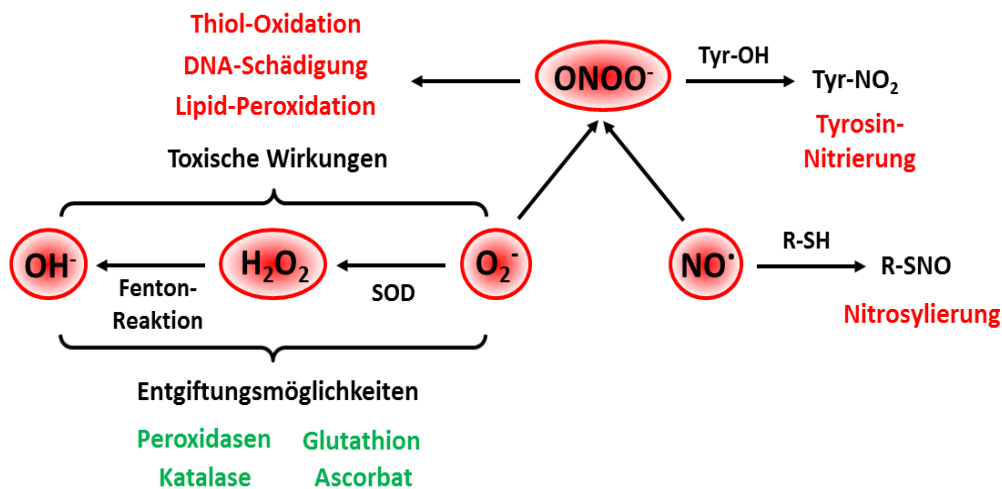
NO ist aufgrund seines Radikalcharakters und seiner Fähigkeit der Membrandiffusion in der Lage mit einer Vielzahl zellulärer Komponenten zu reagieren, wobei der Wirkungsbereich angesichts der Reaktivität räumlich und zeitlich limitiert ist (Lancaster, 1997). Die Halbwertszeit bzw. Stabilität von NO hängt dabei hauptsächlich vom Redoxstatus und der zellulären Verfügbarkeit potentieller Reaktionspartner ab (Henry et al., 1997). Besonders reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH^\cdot$ ) sind prädestiniert für eine Interaktion mit NO, da sie einerseits unter physiologischen Bedingungen permanent als Nebenprodukte von Stoffwechselprozessen generiert werden und andererseits unter Stressbedingungen - analog zur NO-Synthese - verstärkt akkumulieren (Gill und Tuteja., 2010).

Die wichtigste Interaktion zwischen NO und ROS beruht dabei auf der direkten Reaktion von NO mit  $O_2^-$  zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein starkes Oxidationsmittel, das mit einer Vielzahl anderer Moleküle (vor allem Tyrosinresten und Thiolgruppen von Proteinen) reagiert und zudem oxidative Schäden verursachen kann (Radi, 2004). Ungeachtet dessen konkurrieren NO und reaktive Sauerstoffspezies andererseits auch in ihrer Funktion als Signalmoleküle um potentielle Bindungsstellen, wobei vor allem redoxsensitive Thiolgruppen von Cysteinresten in den Blickpunkt rücken. Beispielsweise können Thiolgruppen durch ROS-Moleküle zu Disulfiden oder in mehreren Reaktionsschritten irreversibel zu Sulfonsäuren oxidiert werden, während eine Reaktion mit NO zur Ausbildung von Nitrosothiolen führt. (Spadaro et al., 2010). Eine antagonistische Wechselwirkung zwischen NO und ROS spielt vor allem bei der sexuellen Reproduktion im Rahmen der Interaktion von Pollenkörnern und Stigma eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, dass eine Veränderung des ROS/NO-Verhältnisses eine entscheidende Funktion bei der Induktion des Pollenschlauch-Wachstums und damit bei der Bestäubung und Befruchtung einnimmt (McInnis et al., 2006, Zafra et al., 2010). Eine synergistische Wirkung von ROS und NO ist hingegen unter Stressbedingungen zu beobachten, z. B. bei Salzstress (Zhang et al., 2007, Tanou et al., 2009), Wassermangel (Filippou et al., 2011), Kältestress (Airaki et al., 2012) und der Immunantwort nach Pathogenbefall (Delledonne et al., 2001).

Um eine toxische Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies zu verhindern, haben Pflanzen ein antioxidatives Schutzsystem entwickelt, damit keine unkontrollierte Schädigung zellulärer Bestandteile wie Lipide und Nukleinsäuren oder irreversible Proteinmodifikationen stattfinden (Apel und Hirt, 2004.) Hierzu zählen unter anderem Superoxid-Dismutasen (SOD) zur Detoxifizierung von  $O_2^-$  oder Katalasen und Peroxidasen für den Abbau von  $H_2O_2$ . Daneben existieren auch niedermolekulare Substanzen wie Ascorbat und Glutathion, die einerseits als Kosubstrate für Enzymreaktionen fungieren und andererseits auch nicht-enzymatisch mit Radikalen reagieren können (Alscher et al., 1997).

Interessanterweise ist NO in der Lage, die Bildung und Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies zu manipulieren und damit einen direkten Einfluss auf die Regulation der zellulären ROS-Homöostase zu nehmen. Beispielsweise konnte durch exogene NO-Behandlung eine Inhibierung antioxidativer Enzyme wie Katalase und Peroxidasen gezeigt werden (Ferrer und Ros Barceló, 1999, Clark et al., 2000), während die NO-abhängige Hemmung von NADPH-Oxidasen zu einer Blockierung der Superoxid- bzw.  $H_2O_2$ -Produktion führte (Yun et al., 2011).

In der Abb. 1 ist der Zusammenhang zwischen NO und reaktiven Sauerstoffspezies sowie die zellulären Auswirkungen der einzelnen Komponenten nochmals graphisch veranschaulicht.



**Abb. 1: Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffspezies**

Die Reaktion von NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> läuft nahezu diffusionskontrolliert ab, wobei Peroxynitrit gebildet wird, das sowohl Tyrosinreste von Proteinen nitriert aber auch als Oxidationsmittel mit Lipiden, Nukleinsäuren und Cysteinresten interagiert. NO reagiert hingegen primär mit Thiolgruppen von Proteinen, was zur Bildung von Nitrosothiolen führt. O<sub>2</sub><sup>-</sup> dient als Ausgangssubstrat für weitere reaktive Sauerstoffspezies, wobei neben der SOD-katalysierten Umsetzung bzw. der spontanen Dismutation zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch die Entstehung von OH<sup>-</sup> aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Rahmen der Fenton-Reaktion zu erwähnen ist. Um den Redoxstatus im Gleichgewicht zu halten bzw. eine oxidative Schädigung zellulärer Strukturen zu unterbinden, existieren verschiedene antioxidative Enzymsysteme und Antioxidantien, die an der Detoxifizierung von ROS-Molekülen beteiligt sind.

Abkürzungen: NO: Stickstoffmonoxid, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superoxidation, ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid, OH<sup>-</sup>: Hydroxylradikal, SOD: Superoxid-Dismutase, Tyr-OH: Hydroxylgruppe eines Tyrosinrests, R-SH: Thiolgruppe eines Cysteinrests, Tyr-NO<sub>2</sub>: Nitrierter Tyrosinrest, R-SNO: Nitrosylierter Cysteinrest

### 1.1.1.3. Funktion von NO bei der Pathogenabwehr und Zelltod-Induktion

Die Produktion von Stickstoffmonoxid zählt zu den ersten Abwehrmechanismen, die nach Pathogenerkennung in der Pflanze induziert werden und wurde zeitgleich in *Arabidopsis thaliana* nach *Pseudomonas syringae*-Infektion (Delledonne et al., 1998) und Tabak nach Kontakt mit Tabakmosaikviren (Durner et al., 1998) entdeckt. Mittlerweile sind zahlreiche weitere Wirt-Pathogen-Interaktionen bekannt, bei denen ein rascher Anstieg der NO-Konzentration beobachtet werden konnte, beispielsweise nach Bakterieninokulation in Tabak (Conrath et al., 2004), Pilzinfektionen in Hafer (Tada et al., 2004) und Weizen (Guo et al., 2004) oder Behandlungen mit unterschiedlichen Elictoeren wie Cryptogein in Tabakzellen (Foissner et al., 2000) und Lipopolysacchariden in *Arabidopsis*-Zellen (Zeidler et al., 2004). Als direkte Folge einer erhöhten NO-Akkumulation konnte eine Stimulierung der Immunantwort festgestellt werden, wobei parallel mehrere voneinander unabhängige Signalwege betroffen sind. Dazu zählen neben der Aktivierung von MAP-Kinasen (Clarke et al., 2000) und der

Phytoalexin-Synthese (Modolo et al., 2002) vor allem ein Anstieg der Salicylsäure (SA)-Konzentration, wodurch die Expression von Abwehrgenen des Phenylpropan-Stoffwechsels oder PR1 („Pathogenesis-Related“)-Proteinen ausgelöst werden (Durner et al., 1998). SA spielt eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR), die eine gesteigerte Abwehrbereitschaft in vom Infektionsort entfernt gelegenen, gesunden Teilen der Pflanze bewirkt. Die Auslösung der SAR wird dabei über die SA-abhängige Aktivierung des redox-sensitiven Proteins NPR1 („Nonexpressor-of-Pathogenesis-Related-Genes1“) reguliert, das ausgehend von seiner inaktiven oligomeren Form in Monomere dissoziiert. Die aktiven Monomere können anschließend in den Zellkern transportiert werden, wo sie durch Interaktion mit dem TGA-Transkriptionsfaktor die Expression des PR1-Gens induzieren (Pieterse und van Loon, 2004). NO spielt bei diesem Signalprozess eine bedeutende Funktion, da es über die Reaktion mit Thiolgruppen die Oligomerisierung bzw. Monomerisierung des NPR1-Proteins reguliert und zudem die DNA-Bindung des NPR1-TGA Komplexes verbessert (Tada et al., 2008, Lindermayr et al., 2010). Darüber hinaus kann NO allerdings auch einen negativen Effekt auf die SA-Signaltransduktionskette ausüben, indem es die Anbindung von SA an sein Rezeptorprotein SAPB3 inhibiert und damit die Abwehrreaktion unterdrückt (Wang et al., 2009).

Die wichtigste Bedeutung von NO im Rahmen der Immunantwort ist die Beteiligung bei der Entwicklung der hypersensitiven Reaktion (HR), wodurch es zum gezielten Absterben pflanzlicher Zellen am bzw. um den Infektionsort kommt und dadurch eine Vermehrung bzw. Ausbreitung eingedrungener Pathogene in intaktes Gewebe verhindert wird. In diesem Fall kann NO allerdings nicht alleine, sondern nur synergistisch zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies den programmierten Zelltod einleiten. Dabei scheint vor allem ein gleichzeitiger Anstieg von NO und ROS (insbesondere  $H_2O_2$ ) bzw. ein ausbalanciertes Konzentrationsverhältnis essentiell zu sein, wohingegen die Zunahme einzelner Komponenten den Zelltod nicht hervorrufen kann (Delledonne et al., 2001, De Pinto et al., 2002). Aktuellere Untersuchungen in Tabakzellen und *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen zudem, dass die Abwehrreaktion nach Pathogenbefall mit einer Akkumulation von Peroxynitrit einhergeht (Saito et al., 2006, Cecconi et al., 2009). Interessanterweise konnten in diesem Zusammenhang Peroxyredoxine, die unter Normalbedingungen an der Detoxifizierung von Peroxynitrit beteiligt sind, nach Pathogenbefall als Zielproteine für eine NO-abhängige Hemmung identifiziert werden, was eine Potentierung der durch Peroxynitrit verursachten Schäden zur Folge hatte (Romero-Puertas et al., 2007).

### 1.1.2. Biosynthese von NO in Pflanzen

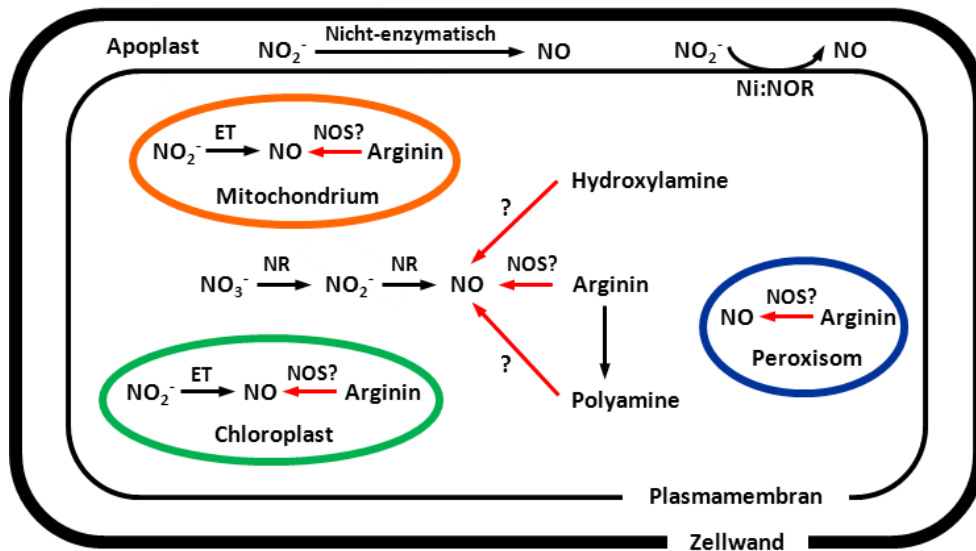
Die Bildung von NO ist eng mit der Stickstoff-Assimilation und dem Stickstoff-Stoffwechsel in Pflanzen verbunden, wobei prinzipiell zwischen einem reduktiven und einem oxidativen Reaktionsprozess unterschieden wird.

Beim reduktiven Syntheseweg dienen anorganische Stickstoffverbindungen wie Nitrat und Nitrit als Ausgangssubstrate, die im Cytosol durch das Enzym Nitrat-Reduktase (NR) zu NO reduziert werden können (Yamasaki und Sakihama, 2000). Darüber hinaus konnte in Tabakwurzeln eine Nitrit-abhängige NO-Produktion durch das Enzym Nitrit:NO-Reduktase beobachtet werden, welches an der apoplastischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist (Stöhr et al., 2001). Als weitere wichtige NO-Quelle wird mittlerweile auch die Reduktion von Nitrit in den Plastiden angesehen, wobei in beiden Fällen eine Beteiligung der chloroplastidären bzw. mitochondrialen Elektronentransportkette an der NO-Bildung nachweisbar war (Jasid et al., 2006, Planchet et al., 2005). Neben der enzymatisch katalysierten Nitrit-Reduktion kann die Umwandlung von Nitrit in NO allerdings auch auf nicht-enzymatischen Prozessen beruhen, z.B. bei niedrigen pH-Werten im Apoplasten (Bethke et al., 2004) oder in Gegenwart von Carotinoiden (Cooney et al., 1994).

Beim oxidativen Syntheseweg erfolgt die NO-Bildung hingegen über organische Stickstoffverbindungen wie Arginin und Polyamine, wobei in Pflanzen in beiden Fällen noch keine katalytisch aktiven Enzymkandidaten eindeutig nachgewiesen werden konnten. In tierischen und humanen Zellen ist die NO-Produktion größtenteils auf die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) zurückzuführen, die unter aeroben Bedingungen die NADPH-abhängige Umwandlung von L-Arginin zu NO und L-Citrullin katalysieren (Stühr, 1997). Obwohl in Pflanzen bisher keine homologen Nukleotidsequenzen gefunden wurden, konnte eine NOS-ähnliche Aktivität sowohl im Cytosol (Ribeiro et al., 1999) als auch in verschiedenen Zellorganellen wie Chloroplasten (Jasid et al., 2006), Mitochondrien (Guo und Crawford, 2005) und Peroxisomen (Barroso et al., 1999) detektiert werden. Allerdings basieren diese Studien fast ausschließlich auf der Verwendung von Arginin-Analoga oder NOS-Inhibitorsubstanzen aus dem tierischen System, durch deren Zugabe eine Änderung der NO-Produktion auch in Pflanzen feststellbar war. Fakt ist, dass in höheren Pflanzen bis zum heutigen Zeitpunkt außer bei der Grünalge *Ostreococcus tauri* (Foresi et al., 2010) noch kein säugetierähnliches NOS-Homolog isoliert werden konnte.

Des Weiteren können Polyamine, die ausgehend von Arginin oder Ornithin synthetisiert werden, als Ausgangssubstanzen für die NO-Synthese fungieren, was beispielsweise nach exogener Zugabe von Spermin oder Spermidin feststellbar war (Tun et al., 2006). Außerdem

konnte auch nach Applikation von Hydroxylaminen eine NO-Freisetzung detektiert werden (Rümer et al, 2009), wobei die physiologische Relevanz dieser Reaktion zumindest fragwürdig ist, da die Existenz dieser Substanz in Pflanzen bisher noch nicht bewiesen werden konnte. Eine Zusammenfassung der verschiedenen NO-Synthesereaktionen ist in Abb. 2 nochmals graphisch dargestellt.



**Abb. 2: Übersicht der NO-Produktion und deren zelluläre Lokalisation in Pflanzen**

Dargestellt ist eine schematische Illustration einer Pflanzenzelle mit verschiedenen Zellkompartimenten, bei denen bisher eine NO-Produktion in der Literatur beschrieben wurde. Schwarze Pfeile kennzeichnen reduktive Synthesewege bzw. rote Pfeile markieren oxidative Synthesewege, während ein Fragezeichen Reaktionen symbolisiert, bei denen bisher noch keine Enzymkandidaten eindeutig nachgewiesen werden konnten. Abkürzungen:  $\text{NO}_3^-$ : Nitrat,  $\text{NO}_2^-$ : Nitrit, NO: Stickstoffmonoxid, NR: Nitrat-Reduktase, Ni: NOR: Nitrit-NO-Reduktase, NOS: NO-Synthase ähnliche Reaktion, ET: Elektronentransportkette

### 1.1.3. Wirkungsweise und Signaltransduktion von NO in Pflanzen

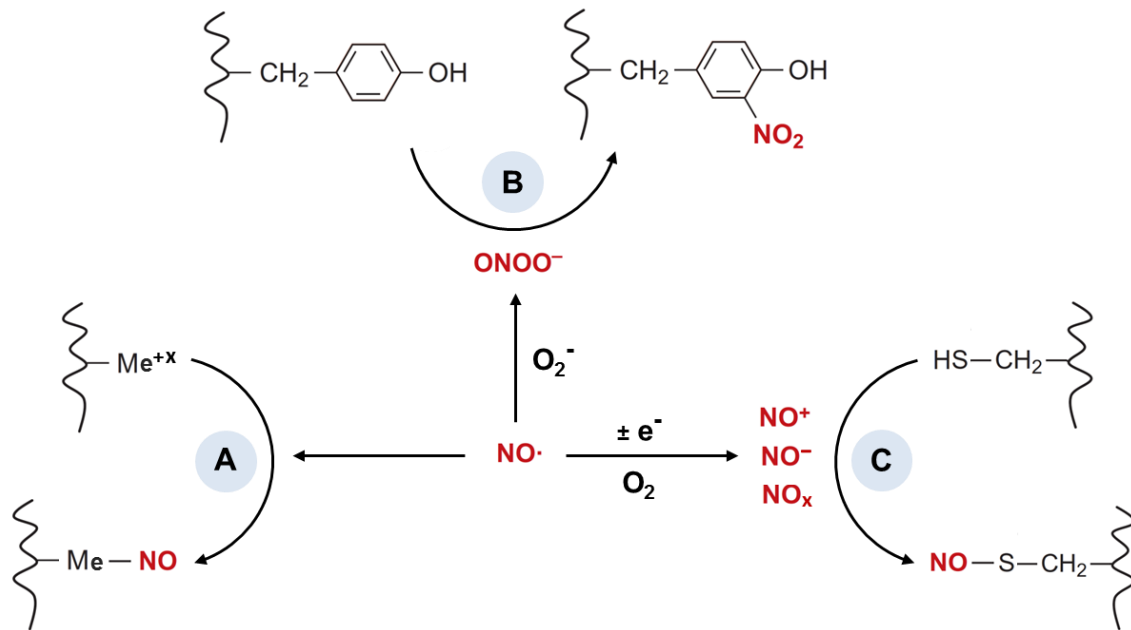
Die biologische Wirkung von NO wird bestimmt durch seine Bildung auf der einen Seite und seine Inaktivierung auf der anderen Seite. In Analogie zum tierischen und menschlichen System wird dabei im Allgemeinen zwischen einem klassischen und einem nicht-klassischen Signalmechanismus unterschieden. Der klassische bzw. cGMP-abhängige Signalweg umfasst die durch NO-induzierte zelluläre Anreicherung des sekundären Botenstoffes cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) und die damit verbundene Generierung von „downstream“-Prozessen. Dazu zählt neben der Mobilisierung spezifischer Proteinkinasen vor allem die Aktivierung von cyclischer Adeninnukleotid-Ribose (cADPR), welche eine Freisetzung von Calcium-Ionen stimuliert und letztendlich eine Veränderung der Genexpression bewirkt. Als zentrales regulatorisches Element dieser Signalkaskade wurde in Säugetieren das Enzym Guanylat-Zyklase (GC) identifiziert, das als intrazellulärer Rezeptor

für NO fungiert und nach dessen Anbindung die Umwandlung von Guanosin triphosphat (GTP) zu cGMP katalysiert (Wendehenne et al., 2001). In Pflanzen konnte ebenfalls eine Akkumulation von cGMP, cADPR und Calcium-Ionen im Zusammenhang mit der Abwehrreaktion (Durner et al., 1998, Klessig et al., 2000) und der Stomata-Schließung (García-Mata und Lamattina, 2002, Neill et al., 2002) nachgewiesen werden, was auf einen ähnlichen Reaktions-Mechanismus hindeutet. Microarray-Experimente zeigen zudem, dass NO die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflussen kann (Huang et al., 2002), was vor allem unter Stressbedingungen deutlich wird (Zago et al., 2006, Ahlfors et al., 2009). Allerdings wurde jedoch bisher kein zur Guanylat-Zyklase homologes Protein in höheren Pflanzen gefunden, das durch NO aktiviert werden kann. Vor kurzem konnte allerdings in *Arabidopsis thaliana* eine Flavin-Monooxygenase mit GC-Aktivität (AtNOGC1) identifiziert werden, die eine NO sensitive Häm-Domäne besitzt und *in-vitro* die Bildung von cGMP katalysierte (Mulaudzi et al., 2011).

Der nicht-klassische oder cGMP-unabhängige Signalweg beschreibt die direkte Interaktion von NO mit Proteinen, was zu einer veränderten Aktivität oder Struktur der betroffenen Proteine führt. Zu diesen postranslationalen Modifikationen zählt neben der NO-Interaktion mit Metall-Ionen (Metall-Nitrosylierung) und Tyrosinresten (Tyrosin-Nitrierung) vor allem die Wechselwirkung mit Cysteinresten (S-Nitrosylierung). Die Charakteristika der jeweiligen Reaktionsmechanismen sind in Abb. 3 in Form einer Übersichtsgrafik veranschaulicht.

Die **Metall-Nitrosylierung** (Abb. 3A) von Proteinen setzt eine koordinative Bindung von NO an Übergangsmetalle wie Eisen, Kupfer oder Zink voraus, wodurch Metall-Nitrosyl-Komplexe entstehen. Als Folge dieser Reaktion wird das Stickstoffatom der NO-Gruppe stärker positiviert und damit anfälliger gegenüber Nucleophilen, was wiederum die Ausbildung von S-Nitrosothiol-Verbindungen unterstützt (Luchsinger et al., 2003, Ford, 2010). Darüber hinaus kann NO in Kombination mit niedermolekularen Thiolverbindungen auch mit freien Eisen-Ionen wechselwirken und sog. Dinitrosyl-Eisen-Komplexe bilden (Bosworth et al., 2009). Die am besten charakterisierten Zielproteine für Metall-Nitrosylierung in Pflanzen sind symbiotische und nicht-symbiotische Hämoglobine, die eine wichtige Rolle hinsichtlich der Regulation der zellulären NO-Verfügbarkeit einnehmen (Gupta et al., 2011). Außerdem konnte eine Reihe weiterer Proteinkandidaten identifiziert werden, deren katalytische Aktivitäten allesamt durch die NO-abhängige Nitrosylierung der Metallzentren inhibiert werden. In diesem Zusammenhang sind die Enzyme Lipooxygenase (Nelson, 1987), Cytochrom C-Oxidase (Millar und Day, 1996), Aconitase (Navarre et al., 2000) Katalase und Ascorbat-Peroxidase (Clark et al., 2000) sowie AtNOGC1 (Mulaudzi et al., 2011) zu erwähnen.





**Abb. 3: Möglichkeiten NO-abhängiger posttranslationaler Proteinmodifikationen**

A) NO kann als Elektronendonator direkt mit Übergangsmetallen wie bspw. eisenhaltigen Hämgruppen reagieren, was als Metall-Nitrosylierung bezeichnet wird. B) Die Interaktion von NO mit  $\text{O}_2^-$  führt zur Bildung von  $\text{ONOO}^-$ , das als Substrat für Nitrierungsprozesse dient. Die Bindung der Nitrogruppe erfolgt dabei in *ortho*-Position der Hydroxylgruppe des aromatischen Tyrosinrings. C) Durch Aufnahme bzw. Abgabe eines Elektrons entstehen aus NO die reaktiven Zwischenprodukte  $\text{NO}^-$  bzw.  $\text{NO}^+$ , die mit Thiolgruppen von Cysteinen reagieren können. Alternativ dazu ist die Bildung von S-Nitrosothiolen auch durch Wechselwirkung mit höheren Stickoxiden möglich, die aus der Reaktion von NO mit molekularem Sauerstoff hervorgehen.

Abkürzungen: NO: Stickstoffmonoxid, Me: Metall,  $\text{O}_2^-$ : Superoxidanion,  $\text{ONOO}^-$ : Peroxynitrit,  $e^-$ : Elektron,  $\text{O}_2$ : molekularer Sauerstoff,  $\text{NO}^+$ : Nitrosoniumion,  $\text{NO}^-$ : Nitrosylanion,  $\text{NO}_x$ : Stickoxide

Als **Tyrosin-Nitrierung** (Abb. 3B) wird die Substitution eines Wasserstoffatoms durch eine Nitrogruppe ( $\text{NO}_2$ ) in *ortho*-Position der Hydroxylgruppe des aromatischen Tyrosinrings beschrieben, was zur Ausbildung von 3-Nitrotyrosinen führt. Die durch Peroxynitrit-vermittelte Reaktion verringert dabei den  $\text{pK}_a$ -Wert um drei pH-Wertstufen und führt gleichzeitig zu einer Zunahme der Hydrophobizität des entsprechenden Tyrosinrestes (Radi, 2004). Die Nitrierung ist dabei nicht an die Existenz einer bestimmten Konsensus-Sequenz geknüpft, aber im Allgemeinen durch die räumliche Nähe zu sauren Aminosäuren oder die gut zugängliche Exponierung des aromatischen Ringes auf der Proteinoberfläche, bspw. innerhalb von Schlaufen-Strukturen, begünstigt (Bayden et al., 2011). Obwohl die Nitrierung als irreversibler Mechanismus angesehen wurde und im tierischen System zum Abbau des betroffenen Proteins führt, wird mittlerweile auch die Möglichkeit einer reversiblen Denitrierungsreaktion in Betracht gezogen (Souza et al., 2000, Abello et al., 2009). Möglicherweise hat diese posttranslationale Modifikation auch einen Einfluss auf Phosphorylierungsprozesse und damit auf die Signaltransduktion durch Proteinkinasen, da beide Reaktionen um Tyrosinreste als Bindungsstellen konkurrieren (Monteiro et al., 2008).

In Pflanzen ist bisher nur eine geringe Anzahl an Studien bekannt, die sich hauptsächlich mit dem Nachweis nitrierter Proteine auseinandersetzt. Dabei konnte sowohl unter Stressbedingungen, z.B. nach Pathogeninfektion (Cecconi et al., 2009), Salzstress (Valderrama et al., 2007, Tanou et al., 2012) oder Hitzestress (Chaki et al., 2009) als auch unter Normalbedingungen, z.B. in Keimlingen (Lozano-Juste et al., 2011) oder Chloroplasten (Galetskiy et al., 2011) von *Arabidopsis thaliana* eine Akkumulation nitrierter Proteine detektiert werden. Eine genauere Charakterisierung einzelner Proteine in Bezug auf die Lokalisation der Nitrierungsstelle sowie eine potentielle physiologische Bedeutung liegt momentan nur für die Enzyme Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (Chaki et al., 2011), O-Acetylserinthiol-Lyase A1 (Alvarez et al., 2011) und Glutamin-Synthetase 1 (Melo et al., 2011) vor.

Unter **S-Nitrosylierung** (Abb. 3C) versteht man die kovalente Bindung von NO an das Schwefelatom von Cysteinresten, wodurch sog. S-Nitrosothiole entstehen. Die Interaktion von NO mit Thiolgruppen erfordert jedoch zunächst die zusätzliche Aufnahme bzw. Abgabe eines Elektrons, wodurch entweder das Nitrosylanion ( $\text{NO}^-$ ) oder das Nitrosoniumion ( $\text{NO}^+$ ) als reaktives Zwischenprodukt entsteht. Die Reduktion bzw. Oxidation von NO findet dabei bevorzugt in Gegenwart von eisenhaltigen Metalloproteinen statt (Stamler et al., 1992). Eine Nitrosylierung von Thiolgruppen kann allerdings auch durch höhere Stickoxide ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) erfolgen, die bei der Autooxidation von NO mit molekularem Sauerstoff entstehen. Darüber hinaus kann NO in einer heterolytischen Reaktion von S-Nitrosothiolen abgespalten und auf nukleophile Thiolgruppen anderer Proteine übertragen werden, was als Transnitrosylierung bezeichnet wird (Hess et al., 2005).

Obwohl die Aminosäure Cystein in nahezu allen Proteinen vorkommt, sind *in-vivo* nur bestimmte Thiolgruppen als Bindungsstellen für die S-Nitrosylierung zugänglich. Diese Spezifität ist von mehreren Strukturmotifen abhängig, wie der Lokalisation des betreffenden Cysteins in hydrophober Umgebung sowie dem Vorhandensein von sauren und basischen Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der Nitrosylierungsstelle (Stamler et al., 1997). Die NO-abhängige Cystein-Modifikation ist zudem ein reversibler Mechanismus, der einerseits auf enzymatischem Weg, bspw. mit Hilfe des Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Systems reguliert wird (Benhar et al., 2009). Aufgrund der geringen Stabilität der SNO-Bindung können allerdings auch nicht-enzymatische Prozesse wie reduzierende Bedingungen oder Lichteinfall Denitrosylierungs-Reaktionen initiieren. Der Nachweis nitrosylierter Proteine basiert hauptsächlich auf der Anwendung des Biotin-Switch-Verfahrens, bei dem Nitrosothiolgruppen durch einen Biotin-Tag ersetzt und entweder durch Immunodetektion oder Affinitätsreinigung mit anschließender Massenspektrometrie-Analyse identifiziert

werden (Jaffrey und Snyder, 2001). In Pflanzen sind mittlerweile mehrere Proteomstudien nach diesem Prinzip in unterschiedlichen Pflanzen und Zellkompartimenten sowie nach Stressbedingungen durchgeführt worden (zusammengefasst in Astier et al., 2011). Auf diese Weise konnten insgesamt mehr als 200 putative Proteinkandidaten identifiziert werden, von denen allerdings bisher weniger als 10% einer detaillierten Analyse unterzogen wurden. Eine Auflistung einzelner Proteine, die im Zusammenhang mit einer NO-abhängigen posttranslationalen Modifikation genauer charakterisiert sind, ist in Tab. 1 nochmals zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 1: Beispiele für charakterisierte Zielproteine mit NO-abhängiger Modifikation**

Dargestellt ist eine Auflistung aller Kandidatenproteine in verschiedenen Pflanzenspezies, bei denen eine Aktivitätsveränderung durch Metall-Nitrosylierung, Tyrosin-Nitrierung und S-Nitrosylierung in der Literatur beschrieben wurde. Sofern die exakte NO-Bindungsstelle identifiziert wurde, ist die jeweilige Aminosäure sowie deren Position innerhalb der Sequenz als Zahl angegeben.

Abkürzungen: PTM: Posttranslationale Modifikation, Tyr: Tyrosin, Cys: Cystein

PTM	Zielprotein	Effekt	Interaktion	Organismus	Referenz
Metall-Nitrosylierung	Hämoglobin	NO-Abbau	Häm-Gruppe	<i>A.thaliana</i>	Perazzolli et al., 2004
	Lipoxygenase	Inhibierung	Eisen	<i>Glycine max</i>	Nelson, 1987
	Cytochrom C-Oxidase	Inhibierung	Häm-Gruppe	<i>Glycine max</i>	Millar und Day, 1996
	Aconitase	Inhibierung	Eisen	<i>Nicotiana tabacum</i>	Navarre et al., 2000
	Katalase	Inhibierung	Häm-Gruppe	<i>Nicotiana tabacum</i>	Clark et al., 2000
	Ascorbat-Peroxidase	Inhibierung	Häm-Gruppe	<i>Nicotiana tabacum</i>	Clark et al., 2000
	NO-abhängige Guanylat-Zyklase	Aktivierung	Häm-Gruppe	<i>A.thaliana</i>	Mulaudzi et al., 2011
Tyrosin-Nitrierung	Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase	Inhibierung	?	<i>Helianthus annuus</i>	Chaki et al., 2011
	O-Acetylserinithiol-Lyase	Inhibierung	Tyr-302	<i>A.thaliana</i>	Alvarez et al., 2011
	Glutamin-Synthetase 1	Inhibierung	Tyr-167	<i>Medicago truncatula</i>	Melo et al., 2011
S-Nitrosylierung	Metacaspase	Inhibierung	Cys-147	<i>A.thaliana</i>	Belenghi et al., 2007
	Peroxiredoxin II E	Inhibierung	Cys-121	<i>A.thaliana</i>	Romero-Puertas et al., 2007
	Methionin-Adenosyltransferase 1	Inhibierung	Cys-114	<i>A.thaliana</i>	Lindermayr et al., 2006
	Adenosintriphosphatase	Inhibierung	Cys-526	<i>Nicotiana tabacum</i>	Astier et al., 2012
	RuBisCO	Inhibierung	?	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Abat et al., 2008
	Salicylsäure-bindendes Protein	Inhibierung	Cys-280	<i>A.thaliana</i>	Wang et al., 2009
	Transkriptionsfaktor MYB2	Inhibierung	Cys-53	<i>A.thaliana</i>	Serpa et al., 2007
	Transkriptionsfaktor TGA1	Aktivierung	Cys-172, Cys-287	<i>A.thaliana</i>	Lindermayr et al., 2010
	Auxin Rezeptor TIR1	Aktivierung	Cys-140	<i>A.thaliana</i>	Terrile et al., 2012
	NPR1	Inhibierung	Cys-156	<i>A.thaliana</i>	Tada et al., 2008
	GAPDH	Inhibierung	Cys-155, Cys-159	<i>A.thaliana</i>	Holtgreffe et al., 2008
	Glycin-Decarboxylase	Inhibierung	?	<i>A.thaliana</i>	Palmieri et al., 2010
	NADPH-Oxidase	Inhibierung	Cys-890	<i>A.thaliana</i>	Yun et al., 2011

#### 1.1.4. Inaktivierung von NO in Pflanzen

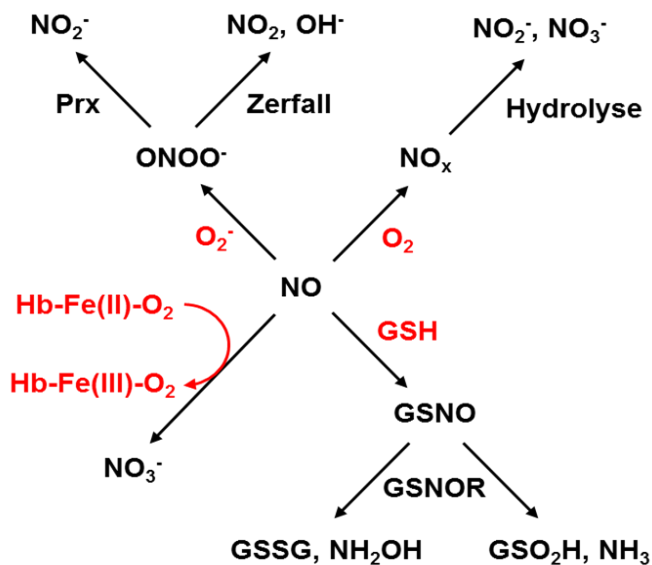
Um eine schädigende Akkumulation von NO zu vermeiden bzw. dessen Funktionalität als Signalmolekül zu gewährleisten, ist die Pflanze in der Lage, die zelluläre NO-Konzentration über verschiedene Reaktionsprozesse zu kontrollieren, wobei generell zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen unterschieden wird.

Nicht-enzymatische Mechanismen resultieren aus der Reaktion von NO mit molekularem Sauerstoff und freien Radikalen wie Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), was unter anderem zur Bildung von reaktiven Stickstoffspezies führt. Diese Detoxifizierungsprozesse finden vor allem in Mitochondrien und Chloroplasten statt, wo die entsprechenden Reaktionssubstrate im Rahmen von Stoffwechselfvorgängen während der Photosynthese und der Respiration gebildet werden (Baudouin, 2011). Die Autooxidation von NO in Gegenwart von Sauerstoff läuft unter physiologischen Bedingungen verhältnismäßig langsam ab und spielt daher eine eher untergeordnete Rolle. Die dabei entstehenden höheren Stickoxide ( $NO_2$ ,  $N_2O_3$ ,  $N_2O_4$ ) reagieren entweder mit anderen Molekülen wie Aminen und Thiolen oder hydrolysieren im wässrigen Milieu zu den Endprodukten Nitrit ( $NO_2^-$ ) und Nitrat ( $NO_3^-$ ) (Hayat et al., 2010).

Im Gegensatz dazu läuft die Reaktion von NO mit Superoxidradikalen mit einer hohen Geschwindigkeit nahezu diffusionskontrolliert ab, wodurch Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) gebildet wird (Huie und Padmaja, 1993). Diese Verbindung wird im tierischen System als zytotoxisch eingestuft, da sie maßgeblich an der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt ist (Pacher et al., 2007). In Pflanzen konnten hingegen auch bei hohen Konzentrationen keine Anzeichen des Zelltodprozesses beobachtet werden, was vermutlich auf die enzymatische Entgiftung von Peroxynitrit zu Nitrit durch Peroxyredoxine zurückzuführen ist (Sakamoto et al., 2003, Romero-Puertas et al., 2007). Allerdings ist Peroxynitrit nur im alkalischen Milieu stabil, während unter physiologischen pH-Bedingungen eine Protonierung zu peroxysalpetriger Säure ( $ONOOH$ ) stattfindet, die entweder durch Isomerisierung zu Nitrat ( $NO_3^-$ ) umgewandelt wird oder in Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH^-$ ) zerfällt (Lamattina et al., 2003).

Bei den enzymatischen Mechanismen zur Regulation der NO-Konzentration steht hingegen die unmittelbare Interaktion von NO mit Biomolekülen wie Hämoglobin oder Glutathion im Vordergrund. Im Gegensatz zu den nicht-enzymatischen Reaktionen ist dieser Prozess hauptsächlich auf das Cytosol beschränkt (Baudouin, 2011). Bei den Hämoglobinen handelt es sich um globuläre Proteine, die eine eisenhaltige Hämgruppe besitzen und primär mit Sauerstoffmolekülen interagieren. In Pflanzen werden Hämoglobine aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in eine nicht-symbiontische Klasse (1), eine symbiontische Klasse (2) und eine trunkierte Klasse (3) unterschieden (Gupta et al., 2011). Bei Hämoglobinen der Klasse 1 und 2 konnte eine Funktion als NO-Dioxygenase beschrieben werden, da sie in der Lage sind in Gegenwart von NADH die Oxidation von NO zu Nitrat zu katalysieren (Igamberdiev und Hill, 2004, Herold und Puppo, 2005).

Der wichtigste Reaktionsmechanismus um eine schädigende NO-Akkumulation unter aeroben Bedingungen zu vermeiden, stellt die Interaktion von NO mit Glutathion dar, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet wird und entweder in reduzierter Form (GSH) oder als Disulfid (GSSG) vorliegen kann. Aufgrund seiner Funktion als zelluläre Speicherform von redoxsensitivem Cystein und der hohen Konzentration im millimolaren Bereich, ist Glutathion als Antioxidans maßgeblich für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus bzw. reduzierende Bedingungen im Cytosol verantwortlich (Noctor et al., 2011). Bei der Interaktion von NO mit Glutathion handelt es sich prinzipiell um eine Nitrosylierungsreaktion, die zur Bildung von S-Nitrosoglutathion (GSNO) führt. Diese Verbindung fungiert einerseits als intrazelluläre Speicher- und Transportform von NO, was dessen Stabilität bzw. Halbwertszeit verlängert, und andererseits als NO-Donor für Transnitrosylierungs-Prozesse (Stamler, 1994). In diesem Zusammenhang konnte z.B. gezeigt werden, dass nach exogener Applikation von GSNO eine deutliche Zunahme nitrosylierter Proteine in Pflanzen detektierbar war (Lindermayr et al., 2005). Der Abbau von GSNO erfolgt durch das Enzym GSNO-Reduktase, welches zur Klasse der Alkohol-Dehydrogenasen gehört und auf diese Weise einen enormen Einfluss auf die zelluläre NO-Verfügbarkeit bzw. die NO-abhängige Signaltransduktion nimmt (Liu et al., 2001). Eine Übersicht der verschiedenen Inaktivierungsmöglichkeiten von NO ist in Abb. 4 nochmals zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 4: Darstellung der Inaktivierungsmöglichkeiten von NO**

NO kann mit Superoxidradikalen zu Peroxynitrit reagieren, das entweder zu Stickstoffdioxid und Hydroxylradikale zerfällt oder mit Hilfe von Peroxyredoxinen zu Nitrit abgebaut wird (links oben). Die Autooxidation von NO in Gegenwart von molekularem Sauerstoff führt zur Bildung höherer Stickoxide, die durch Hydrolyse zu den Endprodukten Nitrit und Nitrat umgewandelt werden (rechts oben). Eine weitere Möglichkeit stellt die Oxidation von NO zu Nitrat durch oxygeniertes Hämoglobin dar (links unten). NO kann allerdings auch mit Glutathion zu S-Nitrosoglutathion reagieren, was durch S-Nitrosoglutathion-Reduktase zu Glutathiondisulfid und Hydroxylamin bzw. Glutathionsulfinsäure und Ammoniak degradiert wird (rechts unten).

## **1.2. Alkohol-Dehydrogenasen**

Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) kommen universell in allen prokaryotischen und eukaryotischen Lebewesen vor und katalysieren die reversible Umwandlung von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen. Diese enzymatische Reaktion ist auf der einen Seite essentiell für den oxidativen Abbau alkoholischer Verbindungen, die endogen als Nebenprodukte von Stoffwechselvorgängen entstehen oder exogen in Form von Ethanol aufgenommen werden. Auf der anderen Seite bietet die Umkehrung dieser Reaktion vielen Mikroorganismen im Rahmen der alkoholischen Gärung aber auch eine Möglichkeit der Energiegewinnung und NAD-Regenerierung unter anaeroben Bedingungen.

### **1.2.1. Klassifizierung von Alkohol-Dehydrogenasen**

Alkohol-Dehydrogenasen werden im Allgemeinen in vier verschiedene Gruppen eingeteilt, die sich hinsichtlich der Länge ihrer Aminosäurekette und Metall-Kofaktoren unterscheiden (Chase, 1999). Dazu zählen kurzkettige ADHs mit bis zu 250 Aminosäuren, die keine Metallionen enthalten und nur eine Koenzym-Domäne aufweisen. Aufgrund des relativ einfachen Strukturaufbaus werden sie als Ursprungsformen angesehen, aus denen sich im Laufe der Evolution komplexere Alkohol-Dehydrogenasen entwickelten (Jörnvall et al., 1995). Mittelkettige ADHs sind die am besten untersuchte Gruppe von Alkohol-Dehydrogenasen und liegen in ihrer enzymatisch aktiven Form als Homodimere oder Homotetramere vor. Jede Untereinheit ist aus etwa 350 Aminosäuren aufgebaut und besitzt sowohl eine katalytische als auch eine Kofaktorbindungs-Domäne für NAD oder NADP. Darüber hinaus enthält jedes Monomer zwei Zink-Ionen, wobei ein Ion innerhalb des aktiven Zentrums lokalisiert ist und mit der Hydroxylgruppe bzw. Carbonylgruppe des Substrats wechselwirkt und das andere Ion für die strukturelle Stabilität des Proteins verantwortlich ist (Auld und Bergman, 2008). Des Weiteren existieren auch langkettige ADHs mit mehr als 350 Aminosäuren (Ribas De Pouplana et al., 1991) und eisenhaltige Alkohol-Dehydrogenasen, die hauptsächlich in Bakterien und Pilzen vorkommen (Reid und Fewson, 1994).

### **1.2.2. Bedeutung von Alkohol-Dehydrogenasen in Pflanzen**

In höheren Pflanzen konnten hauptsächlich mittelklassige Alkohol-Dehydrogenasen nachgewiesen werden, wobei es sich um eine relativ kleine Klasse bestehend aus zwei bis drei Isoenzymen handelt, die eine hohe Sequenzübereinstimmung aufweisen und vermutlich durch Genduplikation entstanden sind (Thompson et al., 2007). Die am häufigsten vorkommenden Alkohol-Dehydrogenasen in monokotylen und dikotylen Pflanzen sind ADH1 und ADH2, die sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters unterscheiden. Während ADH1 vor

allem in Pollen und Samen exprimiert wird, konnte ADH2 in verschiedenen Gewebetypen wie Wurzeln, Blättern und Spross identifiziert werden (Strommer et al., 2011). Die simultane Expression beider ADH-Gene ist insbesondere bei Sauerstoffmangel zu beobachten, bspw. unter hypoxischen Bedingungen in Wurzeln, wenn die Pflanze zur Energiegewinnung auf Fermentationsprozesse angewiesen ist (Dolferus et al., 1994, Mayne und Lea, 1994). Das bei der Glykolyse entstehende Pyruvat wird dabei zunächst durch CO<sub>2</sub>-Abspaltung zu toxischem Acetaldehyd umgewandelt, welches im nächsten Schritt durch Alkohol-Dehydrogenasen zu Ethanol reduziert wird. Darüber hinaus konnte in einigen Pflanzenspezies wie Gerste (Hanson et al., 1984), Tomate (Ingersoll et al., 1994), Kartoffel (Van Eldik et al., 1998) und Petunien (Garabagi und Strommer, 2004) die Existenz einer weiteren Alkohol-Dehydrogenase (ADH3) festgestellt werden, welche bevorzugt in männlichen und weiblichen Blütenorganen auftritt.

In diesem Zusammenhang scheinen Alkohol-Dehydrogenasen auch eine wichtige Funktion bei der Produktion von flüchtigen aromatischen Verbindungen zu besitzen, die unter anderem im Rahmen des Lipooxygenase-Synthesewegs entstehen. Sie katalysieren die Umwandlung von langkettigen C6- und C9-Aldehyden zu den entsprechenden Alkoholen, welche für die charakteristische Duftnote von Blüten bzw. den Fruchtgeschmack verantwortlich sind (Strommer, 2011). Auch während der Fruchtreifung, die maßgeblich durch eine Verschiebung des Aldehyd/Alkohol-Verhältnisses gekennzeichnet ist, konnte eine verstärkte Expression von ADH-Genen, z.B. in Tomaten (Speirs et al., 1998), Trauben (Tesniere und Verries, 2000) oder Melone (Manríquez et al., 2006) detektiert werden.

### **1.2.3. Die duale Funktion von Alkohol-Dehydrogenase 2**

Das Enzym Alkohol-Dehydrogenase 2 wird aufgrund seiner Strukturhomologie bzw. der konservierten Aminosäuresequenz zwischen Mikroorganismen, Pflanzen und Säugetieren speziesübergreifend auch zu den Klasse 3 Alkohol-Dehydrogenasen gezählt (Duester et al., 1999). Im Gegensatz zu ADH1 besitzt ADH2 allerdings nur eine geringe Substrataffinität gegenüber kurzkettigen Alkoholen wie Methanol oder Ethanol und ist stattdessen primär für die zelluläre Metabolisierung von Formaldehyd verantwortlich (Lee et al., 2003). Formaldehyd ist einerseits unentbehrlich für die Synthese der Aminosäuren Glycin und Serin, wirkt aber gleichzeitig auch hochtoxisch, da es durch Reaktion mit Aminogruppen die Ausbildung von Schiffchen Basen und damit Protein- und DNA-Quervernetzungen induzieren kann (Staab et al., 2008). In Pflanzen entsteht Formaldehyd zusätzlich durch Oxidation von Methanol, das während der Hydrolyse von Pektin akkumuliert (Fall und Benson, 1996), sowie im Rahmen der Glyoxylat-Decarboxylierung (Prather und Sisler, 1972).

Der Abbau von Formaldehyd läuft in zwei Reaktionsschritten ab, wobei ADH2 in Gegenwart von NAD zunächst die Oxidation von S-Hydroxymethylglutathion (HMGS) zu S-Formylglutathion katalysiert, welches im zweiten Schritt zu Formiat und Glutathion hydrolytisch gespalten wird. Das Substrat HMGS entsteht dabei spontan durch Reaktion der polarisierten Carbonylgruppe von Formaldehyd mit der Thiolgruppe von Glutathion (Strittmatter und Ball, 1955). Der Nachweis, dass es sich bei Klasse 3 Alkohol-Dehydrogenasen um Glutathion-abhängige Formaldehy-Dehydrogenasen (FALDH) handelt, wurde erstmals in Ratten dokumentiert (Koivusalo et al., 1989) und ist mittlerweile auch in verschiedenen Pflanzenspezies wie Erbsen (Shafqat et al., 1996), *Arabidopsis thaliana* (Martínez et al., 1996), Mais (Fliegmann und Sandermann, 1997) und Reis (Dolferus et al., 1997) bestätigt. In transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit erhöhter FALDH-Aktivität konnte zudem eine deutlich schnellere katalytische Umsetzung nach Formaldehyd-Stress im Vergleich zu Antisense-Linien mit reduzierter FALDH-Aktivität beobachtet werden, was sich auch in einem toleranteren Phänotyp widerspiegelte (Achkor et al., 2003). Des Weiteren zeigten Western Blot-Analysen mit Anti-FALDH-Antikörpern, dass das entsprechende Protein in allen Organen von *Arabidopsis*-Pflanzen vorkommt, wobei die Signalintensität in Wurzeln und Blättern am stärksten ausgeprägt war (Espunya et al., 2006).

Neben der ursprünglichen Bedeutung als Formaldehyd detoxifizierendes Enzym besitzt ADH2 allerdings auch eine wichtige Funktion hinsichtlich der Regulation der zellulären NO-Homöostase. Mit Hilfe von Aktivitätstests konnte erstmals gezeigt werden, dass isolierte Cytosolfraktionen aus Leberzellen von Ratten GSNO umsetzen können und dass es sich bei dem enzymatisch aktiven Protein um eine Klasse 3 Alkohol-Dehydrogenase handelt (Jensen et al., 1998). Dieses Ergebnis wurde mittlerweile in verschiedenen Organismen wie *E.coli*, Hefe, *Arabidopsis thaliana*, Mäusen und menschlichen Zelllinien verifiziert und lässt einen evolutionär konservierten Reaktionsmechanismus vermuten (Liu et al., 2001). In Hefezellen konnte der Verlust der ADH2-Enzymaktivität beispielsweise durch Komplementation mit der homologen Isoform aus *Arabidopsis thaliana* kompensiert werden, was diese Hypothese bekräftigt (Sakamoto et al., 2002). Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen von kinetischen Studien eine deutlich höhere Substrataffinität von ADH2 gegenüber GSNO im Vergleich zu Formaldehyd gemessen wurde, wird dieser Umstand auch in der Namensgebung dieses Enzyms berücksichtigt und FALDH mittlerweile häufig als GSNO-Reduktase tituiert (Jensen et al., 1998, Liu et al., 2001). Der Abbau von GSNO durch GSNO-Reduktase ist ebenfalls ein zweistufiger Prozess, wobei zunächst unter NADH-Verbrauch das Zwischenprodukt S-Hydroxylaminoglutathion entsteht. Diese Verbindung wird anschließend einerseits bei



geringer GSH-Verfügbarkeit entweder spontan zu Glutathionsulfinsäure und Ammoniak umgewandelt oder reagiert andererseits mit GSH zu den Endprodukten Glutathiondisulfid und Hydroxylamin (Staab et al., 2009). Im Hinblick auf die NO-abhängige Signaltransduktion spielt das Enzym GSNO-Reduktase über die Regulation der zellulären GSNO-Konzentration somit vermutlich eine zentrale Rolle bei Nitrosylierungsreaktionen sowie als Schutzmechanismus gegenüber nitrosativen Stressbedingungen.

#### **1.2.4. Physiologische Rolle von GSNO-Reduktase unter Stressbedingungen**

In Pflanzen wurde die Bedeutung von GSNO-Reduktase bzw. die damit einhergehende Veränderung des NO-Metabolismus bisher in mehreren Veröffentlichungen vor allem im Zusammenhang mit unterschiedlichen abiotischen und biotischen Stressfaktoren untersucht. Studien zur Krankheitsresistenz ergaben, dass *gsnor* Knock-out Pflanzen einen anfälligeren Phänotyp nach Infektion mit verschiedenen avirulenten *Pseudomonas syringae* DC 3000-Stämmen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufwiesen, was mit einer höheren Akkumulation von Nitrosothiolen (SNO) korrelierte. Darüber hinaus weisen diese Pflanzen signifikant niedrigere SA-Gehalte sowie eine zeitlich verzögerte und schwächere PR1-Expression auf (Feechan et al., 2005, Yun et al., 2011).

Diese Daten stehen im Widerspruch zu Ergebnissen aus anderen Veröffentlichungen, die bspw. keine Unterschiede bei der SA-Konzentration zwischen Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen mit reduzierter GSNO-Reduktase Expression beobachteten (Espunya et al., 2012). In Tabak und *Arabidopsis thaliana* war zudem ein Anstieg der Transkriptmenge und Proteinaktivität von GSNO-Reduktase nach SA-Behandlung detektierbar (Diaz et al., 2003). In Antisense-Linien mit reduzierter GSNO-Reduktase Expression konnten ebenfalls höhere SNO-Gehalte nachgewiesen werden, was aber nicht zu einer höheren Sensitivität nach *Pseudomonas*-Inokulation führte. Diese Pflanzen zeigten hingegen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Oomyceten, was auf eine gesteigerte Expression von PR1 und GST1 während des Infektionsverlaufs zurückzuführen war (Rustérucci et al., 2007). Untersuchungen in Sonnenblumenkeimlingen ergaben zudem, dass Mehltau-resistente Sorten konstitutiv höhere SNO- bzw. GSNO-Gehalte besitzen als anfällige Sorten und möglicherweise deshalb in der Lage sind, eine Ausbreitung der Infektion zu unterbinden (Chaki et al., 2009).

Auch wenn die verschiedenen Studien bisher kein einheitliches Modell ergeben, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, dass das Enzym GSNO-Reduktase eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr einnimmt. Inwieweit eine pathogenspezifische Veränderung der NO-Homöostase die Krankheitsresistenz in unterschiedlichen Pflanzenspezies beeinträchtigt, ist momentan allerdings schwer zu interpretieren und bedarf weiterer Untersuchungen.

In Analogie zu den Pathogenversuchen sind auch nach Verwundung in der Literatur keine einheitlichen Resultate zu finden. In Sonnenblumenkeimlingen und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen war bspw. nach mechanischer Verwundung eine Reduktion der GSNO-Reduktase Transkriptakkumulation zu verzeichnen (Diaz et al., 2003, Chaki et al., 2010), während in Erbsenpflanzen eine Steigerung der GSNO-Reduktase Aktivität gezeigt wurde (Corpas et al., 2008). In Tabakpflanzen war hingegen nur nach Verwundung durch Herbivore, nicht aber nach mechanischer Verwundung eine kurzfristige Abnahme der GSNO-Reduktase Aktivität feststellbar (Wünsche et al., 2011). Beide Behandlungen führten allerdings zu einer geringeren Anreicherung von Jasmonsäure und Ethylen in transgenen Tabakpflanzen, die durch Virus-induziertes „gene silencing“ keine GSNO-Reduktase Aktivität aufwiesen.

Auch durch Metallstress verursachte Änderungen der GSNO-Reduktase Aktivität wurden bereits im Detail analysiert und resultierten in unterschiedlichen Erkenntnissen. In Erbsenpflanzen, welche auf Cadmium-haltigem Medium angezogen wurden, konnte z.B. eine niedrigere GSNO-Reduktase Akkumulation sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene festgestellt werden (Barroso et al., 2006). Demgegenüber zeigten *Arabidopsis*-Keimlinge nach Arsenbehandlung eine signifikante Zunahme der GSNO-Reduktase Aktivität, was mit der gleichzeitigen Abnahme der zellulären GSNO-Konzentration korrelierte (Leterrier et al., 2012).

Des Weiteren konnte im Rahmen von Hitzestress-Tests nachgewiesen werden, dass GSNO-Reduktase eine wichtige Funktion hinsichtlich der Temperatur-Adaption besitzt, da Knock-out Pflanzen deutlich sensitiver auf einen Temperaturanstieg reagierten als Wildtyp-Pflanzen. Angesichts der Tatsache, dass in Wildtyp-Pflanzen nach Erwärmung keine Änderung der GSNO-Reduktase Aktivität messbar war, scheint vermutlich der konstitutiv erhöhte GSNO bzw. SNO-Gehalt in den Mutanten für die Hitzeanfälligkeit verantwortlich zu sein (Lee et al., 2008).

Darüber hinaus wurden *gsnor* Knock-out Pflanzen in Screening-Versuchen auf Paraquat-haltigem Medium als Herbizid-resistente Pflanzen identifiziert. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieser Phänotyp mit einer Reduzierung der Zelltod-Entwicklung assoziiert war und offenbar auf höhere NO-Gehalte zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte zudem in Wildtyp-Pflanzen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Paraquat die Akkumulation von GSNO-Reduktase auf Proteinebene induziert. Ein detaillierter Reaktionsmechanismus, inwiefern NO die Paraquat-Toleranz beeinflusst, wurde in diesem Zusammenhang allerdings nicht beschrieben (Chen et al., 2009).

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

In Pflanzen ist Stickstoffmonoxid als Signalmolekül an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Vorgänge direkt oder indirekt beteiligt, was sowohl physiologische Prozesse als auch die Reaktion auf umweltbedingte Stressfaktoren einschließt. Die Verfügbarkeit von NO, welches intrazellulär größtenteils in gebundener Form als S-Nitrosoglutathion (GSNO) vorliegt, wird primär durch das Enzym GSNO-Reduktase kontrolliert, das somit eine zentrale Rolle hinsichtlich der NO-abhängigen Signaltransduktion einnimmt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe eines „reverse genetics“-Ansatzes die Bedeutung der GSNO-Reduktase für den pflanzlichen Metabolismus in *Arabidopsis thaliana* genauer zu charakterisieren. Für die Funktionsanalyse sollen zunächst die Auswirkungen des GSNO-Reduktase Verlustes auf das phänotypische Erscheinungsbild sowie den allgemeinen NO-Stoffwechsel in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden. Im letztgenannten Fall lassen sich anhand der quantitativen Bestimmung verschiedener NO-Metabolite mit Hilfe Ozon-basierter Gasphasen-Chemilumineszenz somit Rückschlüsse hinsichtlich der Rolle von GSNO-Reduktase für die zelluläre NO-Homöostase ableiten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt vor allem auf der Untersuchung der Abwehrantwort von *gsnor* Knock-out Linien nach unterschiedlicher Stressexposition. In diesem Zusammenhang sollen einerseits Veränderungen auf Proteomebene nach kompatibler und inkompatibler *Pseudomonas syringae*-Infektion im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen analysiert werden. Da für die Mutante im Rahmen dieses Pathosystems bisher nur Expressionsdaten einzelner Gene vorliegen (Feechan et al., 2005, Rustérucci et al., 2007), sollen mit Hilfe Fluoreszenz-basierter 2D-Gelelektrophorese (DIGE-Technologie) und massenspektrometrischer Identifikation differentiell regulierter Proteine, neue Erkenntnisse bzgl. Variationen in der Immunantwort zwischen beiden Linien gewonnen werden.

Darüber hinaus soll durch Behandlung mit dem Herbizid Paraquat überprüft werden, welche Funktion das Enzym GSNO-Reduktase speziell bei ROS-induziertem oxidativem Stress besitzt. In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität in einer geringeren Sensitivität gegenüber Paraquat resultiert (Chen et al., 2009). Auf der Grundlage dieser Beobachtung soll anhand der Charakterisierung von Glutathion und Glutathion-abhängiger Enzyme herausgefunden werden, ob die Ursache des Paraquat-toleranten Phänotyps von *gsnor* Insertionslinien auf eine NO-abhängige Stimulation des antioxidativen Systems zurückzuführen ist.

Ferner soll ermittelt werden, ob NO die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies durch Interaktion mit antioxidativen Schutzenzymen direkt beeinträchtigen kann. Als Studienobjekt werden hierfür Superoxid-Dismutasen ausgewählt, die als erste Instanzen des Abwehrsystems gegenüber oxidativen Stressbedingungen fungieren und bereits als mögliche Zielproteine für NO-induzierte posttranslationale Modifikationen identifiziert werden konnten (Lindermayr et al., 2005). Ziel dieses Versuchs ist es daher, die einzelnen SOD-Isoformen rekombinant herzustellen und deren Enzymaktivität *in-vitro* nach Inkubation mit verschiedenen NO-Donoren zu testen bzw. potentielle NO-Bindungsstellen mittels Massenspektrometrie und zielgerichteter Mutagenese ausfindig zu machen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pflanzenlinien

Name	Ökotyp	Resistenz	Herkunft	Referenz
Col-0 Wt	Columbia		Lehle Seeds	Round Rock, USA
WS Wt	Wassilewskija		Lehle Seeds	Round Rock, USA
<i>gsnor</i> ( <i>hot5-2</i> )	Columbia	Sulfadiazin	Gabi-Kat 315D11	Feechan et al., 2005
<i>gsnor</i>	Wassilewskija	BASTA Kanamycin	INRA flag_298F11	Lee et al., 2008
GSNOR-AS	Columbia	Kanamycin	C. Martinez	Achkor et al., 2003
GSNOR-OE	Columbia	Kanamycin	C. Martinez	Achkor et al., 2003
<i>cue1-1</i>	Columbia	Kanamycin	SALK_007214	He et al., 2004
<i>noa1</i>	Columbia	Kanamycin	SALK_040661	Guo et al., 2003
				Moreau et al., 2008
<i>cad2</i>	Columbia		M. Wirtz	Howden et al., 1995
SAT-OE	Columbia	Kanamycin	M. Wirtz	Freeman et al., 2004

#### 2.1.2. Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Resistenz	Herkunft
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101 (pMP90)	Gentamycin, Rifampicin	1)
<i>Escherichia coli</i>	DH-5 $\alpha$		1)
	Rosetta2 (DE3)	Carbencillin, Chloramphenicol	2)
	Rosetta2 (DE3) pLysS	Carbencillin, Chloramphenicol	2)
	BL21 (DE3) cc4	Carbencillin, Chloramphenicol, Spectinomycin	2)
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>pv tomato</i> DC3000	Rifampicin	3)
	<i>pv tomato</i> DC3000 (avrRpt2)	Kanamycin, Rifampicin	3)

<sup>1)</sup> Institut für biochemische Pflanzenpathologie, HMGU, München

<sup>2)</sup> Institut für Strukturbiologie, HMGU, München

<sup>3)</sup> Universität Fribourg, Department of Biology

### 2.1.3. Antibiotika

Name	Stammlsg. (mg/ml)	Endkonz. (ug/ml)	Hersteller
Ampicillin	100	100	Roche (Mannheim, D.)
Carbenicillin	100	100	Sigma (Deisenhofen, D.)
Chloramphenicol	33 (in Ethanol)	33	Roche (Mannheim, D.)
		10 [für BL21 (DE3) cc4]	
Gentamycin	25	25	Roche (Mannheim, D.)
Kanamycin	50	50	Sigma (Deisenhofen, D.)
Rifampicin	50 (in DMSO)	25 (für <i>Pst</i> DC3000)	Sigma (Deisenhofen, D.)
		10 (für <i>Agrobacterium</i> )	
Spectinomycin	50	100	Sigma (Deisenhofen, D.)
		50 [für BL21 (DE3) cc4]	

Alle Stammlösungen mit Ausnahme von Chloramphenicol und Rifampicin wurden mit Wasser angesetzt und bei -20 °C gelagert.

### 2.1.4. Enzyme

Name	Hersteller
DNase I	Sigma (Deisenhofen, D.)
Glutathion-Reduktase aus Hefe, Nr.: 10105678001	Roche (Mannheim, D.)
iProof High Fidelity DNA Polymerase	BioRad (München, D.)
Lysozym aus Hühnereiweiß, Nr.: L-6876	Sigma (Deisenhofen, D.)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt, D.)
Taq DNA Polymerase	Agrobiogen (Hilgertshausen, D.)
Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch, Nr.: X4376	Sigma (Deisenhofen, D.)

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt, D.) oder MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D.) bezogen.

### 2.1.5. Antikörper

Name	Verd.stufe	Hersteller
<b><u>Primäre Antikörper</u></b>		
Anti-Histidin (Maus, monoklonal)	1:1000	Calbiochem (Darmstadt, D.)
Anti-Nitrotyrosin (Ziege, monoklonal)	1:2000	Millipore (Schwalbach, D.)
<b><u>Sekundäre Antikörper</u></b>		
Anti-Mouse IgG, AP-Konjugat	1:7500	Promega (Mannheim, D.)
Goat Anti-Mouse IgG, HRP-Konjugat	1:3000	Invitrogen (Darmstadt, D.)

### 2.1.6. Reaktionssysteme (Kits)

Name	Hersteller
Absolute QPCR SYBR Green Mix, Nr.: AB-1322	Thermo Scientific (Rockford, USA)
CyDye Fluor Minimal Labelling Kit, Nr.: 25-8010-65	GE Healthcare (LittleChalfont, USA)
2D-Clean-Up Kit, Nr.: 80-6484-51	GE Healthcare (LittleChalfont, USA)
GATEWAY BP Clonase Enzymmix, Nr.: 11789-013	Invitrogen (Darmstadt, D.)
GATEWAY LR Clonase Enzymmix, Nr.: 11791-019	Invitrogen (Darmstadt, D.)
QIAquick Gel Extraction Kit, Nr.: 28704	Qiagen (Hilden, D.)
QIAprep Spin Miniprep Kit, Nr.: 27104	Qiagen (Hilden, D.)
QuantiTect Rev. Transcription Kit, Nr.: 205311	Qiagen (Hilden, D.)
RNeasy Plant Mini Kit, Nr.: 74904	Qiagen (Hilden, D.)
Superscript Reverse Transkriptase Kit, Nr.: 18064-014	Invitrogen (Darmstadt, D.)
West Pico Chemilumineszenz-Kit, Nr.: 34077	Thermo Scientific (Rockford, USA)

### 2.1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von Eurofins MWG Operon (Martinsried, D.) bezogen und als Stammlösungen mit Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt bzw. bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration der Oligonukleotide in allen PCR-Ansätzen lag bei 10 µM.

Name	ATG-Nummer	Sequenz
<b>Primer zum Nachweis der GSNO-Reduktase Nukleotidsequenz mittels RT-PCR</b>		
GSNOR_for	At5g43940	5' - ATGGCGACTCAAGGTCAG - 3'
GSNOR_rev		5' - TCATTTGCTGGTATCGAGGAC - 3'
<b>Primer für Vervielfältigung von Superoxid-Dismutase Nukleotidsequenzen mittels RT-qPCR</b>		
MnSOD_for502	At3g10920	5' - GTTGACACAACACTGCCAATCAG - 3'
MnSOD_rev621		5' - CTCAGGCCTCACATTTTTGTAC - 3'
FeSOD1_for195	At4g25100	5' - CCACAGCACTTACAACAATGG - 3'
FeSOD1_rev317		5' - AGCTCTCCTGATGGTTTTCT - 3'
FeSOD2_for655	At5g51100	5' - TGGGATTATTCTCCACTTCTCA - 3'
FeSOD2_rev774		5' - AGTTTCCCATGACACAAGCTT - 3'
FeSOD3_for323	At5g23310	5' - CATAACAACGGGAATCCTT - 3'
FeSOD3_rev446		5' - TGCTCAAGAACACCCTTTTG - 3'
CZSOD1_for233	At1g08830	5' - GACATGCTGGTGATCTAGGAAA - 3'
CZSOD1_rev352		5' - CAACAACAGCCCTACCAACA - 3'
CZSOD2_for59	At2g28190	5' - CTTCTCCAATCCTTCAACTCT - 3'
CZSOD2_rev182		5' - ACAACTGTCAACGCTTTCGA - 3'
CZSOD3_for170	At5g18100	5' - ATACCACAAATGGCTGCATCT - 3'
CZSOD3_rev289		5' - TTGATCCTGCAAGAATGTTACC - 3'

Name	ATG-Nummer	Sequenz
<b><u>Primer für Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen der Referenzgene</u></b>		
Aktin2_for821	At3g18780	5'- TGG AATCCACGAGACAACCTA - 3'
Aktin2_rev1102		5'- ttctgtgaacgattcctggac - 3'
S16_for356	At2g09990	5'- TTTACGCCATCCGTCAGAGTAT - 3'
S16_rev541		5'- TCTGGTAACGAGAACGAGCAC- 3'
Tubulin9_for	At4g20890	5'- GTACCTTGAAGCTTGCTAATCCTA - 3'
Tubulin9_rev		5'- GTTCTGGACGTTTCATCATCTGTTC - 3'
Ubiquitin5_for369	At3g62250	5'- GATGGATCTGGAAAGGTTTCAG - 3'
Ubiquitin5_rev536		5'- ATCTACCGCTACAACAGATCAAG - 3'
<b><u>Primer für Vervielfältigung von Superoxid-Dismutase Nukleotidsequenzen mittels RT-PCR</u></b>		
MnSOD_for		5'- ATGGCGATTCGTTGTGTAGC - 3'
MnSOD_rev (mit Stopcodon)		5'- TCAGTTGTTTTCTTCTCATAAACC - 3'
MnSOD_rev (ohne Stopcodon)		5'- GTTGTTCCTTCTCATAAACCTC - 3'
FeSOD1_for		5'- ATGGCTGCTTCAAGTGCTG - 3'
FeSOD1_rev (mit Stopcodon)		5'- TTAAGCAGAAGCAGCCTTGG - 3'
FeSOD1_rev (ohne Stopcodon)		5'- AGCAGAAGCAGCCTTGGC - 3'
FeSOD2_for		5'- ATGATGAATGTTGCAGTGACAG - 3'
FeSOD2_rev (mit Stopcodon)		5'- TTAGTCAACCTCAGATACATCG - 3'
FeSOD2_rev (ohne Stopcodon)		5'- GTCAACCTCAGATACATCGAT - 3'
FeSOD3_for		5'- ATGAGTTCTTGTGTTGTGACG - 3'
FeSOD3_rev (mit Stopcodon)		5'- TTAAGCGATTGGGATGTTGG - 3'
FeSOD3_rev (ohne Stopcodon)		5'- AGCGATTGGGATGTTGGG - 3'
CZSOD1_for		5'- ATGGCGAAAGGAGTTGCAG - 3'
CZSOD1_rev (mit Stopcodon)		5'- TTAGCCCTGGAGACCAATG - 3'
CZSOD1_rev (ohne Stopcodon)		5'- GCCCTGGAGACCAATGAT - 3'
CZSOD2_for		5'- ATGGCTGCCACCAACACAA - 3'
CZSOD2_rev (mit Stopcodon)		5'- TTAGAGCGGCGTCAAGC - 3'
CZSOD2_rev (ohne Stopcodon)		5'- GAGCGGCGTCAAGCCA - 3'
CZSOD3_for		5'- ATGGAAGCTCCTAGAGGAAATC - 3'
CZSOD3_rev (mit Stopcodon)		5'- CTATAGTTTAGCATCCGCAGAT - 3'
CZSOD3_rev (ohne Stopcodon)		5'- TAGTTTAGCATCCGCAGATGATT - 3'
<b><u>Primer zur GATEWAY-Klonierung von Superoxid-Dismutase Nukleotidsequenzen</u></b>		
attB1_MnSOD_for (mit Stopcodon)		5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCGATTCGTTGTGTAGC - 3'
attB2_MnSOD_rev (mit Stopcodon)		5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TCAGTTGTTTTCTTCTCATAAACC - 3'
attB1_MnSOD_for (ohne Stopcodon)		5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CGAGAGATAGACGCGATTTCGTTGTGTAGC - 3'
attB2_MnSOD_rev (ohne Stopcodon)		5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC GTTGTTTTCTTCTCATAAACCTC - 3'



Name	Sequenz
attB1_FeSOD1_for (mit Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCTGCTTCAAGTGCTG - 3'
attB2_FeSOD1_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAAGCAGAAGCAGCCTTGG - 3'
attB1_FeSOD1_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGAATAGACATGCTGCTTCAAGTGCTG - 3'
attB2_FeSOD1_rev (ohne Stopcodon)	5'- GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCA GCAGAAGCAGCCTTGGC - 3'
attB1_FeSOD2_for (mit Stopcodon)	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGATGAATGTTGCAGTGACAG - 3'
attB2_FeSOD2_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGATGAA - 3'
attB1_FeSOD2_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGAGATAGACATGATATTGCAGTGACA - 3'
attB2_FeSOD2_rev (ohne Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC GTCAACCTCAGATACATCGAT - 3'
attB1_FeSOD3_for (mit Stopcodon)	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGAGTTCTTGTGTTGTGACG - 3'
attB2_FeSOD3_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAAGCGATTGGGATGTTGG - 3'
attB1_FeSOD3_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGAGTAGACATGAGTTCGTGTGTGACG - 3'
attB2_FeSOD3_rev (ohne Stopcodon)	5'- GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCA GCGATTGGGATGTTGGG - 3'
attB1_CZSOD1_for (mit Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCGAAAGGAGTTGCAG - 3'
attB2_CZSOD1_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAGCCCTGGAGACCAATG - 3'
attB1_CZSOD1_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGACATGCGAAGAGTGACG - 3'
attB2_CZSOD1_rev (ohne Stopcodon)	5'- GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCG CCCTGGAGACCAATGAT - 3'
attB1_CZSOD2_for (mit Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGTTTCCGCGGCGAAGAAGGC - 3'
attB2_CZSOD2_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAGAGCGGCGTCAAGC - 3'
attB1_CZSOD2_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGAGAAACCATGTTCCGCGAAGAAGGC - 3'
attB2_CZSOD2_rev (ohne Stopcodon)	5'- GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCG AGCGGCGTCAAGCCA - 3'

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
attB1_CZSOD3_for (mit Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGAAGCTCCTAGAGGAAATC - 3'
attB2_CZSOD3_rev (mit Stopcodon)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CTATAGTTTAGCATCCGCAGAT - 3'
attB1_CZSOD3_for (ohne Stopcodon)	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGAGATAACCATGAGCCTAGAGGAATC - 3'
attB2_CZSOD3_rev (ohne Stopcodon)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TAGTTTAGCATCCGCAGATGATT - 3'
<b><u>Primer zur Sequenzierung von GATEWAY-Vektoren</u></b>	
pDONR221 M13_for (MediGX)	5'- TGTA AACGACGGCCAGT - 3'
pDONR221 M13_rev (MediGX)	5'- GGAAACAGCTATGACCATG - 3'
pDEST17_for	5'- TTAATACGACTCACTATAGGG - 3'
pDEST17_rev	5'- CTTTGTTAGCAGCCTCGA - 3'
pDEST42_for	5'- TTAATACGACTCACTATAGGG - 3'
pDEST42_rev	5'- GTTAGGGATAGGCTTACC - 3'
<b><u>Primer für Kolonie-PCR</u></b>	
attB1_for	5'- GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCT - 3'
attB2_rev	5'- GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGT - 3'
<b><u>Primer für zielgerichtete Mutagenese der Mn-SOD Nukleotidsequenz</u></b>	
MnSODY63F_for	5'- CATCACCAGGCTTTTGTACTAATTAC - 3'
MnSODY63F_rev	5'- GTAATTAGTAACAAAAGCCTGGTGATG - 3'

### 2.1.8. Vektoren

<b>Name</b>	<b>Selektion</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verwendung</b>
pDONR221	Kanamycin	Invitrogen (Darmstadt, D.)	GATEWAY-Klonierungsvektor
pDEST17	Ampicillin	Invitrogen (Darmstadt, D.)	GATEWAY-Expressionsvektor
pDEST17: <i>MnSOD</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von MnSOD mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>FeSOD1</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD1 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>FeSOD2</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD2 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>FeSOD2</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD2 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag

## Material und Methoden

<b>Name</b>	<b>Selektion</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verwendung</b>
pDEST17: <i>FeSOD3</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD3 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>CZSOD1</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD1 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>CZSOD2</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD2 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST17: <i>CZSOD3</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD3 mit N-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDest 42	Ampicillin	Invitrogen (Darmstadt, D.)	GATEWAY-Expressionsvektor
pDEST42: <i>MnSOD</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von MnSOD mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>FeSOD1</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD1 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>FeSOD2</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD2 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>FeSOD3</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von FeSOD3 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>CZSOD1</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD1 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>CZSOD2</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD2 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pDEST42: <i>CZSOD3</i>	Ampicillin	vorliegende Arbeit	Rekombinante Produktion von CZSOD3 mit C-term. His <sub>6</sub> -Tag
pAlligator2(-35S)	Fluoreszenz	A. Schäffner, BIOP	GATEWAY-Expressionsvektor ohne 35S-Promotor
pAlligator2: <i>proGSNOR::GSNOR</i>	Fluoreszenz	vorliegende Arbeit	Agrotransformation für genetische Komplementation
pBGWFS7	BASTA	Universität Gent, Belgien	GATEWAY-Expressionsvektor
pBGWFS7: <i>proGSNOR::GUS</i>	BASTA	vorliegende Arbeit	Agrotransformation für Expressionsstudien

### 2.1.9. Medien, Puffersysteme und Lösungen

Für die Herstellung von Puffern, Nährmedien und Lösungen wurde entsalztes und filtriertes Wasser (H<sub>2</sub>O bidest) aus einer Reinstwasseranlage (Ultra Clear Direct SG, Barsbüttel, D.) verwendet. Soweit nicht anderweitig aufgeführt, wurden die verwendeten Laborchemikalien und Lösungsmittel von Carl-Roth (Karlsruhe, D.), Sigma (Deisenhofen, D.), Merck (Darmstadt, D.) oder GE Healthcare (LittleChalfont, USA) bezogen und waren stets von analysenreiner Qualität. Zur Sterilisation aller hitzestabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Evo 150 MediTech, Norderstedt, D. bzw. HV-50 HMC, Tüssling, D.) verwendet. Die Flüssigkeiten wurden für 20 min bei 121° C und 1,013x10<sup>5</sup> Pa Überdruck sterilisiert. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl.

Name	Zusammensetzung
<b><u>Medien</u></b>	
King's B-Medium	2% (w/v) Trypton (Duchefa, Haarlem, Holland) 1% (v/v) Glycerin 0,15% (w/v) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,15% (w/v) MgSO <sub>4</sub> pH-Wert auf 7,2 einstellen, 1,5% (w/v) Agar für Festmedien
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Duchefa, Haarlem, Holland) 0,5% (w/v) NaCl pH-Wert auf 7,2 einstellen 1,5% (w/v) Agar für Festmedien
Transformationspuffer1 (TFB1)	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (v/v) Glycerin pH-Wert mit Essigsäure auf 5,8 einstellen
Transformationspuffer2 (TFB2)	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15% (v/v) Glycein pH-Wert mit KOH auf 6,5 einstellen

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Autoinduktionsmedium	960 ml ZY-Medium 20 ml 50 x M 20 ml 50 x 5052 0,2 ml 1000 x Spurenelemente
	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 2 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM NH <sub>4</sub> Cl 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5% (w/v) Glycerin 0,2% (w/v) α-Laktose 0,05% (w/v) Glukose 50 mM FeCl <sub>3</sub> 20 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM ZnSO <sub>4</sub> 2 mM CoCl <sub>2</sub> 2 mM CuCl <sub>2</sub> 2 mM NiCl <sub>2</sub> 2 mM Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> 2 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> 2 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
MS-Medium	1% (w/v) Saccharose 0,22% MS-Medium M5519 pH-Wert auf 5,8 einstellen, 0,5% (w/v) Gelrite für Festmedien
RB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) NaCl 0,2 % (v/v) 1 M NaOH
<b><u>Puffersysteme für gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</u></b>	
50 x TAE-Laufpuffer	2 M Tris 50 mM EDTA 5,7% (v/v) Eisessig
Tris-EDTA(TE)-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
10 x RNA-Ladepuffer	10 mM EDTA (pH 8,0) 50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF

Name	Zusammensetzung
5 x DNA-Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin 1 x TAE-Puffer 0,4% Orange G

**Puffersysteme für Extraktion von homogenisiertem Pflanzenmaterial**

Extraktion für 2D-Gelelektrophorese	100 mM Tris 10 mM EDTA (pH 8,0) 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM Ascorbinsäure pH-Wert auf 8,0 einstellen und 0,07% (v/v) β-Mercaptoethanol vor Gebrauch zugeben
Extraktion für Stickoxid-Bestimmung	1 x PBS-Puffer (pH 7,4) 137 mM NaCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM N-Ethylmaleinimid 2,5 mM EDTA (pH 8,0)
Extraktion für Aktivitätsbestimmung des GSNO-Reduktase-Enzyms	100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 2 mM DTT 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 10% (v/v) Glycerin 0,2% TritonX100
Extraktion für Aktivitätsbestimmung von antioxidativen Enzymen	50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 0,5% TritonX100 0,5% PVP-40

**Puffersysteme für 1D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

1 x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 4% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 2 mM DTT 10% (v/v) Glycerin
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% (w/v) SDS

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10 x Laufpuffer	2 M Glycin 250 mM Tris 1% (w/v) SDS
<b><u>Puffersysteme für isoelektrische Fokussierung von Proteinen</u></b>	
Labellingpuffer für Protein-Solubilisierung	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 20 mM Tris 4% (w/v) CHAPS pH-Wert auf 8,5 einstellen
2 x Lysispuffer für Denaturierung markierter Proteine	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4% (w/v) CHAPS 2% (v/v) IPG-Puffer, pH 3-11 NL 2% (w/v) DTT 0,04% (w/v) Bromphenolblau
Rehydrierungspuffer für Quellung von Gelstreifen	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2% (w/v) CHAPS 0,8% (w/v) DTT 0,5% (v/v) IPG-Puffer, pH 3-11 NL 0,002% (w/v) Bromphenolblau
<b><u>Puffersysteme für 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen</u></b>	
Äquilibrierungspuffer für IEF-Gelstreifen	6 M Harnstoff 50 mM Tris-HCL (pH 8,8) 30% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,002% (w/v) Bromphenolblau
Gellösung für Proteingele	375 mM Tris-HCl (pH 8,8) 12,5% (v/v) Rotiphorese-Acrylamidlösung 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,03% (v/v) TEMED
Agaroselösung zum Überschichten von Proteingelen	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,5% (w/v) Agarose 0,1% (w/v) SDS

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b><u>Lösungen zur Anfärbung von Proteinen</u></b>	
Coomassie-Färbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie G250
Coomassie-Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Silber-Färbelösungen	Fixierlösung 50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure 0,2% (v/v) Formaldehyd Färbelösung 12 mM AgNO <sub>3</sub> 0,3% (v/v) Formaldehyd Entwicklungslösung 0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,02 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,2% (v/v) Formaldehyd
Ponceau-S-Färbelösung	0,5% (w/v) Ponceau-S 1% (v/v) Essigsäure
<b><u>Puffersysteme und Lösungen für Transfer und Immunodetektion von Proteinen</u></b>	
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol 0,4% (w/v) SDS
Tris gepufferte Saline(TBS)-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Tris (pH 7,4) 1 mM MgCl <sub>2</sub>
TBS-T-Puffer	0,5% (v/v) Tween20 in TBS-Puffer
Blockierungspuffer	1% (w/v) BSA (Serva, Heidelberg, D.) 1% (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, D.) in TBS-T-Puffer lösen
Alkalische Phosphatase(AP)-Puffer	100 mM Tris (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
AP-Entwicklungspuffer	0,33% (v/v) NBT 0,33% (v/v) BCIP vor Gebrauch in AP-Puffer lösen
NBT-Lösung	10% (w/v) NBT in 70% (v/v) DMF



<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
BCIP-Lösung	5% (w/v) BCIP in 100% (v/v) DMF
Meerrettichperoxidase (HRP)-Entwicklungslösung	50% (v/v) Peroxid-Lösung (Thermo Scientific, Rockford, USA) 50% (v/v) Luminol-Lösung (Thermo Scientific, Rockford, USA)

**Puffersysteme für Aufschluss und Reinigung rekombinanter Proteine**

Puffer A	300 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 20 mM Imidazol 0,02% (v/v) Thioglycerin, (SantaCruzBiotech., Santa Cruz, USA)
Lysis-Puffer B für Zellaufschluss	10 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM Protease-Inhibitor AEBSF 1 mg/ml Lysozym 0,2 µg/ml DNase I in PufferA lösen
Waschpuffer (1)	1 M NaCl in Puffer A
Waschpuffer (2)	20 mM Imidazol in Puffer A
Elutionspuffer	300 mM Imidazol in Puffer A

**Puffersysteme für Enzymtests**

GSNO-Reduktase- Reaktionspuffer	1 M Tris (pH 8,0) 0,5 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 mM NADH
Glutathion-Reduktase- Reaktionspuffer	100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 mM NADPH
Glutathion S-Transferase- Reaktionspuffer	100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) 1 mM CDNB (in 80% (v/v) Ethanol)
SOD-Reaktionspuffer(1)	50 mM Natriumcarbonat-Puffer (pH 10,2) 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 25 µM NBT 0,1 mM Xanthin (in 1 M NaOH)
Glutathion-Peroxidase- Reaktionspuffer	100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,4 mM NADPH 0,3 U/ml Glutathion-Reduktase

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SOD-Reaktionspuffer (2)	50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 50 µM Xanthin 10 µM Cytochrom C pH-Wert auf 7,8 einstellen
<b><u>Puffersysteme für Glutathion- und NO-Messung</u></b>	
Glutathion-Puffer	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,8 mM NADPH 1 mM DTNB (in DMSO)
Reduktionslösung für Nitritbestimmung	1,1% (w/v) Kaliumiodid 0,7% (w/v) Iod 78% (v/v) Essigsäure 22% (v/v) Wasser
Reduktionslösung für Nitratbestimmung	0,8% (w/v) VCl <sub>3</sub> in 1M HCl
<b><u>Puffersysteme für Anfärbung von Pflanzenmaterial</u></b>	
GUS-Färbepuffer	Fixierpuffer 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0) 0,05% (v/v) TritonX100 0,5% (v/v) Formaldehyd Färbepuffer 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0) 0,1% (v/v) TritonX100 1 mM C <sub>6</sub> FeK <sub>4</sub> N <sub>6</sub> 1 mM C <sub>6</sub> FeK <sub>3</sub> N <sub>6</sub> 1 mM X-Gluc in DMSO
Wasserstoffperoxid-Färbepuffer	MES-Puffer (pH 6,5) 0,1% (w/v) DAB
Superoxid-Färbepuffer	50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,4) 10 mM NaN <sub>3</sub> 0,1% (w/v) NBT

### 2.1.10. Computerprogramme und Webseiten

Name	Verwendung	Hersteller/Webseite
<b><u>Programme</u></b>		
BioEdit 7.13	Sequenzüberprüfung	Abbott Laboratories (Chicago, USA)
CellP	Mikroskopaufnahmen	Olympus (Hamburg, D.)
DeCyder 2D 6.5	Analyse von 2D-Bildern	Amersham Biosciences (Freiburg, D.)
Ettan IPGphor 3	Isoelektr. Fokussierung	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
7500 Fast System	Auswertung RT-qPCR	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
GeNorm	Normalisierung RT-qPCR	Universität Gent (Belgien)
GPS Explorer 3.6	Auswertung MALDI/MS-Daten	Applied Biosystems (Carlsbad)
ImageJ 1.46	Wurzel-Vermessungen	NIH (Bethesda, USA)
ImageQuant 5.2	Darstellung von 2D-Bildern	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
LinRegPCR	Effizienzberechnung RT-qPCR	HFRC (Amsterdam, Holland)
Mascot	Proteinidentifizierung	Cancer Research Technology (Cambridge, Großbritannien)
NO Analysis Software 3.2	Auswertung NO-Messungen	Analytix (Baldon, Großbritannien)
Primer Express 3.0	Primer-Design RT-qPCR	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
PyMOL 1.5	3D-Darstellung von Proteinen	DeLano Scientific (Palo Alto, USA)
Scaffold 3.0	Auswertung LC/MS-Daten	Proteome Software (Portland, USA)
Typhoon Scanner 5	Digitalisierung von 2D-Gelen	Amersham Biosciences (Freiburg, D.)
<b><u>Webseiten</u></b>		
SWISSMODEL	Proteinmodellierung	<a href="http://www.swissmodel.expasy.org">www.swissmodel.expasy.org</a>
SwissProt	Datenbankrecherche	<a href="http://www.expasy.org/sprot">www.expasy.org/sprot</a>
TAIR	Datenbankrecherche	<a href="http://www.arabidopsis.org">www.arabidopsis.org</a>
TargetP	Identifizierung Signalpeptide	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP">www.cbs.dtu.dk/services/TargetP</a>

### 2.1.11. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Econo-Pac Chromatographie-Säulen (20 ml)	BioRad (München, D.)
DryStrip Gelstreifen, 24 cm, pH 3-11 NL	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Integrid Petrischalen mit Gitternetz	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D.)

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Micro Bio-Spin Chromatographie-Säulen (2 ml)	BioRad (München, D.)
Mikrowellplatte 96-fach	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D.)
Mikrowellplatte Thermo-Fast AB-1100	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Multiflor Anzuchtpaletten	Teku (Lohne)
Nitrozellulosemembran Protran BA 85	Whatman (Dassel)
Nylonmembran (71 µm)	Versedag (Kempfen, D.)
Petrischalen zwei- und dreigeteilt	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D.)
Petrischalen quadratisch	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D.)
Probentaschen für IEF	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
PS halbmikro Einmalküvetten)	Brandt GmbH (Wertheim, D.)
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences (Freiburg, D.)
Sephadex G-25M PD-10 Säulen	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Sprühdose EcoSpray	Labo Chimie France (Meyreuil, Frankreich)
Zeba Spin Entsalzungssäulen (0,5 ml)	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)

### 2.1.12. Gerätschaften

<b>Name</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklaven	Evo 150	MediTech (Norderstedt, D.)
	HV 50	HMC (Tüßling, D.)
Brutschränke	Fricoll 111	Memmert (Schwabach, D.)
	BM 500	Memmert (Schwabach, D.)
Elektroblotter	Milliblot-Graphit-System	Millipore (Schwalbach, D.)
Elektrophorese-Netzteile	EPS 601	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
	Power Pack P25	Biometra (Göttingen, D.)
Elektrophorese-Systeme	SE 250 Mighty Small II	Hoefer (San Francisco, USA)
	Ettan DALSix	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Elektroporator	Gene Pulser	BioRad (München, D.)
Geldokumentationssystem	Gel-Doc 2000	BioRad (München, D.)
Gelgießstand	Ettan DALSix	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)

## Material und Methoden

<b>Name</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Homogenisatoren	Hochdrucksystem M110L	Microfluidics (Newton, USA)
	Ultraschallsystem HD2200	Bandelin (Berlin, D.)
IEF-Apparatur	Ettan IPGphor3	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Kamera	D300	Nikon (Tokio, Japan)
Keramikhalterung mit Elektrodenstet	Ettan IPGphor	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Mikroskope	BX61	Olympus (Hamburg, D.)
	Axioskop	Carl Zeiss (Jena, D.)
NO-Analysator	Sievers 280i	Analytix (Baldon, Großbritannien)
pH-Elektrode	InLab Routine	Mettler Toledo (Gießen, D.)
pH-Meter	pH 523	WTW (Weilheim, D.)
Präzisionswaagen	KB 100-3	Kern & Sohn (Balingen, D.)
	A 210	Sartorius (Göttingen, D.)
Rehydratisierungskassette	Immobiline DryStrip	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Reinstwasseranlage	Ultra Clear Direct	SG (Barsbüttel, D.)
Scanner	Typhoon 9400	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
	Perfection 3170	Epson (Meerbusch, D.)
Schüttler	Innova 4340	NewBrunswickScientific (Edison, USA)
Spektrophotometer	Ultrospec 3100 Pro	Amersham Biosciences (Freiburg, D.)
	NanoDrop ND 1000	NanoDropTechnologies (Wilmington)
	GENios Plate Reader	Tecan (Crailsheim, D.)
Thermocycler	PTC 200	BioRad (München, D.)
	7500 Real-Time PCR	Applied Biosystem (Carlsbad, USA)
Thermomixer	Compact 5436	Eppendorf (Hamburg, D.)
UV-Tisch	Transilluminator	Fröbel Labortechnik (Lindau, D.)
Vakuumpumpe	Trivac D2,5 E	Leybold Vakuum (Köln, D.)
Wasserthermostat	MultiTemp III	GE Healthcare (Little Chalfont, USA)
Zentrifugen	Rotanta 460R	Hettich (Baech, D.)
	Kühlzentrifuge	
	5417R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, D.)
	Sorvall Evolution RC	Thermo Scientific (Rockford, USA)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Pflanzliche Methoden**

#### **2.2.1.1. Anzuchtbedingungen**

In der vorliegenden Arbeit standen verschiedene *Arabidopsis thaliana*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0) und Wassilewskija (WS) als Versuchspflanzen zur Verfügung. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte tagsüber bei 20° C bzw. nachts bei 18° C unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Lichtintensität während der Photoperiode betrug  $70 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Die Samen wurden entweder auf Erde oder MS-Medium verteilt und für zwei Tage zur Vernalisation bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt, bevor sie unter den jeweiligen Bedingungen angezogen wurden.

#### **2.2.1.2. Pflanzenaussaat auf Erde**

Für Infektionsexperimente, RT-qPCR-Analysen sowie molekulare und phänotypische Untersuchungen wurde Anzuchterde (Floraton 1, Floragard) im Verhältnis 4:1 mit Quarzsand vermischt, mit Wasser angefeuchtet und jeweils fünf Samen mit Hilfe eines Zahnstochers auf mit Erde gefüllten Kunststoffschalen (Multiflorpaletten, Teku) abgelegt. In den ersten Anzuchttagen nach der Stratifikation wurden durchsichtige Plastikhauben über den Schalen platziert, um eine hohe Luftfeuchtigkeit für optimale Keimungsverhältnisse zu generieren.

#### **2.2.1.3. Pflanzenaussaat unter sterilen Bedingungen**

Für Keimungsversuche, Dokumentation des Wurzelwachstums und Selektion transgener Pflanzen wurden Samen auf  $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium in Petrischalen ausgesät. Um mögliche Kontaminationen des Agarmediums zu vermeiden, erfolgte zuvor einer Oberflächensterilisierung des Saatgutes. Hierfür wurden die Samen unter der Sterilbank auf Filterpapier abgelegt, mit 80% Ethanol versetzt und im Luftstrom getrocknet. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, die Samen anschließend mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder durch Streuung möglichst gleichmäßig auf dem Medium verteilt und die Petrischalen anschließend mit einem luftdurchlässigen Gewebepband versiegelt.

#### **2.2.1.4. Behandlung mit Paraquat**

Die Anwendung von Paraquat (Methylviologen Dichlorid-Hydrat, Sigma) erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationsstufen sowie durch verschiedene Verfahren und wurde hierfür in deionisiertem Wasser gelöst. Um den Einfluss von Paraquat auf das Keimungsverhalten von Pflanzen zu testen, wurde das MS-Medium mit steril filtrierter Paraquatlösung versetzt und

das Pflanzenwachstum nach sechs Tagen dokumentiert. Für die Infiltration von sterilen Keimlingen wurde mehrmals ein Vakuum für ca. 10 sec angelegt, überschüssige Paraquatlösung durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt und die Veränderungen nach 24 h Belichtungszeit beobachtet. Im Falle der Sprühapplikation wurden 2 ml der jeweiligen Paraquatlösung mit Hilfe einer Spritzdose (EcoSpray, Labo Chimie France) als feiner Sprühnebel auf die Keimlinge verteilt, um eine möglichst gleichmäßige Benetzung der Blattfläche zu erzielen und die Symptomausprägungen nach 48 h Belichtungszeit erfasst.

#### **2.2.1.5. GUS-Färbung von Pflanzengewebe**

Bei dieser Farbreaktion wird das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Glukuronid (X-Gluc) durch  $\beta$ -Glukuronidase zu Brom-4-Chlor-Indol umgesetzt, welches zu einem blauen Indigo-farbstoff dimerisiert. Hierfür wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial zunächst unter Verwendung einer Vakuumpumpe mehrmals für 10 sec mit Fixierpuffer infiltriert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann dreimal mit 500 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit Färbepuffer versetzt, für 1 h bei 37° C im Wasserbad aufbewahrt und die Reaktion durch Waschen mit 70% Ethanol gestoppt. Die Entfärbung des Pflanzenmaterials erfolgte daraufhin in 70% Ethanol bei 80° C im Wasserbad.

#### **2.2.1.6. NBT-Färbung von Pflanzengewebe**

Bei dieser Farbreaktion wird der gelbe, wasserlösliche NBT-Farbstoff durch Reaktion mit Superoxidradikalen zu dem unlöslichen, blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Für diesen Versuch wurde NBT-Färbepuffer nach unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h und 6 h) in das zu untersuchende Pflanzenmaterial durch mehrmaliges Anlegen eines 10-sekündigen Vakuums eingebracht. Nach 45-minütiger Inkubation im Dunkeln und dreimaligem Waschen mit Wasser erfolgte eine Entfernung des Chlorophylls in 90% Ethanol bei 60° C im Wasserbad.

#### **2.2.1.7. DAB-Färbung von Pflanzengewebe**

Für den Nachweis der Wasserstoffperoxid-Bildung wurde der Farbstoff Diaminbenzidin (DAB) verwendet, der durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidasen polymerisiert und als braunes Präzipitat ausfällt. Zu diesem Zweck wurde DAB-Färbepuffer nach unterschiedlichen Zeitpunkten (4 h und 8 h) durch mehrmaliges Anlegen eines 10-sekündigen Vakuums in das Blattgewebe infiltriert. Nach mehrfachem Waschen mit Wasser wurden die Keimlinge anschließend auf ein feuchtes Filterpapier gelegt und 45 min im Licht inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion und die Entfärbung erfolgten analog zur NBT-Färbung in 90% Ethanol bei 60° C im Wasserbad.

### **2.2.1.8. Mikroskopie und Fotografie**

Die mikroskopischen Untersuchungen von Pflanzenmaterial wie Quer- und Längsschnitte oder vergrößerte Detailaufnahmen wurden mit Hilfe des BX61-Mikroskops der Firma Olympus durchgeführt, wobei jeweils fünf bis zehn Pflanzen für die jeweilige Analyse herangezogen wurden. Für die Anfärbung zellulose- bzw. ligninhaltiger Zellen wurden die Schnitte zuvor mit Astra Blau (Sigma, D.) bzw. Safranin (Sigma, D.) versetzt.

Die photographische Darstellung und Auswertung mikroskopischer Präparate erfolgte mit Hilfe einer Mikroskop-integrierten Kamera sowie dem Softwareprogramm CellP der Firma Olympus. Für alle übrigen Aufnahmen wurde eine D300-Kamera der Firma Nikon verwendet. Die Selektion genetisch komplementierter *gsnor* Knock-out Linien erfolgte unter Verwendung eines Axioskop-Mikroskops der Firma Carl Zeiss.

### **2.2.2. Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.2.1. Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen**

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurde 2,5 ml RB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und bei 37° C über Nacht bei 200 g inkubiert. Die gesamte Übernachtskultur wurde anschließend auf 250 ml RB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> überimpft und bis zu einer OD<sub>590</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37° C unter konstantem Schütteln angezogen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2.500 g und 4° C wurde der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 100 ml eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min sowie ein weiterer Zentrifugationsschritt, bevor das Sediment in 10 ml vorgekühltem TFB2-Puffer aufgenommen wurde. Im Anschluss an eine 60-minütige Lagerung der Suspension auf Eis wurden die Zellen zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C aufbewahrt.

#### **2.2.2.2. Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen**

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 50 µl Aliquots der kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 80 ng bis 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA wurden die Zellen im Wasserbad für 30 sec einer Temperatur von 42° C ausgesetzt und der Ansatz danach für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37° C unter konstantem Schütteln kultiviert, die Bakteriensuspension kurz abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Ansatzes auf LB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika und Inkubation bei 37° C über Nacht.



### **2.2.2.3. Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Für die Erzeugung elektrokompenter Zellen wurde 2 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und bei 28° C über Nacht unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach Überimpfung der Vorkultur auf 300 ml LB-Medium folgte eine mehrstündige Kultivierung bei 28° C bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 bis 0,7 vorlag. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension zunächst für 30 min auf Eis gekühlt, 20 min bei 4° C bzw. 20 g zentrifugiert und das Zellsediment in 125 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Nach 30-minütiger Aufbewahrung auf Eis und erneuter Zentrifugation bzw. Pellet-Resuspendierung wurden die Zellen nochmals für 60 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Bakterien schließlich in 3 ml eisgekühltem 15% (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. bei -80° C aufbewahrt wurden.

### **2.2.2.4. Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Für die Elektroporation wurden 50 µl Aliquots der kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz nach kurzem Durchmischen sofort in eine -20° C vorgekühlte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm pipettiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Elektroporators GenePulser (BioRad, München) bei 25 µF Zellmembrankapazität sowie einem Ladewiderstand von 400 Ω und einem Spannungsimpuls von 1,25 kV. Anschließend wurde der Transformationsansatz sofort mit 1 ml LB-Medium vermischt, die gesamte Suspension mittels Pasteurpipette abgesaugt und bei 28° C für 2 h unter konstantem Schütteln (200 g) inkubiert. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 4.500 g wurde das Pellet in 400 µl LB-Medium resuspendiert und 50 µl des Ansatzes zur Selektion auf LB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für zwei Tage bei 28° C inkubiert.

### **2.2.2.5. *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Die Transformation erfolgte nach der „floral dip“-Methode, welche auf der Vakuuminfiltration unreifer Blütenstände von *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer Suspension kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen basiert. Hierfür wurde zunächst 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie des *Agrobacterium*-Stammes, welcher zuvor mit den entsprechenden Plasmid-Konstrukten transformiert wurde, angeimpft und über Nacht bei 28° C inkubiert. Nach Überimpfung der Vorkultur auf 300 ml LB-Medium folgte eine erneute Kultivierung bei 28° C über Nacht unter konstantem Schütteln bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 1,4 bis 1,6 vorlag. Die Bakteriensuspension wurde anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 2.500 g und 4° C pelletiert, das Zellsediment in 10 ml einer 5% (w/v) Saccharoselösung

inklusive 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock) aufgenommen und im gleichen Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,8 verdünnt. Die gesamten Blütenstände der zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurden dann für ca. 10 sec in das Infiltrationsmedium eingetaucht und die Pflanzen im Anschluss mit einer Plastikhaube abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Nach zwei Tagen wurde die Abdeckung entfernt und die Pflanzen unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife kultiviert. Die Selektion transformierter Samen erfolgte in Abhängigkeit des verwendeten Vektors entweder mittels Fluoreszenz (pAlligator2) oder BASTA-Resistenz (pB2GW7).

### **2.2.2.6. Bakterieninfektion von *Arabidopsis thaliana***

Für die Proteomanalyse mit infiziertem Pflanzenmaterial wurden die beiden Bakterienstämme *Pseudomonas syringae* DC3000 und *Pseudomonas syringae* DC3000 (avrRpt2) ausgehend von Glycerinkulturen auf King's B-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und zwei Tage bei 28° C inkubiert. Danach wurde 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 28° C unter konstantem Schütteln angezogen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 3.500 g und 4° C pelletiert, das Zellsediment in 3 ml einer 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen und im gleichen Medium zusammen mit 0,0001% (v/v) Silwet L-77 auf eine  $OD_{600}$  von 0,002 eingestellt. Dieser Wert entsprach in etwa einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^6$  Kolonie bildenden Einheiten pro ml Infiltrationslösung. Die bakterielle Infektion mittels Vakuuminfiltration erfolgte schließlich unter Verwendung von sieben Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen, welche zuvor für 24 h unter einer Plastikhaube aufbewahrt wurden, um durch hohe Luftfeuchtigkeit eine erhöhte Stomata-Öffnung zu erzielen. Im Anschluss an die Inokulation wurden die Pflanzen bis zur Ernte des infizierten Blattmaterials bei hoher Luftfeuchtigkeit aufbewahrt, was die Entwicklung von Krankheitssymptomen unterstützte.

### **2.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Zellen bzw. *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen erfolgte ausgehend von 3 ml Vorkulturen, die jeweils mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C bzw. 28° C unter konstantem Schütteln angezogen wurden. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.2.3.2. Isolierung von pflanzlicher RNA**

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattmaterial von vier Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen für Klonierungsreaktionen sowie Überprüfung von Insertionslinien wurde unter Verwendung der Trizol-Methode der Firma Invitrogen durchgeführt. Hierfür wurde tiefgefrorenes Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff fein zermahlen, ca. 100 mg des Pulvers mit 1 ml Trizol versetzt und die RNA gemäß den Vorgaben des Herstellers isoliert. Alternativ zu der Trizol-Methode wurde Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen für quantitative PCR-Reaktionen zusätzlich mit Hilfe des RNeasy-Plant Mini-Kits der Firma Qiagen extrahiert, da mit diesem System ein höherer Reinheitsgrad der isolierten RNA erzielt werden kann. Hierfür wurde tiefgefrorenes Blattmaterial von vier Wochen alten Pflanzen zunächst in flüssigem Stickstoff fein zermahlen, ca. 60 mg des Pulvers mit RLC-Puffer versetzt und anschließend gemäß der vorgegebenen Protokollschritte des Herstellers verfahren. Der Erfolg der RNA-Isolierung wurde durch ein analytisches Agarosegel überprüft.

### **2.2.3.3. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Die Quantifizierung von DNA und RNA wurde durch photometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten hierbei am NanoDrop ND-1000 der Firma NanoDrop Technologies, wobei jeweils ein Probenvolumen von 1,5 µl aufgetragen und die Konzentration gegen Wasser als Leerwert berechnet wurde. Eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen wird dabei über den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt, wobei die Idealwerte für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen sollten. Zusätzlich ergibt der Quotient der Absorptionen bei 230 nm und 260 nm Auskunft über Verunreinigungen durch Phenole oder Polysaccharide, wobei das Verhältnis für einen adäquaten Reinheitsgrad mindestens einen Wert von 2 ergeben sollte.

### **2.2.3.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Auftrennung von Nukleinsäuren und PCR-Amplifikaten für analytische und präparative Zwecke erfolgte in 1% (w/v) Agarose-Gelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Zusatz in Gegenwart von 1x TAE-Puffer. Zu untersuchende Proben wurden 5:1 mit DNA-Ladepuffer bzw. 1:10 mit RNA-Ladepuffer vermischt, zusammen mit 10 µl eines DNA-Größenmarkers (GeneRuler 1 kb, Fermentas) bzw. RNA-Größenmarkers (Puc 100 bp, Fermentas) auf das Gel aufgetragen und bei 120 Volt für 30 min aufgetrennt. Die anschließende Visualisierung separierter Nukleinsäuren erfolgte durch Fluoreszenzemission des interkalierenden Ethidiumbromids unter UV-Licht und wurde mit Hilfe des Geldokumentationssystems Gel-Doc 2000 der Firma BioRad erfasst.

#### **2.2.3.5. Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Für eine weitere Verwendung von PCR-Amplifikaten in Klonierungsansätzen wurden einzelne DNA-Banden nach Sichtbarmachung durch UV-Licht unter Verwendung eines Skalpels mitsamt der Agarose aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg der durchgeführten Aufreinigung wurde durch ein analytisches Agarosegel überprüft.

#### **2.2.3.6. Enzymatischer Verdau von DNA**

Für die Überprüfung von Klonierungsreaktionen wurde ein Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA durchgeführt, wobei die eingesetzten Restriktionsenzyme mindestens einmal innerhalb des Kandidatengens sowie der Vektorsequenz eine Schnittstelle aufweisen sollten. Die Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte ausschließlich mit Restriktions-Endonukleasen der Firmen New England BioLabs oder MBI Fermentas in Kombination mit den dazugehörigen Puffersystemen und wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Standardmäßig wurden in jeder Reaktion etwa 5 Einheiten Enzym eingesetzt um 0,5 µg DNA zu verdauen, wobei das Gesamtvolumen von 10 µl gegebenenfalls mit deionisiertem Wasser aufgefüllt wurde. Die Ansätze wurden anschließend für 3 h bei 37° C inkubiert und das Ergebnis der Restriktionsanalyse überprüft, indem der Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt wurde.

#### **2.2.3.7. Sequenzierung von DNA**

Um zu überprüfen, ob die durchgeführten Klonierungsreaktionen erfolgreich waren bzw. die verwendeten Vektoren das gewünschte Kandidatengen aufwiesen, wurden jeweils 50 ng der gereinigten Plasmidkonstrukte in Kombination mit Standardprimern (M13\_for bzw. M13\_rev) in einem Gesamtvolumen von 15 µl vorgelegt. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt und die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse mit Hilfe des Programms BioEdit der Firma Abbott Laboratories analysiert.

#### **2.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur enzymatischen Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte aus einer längeren, doppelsträngigen DNA-Sequenz *in-vitro* verwendet. Dabei wurden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (in *sense*- und *antisense*-Orientierung) eingesetzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Durch einen sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Nukleotid-Elongation der generierten Einzelstränge in Gegenwart einer Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase der

Firma New England BioLabs wurde eine exponentielle Vervielfältigung der jeweiligen DNA-Fragmente erzielt. Ein standardmäßiger Reaktionsansatz bestand aus folgender Zusammensetzung:

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetztes Volumen</b>
5x Reaktionspuffer	2 µl
2 mM dNTP	1 µl
10 µM Primer_for	0,5 µl
10 µM Primer_rev	0,5 µl
DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA	20 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler PTC-200 der Firma BioRad durchgeführt und analog der aufgelisteten Programm-Parameter realisiert. Der Ergebnis der PCR wurde anschließend durch ein analytisches Agarosegel überprüft.

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
98° C	30 sec	1
98° C	10 sec	35
55° C	20 sec	35
72° C	30 sec	35
72° C	10 min	1

### **2.2.3.9. Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion**

Um positive Klone nach *E.coli*-Transformationen zu identifizieren, die das gewünschte Kandidatengen nach Klonierungsreaktionen enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Für diese PCR-Reaktion wurden Primer eingesetzt, die entlang den homologen Rekombinationsstellen der verwendeten Vektorsysteme hybridisierten und somit das inserierte Kandidatengen flankierten. Dementsprechend erhielt man im Falle des erfolgreichen Einbaus des klonierten Fragments Amplifikate mit der jeweiligen Größe des Kandidatengens, die durch Auftrennung in einem 1% (w/v) Agarosegel nachgewiesen werden konnten. Als PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten in Form eines Mastermixes für mehrere Reaktionen bereitgestellt:

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x Reaktionspuffer	2 µl
2 mM dNTP	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
10 µM attB1_for	1 µl
10 µM attB2_rev	1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Add 20 µl

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde von einer Kolonie Zellmaterial entnommen und jeweils in einen Reaktionsansatz eingetaucht. Während der anschließenden PCR wurde in der Denaturierungsphase die DNA aus den Bakterien freigesetzt und stand zur Amplifikation zur Verfügung. Die Kolonie-PCR wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

Temperatur	Dauer	Zyklen
94° C	2 min	1
94° C	30 sec	39
50° C	30 sec	39
72° C	1 min	39
72° C	5 min	1

#### 2.2.3.10. Reverse-Transkriptase(RT)-Polymerase-Kettenreaktion

Als Ausgangsmaterial für Klonierungsreaktionen sowie zur Transkriptüberprüfung von Insertionslinien erfolgte die Synthese von cDNA ausgehend von isolierter pflanzlicher RNA mit Hilfe des SuperScript II First Strand Synthesis Kits der Firma Invitrogen. Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben, wobei für jede Probe zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Enzymzugabe durchgeführt wurde. Für den allgemeinen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

Komponente	Eingesetztes Volumen
5x Reaktionspuffer	4 µl
20 mM dNTP	1 µl
Oligo (dT)15 (Promega)	0,5 µl
0,1 M DDT	2 µl
RibuLock (Fermentas)	1 µl
RNA	1 µg
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Nach 10-minütiger Inkubation des Ansatzes bei RT und Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase Superscript II, welche zuvor 1:1 mit 1x Reaktionspuffer verdünnt wurde, erfolgte die cDNA-Synthese unter folgenden PCR-Bedingungen:

Temperatur	Dauer
42° C	30 min
50° C	40 min
95° C	5 min

Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde anschließend in einer weiteren PCR mit Hilfe von Tubulin-Primern und 1 µl cDNA analog der Vorgehensweise unter 2.2.3.8 untersucht. Die folgende Auftrennung des gesamten Ansatzes in einem 1% (w/v) Agarosegel sollte im Falle einer erfolgreichen cDNA-Synthese in einer einzigen Bande resultieren, welche in der Negativkontrolle nicht nachgewiesen werden kann.

#### **2.2.3.11. Quantitative Echtzeit(qRT)-Polymerase-Kettenreaktion**

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, wobei dem Reaktionsansatz der Farbstoff SYBR Green zugesetzt wird, der mit Doppelstrang-DNA einen fluoreszierenden Komplex eingeht und Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Diese Fluoreszenz-emission nimmt bei jedem Temperaturzyklus proportional zum entstandenen PCR-Produkt zu, so dass der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Quantifizierung herangezogen werden kann.

Im ersten Schritt wurde RNA aus Blattmaterial von *Arabidopsis*-Pflanzen wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben, isoliert und unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription-Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Dieses System bietet den Vorteil, dass Verunreinigungen der Probe durch genomische DNA, die während der RNA-Extraktion nicht vollständig entfernt werden konnte, zuverlässig eliminiert werden.

Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt und der Erfolg der cDNA-Synthese wie unter Punkt 2.2.3.10 in einem analytischen Agarosegel mit Tubulin-Primern überprüft. Für die PCR-Reaktion wurden genspezifische Primerpaare mit Hilfe der Software Primer Express der Firma Applied Biosystems konstruiert, wobei die Sequenzen so gewählt wurden, dass diese eine Exon-Intron-Grenze überspannen und maximal ein Amplifikat von 120 Basenpaaren erzielen (siehe 2.1.7). Alle Nukleotidsequenzen wurden zusätzlich auf mögliche Homologien mit dem Blast-Server der NCBI-Datenbank untersucht und hinsichtlich ihrer Spezifität mit verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen überprüft. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetztes Volumen</b>
2x SYBR Green Mastermix	10 µl
10 mM Primer_for	0,5 µl
10 mM Primer_rev	0,5 µl
DNA (1:20-Verd.)	4 µl
ddH <sub>2</sub> O	5 µl

Der Ansatz wurde in einer 96-Mikrowellplatte der Firma Thermo Scientific vorgelegt und die PCR-Reaktion inklusive Schmelzkurvenanalyse in einem 7500 Real-Time PCR-Thermocycler der Firma Applied Biosystem analog des aufgelisteten Temperaturprofils durchgeführt.

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
95° C	15 min	1
95° C	15 sec	40
55° C	35 sec	40
72° C	45 sec	40
<b><u>Schmelzkurvenanalyse</u></b>		
95° C	15 sec	1
60° C	1 min	1
95° C	15 sec	1

Nach dem Lauf wurden die ermittelten Fluoreszenz-Schwellenwerte (CT-Werte), d.h. die Zyklen bei denen das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant übersteigt, nach manueller Basislinienkorrektur mit Hilfe des Programms 7500 Fast System der Firma Applied Biosystems in Excel exportiert. Zur anschließenden Berechnung der Amplifikations-Effizienz wurde das Computer-Programm LinRegPCR des Heart Failure Research Center in Amsterdam verwendet, welches den Anstieg des Fluoreszenzsignals in der linearen Phase jeder PCR-Reaktion berechnet. Die quantitative Berechnung des relativen Expressionsniveaus der Zielgene erfolgte in Relation zu mehreren Referenzgenen, deren Stabilität mit Hilfe des Computerprogramms GeNorm der Universität Genk ermittelt wurde. In diesem Fall wurden Ubiquitin und S16 als die beiden stabilsten Referenzgene identifiziert und ihr geometrisches Mittel als Normalisierungsfaktor verwendet.

#### **2.2.3.12. Klonierung von Superoxid-Dismutasen mit dem GATEWAY-System**

Für die Klonierung von Nukleotidsequenzen wurde wie in Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.10 beschrieben, zunächst RNA aus Blattmaterial isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im nächsten Schritt wurden die Nukleotidsequenzen mit Primern amplifiziert, welche an den



Enden eine spezifische Rekombinations-Erkennungssequenz (sog. att-Bereiche) enthielten und die PCR-Produkte nach der Auftrennung aus dem Gel isoliert. Es folgte eine erste Rekombinations-Reaktion (BP-Reaktion), bei der die DNA-Fragmente mit Hilfe des GATEWAY BP Clonase Enzymmix-Kits der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers in den Donorvektor pDONR221 integriert wurden. Ein Reaktionsansatz bestand aus folgender Zusammensetzung:

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetztes Volumen</b>
BP-Puffer	1 µl
Clonase	1 µl
pDONR221	80 ng
DNA	80-100 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 5 µl

Der Ansatz wurde für 14 h bei 25° C in einem Thermocycler inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1 µl Proteinase K gestoppt. Nach Transformation der Vektoren in kompetente *E. coli*-Zellen wurden positive Klone durch Kanamycinresistenz selektiert, die Insertion mittels PCR-Koloniescreening überprüft und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Im Anschluss folgte eine Überprüfung durch Restriktions- und Sequenzanalysen, bevor die gereinigten Plasmide in einer zweiten Rekombinations-Reaktion (LR-Reaktion) unter Verwendung des GATEWAY LR Clonase Enzymmix-Kits nach Angaben des Herstellers in verschiedene Destinationsvektoren (pDEST17 und pDEST42) überführt wurden. Für den Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

<b>Komponente</b>	<b>Eingesetztes Volumen</b>
LR-Puffer	1 µl
Clonase	1 µl
pDEST17 bzw. pDEST42	80 ng
DNA	80-100 ng

Anschließend wurde nach dem gleichen Prinzip vorgegangen wie nach der BP-Reaktion, allerdings beruhte die Selektion positiver Klone auf Ampicillinresistenz.

### **2.2.3.13. Klonierung des Promotor-Reportergenkonstruktes mit dem GATEWAY-System**

Für die Untersuchung der gewebespezifischen Expression des GSNO-Reduktase Gens wurde eine 2.000 bp große, putative Promotorsequenz „upstream“ vom ATG-Startcodon mittels PCR amplifiziert und analog der Vorgehensweise in Kapitel 2.2.3.12 in den Donorvektor

pDONR221 kloniert bzw. positive Klone einer Plasmidpräparation unterzogen. Anschließend wurde das Promotorfragment über homologe Rekombination mit dem Reporter-gen  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) des pB2GW7-Vektors fusioniert, positive Klone selektiert und über *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer stabil in das Genom von Wildtyp-Pflanzen transformiert. Transgene Pflanzen der T1- und T2-Generation wurden auf Erde oder ½MS-Festmedium mit BASTA selektiert und diese Pflanzen dann in verschiedenen Entwicklungsstadien einer GUS-Färbung unterzogen. Alle Klonierungsreaktionen inklusive *Agrobacterium*-Transformation wurden in diesem Zusammenhang in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Lindermayr am Institut für biochemische Pflanzenpathologie durchgeführt.

#### **2.2.3.14. Klonierungsreaktionen für die Komplementation mit dem GATEWAY-System**

Um die *gsnor* Insertionslinie genetisch zu komplementieren, wurde ein 4.000 Basenpaar langes Fragment, bestehend aus endogenem Promotorbereich und GSNO-Reduktase Nukleotidsequenz mittels PCR amplifiziert und analog der Vorgehensweise in Kapitel 2.2.3.12 in den Donorvektor pDONR221 kloniert bzw. positive Klone einer Plasmidpräparation unterzogen. Anschließend wurde das Konstrukt über homologe Rekombination in den Zielvektor pAlligator2 inseriert, aus dem zuvor der konstitutive 35S-Promotor entfernt wurde, und positive Klone auf Spectinomycin-haltigem Medium selektiert. Die Bereitstellung des Vektors erfolgte hierbei durch die Arbeitsgruppe von Dr. Anton Schäffner am Institut für biochemische Pflanzenpathologie. Mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers wurde das Fragment stabil in das Genom von *gsnor* Knock-out Linien integriert. Da der transformierte Vektor pAlligator2 als Selektionsmarker das GFP-Gen unter der Kontrolle des samenspezifischen Promotors trägt, konnten positive Pflanzenlinien der T1-, T2- und T3-Generation anhand ihrer fluoreszierenden Samen nach Bestrahlung mit blauem Licht identifiziert werden. Alle Klonierungsreaktionen inklusive der Insertion des Fragmentes in pDONR221 wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Lindermayr am Institut für biochemische Pflanzenpathologie durchgeführt.

#### **2.2.3.15. Zielgerichtete Mutagenese**

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgte analog dem Protokoll des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene, wobei die synthetisierten Primer mindestens 12 korrekte Basenpaarungen „up- und downstream“ der Mutation aufwiesen. Als Ausgangsprodukt für die Mutations-Reaktion wurde der Donorvektor pDONR221 mit korrekter Mn-SOD-Sequenz verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt im Vergleich zum Standardprotokoll unter 2.2.3.8 folgende Änderungen:

Komponente	Eingesetztes Volumen
5x Reaktionspuffer	4 µl
2 mM dNTP	2 µl
10 µM Primer_for	1 µl
10 µM Primer_rev	1 µl
DNA-Polymerase	0,2 µl
DNA	600 ng

Aufgrund der Verwendung einer iProof-DNA Polymerase der Firma BioRad und der Amplifikation des gesamten Vektors wurden die PCR-Bedingungen wie folgt angepasst:

Temperatur	Dauer	Zyklen
98° C	1 min	1
98° C	25 sec	20
55° C	25 sec	20
72° C	6 min	20
72° C	10 min	1

Im nächsten Schritt wurde ein Teil des Ansatzes zur Qualitätsüberprüfung auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt und das restliche Probenvolumen für 3 h bei 37° C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, um methylierte und somit unmutierte DNA-Stränge zu zerstören. Nach *E. coli*-Transformation wurde anschließend von fünf Klonen die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation hin überprüft.

## 2.2.4. Biochemische Methoden

### 2.2.4.1. Isolierung von Proteinen aus Pflanzenmaterial

Für die Proteomanalyse nach *Pseudomonas*-Infiltration erfolgte die Extraktion von Gesamtprotein aus dem Blattmaterial von sieben Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen, während für die Bestimmung von Enzymaktivitäten Pflanzenmaterial von zwei Wochen alten Keimlingen verwendet wurden, die unter sterilen Bedingungen auf ½MS-Medium mit oder ohne Zugabe von Paraquat heranwuchsen. Um genügend Ausgangsmaterial für Untersuchungen zu erhalten, wurden in diesem Fall mindestens 100 Keimlinge zu einer biologischen Wiederholung vereint.

Die Isolierung der Proteine erfolgte ausgehend von tiefgefrorenem Pflanzenmaterial, das zunächst in flüssigem Stickstoff fein zermahlen wurde. Je nach Versuch wurden im nächsten Schritt 0,1 g bis 1 g des Pulvers mit zwei Volumeneinheiten Extraktionspuffer versetzt, kurz durchmischt und das Homogenat zweimal für 15 min bei 25.000 g und 4° C zentrifugiert.

Im Falle der Proteinauftrennung mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen mit Hilfe von PD-10 Säulen der Firma GE Healthcare nach den Angaben des Herstellers einem Entsalzungsschritt unterzogen. Für Präzipitations-Reaktionen wurden anschließend 50 µg Probenaliquots mit 10-fachem Überschuss an eiskaltem Aceton versetzt und die Proteine über Nacht bei -20° C ausgefällt.

#### 2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte nach der Bradford-Methode und beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm zur Folge hat. Die Proteinkonzentration wurde über eine Eichgerade berechnet, die parallel zu den gemessenen Proben mit Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 0,1 mg/ml bis 1 mg/ml erstellt wurde.

#### 2.2.4.3. 1D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte gemäß dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli, 1970) und wurde in vertikalen Elektrophoresekammern der Firma Hoefer durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst in einem 4% (v/v) Sammelgel aufkonzentriert und danach in einem 12% (v/v) Trenngel separiert. Ein standardmäßig verwendetes Polyacrylamidgel bestand aus folgender Zusammensetzung:

<b>Komponente</b>	<b>8% Stopfgel</b>	<b>12% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
ddH <sub>2</sub> O	575 µl	1,67 ml	781 µl
Trenngel-Puffer	625 µl	1,25 ml	
Sammelgel-Puffer			390 µl
10% (v/v) SDS	25 µl	50 µl	15,6 µl
37,5% (v/v) Acrylamid	1,25 ml	2 ml	313 µl
TEMED	6,25 µl	2,5 µl	6,25 µl
APS	18,75 µl	25 µl	12,5 µl

Die Proben (1 µg bis 5 µg rekombinantes Protein bzw. 5 µl der verschiedenen Aufreinigungsfractionen - siehe Kap. 2.2.4.10 und 2.2.4.11) wurden mit SDS-Probenpuffer vermischt, 15 min bei 95° C denaturiert und anschließend in 1x Laufpuffer für 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA aufgetrennt. Als Größenmarker zum Vergleich der Molekulargewichte wurden jeweils 10 µl der Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas) oder

Precision Plus Protein Standard (BioRad) eingesetzt. Zur Anfärbung der einzelnen Proteinbanden wurde das Gel über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert und danach mindestens 2 h in Entfärbelösung eingebettet bis nur noch ein minimales Hintergrundsignal vorhanden war.

#### **2.2.4.4. Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese**

Um die Proben vor der Auftrennung mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese von Verunreinigungen wie Lipiden oder Nukleinsäuren zu befreien, wurden jeweils 50 µg Protein unter Verwendung des 2D-Clean-Up Kits der Firma GE Healthcare nach Herstellerangaben ausgefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 25.000 g bzw. 4° C wurde das Sediment zunächst kurz bei RT getrocknet, in 25 µl Labelling-Puffer resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde von allen zu untersuchenden Proben ein Gesamtpool als interner Standard erstellt und wie oben beschrieben in Form von 50 µg-Aliquots präzipitiert. Anschließend wurden die Proteinproben unter Verwendung des Minimal-Labelling-Kits der Firma GE Healthcare mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5) markiert, wobei interne Standardproben mit dem Cy2-Farbstoff bzw. zu analysierende Proben wahlweise mit Cy3- oder Cy5-Farbstoffen versetzt wurden. Die lyophilisierten Farbstoffe wurden hierfür nach Herstellerangaben in DMF auf eine Konzentration von 400 pmol/µl verdünnt und pro µg Proteinlysate 8 pmol Farbstoff eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 10 mM Lysin und erneuter Aufbewahrung der Proben für 15 min auf Eis gestoppt. Für analytische 2D-Gele wurden anschließend jeweils zwei Proteinproben mit einer internen Standardprobe im Verhältnis 1:1:1 vereint und durch Zugabe von Lysis-Puffer auf ein Endvolumen von 150 µl eingestellt.

#### **2.2.4.5. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen**

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) wurden nicht lineare Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten verwendet, welche einen pH-Bereich von 3 bis 11 und eine Länge von 24 cm besaßen. Die IPG-Streifen wurden über Nacht bei RT in 340 µl Rehydrierungspuffer rehydriert, die Proben in Beladungstaschen appliziert und der Kontakt zwischen Gelstreifen und Elektroden mit feuchtem Filterpapier realisiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Ettan IPGphor3-Apparatur der Firma GE Healthcare nach Hersteller-Protokoll und wurde mit Hilfe der Ettan IPGphor3 Control Software dokumentiert, wobei ein mehrstufiges Programm mit steigender Spannung durchlaufen wurde:

<b>Ablauf</b>	<b>Spannung</b>	<b>Dauer</b>	<b>Voltstunden</b>
Stufe	150 V	3 h	450 Vh
Stufe	300 V	3 h	900 Vh
Gradient	1.000 V	6 h	3.900 Vh
Gradient	10.000 V	3 h	16.500 Vh
Stufe	10.000 V	3 h	30.000 Vh

#### **2.2.4.6. 2D-gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

Bevor die Proteine in der 2. Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden konnten, wurden die Gelstreifen in einem zweistufigen Prozess zunächst für 15 min in Äquilibrierungspuffer mit 1% (w/v) DTT reduziert und anschließend für 15 min in Äquilibrierungspuffer mit 2,5% (w/v) Iodoacetamid alkyliert. Für die vertikale SDS-PAGE wurden Gele mit einer Größe von 25 cm x 21 cm hergestellt, die eine Acrylamid-Konzentration von 12,5% enthielten und über Nacht bei RT auspolymerisierten. Die Gelstreifen wurden auf den SDS-Gelen platziert und vor der Fixierung mit 0,5% (w/v) Agaroselösung 15 µl Proteinstandard auf ein kleines Filterpapier seitlich der Streifen aufgetragen. Der Lauf erfolgte in einer Ettan DALTsix Elektrophorese-Apparatur der Firma GE Healthcare nach Angaben des Herstellers bei 12° C mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel über einen Zeitraum von 16 h bis 18 h.

#### **2.2.4.7. Silber-Färbung von Proteinen auf 2D-Gelen**

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine auf 2D-Gelen bzw. für das manuelle Ausstanzen einzelner Proteine aus präparativen Gelen mit 300 µg Proteinprobe wurde eine Silberfärbung nach Shevchenko (Shevchenko et al., 1996) durchgeführt. Hierfür wurden die Gele mindestens 1 h in Fixierlösung eingebettet, dann drei Mal für 20 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen und für 90 sec in 0,8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 1 min wurden die Gele für 25 min mit Silber-Färbelösung imprägniert und danach erneut mehrmals mit Wasser gespült. Durch Zugabe von Entwicklungslösung wurden die Silberionen von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, was in einer grau-schwarzen Anfärbung der Proteine resultierte. Die Dauer der Entwicklung wurde dabei nach visuellem Eindruck bis zur gewünschten Intensität der Proteinspots durchgeführt und dann durch Überführung der Gele in Fixierlösung gestoppt.

#### **2.2.4.8. Transfer von Proteinen mittels Western Blot**

Für den selektiven Nachweis bestimmter Proteine mittels Antikörper-gekoppelter Detektion wurden die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE unter Verwendung einer Milliblot-

Graphit-Apparatur der Firma Millipore auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Whatman) übertragen. Hierfür wurden sechs Whatman-Filterpapiere und die Membran auf Gelgröße zugeschnitten, kurz in Transferpuffer getaucht und auf der Graphitoberfläche platziert. Anschließend wurde das Gel aufgelegt und mit drei weiteren, feuchten Whatman-Filterpapieren überschichtet. Der Protein-Transfer auf die Membranoberfläche erfolgte bei einer Stromstärke von 110 mA für eine Dauer von 1 h. Zur Kontrolle der Transfereffizienz bzw. der gleichmäßigen Probenbeladung wurde die Membran im Anschluß für 2 min in Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und solange mit Wasser gespült, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

#### **2.2.4.9. Immunodetektion von Proteinen**

Um die transferierten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Elektro-Blotting zunächst für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer abgesättigt, um alle unbesetzten Bindungsstellen zu maskieren. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4° C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert, mehrmals mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und schließlich für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper versetzt. Die anschließende Detektion erfolgte nach zwei 10-minütigen Waschschritten der Membran mit TBS-T-Puffer bzw. einmaliger Inkubation in TBS-Puffer und richtete sich dabei nach dem Enzym-gekoppelten System des sekundären Antikörpers.

Der Nachweis mit Hilfe des alkalischen Phosphatase(AP)-Konjugats erfolgte über eine katalysierte Farbreaktion, bei der das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem violetten Farbstoff umgesetzt wird. Hierfür wurde die Membran für 5 min bis 10 min in AP-Entwicklungspuffer inkubiert und die Farbentwicklung durch Waschen mit Wasser gestoppt. Der Nachweis mittels Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat hingegen erfolgte über Chemilumineszenz mit Hilfe des West Pico Chemilumineszenz-Kits der Firma Thermo Scientific, bei der das Substrat Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu einem Dicarboxylat-Dianion oxidiert wird. Hierfür wurde die Membran zunächst für 5 min mit 1,5 ml Meerrettichperoxidase-Entwicklungslösung versetzt und die entstehende Lichtemission durch Exposition mit Hilfe eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL) der Firma Amersham Biosciences sichtbar gemacht. Die Reaktion erfolgte dabei in einer Filmkassette für eine Dauer von 1 min bis 3 min und wurde dann durch aufeinander folgende Inkubation in Fixierungslösung (G354, AGFA Healthcare) bzw. Entwicklungslösung (G153, AGFA Healthcare) gestoppt.

#### **2.2.4.10. Heterologe Testexpression und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen**

Für die Testexpression wurden die verschiedenen Destinationsvektoren aus Kap. 2.2.3.12 mittels Hitzeschock-Transformation in die *E.coli*-Stämme BL21 sowie in zwei Varianten des Rosetta-Stamms (R und RS) transformiert und positive Klone in 4 ml LB-Medium bei 37° C über Nacht kultiviert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2.500 g und 4° C wurden die Zellsedimente in 1 ml LB-Medium resuspendiert, jeweils 4 ml Autoinduktionsmedium mit 100 µl der einzelnen Vorkulturen angeimpft und in einem zweistufigen Prozess zuerst bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 1 und 2 bei 37° C angezogen bzw. anschließend über Nacht bei 20° C unter konstantem Schütteln inkubiert. Das Autoinduktionsmedium erlaubt in diesem Zusammenhang das Erreichen einer hohen bakteriellen Zelldichte ebenso wie einen flexiblen Induktionszeitpunkt. Die im Medium enthaltene Glukose verhindert eine vorzeitige Induktion durch Katabolit-Repression, so dass ein Wachstum bis in die logarithmische Phase erfolgen kann. Sobald die Glukose vollständig verstoffwechselt ist, wird die Genexpression durch Laktose induziert, was eine hohe Produktionsrate des Zielproteins garantiert. Die mittels Zentrifugation (2.500 g, 4° C, 15 min) gewonnenen Bakterienpellets wurden anschließend in 1 ml Lysis-PufferB resuspendiert und durch wiederholtes Einfrieren bei -80° C bzw. Auftauen bei 30° C im Wasserbad aufgeschlossen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 23.500 g und 4° C erfolgte im nächsten Schritt die Aufreinigung der rekombinanten Proteine im Überstand mit Hilfe einer Metallaffinitäts-Chromatographie.

Diese Methode basiert auf der Interaktion des Histidin-Hexapeptids der rekombinanten Proteine mit Nickel-Ionen, die innerhalb einer Agarosematrix an Chelatliganden gebunden sind. Diese Verbindungen werden nach dem Auswaschen nicht gebundener Proteine durch Zugabe von Imidazol wieder gelöst, wodurch die rekombinanten Proteine eluiert werden. Für den Reinigungsprozess wurden 50 µl Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen in Microspin-Säulen der Firma BioRad vorgelegt, mit 1 ml Wasser gewaschen und mit 1 ml PufferA äquilibriert. Nach Applikation des Proteinüberstandes folgten schließlich zwei Waschschrte mit 1 ml Puffer A und 1 ml Waschpuffer 1, bevor die rekombinanten Proteine mit 250 µl Elutionspuffer ausgespült wurden. Standardgemäß wurden anschließend 5 µl Probenaliquots der verschiedenen Reinigungsschritte (Lysat, Überstand und Eluat) für jedes produzierte Protein mittels Auftrennung über SDS-PAGE auf die Anwesenheit der Zielproteine analysiert.

#### **2.2.4.11. Heterologe Überexpression und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen**

Für die Überexpression wurden die Bakterienstämme ausgewählt, welche für jedes zu produzierende Protein das beste Expressionsergebnis lieferten und zunächst jeweils Vorkulturen in 50 ml LB-Medium bei 37° C über Nacht hergestellt. Nach 25-minütiger



Zentrifugation bei 4° C wurde das Bakterienpellet in 40 ml LB-Medium gelöst, jeweils 2 l Autoinduktionsmedium angeimpft und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2 bei 37° C angezogen bzw. anschließend über Nacht bei 20° C kultiviert. Nach 16 h bis 18 h wurden die Expressionskulturen durch Zentrifugation bei 3.500 g bzw. 4° C für 30 min pelletiert, jeweils in 160 ml Lysis-Puffer B resuspendiert und aufgrund der großen Volumina unter Verwendung des Hochdruckhomogenisators M110L der Firma Microfluidics sowie des Ultraschallhomogenisators HD2200 der Firma Bandelin nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Das erhaltene Zellysate wurde anschließend für 1 h bei 25.000 g und 4° C zentrifugiert. Für die Aufreinigung wurde abhängig von der Expressionsstärke im Vorversuch zwischen 0,5 ml und 1 ml Ni-NTA-Agarose in Econo-Pac-Säulen der Firma BioRad vorgelegt und je einmal mit 15 ml Wasser gewaschen bzw. mit 15 ml Puffer A äquilibriert. Im nächsten Schritt wurde der gesamte Überstand zweimal hintereinander auf die Säule appliziert und danach mehrmals mit Puffer A gespült, um unspezifische Proteinanbindungen zu entfernen. Nach zwei weiteren Inkubationsschritten mit 15 ml Waschpuffer 1 und 2 folgten je drei Elutionsstufen mit 5 ml Elutionspuffer bei 1 ml Matrixeinsatz bzw. 3 ml Puffer bei 0,5 ml Matrixeinsatz.

#### **2.2.4.12. Behandlung rekombinant hergestellter SODs mit NO-Donoren**

Für *in-vitro* Studien wurden zunächst bestimmte Komponenten wie Imidazol oder Thioglycerin, die während des Reinigungsprozesses der rekombinanten Proteine verwendet wurden, mit Hilfe der Gelfiltration entfernt, um eventuelle Störeffekte auszuschließen. Hierfür erfolgte eine Umpufferung der gereinigten Eluate der verschiedenen SOD-Isoformen unter Verwendung von Zeba Spin Entsalzungssäulen der Firma Pierce Biotechnology gemäß der Herstelleranweisung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0).

Für die Untersuchung, ob Superoxid-Dismutasen durch S-Nitrosylierung in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden, wurden die Isoformen in verschiedenen Konzentrationsstufen (0,25 mM und 0,5 mM) mit dem NO-Donor GSNO (Enzo Life Sciences, Lörrach, D.) versetzt und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Parallel hierzu wurden die Proteine zudem in Gegenwart von 5 mM DTT mit GSNO behandelt, was eine effektive Nitrosylierung unterbindet und als Negativkontrolle zusätzlich mit lichtinaktiviertem GSNO versetzt.

Für die Untersuchung, ob Superoxid-Dismutasen durch Nitrierung in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden, wurden die Isoformen in verschiedenen Konzentrationsstufen (0,1 mM bis 1 mM) mit dem NO-Donor Peroxynitrit (Calbiochem, Darmstadt, D.) inkubiert. Aufgrund der hohen Instabilität dieses Moleküls war es erforderlich, vor jeder Behandlung die Zerfallsrate der eingefrorenen Stammlösungen nach Herstellerangaben im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 302 nm zu bestimmen. Im Gegensatz zur oben

erwähnten DTT-Behandlung wurde in diesem Fall der Nitrierungs-Hemmstoff Urat sowie lichtinaktiviertes Peroxynitrit als Negativkontrolle verwendet. Um die verschiedenen NO-Donoren bzw. deren Hemmstoffe für den anschließenden Aktivitätstest wieder aus dem Reaktionsansatz zu beseitigen, erfolgte ein weiterer Entsalzungsschritt mit umgepufferten Zeba Spin-Säulen.

#### **2.2.4.13. Bestimmung der Enzymaktivität von Superoxid-Dismutase**

Für eine qualitative Bestimmung der SOD-Aktivität wurde die Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid zu blauem Formazan in Gegenwart von Superoxidradikalen detektiert, die mit Hilfe des Xanthin-Xanthinoxidase-Systems generiert wurden. Aktive Superoxid-Dismutasen inhibieren die Formazan-Bildung und damit die Blaufärbung des Reaktionsansatzes durch Abbau der Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid, was bei einer Wellenlänge von 570 nm verfolgt werden kann. Ein Vorteil dieses Tests besteht darin, dass die Messung nicht durch verschiedene chemische Hemmstoffe beeinträchtigt wird, die eine Unterscheidung der einzelnen SOD-Isoformen ermöglichen.

Die Messungen erfolgten in einem Testvolumen von 1 ml, wobei zunächst jeweils 10 µg der gereinigten Eluatfraktion mit 545 µl SOD-Reaktionspuffer 1 sowie 395 µl Wasser vermischt und die Reaktion dann durch Zugabe von 50 µl 3,5 µM Xanthin-Oxidase gestartet wurde. Die anschließende Detektion der Extinktionsabnahme erfolgte alle 10 sec über einen Zeitraum von 5 min und wurde mit Hilfe des Spektrophotometers Ultrospec 3100 Pro der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Parallel hierzu wurden ebenfalls Aliquots aller Proteineluate für 15 min bei 95° C denaturiert, um einen internen Kontrollwert für die ungehemmte NBT-Reduktion zu generieren. Für die Identifizierung einzelner SOD-Isoformen wurden Aliquots aller eisenhaltigen SODs mit 0,5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, CZSOD-Eluate mit 3 mM NaCN-Lösung bzw. die manganhaltige SOD mit beiden Hemmstoffen versetzt und die Ansätze vor der Messung für 1 h bei RT inkubiert. Als Maß für die qualitative Enzymaktivität wurde in diesem Fall die Bildung von Formazan relativ zum internen Kontrollwert in Prozentangaben wiedergegeben.

Für eine quantitative Bestimmung der SOD-Aktivität und die Untersuchung der NO-abhängigen Hemmung von rekombinant produzierten Superoxid-Dismutasen wurde die Reduktion von Cytochrom C (Fe<sup>3+</sup>) zu Cytochrom C (Fe<sup>2+</sup>) in Gegenwart von Superoxidradikalen detektiert. Die Rotfärbung des Reaktionsansatzes bzw. die Extinktionszunahme kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt werden und wird durch Superoxid-Dismutasen inhibiert. Zur Untersuchung der SOD-Gesamtaktivität wurde 0,5 g Blattmaterial von vier Wochen alten Pflanzen bzw. 0,1 g Material von zwei Wochen alten

Keimlingen mit dem doppelten Volumen an Extraktionspuffer aufgeschlossen und die Probenextrakte in einem Messvolumen von 3 ml mit SOD-Reaktionspuffer 2 vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Xanthin-Oxidase gestartet und die Absorptionszunahme alle 10 sec über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Als Negativkontrolle wurde zudem zeitgleich ein Reaktionsansatz ohne Probenextrakt analysiert. Die SOD-Aktivität wurde in Unit angegeben und auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen. Ein Unit ist in diesem Zusammenhang definiert als die Enzymmenge, welche benötigt wird, um die Cytochrom C-Reduktion um 50% zu inhibieren.

#### **2.2.4.14. Bestimmung der Enzymaktivität von GSNO-Reduktase**

Für die Untersuchung der GSNO-Reduktase-Aktivität wurde 0,5 g Blattmaterial von vier Wochen alten Pflanzen wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, mit 1 ml Extraktionspuffer aufgeschlossen und der Überstand für den Messansatz verwendet. In diesem Fall wurde der Abbau von GSNO indirekt über die Oxidation von Kosubstrat NADH zu NAD<sup>+</sup> photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten in einem Testvolumen von 1 ml, wobei zwischen 130 µg und 160 µg Protein des Probenextraktes mit 875 µl GSNO-Reduktase-Reaktionspuffer vermischt und die Reaktion dann durch Zugabe von 100 µl 4 mM GSNO gestartet wurde. Die Detektion der Extinktionsabnahme erfolgte alle 20 sec über einen Zeitraum von 10 min. Die GSNO-Reduktase-Aktivität wurde in Katal angegeben und auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen. Ein Katal ist in diesem Zusammenhang definiert als die Enzymmenge, die ein Mol Substrat pro Sekunde umsetzt.

#### **2.2.4.15. Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion-Reduktase**

Bei dieser Messmethode wurde die durch Glutathion-Reduktase katalysierte Reduktion von Glutathiondisulfid zu Glutathion ebenfalls indirekt über den Verbrauch von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm im Spektrophotometer erfasst. Hierfür wurde 0,1 g gemörstertes Material von zwei Wochen alten Keimlingen mit dem doppelten Volumen an Extraktionspuffer aufgeschlossen und zwischen 40 µg und 50 µg Protein des Probenextraktes in einem Reaktionsvolumen von 1 ml mit Glutathion-Reduktase-Reaktionspuffer vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 5 mM Glutathiondisulfid gestartet und die Absorptionsabnahme alle 10 sec über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte analog zu der in Kapitel 2.2.4.14. beschriebenen Vorgehensweise.

#### **2.2.4.16. Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion-Peroxidase**

Das verwendete Testprinzip basiert auf einem gekoppelten Enzymsystem, bei dem Glutathion-Peroxidase die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser in Gegenwart von Glutathion katalysiert. Das dabei entstehende Glutathiondisulfid wird in einem zweiten Reaktionsschritt mit Hilfe der Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch wieder in Glutathion überführt, was photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden kann. Für den Messansatz wurde 0,1 g gemörsertes Material von zwei Wochen alten Keimlingen mit 0,2 ml Extraktionspuffer aufgeschlossen und zwischen 20 µg und 30 µg Protein des Probenextraktes in einem Reaktionsvolumen von 1 ml mit Glutathion-Peroxidase-Reaktionspuffer vermischt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl 0,1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gestartet und die Extinktionsabnahme alle 10 sec über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte analog zu der in Kapitel 2.2.4.14. beschriebenen Vorgehensweise.

#### **2.2.4.17. Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathion S-Transferase**

Glutathion S-Transferasen katalysieren die Reaktion zwischen elektrophilen, hydrophoben Substanzen und reduziertem Glutathion. In diesem Versuchsansatz wurde das artifizielle Substrat 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) eingesetzt und das resultierende Glutathion-CDNB-Konjugat direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen. Für die Messung wurde 0,1 g gemörsertes Material von zwei Wochen alten Keimlingen mit 0,2 ml Extraktionspuffer aufgeschlossen und zwischen 50 µg und 60 µg Protein des Probenextraktes in einem Reaktionsvolumen von 1 ml mit Glutathion S-Transferase-Reaktionspuffer vermischt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 10 mM Glutathion gestartet und die Absorptionzunahme alle 10 sec über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte analog zu der in Kapitel 2.2.4.14. beschriebenen Vorgehensweise.

#### **2.2.4.18. Bestimmung des Glutathion-Gehaltes**

Die quantitative Bestimmung von reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) in zwei Wochen alten Keimlingen erfolgte mit Hilfe einer durch Glutathion-Reduktase enzymatisch katalysierten Recycling-Methode. Bei diesem Testprinzip wird 5,5-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) in Gegenwart von Glutathion zu 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB) oxidiert, dessen Akkumulation durch einen gelblichen Farbumschlag photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm verfolgt werden kann. Das ebenfalls entstehende Glutathiondisulfid wird in einem zweiten Reaktionsschritt durch Glutathion-Reduktase in Anwesenheit

des Kofaktors NADPH wieder in Glutathion umgewandelt, welches erneut mit DTNB reagieren kann. Für die Messungen wurden jeweils 0,1 g pulverisiertes Pflanzenmaterial in 1 ml 0,2 M HCl extrahiert und die Proben für 10 min bei 25.000 g bzw. 4° C zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5 ml des Überstandes mit 50 µl 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,6) versetzt und mit 0,2 M NaOH auf einen pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 eingestellt. Zur Bestimmung des Gesamtglutathion-Gehaltes wurden im nächsten Schritt jeweils 120 µl Glutathion-Pufferlösung mit 50 µl Wasser in Vertiefungen einer 96-Mikrowellplatte der Firma Greiner-Bio-One vorgelegt, mit 20 µl neutralisiertem Extrakt vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 0,2 Unit Glutathion-Reduktase gestartet. Die anschließende Detektion der Absorptionzunahme bei 412 nm erfolgte alle 25 sec über einen Zeitraum von 5 min und wurde mit Hilfe des Spektrophotometers GENios der Firma Tecan durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung wurde schließlich durch Vergleich mit einer Eichgeraden aus bekannten GSH-Standards ermittelt. Für die Quantifizierung des GSSG-Gehaltes wurden vor der Messung 200 µl des neutralisierten Extraktes mit 1 µl 2-Vinylpyridin für 30 min bei RT inkubiert, um reduziertes Glutathion durch Derivatisierung aus dem Ansatz zu entfernen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 25.000 g wurden 40 µl der vorbehandelten Proben mit 120 µl Glutathion-Pufferlösung und 30 µl Wasser vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 0,2 Unit Glutathion-Reduktase nach den gleichen Parametern wie oben gestartet. Parallel hierzu wurde ebenfalls eine Kalibrierungskurve mit verschiedenen GSSG-Konzentrationen erstellt. Die finale Konzentration an reduziertem Glutathion wurde rechnerisch ermittelt, indem von dem gemessenen Gesamt-Glutathiongehalt die doppelte Menge an Glutathiondisulfid subtrahiert wurde.

#### **2.2.4.19. Bestimmung thiolhaltiger Komponenten des Glutathion-Stoffwechsels**

Um den Einfluss von NO-Begasung auf die Glutathion-Biosynthese zu untersuchen, wurden thiolhaltige Ausgangs-, Zwischen- und Abbauprodukte des Glutathion-Stoffwechsels in vier Wochen alten Pflanzen analysiert. Hierfür wurden die Pflanzen in einem Glasexsikkator platziert, gasförmiges NO bis zu einer Konzentration von 80 ppm eingeleitet und die Pflanzen anschließend 20 min lang inkubiert. Nach 1 h Regenerationszeit wurde das behandelte Blattmaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für die anschließenden Analysen eingesetzt. Die NO-Begasungsexperimente erfolgten am Institut für biochemische Pflanzenpathologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Lindermayr, während die quantitative Bestimmung einzelner Komponenten des Glutathion-Stoffwechsels von Dr. Markus Wirtz an der Universität Heidelberg durchgeführt wurde.

#### **2.2.4.20. Gasphasen-Chemilumineszenz zur Bestimmung von NO-Metaboliten**

Die quantitative Bestimmung der Oxidationsprodukte von NO (Nitrit, Nitrat) und Nitrosothiolen in Blatt-, Spross- und Blütenextrakten wurde mit einem NO-Analysator der Firma Analytix durchgeführt und erfolgte mittels Ozon-abhängiger Gasphasen-Chemilumineszenz. Für die Messungen wurden jeweils 0,5 g pulverisiertes Pflanzenmaterial in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen, zweimal zentrifugiert und ein Probenvolumen von 100 µl für die Nitrit- und Nitratbestimmung bzw. 200 µl für die Nitrosothiol-Bestimmung mit einer Glasspritze durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionskammer injiziert. Zur Detektion des Nitrit- und Nitrosothiolgehaltes wurde diese Kammer auf 40° C erwärmt und mit einer iodhaltigen Reduktionslösung versetzt, welches NO aus der zu analysierenden Probe freisetzt. Die Reaktionslösung wird zusätzlich von einem inerten Trägergas durchströmt, das den Transport des gebildeten NO über ein 4° C kaltes Kühlaggregat zum NO-Analysator gewährleistet. Die bei der Chemilumineszenz-Reaktion generierte Lichtemission wurde von einem Photoverstärker erfasst und in elektrische Ladungsimpulse umgewandelt. Da sich das Signal in diesem Fall aus der Summe von Nitrit und Nitrosothiolen zusammensetzte, musste eine spezielle Probenaufarbeitung durchgeführt werden, um zwischen beiden Metaboliten zu differenzieren. Für die Nitrosothiol-Bestimmung wurden die Proben nach der Extraktion daher im Verhältnis 9:1 mit einer 5% (w/v) Sulfanilamidlösung in 1 M HCl vorbehandelt, wodurch Nitrit zu einem stabilen Diazoniumsalz umgewandelt wird. Die anschließende Datenauswertung erfolgte durch Integration der Peakfläche des Kurvensignals und wurde mit Hilfe des Programms NO Analysis Software 3.2 durchgeführt. Die Quantifizierung der Metabolit-Konzentrationen wurde durch Vergleich mit Kalibrierungskurven bekannter Nitritstandards ermittelt.

Die Bestimmung des Nitratgehaltes erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise mit geringfügigen Veränderungen. Die Probenlösungen wurden vor der Applikation 1:10.000 (Blattextrakte) bzw. 1:1.000 (Spross- und Blütenextrakte) mit bidestilliertem Wasser verdünnt und enthaltenes Nitrat mit Hilfe einer 90° C heißen, vanadiumhaltigen Reaktionslösung reduziert. Das freigesetzte NO wurde zusätzlich durch eine 1 M NaOH-Lösung geleitet, um höhere Stickoxide abzufangen und die anschließende Quantifizierung über eine Eichgerade mit verschiedenen Nitratstandard-Konzentrationen ermittelt.

## **2.2.5. Datenverarbeitung und computergestützte Auswertung**

### **2.2.5.1. Digitalisierung und quantitative Auswertung von 2D-Gelen**

Um die fluoreszenzgefärbten und aufgetrennten Proteine verschiedener Proben quantitativ auswerten zu können, wurden die entsprechenden 2D-Gele mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (Typhoon 9400, GE Healthcare) digitalisiert. Die drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden hierfür bei unterschiedlichen Wellenlängen zur Fluoreszenz angeregt und jeweils ein separates Bild erstellt. Eine Überlagerung dieser drei Spotmuster eines Gels wurde anschließend in Form einer digitalen Aufnahme mit Hilfe der ImageQuant-Software der Firma GE Healthcare dargestellt. Alle Gele wurden mit einer Auflösung von 100  $\mu\text{M}$  pro Pixel eingescannt und darauf geachtet, dass keine gesättigten Spots detektiert wurden. Die Einstellungen der Scanparameter erfolgten über das Programm Typhoon Scanner Control der Firma GE Healthcare.

Die quantitative Analyse der Gelbilder wurde unter Verwendung des Programms DeCyder 6.5 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die einzelnen Gelbilder prozessiert, d.h. eine bestimmte Anzahl an Proteinspots für die Verarbeitung festgelegt (in der Regel 2.500) und deren Eigenschaften hinsichtlich Spotfläche, -höhe und -steigung erfasst. Im zweiten Schritt wurden die detektierten Spotmuster auf verschiedenen Gelen miteinander verglichen. Die Spotausrichtung bzw. -überlagerung war allerdings teilweise fehlerbehaftet und erforderte ein manuelles Nacheditieren, bei dem Referenzproteine auf verschiedenen Gelen einander zugeordnet werden mussten. Die statistische Analyse erfolgte auf Grundlage des verwendeten internen Standards, da er sämtliche Spotinformationen aus dem Gesamtexperiment enthielt und daher auf allen Gelen zur Spotquantifizierung durch Normalisierung zwischen den einzelnen Gelen verwendet werden konnte.

### **2.2.5.2. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen**

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Abteilung Core Facility Proteomics unter der Leitung von Dr. Hakan Sarioglu am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Für die Identifizierung von Proteinkandidaten der 2D-Gelelektrophorese wurden silbergefärbte Proteinspots einem tryptischen Verdau unterzogen und die Peptidfragmente unter Verwendung eines MALDI-TOF/TOF-Gerätes (ABI 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) sowie mit Hilfe eines LTQ-Orbitrap-Massenspektrometers der Firma Thermo Fisher in Kombination mit einem HPLC-System (Ultimate 3000, Dionex) analysiert. Dabei wurde eine Massenabweichung von 65 ppm für MALDI-Daten bzw. 10 ppm für Orbitrap-Daten toleriert und eine Oxidation von

Cysteinresten bzw. Desaminierung von Arginin- und Glutaminresten als variable Modifikation sowie die Bildung von Iodoacetamid-Derivaten von Cysteinresten als stabile Modifikation betrachtet. Die statistische Auswertung von MALDI-Ergebnissen erfolgte mit Hilfe des Programms GPS Explorer 3.6 der Firma Applied Biosystems, während Orbitrap-Daten mit dem Programm Scaffold 3.0 der Firma Proteome Software analysiert wurden.

Der Nachweis nitrierter Aminosäuren nach Peroxynitrit-Behandlung von rekombinant hergestellter MnSOD (siehe Kapitel 2.2.4.12) erfolgte aufgrund der höheren Sensitivität ausschließlich mit dem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer. Bei den Auswahlkriterien für den verwendeten Suchalgorithmus wurde allerdings nur eine Nitrierung von Tyrosin- und Tryptophanresten als variable Modifikation angegeben.



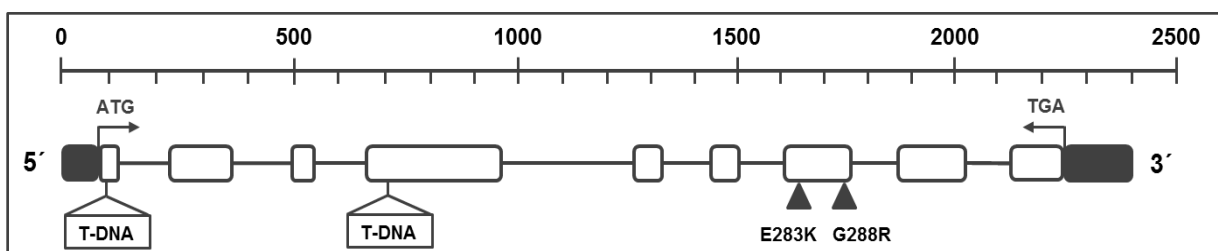
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Molekulare Charakterisierung der *gsnor* Knock-out Linie

##### 3.1.1. Die Struktur des GSNO-Reduktase Gens

Das GSNO-Reduktase Gen (At5g43940) mit einer Gesamtlänge von 2.379 Basenpaaren ist in einer einzigen Kopie auf Chromosom 5 des *Arabidopsis thaliana* Genoms lokalisiert und enthält neun codierende Regionen (Exons) bzw. acht nicht-codierende Bereiche (Introns). Die in dieser Arbeit verwendeten homozygoten *gsnor* Knock-out Linien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund wurden über das französische Nationalinstitut für Agrarforschung (INRA) bzw. das Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (GABI-Kat) bezogen. Bei Pflanzen des Ökotyps Wassilewskija ist das GSNO-Reduktase Gen durch eine T-DNA Insertion im vierten Exon unterbrochen, wobei der für die Transformation verwendete Vektor pGKB5 zusätzlich eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin sowie dem Herbizid Glufosinat (BASTA) vermittelt. Bei Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 ist das Sulfadiazinresistenz vermittelnde T-DNA Element des Vektors pAC161 hingegen innerhalb des ersten Exons lokalisiert und liegt damit vor dem katalytischen Bereich des Enzyms. Darüber hinaus existieren zwei weitere Linien mit Columbia-Hintergrund, die jeweils im siebten Exon eine Punktmutation aufweisen, was in beiden Fällen zu einem Austausch hochkonservierter Aminosäuren führt.

Eine Übersicht der Exon/Intron-Struktur sowie die Lokalisation verschiedener T-DNA Insertionen bzw. Punktmutationen innerhalb der GSNO-Reduktase Sequenz, die zu einem Funktionsverlust des Genprodukts führen, ist in Abb. 5 dargestellt.



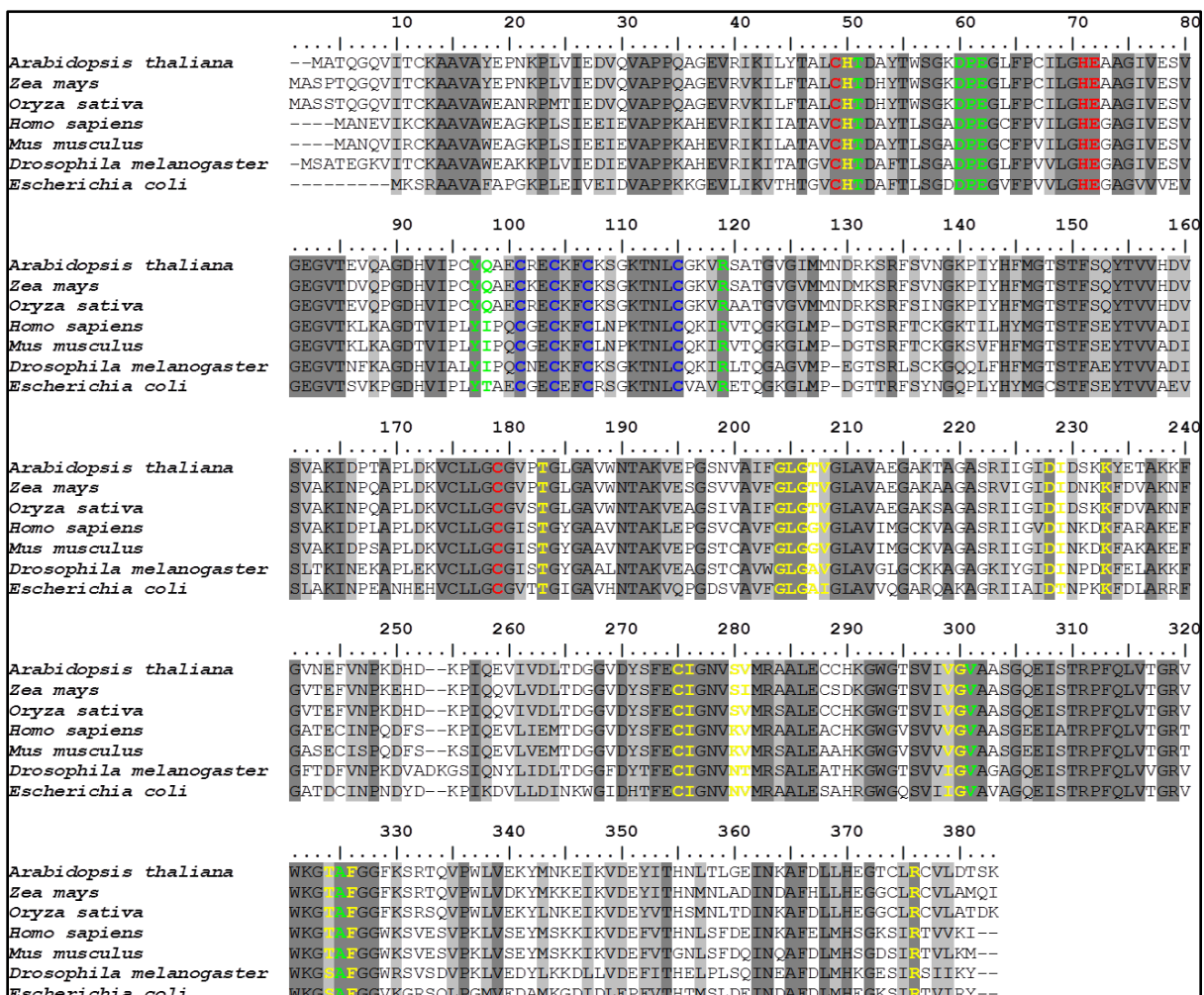
**Abb. 5: Struktureller Aufbau des GSNO-Reduktase Gens**

Die Skala gibt die Länge des GSNO-Reduktase Gens in Basenpaaren an, während schwarze Pfeile die Position des Start- bzw. des Stoppcodons kennzeichnen. Schwarze Balken repräsentieren untranslatierte Regionen (UTR), weiße Balken Exon-Bereiche und einfache Linien Intron-Sequenzen. Darüber hinaus sind die einzelnen Positionen der T-DNA Insertionen und Punktmutationen verschiedener *gsnor*-Mutantenlinien innerhalb der Gensequenz dargestellt.

### 3.1.2. Eigenschaften und Sequenzvergleich des GSNO-Reduktase Proteins

Das GSNO-Reduktase Protein setzt sich aus 391 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von 42 kDa, wobei der isoelektrische Punkt bei einem pH-Wert von 6,9 erreicht wird. Das Protein liegt im nativen Zustand als Homodimer vor und enthält neben einer Koenzym (NADH)-Domäne und der Substrat (GSNO)-Bindetasche zusätzlich zwei Bindungsstellen für Zinkatome, welche einerseits für die katalytische Aktivität sowie andererseits für die strukturelle Stabilität benötigt werden.

Ein Vergleich der Aminosäureabfolge des GSNO-Reduktase Proteins aus *Arabidopsis thaliana* mit homologen Sequenzen aus verschiedenen Organismen wie Bakterien, Pflanzen und Säugetieren ergab Übereinstimmungswerte im Bereich von 60% bis 90%. Die höchsten Sequenzidentitäten wurden dabei erwartungsgemäß bei näher verwandten höheren Nutzpflanzenarten wie Mais und Reis gefunden (ca. 90%), während die Ähnlichkeit bei Prokaryoten (60%) und Säugetieren (64% - 68%) deutlich geringer ausfällt. In Abb. 6 ist das Ergebnis des linearen Sequenzvergleiches des GSNO-Reduktase Proteins graphisch abgebildet.



### **Abb. 6: Primärstruktur des GSNO-Reduktase Proteins in verschiedenen Spezies**

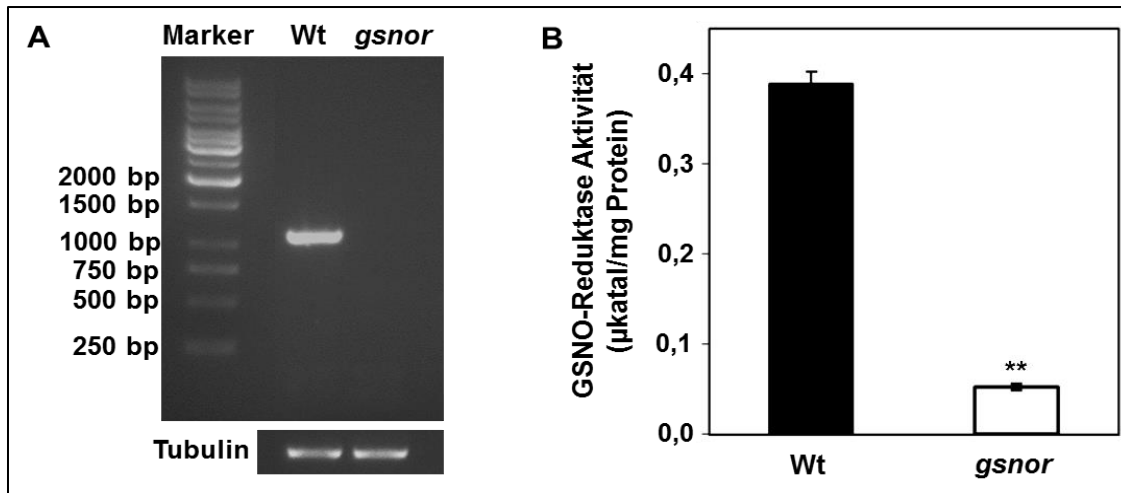
Für die Homologie-Betrachtung auf Proteinebene wurden die GSNO-Reduktase Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana* (NP\_199207), *Zea mays* (CAA\_71913), *Oryza sativa* (BAD21999), *Homo sapiens* (NP\_000662), *Mus musculus* (NP\_031436), *Drosophila melanogaster* (NP\_524310) und *Escherichia coli* (NP\_414890) miteinander verglichen. Die obere Zahlenreihe gibt die Länge des GSNO-Reduktase Proteins in Aminosäuren an, wobei dunkelgraue Bereiche eine identische bzw. hellgraue Regionen eine ähnliche Übereinstimmung signalisieren. Besonders gekennzeichnet wurden Aminosäure-Bindungsstellen für das katalytische Zinkatom (rot), das strukturelle Zinkatom (blau), das Koenzym NADH (gelb) und das Substrat GSNO (grün). Alle aufgelisteten Sequenzen entstammen der NCBI-Datenbank und wurden mit Hilfe des Programms BioEdit aliniert. Die Angaben hinsichtlich funktioneller Aminosäuren basieren auf dem Vergleich mit der humanen Kristallstruktur des GSNO-Reduktase Proteins (PDB-Nummer: 1MC5).

Auffällig ist, dass vor allem bestimmte Aminosäuren hoch konserviert sind, welche für die Koordination der beiden Zinkatome sowie für die Ausbildung des aktiven Zentrums bzw. der Koenzym-Bindedomane verantwortlich sind. Die ausgeprägte Sequenzidentität innerhalb spezifischer Abschnitte lässt in diesem Zusammenhang vermutlich auf einen ähnlichen katalytischen Reaktionsmechanismus bzw. auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen.

### **3.1.3. Überprüfung der T-DNA Insertion in der *gsnor* Knock-out Linie**

Die Insertion eines T-DNA Elements innerhalb des genomischen Locus eines Gens führt in den meisten Fällen zum Abbruch der Transkription durch Unterbrechung bzw. Verschiebung des offenen Leserasters in diesem Bereich. Um den Funktionsverlust des GSNO-Reduktase Gens zu bestätigen, wurde die Gesamt-RNA aus Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die Amplifikation der Sequenz durch den Einsatz genspezifischer Primer in der nachfolgenden PCR untersucht. Wie in Abb. 7A gezeigt, konnte nur in Wildtyp-Pflanzen ein spezifisches PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von etwa 1.200 bp nachgewiesen werden, während in der Knock-out Linie kein mRNA-Transkript detektiert werden konnte. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche cDNA-Synthese wurde zusätzlich mit Hilfe genspezifischer Primer die Transkript-Akkumulation des konstant exprimierten Referenzgens Tubulin bestimmt.

Da in Abwesenheit des entsprechenden mRNA-Amplifikats auch kein funktionsfähiges Protein entstehen kann, wurde im nächsten Schritt zusätzlich ein Enzymtest mit Blattrohextrakt von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien durchgeführt. Hierfür wurde die GSNO-Reduktase Aktivität bzw. der Abbau von S-Nitrosoglutathion (GSNO) indirekt über die Oxidation von Koenzym NADH zu  $\text{NAD}^+$  photometrisch anhand der Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt (Abb. 7B). Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen konnte bei der *gsnor* Knock-out Linie eine Reduktion der Enzymaktivität um mehr als 90% festgestellt werden, was mit den Daten der Transkriptamplifizierung übereinstimmte.



**Abb. 7: Verifikation der T-DNA Insertion**

A) Überprüfung der Expression des GSNO-Reduktase Gens mit genspezifischen Primern. Dargestellt sind die Transkript-Amplifikate nach RT-PCR-Analyse in Wt-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die mRNA-Akkumulation von Tubulin bestimmt.

B) Photometrische Bestimmung der GSNO-Reduktase Aktivität in beiden Pflanzenlinien. Für die Berechnung wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen biologischen Wiederholungen verwendet, in die Einheit Katal umgerechnet und auf den Proteingehalt der Proben bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

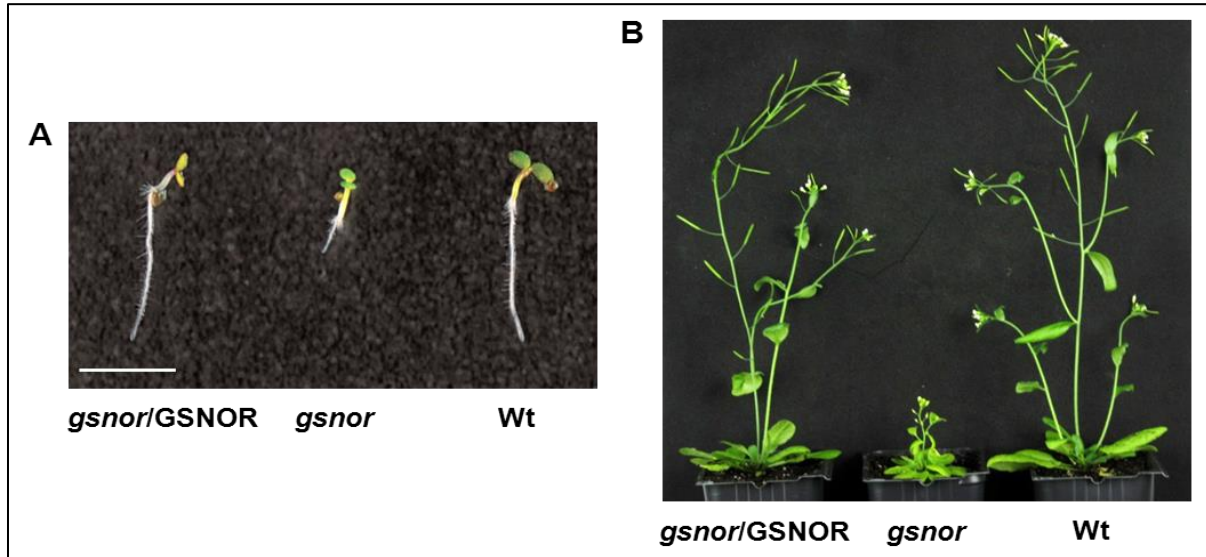
### 3.1.4. Genetische Komplementation der *gsnor* Knock-out Linie

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp der *gsnor* Knock-out Linie im direkten Zusammenhang mit der Inaktivierung des GSNO-Reduktase Gens steht, sollte der Funktionsverlust mit Hilfe eines „reverse genetics“-Ansatzes rekonstruiert werden. Bei dieser Methode werden die mutierten Pflanzen genetisch komplementiert, d. h. sie enthalten neben dem ursprünglich zerstörten Gen eine zusätzliche funktionelle Kopie, die die Transkription ermöglicht und somit den beobachteten Phänotyp wieder aufhebt.

Für die Komplementation wurde ein 4.000 Basenpaar langes Fragment, bestehend aus endogenem Promotorbereich (ca. 2 kb) und GSNO-Reduktase Gensequenz mittels PCR amplifiziert und unter Verwendung des GATEWAY-Klonierungsystems in den Zielvektor pAlligator2 inseriert. Mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers wurde das Fragment stabil in das Genom von *gsnor* Knock-out Linien integriert. Da der verwendete Vektor als Selektionsmarker das GFP-Gen unter der Kontrolle des samenspezifischen Promotors trägt, konnten positiv transformierte Pflanzenlinien anhand ihrer fluoreszierenden Samen identifiziert werden.

Für die morphologische Analyse des Phänotyps komplementierter *gsnor*/GSNOR Linien wurden Pflanzen der T3-Generation verwendet. Wie in der Abb. 8 zu sehen ist, konnte der kurzwüchsige Phänotyp der *gsnor* Knock-out Linie vollständig revertiert werden. Sowohl auf Erde als auch unter sterilen Anzuchtbedingungen auf MS-Medium unterscheiden sich

Keimlinge als auch adulte Pflanzen weder im Wachstum noch der Entwicklung von normalen Wildtyp-Pflanzen. Die erfolgreiche Komplementation lieferte somit den Nachweis, dass den phänotypischen Veränderungen die Inaktivierung des GSNO-Reduktase Gens zugrunde liegt.



**Abb. 8: Vergleich von Wt-Pflanze und komplementierter *gsnor/GSNOR* Linie**

A) Vergleich des Wurzelwachstums von 4 Tagen alten Keimlingen auf MS-Medium (Teilstrich 0,5 cm).

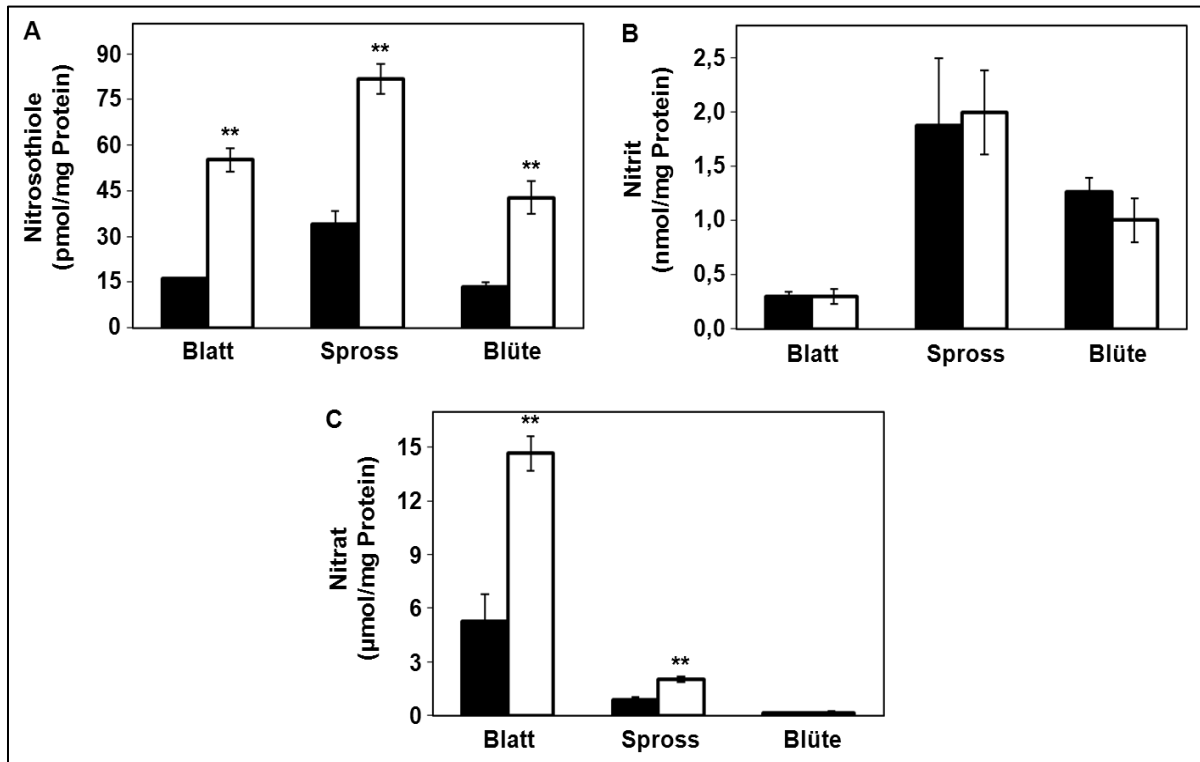
B) Vergleich der Entwicklung von sechs Wochen alten Pflanzen auf Erde.

### 3.1.5. Quantitative Bestimmung von Stickstoffoxiden und Nitroverbindungen

Um detailliertere Erkenntnisse über die Auswirkung einer Inaktivierung des GSNO-Reduktase Gens für den allgemeinen NO-Stoffwechsel zu gewinnen, wurde im folgenden Experiment die Konzentration verschiedener NO-Metabolite in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Oxidationsprodukte von NO (Nitrit, Nitrat) und Nitrosothiolen in verschiedenen Gewebetypen wie Blatt-, Spross- und Blütenextrakten erfolgte mittels Ozon-abhängiger Gasphasen-Chemilumineszenz. Diese Methode basiert auf der Messung von Lichtquanten, die bei der Reaktion von reduziertem, aus dem Probenmaterial freigesetztem NO mit Ozon zu Stickstoffdioxid entstehen.

Bei dieser Messreihe konnten mehr als doppelt so hohe Werte hinsichtlich des Gehaltes an Nitrosothiolen und Nitrat in allen untersuchten Gewebeextrakten von *gsnor* Insertionslinien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen gemessen werden (Abb. 9). Überraschenderweise waren bei der Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Linien feststellbar. Unter Berücksichtigung der gewebespezifischen Verteilung der verschiedenen NO-Spezies, konnte die höchste Akkumulationsrate von Nitrosothiolen und Nitrit in Sprossextrakten beider Linien beobachtet werden, während Nitrat hauptsächlich in Blattproben vorhanden war. Von allen untersuchten NO-Metaboliten

ergab die Messung der Nitratkonzentration dabei mit Abstand die höchsten Werte, während der Gehalt an Nitrosothiolen im picomolaren Bereich und damit knapp oberhalb des Detektionslimits des NO-Analysators lag. Insgesamt betrachtet deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das Enzym GSNO-Reduktase offensichtlich eine entscheidende Funktion hinsichtlich der Regulation des endogenen NO-Stoffwechsels besitzt.



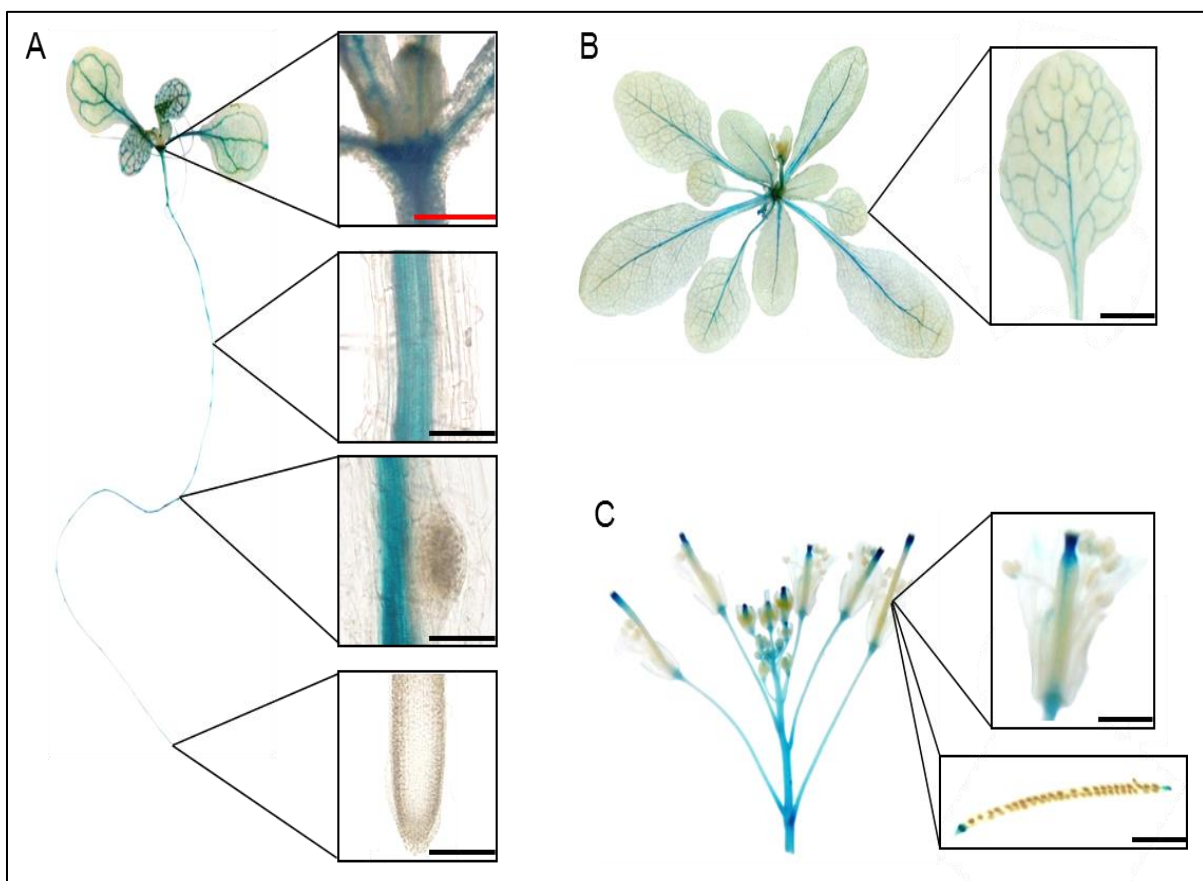
**Abb. 9: Bestimmung von NO-Metaboliten**

Blatt- Spross- und Blütenproben wurden separat geerntet und die Konzentration von Nitrosothiolen (A), Nitrit (B) und Nitrat (C) bestimmt. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Alle Messungen beruhten auf der Verwendung von Pflanzenmaterial aus drei biologischen Replikaten und zwei technischen Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.1.6. Analyse der gewebespezifischen Expression des GSNO-Reduktase Gens

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe von Promotor-Reportergenkonstrukten ermittelt werden, in welchen Geweben und in welchen Entwicklungsstadien der Promotor des GSNO-Reduktase Gens aktiv ist. Für die *in-vivo* Expressionsanalyse wurde eine 2.000 bp lange, putative Promotorsequenz „upstream“ vom ATG-Startcodon mittels PCR amplifiziert und unter Verwendung des GATEWAY-Klonierungssystem mit dem Reporter gen  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) des pB2GW7-Vektors fusioniert. Mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers wurde das Konstrukt stabil in das Genom von Wildtyp-Pflanzen integriert und positive Transformanten mit dem Herbizid BASTA selektiert. Für den

histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität wurden Pflanzen der T2-Generation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verwendet. In Abb. 10 ist exemplarisch eine Linie ausgewählt und die charakteristische Blaufärbung im Detail analysiert. Eine GUS-Expression konnte bereits bei der Entwicklung von zehn Tage alten Keimlingen festgestellt werden. In diesem Fall war eine deutliche Färbung des Zentralzylinders innerhalb der Primärwurzel zu erkennen, während bei der Ausbildung von Seitenwurzeln und im meristematischen Gewebe der Wurzelspitze kein Signal detektiert werden konnte. Stattdessen zeigten vor allem Haupt- und Nebenleitbahnen von Kotyledonen und jungen Blättern sowie das apikale Sprossmeristem eine starke Promotoraktivität (Abb. 10A). Dieses Expressionsmuster konnte auch in Blättern und Blattstielen von vier Wochen alten Pflanzen gefunden werden (Abb. 10B). Beobachtete man die GUS-Reporteraktivität in sechs Wochen alten Pflanzen, so konnte außerdem eine starke Blaufärbung der gesamten Sprossachse sowie des Griffels und Septums in weiblichen Blütenorganen nachgewiesen werden. Die Abszissionszone ausgewachsener Schoten war ebenfalls blau gefärbt (Abb. 10C).



**Abb. 10: Analyse der GUS-Expression unter Kontrolle des GSNO-Reduktase Promotors**

A) 10 Tage alter Keimling mit vergrößerter Aufnahme des Sprossmeristems, Primärwurzel, Seitenwurzeln und Wurzelspitze (Teilstrich rot: 0,5 mm, Teilstrich schwarz: 0,1 mm).

B) Rosette einer vier Wochen alten Pflanze mit Nahaufnahme eines Blattes (Teilstrich 0,5 cm).

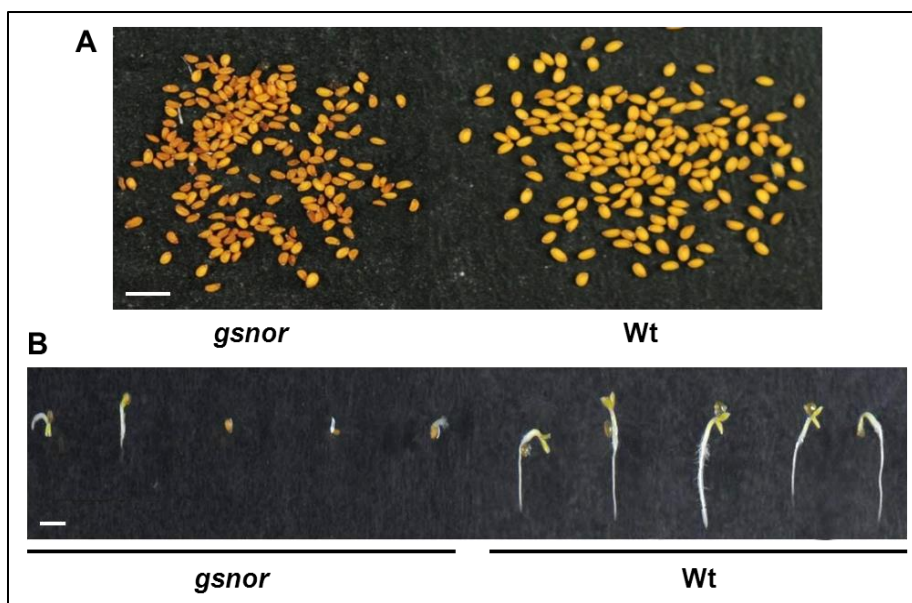
C) Blütenstand einer sechs Wochen alten Pflanze mit detaillierter Vergrößerung einer einzelnen Blüte und Schote (Teilstrich 0,5 cm).

### 3.2. Phänotypische Charakterisierung der *gsnor* Knock-out Linie

In diesem Kapitel wurde die gesamte Pflanzenentwicklung von *gsnor* Insertionslinien hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten und Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen analysiert. Da ein Ausschalten des GSNO-Reduktase Gens gravierende Auswirkungen auf das Erscheinungsbild dieser Pflanzen hatte, wurde die Vielseitigkeit des beobachteten Phänotyps separat während Keimung, vegetativem Wachstum und Reproduktion im Detail dokumentiert.

#### 3.2.1. Einfluss von GSNO-Reduktase auf Keimung und Wurzelwachstum

Zur Analyse der Keimung und der Wurzelentwicklung von Keimlingen wurden sterilisierte Samen beider Linien auf horizontal gekippten MS-Agarplatten angezogen und das Wachstum über einen Zeitraum von zehn Tagen verglichen. Im Hinblick auf Unterschiede in der Samenmorphologie war zu erkennen, dass *gsnor* Knock-out Linien eine geringere Samengröße sowie eine rötlichbraune Samenschale aufwiesen (Abb. 11A). Darüber hinaus konnte neben einer reduzierten Keimungsrate auch eine zeitliche Verzögerung des Keimungsprozesses im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 11B).



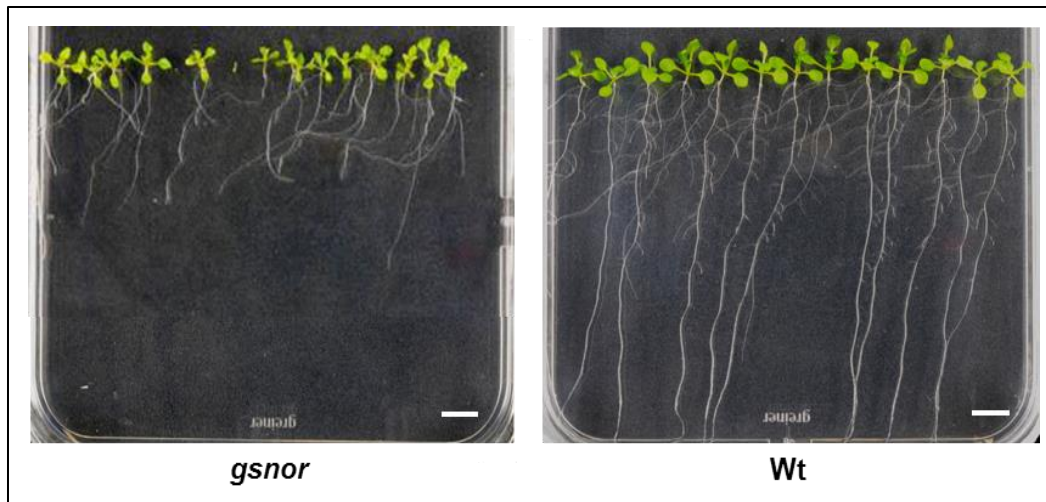
**Abb. 11: Phänotypische Unterschiede in der Samenmorphologie und Keimung**

A) Vergleich reifer Samen von *gsnor* Knock-out Linien und Wildtyp-Pflanzen (Teilstrich 1 mm).

B) Vergleich der Keimung von vier Tage alten Pflanzen auf MS-Medium (Teilstrich 1 mm).

Bei der Betrachtung der Wurzelmorphologie war zudem auffällig, dass *gsnor* Insertionslinien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine starke Beeinträchtigung der Primärwurzelbildung sowie eine verringerte Seitenwurzelentwicklung zeigten (Abb. 12).





**Abb. 12: Phänotypische Unterschiede in der Wurzelmorphologie**

Vergleich der Wurzellängen von 14 Tage alten Keimlingen unter sterilen Anzuchtbedingungen auf MS-Medium (Teilstrich 1 cm).

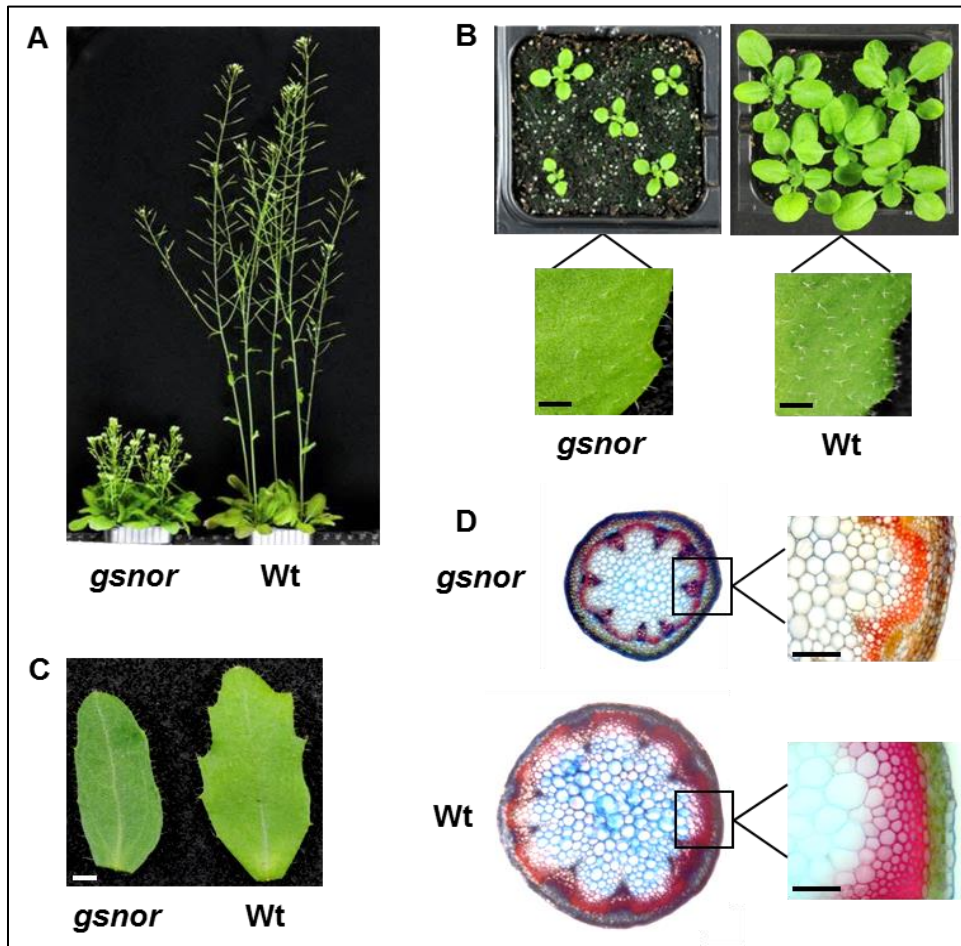
Weiterhin konnte ebenfalls eine deutliche Einschränkung in Bezug auf die Hypokotyl-Entwicklung gegenüber Wildtyp-Pflanzen ermittelt werden. In Tab. 1 im Anhang sind ausgewählte Messdaten in Bezug auf unterschiedliche Keimungs- und Wachstumsparameter von zehn Tage alten Keimlingen beider Linien nochmals vergleichend gegenüber gestellt.

### 3.2.2. Einfluss von GSNO-Reduktase auf Blatt- und Sprossentwicklung

Die gesamte vegetative Entwicklungsphase war durch eine drastische Größenreduktion von *gsnor* Knock-out Linien auf etwa ein Viertel der Wildtyp-Pflanzen gekennzeichnet, so dass man in diesem Zusammenhang von einem zwergenhaften Erscheinungsbild sprechen kann. Auffällig waren dabei vor allem Veränderungen der Sprossmorphologie im Hinblick auf eine vermehrte Ausbildung von Sprossachsen mit einer Vielzahl an Seitensprossen, wodurch der Habitus eines buschigen und stark verzweigten Phänotyps entsteht (Abb. 13A). Im Allgemeinen zeigten *gsnor* Insertionslinien zu allen Zeitpunkten ein erheblich langsames, zeitlich verzögertes Wachstum, was sich folglich auch in einer reduzierten Blatt- bzw. Rosettengröße gleichaltriger Pflanzen widerspiegelte. Darüber hinaus scheint zudem die Ausbildung bzw. Entwicklung von Trichomen auf der Blattoberseite negativ beeinträchtigt zu sein (Abb. 13B). Auch hinsichtlich der Sprossblätter waren deutliche Unterschiede zwischen beiden Linien zu erkennen, wobei *gsnor* Mutanten eine schmale lanzettartige Form aufwiesen, während bei Wildtyp-Pflanzen eine ovale und mehrfach gezähnte Blattspreite existierte (Abb. 13C). Für eine detaillierte Untersuchung der eingeschränkten Sprosslänge bzw. -breite wurden zusätzlich mikroskopische Präparate von Quer- und Längsschnitten hergestellt. Interessanterweise konnte dabei neben einer reduzierten Länge von Parenchymzellen und einem eingeschränkten Lignifizierungsgrad sklerenchymatischer

Zellschichten auch eine geringere Anzahl von Leitbündeln bei *gsnor* Knock-out Pflanzen beobachtet werden (Abb. 13D).

In Tab. 2 im Anhang sind ausgewählte Messdaten hinsichtlich unterschiedlicher vegetativer Wachstumsparameter von sieben Wochen alten Pflanzen beider Linien nochmals vergleichend gegenübergestellt.



**Abb. 13: Phänotypische Unterschiede in der vegetativen Entwicklung**

A) Vergleich des Habitus von sieben Wochen alten Pflanzen.

B) Vergleich der Rosettengröße von drei Wochen alten Pflanzen mit vergrößerter Aufnahme eines Blattauschnittes (Teilstrich 1 mm).

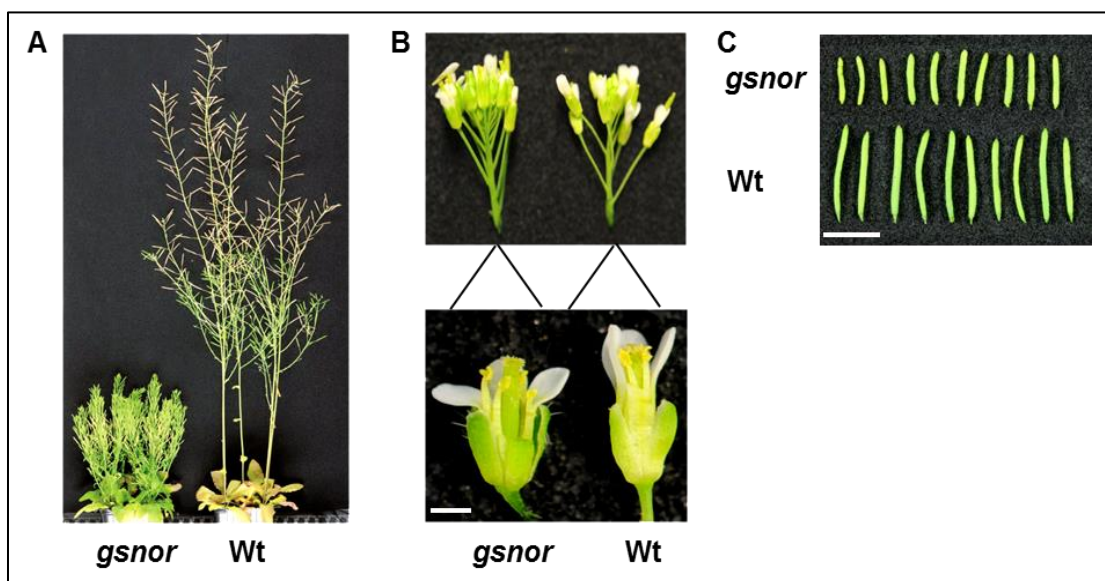
C) Vergleich eines Sprossblattes von sieben Wochen alten Pflanzen (Teilstrich 1 mm).

D) Querschnittpräparate von sieben Wochen alten Sprossachsen mit detaillierter Vergrößerung eines Sprossauschnittes. Ligninhaltige Zellschichten sind rot eingefärbt, während zellulosehaltige Zellen durch eine Blaufärbung gekennzeichnet sind (Teilstrich 0,1 mm).

### 3.2.3. Einfluss von GSNO-Reduktase auf Blüten- und Schotenbildung

Auch während der gesamten Phase der Blüten- und Samenbildung war eine erhebliche zeitliche Verzögerung des Entwicklungsprozesses bei *gsnor* Knock-out Linien zu verzeichnen. Nach zehn Wochen Kultivierung konnten bei Wildtyp-Pflanzen bereits deutliche Anzeichen der Seneszenz bezüglich Blattverfärbungen und Samenreife festgestellt werden, während

dieser Prozess bei *gsnor* Insertionslinien nur ansatzweise zu beobachten war (Abb. 14A). Bei Betrachtung der Blütenstände fiel auf, dass diese im Allgemeinen dichter zusammen standen und die einzelnen Blüten über kürzere Staubblätter verfügten (Abb. 14B). Die sich aus der Blüte entwickelnden Schoten zeigten darüber hinaus eine deutlich reduzierte Länge im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Abb. 14C). Überraschenderweise konnten allerdings mehr als doppelt so viele Schoten pro Pflanze gezählt werden, während die Anzahl der Samenanlagen pro Schote geringer ausfiel. In Tab. 3 im Anhang sind bestimmte Messdaten hinsichtlich der Schotenentwicklung von neun Wochen alten Pflanzen beider Linien nochmals vergleichend gegenübergestellt.



**Abb. 14: Phänotypische Unterschiede in der generativen Entwicklung**

- A) Vergleich des Habitus von zehn Wochen alten Pflanzen.  
 B) Vergleich der Infloreszenz von sieben Wochen alten Pflanzen mit Nahaufnahme einer präparierten Blüte ohne Petalen (Teilstrich 1 mm).  
 C) Vergleich unreifer Schoten von neun Wochen alten Pflanzen (Teilstrich 1 cm).

Insgesamt betrachtet deuten die multiplen Veränderungen des phänotypischen Erscheinungsbildes darauf hin, dass das Enzym GSNO-Reduktase und damit die Regulation der endogenen NO-Homöostase eine bedeutende Funktion für die gesamte Pflanzenentwicklung besitzt. Um zusätzliche Erkenntnisse im Hinblick auf die Rolle von GSNO-Reduktase in physiologischen Prozessen zu gewinnen, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen verschiedener Stressbedingungen auf den Stoffwechsel analysiert.

### **3.3. Untersuchung der biotischen Stressantwort der *gsnor* Knock-out Linie nach Pathogeninfektion mittels quantitativer Proteomanalyse**

Im Rahmen dieses Versuchs sollte anhand des Pathosystems *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* ermittelt werden, ob *gsnor* Insertionslinien ein unterschiedliches Resistenzverhalten nach kompatibler und inkompatibler Interaktion im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass NO als Signalmolekül eine wichtige Funktion bei der Pathogenabwehr spielt (Delledonne et al., 1998, Durner et al., 1998) und der NO Stoffwechsel von *gsnor* Knock-out Linien erheblich beeinträchtigt ist, konnten in Vorarbeiten überraschenderweise keine Unterschiede hinsichtlich der Krankheitssymptome und der bakterieller Vermehrungsrate zwischen beiden Linien beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob beide Linien möglicherweise unterschiedlich Abwehrstrategien nutzen, die in einem ähnlichen Resistenzverhalten resultieren, wurden im nächsten Experiment potentielle Unterschiede der Abwehrreaktion auf Proteinebene untersucht.

#### **3.3.1. Rahmenbedingungen der differentiellen Proteomanalyse**

Für die Proteomanalyse wurden sieben Wochen alte Pflanzen beider Linien einerseits mit dem avirulenten Stamm *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) und andererseits mit dem virulenten Stamm *Pst* DC3000 mittels Vakuuminfektion infiziert. Pro Pflanzenlinie wurde anschließend Blattmaterial nach zwei frühen (3 h und 6 h nach der Infektion) sowie zwei späteren Zeitpunkten (24 h und 48 h nach der Infektion) geerntet und daraus jeweils die Gesamtproteinfraktion isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese unter Verwendung der DIGE-Technologie. Bei diesem Verfahren werden die zu analysierenden Proteinproben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5) versetzt. Die Farbstoffe gehen eine kovalente Bindung mit Lysinresten der Proteine ein, wobei aufgrund des geringen Farbstoff/Protein-Verhältnisses nur etwa 3% bis 5% aller Lysinreste eines Proteinmoleküls markiert werden, um gravierende Masseveränderungen der Proteine auszuschließen. Neben der Tatsache, dass die Farbstoffe die gleiche Masse besitzen (ca. 500 Da), sind sie zudem - ebenso wie Lysin - einfach positiv geladen und ersetzen bei der Reaktion mit der Aminosäure dessen Ladung. Dies hat den Vorteil, dass die Gesamtladung eines Proteins und damit auch dessen isoelektrischer Punkt nicht beeinträchtigt werden. Da die einzelnen Farbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen zu Fluoreszenz angeregt werden können und dadurch separat voneinander detektierbar sind, ist es möglich Unterschiede im Spotmuster sichtbar zu machen.

### 3.3.2. Quantitative Auswertung differentiell regulierter Proteine nach Infektion

Die statistische Analyse erfolgte auf Grundlage des verwendeten internen Standards, da er sämtliche Spotinformationen aus dem Gesamtexperiment enthielt und daher zur Spotquantifizierung auf den einzelnen Gelen verwendet werden konnte. Um eine signifikante Aussage hinsichtlich Veränderungen auf Proteinebene zwischen avirulenter bzw. virulenter Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen über den Zeitverlauf zu erhalten, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für jede Pflanzenlinie durchgeführt. Proteinkandidaten für die Massenspektrometrie wurden als signifikant reguliert bewertet, wenn die Intensitätsänderung bei einer Signifikanzschwelle von  $p \leq 0,01$  mindestens um den Faktor  $\pm 2$  erhöht bzw. erniedrigt war und die entsprechenden Spots auf allen zu untersuchenden Gelen vorhanden waren. Eine detaillierte Auflistung aller detektierten Proteine sowie deren Lokalisation auf den Gelen ist im Anhang (Tab. 4-7 bzw. Abb. 1-4) einzusehen. Ein Überblick über die Gesamtzahl der differentiell produzierten Proteine, die nach avirulenter bzw. virulenter Infektion in beiden Linien akkumulierten und den oben erwähnten Kriterien entsprachen, ist in Tab. 2 gezeigt.

**Tab. 2: Gesamtzahl differentiell produzierter Proteine in beiden Linien**

Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien wurden mit einem avirulenten und einem virulenten *Pseudomonas syringae* DC3000 Stamm behandelt und die Anzahl differentiell regulierter Proteine zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Rot markierte Bereiche mit einem nach oben gerichteten Pfeil kennzeichnen Proteine, die mindestens eine um den Faktor 2 erhöhte Produktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufwiesen. Grüne Felder mit einem nach unten gerichteten Pfeil stehen für Proteine, die mindestens eine um den Faktor 2 verminderte Produktion zeigten.

Behandlung	Anzahl differentiell regulierter Proteine			
	3 h	6 h	24 h	48 h
<b>Wildtyp</b>				
<i>Pst</i> DC3000 (avrRpt2)	0	0	17 16 ↑ 1 ↓	39 26 ↑ 13 ↓
<i>Pst</i> DC3000	0	0	8 8 ↑ 0 ↓	32 19 ↑ 13 ↓
<b><i>gsnor</i></b>				
<i>Pst</i> DC3000 (avrRpt2)	0	0	12 12 ↑ 0 ↓	19 17 ↑ 2 ↓
<i>Pst</i> DC3000	0	0	8 8 ↑ 0 ↓	34 21 ↑ 13 ↓

Bei Betrachtung der Daten wird deutlich, dass beide Pflanzenlinien keine signifikanten Veränderungen auf Proteinebene hinsichtlich der beiden frühen Zeitpunkte zeigten. Erst 24 h bzw. vor allem 48 h nach avirulenter und virulenter Infektion war ein erheblicher Anstieg differentiell produzierter Proteine zu verzeichnen, wobei die Anzahl der Proteine, die

verstärkt produziert werden, deutlich überwog. Auffällig war zudem, dass in beiden Linien 24 h nach inkompatibler Interaktion mehr regulierte Proteine vorlagen im Vergleich zur kompatiblen Infektion. Unterschiede in der Proteinproduktion zwischen beiden Pflanzenlinien waren hauptsächlich nach avirulenter Infektion zu beobachten. Bei Wildtyp-Pflanzen war vor allem nach 48 h eine deutlich höhere Menge an regulierten Proteinen feststellbar im Vergleich zu *gsnor* Knock-out Linien, während sich die Anzahl differentiell produzierter Proteine nach virulenter Infektion zwischen den Linien hinsichtlich der untersuchten Zeitpunkte kaum unterschied.

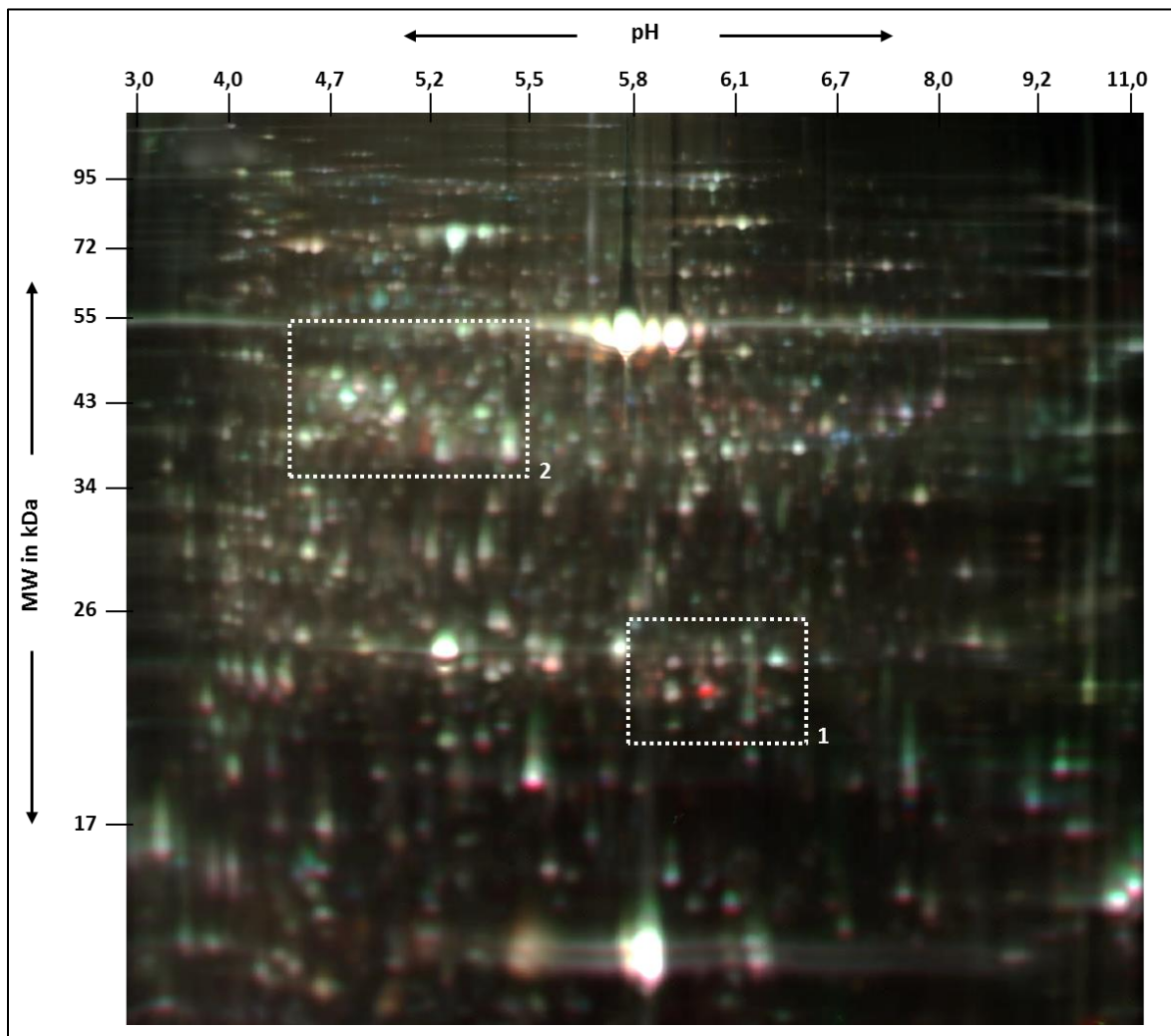
### **3.3.3. Massenspektrometrische Identifizierung differentiell regulierter Proteine**

Ausgewählte Proteinkandidaten, die den Kriterien der quantitativen Auswertung entsprachen, wurden aus präparativen Silbergelen herausgeschnitten, einem tryptischen Verdau unterzogen und die Peptidfragmente anschließend massenspektrometrisch analysiert. Anhand der erstellten Massenspektrogramme wurde anschließend die *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR9 sowie die Datenbank SwissProt unter Verwendung des Programms Mascot durchsucht, um Proteine zu identifizieren, die eine übereinstimmende Peptidmassenverteilung besitzen. Für die statistische Auswertung der Datenbankrecherche wurde ein Score-Wert  $\geq 59$  als Signifikanzschwelle herangezogen und identifizierte Proteinkandidaten mussten mindestens mit zwei detektierten Peptidfragmenten übereinstimmen. In den meisten Fällen war allerdings keine eindeutige Identifizierung einzelner Proteine möglich, da die ausgestanzten Gelstücke oft mehr als eine Proteinspezies enthielten. Dies ist vor allem durch die Wahl des weiten pH-Bereiches zu erklären, wodurch die Proteine in den Gelen räumlich nicht so weit voneinander getrennt werden konnten und der Großteil der Spots sich somit überlagerte. Darüber hinaus ist ein exaktes manuelles Ausstechen einzelner Proteinspots nur schwer möglich. In den Auflistungen sind daher unterschiedliche Identifizierungen einzelner Proteine nach der Höhe des Score-Wertes angeordnet. Eine Gesamtübersicht aller Ergebnisse mit signifikant erhöhten bzw. erniedrigten Proteinen inklusive den Regulationsfaktoren und den statistischen Auswertekriterien ist im Anhang zu finden (Tab. 4-7).

### **3.3.4. Analyse von Proteinmustern und deren zeitliche Veränderung**

Bei Gegenüberstellung der Proteommuster bzw. bei Betrachtung der Lokalisation differentiell regulierter Proteine in den Gelen, fielen in beiden Linien bestimmte Regionen auf, die nach avirulenter bzw. nach virulenter Interaktion eine deutliche Veränderung auf Proteinebene zeigten. Um einen Gesamteindruck hinsichtlich der Proteinauftrennung zu

erhalten, ist in Abb. 15 eine repräsentative Darstellung eines aufgetrennten Homogenats löslicher Blattproteine gezeigt und exemplarisch zwei interessante Gelbereiche markiert.

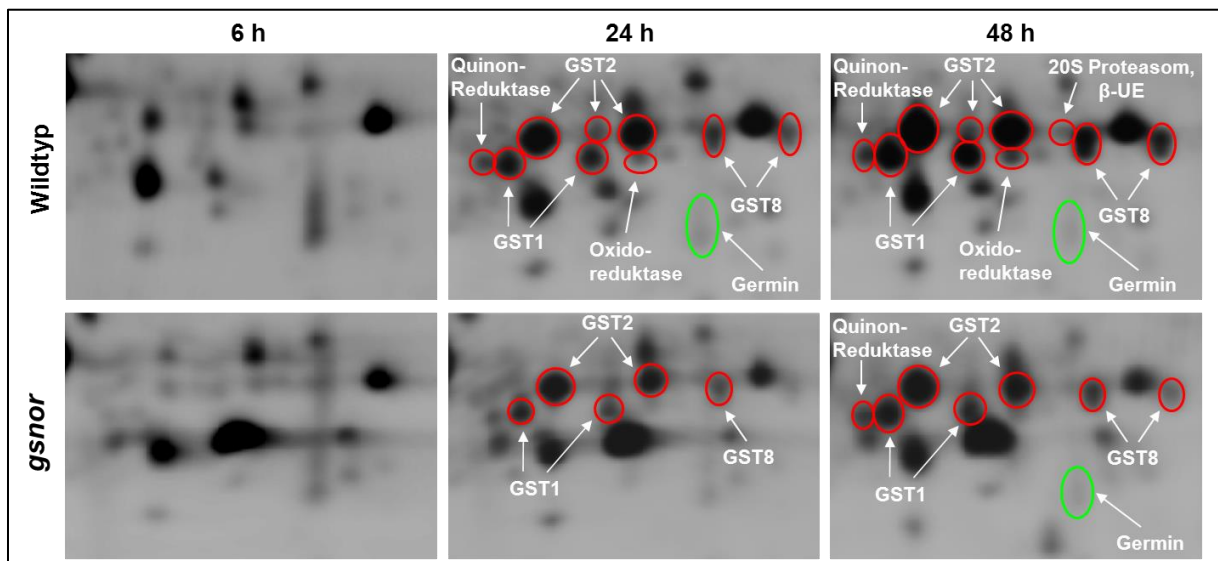


**Abb. 15: Auftrennung der Proteinfraktion aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana***

Die Separierung der Proteine erfolgte im nicht linearen pH-Bereich von 3 bis 11. Auf der linken Seite sind die relativen Molekülmassen in kDa angegeben. Regionen, in denen deutliche Unterschiede in der Proteinregulation nach Infektion festgestellt werden konnten, sind mit einem weißen Rahmen markiert.

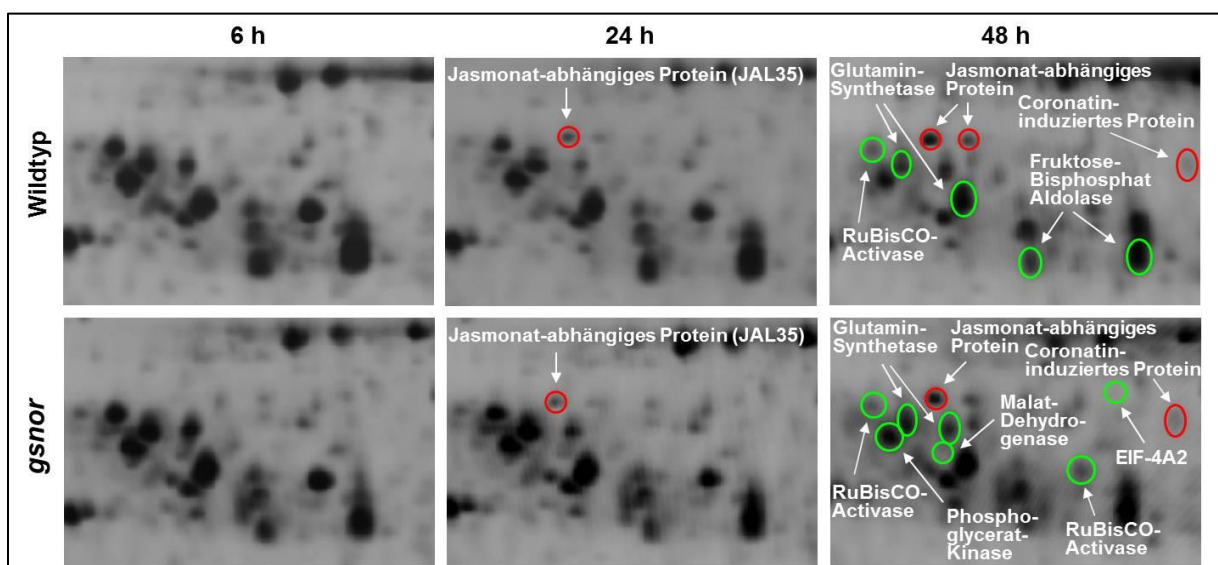
Diese Gelabschnitte sind in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien identisch und auch die identifizierten Proteine in diesen Bereichen weisen eine gewisse Übereinstimmung auf, was auf eine charakteristische Abwehrantwort je nach Infektionstypus schließen lässt. Nach avirulenter Infektion konnte beispielsweise eine Gelregion im pH-Bereich zwischen 5,7 und 6,7 mit einer Molekülmasse von 20 kDa bis 26 kDa lokalisiert werden, in der vor allem verschiedene Isoformen von Glutathion S-Transferasen verstärkt akkumulierten. Eine erhöhte Produktion dieser Proteine war bereits nach 24 h detektierbar, wobei nur noch geringe Veränderungen im Vergleich zum 48 h Zeitpunkt auftraten. Im Gegensatz dazu konnten Variationen in der Proteinsynthese nach virulenter Infektion hauptsächlich im

sauren pH-Bereich zwischen 4,5 und 5,5 und einer Molekülmasse von 35 kDa bis 55 kDa festgestellt werden. Interessanterweise handelte es sich dabei zum Großteil um Proteine, die in metabolische Stoffwechselforgänge involviert sind und eine reduzierte Akkumulation zeigten. Eine deutliche Änderung der Regulation konnte in diesem Fall allerdings erst 48 h nach der Infektion beobachtet werden. Die Bereiche sind in den nachfolgenden Abb. 16 und Abb. 17 vergrößert dargestellt und sollen auftretende Unterschiede in der zeitabhängigen Regulation der Proteine nach avirulenter Infektion (Abschnitt 1) und virulenter Infektion (Abschnitt 2) in beiden Linien verdeutlichen.



**Abb. 16: Proteinregulation in Gelabschnitt 1 nach avirulenter Infektion**

Nebeneinander dargestellt sind die gleichen Gelabschnitte der verschiedenen Behandlungszeitpunkte 6 h, 24 h und 48 h nach Infektion mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien. Rot markiert sind Proteine, deren Abundanz mindestens um den Faktor 2 erhöht war, während grün umrandete Proteine mindestens eine um den Faktor 2 reduzierte Produktion aufwiesen.



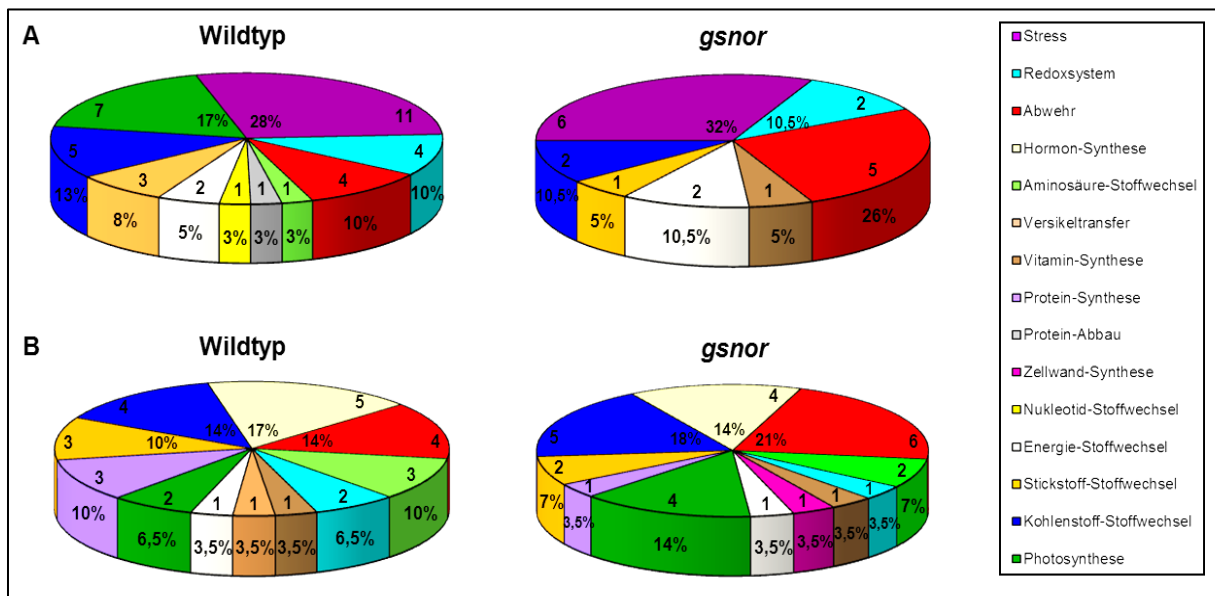


**Abb. 17: Proteinregulation in Gelabschnitt 2 nach virulenter Infektion**

Nebeneinander dargestellt sind die gleichen Gelabschnitte der verschiedenen Behandlungszeitpunkte 6 h, 24 h und 48 h nach Infektion mit *Pst* DC3000 in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien. Rot markiert sind Proteine, deren Abundanz mindestens um den Faktor 2 erhöht war, während grün umrandete Proteine mindestens eine um den Faktor 2 reduzierte Produktion aufwiesen.

**3.3.5. Vergleich und funktionelle Klassifizierung der identifizierten Proteine**

Um einen detaillierten Eindruck zu erhalten, welche physiologischen Prozesse in beiden Pflanzenlinien speziell nach avirulenter und virulenter Infektion beeinträchtigt wurden, erfolgte eine Zuordnung aller identifizierten Proteine in verschiedene Kategorien mit Hilfe der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR. Aus Gründen der besseren Übersicht wurde für jedes Protein nur der Kandidat mit dem höchsten Score-Wert berücksichtigt. Eine detaillierte Auflistung aller differentiell regulierten Proteine in beiden Linien ist im Anhang (Tab. 4-7) einzusehen. In der folgenden Abb. 18 sind die prozentualen Anteile der verschiedenen Kategorien in Bezug auf die Gesamtzahl aller identifizierten Proteine nach avirulenter Behandlung (Abb. 18A) bzw. virulenter Behandlung (Abb. 18B) dargestellt.



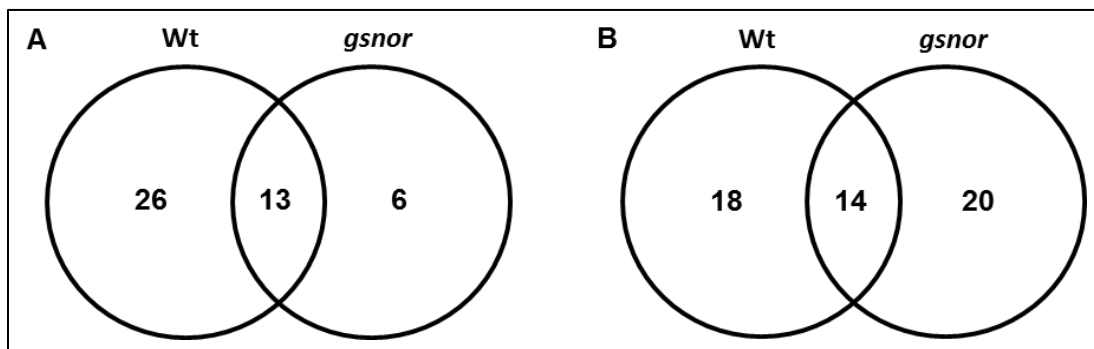
**Abb. 18: Funktionelle Klassifizierung identifizierter Proteine**

Dargestellt ist die Einteilung differentiell regulierter Proteine von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien nach avirulenter Infektion (A) und virulenter Infektion (B) hinsichtlich ihrer Beteiligung an physiologischen Prozessen. Die Anzahl der Proteine und die Anteile der verschiedenen Kategorien in Bezug auf die Gesamtzahl sind sowohl als absolute Zahlen als auch in Prozent wiedergegeben.

Nach inkompatibler Interaktion war auffällig, dass etwa ein Drittel aller identifizierten Proteine in beiden Linien eine differentielle Produktion im Zusammenhang mit der Stressantwort zeigten. Dabei handelte es sich vor allem um eine verstärkte Synthese von

verschiedenen Glutathion S-Transferasen, wobei eine doppelt so hohe Anreicherung bei Wildtyp-Pflanzen detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte ein höherer prozentualer Anteil von Abwehrproteinen in *gsnor* Insertionslinien beobachtet werden. Deutliche Unterschiede in der Proteinproduktion zwischen beiden Linien waren im Rahmen des Photosynthese-Prozesses feststellbar. Bei Wildtyp-Pflanzen war hier eine deutliche Abnahme auf Proteinebene nachweisbar, während bei *gsnor* Knock-out Pflanzen keine Proteinregulation hinsichtlich des Photosynthese-Apparats nachgewiesen werden konnte.

Nach kompatibler Infektion ergab sich hingegen ein anderes Bild der Klassifizierung, da an Stelle der Stressantwort hauptsächlich metabolische Stoffwechselfvorgänge (Aminosäure-, Stickstoff-, Kohlenstoff-, Photosynthese-Metabolismus) und die Hormonsynthese von Jasminsäure betroffen waren. Interessanterweise war bei *gsnor* Knock-out Linien allerdings eine erhöhte Anreicherung von Abwehrproteinen zu verzeichnen, während nur in Wildtyp-Pflanzen Proteine akkumulierten, die an der Proteinfaltung beteiligt sind. Um die Abwehrantwort beider Linien besser vergleichen zu können, wurden die Unterschiede in der Proteinakkumulation zwischen Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien in Form von Venn-Diagrammen analysiert (Abb. 19). Sowohl nach avirulenter als auch nach virulenter Infektion konnten hierbei deutliche Abweichungen hinsichtlich der identifizierten Proteinkandidaten festgestellt werden. Nach inkompatibler Interaktion zeigten insgesamt nur etwa ein Drittel aller identifizierten Proteine in Wildtyp-Pflanzen eine identische Regulation im Vergleich zu *gsnor* Knock-out Linien, wobei der Überschneidungsgrad auf Seiten der mutierten Linie fast 70% betrug. Bei der kompatiblen Interaktion lag der Anteil übereinstimmender Proteine in beiden Linien hingegen bei etwa 40%, während der Großteil der identifizierten Kandidaten durch eine divergente Regulation gekennzeichnet war.



**Abb. 19: Vergleich der Abwehrreaktionen in beiden Linien**

Die Venn-Diagramme veranschaulichen die Verteilung der differentiell regulierten Proteine nach avirulenter Infektion (A) bzw. virulenter Infektion (B) in Wildtyp-Pflanzen und *gsno1* Knock-out Linien. Der Überschneidungsbereich beider Kreise gibt dabei die Menge an Proteinen mit identischer Regulation zwischen beiden Linien an.

Als Resümee lässt sich anhand der erhobenen Daten schlussfolgern, dass beide Linien einerseits eine ähnliche Abwehrstrategie auf Proteinebene offenbaren, beispielsweise in Bezug auf Veränderungen der Proteinregulation innerhalb charakteristischer Gelregionen nach avirulenter und virulenter Infektion. Andererseits konnten aber auch deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien beobachtet werden hinsichtlich der Anzahl regulierter Proteine und einer geringen Übereinstimmung der identifizierten Kandidaten. Diese Ergebnisse deuten auf Variationen in der Abwehrreaktion hin, die allerdings nicht in einer gesteigerten bzw. verminderten Resistenz nach biotischem Stress resultierten.

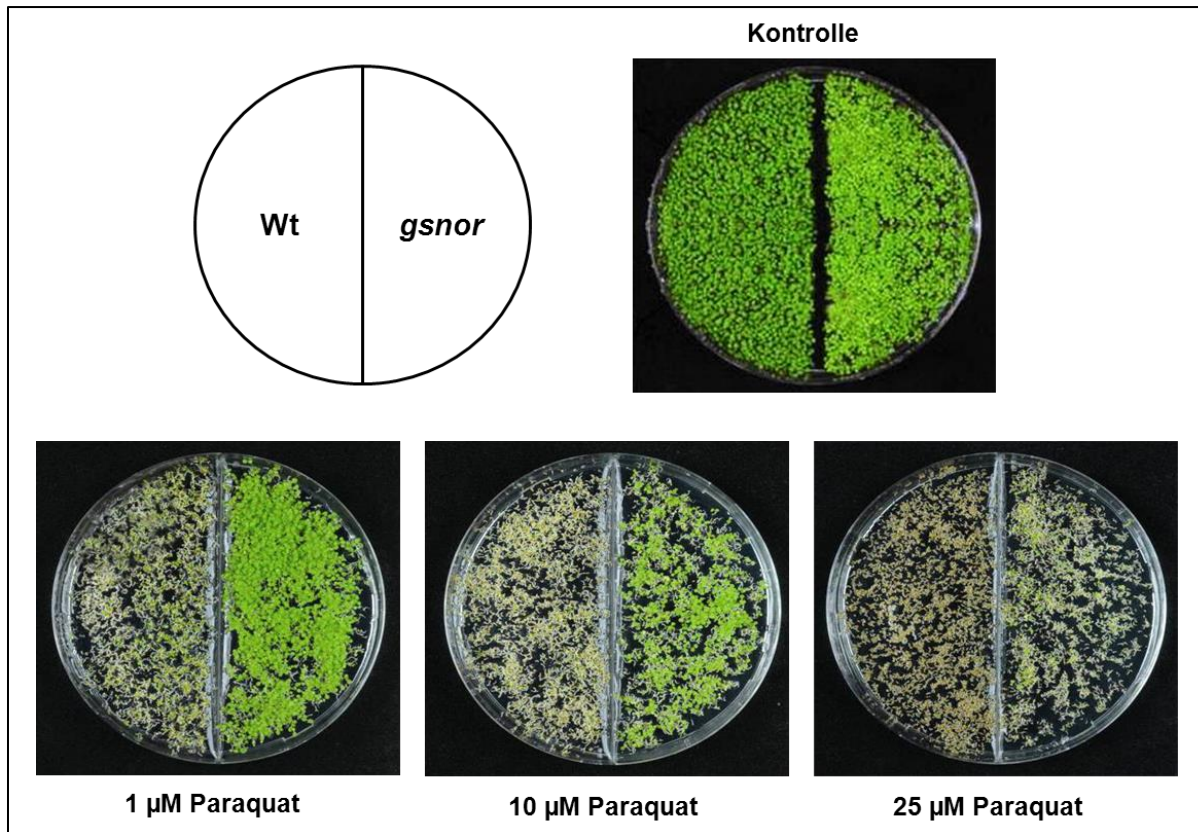
Um zu überprüfen, ob eine Beeinträchtigung der NO-Homöostase möglicherweise einen Einfluss auf das Resistenzverhalten nach abiotischer Stressbehandlung hat, wurde im nächsten Schritt die Sensitivität beider Linien gegenüber Xenobiotika analysiert. Vor allem das Herbizid Paraquat ist aufgrund seiner ROS-induzierenden Wirkung geeignet, um die Auswirkungen von oxidativer Stressexposition auf das Redoxsystem zu untersuchen.

### **3.4. Untersuchung der oxidativen Stressantwort der *gsnor* Knock-out Linie nach Herbizidbehandlung mit Paraquat**

Im Rahmen dieses Experiments sollte anhand der phänotypischen Schadausprägung sowie durch Charakterisierung des antioxidativen Systems herausgefunden werden, ob *gsnor* Insertionslinien eine unterschiedliche Toleranzausprägung nach Paraquatbehandlung im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zeigen. Paraquat ist ein Kontaktherbizid, welches den Elektronentransport vom Photosystem I auf die Ferredoxin-abhängige NADPH-Reduktase in den Chloroplasten unterbindet. Bei Lichteinstrahlung werden dabei Elektronen auf das Paraquat-Kation übertragen, das dadurch zum Paraquat-Radikal reduziert wird und durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff die Bildung von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid induziert.

#### **3.4.1. Vergleichende Untersuchung der Paraquat-Sensitivität**

Um die Anfälligkeit beider Linien gegenüber Paraquat zu testen, wurden zunächst Samen von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien oberflächensterilisiert und auf MS-Medium mit unterschiedlichen Paraquat-Konzentrationen ausgesät. Anschließend wurde die Keimung bzw. das Wachstum beider Linien über einen Zeitraum von sechs Tagen nach der Aussaat verglichen und photographisch dokumentiert (Abb. 20).



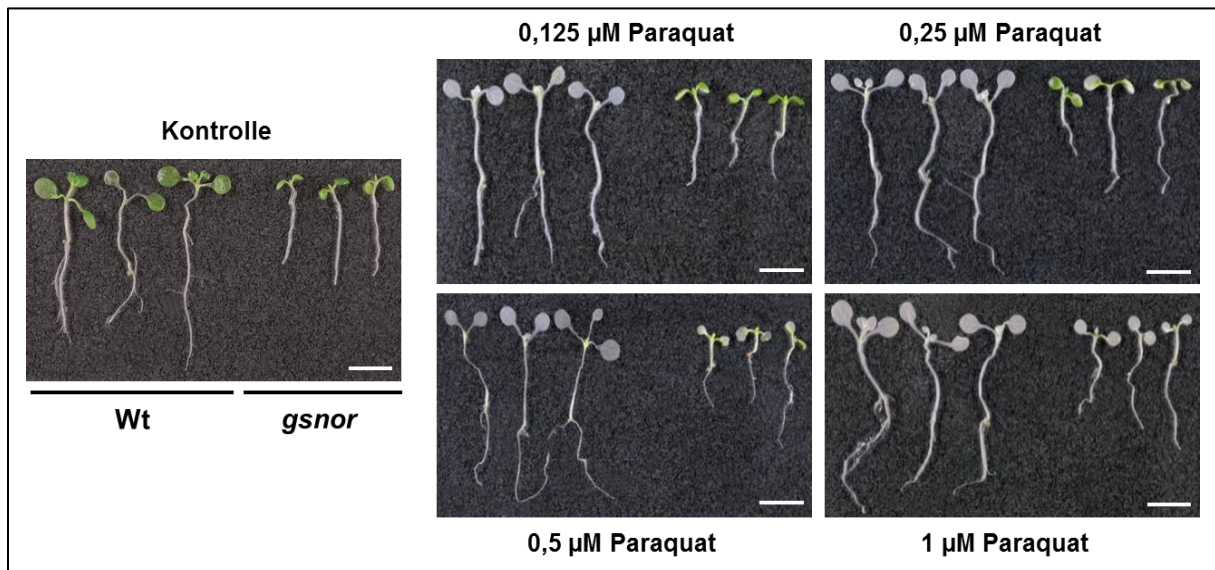
**Abb. 20: Vergleich der Keimung in Gegenwart von Paraquat**

Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien wurden unter sterilen Bedingungen in Gegenwart von unterschiedlichen Paraquat-Dosierungen angezogen und die Entwicklung beider Linien nach sechs Tagen dokumentiert.

In diesem Fall konnte bei Wildtyp-Pflanzen bereits bei der niedrigsten Paraquat-Konzentration eine massive Beeinträchtigung sowohl bei der Keimung als auch beim Wachstum beobachtet werden, während der Keimungsprozess bei den höheren Dosierungsstufen vollständig inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu war bei *gsnor* Insertionslinien eine konzentrationsabhängige Hemmung der Pflanzenentwicklung zu beobachten, wobei eine mindestens 10-fach höhere Toleranzschwelle im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden konnte. Eine geringere Sensitivität hinsichtlich der Keimung auf Paraquat-haltigem Medium konnte dabei nicht nur bei *gsnor* Insertionslinien des Ökotyps Wassilewskija, sondern auch bei der entsprechenden Knock-out Linie des Ökotyps Columbia-0 entdeckt werden (siehe Anhang Abb. 5).

Aufgrund der Tatsache, dass *gsnor* Knock-out Linien eine deutliche Beeinträchtigung der gesamten Wurzelentwicklung zeigten, könnte der Paraquat-tolerante Phänotyp möglicherweise auf eine reduzierte Aufnahme des Herbizids im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zurückzuführen sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im nächsten Versuch verschiedene

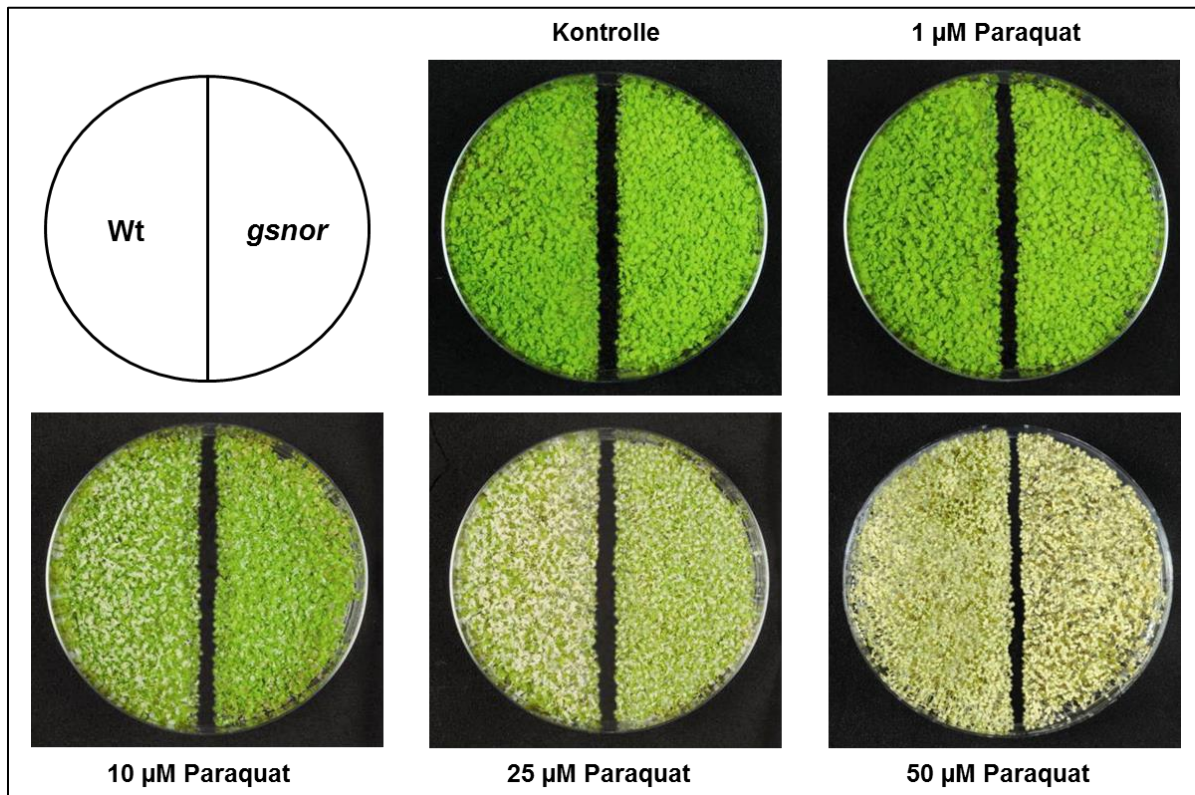
Paraquat-Konzentrationen mit Hilfe einer Vakuumpumpe direkt in sechs Tage alte Keimlinge beider Linien infiltriert und das Schadausmaß nach 24 h Belichtung dokumentiert (Abb. 21)



**Abb. 21: Vergleich der Schadwirkung nach Vakuuminfiltration von Paraquat**

Dargestellt sind sechs Tage alte Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien, die unter Sterilbedingungen angezogen und mit unterschiedlichen Paraquat-Konzentrationen vakuuminfiltriert wurden. Nach 24 h Belichtungsdauer wurde das Ausmaß des Schadpotentials photographisch dokumentiert (Teilstrich 0,5 cm). Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

Auch bei dieser Behandlungsmethode konnte eine höhere Sensitivität bei Wildtyp-Pflanzen detektiert werden, welche durch ein charakteristisches Ausbleichen des photosynthetisch aktiven Gewebes bei allen verwendeten Dosierungsstufen gekennzeichnet war. Bei Keimlingen der *gsnor* Insertionslinie konnte dieser Phänotyp hingegen erst bei deutlich höheren Konzentrationen beobachtet werden. Interessanterweise stellte sich allerdings nach Sprühapplikation von verschiedenen Paraquat-Konzentrationen heraus, dass die Unterschiede in der Herbizidsensitivität zwischen beiden Linien deutlich geringer ausfielen im Vergleich zu den beiden Behandlungen zuvor. Für diese Anwendung wurden verschiedene Dosierungsstufen mit Hilfe einer Sprühdose als feiner Sprühnebel auf zehn Tage alte Keimlinge ausgebracht, die unter Sterilbedingungen angezogen wurden, und die Schadwirkung nach 48 h Belichtungsdauer erfasst (Abb. 22). Bei *gsnor* Knock-out Linien war zwar sowohl bei 10 µM als auch bei 25 µM Paraquatlösung ungeachtet der einsetzenden Ausbleichung eine geringere Symptomausprägung erkennbar, was aber nur noch in einer maximal 2-fach höheren Toleranzschwelle im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen resultierte. Die Variationen hinsichtlich der unterschiedlichen Ausprägung des Paraquat-toleranten Phänotyps der *gsnor* Insertionslinie könnten womöglich mit einer effektiveren Detoxifizierung des Herbizids während der Aufnahme und dem Transport zum Wirkort zu erklären sein, was in den nachfolgenden Versuchen näher untersucht wurde.



**Abb. 22: Vergleich der Schadwirkung nach Sprühapplikation von Paraquat**

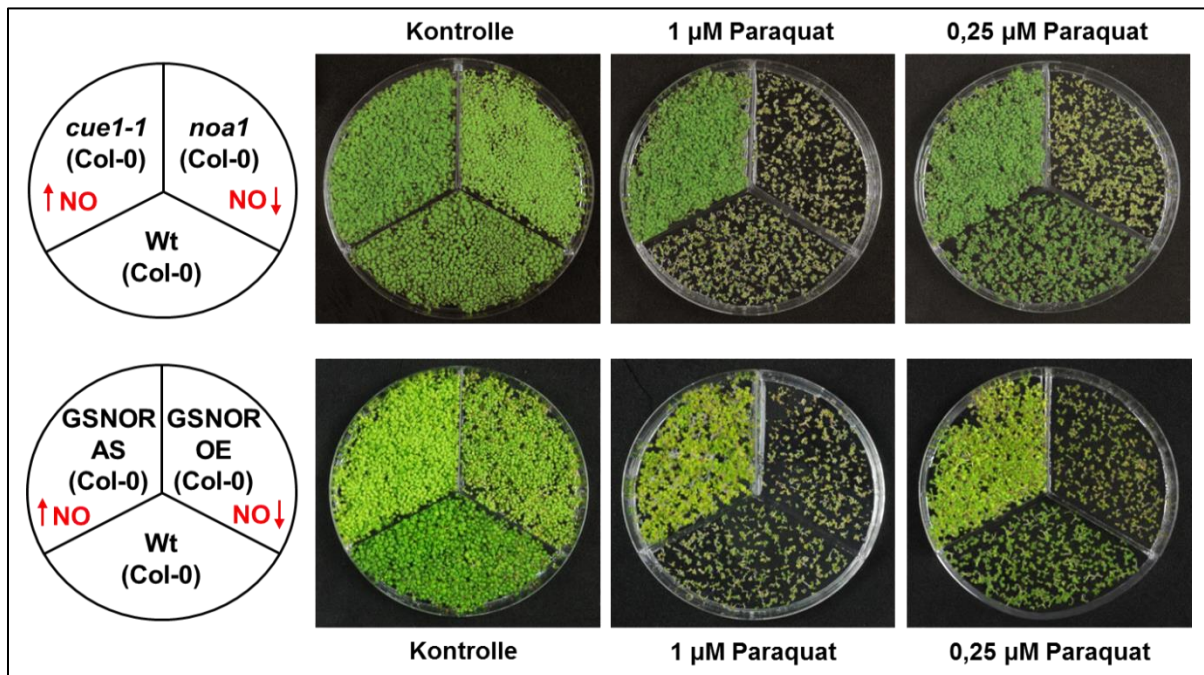
Zehn Tage alte Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien wurden unter Sterilbedingungen angezogen und mit unterschiedlichen Paraquat-Konzentrationen besprüht. Nach 48 h Belichtungsdauer wurde das Ausmaß des Schadpotentials photographisch dokumentiert. Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

### 3.4.2. Einfluss reduzierter und erhöhter NO-Gehalte auf Paraquattoleranz

Um zu überprüfen, ob der Paraquat-tolerante Phänotyp der *gsnor* Knock-out Linie auf die Veränderung der NO-Homöostase in diesen Pflanzen zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt die Auswirkung von endogener und exogener Modifikation des NO-Gehaltes auf die Paraquat-Sensitivität analysiert.

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Pflanzenlinien, die ebenfalls durch genetische Manipulationen in ihrem NO-Metabolismus beeinträchtigt sind, in Keimungsversuchen mit verschiedenen Paraquat-Konzentrationen analog der Vorgehensweise in Kapitel 3.4.1 getestet (Abb. 23). Dabei handelte es sich einerseits um Pflanzen, die in der Literatur bereits im Zusammenhang mit einem erhöhten NO-Gehalt beschrieben wurden und somit eine vergleichbare Referenz zu *gsnor* Insertionslinien darstellen. Hierfür wurde neben einer Antisense-Linie mit reduzierter GSNO-Reduktase-Aktivität (Achkor et al., 2003) zusätzlich eine *cue1*-Mutante (*underexpressed chlorophyll a/b binding protein*) verwendet,

bei der das Gen, welches für den Phosphoenolpyruvat-Phosphat-Translokator der inneren plastidären Hüllmembran codiert, durch T-DNA Insertion inaktiviert wurde (He et al., 2004).



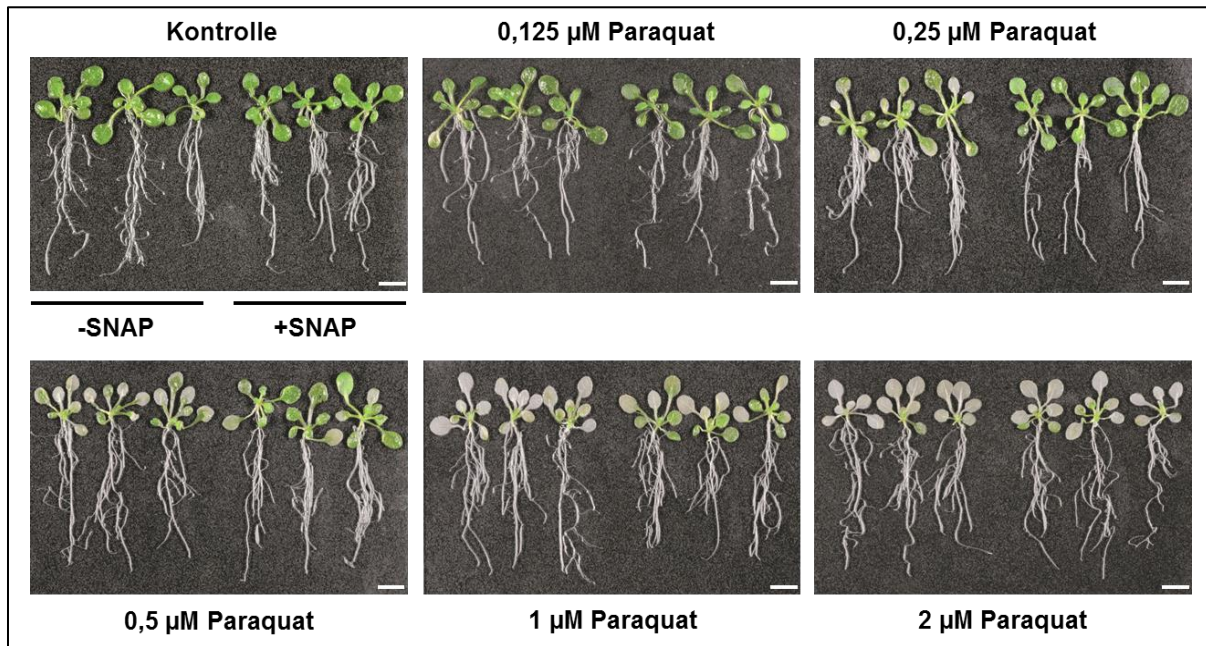
**Abb. 23: Keimungsanalyse verschiedener NO-Mutanten in Gegenwart von Paraquat**

Samen des Ökotyps Columbia-0 von Wildtyp-Pflanzen und Linien mit manipulierter NO-Homöostase wurden analog des vorgegebenen Schemas unter sterilen Bedingungen in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  und 0,25  $\mu\text{M}$  Paraquat kultiviert bzw. das Wachstum nach sechs Tagen dokumentiert. Pflanzen mit einem erhöhten NO-Gehalt sind mit einem roten nach oben gerichteten Pfeil gekennzeichnet, während ein nach unten gerichteter Pfeil eine geringere NO-Konzentration symbolisiert. Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

Um zusätzlich das Toleranzverhalten gegenüber Paraquat bei Pflanzen mit niedrigerem NO-Gehalt zu untersuchen, wurde sowohl eine Überexpressionslinie mit erhöhter GSNO-Reduktase-Aktivität (Achkor et al., 2003) als auch eine *noa*-Mutante (*nitric oxide associated protein*) ausgewählt, die eine eingeschränkte plastidäre GTPase-Funktion aufweist und hinsichtlich des Ribosomen-Aufbaus beeinträchtigt ist (Moreau et al., 2008). Bei vergleichender Betrachtung des Wachstums auf Paraquat-haltigem Medium konnte festgestellt werden, dass beide Pflanzen mit einem höheren endogenen NO-Gehalt eine deutlich geringere Herbizid-Sensitivität zeigten. Darüber hinaus scheinen Pflanzen mit reduziertem NO-Gehalt bei der niedrigsten Konzentrationsstufe eine geringfügig höhere Anfälligkeit gegenüber Paraquat aufzuweisen als Wildtyp-Pflanzen.

In Anbetracht der Tatsache, dass NO offenbar eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Ausprägung eines Paraquat-toleranten Phänotyps spielt, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob auch durch eine artifizielle Steigerung des NO-Gehalts eine geringere Sensitivität gegenüber Paraquat in Wildtyp-Pflanzen induziert werden kann. Für diesen Versuch wurden zehn Tage alte Keimlinge, die unter Sterilbedingungen angezogen wurden, im Abstand von

5 h zweimal mit 500  $\mu\text{M}$  des NO-Donors SNAP besprüht und anschließend verschiedene Paraquat-Konzentrationen vakuumfiltriert. Nach 24 h Belichtungszeit konnte auch in diesem Fall eine höhere Toleranzschwelle der mit SNAP vorbehandelten Keimlinge im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen beobachtet werden (Abb. 24). Vor allem bei den Dosierungsstufen 0,25  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  Paraquat war ein deutlich geringeres Ausmaß im Hinblick auf das Ausbleichen des photosynthetisch aktiven Gewebes sichtbar.



**Abb. 24: Vergleich der Schadwirkung nach Vorbehandlung mit NO-Donor SNAP**

Dargestellt sind zehn Tage alte Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen, die ohne Vorbehandlung (linke Seite) bzw. nach Vorbehandlung mit 500  $\mu\text{M}$  SNAP (rechte Seite) mit unterschiedlichen Paraquat-Konzentrationen vakuumfiltriert wurden. Nach 24 h Belichtungsdauer wurde das Ausmaß des Schadpotentials photographisch dokumentiert (Teilstrich 1 cm). Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

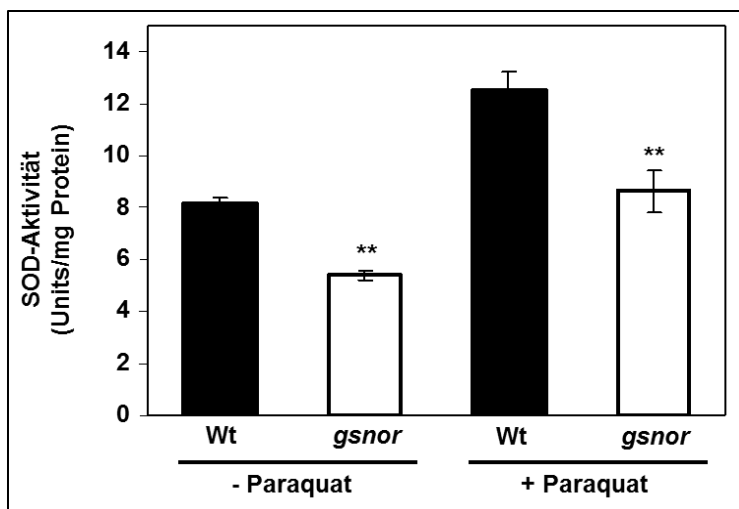
Um einen Einblick in den Mechanismus zu erhalten, inwieweit NO die Toleranz gegenüber Paraquat auf molekularer Ebene positiv beeinflussen kann, wurde in den folgenden Experimenten das antioxidative Potential von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien vor und nach Herbizid-Behandlung genauer charakterisiert.

### 3.4.3. Auswirkung von Paraquat auf SOD-Aktivität und Superoxid-Akkumulation

Der Effekt von Paraquat auf Veränderungen des antioxidativen Systems erfolgte zunächst durch Bestimmung der Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen (SOD). Diese Proteinklasse ist in der Lage die durch Paraquat induzierte Bildung von Superoxidradikalen auf enzymatischem Weg zu Wasserstoffperoxid umzusetzen. Als Ausgangsmaterial wurden 14 Tage alte Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien, die auf MS-Medium mit und ohne



0,5  $\mu\text{M}$  Paraquat kultiviert wurden, verwendet. Die anschließende Quantifizierung erfolgte indirekt durch Hemmung der Cytochrom C-Reduktion, was spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt werden konnte. Erstaunlicherweise konnte bei *gsnor* Knock-out Linien bereits unter normalen, ungestressten Bedingungen eine um etwa 25% reduzierte SOD-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen gemessen werden. Unter Paraquateinfluss nahm die SOD-Aktivität in beiden Linien hingegen um ca. 50% zu, verblieb im Falle der Mutanten jedoch auf einem signifikant niedrigeren Niveau (Abb. 25).

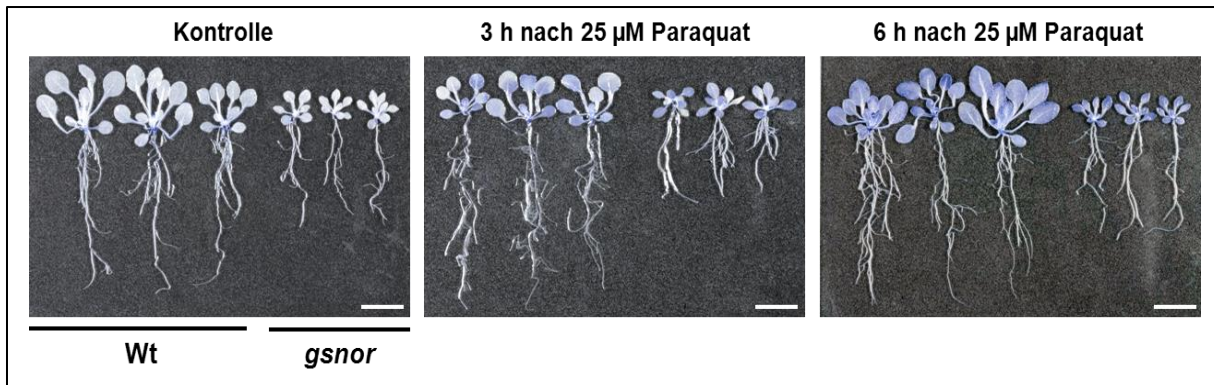


**Abb. 25: Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen**

Pflanzen beider Linien wurden auf MS-Medium ohne bzw. mit 0,5  $\mu\text{M}$  Paraquat angezogen. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurden die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten verwendet, in Unit umgerechnet und auf den Proteingehalt der Proben bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

Eine detaillierte Betrachtung von Superoxid-Dismutasen in Bezug auf die Regulation einzelner Isoformen bzw. ein möglicher Erklärungsansatz für die geringere enzymatische Gesamtaktivität in *gsnor* Insertionslinien wird in Kapitel 3.5 dargestellt.

Um das Ergebnis des Aktivitätstests zu verifizieren, wurde die Akkumulation von Superoxidradikalen nach Sprühapplikation von 25  $\mu\text{M}$  Paraquat in zehn Tage alten Keimlingen verglichen. Der histochemische Nachweis erfolgte mit Hilfe von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), das in Anwesenheit von Superoxid zu einem blauen Farbstoff reduziert wird. Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, konnte in beiden Linien unter Kontrollbedingungen keine Färbung festgestellt werden, während 3 h bzw. vor allem 6 h nach Paraquat-Behandlung eine deutliche Blaufärbung innerhalb des Blattgewebes nachgewiesen werden konnte. Makroskopisch betrachtet waren allerdings keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Blaufärbung zwischen Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien zu beobachten. Angesichts einer eingeschränkten SOD-Aktivität scheinen *gsnor* Insertionslinien in der Lage zu sein, die Paraquat-induzierte Anreicherung von Superoxidradikalen auf eine andere Art und Weise zu kompensieren.

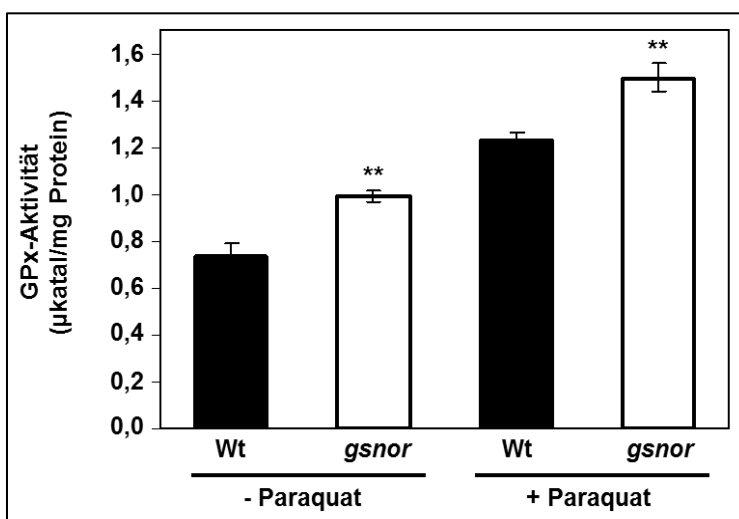


**Abb. 26: Superoxid-Akkumulation nach Sprühapplikation von Paraquat**

Dargestellt sind zehn Tage alte Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien, die unter Sterilbedingungen angezogen und mit 25 µM Paraquatlösung besprüht wurden. Jeweils 3 h und 6 h nach der Behandlung wurden die Keimlinge mit NBT-Lösung vakuumfiltriert und die Färbung nach Chlorophyll-Entfernung photographisch dokumentiert (Teilstrich 1 cm). Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 10 Keimlinge verwendet. Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

### 3.4.4. Einfluss von Paraquat auf den Glutathiongehalt und die Aktivität Glutathion-abhängiger Enzyme

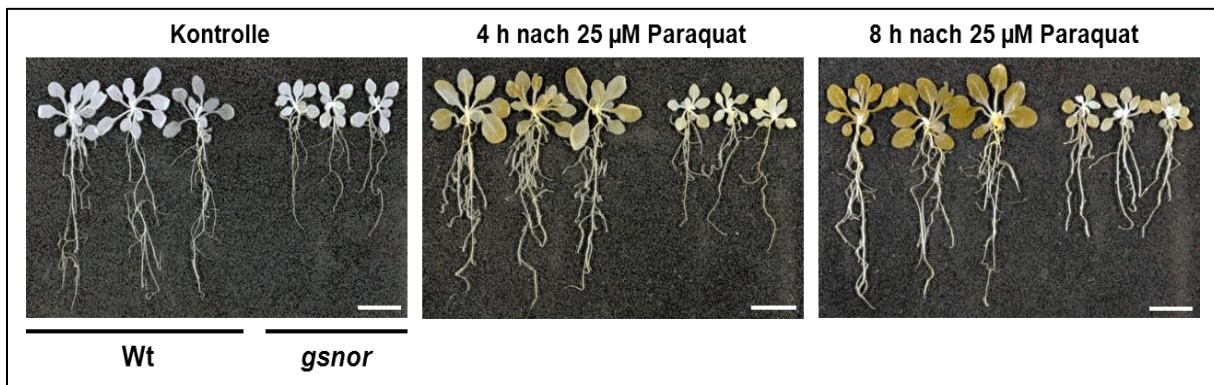
Da Superoxidradikale auch spontan zu Wasserstoffperoxid dismutieren können und diese Spezies aufgrund ihrer Stabilität bzw. ihrer Fähigkeit der Membrandiffusion eine zellschädigendere Wirkung besitzen, wurde im nächsten Schritt die Detoxifizierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O durch Glutathion-Peroxidasen (GPx) analysiert. Analog der Versuchsbeschreibung in Kapitel 3.4.3 wurde die Enzymaktivität in beiden Linien, die auf Medium mit und ohne Paraquat aufgezogen wurden, indirekt durch Messung der Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm im Spektrophotometer quantifiziert (Abb. 27).



**Abb. 27: Aktivität von Glutathion-Peroxidase**

Pflanzen beider Linien wurden auf MS-Medium ohne bzw. mit 0,5 µM Paraquat angezogen. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurden die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten verwendet, in Katal umgerechnet und auf den Proteingehalt der Proben bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert ≤0,01 mit \*\* gekennzeichnet.

Dabei konnte unter normalen Bedingungen eine etwa 25% höhere Aktivität von Glutathion-Peroxidase in *gsnor* Knock-out Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden. Nach Wachstum auf Paraquat-haltigem Medium wurde in beiden Linien eine Zunahme der Aktivität um ca. 50% gemessen, wobei die Mutante nach wie vor einen signifikant höheren Wert erzielte. In Analogie zur Superoxid-Akkumulation wurde ebenfalls die Bildung von Wasserstoffperoxid nach Sprühapplikation von 25  $\mu$ M Paraquat in beiden Linien verglichen. Der Nachweis erfolgte hierbei mit Diaminobenzidin (DAB), das durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidasen polymerisiert und als braunes Präzipitat ausfällt. In diesem Fall war sowohl 4 h als auch 8 h nach der Paraquatbehandlung eine deutlich geringere Braunfärbung bei den Keimlingen der *gsnor* Insertionslinie zu beobachten (Abb. 28).



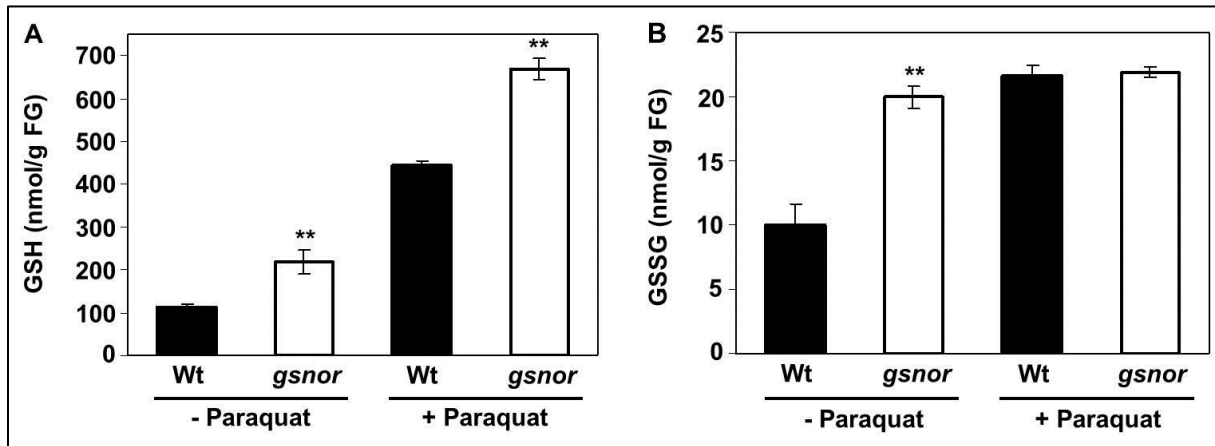
**Abb. 28: Wasserstoffperoxid-Akkumulation nach Sprühapplikation von Paraquat**

Dargestellt sind zehn Tage alte Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien, die unter Sterilbedingungen angezogen und mit 25  $\mu$ M Paraquatlösung besprüht wurden. Jeweils 4 h und 8 h nach der Behandlung wurden die Keimlinge mit DAB-Lösung vakuumfiltriert und die Färbung nach Chlorophyll-Entfernung photographisch dokumentiert (Teilstrich 1 cm). Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 10 Keimlinge verwendet. Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

Interessanterweise konnte zudem ein deutlicher Unterschied des Gesamtglutathion-Gehaltes in beiden Linien ermittelt werden. Glutathion fungiert in der Zelle als Antioxidans und trägt sowohl als Kosubstrat für Enzymreaktionen (z.B. für Glutathion-Peroxidase) als auch durch Reaktion mit Radikalen (z.B. mit Superoxidanionen) zur Stressabwehr bei.

Die Bestimmung des Glutathion-Gehaltes (Abb. 29A) und Glutathiondisulfid-Gehaltes (Abb. 29B) in Keimlingen, die auf Medium mit und ohne Paraquat aufgezogen wurden, erfolgte durch photometrische Messung der DTNB-Oxidation bei einer Wellenlänge von 412 nm. Bei dieser Messung konnten im ungestressten Zustand mehr als doppelt so hohe Glutathion-Werte in *gsnor* Insertionslinien als in Wildtyp-Pflanzen detektiert werden. In Gegenwart von Paraquat war zudem ein gravierender Anstieg der Glutathion-Konzentration in beiden Linien

zu verzeichnen, wobei Wildtyp-Pflanzen eine vierfach höhere Anreicherung bzw. *gsnor* Knock-out Linien eine dreifache Akkumulation im Vergleich zum Grundzustand aufwiesen.

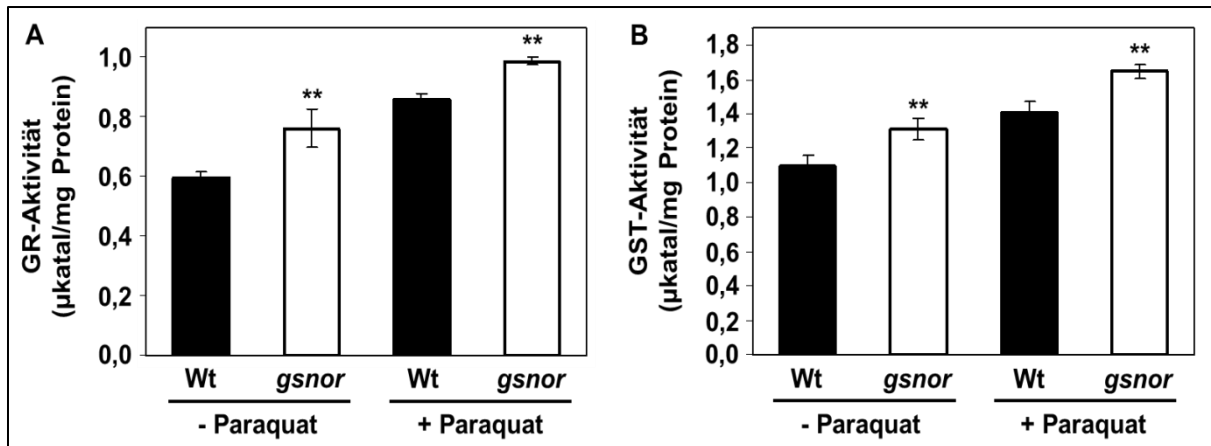


**Abb. 29: Bestimmung des Glutathion-Gehaltes**

Pflanzen beider Linien wurden auf MS-Medium ohne bzw. mit 0,5  $\mu$ M Paraquat angezogen. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsno1* Knock-out Linien. Für die Berechnung des Glutathion-Gehaltes (A) bzw. des Glutathiondisulfid-Gehaltes (B) wurden die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten verwendet und auf das Frischgewicht der Probe bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

Im Gegensatz dazu wurden bei der Bestimmung der Glutathiondisulfid-Konzentration in beiden Linien deutlich niedrigere Werte gemessen, die unter normalen Bedingungen etwa 10% des Glutathion-Gehaltes betragen. Unter Paraquateinfluss konnte allerdings eine höhere Akkumulation von oxidiertem Glutathion bei Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden, obwohl der prozentuale Anteil beider Linien im Vergleich zum reduzierten Glutathion abnahm. Um zu überprüfen, ob diese Verschiebung des Redoxzustandes möglicherweise auf eine langsamere Umsetzung von Glutathiondisulfid zu Glutathion in Wildtyp-Pflanzen zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die enzymatische Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) in beiden Linien bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls ausgehend von unbehandeltem bzw. Paraquat-behandeltem Pflanzenmaterial indirekt durch photometrische Messung des NADPH-Verbrauchs, was bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden konnte.

Wie Abb. 30A zu entnehmen ist, war auch bei dieser Messreihe im Grundzustand eine signifikante Erhöhung der Glutathion-Reduktase-Aktivität um ca. 20% bei *gsno1* Knock-out Linien zu verzeichnen. Dieser Unterschied zu Wildtyp-Pflanzen war auch nach Wachstum auf Paraquat-haltigem Medium bei den Mutanten feststellbar, wobei in beiden Linien eine vergleichbare Zunahme der Enzymaktivität um etwa 20% beobachtet wurde.



**Abb. 30: Aktivität von Glutathion-Reduktase und Glutathion S-Transferase**

Pflanzen beider Linien wurden auf MS-Medium ohne bzw. mit 0,5 µM Paraquat angezogen. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Für die Berechnung der Enzymaktivitäten wurden jeweils die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten verwendet, in die Einheit Katal umgerechnet und auf den Proteingehalt der jeweiligen Proben bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

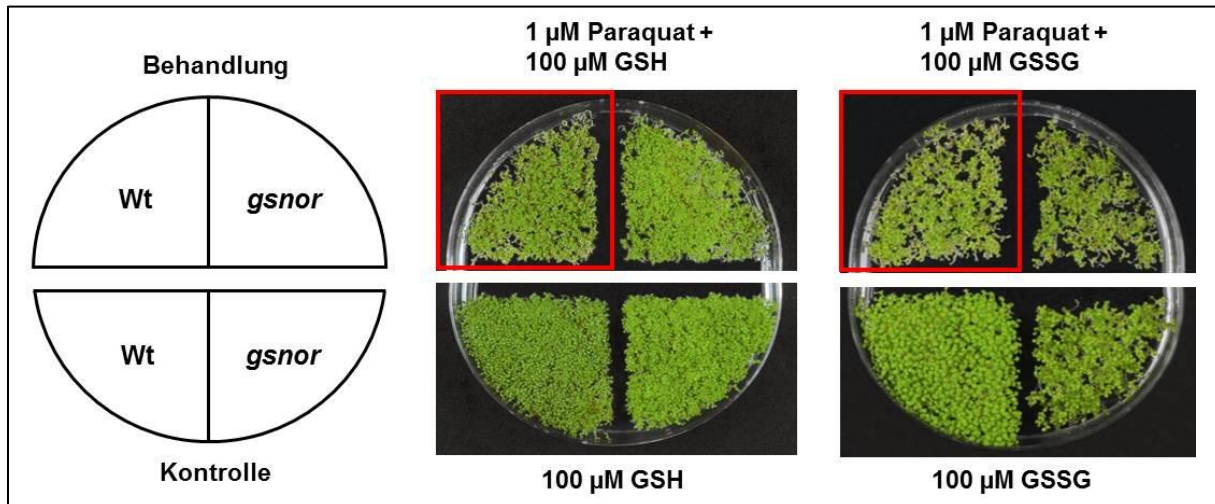
Aufgrund der Tatsache, dass Glutathion nicht nur als Kosubstrat für die Glutathion-Peroxidase-Reaktion, sondern auch für die Detoxifizierung von Xenobiotika essentiell ist, wurde zusätzlich die Gesamtaktivität von Glutathion S-Transferasen (GST) in beiden Linien bestimmt. GSTs sind in der Lage eine Vielzahl von Herbiziden durch Konjugation mit Glutathion zu entgiften, wobei der reaktionslimitierende Faktor die Verfügbarkeit von Glutathion darstellt. Für die Quantifizierung wurde das artifizielle Substrat CDNB eingesetzt und das resultierende Glutathion-CDNB-Konjugat direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen. Auch bei dieser Messung konnte die gleiche Tendenz wie bei der Aktivitätsbestimmung von Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase identifiziert werden, wenngleich die Unterschiede zwischen *gsnor* Insertionslinien und Wildtyp-Pflanzen zwar signifikant waren, aber deutlich geringer ausfielen gegenüber den anderen Enzymtests (Abb. 30B).

### 3.4.5. Auswirkung reduzierter und erhöhter Glutathion-Gehalte auf Paraquattoleranz

Um der Frage nachzugehen, ob möglicherweise der konstitutiv erhöhte Glutathion-Gehalt und damit indirekt die gesteigerte Aktivität Glutathion-abhängiger Enzyme für den Paraquat-toleranten Pänotyp von *gsnor* Insertionslinien verantwortlich ist, wurden anschließend die Folgen von endogener und exogener Veränderung der Glutathion-Konzentration im Hinblick auf die Paraquat-Sensitivität untersucht.

In diesem Zusammenhang sollte zunächst getestet werden, ob durch eine artifizielle Erhöhung des Glutathion-Gehaltes ebenfalls eine Zunahme der Herbizidtoleranz in Wildtyp-Pflanzen erzielt werden kann. Hierfür wurden Samen beider Linien auf Paraquat-haltigem

Medium ausgesät, welches zusätzlich 100  $\mu\text{M}$  Glutathion bzw. 100  $\mu\text{M}$  Glutathiondisulfid enthielt und die Entwicklung der Pflanzen nach sechs Tagen photographisch dokumentiert (Abb. 31). Erstaunlicherweise konnte sowohl nach GSH- als auch nach GSSG-Zugabe ein Wachstum von Wildtyp-Pflanzen unter Paraquateinfluss beobachtet werden, während bei *gsnor* Knock-out Linien hingegen kein zusätzlicher Effekt zu verzeichnen war.



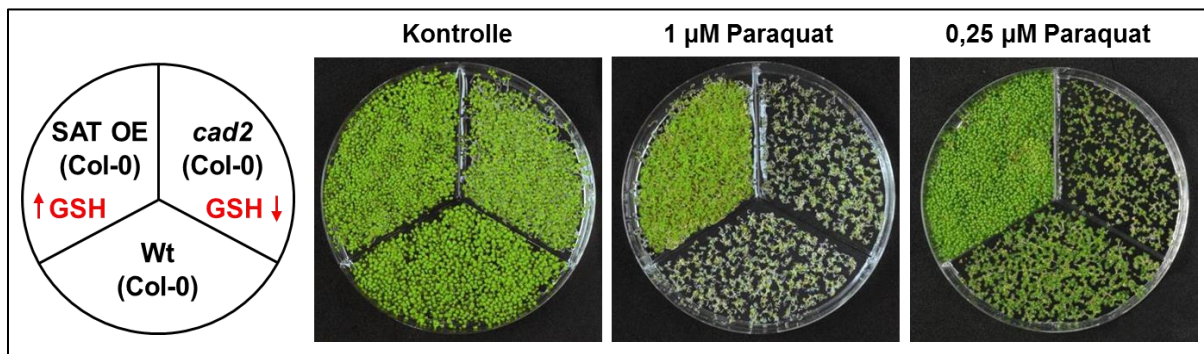
**Abb. 31: Keimungsvergleich auf Paraquat-haltigem Medium in Gegenwart von Glutathion**

In den Abbildungen der oberen Bildhälfte wurden Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Paraquat angezogen und die Pflanzenentwicklung sechs Tage nach der Aussaat dokumentiert. Rot markierte Bereiche kennzeichnen das Wachstum von Wt-Pflanzen in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  GSH bzw. 100  $\mu\text{M}$  GSSG. In der unteren Bildhälfte ist die Entwicklung beider Linien nach Kontrollbehandlung dargestellt, wobei das Medium an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser versetzt wurde.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp nicht auf eine Immobilisierung von Paraquat durch Wechselwirkung mit GSH bzw. GSSG zurückzuführen ist, wurden im nächsten Versuch zwei verschiedene Pflanzenlinien, die ebenfalls durch genetische Manipulationen in ihrem Glutathion-Metabolismus beeinträchtigt sind, in Keimungsversuchen mit verschiedenen Paraquat-Konzentrationen getestet. Dabei handelte es sich einerseits um eine Überexpressionslinie, bei der durch verstärkte Produktion des Serinacetyl-Transferase (SAT)-Proteins eine Steigerung der Cystein-Synthese erzielt wird, was in einem zweifachen Anstieg des Glutathion-Gehaltes resultiert (Freeman et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde zudem die *cad2*-Mutante (*cadmium sensitive mutant*) mit einem um ca. 30% reduzierten Glutathion-Gehalt verwendet, bei der das Gen, welches für die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und damit den ersten Schritt der Glutathion-Biosynthese codiert, inaktiviert wurde (Howden et al., 1995).

Bei Beobachtung der Pflanzenentwicklung in Gegenwart von Paraquat konnte festgestellt werden, dass die SAT-Überexpressionslinie mit einem gesteigerten endogenen Glutathion-Gehalt eine deutlich höhere Toleranzschwelle gegenüber dem Herbizid zeigte (Abb. 32).

Darüber hinaus scheinen Pflanzen mit reduziertem Glutathion-Gehalt bei der niedrigsten Konzentrationsstufe einen etwas anfälligeren Phänotyp zu besitzen als Wildtyp-Pflanzen.

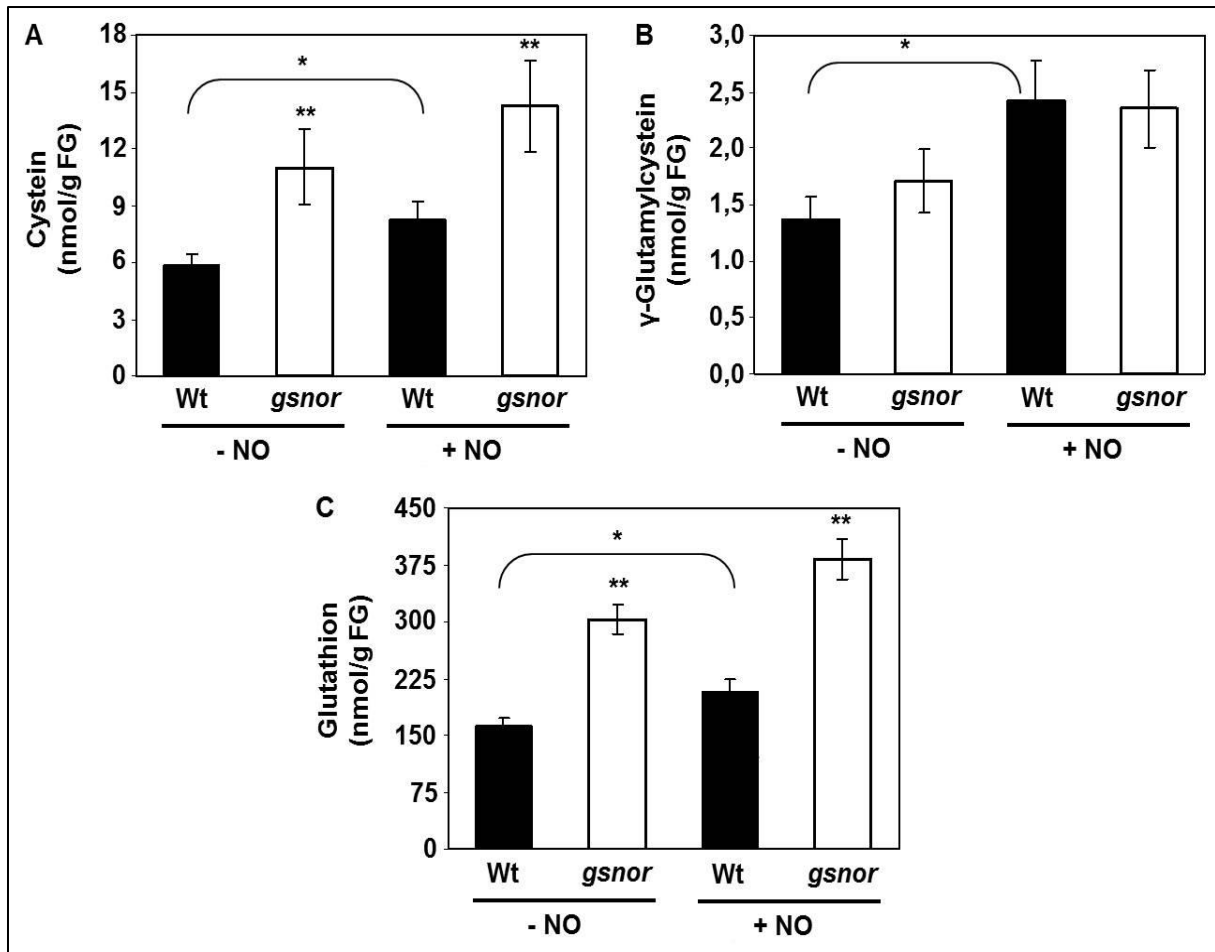


**Abb. 32: Keimungsanalyse verschiedener GSH-Mutanten in Gegenwart von Paraquat**

Samen des Ökotyps Columbia-0 von Wildtyp-Pflanzen und Linien mit manipulierter GSH-Homöostase wurden analog des vorgegebenen Schemas unter sterilen Bedingungen in Gegenwart von 1 µM und 0,25 µM Paraquat kultiviert bzw. das Wachstum nach sechs Tagen dokumentiert. Pflanzen mit einem erhöhten GSH-Gehalt sind mit einem roten, nach oben gerichteten Pfeil gekennzeichnet, während ein nach unten gerichteter Pfeil eine geringere GSH-Konzentration symbolisiert. Die Kontrollbehandlung wurde an Stelle der Paraquatlösung mit Wasser durchgeführt.

### 3.4.6. Einfluss von NO-Begasung auf die Glutathion-Biosynthese

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint neben NO vor allem Glutathion eine wichtige Funktion in Bezug auf Paraquattoleranz einzunehmen. Da beide Komponenten in höheren Mengen in *gsnor* Insertionslinien nachgewiesen wurden und darüber hinaus auch miteinander interagieren können, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob ein Anstieg der intrazellulären NO-Konzentration Auswirkungen auf die Glutathion-Biosynthese hat. Für diesen Versuch wurden die thiolhaltigen Ausgangs- und Zwischenprodukte des Glutathion-Stoffwechsels in Blattmaterial von vier Wochen alten Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien vor und nach 20 minütiger Inkubation mit 80 ppm NO analysiert. Das Prinzip der Methode basiert auf einer Derivatisierung der in der Probe vorhandenen Thiole mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman. Die einzelnen Derivatisierungsprodukte können anschließend über RP-HPLC getrennt und quantifiziert werden. Bei der Glutathion-Bestimmung handelt es sich dabei um den Gesamtgehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion, da alle Thiolverbindungen im Rahmen der Probenaufarbeitung mit DTT reduziert wurden. In Abb. 33 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung einzelner Komponenten des Glutathion-Stoffwechsels, welche von Dr. Markus Wirtz an der Universität Heidelberg gemessen wurden, für beide Linien zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 33: Quantitative Analyse von Thiolverbindungen der Glutathionsynthese**

Vier Wochen alte Pflanzen beider Linien wurden ohne bzw. mit 80 ppm NO begast und der Gehalt an Cystein (A),  $\gamma$ -Glutamylcystein (B) und Glutathion (C) pro g Frischgewicht bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit jeweils drei bis vier Pflanzen von jeder Linie, wobei jede Pflanze als ein biologisches Replikat gewertet wurde. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Signifikante Unterschiede sind bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  mit \* bzw.  $p \leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

Die Begasung der Pflanzen mit NO führte in beiden Linien zu einem signifikanten Anstieg aller gemessenen Thiolverbindungen des Glutathion-Stoffwechsels, wobei die Zunahmeraten, außer im Falle von  $\gamma$ -Glutamylcystein, in *gsnor* Insertionslinien höher ausfielen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Darüber hinaus konnten bereits in unbehandelten Pflanzenproben annähernd doppelt so hohe Werte hinsichtlich der Cystein-Konzentration sowie des Gesamtglutathion-Gehaltes in den Mutanten gemessen werden, was im letzteren Fall mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.4 (Abb. 29) übereinstimmte.

Zusammenfassend betrachtet lässt sich somit die Aussage formulieren, dass eine Erhöhung des Glutathion-Gehaltes und die damit verbundene Aktivierung Glutathion-abhängiger Enzyme primär für die Paraquattoleranz in *gsnor* Insertionslinien verantwortlich ist. NO scheint dabei indirekt über die Regulation des Glutathion-Stoffwechsels einen positiven



Einfluss auf die Herbizidtoleranz auszuüben, da nach Begasungsexperimenten eine erhöhte Synthese von Ausgangs- bzw. Zwischenprodukten des Glutathion-Stoffwechsels in beiden Pflanzenlinien beobachtet werden konnte. Erstaunlicherweise war hingegen die Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen in *gsnor* Knock-Linien sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach Stressbehandlung erheblich reduziert im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Um herauszufinden, ob diese Aktivitätsreduktion möglicherweise mit dem erhöhten NO-Gehalt in diesen Linien in Verbindung steht, wurde im folgenden Kapitel der Effekt von NO auf die *in-vitro* Regulation verschiedener Superoxid-Dismutase Isoformen genauer analysiert.

### **3.5. *In-vitro* Regulation der Aktivität von Superoxid-Dismutasen durch NO**

Da bereits bekannt ist, dass NO die Aktivität antioxidativer Enzyme inhibieren und somit Einfluss auf die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies nehmen kann (Clark et al., 2000), sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob Superoxid-Dismutasen möglicherweise neue Kandidatenproteine für NO-abhängige posttranslationale Modifikationen darstellen. Diese Enzymklasse fungiert als erste Instanz des Abwehrsystems gegenüber oxidativen Stressbedingungen, da sie als Radikalfänger einen wichtigen Beitrag zur Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies leisten. In *Arabidopsis thaliana* sind insgesamt sieben Superoxid-Dismutasen bekannt, die sich anhand ihres Metall-Kofaktors und der zellulären Lokalisation in drei Gruppen einteilen lassen. Dabei handelt es sich um eine Mangan-, drei Eisen- und drei Kupfer/Zink Superoxid-Dismutasen.

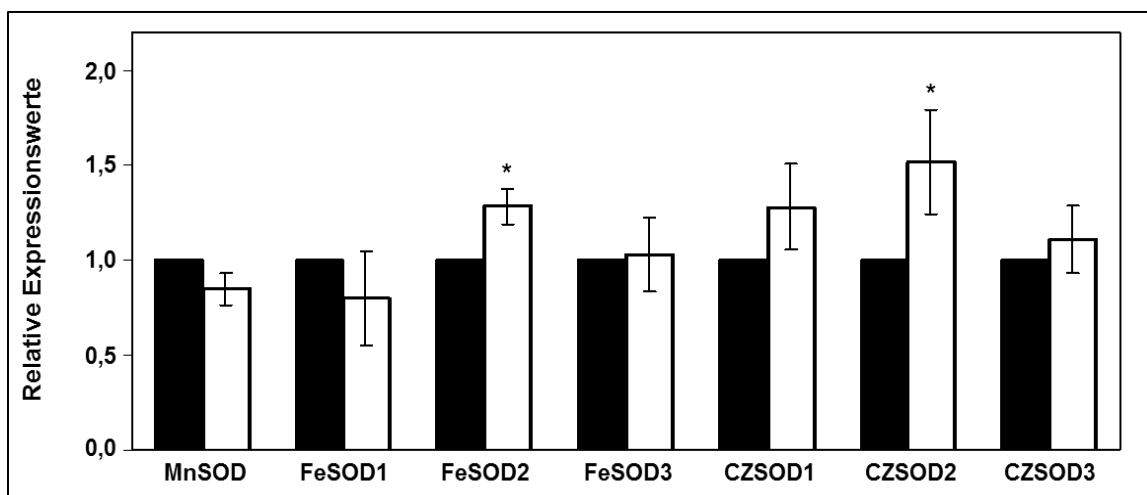
#### **3.5.1. Analyse der Genexpression von Superoxid-Dismutasen**

Um die Ergebnisse des SOD-Enzymtests von 14 Tage alten, unter Sterilbedingungen angezogenen Keimlingen zu bestätigen, wurde der Versuch mit vier Wochen alten, auf Erde kultivierten Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien analog der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Vorgehensweise wiederholt, wobei allerdings keine Paraquat-Behandlung stattfand. Unter diesen Bedingungen konnte ebenfalls die gleiche Tendenz wie im Keimlingsstadium beobachtet werden, wenngleich die Gesamtaktivität in beiden Pflanzenlinien etwas höher ausfiel (siehe Anhang Abb. 6).

Unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass die reduzierte Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen in *gsnor* Insertionslinien gegebenenfalls auf eine verminderte Genexpression einzelner Isoformen zurückzuführen sein kann, wurden zunächst potentielle Veränderungen der relativen Transkriptmengen in beiden Linien mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR)

ermittelt. Für die Analyse wurde RNA aus vier Wochen alten Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien isoliert und die Expression der Zielgene in Relation zu den beiden stabilen Referenzgenen Ubiquitin und S16 erfasst.

Wie der Abb. 34 zu entnehmen ist, konnte bei vier von sieben Genen eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge in *gsnor* Insertionslinien festgestellt werden, die im Falle der beiden Isoformen FeSOD2 und CZSOD2 als signifikant induziert bewertet wurde. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl MnSOD als auch FeSOD1 eine geringere Genexpression im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, während bei der Isoform FeSOD3 kein Unterschied detektiert werden konnte. Interessanterweise scheint die Gesamtexpression aller untersuchten Zielgene in den Mutanten sogar etwas höher auszufallen, wobei keine Rückschlüsse auf die Expressionstärke einzelner Isoformen gezogen werden kann. Diese Resultate verdeutlichen, dass die reduzierte SOD-Gesamtaktivität in *gsnor* Knock-out Linien nicht auf einer limitierten Transkriptakkumulation basiert, sondern einzelne Isoformen offenbar auf posttranskriptioneller oder posttranslationaler Ebene reguliert werden.



**Abb. 34: Analyse der Transkriptmengen von SOD-Isoformen mittels RT-qPCR**

Die Quantifizierung der Transkriptmengen von Superoxid-Dismutase Genen erfolgte ausgehend von isolierter RNA aus vier Wochen alten Pflanzen. Die Expressionsdaten der Referenzgene Ubiquitin und S16 wurde als Normalisierungsfaktor verwendet und die Ergebnisse in Relation zu den Werten von Wildtyp-Pflanzen dargestellt. Schwarze Balken repräsentieren Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien. Signifikante Unterschiede sind bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  mit \* gekennzeichnet. Werte für die Standardabweichungen basieren auf der Verwendung von drei biologischen und zwei technischen Wiederholungen jeder Probe.

### 3.5.2. Klonierung und rekombinante Expression von Superoxid-Dismutasen

Für die Analyse einer posttranslationalen Regulation von Superoxid-Dismutasen durch NO mussten die einzelnen Isoformen zunächst kloniert und heterolog produziert werden, bevor die gereinigten Proteine im Rahmen von *in-vitro* Studien getestet werden konnten. Für die Konstruktion von Expressionsplasmiden wurde das GATEWAY-System verwendet, das einen

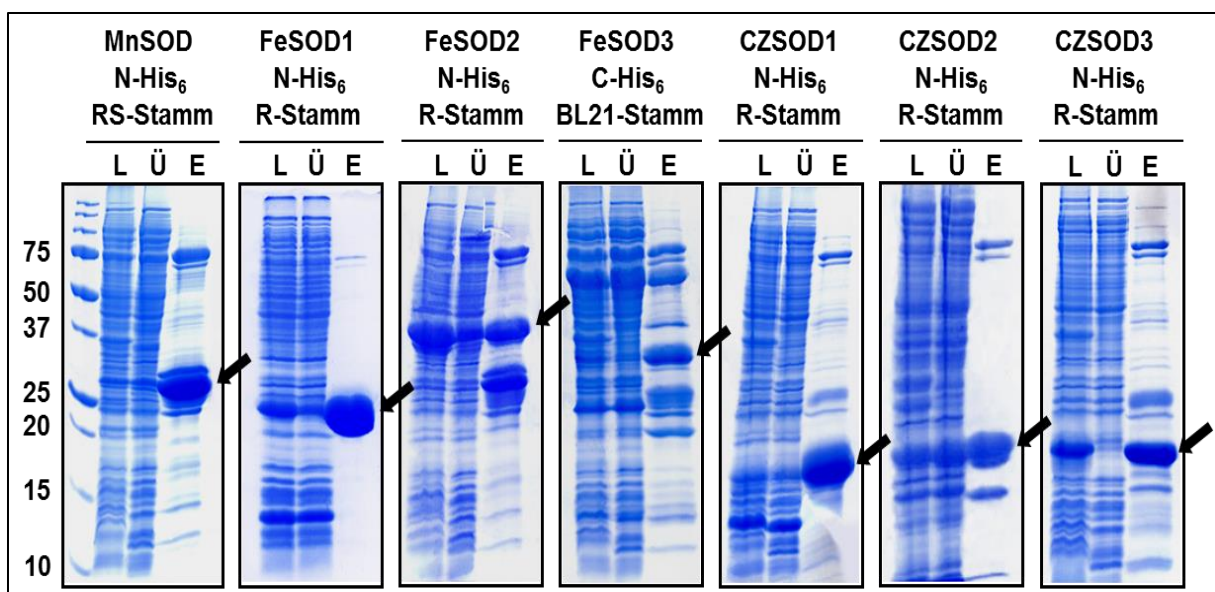
zielgerichteten Transfer von DNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Plasmiden erlaubt und auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$  basiert. Unter Beibehaltung der Orientierung und des Leserasters können DNA-Segmente mit Hilfe bestimmter Erkennungssequenzen (sog. attachment-sites) über homologe Rekombination zwischen GATEWAY-kompatiblen Vektoren beliebig transferiert werden.

Für die Klonierung wurden die einzelnen Sequenzen der Superoxid-Dismutasen jeweils mit und ohne Stopcodon vervielfältigt, um eine variable Produktion von C- und N-terminalen Fusionsproteinen zu gewährleisten. Im Sonderfall der CZSOD2 wurde die Sequenz am N-Terminus nach Überprüfung mit dem Programm TargetP zusätzlich um 180 Basenpaare verkürzt, da es sich hierbei um ein konserviertes Signalpeptid handelt, welches für die chloroplastidäre Lokalisation verantwortlich ist. Jede SOD-Isoform wurde anschließend in die beiden Expressionsvektoren pDEST17 mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid und pDEST42 mit C-terminalem Histidin-Hexapeptid überführt, wobei der Tag für die spätere Aufreinigung der produzierten Proteine benötigt wird. Die verschiedenen Plasmide wurden im nächsten Schritt vorerst einer Testexpression unterzogen und in die verschiedenen *E.coli*-Stämme BL21 sowie in zwei Varianten des Rosetta-Stamms (R und RS) transformiert. Auf diese Weise sollte für jedes Protein ein geeignetes bakterielles Produktionssystem ermittelt werden, das eine optimale Synthese hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit gewährleistet.

Im Genom aller drei Stämme ist ein DE3-Fragment des Bakteriophagen  $\lambda$  enthalten. Dieses Fragment codiert für eine T7 RNA-Polymerase, die unter Kontrolle eines induzierbaren lacUV5-Promotors steht und die Produktion des Fusionsproteins durch Anbindung an den T7-Promotor der Expressionsplasmide ermöglicht. Ein pLysS-Plasmid in Rosetta-Variante RS codiert zudem für ein T7-Lysozym, dessen Expression die Aktivität der T7 RNA-Polymerase inhibiert und somit eine basale Transkriptionsrate unterbindet. Beide Rosetta-Stämme tragen außerdem ein pRARE-Plasmid, welches spezifische tRNAs für in *E.coli* selten benötigte Codons bereitstellt und damit die Expression eukaryontischer Gene erleichtert. Der Vorteil des BL21-Stammes hingegen besteht darin, dass zusätzlich bestimmte bakterielle Chaperone hergestellt werden, die eine korrekte Faltung der produzierten Proteine unterstützen. Somit lässt sich die Ausbeute löslicher Proteine durch Verhinderung von Aggregatbildungen erhöhen. Nach dem Aufschluss und der Isolierung der rekombinanten Proteine wurden Probenaliquots der unterschiedlichen Reinigungsschritte für jedes produzierte Protein mittels SDS-PAGE auf die Anwesenheit der Zielproteine analysiert. Die Ergebnisse dieses Vorversuchs für die verschiedenen rekombinant hergestellten Superoxid-Dismutasen

inklusive den verwendeten Bakterienstämmen und der Position des Histidin-Tags ist im Anhang einzusehen (Anhang Abb. 7).

Um den Anteil der löslichen Proteinfraction zu steigern und eine ausreichende Proteinausbeute für spätere Enzymtests zu generieren, wurde das gesamte Produktionssystem im nächsten Schritt auf eine präparative Größenordnung ausgeweitet. Hierfür wurden, basierend auf den Ergebnissen der Testscreenings die Bakterienstämme ausgewählt, welche für jedes Protein das beste Expressionsresultat lieferten und die Kulturen in einen zwei Liter Maßstab angezogen. Durch die Volumenerhöhung konnte eine deutliche Produktionssteigerung aller löslichen Proteinfractionen erzielt werden (Abb. 35).



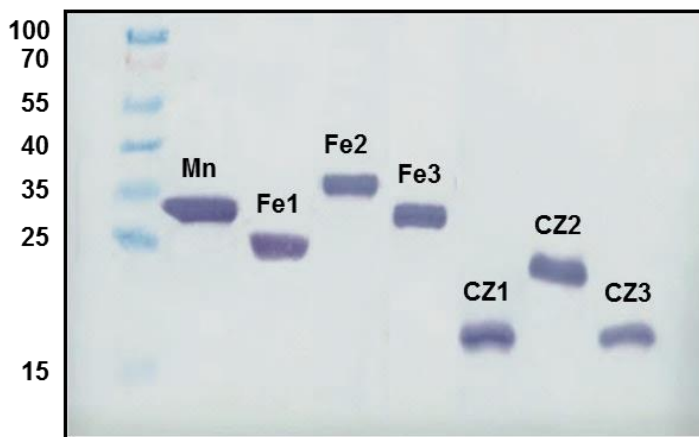
**Abb. 35: Ergebnis der rekombinanten Produktion von Superoxid-Dismutasen hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit**

Dargestellt ist ein Überblick der Produktionskulturen, die in Abhängigkeit der verwendeten Bakterienstämme (BL=BL21 DE3, R=Rosetta DE3, RS=Rosetta DE3 pLysS) und der Position der Histidin-Hexapeptide (N=N-terminaler Tag, C=C-terminaler Tag) die besten Expressionsergebnisse lieferten. Probenaliquots der verschiedenen Reinigungsschritte (L=Lysat, Ü=Überstand, E=Eluat) wurden in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt, wobei die schwarzen Pfeile die Anreicherung der löslichen Fraktion der einzelnen rekombinant hergestellten Proteine im Gel markieren. Auf der linken Seite sind zur Größenabschätzung die relativen Molekülmassen in kDa angegeben.

Eine hohe Akkumulationsrate war vor allem bei MnSOD, FeSOD1, CZSOD1 und CZSOD2 zu verzeichnen, während bei FeSOD2 und FeSOD3 bzw. CZSOD3 eine deutlich geringere Anreicherung beobachtet wurde, was vermutlich auf die zelluläre Lokalisation in Chloroplasten bzw. Peroxisomen zurückzuführen ist. Bei diesen Kulturen war zudem ein höheres Maß an Verunreinigung in Form von Fremdbanden erkennbar.

### 3.5.3. Überprüfung der heterolog hergestellten Superoxid-Dismutasen

Für den Nachweis, dass die einzelnen SOD-Isoformen in den verschiedenen Bakterienstämmen tatsächlich produziert wurden, kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz. Einerseits wurde die Existenz der Proteine mit Hilfe eines Western Blots bestätigt. Hierfür wurden Aliquots jeder Eluatfraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit Antikörpern detektiert, welche spezifisch gegen die Histidin-Hexapeptide der C- bzw. N-terminalen His<sub>6</sub>-SOD Fusionsproteine gerichtet sind. In diesem Fall konnte bei jeder getesteten Proteinprobe ein starkes Signal in Form einer violetten Bande detektiert werden, wobei die einzelnen molekularen Massen ebenfalls mit denen der nachzuweisenden Superoxid-Dismutasen übereinstimmten (Abb. 36).

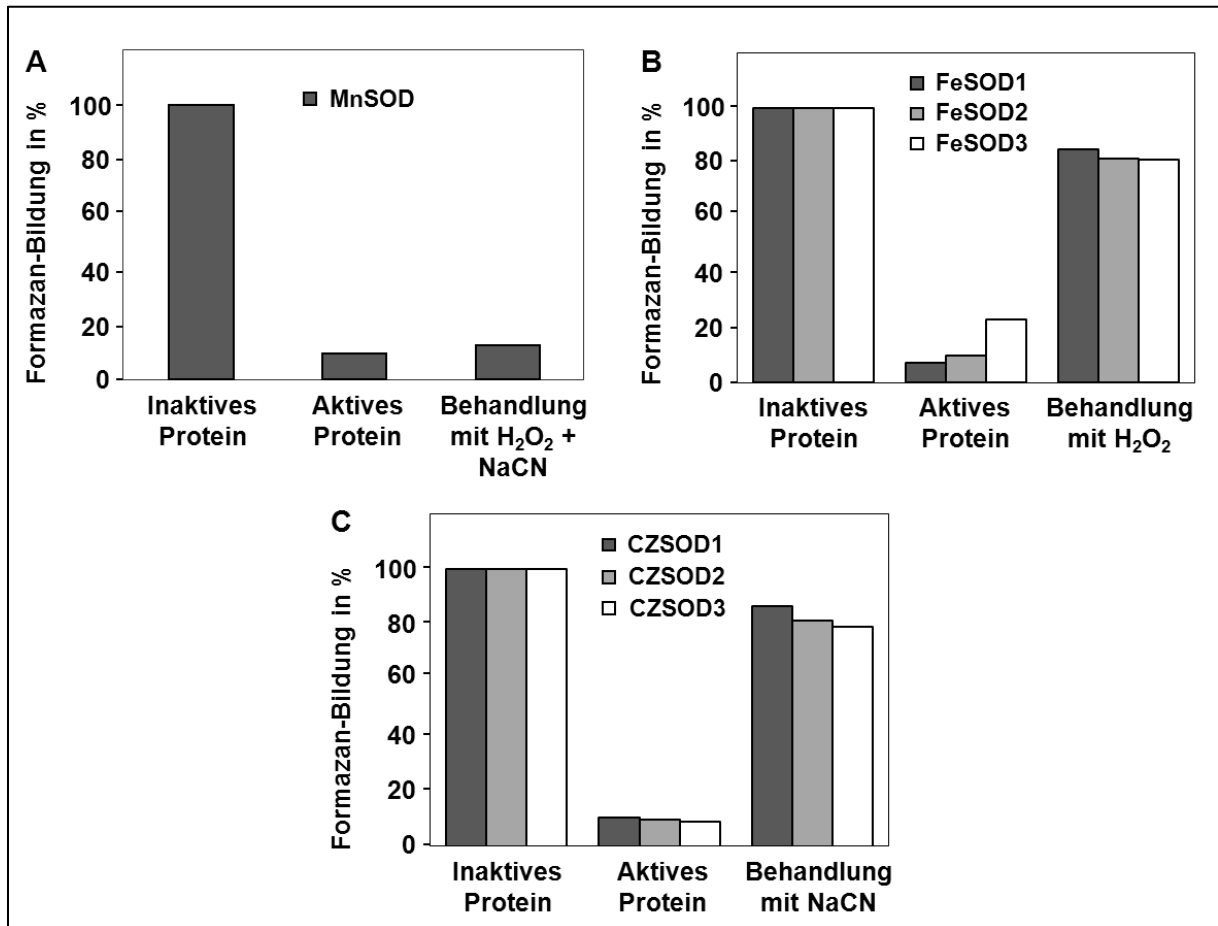


**Abb. 36: Immunologischer Nachweis rekombinant produzierter SODs**

Die einzelnen heterolog exprimierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Anti-Histidin-Antikörper versetzt. Nach Zugabe des Sekundär-Antikörpers mit konjugierter alkalischer Phosphatase erfolgte die Detektion indirekt über eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion. Auf der linken Seite sind die relativen Molekülmassen in kDa angegeben.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die produzierten Superoxid-Dismutasen in einem nativen Zustand vorliegen, was im Hinblick auf die anschließende Verwendung für *in-vitro* Untersuchungen von zentraler Bedeutung ist. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte indirekt durch Messung der NBT-Reduktion zu blauem Formazan, was spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm verfolgt werden konnte. Ein Vorteil dieses Tests besteht darin, dass die Messung nicht durch verschiedene chemische Hemmstoffe beeinträchtigt wird, die eine Unterscheidung der SOD-Isoformen ermöglichen (Kliebenstein et al., 1998). Für diesen Versuch wurden zunächst Aliquots der gereinigten Proteine mittels Hitzedenaturierung inaktiviert, um einen internen Kontrollwert für die ungehemmte NBT-Reduktion zu generieren. Bei Zugabe der verschiedenen unbehandelten Proteinfraktionen

konnte in allen Fällen eine deutliche Inhibierung der Formazan-Bildung im Vergleich zum Kontrollwert gemessen werden, was die enzymatische Aktivität aller produzierten Superoxid-Dismutasen bestätigte (Abb. 37).



**Abb. 37: Überprüfung der Enzymaktivität rekombinant produzierter SODs**

Dargestellt ist die Hemmung der Formazan-Bildung von MnSOD (A), FeSODs (B) und CZSODs (C) vor und nach Hitzeinaktivierung. Für eine Unterscheidung der Isoformen wurde eine selektive Vorbehandlung der Proteine mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NaCN durchgeführt. Als Maß für die Enzymaktivität wurde die Bildung von Formazan relativ zum internen Kontrollwert nach Inaktivierung in Prozent angegeben.

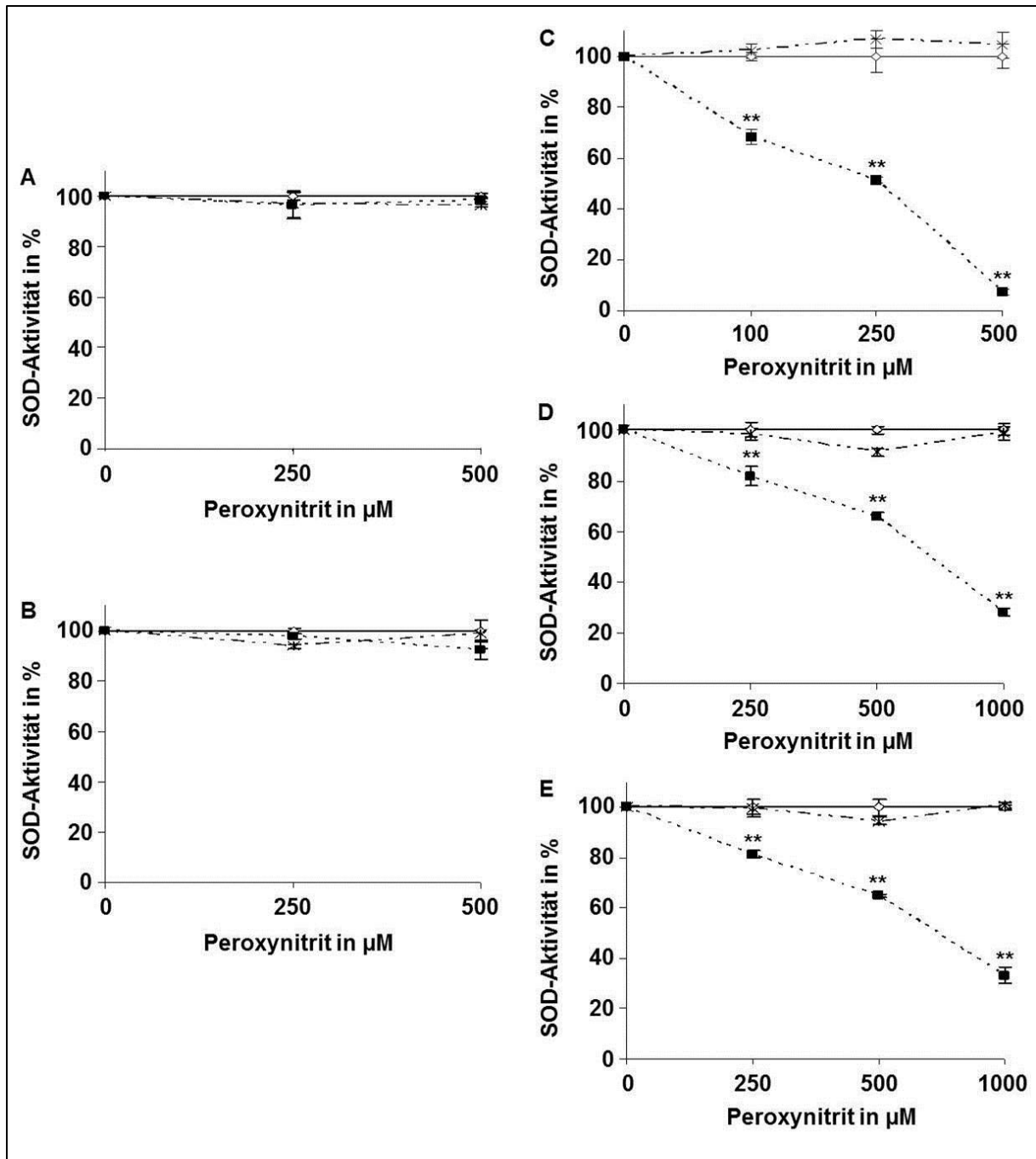
Zur Unterscheidung der verschiedenen metallhaltigen SOD-Isoformen wurden Aliquots der FeSODs mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vorbehandelt, was zu einer selektiven Hemmung dieser Proteine führte. Folglich konnte erneut ein Anstieg der Formazan-Bildung beobachtet werden, der annähernd das Niveau des ungehemmten Kontrollwertes erreichte. Analog dazu bewirkte die Inkubation der CZSODs mit NaCN-Lösung eine Inhibierung der Aktivitäten, was ebenfalls eine Zunahme der Formazan-Akkumulation hervorrief. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität der MnSOD weder durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- noch durch NaCN-Behandlung negativ beeinträchtigt. In diesem Fall konnte keine Veränderung der Formazan-Bildung im Vergleich zur unbehandelten Fraktion ermittelt werden.

#### **3.5.4. *In-vitro* Regulation der SOD-Aktivität durch Behandlung mit NO-Donoren**

NO kann über zwei verschiedene Mechanismen mit spezifischen Aminosäureresten von Proteinen interagieren. Dabei handelt es sich einerseits um Nitrosylierung von Cysteinresten und andererseits um Nitrierung von aromatischen Tyrosinresten. Um die direkte Auswirkung NO-abhängiger posttranslationaler Modifikationen auf die Regulation von Superoxid-Dismutasen *in-vitro* zu studieren, wurden die einzelnen Isoformen mit verschiedenen NO-Derivaten behandelt und anschließend die enzymatische Kapazität anhand der Hemmung der Cytochrom C-Reduktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm detektiert. Für die Untersuchung der Aktivitätsveränderung durch S-Nitrosylierung wurden die Proteine mit dem NO-Donor Nitrosoglutathion (GSNO) exponiert, wobei nur Superoxid-Dismutasen berücksichtigt wurden, die Cysteinreste innerhalb ihrer Aminosäuresequenz aufwiesen (MnSOD, FeSOD3, CZSOD1-3). Dabei konnte weder nach Inkubation mit 0,25 mM noch mit 0,5 mM GSNO ein Aktivitätsunterschied im Vergleich zur Kontrollbehandlung bei allen getesteten Isoformen festgestellt werden (siehe Anhang Abb. 8).

Für die Analyse der Aktivitätsbeeinträchtigung durch Nitrierung wurden die einzelnen Isoformen in verschiedenen Konzentrationsstufen von 0,1 mM bis 1 mM mit dem NO-Donor Peroxynitrit inkubiert und analog der oben beschriebenen Vorgehensweise getestet. Parallel hierzu wurden die Proteine in Gegenwart von 100 µM Urat mit Peroxynitrit behandelt, was eine Nitrierung effektiv unterbindet und zudem zerfallenes Peroxynitrit als Negativkontrolle verwendet. Auch hier wurden nur SODs überprüft, die nitrierbare Tyrosinreste besitzen, weshalb die Isoformen CZSOD1 und CZSOD2 in den folgenden Abbildungen nicht berücksichtigt wurden.

Wie in Abb. 38 dargestellt, konnte bei MnSOD, FeSOD3 und CZSOD3 eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Enzymaktivitäten durch Peroxynitrit beobachtet werden, während die beiden Isoformen FeSOD1 und FeSOD2 keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung zeigten. Der Effekt der Enzymhemmung war am stärksten bei MnSOD ausgeprägt, da bereits bei Verwendung von 500 µM des Nitrierungs-Agens eine nahezu vollständige Hemmung detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu mussten bei den anderen beiden Kandidaten deutlich höherer Peroxynitrit-Konzentrationen eingesetzt werden, wobei auch bei der maximal eingesetzten Dosierungsstufe noch eine Restaktivität von 30% bis 35% zu verzeichnen war. Durch Inkubation mit dem Hemmstoff Urat konnte die negative Auswirkung der Peroxynitrit-Behandlung wieder aufgehoben werden, was die Spezifität der Nitrierungsreaktion verdeutlicht.



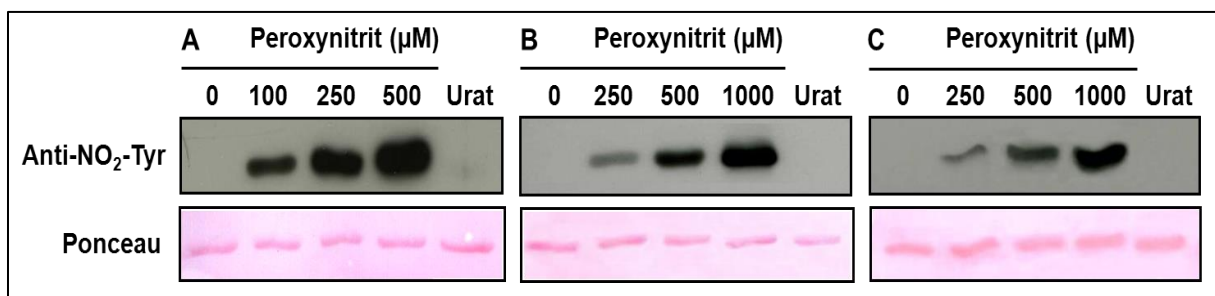
**Abb. 38: Einfluss der *in-vitro* Behandlung mit Peroxynitrit auf die Aktivität von SOD-Isoformen**

Rekombinant produzierte FeSOD1 (A), FeSOD2 (B), MnSOD (C), FeSOD3 (D) und CZSOD3 (E) wurden mit verschiedenen Peroxynitrit-Konzentrationen behandelt und nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln die Aktivität der einzelnen Isoformen bestimmt (Schwarze Sternchen: Kontrollbehandlung mit inaktiviertem Peroxynitrit, schwarze Kästchen: Peroxynitrit-Behandlung, weiße Kästchen: Peroxynitrit-Behandlung in Gegenwart von 100 µM Urat). Veränderungen der enzymatischen Kapazität wurden dabei in Relation zur Negativkontrolle mit lichtinaktiviertem Peroxynitrit in Prozentangaben dargestellt. Werte für die Standardabweichungen basieren auf der Verwendung von drei unabhängigen technischen Messwiederholungen jeder Probe. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollbehandlung sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.



### 3.5.5. *In-vitro* Immunodetektion nitrierter Superoxid-Dismutasen

Im nächsten Versuch sollte mittels Western Blot-Analyse geklärt werden, ob tatsächlich eine Tyrosin-Nitrierung bei den durch Peroxynitrit inaktivierbaren SOD-Kandidaten vorliegt. Hierfür wurden Aliquots der produzierten Isoformen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit Antikörpern detektiert, welche spezifisch gegen nitrierte Tyrosinreste gerichtet sind. In diesem Fall konnte bei jeder mit Peroxynitrit inkubierten Proteinprobe ein konzentrationsabhängiges Signal in Form einer schwarzen Bande beobachtet werden, wobei die Markierungen nach Ponceau-Färbung der Membran mit der Lokalisation bzw. den molekularen Massen der nachzuweisenden Superoxid-Dismutasen übereinstimmten (Abb. 39). Bei der Negativkontrolle mit licht-inaktiviertem Peroxynitrit als auch nach Uratbehandlung war dabei erwartungsgemäß kein Signal feststellbar.



**Abb. 39: Immunologischer Nachweis nitrierter Superoxid-Dismutasen**

Rekombinant produzierte MnSOD (A), FeSOD3 (B) und CZSOD3 (C) wurden mit verschiedenen Peroxynitrit-Konzentrationen behandelt und die Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western Blot-Transfer mit Anti-Nitrotyrosin-Antikörpern versetzt. Nach Zugabe des Sekundär-Antikörpers mit konjugierter Meerrettichperoxidase erfolgte der Nachweis indirekt über eine enzymatisch katalysierte Chemilumineszenzreaktion, welche durch Exposition mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert wurde. Für die Hemmung der Nitrierungsreaktion wurde jeweils die höchste eingesetzte Peroxynitrit-Konzentration in Gegenwart von 100 µM Urat analysiert. Zur Überprüfung der Ladungskontrolle ist in der unteren Bildhälfte das Resultat der Ponceau-Färbung dargestellt.

Angesichts der Tatsache, dass alle drei SOD-Kandidaten mehrere Tyrosinreste innerhalb ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, die als potentielle Nitrierungsstellen in Frage kommen, sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, welcher Tyrosinrest für den Aktivitätsverlust der einzelnen Isoformen verantwortlich ist. Da die Enzymaktivität der MnSOD-Isoform auch bei Verwendung geringer Peroxynitrit-Konzentrationen am stärksten gehemmt werden konnte im Vergleich zu den anderen beiden SOD-Isoformen, sollte in den folgenden Experimenten die Identifizierung von Tyrosinmodifikationen am Beispiel der MnSOD-Isoform im Detail untersucht werden.

### 3.5.6. Massenspektrometrische Analyse nitrierter Tyrosinreste am Beispiel der MnSOD

Für den Nachweis nitrierter Tyrosinreste wurden 20 ng des rekombinanten MnSOD-Proteins mit 500  $\mu$ M Peroxynitrit behandelt und die Peptidfragmente nach tryptischem Verdau mit Hilfe eines LTQ-Orbitrap Massenspektrometers analysiert. Dabei wurde speziell nach Modifikationen von Tyrosinresten mit einer Massenabweichung von 45 Da gesucht, was der molekularen Masse einer zusätzlichen Nitrogruppe entspricht. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde ein Score-Wert  $\geq 25$  als Signifikanzschwelle herangezogen. In diesem Zusammenhang konnten insgesamt neun verschiedene Tyrosinreste als Nitrierungsstellen identifiziert werden (Tab. 3).

**Tab. 3: Nitrierte Tyrosinreste von MnSOD nach *in-vitro* Behandlung mit Peroxynitrit**

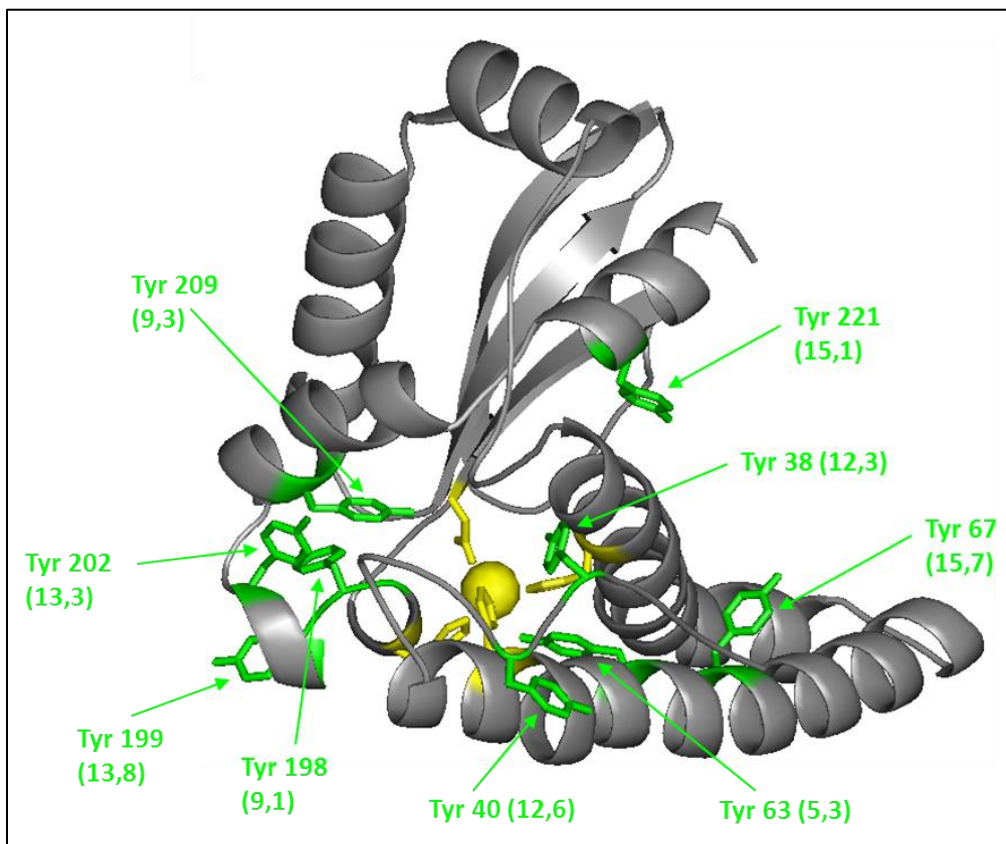
Dargestellt sind die Peptidfragmente von MnSOD, bei denen nach Behandlung mit 500  $\mu$ M Peroxynitrit eine Modifikation einzelner Tyrosinreste mit einer Massenverschiebung von 45 Da detektiert werden konnte. Die einzelnen Tyrosinreste sind grün markiert bzw. deren Position innerhalb der Aminosäuresequenz als Hochzahl gekennzeichnet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines LTQ-Orbitrap Massenspektrometers, wobei die einzelnen Spektrogramme unter Verwendung des Suchalgorithmus Mascot mit der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR verglichen wurden. Angegeben sind die theoretische und tatsächliche Masse sowie die Ladung der einzelnen Peptidsequenzen.

Identifizierte Peptid-Sequenzen	Score-Wert	Theoret. Masse	Beobacht. Masse	Ladung	Modifikation
KHHQAYVTN <sup>67</sup> YNNALEQLDQAVNKG	76	2.614	1.308	2	Nitro (+45)
KHHQAY <sup>63</sup> VTN <sup>67</sup> YNNALEQLDQAVNKGDASTVVKL	70	3.372	0.844	4	Nitro (+45)
KGGSLVPLVGIDVWEHAY <sup>198</sup> YLQYKN	46	2.551	1.277	2	Nitro (+45)
KGGSLVPLVGIDVWEHAY <sup>199</sup> YLQYKN	45	2.551	1.277	2	Nitro (+45)
KGGSLVPLVGIDVWEHAYYLQ <sup>202</sup> YKN	42	2.551	1.277	2	Nitro (+45)
RGIQTFTLPDLPYD <sup>40</sup> YGALEPAISGEIMQIHQKH	39	3.627	1.210	3	Nitro (+45)
RGIQTFTLPDLPY <sup>38</sup> YDYGALPAISGEIMQIHQKH	36	3.627	0.908	4	Nitro (+45)
KVINWKY <sup>221</sup> ASEVYEKE	27	1.673	0.837	2	Nitro (+45)
KNVRPEY <sup>209</sup> LKN	26	1.063	0.532	2	Nitro (+45)

### 3.5.7. *In-silico* Modellierung einer 3D-Struktur von MnSOD

Um herauszufinden, ob die Aktivitätsinhibierung der MnSOD-Isoform aufgrund multipler Tyrosin-Nitrierung und einer damit verbundenen Konformationsänderung zustande kommt oder möglicherweise auf der Modifikation eines bestimmten Tyrosinrestes beruht, wurde zunächst die räumliche Anordnung der identifizierten Nitrierungsstellen innerhalb der Tertiärstruktur überprüft. Da bisher noch keine röntgenkristallographische Analyse der MnSOD aus *Arabidopsis thaliana* vorliegt, wurde basierend auf der bekannten Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms SWISSMODEL eine dreidimensionale Modellvorhersage

berechnet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Homologie-Modellierung, bei der Sequenzidentitäten zu Proteinen mit bereits bekannten Strukturen für die Vorhersage herangezogen werden. Als Vorlage für die Modellierung wurde die Kristallstruktur der MnSOD von *Caenorhabditis elegans* (PDB-Nummer: 3dc6) verwendet, da hier nach automatischem Suchlauf die höchste Aminosäuresequenz-Identität (60%) ermittelt wurde. Bei Betrachtung des dreidimensionalen Strukturmodells der MnSOD wird deutlich, dass die neun massenspektrometrisch identifizierten Nitrotyrosinreste entlang der gesamten Sequenz verteilt sind und vorwiegend als Bestandteil von  $\alpha$ -Helices koordiniert sind (Abb. 40).



**Abb. 40: 3D-Strukturmodell von MnSOD aus *Arabidopsis thaliana***

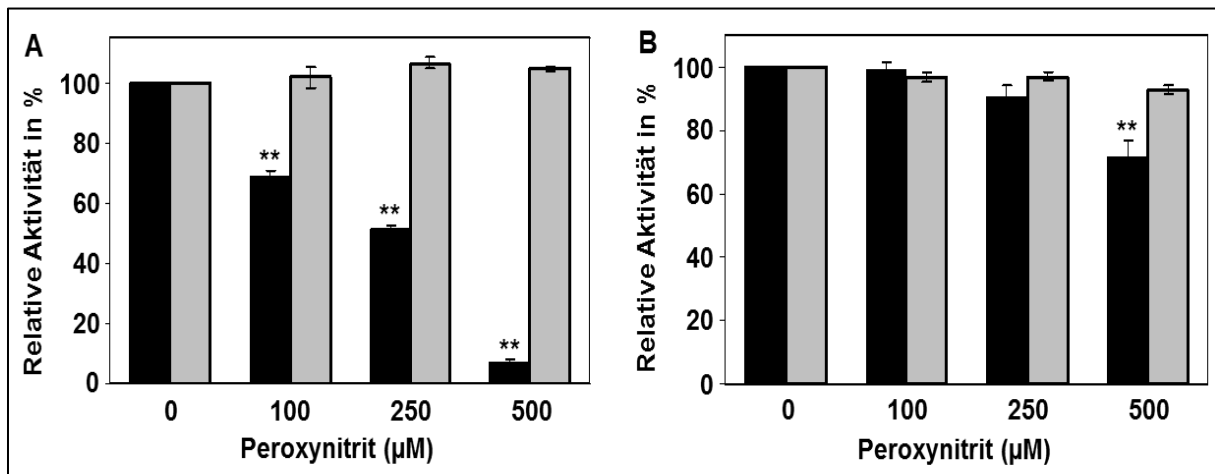
Die Vorhersage der Proteinstruktur von MnSOD basiert auf der Kristallstruktur von *Caenorhabditis elegans* und ist als Bändermodell mit Sekundärstrukturelementen dargestellt (graue Markierung). Die räumliche Lokalisation massenspektrometrisch identifizierter Nitrotyrosinreste (grüne Markierung) und Aminosäuren des aktiven Zentrums (gelbe Markierung) sind als Stabmodell hervorgehoben, während die Position des Mangans innerhalb der Substrat-Bindetasche als Kugelmodell gekennzeichnet ist. In Klammern ist der Abstand jedes Tyrosinrests zum aktiven Zentrum in Ångström angegeben. Die Strukturmodellierung erfolgte mit Hilfe des Programms SWISSMODEL, während die Visualisierung mit Hilfe des Programms Pymol durchgeführt wurde.

Dabei ist auffällig, dass nur die Tyrosinreste Tyr 63, Tyr 198, Tyr 209 in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind, während die restlichen sechs Nitrierungsstellen eine Entfernung von zum Teil deutlich mehr als 10 Ångström aufweisen. Vor allem der Tyrosinrest 63, der in einer Distanz von nur 5,3 Ångström von der Substrat-Bindetasche entfernt liegt,

könnte nach Reaktion mit Peroxynitrit möglicherweise eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Aktivitätshemmung der MnSOD spielen.

### 3.5.8. Strukturelle Bedeutung von Tyrosin 63 für die MnSOD-Aktivität

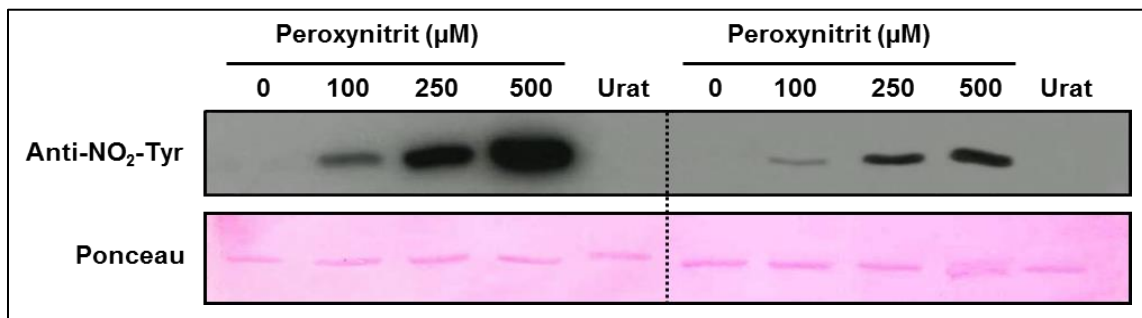
Ausgehend von den Erkenntnissen der Strukturanalyse bzw. der räumlichen Lokalisation des Tyrosinrests 63 erschien es sinnvoll, die strukturelle Bedeutung dieser Nitrierungsstelle genauer zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollte daher die Auswirkung einer Aminosäure-Substitution und die damit verbundene Verhinderung einer Nitrierung an der Position 63 im Hinblick auf die Enzymaktivität nach Peroxynitrit-Behandlung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Aminosäure Tyrosin durch gezielte Einführung einer Punktmutation innerhalb der MnSOD-Sequenz gegen Phenylalanin ausgetauscht und die mutierte Variante in Analogie zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise in Kapitel 3.5.2 rekloniert, heterolog exprimiert und aufgereinigt. Nach erfolgreicher Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde die rekombinant produzierte MnSOD Y63F-Variante nach dem gleichen Verfahren wie in Kapitel 3.5.4 mit unterschiedlichen Peroxynitrit-Konzentrationen behandelt und anschließend die Auswirkung der Nitrierung auf die Enzymfunktion getestet. Auch in diesem Fall war eine konzentrationsabhängige Aktivitätsinhibierung erkennbar, wobei die mutierte Version allerdings eine deutlich geringere Sensitivität im Vergleich zur normalen MnSOD-Isoform zeigte (Abb. 41).



**Abb. 41: Einfluss der *in-vitro* Nitrierung auf die Aktivität von MnSOD Y63F**

Rekombinant produzierte MnSOD (A) und die mutierte MnSOD Y63F-Variante (B) wurden mit verschiedenen Peroxynitrit-Konzentrationen vorbehandelt und die Aktivität beider Isoformen bestimmt (schwarze Balken). Parallel hierzu wurden die Proteine in Gegenwart von 100 µM Urat mit Peroxynitrit behandelt, was die Nitrierung unterbindet (graue Balken). Veränderungen der Aktivität wurden in Relation zur Negativkontrolle mit lichtinaktiviertem Peroxynitrit in Prozent angegeben. Die Standardabweichungen basieren auf der Verwendung von drei technischen Messwiederholungen jeder Probe. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.

Während bei 100  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit keine Beeinträchtigung der Enzymfunktion mehr festgestellt werden konnte, war bei 500  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit maximal eine 30%-ige Inaktivierung detektierbar. Um das Ergebnis des Enzymtests zu bestätigen, wurden die beiden Isoformen MnSOD und MnSOD Y63F nach Peroxynitrit-Behandlung zusätzlich einem Western Blot mit Anti-Nitrotyrosin-Antikörpern unterzogen. Erwartungsgemäß konnte auch bei der mutierten Variante ein deutlich schwächeres, konzentrationsabhängiges Signal detektiert werden im Vergleich zu normalen MnSOD-Version, was auf ein geringeres Ausmaß der Nitrierung hindeutet (Abb. 42).



**Abb. 42: Immunologischer Nachweis der nitrierten MnSOD Y63F-Variante**

Rekombinant produzierte MnSOD (linke Seite) und MnSOD Y63F (rechte Seite) wurden mit verschiedenen Peroxynitrit-Konzentrationen behandelt und die Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western Blot-Transfer mit Anti-Nitrotyrosin-Antikörpern versetzt. Als Negativkontrolle wurden beide Proteine mit lichtinaktiviertem Peroxynitrit inkubiert, während für die Hemmung der Nitrierungsreaktion jeweils die höchste eingesetzte Peroxynitrit-Konzentration in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Urat analysiert wurde. Zur Überprüfung der Ladungskontrolle ist in der unteren Bildhälfte das Resultat der Ponceau-Färbung dargestellt.

Als Fazit dieser Untersuchung lässt sich festhalten, dass insgesamt drei Isoformen (MnSOD, FeSOD3 und CZSOD3) als neue Kandidaten für eine *in-vitro* Regulation durch NO-abhängige postrtranslationale Proteinmodifikationen identifiziert werden konnten. Nach Inkubation mit dem NO-Donor Peroxynitrit war in diesem Zusammenhang eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Enzymaktivitäten durch Nitrierung beobachtbar, während nach Behandlung mit GSNO bei allen rekombinant hergestellten Superoxid-Dismutasen keine Inaktivierung durch Nitrosylierung festgestellt werden konnte. Am Beispiel der MnSOD konnte zudem mittels Massenspektrometrie und zielgerichteter Mutagenese gezeigt werden, dass speziell der Tyrosinrest 63 als Nitrierungsstelle maßgeblich für den beobachteten Aktivitätsverlust verantwortlich ist.

## 4. Diskussion

Die physiologische Wirkung von NO in Pflanzen ist vielfältig und wird im Allgemeinen durch seine Bildung und seinen Abbau bestimmt, wobei vor allem dem Enzym GSNO-Reduktase eine zentrale Bedeutung innerhalb des NO-Stoffwechsels zukommt. Durch Abbau von GSNO reguliert es sowohl die zelluläre Verfügbarkeit von NO als auch indirekt die Veränderung von Enzymaktivitäten durch posttranslationale Modifikationen und übt damit einen entscheidenden Einfluss auf das NO-abhängige Signalnetzwerk aus.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von GSNO-Reduktase hinsichtlich der Pflanzenentwicklung und verschiedener Stressbedingungen näher charakterisiert. Für die Untersuchungen wurden *gsnor* Knock-out Linien verwendet und die Auswirkungen des Funktionsverlusts auf das phänotypische Erscheinungsbild, die Proteinregulation nach *Pseudomonas syringae*-Infektion und das Redoxsystem nach Paraquat-Behandlung analysiert. Des Weiteren wurde mit Hilfe von *in-vitro* Experimenten am rekombinanten Protein der Effekt NO-abhängiger posttranslationaler Modifikationen auf die Enzymklasse der Superoxid-Dismutasen überprüft, die als antioxidative Schutzenzyme eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress spielen.

### 4.1. Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität resultiert in einem pleiotrophen Phänotyp und einer veränderten NO-Homöostase

Die Bedeutung von NO für das Pflanzenwachstum wurde bereits in mehreren Publikationen untersucht, wobei hauptsächlich die Auswirkungen exogener NO-Applikation auf einzelne Entwicklungsprozesse beschrieben wurden (Gouvêa et al., 1997, Leshem et al., 1998, Beligni und Lamattina, 2000). Veränderungen des endogenen NO-Status ermöglichen es hingegen den direkten Langzeiteffekt von NO auf den gesamten Habitus einer Pflanze in unterschiedlichen Wachstumsstadien *in-vivo* zu erfassen bzw. die Interaktion mit anderen Signalmolekülen und Stoffwechselkomponenten im Detail zu studieren.

Die Verwendung der *gsnor* Insertionslinie bietet sich in diesem Zusammenhang als probates Untersuchungsobjekt an, da ein Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität zu einer höheren Akkumulation der zellulären NO-Speicherform GSNO und nitrosylierten Proteinen führt (Feechan et al., 2005, Rustérucci et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe Ozon-abhängiger Gasphasen-Chemilumineszenz bestätigt und zusätzlich in unterschiedlichen Gewebetypen wie Spross- und Blütenmaterial gemessen werden (Abb. 9). Mit der gleichen Methode wurden auch Nitrit- und Nitrat-Gehalte quantifiziert, um Rückschlüsse auf weitere Modifikationen des allgemeinen NO-Stoffwechsels zu erhalten. Interessanterweise war in

*gsnor*-Knock-out Linien analog zum Nitrosothiolgehalt ebenfalls eine mehr als doppelt so hohe Nitratanreicherung im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zu beobachten, was möglicherweise auf eine Verbindung zwischen Protein-Nitrosylierung und Nitratassimilation hindeutet (Lee et al., 2008). Da beide Pflanzen unter den gleichen Anzuchtbedingungen kultiviert wurden, weisen die Unterschiede vermutlich auf eine veränderte Aufnahme, Synthese oder Degradation von Nitrat hin. In diesem Zusammenhang wäre bspw. eine NO-abhängige Inhibierung des Nitrat-Reduktase-Enzyms in *gsnor* Knock-out Linien denkbar, was vor kurzem auch nach exogener NO-Behandlung in Weizenblättern nachgewiesen werden konnte (Rosales et al., 2011). Andererseits könnte die Nitrat-Akkumulation auch auf eine erhöhte Hämoglobin-Enzymaktivität zurückzuführen sein, die als Dioxygenasen eine Oxidation von NO zu Nitrat katalysieren (Igamberdiev und Hill, 2004) und auf diese Weise gegebenenfalls den Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität kompensieren. Angesichts der Tatsache, dass der hohe Nitrat-Gehalt in *gsnor* Knock-out Linien vor allem in Blattmaterial bzw. in geringerem Umfang in Spross- und Blütengewebe detektiert wurde, kann darüber hinaus auch eine Beeinträchtigung des akropedalen Nitrattransports durch NO nicht ausgeschlossen werden.

Die Verschiebung der NO-Homöostase bzw. der damit verbundene nitrosative Stress in *gsnor* Knock-out Linien resultiert in einem pleiotrophen Phänotyp, der sowohl die Keimung als auch das vegetative Wachstum und die Reproduktion umfasst (Abb. 11-14). Die morphologischen Veränderungen korrelierten dabei mit den Untersuchungen der GSNO-Reduktase Promotoraktivität, da dieses Gen während der gesamten Entwicklungsphase in unterschiedlichen Gewebetypen und Pflanzenorganen konstitutiv exprimiert wird (Abb. 10). In diesem Zusammenhang ist besonders die ubiquitäre Lokalisation von GSNO-Reduktase im Vaskulärsystem zu erwähnen, was auf eine potentielle Rolle von GSNO als Signalmolekül schließen lässt und bereits in Bezug auf die SAR-Etablierung (Rustérucci et al., 2007) und die systemische Wundreaktion (Espunya et al., 2012) postuliert wurde. Da auch der Transport von Phytohormonen über das vaskuläre System erfolgt, liegt die Vermutung nahe, dass die phänotypischen Unterschiede auf einer Wechselwirkung von NO mit dem hormonellen Signalnetzwerk basieren.

Die auffälligste morphologische Anomalie stellt der Verlust der Apikaldominanz in *gsnor* Insertionslinien dar, was sich in einem kurzwüchsigen und stark verzweigten Phänotyp äußert und auf eine Beeinträchtigung der Auxin-Produktion oder eine eingeschränkte Mobilisierung dieses Hormons hindeutet. Als Beleg für diese Hypothese könnte die starke Expression des GSNO-Reduktase Gens und damit eine strikte Regulation der NO-Verfügbarkeit innerhalb des Sprossapikalmeristems angesehen werden (Abb. 10A), was als

Hauptsyntheseort von Auxin gilt (Normanly, 1997). Darüber hinaus scheint zudem der polare Auxin-Transport von der Sprossspitze in die Wurzeln, welcher über sog. PIN-Proteine reguliert wird, eine hohe Sensitivität gegenüber NO aufzuweisen bzw. durch Nitrosylierung von PIN1 blockiert zu werden (Fernández-Marcos et al., 2011). Im Hinblick auf die Dysregulation der NO-Homöostase in den *gsnor* Knock-out Linien könnte eine NO-abhängige Inhibierung der gewebespezifischen Auxin-Verteilung somit auch als Ursache für die drastische Hemmung des Primärwurzelswachstums und der Seitenwurzelbildung interpretiert werden (Abb. 12). Transgene Linien mit eingeschränkter Auxinsynthese (Tian und Reed, 1999) oder reduziertem Auxintransport (Reed et al., 1998) zeigen bspw. eine ähnliche Veränderung der Wurzelmorphologie. Eine weitere Bestätigung dieser Annahme liefert zudem der Nachweis, dass eine exogene NO-Applikation das Primärwurzelswachstum in Tomatenkeimlingen unterbinden kann (Correa-Aragunde et al., 2004). Allerdings ist dieser Vorgang mit der gleichzeitigen Stimulierung der Seitenwurzelentwicklung verbunden, was hingegen bei der Mutante nicht festgestellt werden konnte.

Die Inhibierung der Wurzelentwicklung in *gsnor* Knock-out Linien wäre andererseits auch mit der höheren Nitrat-Akkumulation zu erklären, zumal dieser Phänotyp auch bei Maispflanzen in Gegenwart verschiedener Nitrat-Konzentrationen beobachtet werden konnte (Zhao et al., 2007). Möglicherweise handelt es sich dabei um einen indirekten Effekt, da Nitrat die Biosynthese des Hormons Cytokinin induzieren kann (Takei et al., 2004), welche primär in den Wurzeln stattfindet (Aloni et al., 2005). Cytokinin wirkt antagonistisch zu Auxin und wurde bereits im Zusammenhang mit der Inhibierung des Seitenwurzelwachstums (Laplaze et al., 2007) und der Stimulierung der Seitentriebsausbildung (Shimizu-Sato et al., 2009) beschrieben. Da diese morphologischen Befunde eine hohe Ähnlichkeit mit dem Erscheinungsbild der *gsnor* Knock-out Linie aufweisen, wäre daher auch eine Verschiebung des Auxin-Cytokinin-Verhältnisses denkbar.

Weitere phänotypische Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen sind beim Übergang in die generative Phase und der Fertilität zu verzeichnen, was sich vor allem durch eine verzögerte Blühinduktion bemerkbar macht und auch in anderen transgenen Pflanzen mit höherem endogenen NO-Gehalt nachgewiesen wurde (He et al., 2004). Der Übergang in die generative Phase wird durch mehrere Faktoren bestimmt und neben der Photoperiode auch durch das Hormon Gibberellinsäure (GA) gesteuert (Mouradov et al., 2002). Transgene Pflanzen mit gestörter GA-Synthese oder GA-Signaltransduktion weisen z. B. einen späteren Blühzeitpunkt auf (Wilson et al., 1992), was möglicherweise auch durch die NO-abhängige Hemmung von Zielproteinen des GA-Stoffwechsels in *gsnor* Knock-out Linien ausgelöst



werden könnte. Für diese Hypothese spricht zudem die erhebliche geringere Schotengröße (Abb. 14C) sowie die beeinträchtigte Samenentwicklung - zwei Prozesse, die maßgeblich durch GA reguliert werden (Singh et al., 2002). Die reduzierte Samenanzahl pro Schote könnte hingegen auch auf die abnormale Blütenmorphologie zurückzuführen sein, da die Staubblätter deutlich verkürzt sind bzw. sich unterhalb der Narbe befinden und damit keine effektive Selbstbefruchtung möglich ist (Abb. 14B).

Des Weiteren konnte bei *gsnor* Insertionslinien eine deutliche Retardation der Blattseneszenz festgestellt werden (Abb. 14A), was vermutlich mit einer Beeinträchtigung des Ethylen-Haushalts zusammenhängt, da dieses Hormon maßgeblich an der Induktion des Alterungsprozess beteiligt ist (Grbić und Bleecker, 1995). NO steht in einem antagonistischen Verhältnis zu Ethylen und besitzt eine Seneszenz-verzögernde Wirkung, was sowohl nach NO-Behandlung (Leshem et al, 1998) als auch bei transgenen Pflanzen mit verändertem NO-Gehalt nachweisbar war (Guo und Crawford, 2005, Mishina et al., 2007). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die NO-abhängige Inaktivierung des Enzyms Methionin-S-Adenosyltransferase zurückzuführen, wodurch weniger Ausgangssubstrat für die Ethylenproduktion zur Verfügung steht (Lindermayr et al., 2006).

Eine Übersicht der morphologischen Veränderungen in *gsnor* Knock-out Linien sowie ein möglicher Zusammenhang mit den an diesen Prozessen beteiligten Phytohormonen ist in der Abb. 4 nochmals kurz zusammengefasst.

**Tab. 4: Phänotypische Veränderungen in *gsnor* Knock-out Linien als Folge eines beeinträchtigten Hormon-Haushalts**

Dargestellt ist eine Auflistung aller morphologischen Auffälligkeiten, die in *gsnor* Insertionslinien während des gesamten Entwicklungsverlaufs im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet wurden und auf eine potentielle Interaktion zwischen NO und dem hormonellen Signalnetzwerk hindeuten.

<b>Phänotyp. Unterschiede</b>	<b>Hormon-Beteiligung</b>
Eingeschränkte Keimungsrate/Dormanz	Abscisinsäure
Zeitlich verzögerte Keimung	Gibberellinsäure
Reduziertes Wurzelwachstum	Auxin
Verlust der Apikaldominanz	Auxin
Ausbildung mehrerer Sprossachsen und Seitentriebe	Cytokinin
Retardation der Blattseneszenz	Ethylen
Verzögerte Blühinduktion	Gibberellinsäure
Reduzierte Schotenlänge und Samenanzahl	Gibberellinsäure

#### **4.2. Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität hat keine Auswirkungen auf das Resistenzverhalten gegenüber *Pseudomonas syringae***

Anfang der 90er Jahre wurde das hemi-biotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* als erstes Phytopathogen identifiziert, das in der Lage war, *Arabidopsis thaliana* unter Laborbedingungen zu infizieren (Whalen et al., 1991). Seitdem wird die *Arabidopsis thaliana/Pseudomonas syringae* Interaktion als genetisches Modellsystem für die Erforschung molekularer Prinzipien der Abwehrreaktion und Krankheitsresistenz in Pflanzen verwendet. Prinzipiell unterscheidet man dabei zwischen einer kompatiblen Interaktion, bei der das virulente Pathogen sich in der Pflanze vermehren kann, indem es bestimmte Pathogenitätsfaktoren (Effektoren) in die Zellen einschleust, welche die Abwehrreaktion der Pflanze unterdrücken (Abramovitch et al., 2006). Im umgekehrten Fall spricht man hingegen von einer inkompatiblen Interaktion, wenn die Pflanze diese Effektoren erkennen kann und Abwehrmechanismen induziert, die der Besiedlung des avirulenten Pathogens entgegenwirken. Diese Form der Resistenz wird klassischerweise mit der sog. Gen-für-Gen-Hypothese beschrieben (Flor et al., 1971).

In Vorarbeiten wurden Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften bereits in Infektionsversuchen mit dem avirulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (avrRpt2) und dem virulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 getestet. In beiden Linien waren deutliche Unterschiede sowohl bei der Ausbildung charakteristischer Krankheitssymptome als auch der zeitlichen Veränderung der bakteriellen Vermehrungsrate innerhalb des Blattgewebes nach kompatibler und inkompatibler Interaktion sichtbar (Holzmeister et al., 2011). Obwohl *gsnor* Insertionslinien eine gestörte NO-Homöostase aufweisen, hatten diese Veränderungen keinen anfälligeren oder resistenteren Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zur Folge. Diese Resultate konnten auch in Antisense-Linien mit reduzierter GSNO-Reduktase Expression nach Infektion mit einem avirulenten bzw. virulenten *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*-Stamm beobachtet werden (Rustérucchi et al., 2007). Die Resultate der Infektionsstudie stehen hingegen im Widerspruch zu einer weiteren Untersuchung, die ebenfalls mit *gsnor* Knock-out Linien durchgeführt wurde (Feechan et al., 2005). In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität sowohl die R-Gen vermittelte Resistenz als auch die Basisresistenz negativ beeinträchtigt, da diese Pflanzen eine signifikant höhere Anfälligkeit nach Behandlung mit einem avirulenten und virulenten *Pseudomonas syringae*-Stamm besitzen. Für die Interpretation der widersprüchlichen Daten müssen allerdings mehrere Faktoren berücksichtigt werden, die größtenteils auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen sind. Dazu zählt einerseits, dass für

die Experimente verschiedene Ökotypen (Columbia-0 bzw. Wassilewskija in dieser Arbeit) verwendet wurden. Genetische Variationen zwischen einzelnen Akzessionen wurden allerdings im Zusammenhang mit einer differenzierten Abwehrantwort nach verschiedenen abiotischen und biotischen Stressbedingungen bereits in der Literatur beschrieben (Kover und Schaal, 2002, Li et al., 2006, Katori et al., 2010). Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 reagieren bspw. deutlich sensitiver auf Infektion mit *Pst* DC3000 (avrRpt2) als Wassilewskija-Pflanzen, was sich auch in einer geringen Übereinstimmung differentiell regulierter Gene widerspiegelte (Van Poecke et al., 2007). Darüber hinaus erfolgte die Infektion der Pflanzen auf unterschiedliche Weise und mit verschiedenen Konzentrationen (Spritzeninjektion einzelner Blätter mit  $10^5$  KBE/ml bzw. Vakuuminfiltration der gesamten Pflanze mit  $10^6$  KBE/ml in dieser Arbeit). Die Wahl der Behandlungsmethode hat allerdings einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung von Krankheitssymptomen und die Vermehrung innerhalb des Blattgewebes (Zipfel et al., 2004). In diesem Zusammenhang begünstigt die Vakuuminfiltration den Infektionsverlauf vermutlich zugunsten des Pathogens, da die gesamte Pflanze mit einer hohen Bakteriendichte quasi überschwemmt wird (Sun et al., 2006). Dies könnte möglicherweise auch der Grund sein, weshalb die Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien nicht mehr deutlich hervortreten.

Detaillierte Untersuchungen, welche Auswirkungen ein Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität auf die Genexpression oder Proteinregulation nach *Pseudomonas*-Infektion hat, liegen bisher nicht vor. Mittels Proteomanalyse sollten daher neue Erkenntnisse im Hinblick auf potentielle Unterschiede der Proteinregulation sowohl zwischen beiden Linien als auch in Bezug auf die pathogenspezifische Abwehrantwort gewonnen werden.

#### **4.3. Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität führt zu einer veränderten Proteinexpression nach *Pseudomonas syringae*-Infektion**

Nach *Pseudomonas*-Infektion wurden in Blattproben von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien mit Hilfe der differentiellen Gelelektrophorese insgesamt 58 Proteine nach inkompatibler bzw. 66 Proteine nach kompatibler Interaktion identifiziert, deren Abundanz sich während des Infektionsverlaufes mindestens um den Faktor  $\pm 2$  veränderte (Tab. 2). Die quantitative Auswertung ergab, dass ein deutlicher Anstieg differentiell regulierter Proteine erst 24 h nach der jeweiligen Behandlung in beiden Linien auftrat. In anderen Studien konnten hingegen auch zu einem früheren Zeitpunkt bereits signifikante Unterschiede nach avirulenter bzw. virulenter *Pseudomonas*-Infektion detektiert werden, wobei allerdings nur Veränderungen in der Spotintensität und keine quantitativen Werte erfasst wurden (Jones et

al., 2004 und 2006). Im Falle der inkompatiblen Interaktion wurde in beiden Linien nach 24 h eine höhere Anzahl regulierter Proteine im Vergleich zur kompatiblen Interaktion detektiert. Diese Beobachtung stimmt mit anderen Studien überein und beruht auf der früheren Erkennung des Pathogens und der damit verbundenen zeitlich schnelleren Aktivierung der Abwehrreaktion (Dangl und Jones, 2001, Tao et al., 2003). Überraschenderweise waren in *gsnor* Insertionslinien sowohl 24 h und vor allem 48 h nach *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)-Infektion deutlich weniger Veränderungen auf Proteomebene im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erkennbar. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise mit einer erhöhten Anzahl an Redoxmodifikationen von Proteinen in den transgenen Pflanzen zusammenhängen, was auf Proteinebene bspw. nach Nitrosylierung (Lindermayr et al., 2005), Phosphorylierung (Reiland et al., 2009) oder Oxidation (Bykova und Rampitsch, 2012) nachgewiesen werden konnte. Die dadurch initiierte temporäre Aktivierung oder Inhibierung von Proteinen würde in diesem Zusammenhang aufgrund der ausbleibenden Neusynthese bzw. Degradation im Rahmen der Proteomanalyse nicht erfasst werden.

Insgesamt betrachtet lässt sich aus den erhobenen Daten schlussfolgern, dass beide Linien einerseits eine ähnliche Abwehrstrategie auf Proteinebene offenbaren, bspw. in Bezug auf Veränderungen der Proteinregulation innerhalb bestimmter Gelregionen nach avirulenter (Abb. 16) bzw. virulenter (Abb. 17) Infektion. Andererseits konnten aber auch deutliche Abweichungen hinsichtlich der identifizierten Proteinkandidaten festgestellt werden, was auf Variationen in der Abwehrreaktion hindeutet (Abb. 19). Im Folgenden werden charakteristische Unterschiede und Übereinstimmungen in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Insertionslinien anhand einzelner Beispiele kurz erläutert und im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr diskutiert.

Die inkompatible Interaktion war in beiden Linien durch eine starke Akkumulation der GST-Isoformen 1, 2 und 8 gekennzeichnet, die zur Phi-Klasse gehören und zudem in verschiedenen posttranslationalen Modifikationen vorkamen. Alle drei Isoformen besitzen Glutathion-Peroxidase-Aktivität, wobei GST2 und GST8 zusätzlich an der Detoxifizierung von Lipidhydroperoxiden beteiligt sind, die durch Wechselwirkung von ROS mit Zellmembranen entstehen (Wagner et al., 2002). In der Literatur ist eine Induktion der GST-Akkumulation als Marker für die generelle Abwehrantwort nach Pathogenbefall sowohl auf Transkriptebene (Maleck et al., 2000) und Proteinebene (Jones et al., 2004, Asano et al., 2012) als auch nach Elicitorbehandlung in *Arabidopsis*-Zellkulturen (Chivasa et al., 2006) beschrieben. In diesem Zusammenhang spielen GSTs womöglich eine Rolle bei der Regulation des zellulären Redoxstatus, indem sie die Entwicklung des Zelltodes während der HR einschränken.

Nur in *gsnor* Knock-out Linien konnte hingegen die Akkumulation von drei verschiedenen Lektinen festgestellt werden, bei denen es sich um cytosolische oder extrazelluläre, Kohlenhydrat-bindende Proteinen handelt, die lose mit der Zellwand assoziiert sein können (Rüdiger und Gabius, 2001). Ihnen wird eine wichtige Funktion bei der Pathogenabwehr eingeräumt, da sie vermutlich mit Zuckerresten auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen interagieren (Sharon, 2007). Ihre wachstumshemmende Wirkung gegenüber Pilzen ist in diesem Zusammenhang bereits gut untersucht (Barkai-Golan et al., 1978, Brambl und Gade, 1985) und auch nach Elicitor-Behandlung konnte eine Anreicherung von Lektinen auf Proteinebene nachgewiesen werden (Casasoli et al., 2008).

Der auffälligste Unterschied zwischen beiden Linien war hingegen bei der Regulation des Photosynthese-Prozesses feststellbar, da nur in Wildtyp-Pflanzen eine deutliche Reprimierung chloroplastidärer Proteine wie Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) und verschiedener Untereinheiten von Ribulose 1,5-bisphosphat-Carboxylase (RuBisCO) vorlag. FTR katalysiert den Elektronentransport von Ferredoxin auf Thioredoxin und ist an der Aktivierung verschiedener photosynthetischer Zielenzyme wie RuBisCO-Aktivase (Zhang und Portis, 1999) oder Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999) beteiligt, die beide ebenfalls eine reduzierte Abundanz nach avirulenter Infektion aufwiesen. Eine Einschränkung der photosynthetischen Aktivität nach Pathogenbefall wurde auch in anderen Studien beobachtet (Scharte et al., 2005, Bonfig et al., 2006) und ist mittlerweile als typische Reaktion der Pflanze bei der Umstellung vom primären zum abwehrinduzierten Stoffwechsel etabliert (Berger et al., 2007). In diesem Zusammenhang scheinen *gsnor* Knock-out Linien für eine effiziente Abwehrreaktion hingegen nicht auf eine Restriktion des Photosynthese-Systems angewiesen zu sein.

Bei der kompatiblen Interaktion waren im Gegensatz zur inkompatiblen Interaktion hingegen kaum stress- bzw. redoxrelevante Proteine detektierbar, sondern vielmehr unterschiedliche metabolische Stoffwechselwege betroffen, wobei sich allerdings kein zusammenhängendes Abwehrprofil ergab und sich daher allenfalls Tendenzen ableiten lassen. Die Akkumulation von 12-Oxophytodienoat-Reduktase (OPR3) in Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien lässt auf eine Aktivierung der Biosynthese von Jasmonsäure (JA) schließen (Schaller et al., 2000). In diesem Zusammenhang konnte in beiden Linien auch eine höhere Abundanz JA-abhängiger Proteine wie Jacalin-Lektin 35 (Rojo et al., 1998) und  $\beta$ -Glukosidase 18 (Stotz et al., 2000) bzw. zusätzlich ein vegetatives Speicherprotein (Benedetti et al., 1995) in *gsnor* Insertionslinien detektiert werden. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die Produktion des Phytotoxins Coronatin durch *Pseudomonas syringae* zurückzuführen, da in beiden Linien die

Anreicherung eines Coronatin-induzierten Proteins nachweisbar war. Zudem wird vermutet, dass Coronatin aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Methyljasmonat JA-abhängige Signalwege aktiviert und damit die SA-abhängige Abwehrreaktion unterdrückt (Weiler et al., 1994, Nomura et al., 2005).

Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Linien ist hingegen bei der Regulation der Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPI) zu beobachten, die in Wildtyp-Pflanzen eine fast 20-fache Akkumulation aufweist und an der korrekten Proteinfaltung beteiligt ist. Darüber hinaus ist dieses Protein als Interaktionspartner sowohl bei der Regulation der Cystein-Biosynthese (Dominguez-Solis et al., 2008) als auch der Aktivierung von Peroxiredoxinen (Laxa et al., 2007) involviert. Eine Akkumulation von PPI nach Pathogenbehandlung wurde bereits in verschiedenen Pflanzenspezies auf Proteinebene (Campo et al., 2004, Kaur et al., 2011) beschrieben, wobei allerdings unklar bleibt, ob PPI aktiv durch die Pflanze oder aufgrund der gezielten Manipulation der Abwehrreaktion durch das Pathogen induziert wird (Coaker et al., 2005). Darüber hinaus ist in Wildtyp-Pflanzen die Produktion eines luminalen Bindeproteins (BIP1) erhöht, welches die Faltung und Sekretion von Abwehrproteinen bei der SAR-Ausbildung erleichtert (Wang et al., 2005).

Demgegenüber ist bei *gsnor* Insertionslinien eine geringere Abundanz redoxsensitiver Proteine wie Phosphoglycerat-Kinase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, eukaryotischer Initiationsfaktor 4A2, Malat-Dehydrogenase und RuBisCO-Activase feststellbar, die allesamt als Zielproteine für eine Thioredoxin-Interaktion identifiziert wurden (Saze et al., 2001, Yamazaki et al., 2004). Möglicherweise könnte ein proteasomaler Abbau dieser Enzyme auf eine irreversible Oxidation von Thiolgruppen in den transgenen Pflanzen nach virulenter Infektion hinweisen oder auf eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Thioredoxin zurückzuführen sein.

#### **4.4. Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität vermittelt Toleranz gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress**

Der Begriff oxidativer Stress bezeichnet das Ungleichgewicht zwischen der Erzeugung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. beschreibt die Situation, wenn die zelluläre ROS-Generierung die antioxidative Kapazität vorübergehend übersteigt (Alscher et al., 1997). Eine Änderung der ROS-Homöostase und die damit verbundene Verschiebung des Redoxstatus wird primär durch äußere Umwelteinflüsse induziert und ist in diesem Zusammenhang bereits nach verschiedenen abiotischen und biotischen Stressbehandlungen beobachtet worden (zusammengefasst in Mittler, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde das Bipyridium-Herbizid Paraquat als ROS-induzierendes Agens verwendet, dessen Wirkort sich

hauptsächlich auf Chloroplasten beschränkt (Vaughn und Duke, 1983). Aufgrund seines negativen Redoxpotentials fungiert Paraquat als alternativer Elektronenakzeptor am Photosystem I, was einerseits die nachgeschaltete Bildung von NADPH verhindert und andererseits durch Autoxidation des entstehenden Paraquatradikals zur Bildung von Superoxidanionen führt (Dodge, 1971, Fujii et al., 1990). Für die schädigende Wirkung von Paraquat - Lipidperoxidation (Boehler-Kohler et al., 1981) und Pigmentzerstörung (Böger und Kunert, 1978) - scheinen in erster Linie sekundär auftretende ROS wie das relativ stabile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie hochreaktive OH<sup>-</sup>-Radikale verantwortlich zu sein (Babs et al., 1989).

Unter Verwendung verschiedener Behandlungsmethoden konnte in *gsnor* Insertionslinien eine deutlich geringere Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Paraquat-Konzentrationen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22), was mit den Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe übereinstimmt (Chen et al., 2009). Die Toleranzausprägung ist dabei mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Veränderung der zellulären NO-Homöostase zurückzuführen, da sowohl weitere transgene Pflanzen mit erhöhtem endogenem NO-Gehalt (Abb. 23) als auch Wildtyp-Pflanzen, die mit dem NO-Donor SNAP vorbehandelt wurden (Abb. 24), eine geringere Sensitivität aufwiesen. Ein protektiver Effekt von NO gegenüber Paraquat-induziertem oxidativen Stress wurde in diesem Zusammenhang auch in Kartoffel und Reis nach exogener Donor-Applikation beschrieben (Beligni und Lamattina, 1999, Hung et al., 2002).

Die durch NO vermittelte Schutzfunktion in *gsnor* Insertionslinien könnte in diesem Fall möglicherweise auf der Reaktion von NO mit Alkoxy- und Peroxid-Radikalen beruhen, die im Rahmen der Lipidperoxidation durch Interaktion von Hydroxylradikalen mit Fettsäuren entstehen. Auf diese Weise wird die durch Fettsäure-Radikale ausgelöste Kettenreaktion der oxidativen Degradation von Lipiden unterbunden (Lipton et al., 1993, Wink et al., 1995). Andererseits ist NO aufgrund seines Radikalcharakters auch in der Lage direkt mit Superoxidradikalen zu reagieren und damit die Bildung weiterer ROS-Spezies zu unterbinden, wodurch dem Molekül selbst eine Funktion als Antioxidans eingeräumt wird (Kanner et al., 1991, Wink et al., 2003). Die Rolle von NO als Radikalfänger könnte in diesem Kontext auch die Unterdrückung des Zelltodprozesses erklären, der in *gsnor* Knock-out Linien nach Paraquat-Behandlung beobachtet wurde (Chen et al., 2009), da für dessen Induktion ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> essentiell ist (Delledonne et al., 2001). Allerdings war weder in dieser Arbeit noch bei Chen (Chen et al., 2009) eine Veränderung der Superoxid-Akkumulation in *gsnor* Insertionslinien nach Paraquat-Applikation im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erkennbar (Abb. 26).

Im Gegensatz dazu konnte hingegen eine deutlich geringere Anreicherung von  $H_2O_2$  in den Mutanten festgestellt werden (Abb. 28), was vermutlich auf die verstärkte Induktion von Glutathion-Peroxidasen (Abb. 27) zurückzuführen ist. Glutathion-Peroxidasen (GPx) schützen die Zellen vor ROS-induziertem oxidativen Stress, indem sie die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Hydroperoxiden, Lipidperoxiden und Wasserstoffperoxid katalysieren (Ursini et al., 1995). In *Arabidopsis thaliana* existieren sieben Isoformen, die in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Rodriguez Milla et al., 2003), wobei vor allem den beiden chloroplastidären Isoformen eine wichtige Funktion bei der Abwehr von oxidativem Stress eingeräumt wird (Chang et al., 2009). Durch Überexpression einzelner GPx-Isoformen aus artfremden Organismen konnte zudem eine höherer Toleranz gegenüber Paraquat in *Arabidopsis thaliana* (Gaber et al., 2006) oder Tabak (Yoshimura et al., 2004) erzielt werden.

Auch Glutathion S-Transferasen (GST) der Theta-Klasse besitzen eine Glutathion-abhängige Peroxidase-Aktivität und können Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen umsetzen (Dixon et al., 2009). Die Hauptaufgabe von GST besteht jedoch in der Detoxifizierung von Xenobiotika durch deren Konjugation an Glutathion, wobei sich die Mehrzahl der Untersuchungen auf ihre Fähigkeit der Herbizidentgiftung konzentriert (Edwards und Dixon, 2000). Auch nach Paraquat-Behandlung konnte eine Expressionssteigerung bestimmter GST-Isoformen in Weizen-Keimlingen (Mauch und Dudler, 1993) und *Arabidopsis thaliana* (DeRidder et al., 2002) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die GST-Gesamtaktivität bestimmt, die allerdings nur eine geringe Induktion nach Kultivierung auf Paraquat-haltigem Medium erfährt (Abb. 30B). Generell muss bei Bestimmung der GST-Aktivität jedoch in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Isoformen sehr unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem verwendeten Testsubstrat CDNB besitzen, weswegen Veränderungen auf enzymatischer Ebene mitunter durch einen geringen Substratumsatz kaschiert werden (Dixon und Edwards, 2010).

Insgesamt betrachtet war in beiden Linien bei allen untersuchten antioxidativen Enzymen eine Aktivitätssteigerung in Gegenwart von Paraquat messbar, wobei in *gsnor* Insertionslinien bereits unter normalen Bedingungen eine konstitutive Erhöhung der Enzymaktivitäten nachgewiesen werden konnte. Die einzige Ausnahme stellt das Ergebnis der SOD-Aktivität dar, welche sowohl im ungestressten Zustand als auch bei Paraquat-induziertem Stress auf einem signifikant niedrigeren Niveau im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen verblieb (Abb. 25). Diese Beobachtung war überraschend, da eine Toleranz gegenüber Paraquat in verschiedenen Pflanzenspezies oftmals im Zusammenhang mit einer erhöhten SOD-Aktivität beschrieben wurde (Tsugane et al., 1999, Abarca et al., 2001, Fujibe

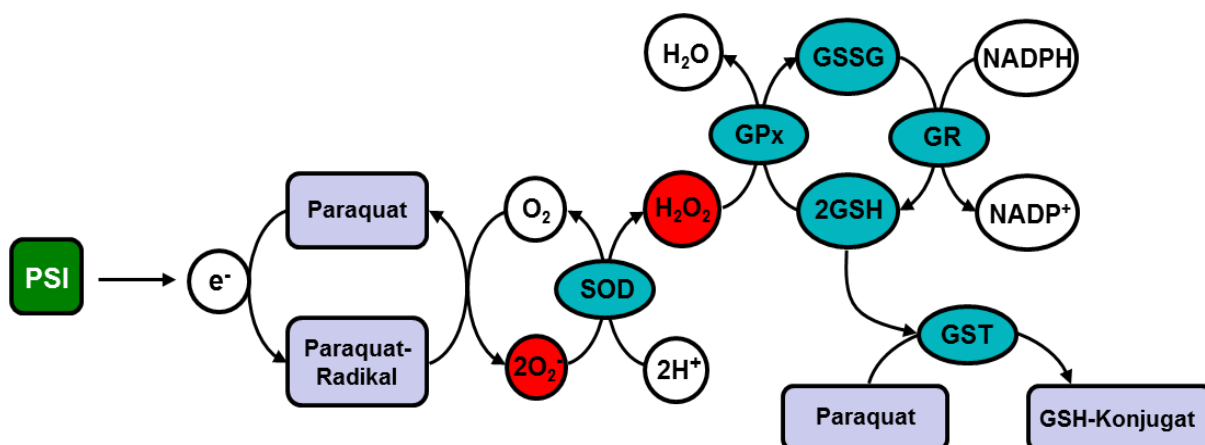


et al., 2004) bzw. durch Überexpression einzelner SOD-Isoformen induziert werden kann (Gupta et al., 1993, Slooten et al., 1995, Van Camp et al., 1996). Als Grund für die eingeschränkte SOD-Aktivität in *gsnor* Insertionslinien ist höchstwahrscheinlich eine NO-abhängigen Inaktivierung einzelner SOD-Isoformen anzuführen, was mit Hilfe von *in-vitro* Tests am rekombinanten Protein bestätigt werden konnte (Abb. 38).

Vor allem Glutathion, dessen Gehalt in *gsnor* Knock-out Linien erheblich stärker akkumuliert im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Abb. 29), scheint eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Paraquattoleranz zu besitzen. Diese Annahme konnte in Keimungsanalysen durch artifizielle Manipulation des Glutathionspiegels sowohl in Wildtyp-Pflanzen nach exogener GSH- bzw. GSSG-Zugabe (Abb. 31) als auch mit Hilfe von SAT-Überexpressionslinien mit erhöhtem endogenen GSH-Gehalt (Abb. 32) verifiziert werden. Eine Erhöhung des Glutathiongehaltes und dessen positive Auswirkungen auf die Herbizidtoleranz wurde zudem auch in Maiskeimlingen (Alla et al., 2008) sowie transgenen Pappel- und Tabakpflanzen nach Überexpression von an der Glutathion-Biosynthese beteiligten Enzymen beobachtet (Gullner et al., 2001, Sugiyama und Sekiya, 2005). Glutathion zählt zu den wichtigsten zellulären Antioxidantien, da es einerseits aufgrund der Cystein-Thiolgruppe direkt als Elektronendonator mit Radikalen wie  $O_2^-$  oder  $OH^-$  interagieren kann und andererseits als Reduktionsäquivalent für Glutathion-Peroxidasen bzw. die Regeneration von Ascorbat im Rahmen des Ascorbat-Glutathion Zyklus fungiert. Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration im millimolaren Bereich in Plastiden und dem Cytosol trägt Glutathion somit maßgeblich dazu bei, ein reduzierendes Milieu im Zellinneren aufrecht zu erhalten (Foyer und Noctor, 2005, Noctor et al, 2011).

Angesichts der doppelt so hohen, konstitutiven GSH-Anreicherung in *gsnor* Knock-out Linien liegt daher die Vermutung nahe, dass der Paraquat-tolerante Phänotyp dieser Pflanzen nicht primär auf die Aktivitätssteigerung von GPx und GSTs, sondern vielmehr auf die höhere Verfügbarkeit von Glutathion zurückzuführen ist. Diese Hypothese wird durch die erhöhte Glutathion-Reduktase (GR) Aktivität in den transgenen Pflanzen untermauert (Abb. 30A), da dieses Enzym für die Rückgewinnung von Glutathion und damit der Aufrechterhaltung des Redoxstatus verantwortlich ist. Unter der Annahme, dass die GR-Aktivität möglicherweise den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glutathion-Regeneration darstellt, würden der *gsnor* Insertionslinie folglich mehr Reduktionsäquivalente für die Abwehrantwort zur Verfügung stehen. Ein Beleg für die Wichtigkeit dieses Enzyms bei der oxidativen Stressabwehr konnte in diesem Zusammenhang auch in transgenen Tabakpflanzen mit überexprimierter Glutathion-Reduktase gezeigt werden, die eine geringere Sensitivität gegenüber Paraquat aufwiesen (Foyer et al., 1991, Aono et al., 1993, Broadbent et al., 1995).

Eine Zusammenfassung aller durchgeführten Analysen zur Charakterisierung des antioxidativen Systems nach Paraquat-Behandlung ist in der Abb. 43 nochmals graphisch veranschaulicht.



**Abb. 43: Zusammenhang zwischen Paraquat und der in dieser Arbeit analysierten Komponenten des Redoxsystems**

Bei Lichteinstrahlung wird Paraquat unter Aufnahme eines Elektrons vom Photosystem I zum Paraquat-Radikal reduziert und durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff wieder oxidiert. Die bei diesem Prozess gebildeten Superoxidanionen werden durch Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches im nächsten Schritt durch Glutathion-Peroxidasen unter Verbrauch von Glutathion zu Wasser abgebaut wird. Entstandenes Glutathiondisulfid wird anschließend mit Hilfe der Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch wieder in Glutathion überführt. Glutathion kann alternativ auch als Konjugationssubstrat zur Detoxifizierung von Herbiziden beitragen, was durch die Enzymklasse der Glutathion S-Transferasen katalysiert wird. Rot hinterlegt sind reaktive Sauerstoffspezies, deren Akkumulation nach Paraquat-Behandlung histochemisch analysiert wurde, während eine blaue Markierung die Bestandteile des antioxidativen Systems kennzeichnet, die im Rahmen dieser Arbeit quantitativ bestimmt wurden.

Abkürzungen: PSI: Photosystem I, e⁻: Elektron, O₂: molekularer Sauerstoff, O₂⁻: Superoxidanion, SOD: Superoxid-Dismutase, H⁺: Proton, H₂O: Wasser, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, GR: Glutathion-Reduktase, GST: Glutathion S-Transferase, NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert), NADP⁺: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (oxidiert)

#### 4.5. Interpretationsmöglichkeiten in Bezug auf das induzierte antioxidative System in *gsnor* Knock-out Linien

Die Analyse des antioxidativen Potentials ermöglicht es im Allgemeinen den zellulären Redoxstatus genauer zu charakterisieren und lässt damit indirekt Rückschlüsse auf die oxidative Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies zu. In *gsnor* Insertionslinien konnte bereits unter normalen physiologischen Bedingungen eine konstitutive Aktivierung von Glutathion und Glutathion-abhängigen Enzymen festgestellt werden. Angesichts der Tatsache, dass ein Anstieg des Glutathion-Gehaltes in vielen Fällen als ein Indiz für Stressbedingungen angesehen wird (Smith, 1985, May und Leaver, 1993), scheint in den Mutanten womöglich eine höhere oxidative Belastung vorzuliegen, was eine Aktivierung des antioxidativen Systems erforderlich macht.

Unter Normalbedingungen ist im Zellmilieu aufgrund der Präsenz von Sauerstoff eine permanente oxidative Bedrohung zellulärer Strukturen vorhanden (Alscher et al., 1997). Die kontinuierliche Bildung von Superoxidradikalen und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies als Nebenprodukte metabolischer Stoffwechselfvorgänge ist unumgänglich und findet in unterschiedlichen Kompartimenten wie Chloroplasten (Asada, 2006), Mitochondrien (Navrot et al., 2007) und Peroxisomen (Del Rio et al., 2006) statt. Eine Detoxifizierung von Superoxidradikalen und damit die Entfernung der Ausgangssubstrate für die Bildung sekundärer ROS-Moleküle wird durch Superoxid-Dismutasen katalysiert. Diese Enzymklasse besteht aus sieben Isoformen, die sich anhand des Metall-Kofaktors unterscheiden und in Analogie zu den potentiellen ROS-Entstehungsorten ebenfalls eine Kompartiment-spezifische Lokalisation aufweisen (Alscher et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben der Mitochondrien-spezifischen MnSOD-Isoform auch die chloroplastidäre FeSOD3-Isoform sowie die peroxisomale CZSOD3-Isoform *in-vitro* durch den NO-Donor Peroxynitrit inhibiert werden (Abb. 38C, D, E). Angesichts des erhöhten endogenen NO-Gehaltes in *gsnor* Knock-out Linien lässt die reduzierte SOD-Gesamtaktivität in den transgenen Pflanzen vermutlich auch auf eine *in-vivo* Hemmung dieser Isoformen schließen. Die dadurch eingeschränkte Kapazität der  $O_2^-$ -Entgiftung könnte somit für die Aktivierung des antioxidativen Systems verantwortlich sein, um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken bzw. den Ausfall der inhibierten SOD-Isoformen auszugleichen. Eine Induktion des antioxidativen Systems als kompensatorischer Effekt für den Verlust bzw. die Reduktion einer Enzymkomponente oder einzelner Antioxidantien ist in der Literatur gut dokumentiert. Ein Beispiel hierfür sind transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die kein Tocopherol mehr bilden können, aber eine verstärkte Synthese von Ascorbat und Glutathion aufweisen (Munné-Bosch, 2005) oder *Arabidopsis*-Mutanten mit eingeschränkter Ascorbat-Produktion, bei denen im Gegenzug eine höherer Enzymaktivität von Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-Peroxidase und Katalase gemessen wurde (Veljovic-Jovanovic et al., 2001). Ein Verlust der Ascorbat-Peroxidase Funktion wurde zudem im Zusammenhang mit einer gestiegenen Anthocyan-Akkumulation beschrieben (Miller et al., 2007). Anhand dieser Beobachtungen kann gefolgert werden, dass ein Radikalfänger die Funktion eines anderen übernehmen kann, was auf eine hohe Redundanz schließen lässt.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivierung des antioxidativen Systems in *gsnor* Insertionslinien zu erklären, könnte in der Veränderung der zellulären NO-Homöostase dieser Pflanzen begründet liegen. Der Verlust der GSNO-Reduktase Aktivität und die damit verbundene Zunahme des endogenen NO-Gehaltes führt zu einer verstärkten Glutathion-Akkumulation,

was auch nach Begasung mit NO in Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden konnte (Abb. 33). Angesichts der Tatsache, dass mit Cystein und  $\gamma$ -Glutamylcystein auch die thiolhaltigen Ausgangs- und Zwischenprodukte des Glutathion-Stoffwechsels zunahmen, scheint NO eine Induktion der gesamten Glutathion-Biosynthese zu verursachen. Da der GSH-Gehalt in den Mutanten zusätzlich zu den bereits erhöhten Werten nach NO-Begasung ansteigt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Reaktion möglicherweise um einen Schutzmechanismus gegenüber toxischen NO-Konzentrationen handelt. Eine Aktivierung der Glutathion-Synthese nach exogener Behandlung mit den NO-Donoren GSNO und SNP konnte darüber hinaus auch in Wurzeln von *Medicago truncatula* (Innocenti et al., 2007) und Maisblättern (Mello et al., 2012) nachgewiesen werden. In beiden Fällen war eine deutliche Expressionssteigerung der Gene  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase detektierbar, was auf eine transkriptionelle Regulation der Glutathion-Bildung durch NO hindeutet.

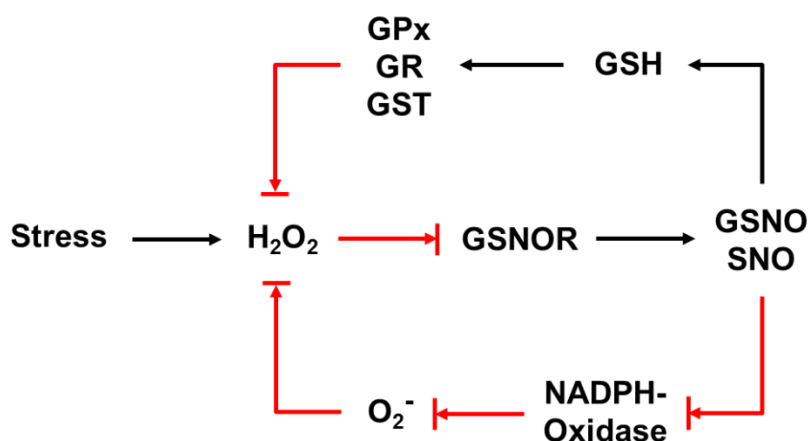
Die Akkumulation von Wasserstoffperoxid nach Stressexposition ist ebenfalls mit einer Zunahme der Glutathion-Gehalte verbunden, wobei dieser Effekt allerdings nur durch endogen produziertes  $H_2O_2$  zustande kommt (Vanacker et al., 2000, Queval et al., 2009, Queval et al., 2011). Die exogene  $H_2O_2$ -Zufuhr hat hingegen keinen Einfluss auf die Transkriptrate der an der Glutathion-Biosynthese beteiligten Gene (Xiang und Oliver, 1998). Da der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus der Glutathion-Anreicherung durch  $H_2O_2$  bisher nicht geklärt ist, wäre in diesem Zusammenhang prinzipiell das Modell einer  $H_2O_2$ -induzierten NO-Produktion zur Stimulation der Glutathion-Synthese denkbar. In der Literatur ist ein Anstieg der NO-Gehalte als unmittelbare Folge der  $H_2O_2$ -Produktion bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Stomata-Schließung (He et al., 2005, Bright et al., 2006), Cytoskelett-Dynamik (Yao et al., 2012), Aktivierung der MAP-Kinase Signaltransduktion (Zhang et al., 2007, Wang et al., 2010) oder dem Zelltodprozess (Lin et al., 2012) beschrieben.

Eine direkte und schnelle Veränderung der NO-Homöostase wäre beispielsweise durch die  $H_2O_2$ -abhängige Hemmung des GSNO-Reduktase Enzyms zu erzielen, was bereits mit Hilfe von *in-vitro* Experimenten am rekombinanten Protein in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Lindermayr demonstriert und vor kurzem auch *in-vivo* nachgewiesen werden konnte (Bai et al., 2012). Die mit der Akkumulation von GSNO verbundene Erhöhung des endogenen NO-Status führt konsequenterweise zu einer Induktion NO-abhängiger Signalwege, was unter anderem eine Stimulation der GSH-Synthese und damit vermutlich auch eine Aktivitätssteigerung Glutathion-abhängiger Enzyme hervorruft (Abb. 44). Auf diese Weise wird einerseits eine progressive ROS-Anreicherung verhindert und andererseits das durch

oxidativen Stress entstanden Ungleichgewicht des Redoxsystems behoben bzw. wieder reduzierende Verhältnisse initiiert. Eine Funktion von NO als Stimulus für die Induktion der oxidativen Stressabwehr ist in diesem Zusammenhang bei vielen ROS-induzierenden Umwelteinflüssen wie Metallstress (Hsu und Kao, 2004, Wang und Yang, 2005), Salzstress (Zhao et al., 2007, Xuexia et al., 2011), Hitzestress (Song et al., 2006), Trockenstress (García-Mata und Lamattina, 2001), Lichtstress (Xu et al., 2010), UV-Bestrahlung (Shi et al., 2005) oder Verwundung (Lin et al., 2011) beschrieben.

Darüber hinaus hätte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Hemmung des GSNO-Reduktase-Enzyms, dessen zelluläre Lokalisation aufgrund eines fehlenden Transitpeptids primär im Cytosol vermutet wird, einen unmittelbaren Anstieg der Nitrosothiol-Gehalte zur Folge, da GSNO als Donormolekül für Nitrosylierungs-Reaktionen fungiert. In diesem Zusammenhang könnte die NO-abhängige Interaktion mit Cysteinresten von Proteinen auch als eine Art Schutzfunktion angesehen werden, um eine irreversible, oxidative Modifikation von Proteinen durch ROS-Moleküle zu verhindern (Spadaro et al., 2010). Durch Nitrosylierung von NADPH-Oxidasen und der damit verbundenen Hemmung der Enzymaktivität, ist NO allerdings auch in der Lage, direkt die endogene Synthese von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und damit auch die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu unterbinden (Yun et al., 2011). Membranständige NADPH-Oxidasen werden als wichtigste Quelle für endogen produziertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Stressexposition angesehen (Perdov und Van Breusegem, 2012), wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermutlich durch Aquaporine aus dem Apoplasten in das Cytosol transportiert wird (Biernert et al., 2007, Dynowski et al., 2008). Darüber hinaus kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allerdings auch durch Membrandiffusion auf das Cytosol übergreifen, was am Beispiel von Chloroplasten nach Belichtung gezeigt werden konnte (Mubarakshina et al., 2010).

Das Modell zur Wechselwirkung zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NO lässt sich prinzipiell als generelle Reaktion auf abiotische oder biotische Stressbedingungen übertragen (Abb. 44). Das Enzym GSNO-Reduktase würde in diesem Kontext die Funktion eines intrazellulären Redox-Schalters erfüllen, dessen Inhibierung nach oxidativem Stress eine NO-abhängige Signalkaskade auslöst, die einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies entgegenwirkt und damit eine überproportionale Schädigung zellulärer Schäden unterbindet. Unter diesem Gesichtspunkt ist der Paraquat-tolerante Phänotyp der *gsnor* Insertionslinie vermutlich primär als indirekter „Priming“-Effekt des antioxidativen Systems zu betrachten, der als Folge der erhöhten NO-Homöostase in den transgenen Pflanzen ausgelöst wird.



**Abb. 44: Modell zur Funktion von GSNO-Reduktase als Redox-Sensor**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten in Kombination mit Information aus der Literatur deuten darauf hin, dass eine stressbedingte Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Induktion NO-abhängiger Signalwege verantwortlich ist, welche wiederum einer oxidativen Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies entgegenwirken. Eine Inhibierung des GSNO-Reduktase Enzyms und die damit verbundene Akkumulation von GSNO stellt in diesem Zusammenhang ein effizientes regulatorisches Element dar, um eine rasche Erhöhung des endogenen NO-Status zu erzielen. (GS)NO kann dabei einerseits indirekt über die Stimulation der Glutathion-Biosynthese und Glutathion-assoziiierter Enzyme eine Aktivierung des antioxidativen Systems bewirken oder andererseits direkt durch Hemmung von NADPH-Oxidasen die endogene Produktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und damit auch die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterbinden. Schwarze Pfeile kennzeichnen einen stimulierenden Effekt, während rote Pfeile einen hemmenden Einfluss symbolisieren.

Abkürzungen: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid, GSNO(R): S-Nitrosoglutathion-(Reduktase), SNO: Nitrosothiole, GSH: Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GR: Glutathion-Reduktase, GST: Glutathion S-Transferase, NADPH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superoxid

#### 4.6. MnSOD als Zielprotein für die *in-vitro* Inhibierung durch Peroxynitrit und strukturelle Aspekte der Nitrierung von Tyrosin 63

Mn-Superoxid-Dismutasen sind antioxidative Schutzenzyme und ubiquitär in aeroben Organismen vorhanden, die auf die Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff für die Energiegewinnung im Rahmen der Zellatmung angewiesen sind. Dieser in den Mitochondrien stattfindende Prozess führt neben der ATP-Gewinnung auch zur Bildung von Superoxidradikalen, da O<sub>2</sub>-Moleküle als alternative Elektronenakzeptoren entlang der Atmungskette fungieren (Navrot et al., 2007). MnSOD ist als einziger Bestandteil des antioxidativen Systems in Mitochondrien in der Lage, eine enzymatische Umsetzung des unter physiologischen Bedingungen als auch bei oxidativem Stress entstehenden Superoxidanions zu katalysieren. Zwar können O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikale in wässrigen Medien auch spontan mit einer Rate von  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disproportionieren (Fridovich, 1983), aber in Gegenwart von Superoxid-Dismutasen wird diese Reaktion um den Faktor  $10^4$  beschleunigt (Scandalios, 1993). Der Mechanismus der Disproportionierung basiert dabei auf einem zweistufigen Reaktionsprozess, bei dem das gebundene Metallion im ersten Schritt durch ein Superoxidanion reduziert wird und im zweiten Schritt durch Abgabe eines

Elektrons auf ein weiteres Superoxidradikal wieder oxidiert wird (Miller, 2004). Superoxidradikale sind zwar im Vergleich zu den anderen reaktiven Sauerstoffspezies relativ reaktionsträge, führen aber zur Bildung von toxischen Hydroxylradikalen im Rahmen der eisenkatalysierten Haber-Weis-Reaktion. Diese hochreaktiven und kurzlebigen Radikale können auf enzymatischem Weg nicht entfernt werden und gelten als Hauptursache für die Zerstörung von Membranlipiden und Modifikationen von DNA-Basen in biologischen Systemen (Halliwell und Gutteridge, 1984). Das Enzym MnSOD spielt somit eine wichtige Rolle hinsichtlich der Kontrolle mitochondrialer ROS-Gehalte und schützt vor oxidativen Schäden, was auch in transgenen Pflanzen mit überexprimierter MnSOD beobachtet werden konnte (Bowler et al., 1991, Van Camp et al., 1994, Van Breusegem et al., 1999).

MnSOD ist wie alle sieben Superoxid-Dismutasen in *Arabidopsis thaliana* kerncodiert, besitzt aber als einzige SOD-Isoform ein mitochondriales Signalpeptid, das für den Transport und die Lokalisation innerhalb der Mitochondrien-Matrix verantwortlich ist (Kliebenstein et al., 1998). Es liegt entweder als Homodimer oder Homotetramer vor und besitzt im Gegensatz zu den Cu/Zn-Systemen ein mononukleares Aktivzentrum mit einem zentralen Manganion pro Untereinheit (Alscher et al., 2002), dessen Ligandenumgebung gewöhnlich aus drei Imidazolringen (Histidine) und einem Carboxylat (Aspartat) besteht (Pilon et al., 2011). Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen der humanen MnSOD konnte zudem gezeigt werden, dass das Metallion innerhalb der Substratbindetasche aufgrund der zusätzlichen Bindung eines Wassermoleküls 5-fach koordiniert ist, was in einer trigonal bipyramidalen Konfiguration resultiert (Perry et al., 2010).

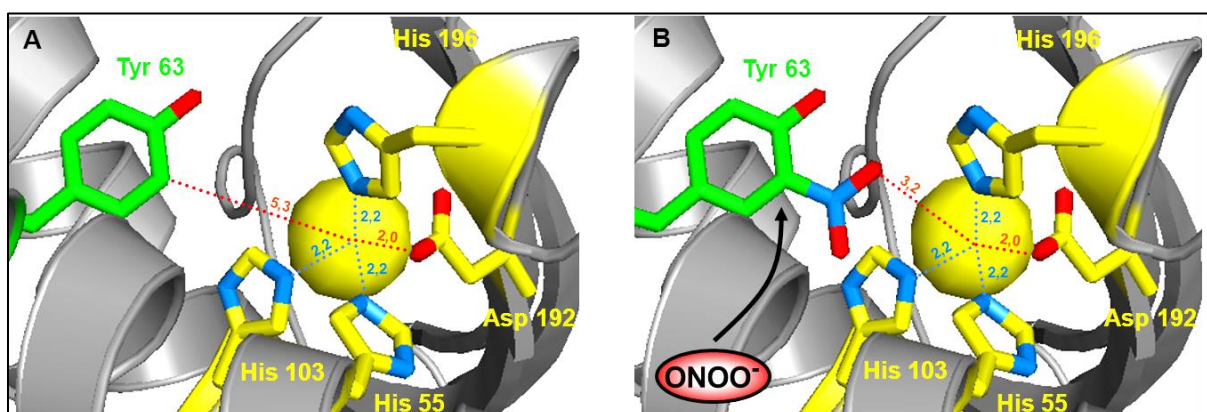
Die Regulation der MnSOD-Aktivität ist in Pflanzen bisher kaum untersucht. In isolierten Mitochondrien-Fractionen aus Kartoffel und Reis wurde dieses Enzym unter anderem zwar als Zielprotein für Phosphorylierungs- und Oxidationsprozesse identifiziert, aber eine potentielle Auswirkung auf die Aktivitätsänderung nicht weiter analysiert (Bykova et al., 2003, Kristensen et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine NO-abhängige Inhibierung der Enzymaktivität von MnSOD in Pflanzen nach *in-vitro* Behandlung mit Peroxynitrit gezeigt werden (Abb. 38C), das als Donor für Nitrierungsreaktionen fungiert (Radi et al., 2004). Die Zugabe von 500  $\mu$ M Peroxynitrit resultierte in einer nahezu vollständigen Inaktivierung des Enzyms, was auch in früheren *in-vitro* Studien mit der humanen MnSOD (Mac-Millan-Crow et al., 1998) bzw. der MnSOD aus *E.coli* (Surmeli et al., 2010) gezeigt werden konnte und auf einen konservierten Reaktionsmechanismus hindeutet. Da bereits in Gegenwart von 100  $\mu$ M Peroxynitrit eine 30%-ige Hemmung detektierbar war, spricht die hohe Sensitivität der MnSOD dafür, dass eine Nitrierung vermutlich auch *in-vivo* stattfindet, zumal die Produktion von Peroxynitrit unter

physiologischen Bedingungen auf 50-100  $\mu\text{M}$  geschätzt wird (Szabó et al., 2007). Die reduzierte SOD-Gesamtaktivität in *gsnor* Knock-out Linien mit höherem endogenem NO-Gehalt könnte in diesem Zusammenhang als zusätzliches Indiz für diese Hypothese angesehen werden (Abb. 25). Die konzentrationsabhängige Abnahme der Enzymaktivität war gleichzeitig mit einer verstärkten Nitrotyrosin-Akkumulation verknüpft (Abb. 39), was allgemein als Indikator für eine posttranslationale Modifikation durch Nitrierung angesehen wird (Van der Vliet et al., 1996). Die Spezifität dieser Reaktion konnte zusätzlich durch Zugabe von Urat demonstriert werden, dass als Radikalfänger mit Peroxynitrit reagiert (Squadrito et al., 2000) und die Inhibierung von MnSOD bzw. die Akkumulation nitrierter Tyrosinreste auch noch bei einem fünffachen molaren Überschuss des NO-Donors effizient verhindert. Angesichts der Tatsache, dass Peroxynitrit allerdings auch Thiolgruppen oxidieren kann (Quijano et al., 1997) und dessen artifizielle Herstellung auf Wasserstoffperoxid als Ausgangssubstrat basiert, kann eine Enzymhemmung durch oxidative Reaktionsprozesse nicht vollständig ausgeschlossen werden. Demgegenüber kann hingegen die Möglichkeit einer Inaktivierung von MnSOD durch Nitrosylierung oder Glutathionylierung vernachlässigt werden, da keine Veränderung nach Inkubation mit dem NO-Donor GSNO messbar war (Anhang Abb. 8). Diese Beobachtung stimmt zudem mit einer früheren Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Durner überein, bei der MnSOD nicht als nitrosyliertes Zielprotein in isolierten Mitochondrien-Fraktionen identifiziert werden konnte (Palmieri et al., 2010).

Mittels Massenspektrometrie konnten insgesamt neun verschiedene Tyrosinreste als Nitrierungsstellen detektiert werden (Tab. 3), wobei vor allem eine Modifikation des Tyrosinrests 63 für die Aktivitätshemmung der MnSOD verantwortlich zu sein scheint. Durch Aminosäure-Substitution an dieser Stelle gegen Phenylalanin konnte der Einfluss der Nitrierung auf die Enzym-Inhibierung deutlich reduziert werden (Abb. 41), was sich auch in einer eingeschränkten Nitrotyrosin-Anreicherung widerspiegelte (Abb. 42). Die Tatsache, dass die mutierte Variante jedoch weiterhin eine geringe Sensitivität gegenüber Peroxynitrit aufwies, was durch Inkubation mit dem Hemmstoff Urat wieder aufgehoben werden konnte, deutet darauf hin, dass noch weitere Tyrosinreste an diesem Prozess zu einem gewissen Grad beteiligt sind. Die zentrale Bedeutung von Tyrosin 63 für die Inaktivierung der MnSOD durch Nitrierung konnte auch bei der humanen Isoform nachgewiesen werden, wobei diese hochkonservierte Aminosäure in diesem Fall als Tyrosin 34 bezeichnet wird (Mac-Millan-Crow et al., 1998, Yamakura et al., 1998).



Eine Erklärung für die Enzyminhibierung ist vermutlich primär auf die räumliche Lokalisation von Tyr 63 mit einem Abstand von nur 5,3 Ångström vom aktiven Zentrum zurückzuführen, was in der Abb. 45 nochmals graphisch veranschaulicht ist. Angesichts einer Nitrierung des aromatischen Ringes in ortho-Position zur Hydroxylgruppe wäre die Nitrogruppe direkt in Richtung des aktiven Zentrums lokalisiert, wodurch sich der Abstand zum koordinierten Mangan-Ion auf 3,2 Ångström verringern würde. Aufgrund der damit verbundenen sterischen Interferenzen wäre somit mutmaßlich der Substratzugang zum aktiven Zentrum blockiert oder die direkte Bindung des Superoxidanions beeinträchtigt. In Kristallisationsstudien mit der humanen MnSOD-Isoform konnte zudem gezeigt werden, dass in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Wassermolekülen und polaren Gruppen benachbarter Aminosäuren existiert. Der Tyrosinrest 34 ist ein Bestandteil dieses Systems, das vermutlich den Protontransfer auf ein gebundenes Superoxidanion innerhalb der Substrat-Bindetasche begünstigt (Perry et al., 2010). Durch Nitrierung und der damit verbundenen Verringerung des pKa-Wertes (Radi et al., 2004), wäre prinzipiell eine Deprotonierung des Phenolrings denkbar, was eine Schwächung oder Zerstörung der Wasserstoffbrücken-Bindungen zur Folge hätte. Möglicherweise führt die Präsenz einer Nitrogruppe in der Nähe des aktiven Zentrums aber auch zu einer elektrostatischen Abstoßung des negativ geladenen Substrats und bewirkt darüber hinaus eine Veränderung des Redoxpotentials des Enzyms (Edwards et al., 2001).



**Abb. 45: Vergrößerter Ausschnitt des aktiven Zentrums von MnSOD**

Dargestellt ist eine detaillierte Nahaufnahme der Substrat-Bindetasche inklusive des Tyrosinrests 63 (grünes Stabmodell) im Normalzustand (Abb. A) bzw. nach Modellierung einer Nitrogruppe in ortho-Position der Hydroxylgruppe des aromatischen Rings (Abb. B). Gelbe Stabmodelle symbolisieren die räumliche Lage der Aminosäuren Histidin und Aspartat des aktiven Zentrums. Gestrichelte Linien geben die Entfernung der einzelnen Aminosäuren zum Mangan-Ion innerhalb des aktiven Zentrums in Ångström an. Sauerstoff-Atome sind rot markiert und Stickstoffatome durch eine blaue Farbe gekennzeichnet. Die Strukturmodellierung erfolgte mit Hilfe des Programms SWISSMODEL, während die Visualisierung mit Hilfe des Programms Pymol durchgeführt wurde.

Abkürzungen: Tyr: Tyrosin, His: Histidin, Asp: Aspartat, ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit

## 5. Literaturverzeichnis

- Abarca D., Roldán M., Martín M., Sabater B.: *Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme, *Journal of Experimental Botany*, 52, S.: 1417-1425, 2001
- Abat J., Mattoo A., Deswal R.: S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition, *FEBS Journal*, 275, S.: 2862-2872, 2008
- Abello N., Kerstjens H., Postma D., Bischoff R.: Protein tyrosine nitration: Selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins, *Journal of Proteome Research*, 8, S.: 3222-3238, 2009
- Abramovitch R., Anderson J., Martin G.: Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, S.: 601-611, 2006
- Achkor H., Díaz M., Fernández M., Biosca J., Parés X, Martínez M.: Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 132, S. 2248-2255, 2003
- Ahlfors R., Brosché M., Kollist H., Kangasjärvi J.: Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 58, S.: 1-12, 2009
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R., Valderrama R., Chaki M., Barroso J., Del Río L., Palma J., Corpas F.: Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress, *Plant, Cell and Environment*, 35, S.: 281-295, 2012
- Alla M., Badawi A., Hassan N., El-Bastawisy Z., Badran E.: Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, S.: 371-379, 2008
- Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.: Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream, *Journal of Experimental Botany*, 56, S.: 1535-1544, 2005
- Alscher R., Donahue J., Cramer C.: Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells, *Physiologia Plantarum*, 100, S.: 224-233, 1997
- Alscher R., Erturk N., Heath L.: Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53, S.: 1331-1341, 2002
- Alvarez C., Lozano-Juste J., Romero L., García I., Gotor C., León J.: Inhibition of *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol)lyase A1 by tyrosine nitration, *Journal of Biological Chemistry*, 286, S.: 578-586, 2011
- Aono M., Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N.: Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity, *Plant and Cell Physiology*, 4, S.: 129-135, 1993
- Apel K. und Hirt H.: Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, S.: 373-399, 2004
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J.: Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber, *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, S.: 177-186, 2009
- Asada K.: Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141, S.: 391-396, 2006

- Asano T., Kimura M., Nishiuchi T.: The defense response in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium sporotrichioides*, *Proteome Science*, 10, S.: 1-10, 2012
- Astier J., Rasul S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz S., Durner J., Lindermayr C., Wendehenne D.: S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants, *Plant Science*, 181, S.: 527-522, 2011
- Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H., Wendehenne D.: Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogeiin signalling in tobacco cells, *Biochemical Journal*, 447, S.: 249-260, 2012
- Auld D. und Bergman T.: Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, S.: 3961-3970, 2008
- Babbs C., Pham J., Coolbaugh R.: Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants, *Plant Physiology*, 90, S.: 1267-1270, 1989
- Bai X., Chen J., Kong X., Todd C., Yang Y., Hu X., Li D.: Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis, *Free Radical Biology and Medicine*, 53, S.: 710-720, 2012
- Barroso J., Corpas F., Carreras A., Sandalio L., Valderrama R., Palma J., Lupiáñez J., Del Río L.: Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, S.: 36729-36733, 1999
- Barroso J., Corpas F., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M., Valderrama R., Sandalio L., Del Río L.: Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress, *Journal of Experimental Botany*, 57, S.: 1785-1793, 2006
- Baudouin E.: The language of nitric oxide signaling, *Plant Biology*, 13, S.: 233-242, 2011
- Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N., Puppo A.: Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, S.: 970-975, 2006
- Bayden A., Yakovlev V., Graves P., Mikkelsen R., Kellogg G.: Factors influencing protein tyrosine nitration-Structure-based predictive models, *Free Radical Biology and Medicine*, 50, S.: 749-762, 2011
- Belenghi B., Romero-Puertas M., Vercammen D., Brackenier A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F.: Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue, *Journal of Biological Chemistry*, 282, S.: 1352-1358, 2007
- Beligni M., Lamattina L.: Is nitric oxide toxic or protective?, *Trends in Plant Science*, 4, S.: 299-300, 1999
- Beligni M. und Lamattina L.: Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants, *Nitric Oxide*, 3, S.: 199-208, 1999
- Beligni M., Lamattina L.: Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants, *Planta*, 210, S.: 215-221, 2000
- Beligni M., Lamattina L.: Nitric oxide: A non-traditional regulator of plant growth, *Trends in Plant Science*, 6, S.: 508-509, 2001
- Benedetti C., Xie, D., Turner J.: COI1-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to methyl jasmonate, *Plant Physiology*, 109, S.: 567-572, 1995

- Benhar M., Forrester M., Stamler J.: Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, S.: 721-732, 2009
- Berger S., Sinha A., Roitsch T.: Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions, *Journal of Experimental Botany*, 58, S.: 4019-4026, 2007
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D.: New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 59, S.: 21-39, 2008
- Bethke P., Badger M., Jones R.: Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues, *Plant Cell*, 16, S.: 332-341, 2004
- Bethke P., Gubler F., Jacobsen J., Jones R.: Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide, *Planta*, 219, S.: 847-855, 2004
- Bienert G., Møller A., Kristiansen K., Schulz A., Møller I., Schjoerring J., Jahn T.: Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes, *Journal of Biological Chemistry*, 282, S.: 1183-1192, 2007
- Böger P. und Kunert K.: Phytotoxic action of paraquat on the photosynthetic apparatus, *Zeitung für Naturforschung*, 33, S.: 668-694, 1978
- Boehler-Kohler B., Schopf M., Böger P.: The effect of paraquat on membrane lipids. In: *Photosynthesis IV. Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment*, Balaban International Science Services, Philadelphia, USA, 1981
- Bonfig K., Schreiber U., Gabler A., Roitsch T., Berger S.: Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves, *Planta*, 225, S.: 1-12, 2006
- Bosworth C., Toledo J., Zmijewski J., Li Q., Lancaster J.: Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, S.: 4671-4676, 2009
- Bowler C., Sloaten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M., Inzé D.: Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants, *EMBO Journal*, 10, S.: 1723-1732, 1991
- Bright J., Desikan R., Hancock J., Weir I., Neill S.: ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis, *Plant Journal*, 45, S.: 113-122, 2006
- Broadbent P., Creissen G., Kular B., Wellburn A., Mullineaux P.: Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity, *Plant Journal*, 8, S.: 247-255, 1995
- Bykova N., Egsgaard H., Møller I.: Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes, *FEBS Letters*, 540, S.: 141-146, 2003
- Bykova N. und Rampitsch C.: Modulating protein function through reversible oxidation: Redox-mediated processes in plants revealed through proteomics, *Proteomics*, 13, S.: 579-596, 2013
- Campo S., Carrascal M., Coca M., Abián J., San Segundo B.: The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach, *Proteomics*, 4, S.: 383-396, 2004
- Casasoli M., Spadoni S., Lilley K., Cervone F., De Lorenzo G., Mattei B.: Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by oligogalacturonides in *Arabidopsis thaliana*, *Proteomics*, 8, S.: 1042-1054, 2008
- Cassina A. und Radi R.: Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 328, S.: 309-316, 1996
- Cecconi D., Orzetti S., Vandelle E., Rinalducci S., Zolla L., Delledonne M.: Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*, *Electrophoresis*, 30, S.: 2460-2468, 2009

- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A., Carreras A., López-Jaramillo J., Luque F., Palma J., Pedrajas J., Begara-Morales J., Sánchez-Calvo B., Gómez-Rodríguez M., Corpas F., Barroso J.: Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls, *Journal of Experimental Botany*, 60, S.: 4221-4234, 2009
- Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Carreras A., Esteban F., Luque F., Gómez-Rodríguez M., Begara-Morales J., Corpas F., Barroso J.: Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction, *Plant and Cell Physiology*, 50, S.: 265-279, 2009
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A., Carreras A., Gómez-Rodríguez M., Pedrajas J., Begara-Morales C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F., Barroso J.: Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings, *Journal of Experimental Botany*, 62, S.: 1803-1813, 2011
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A., Carreras A., Gómez-Rodríguez M., López-Jaramillo J., Begara-Morales J., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F., Barroso J.: High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration, *Plant, Cell and Environment*, 34, S.: 1803-1818, 2011
- Chandok M., Ytterberg A., Van Wijk K., Klessig D.: The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex, *Cell*, 113, S.: 469-482, 2003
- Chang C., Ślesak I., Jordá L., Sotnikov A., Melzer M., Miszalski Z., Mullineaux P., Parker J., Karpińska B., Karpiński S.: *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses, *Plant Physiology*, 150, S.: 670-683, 2009
- Chase T.: Alcohol dehydrogenases: Identification and names for gene families, *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, S.: 333-350, 1999
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F., Li C., Dong H., Yang X., Zhang J., Zuo J.: The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death, *Cell Research*, 19, S.: 1377-1387, 2009
- Chivasa S., Hamilton J., Pringle R., Ndimba B., Simon W., Lindsey K., Slabas A.: Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures, *Journal of Experimental Botany*, 57, S.: 1553-1562, 2006
- Coaker G., Falick A., Staskawicz B.: Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin, *Science*, 308, S.: 548-550, 2005
- Corpas F., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J., Carreras A., Begara-Morales J., Airaki M., Del Río L., Barroso J.: Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions, *Plant and Cell Physiology*, 49, S.: 1711-1722, 2008
- Clark D., Durner J., Navarre D., Klessig D.: Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, S.: 1380-1384, 2000
- Clarke A., Desikan R., Hurst R., Hancock J., Neill S.: NO way back: Nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures, *Plant Journal*, 24, S.: 667-677, 2000
- Conrath U., Amoroso G., Köhle H., Sültemeyer D.: Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry, *Plant Journal*, 38, S.: 1015-1022, 2004
- Cooney R., Harwood P., Custer L., Franke A.: Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids, *Environmental Health Perspectives*, 102, S.: 460-462, 1994
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L.: Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato, *Planta*, 218, S.: 900-905, 2004

- Dangl J. und Jones J.: Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature*, 411, S.: 826-833, 2001
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F.: Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, S.: 779-795, 2000
- Del Río L., Corpas F., Sandalio L., Palma J., Gómez L., Barroso J.: Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *Journal of Experimental Botany*, 53, S.: 1255-1272, 2002
- Del Rio L., Sandalio L., Corpas F., Palma J., Barroso J.: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling, *Plant Physiology*, 141, S.: 330-335, 2006
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R., Lamb C.: Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature*, 394, S.: 585-588, 1998
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C.: Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, S.: 13454-13459, 2001
- De Pinto M., Tommasi F., De Gara L.: Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells, *Plant Physiology*, 130, S.: 698-708, 2002
- DeRidder B., Dixon D., Beussman D., Edwards R. Goldsbrough P.: Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners, *Plant Physiology*, 130, S.: 1497-1505, 2002
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M.: The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid, *FEBS Letters*, 543, S.: 136-139, 2003
- Dixon D., Hawkins T., Hussey P. Edwards R.: Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily, *Journal of Experimental Botany*, 60, S.: 1207-1218, 2009
- Dixon D. und Edwards R.: Glutathione Transferases, In: *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists, Rockville, USA, 8, S.: 1-15, 2010
- Dodge A.: The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat, *Endeavour*, 30, S.: 130-135, 1971
- Dolferus R., Jacobs M., Peacock W., Dennis E.: Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* ADH gene, *Plant Physiology*, 105, S.: 1075-1087, 1994
- Dolferus R., Osterman J., Peacock W., Dennis E.: Cloning of the *Arabidopsis* and rice formaldehyde dehydrogenase genes: Implications for the origin of plant ADH enzymes, *Genetics*, 146, S.: 1131-1141, 1997
- Dominguez-Solis J., Zengyong H., Amparo L., Julie T., Buchanan B., Sheng L.: A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, S.: 16386-16391, 2008
- Duester G., Farrés J., Felder M., Holmes R., Höög J., Parés X., Plapp B., Yin S., Jörnvall H.: Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family, *Biochemical Pharmacology*, 58, S.: 389-395, 1999
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D.: Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, S.: 10328-10333, 1998
- Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O., Ludewig U.: Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Biochemical Journal*, 414, S.: 53-61, 2008

- Edwards R. und Dixon D.: The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: *Herbicides and their mechanisms of action*, Sheffield Academic Press, UK, S.: 38-71, 2000
- Edwards R., Whittaker M., Whittaker J., Baker E., Jameson G.: Outer sphere mutations perturb metal reactivity in manganese superoxide dismutase, *Biochemistry*, 40, S.: 15-27, 2001
- Espunya M., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M.: Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development, *Plant, Cell and Environment*, 29, S.: 1002-1011, 2006
- Espunya M., De Michele R., Gómez-Cadenas A., Martínez M.: S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 63, S.: 3219-3227, 2012
- Fall R. und Benson A.: Leaf methanol - the simplest natural product from plants, *Trends in Plant Science*, 1, S.: 296-301, 1996
- Feechan A., Kwon E., Yun B., Wang Y., Pallas J., Loake G.: A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, S.: 8054-8059, 2005
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D., Muday G., Lorenzo O.: Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing pin-formed 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, S.: 18506-18511, 2011
- Ferrer M. und Ros Barceló A.: Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*, *Plant, Cell and Environment*, 22, S.: 891-897, 1999
- Filippou P., Antoniou C., Fotopoulos V.: Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants, *Plant Signaling and Behavior*, 6, S.: 270-277, 2011
- Fliegmann J. und Sandermann H.: Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: A novel plant gene of detoxification, *Plant Molecular Biology*, 34, S.: 843-854, 1997
- Flor H.: Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9, S.: 275-296, 1971
- Floryszak-Wieczorek J., Arasimowicz M., Milczarek G., Jelen H., Jackowiak H.: Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen, *New Phytologist*, 175, S.: 718-730, 2007
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J.: In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco, *Plant Journal*, 23, S.: 817-824, 2000
- Ford P.: Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins, *Inorganic Chemistry*, 49, S.: 6226-6239, 2010
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L.: Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent, *Plant Cell*, 22, S.: 3816-3830, 2010
- Foyer C., Lelandais M., Galap C. und Kunert K.: Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions, *Plant Physiology*, 97, S.: 863-872, 1991
- Foyer C. und Noctor G.: Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell*, 17, S.: 1866-1875, 2005
- Foyer C. und Noctor G.: Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub, *Plant Physiology*, 155, S.: 2-18, 2011

- Freeman L., Persans M., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I., Salt D.: Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *thlaspi* nickel hyperaccumulators, *Plant Cell*, 16, S. 2176-2191, 2004
- Fridovich I.: Superoxide radical: An endogenous toxicant, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, S.: 239-257, 1983
- Fujibe T., Saji H., Arakawa K., Yabe N., Takeuchi Y., Yamamoto K.: A methyl viologen-resistant mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive *rcd1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation, *Plant Physiology*, 134, S.: 275-285, 2004
- Fujii T., Yokoyama E., Inoue K., Sakurai H.: The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1015, S.: 41-48, 1990
- Gaber A., Yoshimura K., Yamamoto T., Yabuta Y., Takeda T., Miyasaka H., Nakano Y., Shigeoka S.: Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*, *Physiologia Plantarum*, 128, S.: 251-262, 2006
- Galetskiy D., Lohscheider J., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E., Adamska I.: Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, S.: 184-190, 2011
- Galweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K.: Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue, *Science*, 282, S.: 2226-2230, 1998
- Garabagi F. und Strommer J.: 2004. Distinct genes produce the alcohol dehydrogenases of pollen and maternal tissues in *Petunia hybrid*, *Biochemical Genetics*, 42, S.: 199-208, 2004
- García-Mata C. und Lamattina L.: Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiology*, 126, S.: 1196-1204, 2001
- García-Mata C. und Lamattina L.: Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells, *Plant Physiology*, 128, S.: 790-792, 2002
- Gardner P., Costantino G., Szabó C., Salzman A.: Nitric oxide sensitivity of the aconitases, *Journal of Biological Chemistry*, 272, S.: 25071-25076, 1997
- Gaupels F., Furch A., Will T., Mur L., Kogel K., Van Bel A.: Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals, *New Phytologist*, 178, S.: 634-646, 2008
- Gill S. und Tuteja N.: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, S.: 909-930, 2010
- Gouvêa C., Souza J., Magalhães C., Martins I.: NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments, *Plant Growth Regulation*, 21, S.: 183-187, 1997
- Gow A. und Stamler J.: Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions, *Nature*, 391, S.: 169-173, 1998
- Graziano M., Beligni M., Lamattina L.: Nitric oxide improves internal iron availability in plants, *Plant Physiology*, 130, S.: 1852-1859, 2002
- Groppa M., Rosales E., Iannone M., Benavides M.: Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots, *Phytochemistry*, 69, S.: 2609-2615, 2008
- Grbić V. und Bleecker A.: Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*, *Plant Journal*, 8, S.: 595-602, 1995
- Gullner G., Kömives T., Rennenberg H.: Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides, *Journal of Experimental Botany*, 52, S.: 971-979, 2001



- Guo F., Okamoto M., Crawford N.: Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling, *Science*, 302, S. 100-103, 2003
- Guo F. und Crawford N.: *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence, *Plant Cell*, 17, S.: 3436-3450, 2005
- Guo P., Cao Y., Li Z., Zhao B.: Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust, *Plant, Cell and Environment*, 27, S.: 473-477, 2004
- Gupta A., Webb R., Holaday A., Allen R.: Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress, *Plant Physiology*, 103, S.: 1067-1073, 1993
- Gupta K., Hebelstrup K., Mur L., Igamberdiev A.: Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide, *FEBS Letters*, 585, S.: 3843-3849, 2011
- Gutteridge J. und Halliwell B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *Trends in Biochemical Sciences*, 15, S.: 129-135, 1990
- Halliwell B. und Gutteridge J.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, S.: 1-14, 1984
- Hanson A., Jacobsen J., Zwar J.: Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers, *Plant Physiology*, 75, S.: 573-581, 1984
- Hayat S., Hasan S., Mori M., Fariduddin Q., Ahmad A.: Nitric oxide: Chemistry, biosynthesis, and physiological role. In: *Nitric oxide in plant physiology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S.: 1-15, 2010
- He J., Xu H., She X., Song X., Zhao W.: The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean, *Functional Plant Biology*, 32, S.: 237-247, 2005
- He Y., Tang R., Hao Y., Stevens R., Cook C., Ahn S., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R., Crawford N., Pei Z.: Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition, *Science*, 305, S.: 1968-1971, 2004
- Henry Y., Guissani A., Ducastel B.: Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides, Landes Biomedical Publishing, Austin (USA), S.: 15-46, 1997
- Herold S. und Puppo A.: Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: A possible role in functioning nodules?, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10, S.: 935-945, 2005
- Hess D., Matsumoto A., Kim S., Marshall H., Stamler J.: Protein S-nitrosylation: Purview and parameters, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, S.: 150-166, 2005
- Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R.: Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications, *Physiologia Plantarum*, 133, S.: 211-228, 2008
- Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C.: Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO- homeostasis, *Proteomics*, 11, S.: 1664-1683, 2011
- Howden R., Andersen C., Goldsbrough P., Cobbett C.: A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*, 107, S. 1067-1073, 1995
- Hsu Y. und Kao C.: Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves, *Plant Growth Regulation*, 42, S.: 227-238, 2004
- Hu X., Neill S., Tang Z., Cai W.: Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots, *Plant Physiology*, 137, S.: 663-670, 2005

- Huang X., Von Rad U., Durner J.: Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells, *Planta*, 215, S.: 914-923, 2002
- Huie R. und Padmaja S.: The reaction of NO with superoxide, *Free Radical Research Communications*, 18, S.: 195-199, 1993
- Hung K., Chang C., Kao C.: Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves, *Journal of Plant Physiology*, 159, S.: 159-166, 2002
- Igamberdiev A. und Hill R.: Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: An alternative to classic fermentation pathways, *Journal of Experimental Botany*, 55, S.: 2473-2482, 2004
- Ignarro L., Buga G., Wood K., Byrns R., Chaudhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, S.: 9265-9269, 1987
- Ingersoll J., Rothenberg M., Liedl B., Folkerts K., Garvin D., Hanson M., Doyle J., Mutschler M.: A novel anther-expressed ADH-homologous gene in *Lycopersicon esculentum*, *Plant Molecular Biology*, 26, S.: 1875-1891, 1994
- Innocenti G., Pucciariello C., Le Gleuher M., Hopkins J., De Stefano M., Delledonne M., Puppo A., Baudouin E., Frendo P.: Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots, *Planta*, 225, S.: 1597-1602, 2007
- Jaffrey S. und Snyder S.: The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins, *Science STKE*, 2001, pl1, 2001
- Jasid S., Simontacchi M., Bartoli C., Puntarulo S.: Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins, *Plant Physiology*, 142, S.: 1246-1255, 2006
- Jensen D., Belka G., Du Bois G.: S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme, *Biochemical Journal*, 331, S.: 659-668, 1998
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D.: Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry*, 34, S.: 6003-6013, 1995
- Jones A., Thomas V., Truman B., Lilley K., Mansfield J., Grant M.: Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: Differentiating basal and R-gene mediated resistance, *Phytochemistry*, 65, S.: 1805-1816, 2004
- Jones A., Thomas V., Bennett M., Mansfield J., Grant M.: Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*, *Plant Physiology*, 142, S.: 1603-1620, 2006
- Kanner J., Harel S., Rina G.: Nitric oxide as an antioxidant, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1, S.: 130-136, 1991
- Katori T., Ikeda A., Iuchi S., Kobayashi M., Shinozaki K., Maehashi K., Sakata Y., Tanaka S., Taji T.: Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions, *Journal of Experimental Botany*, 61, S.: 1125-1138, 2010
- Kaur P., Jost R., Sivasithamparam K., Barbetti M.: Proteome analysis of the *Albugo candida*-*Brassica juncea* pathosystem reveals that the timing of the expression of defence-related genes is a crucial determinant of pathogenesis, *Journal of Experimental Botany*, 62, S.: 1285-1298, 2011
- Klessig D., Durner J., Noad R., Navarre D., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H.: Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, S.: 8849-8855, 2000

- Kliebenstein D., Monde R., Last R.: Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization, *Plant Physiology*, 118, S.: 637-650, 1998
- Koivusalo M., Baumann M., Uotila L.: Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase, *FEBS Letters*, 257, S.: 105-109, 1989
- Kover P. und Schaal B.: Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, S.: 11270-11274, 2002
- Kristensen B., Askerlund P., Bykova N., Egsgaard H., Møller I.: Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Phytochemistry*, 65, S.: 1839-1851, 2004
- Kwon E., Feechan A., Yun B., Hwang B., Pallas J., Kang J., Loake G.: AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*, *Planta*, 236, S.: 887-900, 2012
- Laemmli U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, S.: 680-685, 1970
- Lamattina L., García-Mata C., Graziano M., Pagnussat G: Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule, *Annual Review of Plant Biology*, 54, S.: 109-136, 2003
- Lancaster J.: A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, *Nitric Oxide*, 1, S.: 18-30, 1997
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M.: Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation, *Plant Cell*, 19, S.: 3889-3900, 2007
- Laxa M., König J., Dietz K., Kandlbinder A.: Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions, *Biochemical Journal*, 401, S.: 287-297, 2007
- Lee S., Wang M., Lee A., Yin S.: The metabolic role of human ADH3 functioning as ethanol dehydrogenase, *FEBS Letters*, 544, S.: 143-147, 2003
- Lee U., Wie C., Fernandez B., Feelisch M., Vierling E.: Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 20, S.: 786-802, 2008
- Leshem Y. und Haramaty E.: The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *pisum sativum* Linn. foliage, *Journal of Plant Physiology*, 148, S.: 258-263, 1996
- Leshem Y., Wills R., Ku V.: Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO•) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 11, S.: 825-833, 1998
- Leshem, Y.: Nitric oxide gas as an endogenous regulator of fruit, vegetable and flower maturation and senescence. In: *Nitric oxide in plants-occurrence, function and use*, Klumer Academics Publishers, Dordrecht, Netherlands, S.: 33-62, 2000
- Leterrier M., Airaki M., Palma J., Chaki M., Barroso J., Corpas F.: Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*, *Environmental Pollution*, 166, S.: 136-143, 2012
- Li P., Sioson A., Mane S., Ulanov A., Grothaus G., Heath L., Murali T., Bohnert H., Grene R.: Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO<sub>2</sub>] in the field, *Plant Molecular Biology*, 62, S.: 593-609, 2006

- Lin C., Jih P., Lin H., Lin J., Chang L., Shen Y., Jeng S.: Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding, *Plant Molecular Biology*, 77, S.: 235-249, 2011
- Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li C., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G., Chu C.: Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice, *Plant Physiology*, 158, S.: 451-464, 2012
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J.: Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 137, S.: 921-930, 2005
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J.: Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation, *Journal of Biological Chemistry*, 281, S.: 4285-4291, 2006
- Lindermayr C., Sell S., Müller B., Leister D., Durner J.: Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide, *Plant Cell*, 22, S.: 2894-2907, 2010
- Lipton S., Choi Y., Pan Z., Lei S., Chen H., Sucher N., Loscalzo J., Singel D., Stamler J.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*, 364, S.: 626-632, 1993
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.: A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans, *Nature*, 410, S.: 490-494, 2001
- Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., León J.: *In-vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 62, S.: 3501-3517, 2011
- Luchsinger B., Rich E., Gow A., Williams E., Stamler J., Singel D.: Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, S.: 461-466, 2003
- MacMillan-Crow L., Crow J., Thompson J.: Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues, *Biochemistry*, 37, S.: 1613-1622, 1998
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K., Dangl J., Dietrich R.: The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, *Nature Genetics*, 26, S.: 403-410, 2000
- Mancardi D., Ridnour L., Thomas D., Katori T., Tocchetti C., Espey M., Miranda K., Paolocci N., Wink D.: The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: A practical guide, *Current Molecular Medicine*, 4, S.: 723-740, 2004
- Manríquez D., El-Sharkawy I., Flores F., El-Yahyaoui F., Regad F., Bouzayen M., Latché A., Pech J.: Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics, *Plant Molecular Biology*, 61, S.: 675-685, 2006
- Martínez M., Achkor H., Persson B., Fernández M., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X.: *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases, *European Journal of Biochemistry*, 241, S.: 849-857, 1996
- Mauch F. und Dudler R.: Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack, *Plant Physiology*, 102, S.: 1193-1201, 1993
- May M. und Leaver C.: Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures, *Plant Physiology*, 103, S.: 621-627, 1993
- Mayne R. und Lea P.: Alcohol dehydrogenase in *Hordeum vulgare*: Changes in isoenzyme levels under hypoxia, *Plant Science Letters*, 37, S.: 73-78, 1984

- McInnis S., Desikan R., Hancock J., Hiscock S.: Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: Potential signalling crosstalk?, *New Phytologist*, 172, S.: 221-228, 2006
- Mehler A.: Studies on reactions of illuminated chloroplasts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33, S.: 65-77, 1951
- Mello C., Hermes V., Guerra M., Arisi A.: Sodium nitroprusside modulates gene expression involved in glutathione synthesis in *Zea mays* leaves, *Biologia Plantarum*, 56, S.: 383-388, 2012
- Melo P., Silva L., Ribeiro I., Seabra A., Carvalho H.: Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration, *Plant Physiology*, 157, S.: 1505-1517, 2011
- Milla M., Maurer A., Huete A., Gustafson J.: Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways, *Plant Journal*, 36, S.: 602-615, 2003
- Millar A. und Day D.: Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria, *FEBS Letters*, 398, S.: 155-158, 1996
- Miller A.: Superoxide dismutases: Active sites that save, but a protein that kills, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, S.: 162-168, 2004
- Miller G., Suzuki N., Rizhsky L., Hegie A., Koussevitzky S., Mittler R.: Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses, *Plant Physiology*, 144, S.: 1777-1785, 2007
- Mishina T., Lamb C., Zeier J.: Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*, *Plant, Cell and Environment*, 30, S.: 39-52, 2007
- Mittler R.: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, S.: 405-410, 2002
- Moche M., Stremlau S., Hecht L., Göbel C., Feussner I., Stöhr C.: Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles, *Planta*, 231, S.: 425-436, 2009
- Modolo L., Cunha F., Braga M., Salgado I.: Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* elicitor, *Plant Physiology*, 130, S.: 1288-1297, 2002
- Monteiro H., Arai R., Travassos L.: Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling, *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, S.: 843-889, 2008
- Moreau M., Lee G., Wang Y., Crane B., Klessig D.: AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase, *Journal of Biological Chemistry*, 283, S. 32957-32967, 2008
- Morris G.: The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development, *Physiologia Plantarum*, 90, S.: 230-237, 1994
- Mouradov A., Cremer F., Coupland G.: Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity, *Plant Cell*, 14, S.: 111-130, 2002
- Mubarakshina M., Ivanov B., Naydov I., Hillier W., Badger M., Krieger-Liszkay A.: Production and diffusion of chloroplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its implication to signaling, *Journal of Experimental Botany*, 61, S.: 3577-3587, 2010
- Mulaudzi T., Ludidi N., Ruzvidzo O., Morse M., Hendricks N., Iwuoha E., Gehring C.: Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity in vitro, *FEBS Letters*, 585, S.: 2693-2697, 2011

- Munné-Bosch S.: The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance, *Journal of Plant Physiology*, 162, S.: 743-748, 2005
- Navarre D., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D.: Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase, *Plant Physiology*, 122, S.: 573-582, 2000
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jaquot J.: Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 129, S.: 185-195, 2007
- Neill S., Desikan R., Clarke A., Hancock J.: Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells, *Plant Physiology*, 128, S.: 13-16, 2002
- Nelson M.: The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1. Substrate, pH, and ethanol effects on the active-site iron, *Journal of Biological Chemistry*, 262, S.: 12137-12142, 1987
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C.: Glutathione. In: *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists, Rockville, USA, 9, S.: 1-32, 2011
- Nomura K., Melotto M., He S.: Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, S.: 361-368, 2005
- Normanly, J.: Auxin metabolism, *Physiologia Plantarum*, 100, S.: 431-442, 1997
- Pacher P., Beckman J., Liudet L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiological Reviews*, 87, S.: 315-424, 2007
- Pagnussat G., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L.: Nitric oxide is required for root organogenesis, *Plant Physiology*, 129, S.: 954-956, 2002
- Palmer R., Ferrige A., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, 327, S.: 524-526, 1987
- Palmieri M., Lindermayr C., Bauwe H., Steinhauser C., Durner J.: Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation, *Plant Physiology*, 152, S.: 1514-1528, 2010
- Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C., Delledonne M.: *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity, *Plant Cell*, 16, S.: 2785-2794, 2004
- Perry J., Shin D., Getzoff E., Tainer J.: The structural biochemistry of the superoxide dismutases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, S.: 245-262, 2010
- Petrov V. und Van Breusegem F.: Hydrogen peroxide - A central hub for information flow in plant cells, *AoB Plants*, pls014, S.: 1-13, 2012
- Pieterse C. und Van Loon L.: NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, S.: 456-464, 2004
- Pilon M., Ravet K., Tapken W.: The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, S.: 989-998, 2011
- Planchet E., Gupta K., Sonoda M., Kaiser W.: Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: Rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport, *Plant Journal*, 41, S.: 732-743, 2005
- Prado A., Porterfield D., Feijó J.: Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes, *Development*, 131, S.: 2707-2714, 2004
- Prather C. und Sisler E.: Glycine and glyoxylate decarboxylation in *Nicotiana rustica* roots, *Phytochemistry*, 11, S.: 1637-1647, 1972
- Queval G., Thominet D., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Gakière B., Noctor G.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast, *Molecular Plant*, 2, S.: 344-356, 2009

- Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G.: Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts, *Plant, Cell and Environment*, 34, S.: 21-32, 2011
- Quijano C., Alvarez B., Gatti R., Augusto O., Radi R.: Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups, *Biochemical Journal*, 322, S.: 167-173, 1997
- Radi R.: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 23, S.: 4003-4008, 2004
- Reed R., Brady S., Muday G.: Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 118, S.: 1369-1378, 1998
- Reid M. und Fewson C.: Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases, *Critical Reviews in Microbiology*, 20, S.: 13-56, 1994
- Reiland S., Messerli G., Baerenfaller K., Gerrits B., Endler A., Grossmann J., Gruissem W., Baginsky S.: Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks, *Plant Physiology*, 150, S.: 889-903, 2009
- Rhoads D., Umbach A., Subbaiah C., Siedow J.: Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiology*, 141, S.: 357-366, 2006
- Ribas De Pouplana L., Atrian S., González-Duarte R., Fothergill-Gilmore L., Kelly S., Price N.: Structural properties of long- and short-chain alcohol dehydrogenases. Contribution of NAD<sup>+</sup> to stability, *Biochemical Journal*, 276, S.: 433-438, 1991
- Ribeiro E., Cunha F., Tamashiro W., Martins I.: Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells, *FEBS Letter*, 26, S.: 283-286, 1999
- Rojo E., Titarenko E., León J., Berger S., Vancanneyt G., Sánchez-Serrano J.: Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 13, S.: 153-165, 1998
- Romero-Puertas M., Laxa M., Mattè A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K., Delledonne M.: S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *Plant Cell*, 19, S.: 4120-4130, 2007
- Rosales E., Iannone M., Groppa M., Benavides M.: Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, S.: 124-130, 2011
- Rüdiger H. und Gabius H.: Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications, *Glycoconjugate Journal*, 18, S.: 589-613, 2001
- Ruelland E. und Miginiac-Maslow M.: Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: Activation or relief from inhibition?, *Trends in Plant Science*, 4, S.: 136-141, 1999
- Rümer S., Gupta K., Kaiser W.: Plant cells oxidize hydroxylamines to NO, *Journal of Experimental Botany*, 60, S.: 2065-2072, 2009
- Rustérucci C., Espunya M., Díaz M., Chabannes M., Martínez M.: S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically, *Plant Physiology*, 143, S.: 1282-1292, 2007
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B.: An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root, *Cell*, 99, S.: 463-472, 1999
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.: Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells, *Plant and Cell Physiology*, 47, S.: 689-697, 2006

- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H.: *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase, *FEBS Letters*, 515, S.: 20-24, 2002
- Sakamoto A., Tsukamoto S., Yamamoto H., Ueda-Hashimoto M., Takahashi M., Suzuki H., Morikawa H.: Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species, *Plant Journal*, 33, S.: 841-851, 2003
- Saze H., Ueno Y., Hisabori T., Hayashi H., Izui K.: Thioredoxin-mediated reductive activation of a protein kinase for the regulatory phosphorylation of C4-form phosphoenolpyruvate carboxylase from maize, *Plant, Cell and Environment*, 42, S.: 1295-1302, 2001
- Scandalios J.: Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiology*, 101, S.: 7-12, 1993
- Schaller F., Biesgen C., Müssig C., Altmann T., Weiler E.: 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis, *Planta*, 210, S.: 979-984, 2000
- Scharte J., Schön H., Weis E.: Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*, *Plant, Cell and Environment*, 28, S.: 1421-1435, 2005
- Schroeder J., Kwak J., Allen G.: Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants, *Nature*, 410, S.: 327-330, 2001
- Serpa V., Vernal J., Lamattina L., Grotewold E., Cassia R., Terenzi H.: Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, S.: 1048-1053, 2007
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martínez M., Persson B., Parés X., Jornvall H.: Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, S.: 5595-5599, 1996
- Shah J., Kachroo P., Nandi A., Klessig D.: A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens, *Plant Journal*, 25, S.: 563-574, 2001
- Sharon N.: Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules, *Journal of Biological Chemistry*, 282, S.: 2753-2764, 2007
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Analytical Chemistry*, 68, S.: 850-858, 1996
- Shi S., Wang G., Wang Y., Zhang L., Zhang L.: Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation, *Nitric Oxide*, 13, S.: 1-9, 2005
- Shimizu-Sato S., Tanaka M., Mori H.: Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching, *Plant Molecular Biology*, 69, S.: 429-435, 2009
- Singh D., Jermakow A., Swain S.: Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 14, S.: 3133-3147, 2002
- Slooten L., Capiou K., Van Camp W., Van Montagu M., Sybesma C., Inze D.: Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts, *Plant Physiology*, 107, S.: 737-750, 1995
- Smith I.: Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors, *Plant Physiology*, 79, S.: 1044-1047, 1985
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L.: Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed, *Plant Science*, 171, S.: 449-458, 2006



- Souza J., Choi I., Chen Q., Weisse M., Daikhin E., Yudkoff M., Obin M., Ara J., Horwitz J., Ischiropoulos H.: Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380, S.: 360-366, 2000
- Spadaro D., Yun B., Spoel S., Chu C., Wang Y., Loake G.: The redox switch: Dynamic regulation of protein function by cysteine modifications, *Physiologia Plantarum*, 138, S.: 360-371, 2010
- Speirs J., Lee E., Holt K., Yong-Duk K., Steele Scott N., Loveys B., Schuch W.: Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols, *Plant Physiology*, 117, S.: 1047-1058, 1998
- Squadrito G., Cueto R., Splenser A., Valavanidis A., Zhang H., Uppu R., Pryor W.: Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376, S.: 333-337, 2000
- Staab C., Hellgren M., Höög J.: Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: Implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, S.: 3950-3960, 2008
- Staab C., Alander J., Morgenstern R., Grafström R., Höög J.: The Janus face of alcohol dehydrogenase 3, *Chemico-Biological Interactions*, 178, S.: 29-35, 2009
- Stamler J., Singel D., Loscalzo J.: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science*, 258, S.: 1898-1902, 1992
- Stamler J.: Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide, *Cell*, 78, S.: 931-936, 1994
- Stamler J., Toone E., Lipton S., Sucher N.: (S)NO signals: Translocation, regulation and a consensus motif, *Neuron*, 18, S.: 691-696, 1997
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W., Rockel P.: A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite, *Planta*, 212, S.: 835-841, 2001
- Stoimenova M., Igamberdiev A., Gupta K., Hill R.: Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria, *Planta*, 226, S.: 465-474, 2007
- Stone J. und Marletta M.: Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states, *Biochemistry*, 33, S.: 5636-5640, 1994
- Stotz H., Pittendrigh B., Kroymann J., Weniger K., Fritsche J., Bauke A., Mitchell-Olds T.: Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against Egyptian cotton worm but not diamondback moth, *Plant Physiology*, 124, S.: 1007-1018, 2000
- Strittmatter P. und Ball E.: Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione-dependent enzyme system, *Journal of Biological Chemistry*, 213, S.: 445-461, 1955
- Strommer J.: The plant ADH gene family, *Plant Journal*, 66, S.: 128-142, 2011
- Stühr D.: Structure-function aspects in the nitric oxide synthases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, S.: 339-359, 1997
- Sugiyama A. und Sekiya J.: Homoglutathione confers tolerance to acifluorfen in transgenic tobacco plants expressing soybean homoglutathione synthetase, *Plant Cell Physiology*, 46, S.: 1482-1432, 2005
- Sun W., Dunning M., Pfund C., Weingarten R., Bent A.: Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris pv campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* flagellin sensing2-dependent defenses, *Plant Cell*, 18, S.: 764-779, 2006

- Surmeli N., Litterman N., Miller A., Groves J.: Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion, *Journal of the American Chemical Society*, 132, S.: 17174-17185, 2010
- Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R.: Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, S.: 662-280, 2007
- Tada Y., Mori T., Shinogi T., Yao N., Takahashi S., Betsuyaku S., Sakamoto M., Park P., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S.: Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17, S.: 245-253, 2004
- Tada Y., Spoel S., Pajeroska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X.: Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins, *Science*, 321, S.: 952-956, 2008
- Takahashi M. und Asada K.: Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267, S.: 714-722, 1988
- Takahashi S. und Yamasaki H.: Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide, *FEBS Letters*, 13, S.: 145-148, 2002
- Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H.: AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant and Cell Physiology*, 45, S.: 1053-1062, 2004
- Tanou G., Job C., Rajjou L., Arc E., Belghazi M., Diamantidis G., Molassiotis A., Job D.: Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity, *Plant Journal*, 60, S.: 795-804, 2009
- Tanou G., Filippou P., Belghazi M., Job D., Diamantidis G., Fotopoulos V., Molassiotis A.: Oxidative and nitrosative based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress, *Plant Journal*, 72, S.: 585-599, 2012
- Tao Y., Xie X., Chen W., Glazebrook J., Chang H., Han B., Zhu T., Zou G., Katagiri F.: Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*, *Plant Cell*, 15, S.: 317-330, 2003
- Terrile M., París R., Calderón-Villalobos L., Iglesias M., Lamattina L., Estelle M., Casalongué C.: Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* transport inhibitor response 1 auxin receptor, *Plant Journal*, 70, S.: 492-500, 2012
- Tesnière C. und Verriès C.: Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development, *Plant Science*, 157, S.: 77-88, 2000
- Thompson C., Salzano F., De Souza O., Freitas L.: Sequence and structural aspects of the functional diversification of plant alcohol dehydrogenases, *Gene*, 196, S.: 108-115, 2007
- Tian Q. und Reed J.: Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene, *Development*, 126, S.: 711-21, 1999
- Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Ohba Y., Wada K., Kobayashi H.: A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification, *Plant Cell*, 11, S.: 1195-1206, 1999
- Tun N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E., Scherer G.: Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Plant and Cell Physiology*, 47, S.: 346-354, 2006
- Ursini F., Miaorino M., Brigelius-Flohé R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohé L.: Diversity of glutathione peroxidases, *Methods in Enzymology*, 252, S.: 38-53, 1995

- Valderrama R., Corpas F., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M., Colmenero-Varea P., Del Río L., Barroso J.: Nitrosative stress in plants, *FEBS Letters*, 581, S.: 453-461, 2007
- Van Baarlen P., Staats M., Van Kan J.: Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*, *Molecular Plant Pathology*, 5, S.: 559-574, 2004
- Van Camp W., Willekens H., Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., Reupold-Popp P., Sandermann H., Langebartels C.: Levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage, *Nature Biotechnology*, 12, S.: 165-168, 1994
- Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M., Inzé D., Slooten L.: Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts, *Plant Physiology*, 112, S.: 1703-1714, 1996
- Van der Vliet A., Eiserich J., Kaur H., Cross C., Halliwell B.: Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species, *Methods in Enzymology*, 269, S.: 175-184, 1996
- Van Eldik G., Ruiter R., Van Herpen M., Schrauwen J., Wullems G.: An alcohol dehydrogenase-like gene is specifically expressed in potato pistils, *Journal of Experimental Botany*, 49, S.: 1453-1454, 1998
- Van Poecke R., Sato M., Lenarz-Wyatt L., Weisberg S., Katagiri F.: Natural variation in RPS2-mediated resistance among *Arabidopsis* accessions: Correlation between gene expression profiles and phenotypic responses, *Plant Cell*, 19, S.: 4046-4060, 2007
- Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J., Botterman J., Moens T., Van Montagu M., Inze D.: Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress, *Journal of Experimental Botany*, 50, S.: 71-78, 1999
- Vanacker H., Carver T., Foyer C.: Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction, *Plant Physiology*, 123, S.: 1289-3100, 2000
- Vaughn K. und Duke S.: *In-situ* localization of the sites of paraquat action, *Plant, Cell and Environment*, 6, S.: 13-20, 1983
- Veljovic-Jovanovic S., Pignocchi C., Noctor G., Foyer C.: Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system, *Plant Physiology*, 127, S.: 426-435, 2001
- Wagner U., Edwards R., Dixon D., Mauch F.: Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family, *Plant Molecular Biology*, 49, S.: 515-532, 2002
- Wang D., Weaver N., Kesarwani M., Dong X.: Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance, *Science*, 308, S.: 1036-1040, 2005
- Wang Y. und Yang Z.: Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L., *Plant Cell Physiology*, 46, S.: 1915-1923, 2005
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C.: Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 22, S.: 2981-2998, 2010
- Wang Y., Feechan A., Yun B., Shafiei R., Hofmann A., Taylor P., Xue P., Yang F., Xie Z., Pallas J., Chu C. Loake G.: S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity, *Journal of Biological Chemistry*, 284, S.: 2131-2137, 2009
- Weiler E., Kutchan T., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F.: The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants, *FEBS Letters*, 345, S.: 9-13, 1994

- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D., Durner J.: Nitric oxide: Comparative synthesis and signaling in animal and plant cells, *Trends in Plant Science*, 6, S.: 177-183, 2001
- Whalen M., Innes R., Bent A., Staskawicz B.: Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean, *Plant Cell*, 3, S.: 49-59, 1991
- Wilkins K., Bancroft J., Bosch M., Ings J., Smirnoff N., Franklin-Tong V.: Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver, *Plant Physiology*, 156, S.: 404-416, 2011
- Wilson R., Heckman J., Somerville C.: Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days, *Plant Physiology*, 100, S.: 403-408, 1992
- Wink D., Hanbauer I., Krishnat M., Degrafft W., Gamson J., Mitchell J.: Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, S.: 9813-9817, 1993
- Wink D., Cook J., Krishna M., Hanbauer I., De Graff W., Gamson J., Mitchell J.: Nitric oxide protects against alkyl peroxide-mediated cytotoxicity. Further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319, S.: 402-407, 1995
- Wink D. und Mitchel J.: Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radical Biology & Medicine*, 25, S.: 434-456, 1998
- Wojtaszek P.: Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection, *Biochemical Journal*, 322, S.: 681-692, 1997
- Wu X., Zhu W., Zhang H., Ding H., Zhang H.: Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*), *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, S.: 1199-1209, 2011
- Wünsche H., Baldwin I., Wu J.: S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuate*, *Journal of Experimental Botany*, 62, S.: 4605-4616, 2011
- Xiang C. und Oliver D.: Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 10, S.: 1539-1550, 1998
- Xiao-Ping S. und Xi-Gui S.: Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean, *Physiologia Plantarum*, 128, S.: 569-579, 2006
- Xu Y., Sun X., Jin J., Zhou H.: Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue, *Journal of Plant Physiology*, 167, S.: 512-518, 2010
- Yamakura F., Taka H., Fujimura T., Murayama K.: Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxyxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine, *Journal of Biological Chemistry*, 273, S.: 14085-14089, 1998
- Yamasaki H. und Sakihama Y.: Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: *In vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species, *FEBS Letters*, 468, S.: 89-92, 2000
- Yamazaki D., Motohashi K., Kasama T., Hara Y., Hisabori T.: Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant, Cell and Environment*, 45, S.: 18-27, 2004
- Yao L., Pei B., Zhou Q., Li Y.: NO serves as a signaling intermediate downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to modulate dynamic microtubule cytoskeleton during responses to VD-toxins in *Arabidopsis*, *Plant Signaling and Behaviour*, 7, S.: 174-177, 2012

- Yoshimura K., Miyao K., Gaber A., Takeda T., Kanaboshi H., Miyasaka H., Shigeoka S.: Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol, *Plant Journal*, 37, S.: 21-33, 2004
- Yun B., Feechan A., Yin M., Saidi N., Le Bihan T., Yu M., Moore J., Kang J., Kwon E., Spoel S., Pallas J., Loake G.: S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity, *Nature*, 478, S.: 264-268, 2011
- Zafra A., Rodríguez-García M., Alché D.: Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development, *BMC Plant Biology*, 10:36, 2010
- Zago E., Morsa S., Dat J., Alard P., Ferrarini A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F.: Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco, *Plant Physiology*, 141, S.: 404-411, 2006
- Zeidler D., Zähringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P., Durner J.: Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, S.: 15811-15816, 2004
- Zhang N. und Portis A.: Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, S.: 9438-9443, 1999
- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., Tan M.: Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves, *New Phytologist*, 175, S.: 36-50, 2007
- Zhang F., Wang Y., Yang Y., Wu H., Wang D., Liu J.: Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*, *Plant, Cell and Environment*, 30, S.: 775-785, 2007
- Zhao D., Tian Q., Li L., Zhang W.: Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*, *Annals of Botany*, 100, S.: 497-503, 2007
- Zhao M., Tian Q., Zhang W.: Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 144, S.: 206-217, 2007
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E., Jones J., Felix G., Boller T.: Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception, *Nature*, 428, S.: 764-767, 2004
- Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., Lo Schiavo F., Terzi M.: Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in-vivo*, *FEBS Letters*, 515, S.: 75-78, 2002

## 6. Anhang

### Anhang Tab. 1: Keimungsrate und Wachstumsparameter von Wurzeln in beiden Linien

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von sieben Tage alten Keimlingen auf Erde (n=100)<sup>(1)</sup> bzw. zehn Tage alten Keimlingen auf MS-Medium (n=30)<sup>(2)</sup>. Signifikante Unterschiede zwischen *gsnor* Knock-out Linien und Wildtyp-Pflanzen sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet. Alle Längenmessungen wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ durchgeführt.

Phänotyp	<i>gsnor</i>	Wildtyp
Keimungsrate (in %) <sup>1</sup>	64,50**	95,50
Länge Primärwurzel (in cm) <sup>2</sup>	1,86±0,47**	4,74±0,63
Länge Seitenwurzeln (in cm) <sup>2</sup>	0,30±0,21**	2,26±0,82
Anzahl Seitenwurzeln <sup>2</sup>	1,50±0,51**	6,50±1,31
Länge Hypokotyl (in cm) <sup>2</sup>	0,16±0,02**	0,26±0,03

### Anhang Tab. 2: Wachstumsparameter von Sprossachsen in beiden Linien

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von sieben Wochen alten Pflanzen (n=10)<sup>(1)</sup> und Querschnitte<sup>(2)</sup> bzw. Längsschnitte<sup>(3)</sup> von sieben Wochen alten Sprossachsen (n=6). Pro Querschnitt wurden jeweils vier Positionen bzw. pro Längsschnitt jeweils 30 Zellen vermessen. Signifikante Unterschiede zwischen *gsnor* Knock-out Linien und Wildtyp-Pflanzen sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet. Alle Längenmessungen von Mikroskopaufnahmen wurden mit Hilfe des Programmes CellP durchgeführt.

Phänotyp	<i>gsnor</i>	Wildtyp
Pflanzenhöhe (in cm) <sup>1</sup>	8,25±0,72**	34,20±4,05
Anzahl Sprossachsen <sup>1</sup>	7,60±0,97**	1,80±0,79
Anzahl Leitbündel <sup>2</sup>	9**	8
Größenverhältnis Rindenparenchym zu Sklerenchym (in $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	46,45±5,21	41,53±2,86
Länge Parenchymzellen (in $\mu\text{m}$ ) <sup>3</sup>	50,90±3,55**	91,89±6,11
	73,76±16,58**	169,75±36,79

### Anhang Tab. 3: Wachstumsparameter von Schoten in beiden Linien

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von neun Wochen alten Pflanzen (n=10)<sup>(1)</sup>. Signifikante Unterschiede zwischen *gsnor* Knock-out Linien und Wildtyp-Pflanzen sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet. Alle Längenmessungen wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ durchgeführt.

Phänotyp	<i>gsnor</i>	Wildtyp
Länge Schoten (in cm) <sup>1</sup>	0,98±0,04	1,78±0,10
Anzahl Schoten <sup>1</sup>	150,70±22,65	77,40±6,64

**Anhang Tab. 4: Differenziell regulierte Proteine in Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)**

Dargestellt sind alle identifizierten Proteine, die nach avirulenter Behandlung mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) eine mindestens um den Faktor 2 erhöhte bzw. erniedrigte Produktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufwiesen. Die Berechnung des Regulationsfaktors sowie die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Software-Programmes DeCyder und basierte auf drei unabhängigen biologischen Wiederholungen für jeden untersuchten Zeitpunkt. Proteinkandidaten wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF/TOF Massenspektrometers oder LTQ-OrbitrapXL Massenspektrometers analysiert und die einzelnen Massenspektrogramme mit der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR9 sowie der Datenbank SwissProt verglichen.

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	<i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpt2</i>	Zeit	Interaktion
<b>Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>													
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)	1 <sup>a</sup>	AT1G02930	23471 / 5,80	13	62	559	1,07	1,18	7,20	9,60	*	*	*
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	9	44	389	1,07	1,18	7,20	9,60	*	*	*
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)	2 <sup>a</sup>	AT1G02930	23471 / 5,80	12	62	514	1,16	1,09	4,32	8,36	*	*	*
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	8	44	343	1,16	1,09	4,32	8,36	*	*	*
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)	3 <sup>a</sup>	AT1G02920	23583 / 6,14	8	30	73	1,13	-1,07	4,10	7,54	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	8	32	72	1,13	-1,07	4,10	7,54	*	*	**
DSBA-Oxidoreduktase	4 <sup>a</sup>	AT5G38900	24260 / 6,34	9	43	383	-1,00	1,11	5,57	6,16	*	*	*
Glutathion S-Transferase 2	5 <sup>b</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	10	43	354	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
20 kDa luminales Thylakoidprotein		AT3G56650	28726 / 9,30	6	25	240	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Pyrrolidon-Carboxylat-Peptidase		AT1G56700	24316 / 5,98	5	22	240	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Eisen Superoxid-Dismutase (FeSOD1)		AT4G25100	23776 / 6,06	6	24	234	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Glykosid-Hydrolase		AT4G25100	108276 / 6,01	4	3	214	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Quinon-Reduktase		AT4G27270	21778 / 6,08	3	15	109	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Chaperonin 20		AT5G20720	26785 / 8,86	3	17	109	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Photosystem II, P-1-Untereinheit (PSBP-1)		AT1G06680	28249 / 6,90	3	13	93	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	5	12	84	-1,01	1,11	5,40	5,50	*	*	*
Glutathion S-Transferase 2	6 <sup>a</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	5	21	87	-1,01	1,09	4,19	5,37	*	*	*
Peptid-Methioninsulfoxid-Reduktase, putativ		AT4G25130	28968 / 8,96	4	15	63	-1,01	1,09	4,19	5,37	*	*	*
Seneszenz-assoziiertes Gen (SAG13)	7 <sup>a</sup>	AT2G29350	29144 / 5,64	6	25	153	1,27	1,16	1,78	4,27	*	*	**
Tropinon-Reduktase, putativ		AT2G29290	28730 / 5,31	4	12	100	1,27	1,16	1,78	4,27	*	*	**
3-Dehydroquinat-Synthase, putativ	8 <sup>b</sup>	AT5G66120	48319 / 7,05	15	32	467	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**

## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000 avrRpt2	Zeit	Interaktion
Villin 4		AT4G30160	109829 / 5,83	12	11	399	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Aldo/Keto-Reduktase		AT1G04420	46683 / 8,70	11	25	367	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Pyruvat-Dehydrogenase E1 $\alpha$		AT1G01090	47600 / 7,16	9	18	272	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Indol-3-Acetonitril-Nitrilase (Nit1)		AT3G44310	38527 / 5,84	5	15	153	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Osmose-abhängiges Protein (LOS1)		AT1G56070	94743 / 5,89	5	6	136	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ		AT3G52930	38858 / 6,05	5	10	128	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Katalase 3		AT1G20620	57059 / 7,31	3	6	93	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Dihydroorotat-Dehydrogenase		AT3G17810	47216 / 6,37	4	13	92	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490	53435 / 5,88	3	7	91	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Osmose-abhängiges Protein (LOS2)		AT2G36530	47974 / 5,54	3	7	82	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Aminotransferase (Klasse1)		AT1G80360	44132 / 5,97	2	5	78	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Glutamat-Dehydrogenase 2		AT5G07440	45013 / 6,07	4	10	72	1,23	1,14	1,05	4,71	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)	9 <sup>a</sup>	AT1G02920	23583 / 6,14	7	25	287	1,52	1,01	2,34	4,58	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	6	22	244	1,52	1,01	2,34	4,58	*	*	**
Glutamat-Dehydrogenase 2	10 <sup>a</sup>	AT5G07440	45012 / 6,07	14	40	574	1,26	1,06	2,24	4,07	*	*	*
Glutamat-Dehydrogenase 1		AT5G18170	44781 / 6,38	7	20	79	1,26	1,06	2,24	4,07	*	*	*
TolB-Protein	11 <sup>a</sup>	AT4G01870	73112 / 5,64	19	43	314	1,26	1,03	2,76	3,82	*	*	*
Acyl-Koenzym A Oxidase 1	12 <sup>a</sup>	AT4G16760	74996 / 7,58	16	27	160	1,05	-1,01	2,00	3,39	*	*	
Glutathion S-Transferase 2	13 <sup>a</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	9	48	234	1,15	1,23	2,29	3,34	*	*	**
Glutathion S-Transferase 16 (GSTF3)		AT2G02930	24106 / 6,25	5	24	95	1,15	1,23	2,29	3,34	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	6	23	95	1,15	1,23	2,29	3,34	*	*	**
Glutathion S-Transferase 9 (GSTF7)		AT2G30860	18667 / 6,06	3	22	95	1,15	1,23	2,29	3,34	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	4	18	77	1,15	1,23	2,29	3,34	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)	14 <sup>a</sup>	AT1G02920	23583 / 6,14	11	45	509	1,12	1,04	2,04	3,17	*	*	*
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	6	20	303	1,12	1,04	2,04	3,17	*	*	*
Glutathion S-Transferase 2	15 <sup>a</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	10	51	440	1,10	1,07	2,43	3,17	*	*	**
Glutathion S-Transferase 16 (GSTF3)		AT2G02930	24106 / 6,25	6	27	207	1,10	1,07	2,43	3,17	*	*	**
Glutathion S-Transferase 8		AT2G47730	29270 / 8,50	4	14	60	1,10	1,07	2,43	3,17	*	*	**



## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000 avrRpt2	Zeit	Interaktion
Flavodoxin-ähnliche Quinon-Reduktase 1	16 <sup>a</sup>	AT5G54500	21782 / 5,96	8	59	307	1,24	1,04	2,31	3,12	*	*	
Quinon-Reduktase		AT4G27270	21778 / 6,08	4	24	260	1,24	1,04	2,31	3,12	*	*	
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	5	25	67	1,24	1,04	2,31	3,12	*	*	
Kationenbindende Hydrolase	17 <sup>a</sup>	AT4G16260	37745 / 6,43	10	40	128	1,11	1,05	1,49	2,53	*	*	**
NAD-Malat-Dehydrogenase 1		AT2G22780	37841 / 8,11	7	21	95	1,11	1,05	1,49	2,53	*	*	**
2OG-Fe(II)-Oxygenase		AT2G38240	39942 / 8,67	8	22	80	1,11	1,05	1,49	2,53	*	*	**
Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase	18 <sup>a</sup>	AT4G15530	93948 / 5,25	23	24	223	1,10	1,04	2,08	2,50	*	*	*
Aminopeptidase M1		AT4G33090	98744 / 5,34	19	21	157	1,10	1,04	2,08	2,50	*	*	*
Abwehrprotein, putativ	19 <sup>a</sup>	AT4G30530	28653 / 5,46	8	26	67	-1,03	1,01	1,74	2,47	*	*	*
Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase	20 <sup>a</sup>	AT4G15530	93948 / 5,25	25	32	343	1,04	1,00	2,07	2,36	*	*	*
Aminopeptidase M1		AT4G33090	98744 / 5,34	22	26	220	1,04	1,00	2,07	2,36	*	*	*
20S Proteasom, β-Untereinheit F1	21 <sup>a</sup>	AT3G60820	24856 / 6,95	11	60	324	1,02	1,05	1,43	2,26	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	9	32	120	1,02	1,05	1,43	2,26	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	7	25	98	1,02	1,05	1,43	2,26	*	*	**
Glutathion S-Transferase 2		AT4G02520	24114 / 5,92	9	39	72	1,02	1,05	1,43	2,26	*	*	**
Glutathion S-Transferase 9 (GSTF7)		AT2G30860	18667 / 6,06	3	21	59	1,02	1,05	1,43	2,26	*	*	**
Glutathion-Peroxidase 2	22 <sup>a</sup>	AT2G31570	19104 / 5,60	9	49	188	1,15	1,03	1,77	2,22	*	*	
Glutathion S-Transferase 19	23 <sup>a</sup>	AT1G78380	25691 / 5,80	10	34	177	1,07	1,03	1,47	2,21	*	*	
Acyl-Koenzym A Oxidase 1	24 <sup>a</sup>	AT4G16760	74996 / 7,58	16	28	109	1,00	-1,02	1,55	2,19	*	*	
Glutathion S-Transferase 2	25 <sup>a</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	9	48	171	1,10	1,04	1,62	2,18	*	*	
Carboanhydrase 1		AT3G01500	29827 / 5,54	10	38	86	1,10	1,04	1,62	2,18	*	*	
Uridylat-Kinase (PYR6)	26 <sup>a</sup>	AT5G26667	22582 / 5,79	5	24	178	1,24	1,03	1,50	2,03	*	*	
Germin 3	27 <sup>a</sup>	AT5G20630	21993 / 6,26	3	25	82	-1,06	-1,26	-2,06	-2,63	*	*	
Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTRA1)	28 <sup>b</sup>	AT5G23440	19983 / 8,74	5	30	194	-1,04	1,04	-1,41	-2,00	*	*	**
Peroxiredoxin 2, putativ		AT3G52960	24783 / 9,12	5	23	191	-1,04	1,04	-1,41	-2,00	*	*	**
Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTRA2)		AT5G08410	20248 / 9,00	8	23	185	-1,04	1,04	-1,41	-2,00	*	*	**
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490	53435 / 5,88	2	5	117	-1,04	1,04	-1,41	-2,00	*	*	**
RuBisCO, kleine Untereinheit 2B	29 <sup>a</sup>	AT5G38420	20622 / 7,59	10	50	410	-1,13	-1,20	-1,53	-2,03	*	*	

## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000 avrRpt2	Zeit	Interaktion
RuBisCO, kleine Untereinheit 3B		AT5G38410	20556 / 8,22	9	54	394	-1,13	-1,20	-1,53	-2,03	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 1A		AT1G67090	20488 / 7,59	10	55	390	-1,13	-1,20	-1,53	-2,03	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 1B		AT5G38430	20558 / 7,59	8	40	383	-1,13	-1,20	-1,53	-2,03	*	*	
Ferredoxin-unabhängige Glutamat-Synthase 1	30 <sup>a</sup>	AT5G04140	178066 / 5,94	39	27	446	-1,18	-1,07	-1,25	-2,07	*	*	
Glutamat-Synthase 2		AT2G41220	178951 / 6,57	14	10	80	-1,18	-1,07	-1,25	-2,07	*	*	
Fruktose-1,6-Bisphosphatase, putativ	31 <sup>a</sup>	AT3G54050	45590 / 5,25	12	33	547	-1,01	1,11	-1,26	-2,13	*	*	*
RuBisCO, kleine Untereinheit 2B	32 <sup>a</sup>	AT5G38420	20622 / 7,59	9	57	263	-1,07	-1,12	-1,40	-2,21	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 3B		AT5G38410	20556 / 8,22	8	52	248	-1,07	-1,12	-1,40	-2,21	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 1B		AT5G38430	20558 / 7,59	7	37	236	-1,07	-1,12	-1,40	-2,21	*	*	
Fruktose-1,6-Bisphosphatase, putativ	33 <sup>a</sup>	AT3G54050	45590 / 5,25	11	29	265	1,01	1,11	-1,27	-2,23	*	*	*
Glutamat-1-Semialdehyd-Aminomutase 2	34 <sup>a</sup>	AT3G48730	50452 / 7,01	12	34	268	-1,17	-1,08	-1,67	-2,32	*	*	**
Glutamat-1-Semialdehyd-Aminomutase 1		AT5G63570	50737 / 6,43	7	21	208	-1,17	-1,08	-1,67	-2,32	*	*	**
RuBisCO, kleine Untereinheit 1A	35 <sup>a</sup>	AT1G67090	20488 / 7,59	6	33	116	-1,06	-1,18	-1,52	-2,41	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 2B		AT5G38420	20622 / 7,59	6	37	81	-1,06	-1,18	-1,52	-2,41	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 1B		AT5G38430	20558 / 7,59	5	28	70	-1,06	-1,18	-1,52	-2,41	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 3B		AT5G38410	20556 / 8,22	5	32	69	-1,06	-1,18	-1,52	-2,41	*	*	
CbbY-Protein	36 <sup>b</sup>	AT5G45170	41171 / 8,03	9	32	456	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
Nukleotid-Rhamnose-Synthase-Reduktase		AT1G63000	33861 / 5,73	4	15	178	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
Zyklase-Protein		AT4G35220	30083 / 5,64	5	18	172	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
Serin-Carboxypeptidase		AT2G27920	52005 / 5,64	2	6	129	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
30S ribosomales Protein, putativ		AT5G24490	35120 / 6,30	4	9	89	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490	53435 / 5,88	3	7	88	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
ATP-Synthase, $\beta$ -Kette, putativ		AT5G08680	59993 / 6,06	3	5	63	-1,58	-1,18	-1,49	-2,41	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 2B	37 <sup>a</sup>	AT5G38420	20622 / 7,59	8	41	172	-1,08	-1,17	-1,52	-2,60	*	*	**
RuBisCO, kleine Untereinheit 1B		AT5G38430	20558 / 7,59	7	32	159	-1,08	-1,17	-1,52	-2,60	*	*	**
RuBisCO, kleine Untereinheit 3B		AT5G38410	20556 / 8,22	7	37	158	-1,08	-1,17	-1,52	-2,60	*	*	**
RuBisCO, kleine Untereinheit 1A		AT1G67090	20488 / 7,59	6	27	128	-1,08	-1,17	-1,52	-2,60	*	*	**
RuBisCO, große Untereinheit	38 <sup>a</sup>	ATCG00490	53435 / 5,88	14	43	465	-1,06	1,09	-1,41	-2,81	*	*	*

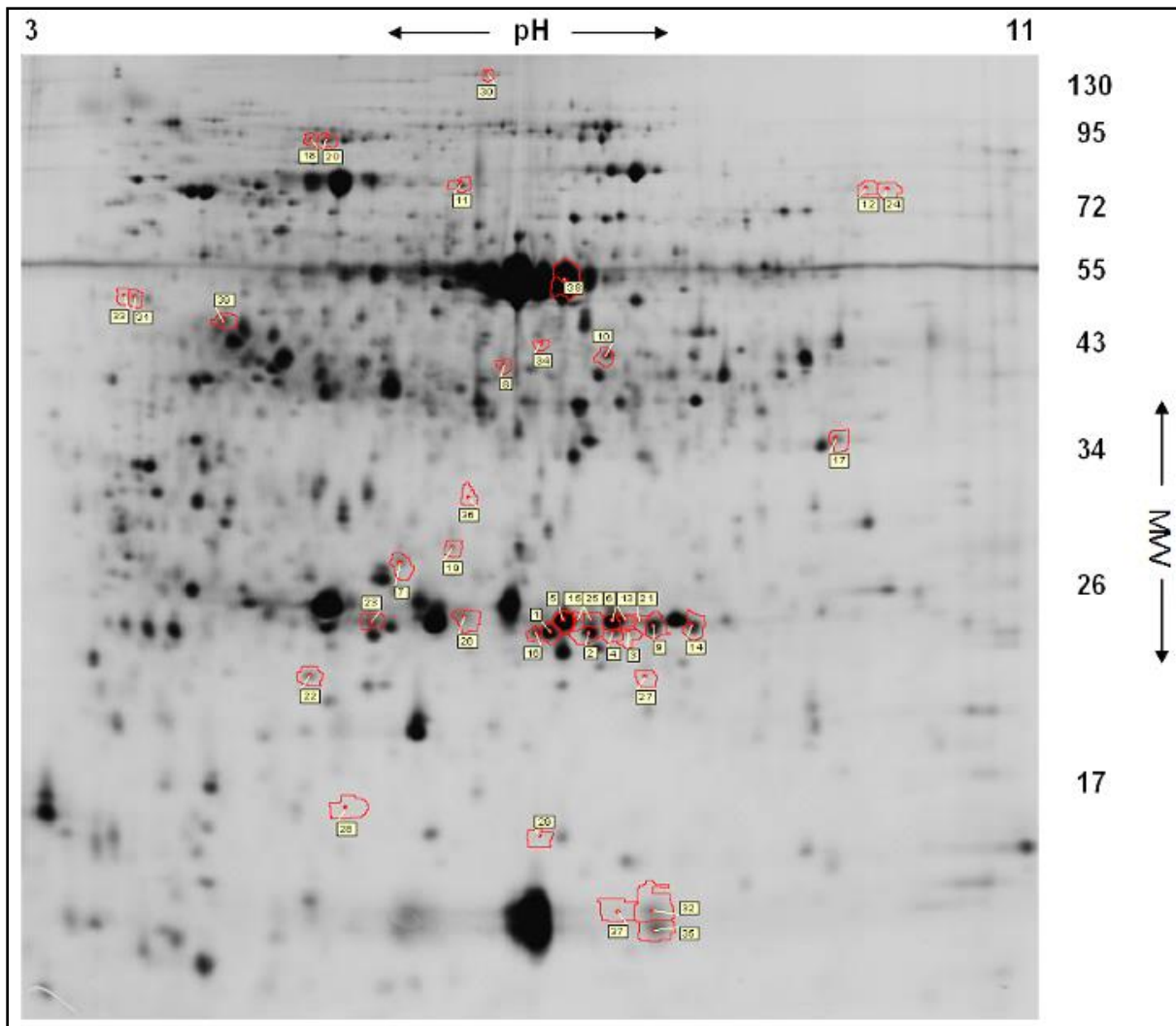
## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000 avrRpt2	Zeit	Interaktion
RuBisCO-Activase	39 <sup>a</sup>	AT2G39730	52347 / 5,87	22	59	614	-1,16	1,04	-1,32	-3,17	*	*	**

- (1) Identifizierte Proteine von *Arabidopsis thaliana* oder *Pst* DC3000 (avrRpt2). Multiple Identifizierungen einzelner Proteinspots sind nach der Höhe des Score-Wertes angeordnet.
- (2) Spotnummer auf 2D-Gelbildaufnahme in Anhang Abb. 1. Proteinidentifizierungen erfolgten entweder durch MALDI TOF/TOF (a) oder LC-MS/MS (b).
- (3) Akzessionsnummer der TAIR-Datenbank (c) bzw. SwissProt-Datenbank (d).
- (4) Werte für Molekulargewichte in Da und isoelektrischen Punkt (pI).
- (5) Ergebnisse des Datenbankabgleichs mit Hilfe des Suchalgorithmus Mascot. Angegeben sind die Anzahl der Peptididentifizierungen, die prozentuale Sequenzübereinstimmung und der berechnete Score-Wert.
- (6) Veränderung der Proteinregulation zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Pst* DC3000 (avrRpt2) im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Proteine, bei denen mindestens eine um den Faktor 1,5 erhöhte Produktion nachgewiesen werden konnte, sind je nach Regulationsstärke in verschiedenen Rottönen wiedergegeben. Proteine, die mindestens eine um den Faktor 1,5 verminderte Produktion zeigten, sind in verschiedenen Grünschattierungen markiert.
- (7) Signifikanzwerte der zweifaktoriellen ANOVA-Auswertung für den Infektionsfaktor, den Zeitfaktor und den Interaktionsfaktor (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

Legende zur farbigen Markierung:

**Regulationsfaktor:** 10,0 - 20,0 5,0 - 10,0 2,0 - 5,0 1,5 - 2,0 -1,5 - -2,0 -2,0 - -5,0 -5,0 - -10,0



**Anhang Abb. 1: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)**

Einzelne Proteine, die 48 h nach der Infektion mindestens eine um den Faktor  $\pm 2$  differentielle Regulation im Vergleich zur Kontrollbehandlung zeigten, sind rot markiert und entsprechend der Auflistung in Anhang Tab. 4 mit Nummern versehen.

**Anhang Tab. 5: Differenziell regulierte Proteine in Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit *Pst* DC3000**

Dargestellt sind alle identifizierten Proteine, die nach virulenter Behandlung mit *Pst* DC3000 eine mindestens um den Faktor 2 erhöhte bzw. erniedrigte Produktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufwiesen. Die Berechnung des Regulationsfaktors sowie die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Software-Programmes DeCyder und basierte auf drei unabhängigen biologischen Wiederholungen für jeden untersuchten Zeitpunkt. Proteinkandidaten wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF/TOF Massenspektrometers oder LTQ-OrbitrapXL Massenspektrometers analysiert und die einzelnen Massenspektrogramme mit der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR9 sowie der Datenbank SwissProt verglichen.

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	<i>Pst</i> DC3000	Zeit	Interaktion
<b>Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>													
Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	1 <sup>b</sup>	AT3G62030 <sup>c</sup>	28532 / 8,83	4	15	142	-1,22	-1,11	2,29	18,18	*	*	*
ADP-Ribosylierungsfaktor A1B		AT5G14670 <sup>c</sup>	21578 / 6,43	3	20	93	-1,22	-1,11	2,29	18,18	*	*	*
Unbekanntes Protein		AT1G09310 <sup>c</sup>	20049 / 5,37	3	17	91	-1,22	-1,11	2,29	18,18	*	*	*
Glutathion-Peroxidase 6	2 <sup>b</sup>	AT4G11600 <sup>c</sup>	25739 / 9,38	2	9	72	1,60	-1,43	2,60	15,09	*	*	*
Photosystem II, P-1-Untereinheit (PSBP-1)		AT1G06680 <sup>c</sup>	28249 / 6,90	2	8	64	1,60	-1,43	2,60	15,09	*	*	*
3-Dehydroquinat-Synthase, putativ	3 <sup>b</sup>	AT5G66120 <sup>c</sup>	48319 / 7,05	15	32	467	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Villin 4		AT4G30160 <sup>c</sup>	109829 / 5,83	12	11	399	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Aldo/Keto-Reduktase		AT1G04420 <sup>c</sup>	46683 / 8,70	11	25	367	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Pyruvat-Dehydrogenase E1 α		AT1G01090 <sup>c</sup>	47600 / 7,16	9	18	272	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Indol-3-Acetonitril-Nitrilase (Nit1)		AT3G44310 <sup>c</sup>	38527 / 5,84	5	15	153	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Osmose-abhängiges Protein (LOS1)		AT1G56070 <sup>c</sup>	94743 / 5,89	5	6	136	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ		AT3G52930 <sup>c</sup>	38858 / 6,05	5	10	128	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Katalase 3		AT1G20620 <sup>c</sup>	57059 / 7,31	3	6	93	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Dihydroorotat-Dehydrogenase		AT3G17810 <sup>c</sup>	47216 / 6,37	4	13	92	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	3	7	91	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Osmose-abhängiges Protein (LOS2)		AT2G36530 <sup>c</sup>	47974 / 5,54	3	7	82	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Aminotransferase (Klasse1)		AT1G80360 <sup>c</sup>	44132 / 5,97	2	5	78	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Glutamat-Dehydrogenase 2		AT5G07440 <sup>c</sup>	45013 / 6,07	4	10	72	1,57	1,41	1,15	12,26	*	*	*
Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	4 <sup>b</sup>	AT3G62030 <sup>c</sup>	28532 / 8,83	7	28	218	1,55	1,47	1,18	9,83	*	*	*
Phosphoribulokinase (PRK)		AT1G32060 <sup>c</sup>	44721 / 5,71	2	6	114	1,55	1,47	1,18	9,83	*	*	*
β-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase, putativ		AT2G22230 <sup>c</sup>	24340 / 8,61	3	15	90	1,55	1,47	1,18	9,83	*	*	*

Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase 2	7 <sup>b</sup>	AT1G20020 <sup>c</sup>	41484 / 8,51	11	25	457	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Indol-3-Acetonitril-Nitrilase (Nit1)		AT3G44310 <sup>c</sup>	38527 / 5,84	9	34	406	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase		AT2G17420 <sup>c</sup>	40217 / 6,26	7	24	256	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Malat-Dehydrogenase		AT1G53240 <sup>c</sup>	36010 / 8,54	2	7	123	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Sulfotransferase 17		AT1G18590 <sup>c</sup>	40115 / 6,04	4	6	92	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
1-Phosphatidylinositol-Phosphodiesterase		AT4G34920 <sup>c</sup>	36720 / 5,68	2	7	81	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Curculin-ähnliches Lektin		AT1G78820 <sup>c</sup>	51246 / 8,75	3	7	79	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Unbekanntes Protein		AT3G29450 <sup>c</sup>	60629 / 8,64	7	5	76	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	2	4	71	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Leucin-reiche Proteinkinase, putativ		AT3G02880 <sup>c</sup>	68167 / 8,60	3	4	63	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Fruktosamin-Kinase		AT3G61080 <sup>c</sup>	36733 / 6,51	3	9	62	1,74	1,02	1,29	5,30	*	*	**
Jasmonat-abhängiges Protein 1	8 <sup>a</sup>	AT3G16470 <sup>c</sup>	48524 / 5,12	19	49	557	-1,42	-1,06	3,17	4,76	*	*	*
Coronatin-induziertes Protein 1	9 <sup>a</sup>	AT4G23600 <sup>c</sup>	47408 / 5,89	19	56	505	-1,17	1,13	2,63	4,17	*	*	*
β-Glukosidase 18	11 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	13	33	108	-1,44	1,23	2,87	3,63	*	*	*
12-Oxo-Phytodienoat-Reduktase	12 <sup>a</sup>	AT2G06050 <sup>c</sup>	42893 / 7,71	16	56	378	1,03	1,01	2,38	3,06	*	*	*
β-Glukosidase 18	13 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	9	24	343	-1,18	1,14	3,99	3,06	*	*	*
Indol-3-Acetonitril-Nitrilase (Nit1)	14 <sup>b</sup>	AT3G44310 <sup>c</sup>	38527 / 5,84	10	28	427	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Aminotransferase 3		AT3G49680 <sup>c</sup>	45343 / 8,33	9	22	325	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Mitogen-aktivierte Proteinkinase 4		AT4G01370 <sup>c</sup>	43281 / 5,74	10	22	254	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Glycerat-Dehydrogenase		AT1G68010 <sup>c</sup>	42449 / 6,68	7	16	185	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Cathepsin-ähnliche Cystein-Protease, putativ		AT4G01610 <sup>c</sup>	40247 / 5,79	5	15	153	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	5	9	137	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Uroporphyrinogen-Decarboxylase (HEME1)		AT3G14930 <sup>c</sup>	46681 / 6,64	6	14	124	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Unbekanntes Protein		AT5G25770 <sup>c</sup>	40951 / 5,91	4	11	114	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ		AT3G52930 <sup>c</sup>	38858 / 6,05	2	5	91	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
Epithio-spezifisches Protein		AT1G54040 <sup>c</sup>	37042 / 5,56	5	11	67	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
ATP-Synthase, β-Untereinheit		ATCG00480 <sup>c</sup>	53957 / 5,38	2	4	66	-1,15	-1,02	1,17	2,65	*	*	*
β-Glukosidase 18	15 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	11	29	70	-1,29	1,23	1,86	2,54	*	*	*

## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
Jasmonat-abhängiges Protein 1	16 <sup>a</sup>	AT3G16470 <sup>c</sup>	48524 / 5,12	18	61	396	-1,30	-1,08	1,86	2,49	*	*	*
Coronatin-induziertes Protein 1		AT4G23600 <sup>c</sup>	47408 / 5,89	10	33	72	-1,30	-1,08	1,86	2,49	*	*	*
ATP-Synthase, $\beta$ -Untereinheit	17 <sup>b</sup>	ATCG00480 <sup>c</sup>	53957 / 5,38	7	8	317	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 1A		AT1G67090 <sup>c</sup>	20488 / 7,59	7	30	279	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Thioredoxin O1		AT2G35010 <sup>c</sup>	21349 / 9,45	4	22	233	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Thioredoxin 3		AT5G42980 <sup>c</sup>	13272 / 5,06	4	38	191	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
RuBisCO, kleine Untereinheit 2B		AT5G38420 <sup>c</sup>	20622 / 7,59	7	30	172	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
15 kDa luminales Thylakoidprotein		AT2G44920 <sup>c</sup>	24106 / 7,55	2	11	126	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Photosystem II, O-2-Untereinheit (PSBO-2)		AT3G50820 <sup>c</sup>	35226 / 5,92	2	12	126	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Glutaredoxin		AT2G20270 <sup>c</sup>	19341 / 8,37	2	15	103	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Glyoxalase 3		AT1G53580 <sup>c</sup>	32483 / 6,50	2	7	98	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Triosephosphat-Isomerase		AT3G55440 <sup>c</sup>	27380 / 5,39	2	10	67	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Ribosomales Protein 12-A		AT3G27830 <sup>c</sup>	20063 / 5,51	2	8	62	1,07	1,12	1,35	2,16	*	*	
Luminales Bindungsprotein (BiP1)	18 <sup>a</sup>	AT5G28540 <sup>c</sup>	73869 / 5,08	21	33	162	1,04	1,26	1,10	2,14	*	*	**
Luminales Bindungsprotein (BiP2)		AT5G42020 <sup>c</sup>	73801 / 5,11	18	27	144	1,04	1,26	1,10	2,14	*	*	**
Thioglukosid-Glukohydrolase 1		AT5G26000 <sup>c</sup>	61664 / 5,61	6	12	88	1,04	1,26	1,10	2,14	*	*	**
$\beta$ -Glukosidase 18	19 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	12	35	74	1,04	1,09	1,72	2,02	*	*	**
Photosystem II, O-2-Untereinheit (PSBO-2)	20 <sup>a</sup>	AT3G50820 <sup>c</sup>	35226 / 5,92	11	43	109	-1,07	-1,04	-1,10	-2,02	*	*	*
Haloacid-Dehalogenase-ähnliche Hydrolase		AT3G48420 <sup>c</sup>	34680 / 8,31	11	40	101	-1,07	-1,04	-1,10	-1,10	*	*	*
Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	21 <sup>a</sup>	AT5G17920 <sup>c</sup>	84646 / 6,09	10	15	248	1,05	1,12	-1,05	-2,05	*	*	*
Methionin-Synthase 2 (ATMS2)		AT3G03780 <sup>c</sup>	84873 / 6,09	6	9	133	1,05	1,12	-1,05	-2,05	*	*	*
Phosphoribulokinase (PRK)	22 <sup>a</sup>	AT1G32060 <sup>c</sup>	44721 / 5,71	19	69	455	1,07	-1,01	-1,22	-2,13	*	*	*
Fruktose-1,6-Bisphosphatase, putativ	23 <sup>a</sup>	AT3G54050 <sup>c</sup>	45590 / 5,25	11	29	265	1,02	1,05	1,04	-2,13	*	*	*
Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase 1	24 <sup>a</sup>	AT5G04140 <sup>c</sup>	178066 / 5,94	35	27	262	-1,02	-1,08	-1,21	-2,14	*	*	**
Patellin 2	25 <sup>b</sup>	AT1G22530 <sup>c</sup>	76019 / 4,92	10	16	437	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Aminotransferase (Klasse4)		AT5G27410 <sup>c</sup>	63369 / 5,97	10	20	422	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	11	20	383	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Malat-Oxidoreduktase, putativ		AT4G00570 <sup>c</sup>	67111 / 6,62	11	18	333	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*

## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
Leucin-reiches Protein		AT3G15410 <sup>c</sup>	64634 / 6,02	9	15	307	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
tRNA-Synthetase (Klasse2)		AT3G62120 <sup>c</sup>	61344 / 6,09	7	14	294	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Aminoacyl-tRNA-Ligase		AT2G31170 <sup>c</sup>	64387 / 6,75	6	11	220	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase 6		AT5G40760 <sup>c</sup>	59422 / 6,03	7	14	192	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Purpur-saure Phosphatase 12		AT2G27190 <sup>c</sup>	54374 / 5,98	2	5	184	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Glutathion-Reduktase		AT3G54660 <sup>c</sup>	61327 / 7,97	3	6	122	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
AICARFT/IMPCHase Bienzym		AT2G35040 <sup>c</sup>	65436 / 6,46	4	6	105	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase		AT5G62530 <sup>c</sup>	62190 / 6,26	2	4	105	-1,15	-1,08	1,07	-2,14	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ	26 <sup>a</sup>	AT2G21330 <sup>c</sup>	43075 / 6,18	16	45	377	1,10	-1,01	-1,19	-2,26	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ	27 <sup>b</sup>	AT4G38970 <sup>c</sup>	43132 / 6,78	153	43	1681	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
RuBisCO-Activase		AT2G39730 <sup>c</sup>	52347 / 5,87	11	24	354	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Serin-typische Endopeptidase		AT3G27925 <sup>c</sup>	46816 / 6,00	9	15	292	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Aktin 7		AT5G09810 <sup>c</sup>	41937 / 5,31	7	19	255	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Aspartat-Carabmoyltransferase		AT3G20330 <sup>c</sup>	43424 / 6,21	10	11	185	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Stamm Schleife-bindendes Protein		AT3G63140 <sup>c</sup>	44074 / 8,54	10	19	167	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Reversibel glykosylierbares Polypeptid 1		AT3G02230 <sup>c</sup>	41116 / 5,61	3	10	146	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Arginase, putativ		AT4G08870 <sup>c</sup>	38071 / 5,90	3	11	135	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Carbohydrat-Kinase		AT5G19150 <sup>c</sup>	39815 / 6,61	3	12	125	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Unbekanntes Protein		AT5G41970 <sup>c</sup>	42558 / 5,88	2	5	67	1,06	1,04	-1,16	-2,32	*	*	*
Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase 1	28 <sup>a</sup>	AT5G04140 <sup>c</sup>	178066 / 5,94	39	27	446	-1,04	-1,17	-1,18	-2,50	*	*	**
Glutamat-Synthase 2		AT2G41220 <sup>c</sup>	178951 / 6,57	14	10	80	-1,04	-1,17	-1,18	-2,50	*	*	**
Glutamin-Synthetase 2	29 <sup>a</sup>	AT5G35630 <sup>c</sup>	47780 / 6,43	17	57	507	1,01	-1,08	-1,22	-2,62	*	*	*
Glutamat-Ammonium-Ligase		AT1G66200 <sup>c</sup>	39297 / 5,14	3	8	107	1,01	-1,08	-1,22	-2,62	*	*	*
Aktin 7		AT5G09810 <sup>c</sup>	41937 / 5,31	12	46	90	1,01	-1,08	-1,22	-2,62	*	*	*
Serin-Transhydroxymethyl-Transferase 1	30 <sup>a</sup>	AT4G37930 <sup>c</sup>	57535 / 8,13	13	24	108	1,04	-1,10	-1,20	-2,74	*	*	*
Thiamin 1 (TH1)	31 <sup>a</sup>	AT5G54770 <sup>c</sup>	36755 / 5,82	11	42	190	-1,18	-1,02	-1,38	-3,06	*	*	*
RuBisCO-Activase	32 <sup>a</sup>	AT2G39730 <sup>c</sup>	52347 / 5,87	22	59	614	1,09	-1,02	-1,38	-4,63	*	*	*



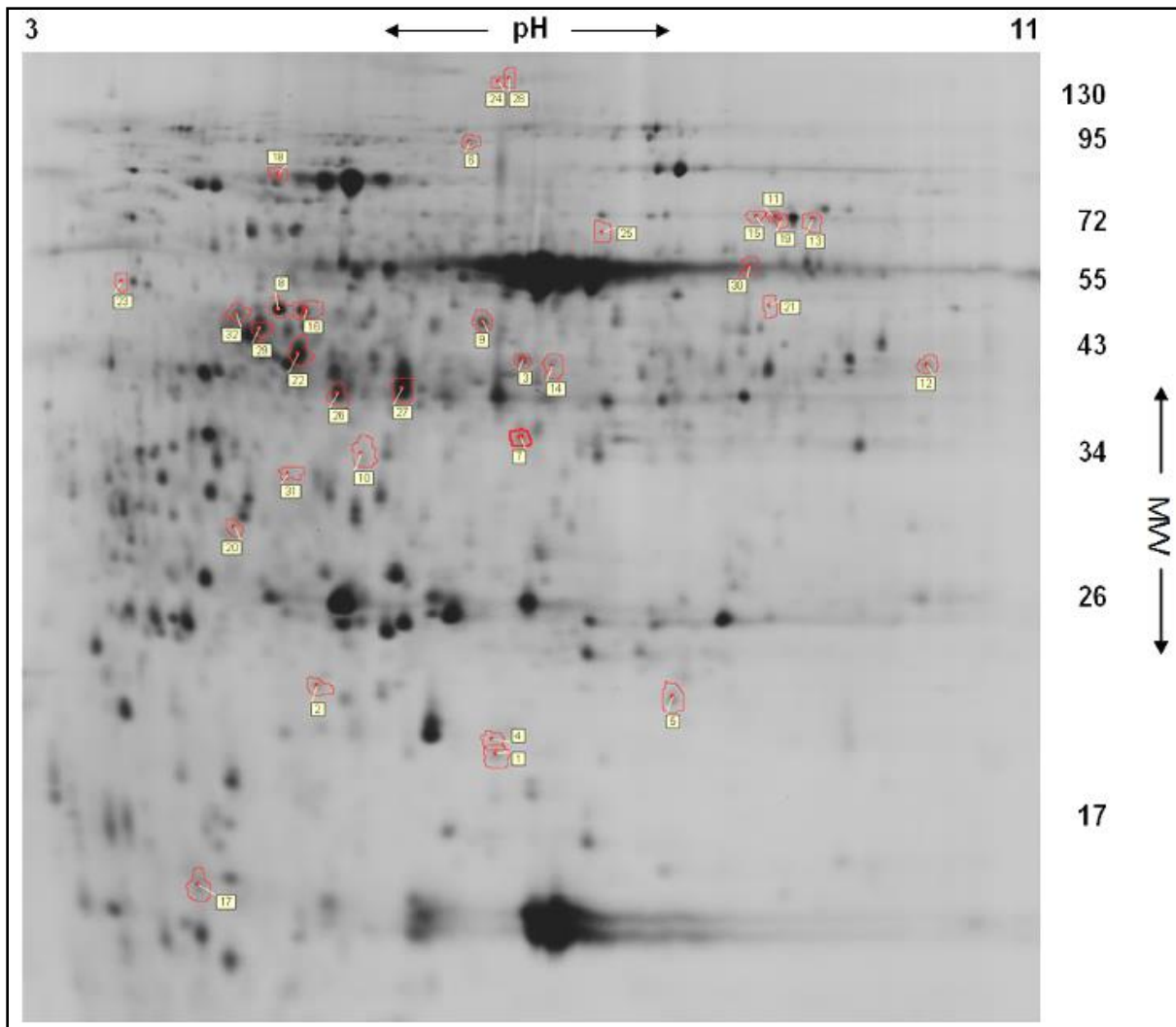
## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
<b>Proteine von Pst DC3000</b>													
Unbekanntes Protein	5 <sup>a</sup>	Q87V70 <sup>d</sup>	20621 / 6,59	7	56	562	1,66	-1,35	1,86	9,85	*	*	*
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	6 <sup>b</sup>	Q886R9 <sup>d</sup>	97987 / 5,57	23	33	738	-1,40	-1,04	2,16	5,68	*	*	*
Elongationsfaktor Ts	10 <sup>a</sup>	Q886P2 <sup>d</sup>	30620 / 5,41	14	50	568	1,71	1,32	1,12	3,89	*	*	**

- (1) Identifizierte Proteine von *Arabidopsis thaliana* oder *Pst* DC3000. Multiple Identifizierungen einzelner Proteinspots sind nach der Höhe des Score-Wertes angeordnet.
- (2) Spotnummer auf 2D-Gelbildaufnahme in Anhang Abb. 2. Proteinidentifizierungen erfolgten entweder durch MALDI TOF/TOF (a) oder LC-MS/MS (b).
- (3) Akzessionsnummer der TAIR-Datenbank (c) bzw. SwissProt-Datenbank (d).
- (4) Werte für Molekulargewichte in Da und isoelektrischen Punkt (pI).
- (5) Ergebnisse des Datenbankabgleichs mit Hilfe des Suchalgorithmus Mascot. Angegeben sind die Anzahl der Peptididentifizierungen, die prozentuale Sequenzübereinstimmung und der berechnete Score-Wert.
- (6) Veränderung der Proteinregulation zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Pst* DC3000 im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Proteine, bei denen mindestens eine um den Faktor 1,5 erhöhte Produktion nachgewiesen werden konnte, sind je nach Regulationsstärke in verschiedenen Rottönen wiedergegeben. Proteine, die mindestens eine um den Faktor 1,5 verminderte Produktion zeigten, sind in verschiedenen Grünschattierungen markiert.
- (7) Signifikanzwerte der zweifaktoriellen ANOVA-Auswertung für den Infektionsfaktor, den Zeitfaktor und den Interaktionsfaktor (\*: p ≤ 0,05; \*\*: p ≤ 0,01).

Legende zur farbigen Markierung:

**Regulationsfaktor:** 10,0 - 20,0 5,0 - 10,0 2,0 - 5,0 1,5 - 2,0 -1,5 - -2,0 -2,0 - -5,0 -5,0 - -10,0



**Anhang Abb. 2: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von Wildtyp-Pflanzen nach Infektion mit *Pst* DC3000**

Einzelne Proteine, die 48 h nach der Infektion mindestens eine um den Faktor  $\pm 2$  differentielle Regulation im Vergleich zur Kontrollbehandlung zeigten, sind rot markiert und entsprechend der Auflistung in Anhang Tab. 5 mit Nummern versehen.

**Anhang Tab. 6: Differenziell regulierte Proteine in *gsnor* Knock-out Linien nach Infektion mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)**

Dargestellt sind alle identifizierten Proteine, die nach avirulenter Behandlung mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) eine mindestens um den Faktor 2 erhöhte bzw. erniedrigte Produktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufwiesen. Die Berechnung des Regulationsfaktors sowie die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Software-Programmes DeCyder und basierte auf drei unabhängigen biologischen Wiederholungen für jeden untersuchten Zeitpunkt. Proteinkandidaten wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF/TOF Massenspektrometers oder LTQ-OrbitrapXL Massenspektrometers analysiert und die einzelnen Massenspektrogramme mit der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR9 sowie der Datenbank SwissProt verglichen.

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	<i>Pst</i> DC3000 <i>avrRpt2</i>	Zeit	Interaktion
<b>Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>													
Glutathion S-Transferase 2	1 <sup>b</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	10	43	354	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
20 kDa luminales Thylakoidprotein		AT3G56650	28726 / 9,30	6	25	240	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Pyrrrolidon-Carboxylat-Peptidase		AT1G56700	24316 / 5,98	5	22	240	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Eisen Superoxid-Dismutase (FeSOD 1)		AT4G25100	23776 / 6,06	6	24	234	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Glykosid-Hydrolase		AT4G25100	108276 / 6,01	4	3	214	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Quinon-Reduktase		AT4G27270	21778 / 6,08	3	15	109	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Chaperonin 20		AT5G20720	26785 / 8,86	3	17	109	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Photosystem II, P-1-Untereinheit (PSBP-1)		AT1G06680	28249 / 6,90	3	13	93	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	5	12	84	1,07	-1,42	6,96	4,89	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)	2 <sup>a</sup>	AT1G02930	23471 / 5,80	13	62	559	1,10	1,21	3,91	4,37	*	*	
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	9	44	389	1,10	1,21	3,91	4,37	*	*	
Glutamat-Dehydrogenase 2	3 <sup>a</sup>	AT5G07440	45013 / 6,07	14	40	574	-1,07	1,09	2,09	3,96	*	*	*
Glutamat-Dehydrogenase 1		AT5G18170	44781 / 6,38	7	20	79	-1,07	1,09	2,09	3,96	*	*	*
ATP-Synthase, α-Untereinheit	4 <sup>a</sup>	ATCG00120	55351 / 5,19	11	27	69	1,20	1,10	1,65	3,63	*	*	*
Glutathion S-Transferase 2	5 <sup>a</sup>	AT4G02520	24114 / 5,92	5	21	87	1,05	-1,14	3,03	2,95	*	*	**
Methioninsulfoxid-Reduktase, putativ		AT4G25130	28968 / 8,96	4	15	63	1,05	-1,14	3,03	2,95	*	*	**
Leguminosen-Lektin	6 <sup>a</sup>	AT3G15356	29788 / 8,91	9	36	107	1,22	1,02	2,67	2,88	*	*	
Leguminosen-Lektin	7 <sup>a</sup>	AT3G16530	30547 / 6,97	8	29	101	1,15	-1,14	3,18	2,65	*	*	**
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)	8 <sup>a</sup>	AT1G02920	23583 / 6,14	7	25	287	-1,08	-1,09	2,62	2,60	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	6	22	244	-1,08	-1,09	2,62	2,60	*	*	**

## Anhang

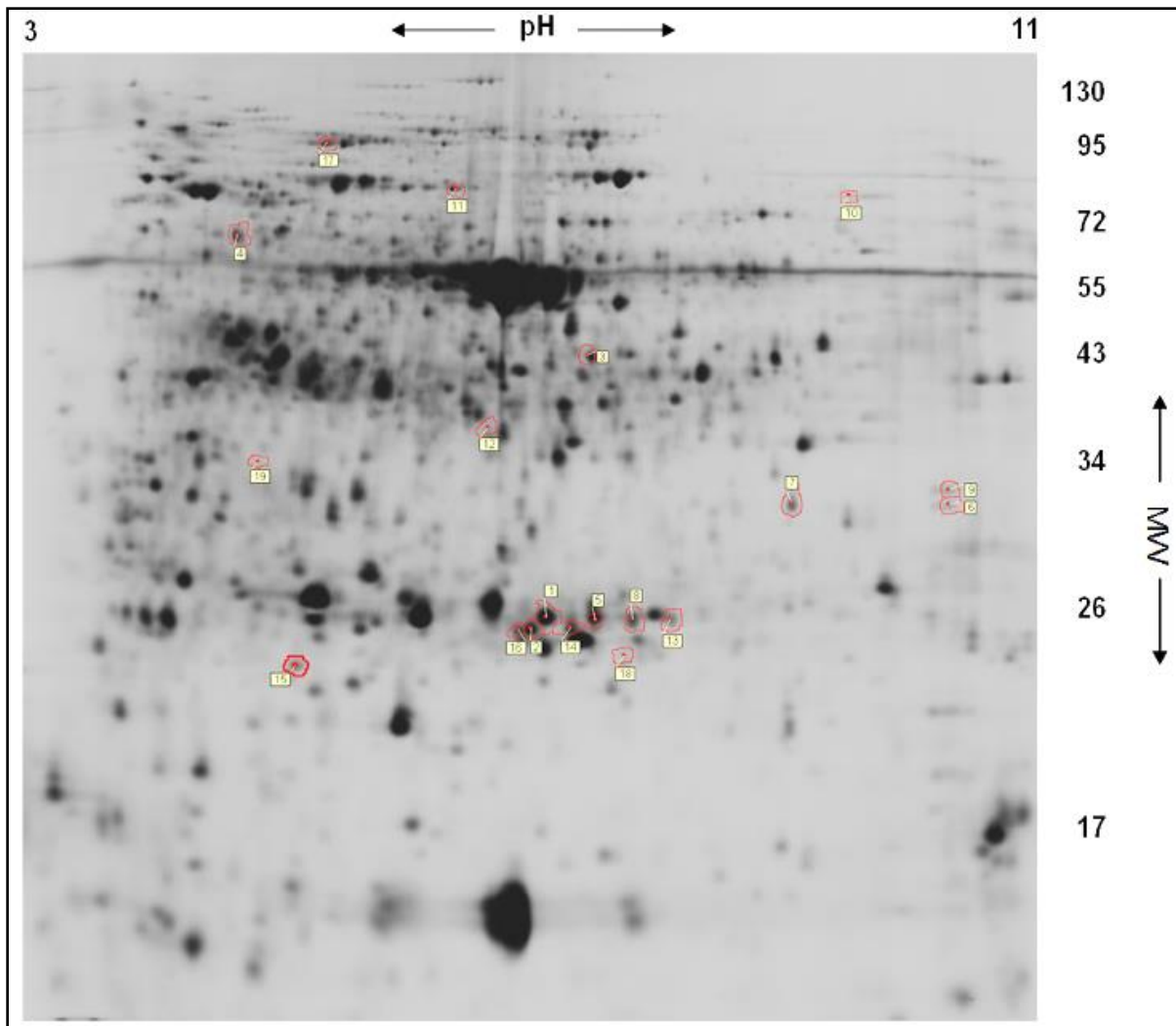
Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000 avrRpt2	Zeit	Interaktion
Leguminosen-Lektin	9 <sup>a</sup>	AT3G15356	29788 / 8,91	9	39	159	1,19	1,01	2,68	2,56	*	*	**
Acyl-Koenzym A Oxidase 1	10 <sup>a</sup>	AT4G16760	74996 / 7,58	16	27	160	1,01	-1,07	2,19	2,52	*	*	**
TolB-Protein	11 <sup>a</sup>	AT4G01870	73112 / 5,64	19	43	314	-1,16	-1,03	3,64	2,43	*	*	**
Mutase-Protein	12 <sup>a</sup>	AT1G21440	36512 / 6,67	13	48	286	1,01	1,10	1,40	2,37	*	*	
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)	13 <sup>a</sup>	AT1G02920	23583 / 6,14	11	45	509	1,03	-1,14	1,95	2,33	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	6	20	303	1,03	-1,14	1,95	2,33	*	*	**
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)	14 <sup>a</sup>	AT1G02930	23471 / 5,80	12	62	514	1,14	1,49	2,18	2,32	*	*	
Glutathion S-Transferase 11 (GSTF8)		AT1G02920	23583 / 6,14	8	44	343	1,14	1,49	2,18	2,32	*	*	
Glutathion-Peroxidase 2	15 <sup>a</sup>	AT2G31570	19104 / 5,60	9	49	188	1,39	1,11	1,93	2,19	*	*	
Flavodoxin-ähnliche Quinon-Reduktase 1	16 <sup>a</sup>	AT5G54500	21782 / 5,96	8	59	307	1,16	1,10	1,92	2,05	*	*	
Quinon-Reduktase		AT4G27270	21778 / 6,08	4	24	260	1,16	1,10	1,92	2,05	*	*	
Glutathion S-Transferase 1 (GSTF6)		AT1G02930	23471 / 5,80	5	25	67	1,16	1,10	1,92	2,05	*	*	
Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase	17 <sup>a</sup>	AT4G15530	93948 / 5,25	25	32	343	1,05	1,02	2,53	2,93	*	*	**
Aminopeptidase M1		AT4G33090	98744 / 5,34	22	26	220	1,05	1,02	2,53	2,93	*	*	**
Germin 3	18 <sup>a</sup>	AT5G20630	21993 / 6,26	4	25	70	-1,09	1,06	-1,94	-2,35	*	*	
Thiamin 4 (THI4)	19 <sup>a</sup>	AT5G54770	36755 / 5,82	6	26	94	1,02	1,12	-1,85	-2,40	*	*	**

- (1) Identifizierte Proteine von *Arabidopsis thaliana* oder *Pst* DC3000 (avrRpt2). Multiple Identifizierungen einzelner Proteinspots sind nach der Höhe des Score-Wertes angeordnet.
- (2) Spotnummer auf 2D-Gelbildaufnahme in Anhang Abb. 3. Proteinidentifizierungen erfolgten entweder durch MALDI TOF/TOF (a) oder LC-MS/MS (b).
- (3) Akzessionsnummer der TAIR-Datenbank (c) bzw. SwissProt-Datenbank (d).
- (4) Werte für Molekulargewichte in Da und isoelektrischen Punkt (pI).
- (5) Ergebnisse des Datenbankabgleichs mit Hilfe des Suchalgorithmus Mascot. Angegeben sind die Anzahl der Peptididentifizierungen, die prozentuale Sequenzübereinstimmung und der berechnete Score-Wert.

- (6) Veränderung der Proteinregulation zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Pst* DC3000 (avrRpt2) im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Proteine, bei denen mindestens eine um den Faktor 1,5 erhöhte Produktion nachgewiesen werden konnte, sind je nach Regulationsstärke in verschiedenen Rottönen wiedergegeben. Proteine, die mindestens eine um den Faktor 1,5 verminderte Produktion zeigten, sind in verschiedenen Grünschattierungen markiert.
- (7) Signifikanzwerte der zweifaktoriellen ANOVA-Auswertung für den Infektionsfaktor, den Zeitfaktor und den Interaktionsfaktor (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

Legende zur farbigen Markierung:

**Regulationsfaktor:** 10,0 - 20,0 5,0 - 10,0 2,0 - 5,0 1,5 - 2,0 -1,5 - -2,0 -2,0 - -5,0 -5,0 - -10,0



**Anhang Abb. 3: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraction aus Blattmaterial von *gsnor* Knock-out Linien nach Infektion mit *Pst* DC3000 (*avrRpt2*)**

Einzelne Proteine, die 48 h nach der Infektion mindestens eine um den Faktor  $\pm 2$  differentielle Regulation im Vergleich zur Kontrollbehandlung zeigten, sind rot markiert und entsprechend der Auflistung in Anhang Tab. 6 mit Nummern versehen.

**Anhang Tab. 7: Differenziell regulierte Proteine in *gsnor* Knock-out Linien nach Infektion mit *Pst* DC3000**

Dargestellt sind alle identifizierten Proteine, die nach virulenter Behandlung mit *Pst* DC3000 eine mindestens um den Faktor 2 erhöhte bzw. erniedrigte Produktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufwiesen. Die Berechnung des Regulationsfaktors sowie die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Software-Programmes DeCyder und basierte auf drei unabhängigen biologischen Wiederholungen für jeden untersuchten Zeitpunkt. Proteinkandidaten wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF/TOF Massenspektrometers oder LTQ-OrbitrapXL Massenspektrometers analysiert und die einzelnen Massenspektrogramme mit der *Arabidopsis thaliana* Datenbank TAIR9 sowie der Datenbank SwissProt verglichen.

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	<i>Pst</i> DC3000	Zeit	Interaktion
<b>Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>													
ATP-Synthase, α-Untereinheit	2 <sup>a</sup>	ATCG00120 <sup>c</sup>	55351 / 5,19	11	27	69	1,41	1,35	2,21	5,97	*	*	*
3-Dehydroquinat-Synthase, putativ	3 <sup>b</sup>	AT5G66120 <sup>c</sup>	48319 / 7,05	15	32	467	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Villin 4		AT4G30160 <sup>c</sup>	109829 / 5,83	12	11	399	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Aldo/Keto-Reduktase		AT1G04420 <sup>c</sup>	46683 / 8,70	11	25	367	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Pyruvat-Dehydrogenase E1 α		AT1G01090 <sup>c</sup>	47600 / 7,16	9	18	272	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Indol-3-Acetonitril-Nitrilase (Nit1)		AT3G44310 <sup>c</sup>	38527 / 5,84	5	15	153	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Osmose-abhängiges Protein (LOS1)		AT1G56070 <sup>c</sup>	94743 / 5,89	5	6	136	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ		AT3G52930 <sup>c</sup>	38858 / 6,05	5	10	128	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Katalase		AT1G20620 <sup>c</sup>	57059 / 7,31	3	6	93	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Dihydroorotat-Dehydrogenase		AT3G17810 <sup>c</sup>	47216 / 6,37	4	13	92	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit		ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	3	7	91	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Osmose-abhängiges Protein (LOS2)		AT2G36530 <sup>c</sup>	47974 / 5,54	3	7	82	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Aminotransferase (Klasse1)		AT1G80360 <sup>c</sup>	44132 / 5,97	2	5	78	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
Glutamat-Dehydrogenase 2		AT5G07440 <sup>c</sup>	45013 / 6,07	4	10	72	-1,25	1,49	-1,01	5,66	*	*	*
β-Glukosidase 18	5 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	14	35	226	1,00	-1,13	4,12	5,03	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit	6 <sup>a</sup>	ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	12	30	77	1,24	-1,21	1,12	4,89	*	*	*
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase, putativ	7 <sup>b</sup>	AT4G38970 <sup>c</sup>	43132 / 6,78	15	25	655	1,00	1,38	1,40	3,90	*	*	*
Serine-transhydroxy-Methyltransferase 1		AT4G37930 <sup>c</sup>	57535 / 8,13	10	15	328	1,00	1,38	1,40	3,90	*	*	*
Peptidyl-prolyl cis-trans- Isomerase (ROC4)		AT3G62030 <sup>c</sup>	28208 / 8,83	4	15	114	1,00	1,38	1,40	3,90	*	*	*
Vegetatives Speicherprotein 1	9 <sup>a</sup>	AT5G24780 <sup>c</sup>	30357 / 5,49	3	10	78	-1,08	1,13	-1,24	3,58	*	*	*
RuBisCO, große Untereinheit	10 <sup>a</sup>	ATCG00490 <sup>c</sup>	53435 / 5,88	21	54	274	1,24	1,17	1,22	3,58	*	*	*

## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
Mutase-Protein	11 <sup>a</sup>	AT1G21440 <sup>c</sup>	36512 / 6,67	13	48	286	-1,11	1,11	1,37	3,51	*	*	*
Coronatin-induziertes Protein 1	12 <sup>a</sup>	AT4G23600 <sup>c</sup>	47408 / 5,89	19	56	505	1,02	1,05	2,42	3,43	*	*	*
β-Glukosidase 18	13 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	13	33	108	-1,08	-1,01	3,00	3,23	*	*	*
Jasmonat-abhängiges Protein 1	14 <sup>a</sup>	AT3G16470 <sup>c</sup>	48524 / 5,12	19	49	557	1,00	-1,04	2,29	3,14	*	*	*
12-Oxo-Phytodienoat-Reduktase	15 <sup>a</sup>	AT2G06050 <sup>c</sup>	42893 / 7,71	16	56	378	1,24	1,17	2,10	2,76	*	*	**
β-Glukosidase 18	19 <sup>a</sup>	AT1G52400 <sup>c</sup>	60877 / 6,74	9	24	343	1,04	1,02	3,15	2,46	*	*	*
Dehydroascorbat-Reduktase	20 <sup>a</sup>	AT1G19570 <sup>c</sup>	23554 / 5,56	8	57	305	1,10	-1,13	1,61	2,37	*	*	*
Dehydroascorbat-Reduktase, putativ		AT1G19550 <sup>c</sup>	17165 / 5,58	4	32	99	1,10	-1,13	1,61	2,37	*	*	*
Coronatin-induziertes Protein 1	21 <sup>a</sup>	AT4G23600 <sup>c</sup>	47408 / 5,89	19	67	449	1,19	1,54	1,51	2,34	*	*	
Glutamin-Synthetase 2	22 <sup>a</sup>	AT5G35630 <sup>c</sup>	47780 / 6,43	19	59	550	-1,32	-1,15	-1,77	-2,19	*	*	
Glutamat-Ammonium-Ligase		AT1G66200 <sup>c</sup>	39297 / 5,14	4	13	122	-1,32	-1,15	-1,77	-2,19	*	*	
Thioglukosid-Glukohydrolase 1	23 <sup>a</sup>	AT5G26000 <sup>c</sup>	61664 / 6,61	13	26	383	-1,10	-1,10	-1,30	-2,23	*	*	
Transketolase, putativ		AT3G60750 <sup>c</sup>	80374 / 5,94	15	24	200	-1,10	-1,10	-1,30	-2,23	*	*	
Thiamin-Pyrophosphokinase 1	24 <sup>a</sup>	AT1G02880 <sup>c</sup>	30145 / 5,31	6	43	67	-1,05	-1,20	-1,40	-2,24	*	*	*
Thioglukosid-Glukohydrolase 1	25 <sup>a</sup>	AT5G26000 <sup>c</sup>	61664 / 5,61	12	23	87	1,00	-1,06	-1,30	-2,23	*	*	
Dienelacton-Hydrolase		AT3G23570 <sup>c</sup>	26742 / 5,28	6	32	63	-1,05	-1,20	-1,40	-2,24	*	*	*
Xyloglukan-Endotransglykosylase, putativ	26 <sup>a</sup>	AT4G37800 <sup>c</sup>	34002 / 7,00	9	35	90	1,00	-1,27	-1,43	-2,65	*	*	*
Glutamin-Synthetase 2	27 <sup>a</sup>	AT5G35630 <sup>c</sup>	47780 / 6,43	17	57	507	1,05	-1,07	-1,45	-2,72	*	*	**
Glutamat-Ammonium-Ligase		AT1G66200 <sup>c</sup>	39297 / 5,14	3	8	107	1,05	-1,07	-1,45	-2,72	*	*	**
Aktin 7		AT5G09810 <sup>c</sup>	41937 / 5,31	12	46	90	1,05	-1,07	-1,45	-2,72	*	*	**
Eukaryotischer Initiationsfaktor 4A2	28 <sup>a</sup>	AT1G54270 <sup>c</sup>	47075 / 5,45	10	28	59	-1,14	1,02	-1,33	-2,76	*	*	**
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase 2	29 <sup>a</sup>	AT2G42600 <sup>c</sup>	110312 / 5,57	30	37	223	1,08	-1,22	-1,32	-2,89	*	*	**
Phosphoglycerat-Kinase 1	30 <sup>a</sup>	AT3G12780 <sup>c</sup>	50195 / 5,91	19	59	732	-1,03	-1,08	-1,20	-3,11	*	*	*
Phosphoglycerat-Kinase, putativ		AT1G56190 <sup>c</sup>	42703 / 5,39	13	48	541	-1,03	-1,08	-1,20	-3,11	*	*	*
ATP-Synthase, β-Untereinheit		ATCG00480 <sup>c</sup>	53957 / 5,38	15	46	139	-1,03	-1,08	-1,20	-3,11	*	*	*
Malat-Dehydrogenase	31 <sup>a</sup>	AT5G58330 <sup>c</sup>	48712 / 5,81	14	49	250	-1,10	1,00	-1,61	-3,92	*	*	*
Glutamin-Synthetase 2		AT5G35630 <sup>c</sup>	47780 / 6,43	9	36	79	-1,10	1,00	-1,61	-3,92	*	*	*
RuBisCO-Activase	32 <sup>a</sup>	AT2G39730 <sup>c</sup>	52347 / 5,87	22	59	614	1,01	-1,24	-1,64	-4,15	*	*	*



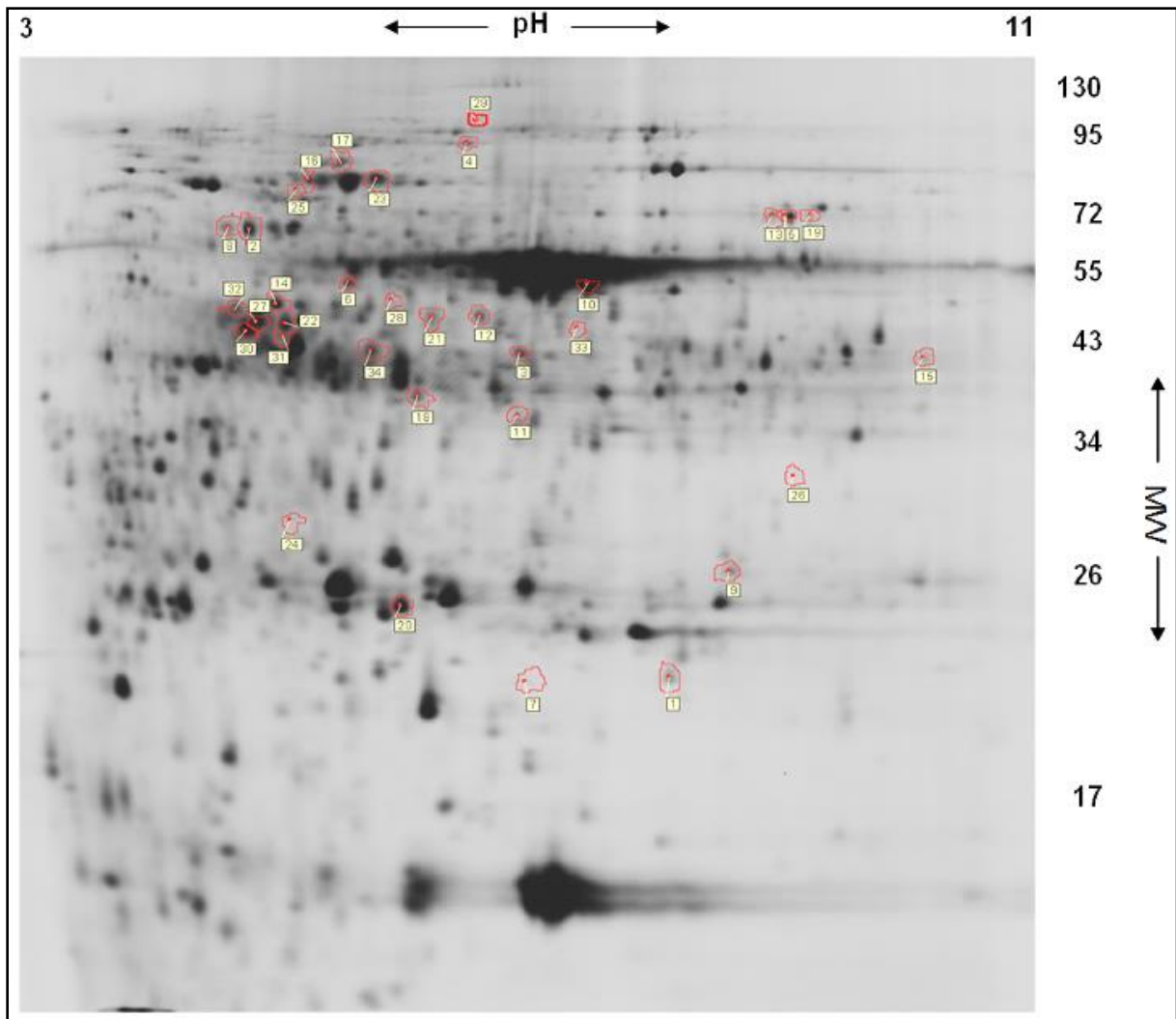
## Anhang

Proteinname <sup>(1)</sup>	Spot- Nummer <sup>(2)</sup>	Akzessions- Nummer <sup>(3)</sup>	Masse / pI <sup>(4)</sup>	Mascot Score <sup>(5)</sup>			Regulation <sup>(6)</sup>				ANOVA-Auswertung <sup>(7)</sup>		
				Peptid- anzahl	Seq.- überein.	Protein Score	3 h	6 h	24 h	48 h	Pst DC3000	Zeit	Interaktion
Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	33 <sup>a</sup>	AT5G17920 <sup>c</sup>	84646 / 6,09	11	24	133	1,41	-1,03	-1,19	-4,37	*	*	*
Methionin-Synthase 2 (ATMS2)		AT3G03780 <sup>c</sup>	84873 / 6,09	8	18	85	1,41	-1,03	-1,19	-4,37	*	*	*
RuBisCO-Activase	34 <sup>a</sup>	AT2G39730 <sup>c</sup>	52347 / 5,87	20	58	457	1,03	-1,19	-1,63	-4,62	*	*	*
<b>Proteine von Pst DC3000</b>													
Unbekanntes Protein	1 <sup>a</sup>	Q87V70 <sup>d</sup>	20621 / 6,59	7	56	562	-1,10	-1,06	1,22	9,38	*	*	*
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	4 <sup>b</sup>	Q886R9 <sup>d</sup>	97987 / 5,57	23	33	738	-1,04	1,14	2,16	5,32	*	*	*
60 kDa Chaperonin	8 <sup>a</sup>	Q87X14 <sup>d</sup>	57163 / 5,06	15	41	254	1,15	1,17	1,43	3,62	*	*	*
Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	16 <sup>a</sup>	Q87WQ8 <sup>d</sup>	75108 / 5,20	10	19	76	1,34	1,01	1,23	2,76	*	*	*
Elongationsfaktor G	17 <sup>a</sup>	Q889X4 <sup>d</sup>	77406 / 5,25	17	32	292	1,41	1,09	1,26	2,74	*	*	**
Katalase-Peroxidase		Q87WL6 <sup>d</sup>	82746 / 5,26	12	17	140	1,41	1,09	1,26	2,74	*	*	**
Ketolacid-Reduktoisomerase	18 <sup>a</sup>	Q888N4 <sup>d</sup>	36589 / 5,38	17	69	557	1,03	-1,02	1,17	2,69	*	*	*

- (1) Identifizierte Proteine von *Arabidopsis thaliana* oder *Pst* DC3000. Multiple Identifizierungen einzelner Proteinspots sind nach der Höhe des Score-Wertes angeordnet.
- (2) Spotnummer auf 2D-Gelbildaufnahme in Anhang Abb. 4. Proteinidentifizierungen erfolgten entweder durch MALDI TOF/TOF (a) oder LC-MS/MS (b).
- (3) Akzessionsnummer der TAIR-Datenbank (c) bzw. SwissProt-Datenbank (d).
- (4) Werte für Molekulargewichte in Da und isoelektrischen Punkt (pI).
- (5) Ergebnisse des Datenbankabgleichs mit Hilfe des Suchalgorithmus Mascot. Angegeben sind die Anzahl der Peptididentifizierungen, die prozentuale Sequenzübereinstimmung und der berechnete Score-Wert.
- (6) Veränderung der Proteinregulation zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit *Pst* DC3000 im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Proteine, bei denen mindestens eine um den Faktor 1,5 erhöhte Produktion nachgewiesen werden konnte, sind je nach Regulationsstärke in verschiedenen Rottönen wiedergegeben. Proteine, die mindestens eine um den Faktor 1,5 verminderte Produktion zeigten, sind in verschiedenen Grünschattierungen markiert.
- (7) Signifikanzwerte der zweifaktoriellen ANOVA-Auswertung für den Infektionsfaktor, den Zeitfaktor und den Interaktionsfaktor (\*: p ≤ 0,05; \*\*: p ≤ 0,01).

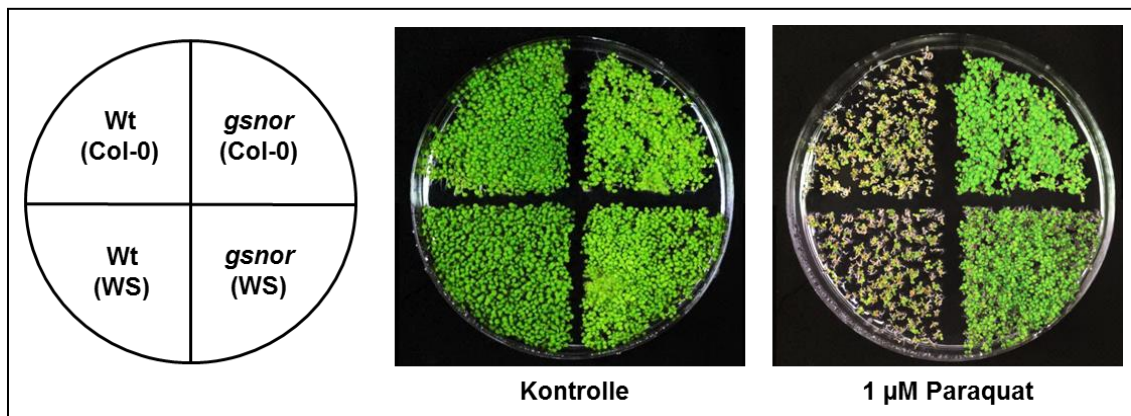
Legende zur farbigen Markierung:

**Regulationsfaktor:** 10,0 - 20,0 5,0 - 10,0 2,0 - 5,0 1,5 - 2,0 -1,5 - -2,0 -2,0 - -5,0 -5,0 - -10,0



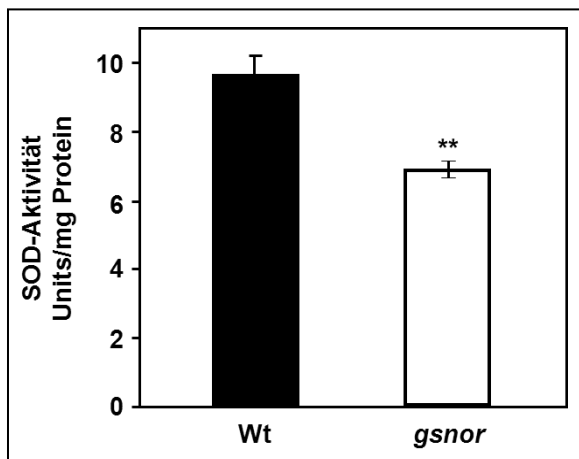
**Anhang Abb. 4: 2D-Gelbild mit Auftrennung der Gesamtproteinfraktion aus Blattmaterial von *gsnor* Insertionslinien nach Infektion mit *Pst* DC3000**

Einzelne Proteine, die 48 h nach der Infektion mindestens eine um den Faktor  $\pm 2$  differentielle Regulation im Vergleich zur Kontrollbehandlung zeigten, sind rot markiert und entsprechend der Auflistung in Anhang Tab. 7 mit Nummern versehen.



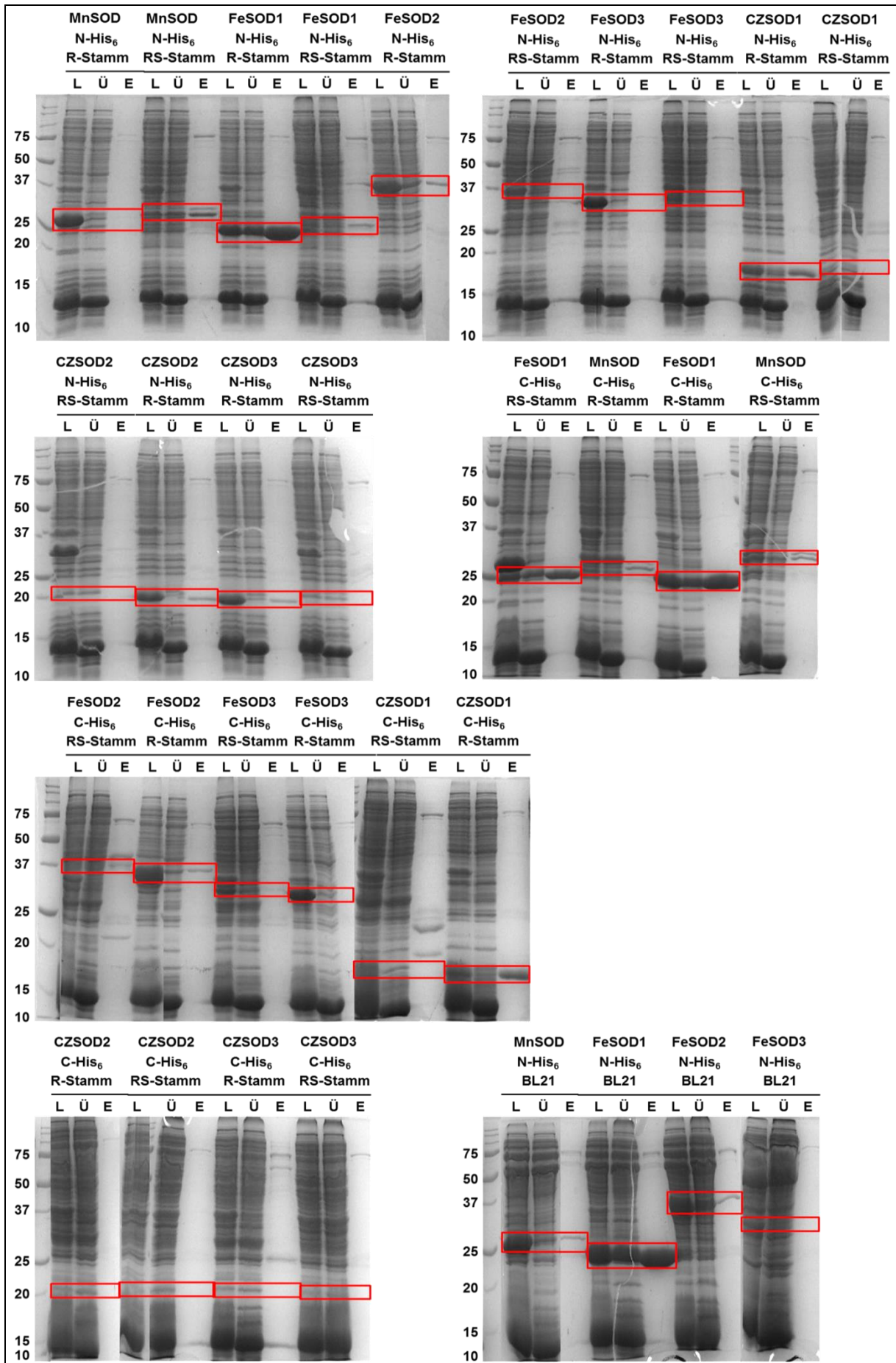
**Anhang Abb. 5: Paraquat-Toleranz von *gsnor* Knock-out Linien verschiedener Ökotypen**

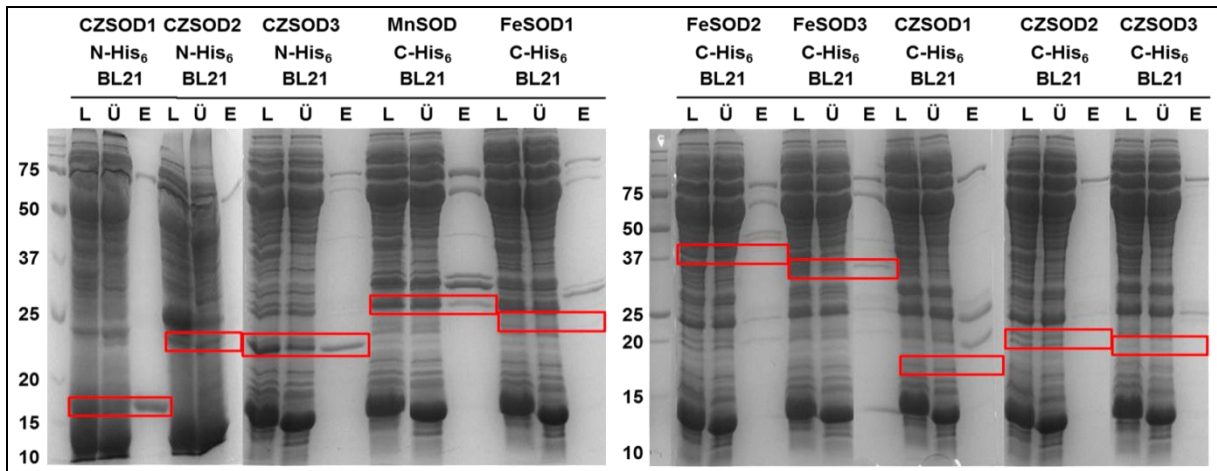
Samen von Wildtyp-Pflanzen und *gsnor* Knock-out Linien wurden unter sterilen Bedingungen in Gegenwart von 1  $\mu$ M Paraquat kultiviert und die Entwicklung beider Linien nach sechs Tagen dokumentiert. In der oberen Bildhälfte sind Pflanzen mit genetischem Hintergrund von Columbia-0 bzw. in der unteren Bildhälfte Pflanzen vom Ökotyp Wassilewskija ausgesät.



**Anhang Abb. 6: Gesamtaktivität von Superoxid-Dismutasen**

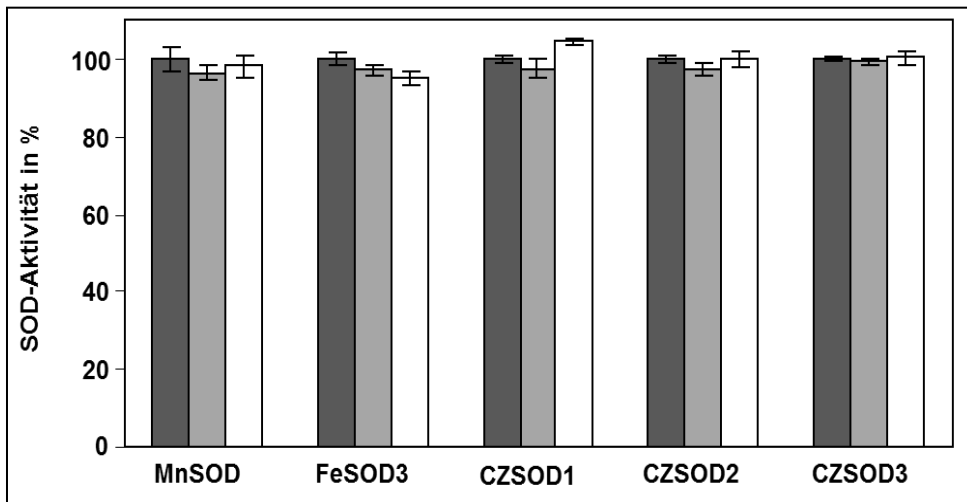
Pflanzen beider Linien wurden auf Erde angezogen, wobei schwarze Balken Wildtyp-Pflanzen und weiße Balken *gsnor* Knock-out Linien repräsentieren. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurden die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten verwendet, in Unit umgerechnet und auf den Proteingehalt der Proben bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Linien sind bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  mit \*\* gekennzeichnet.





**Anhang Abb. 7: Ergebnis des Testscreenings hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit rekombinant hergestellter Superoxid-Dismutasen**

Dargestellt ist ein Überblick der Expressionskulturen, die in Abhängigkeit der verwendeten Bakterienstämme (BL=BL21 DE3, R=Rosetta DE3, RS=Rosetta DE3 pLysS) und der Position der Histidin-Hexapeptide (N=N-terminaler Tag, C=C-terminaler Tag) mit den einzelnen SOD-Isoformen durchgeführt wurden. Probenaliquots der verschiedenen Reinigungsschritte (L=Lysat, Ü=Überstand, E=Eluat) wurden in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt, wobei der rote Bereich die Lokalisation der einzelnen rekombinant hergestellten Proteine im Gel markiert. Auf der linken Seite sind zur Größenabschätzung die relativen Molekülmassen in kDa angegeben.



**Anhang Abb. 8: Einfluss der *in-vitro* Behandlung mit GSNO auf die Aktivität von SOD-Isoformen**

Rekombinant produzierte Superoxid-Dismutasen wurden mit zwei verschiedenen GSNO-Konzentrationen behandelt und nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln die Aktivität der einzelnen Isoformen ermittelt (Dunkelgraue Balken: Kontrollbehandlung mit inaktiviertem GSNO, hellgraue Balken: Behandlung mit 200 µM GSNO, weiße Balken: Behandlung mit 500 µM GSNO). Veränderungen der enzymatischen Kapazität wurden dabei in Relation zur Negativkontrolle mit lichtinaktiviertem GSNO in Prozentangaben dargestellt. Werte für die Standardabweichungen basieren auf der Verwendung von drei unabhängigen technischen Messwiederholungen jeder Probe.

## Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Durner für die Möglichkeit am Institut für biochemische Pflanzenpathologie die Doktorarbeit anfertigen zu können sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen. Seine Bereitschaft, mir Freiraum für eigene Ideen einzuräumen und sein Entgegenkommen bei all den mit einer Doktorarbeit einhergehenden Problemen haben eine erfolgreiche Anfertigung dieser Dissertation sehr erleichtert.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Claus Schwechheimer und der Vorsitzenden der Prüfungskommission Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer für die Begutachtung meiner Arbeit und die Organisation des Disputationverfahrens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Lindermayr für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die fachliche Betreuung der Arbeit sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts. Seine Ratschläge und seine Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ferner möchte ich mich herzlichst bei allen Kooperationspartnern am Helmholtz Zentrum München für die produktive Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Erfahrungsaustausch bedanken - insbesondere bei Dr. Arie Geerlof vom Institut für Strukturbiologie für die Hilfe bei der rekombinanten Proteinproduktion sowie bei Dr. Hakan Sarioglu von der Core Facility Proteomics für alle durchgeführten massenspektrometrischen Analysen.

Darüber hinaus danke ich allen ehemaligen und aktuellen Kollegen bzw. Kolleginnen am Institut für eine harmonische Arbeitsatmosphäre, durch die die langen Tage im Labor immer wieder ein bisschen leichter und angenehmer wurden.

Dabei möchte ich zwei Menschen besonders hervorheben: Dr. Frank Gaupels war durch seine wertvollen fachlichen Anregungen und Anleitungen eine unerlässliche Stütze, ohne dessen Hilfe diese Dissertation in ihrer jetzigen Form nicht vorliegen würde.

Einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit verdanke ich auch Frau Birgit Geist, die mir bei allen molekularbiologischen Techniken mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

An dieser Stelle auch ein Dank an Elke Mattes für die Mitarbeit bei den Klonierungsarbeiten zur zielgerichteten Mutagenese und an Lucia Gößl für die Hilfe bei den histochemischen Färbemethoden.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich in diesem Zusammenhang auch meinen langjährigen Freunden und Bekannten aussprechen, die mir immer wieder klar gemacht haben, dass es eine Welt außerhalb des Labors gibt.

Mein größter Dank gilt jedoch dir, liebe Antonie, für deine endlose Geduld in Zeiten langer Arbeitstage und arbeitsamer Wochenenden. Deine unermüdliche Unterstützung und Motivation hat mir den nötigen Rückhalt und die Zuversicht gegeben, diese Arbeit zu vollenden.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Schwester und meinen Eltern für ihr vorbehaltloses Vertrauen und die wundervolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und der Dauer der Doktorarbeit bedanken.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## Curriculum vitae

Name Christian Holzmeister  
Anschrift Karl-Theodor-Straße 84,  
80803 München  
Geburtsdatum 22.07.1981  
Geburtsort Lohr am Main  
Familienstand ledig

### Promotion

seit 01/2009 Helmholtz Zentrum München (TU München)  
Institut für biochemische Pflanzenpathologie  
Dissertationstitel:  
„Charakterisierung des Redoxsystems in *Arabidopsis thaliana*-  
Pflanzen mit gestörter NO-Homöostase“

### Hochschulstudium

10/2003 – 09/2008 Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim  
Abschluss: Diplom-Agrarbiologe (Dipl.-Agr.-Biol.)  
10/2007 – 07/2008 Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum München,  
Institut für biochemische Pflanzenpathologie  
Titel: „Proteomanalyse von *Arabidopsis thaliana* Insertions-  
linien mit gestörter NO-Homöostase nach Pathogenbefall“  
10/2002 – 09/2003 Studium der Chemie an der Universität Stuttgart

### Zivildienst

09/2001 – 06/2002 Krankenhaus für Psychiatrie und Neurologie des Bezirks  
Unterfranken, Lohr am Main

### Schulbildung

09/1992 – 06/2001 Franz-Ludwig-von-Erthal Gymnasium, Lohr am Main  
Allgemeine Hochschulreife



## Konferenzteilnahmen

**Christian Holzmeister, Jörg Durner, Christian Lindermayr**

„Proteomics of defense response in *Arabidopsis* plants with impaired nitric oxide homeostasis”, 3th International Plant NO Club 2010, Olmütz, Tschechien, **Posterpreis**

**Christian Holzmeister, Hakan Sarioglu, Jörg Durner, Christian Lindermayr**

„Differential proteome analysis of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO-homeostasis”; 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants 2011, Budapest, Ungarn, **Poster**

## Veröffentlichungen

**Holzmeister C., Fröhlich A., Sarioglu H., Bauer N., Durner J., Lindermayr C.**

„Proteomic analysis of defense response of wildtype *Arabidopsis thaliana* and plants with impaired NO-homeostasis”, *Proteomics*, 11, S.: 1664-1683, 2011

**Fröhlich A., Gaupels F., Sarioglu H., Holzmeister C., Spannagl M., Durner J., Lindermayr C.**

„Looking deep inside: Detection of low-abundance proteins in leaf extracts of *Arabidopsis* and phloem exudates of pumpkin”, *Plant Physiology*, 159, S.: 902-914, 2012

**Holzmeister C., Wirtz M., Durner J., Lindermayr C. (2013)**

„Nitric oxide mediates paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana* via upregulation of glutathione pool and glutathione-associated enzymes”, **Publikation in Vorbereitung**

**Holzmeister C., Geerlof A., Sarioglu H., Durner J., Lindermayr C. (2013)**

„Inhibition of *Arabidopsis* manganese superoxide dismutase by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration”, **Publikation in Vorbereitung**