1 EINLEITUNG

1.1 Abwehrmechanismen der Pflanzen

Pflanzen sind ständig den unterschiedlichsten Einflüssen ausgesetzt und müssen in der Lage sein, rasch auf wechselnde Bedingungen zu reagieren. Biotischer Stress, den Herbivore und Pathogene herbeiführen, gehört zu den äußeren Faktoren, auf die Pflanzen sich einstellen müssen. Pflanzenschädlinge stellen für das Überleben der Pflanzen eine sehr ernste Bedrohung dar und sind die Ursache dafür, dass im Laufe der Evolution in Pflanzen effektive Abwehrmechanismen entstanden sind (Howe & Jander 2008).

Konstitutive Abwehrmechanismen zu denen physische Barrieren wie die Cuticula, Dornen und Trichome der Pflanzen sowie toxische Metabolite gehören (Howe & Schaller 2008, Böttcher & Pollmann 2009), besitzen den Nachteil, dass sie eine ständige Belastung im Sinne einer metabolischen Investition für die Pflanzen darstellen (Steppuhn & Baldwin 2008). Bei der induzierten Abwehr muss zwar eine Verzögerung in Kauf genommen werden, bis sich ein Schutz aufgebaut hat. Sie hat aber den Vorteil, dass sie nur Ressourcen beansprucht, wenn die Pflanze sich tatsächlich gegen Schädlinge zur Wehr setzen muss (Gatehouse 2002, Steppuhn & Baldwin 2008).

Als wichtige Signalmoleküle bei der induzierten Abwehrreaktion gegen herbivore Insekten und nekrothrophe Pathogene konnten Phytohormone aus der Klasse der Jasmonate identifiziert werden (Farmer et al. 1991, Farmer & Ryan 1992, Farmer et al. 2003).

1.2 Bedeutung und Wirkung der Jasmonate

Jasmonsäure (JA) und ihre Derivate werden unter dem Begriff Jasmonate zusammengefasst. Sie besitzen eine pentazyklische Ringstruktur und werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren synthetisiert (Schaller et al. 2005). Jasmonate sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet, sie treten in Algen, Moosen, Pilzen, Gymnospermen und Angiospermen auf (Wasternack 2007) und besitzen wie andere Phytohormone ein sehr weites Wirkungsspektrum.

Neben ihrer wichtigen Rolle in der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen sind Jasmonate an der Stressantwort auf abiotische Umwelteinflüsse wie UV-Licht (Conconi et al. 1996) oder osmotischen Stress (Kramell et al. 1995) beteiligt und zudem bei verschiedenen Entwicklungsprozessen der Pflanzen von entscheidender Bedeutung (Wasternack 2007, Browse 2009a, b, Avanci et al. 2010).

Indem Jasmonate drastische Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, nehmen sie Einfluss auf den Metabolismus der Pflanzen (De Geyter et al. 2012). Mittlerweile konnten

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

hunderte durch Jasmonat-regulierte und -koregulierte Gene identifiziert werden (Reymond et al. 2004, Mandaokar et al. 2006).

Verwundungsstress, welcher durch Herbivorie oder mechanische Verletzung verursacht wird, führt in Pflanzen innerhalb kürzester Zeit sowohl lokal als auch systemisch zu einem Anstieg der Jasmonat-Konzentration (Chung et al. 2008, Glauser et al. 2008, Suza & Staswick 2008, Koo et al. 2009). Dies löst direkte und indirekte Abwehrmechanismen aus (Kessler & Baldwin 2002) und bereitet die Pflanze vor auf zukünftigen Insektenfraß zu reagieren (Karban & Baldwin 1997). Beispielsweise werden toxisch wirkende Sekundärmetabolite wie Nikotin in Tabakpflanzen (Baldwin et al. 1994, Baldwin et al. 1997) oder Abwehrproteine wie Proteinase-Inhibitoren in Tomate gebildet (Farmer & Ryan 1990, Farmer & Ryan 1992). Proteinase-Inhibitoren hemmen im Verdauungstrakt der Insekten die Verdauungsenzyme, wodurch Wachstum und Entwicklung des Insektes beeinträchtigt werden (Fan & Wu 2005, Howe & Schaller 2008). Proteine, die ebenfalls als Reaktion auf Verwundung exprimiert werden, sind beispielsweise vegetative Speicherproteine (VSP), Thionine und Defensine (PDF) und Enzyme für die Jasmonat-Biosynthese (Devoto & Turner 2005).

In unverwundeten, gesunden Pflanzen sind Jasmonate an den unterschiedlichsten entwicklungsphysiologischen Prozessen beteiligt. Schon früh wurde die hemmende Wirkung der Jasmonsäure auf das Wurzelwachstum (Dathe et al. 1981, Staswick et al. 1992) und die Samenkeimung entdeckt (Corbineau et al. 1988) sowie die fördernde Eigenschaft der Jasmonate auf die Blattseneszenz festgestellt (Ueda & Kato 1980). Jasmonate beeinflussen weiterhin beispielsweise die Rankenkrümmung (Falkenstein et al. 1991) und Knollenbildung bei Kartoffel-Pflanzen (Yoshihara et al. 1989).
Eine äußerst wichtige Rolle spielen Jasmonate zudem bei der Fortpflanzung (Browse 2009a,b, Avanci et al. 2010). JA-Biosynthese- und JA-Signaltransduktions-Mutanten von *Arabidopsis* zeichnen sich durch männliche Sterilität der Blüte aus (Schaller & Stintzi 2008, Avanci et al. 2010). Auch für Tomate konnte die Bedeutung der Jasmonate bei der Fortpflanzung gezeigt werden. Die *jai1*-Mutante der Tomate ist wegen eines Defektes in der mütterlichen Kontrolle der Samenreifung steril (Li et al. 2004).
Jasmonat-Biosynthese-Mutanten und Jasmonat-Signaltransduktions-Mutanten zeigen nicht nur eine Beeinträchtigung in Wachstum und Entwicklung, sondern fallen auch durch eine stark beeinträchtigte Resistenz gegenüber herbivoren Insekten und Pathogenen auf (Browse & Howe 2008, Browse 2009a, b).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.3 Jasmonat-Biosynthese

Die Biosynthese der Jasmonate erfolgt durch den Oktadekanoidweg (Abb. 1.1) und wurde erstmals von Vick und Zimmerman beschrieben (Vick & Zimmerman 1984).

Als erste Substrate dienen α-Linolensäure (18:3) bzw. Hexadecatriensäure (16:3), mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche durch Lipasen aus der Chloroplastenmembran freigesetzt werden. Durch die Lipoxygenase (LOX) wird α-Linolensäure zu 13-Hydroperoxylinolensäure (13-HPOT) oxidiert. Der erste spezifische Schritt für die JA-Biosynthese wird durch die Allenoxidsynthase (AOS) katalysiert. Durch die AOS wird 13-HPOT dehydratisiert und ein instabiles Epoxid, die 12,13(*S*)-Epoxy-Octadecatriensäure (12,13-EOT), gebildet (Schaller et al. 2005, Schaller & Stintzi 2009, Wasternack & Kombrink 2010). *In vitro* kann dieses instabile Epoxid zu α- und γ-Ketolen zerfallen oder durch spontane Ringbildung ein Racemat der 12-Oxophytodiensäure (OPDA) entstehen (Brash et al. 1988). Das Enzym Allenoxidcyclase (AOC) sorgt für die Bildung eines Pentenonringes zwischen Position 9 und 13, so dass *in vivo* optisch reines cis-(+)-OPDA ((9*S*,13*S*)-OPDA) entsteht (Hamberg & Fahlstadius 1990, Schaller et al. 2005).

In einem parallelen Weg wird aus 16:3 Hexadecatriensäure mit den gleichen Enzymen dinor-OPDA (7*S*,11*S*)-dnOPDA) gebildet (Weber et al. 1997). Cis-(+)-OPDA und dnOPDA sind die Endprodukte des im Chloroplasten stattfindenden Teils der JA-Biosynthese. Die weiteren Schritte der Biosynthese finden in Peroxisomen statt. Unbekannt bleibt dabei, wie OPDA bzw. dnOPDA aus den Chloroplasten transportiert wird (Schaller & Stintzi 2009, Wasternack & Kombrink 2010). Für den Import von OPDA in Peroxisomen gibt es dagegen Belege. Dieser wird durch den peroxisomalen ABC-Transporter COMATOSE (CTS1) (Footitt et al. 2002) auch bekannt als PXA1 (Zolman et al. 2001) oder PED3 (Hayashi et al. 2002) bzw. im Falle von dnOPDA möglicherweise durch das Ionenfallenprinzip vermittelt (Theodoulou et al. 2005).

In den Peroxisomen werden cis-(+)-OPDA und dnOPDA zu 3-Oxo-2-(2‘-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Octansäure (OPC-8:0) bzw. 3-Oxo-2-(2‘-Pentenyl)-Cyclopentan-1-Hexansäure (OPC-6:0) reduziert (Schaller & Stintzi 2009). Für diese Reaktionen ist die 12-Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3) verantwortlich (Schaller et al. 2000, Stintzi & Browse 2000). OPR3 ist ein in Peroxisomen lokalisiertes Flavoprotein, welches NADPH-abhängig die Reduktion von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen katalysiert (Schaller et al. 2000, Strassner et al. 2002). Dabei wird zunächst der FMN Kofaktor von OPR3 durch NADPH reduziert, bevor das Substrat gebunden und die Übertragung eines Hydrids auf das Cβ des Substrates und die anschließende Protonierung des Cα erfolgen kann (Schaller et al. 2005, Schal-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

ler & Stintzi 2009). Schließlich werden für die Bildung der Jasmonsäure die Alkanoat-Seitenketten von OPC-6:0 und OPC-8:0 durch das Durchlaufen von zwei bzw. drei Zyklen der β-Oxidation in den Peroxisomen verkürzt. Vor der β-Oxidation erfolgt die Aktivierung der JA-Vorläufer zu den entsprechenden CoA Estern mittels Acyl-CoA Synthetasen (Schaller & Stintzi 2009). Für die Acyl-CoA Synthetase OPCL1 aus *Arabidopsis* konnte die physiologische Rolle in der JA-Biosynthese eindeutig bestätigt werden (Koo et al. 2006). Die OPCL1 „loss-of-function"-Mutante zeigt in Antwort auf Verwundung einen reduzierten JA-Gehalt (50 % des Wildtyps) und akkumuliert OPC-8:0 (Koo et al. 2006), OPC-6:0 und OPC-4:0 (Kienow et al. 2008).

Die Zyklen der β-Oxidation katalysieren die drei Core-Enzyme Acyl-CoA-Oxidase (ACX), „multifunctional protein" (MFP) und Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) (Schaller und Stintzi 2009). Es entsteht Jasmonoyl-CoA, welche in einem letzten Schritt durch eine noch unbekannte Thioesterase zu (+)-7-iso-JA ((3*R*,7*S*)-JA) umgesetzt wird, die wiederum zur thermodynamisch stabileren (-)-JA isomerisiert. Die gebildete Jasmonsäure wird auf noch unbekanntem Wege ins Cytosol transportiert (Wasternack & Kombrink 2010). In Abbildung 1.1 sind die Schritte der Jasmonat-Biosynthese schematisch zusammengefasst.

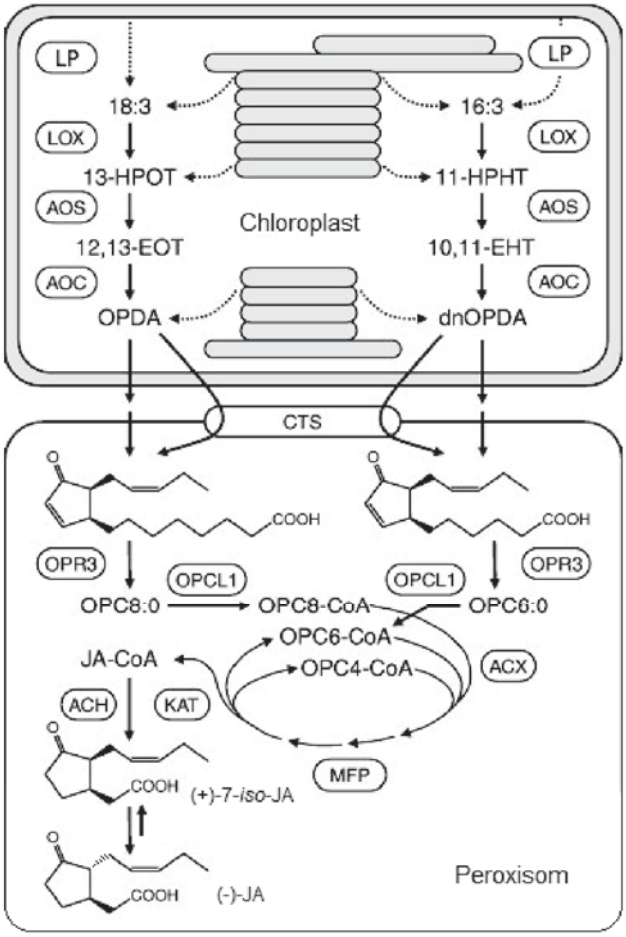

Abb. 1.1: Jasmonat-Biosynthese
Nach der Freisetzung der α-Linolensäure (18:3) durch Lipasen (LP) wird diese durch die Lipoxygenase (LOX) zu 13-HPOT oxidiert. 12,13-EOT wird durch die Allenoxidsynthase (AOS) gebildet und durch die Allenoxidcyclase (AOC) zu (9*S*,13*S*)-OPDA umgesetzt. Auf gleichem Wege kann aus Hexadecatriensäure (16:3) dinor-OPDA (dnOPDA) entstehen. Der Import in Peroxisomen erfolgt durch den ABC-Transporter COMATOSE (CTS). OPDA wird durch OPR3 zu OPC-8:0 reduziert. Nach der Aktivierung der Substrate zu den entsprechenden CoA Estern durch die OPC8:CoA Ligase 1 (OPCL1, At1g20510) erfolgen drei bzw. im Falle von dnOPDA zwei Zyklen der β-Oxidation durch die Enzyme ACX, MBF und KAT. Das Endprodukt Jasmonoyl-CoA (JA-CoA) wird durch eine noch unbekannte Acyl-Thioesterase (ACH) zu (+)-7-iso-JA umgesetzt, welche wiederum zur thermodynamisch stabileren (-)-JA isomerisiert (verändert nach Schaller & Stintzi 2009).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.4 JA-Metabolite und Signaltransduktion

JA ist nicht das Endprodukt des Biosyntheseweges. Derivate der JA entstehen durch: Methylierung (MeJA), Konjugation mit Aminosäuren (z. B. JA-Ile) oder ACC – der Vorstufe von Ethylen – (JA-ACC), Decarboxlierung (cis-Jasmon), Reduktion der Ketogruppe (Cucurbinsäure) und Glykosylierung (JA-Glycosyl-Ester) sowie durch Hydroxylierung an C-11 oder C-12 (11- bzw. 12-OH-JA) und anschließende Glukosylierung bzw. Sulfatierung (Wasternack & Kombrink 2010). Nicht nur den Metaboliten der JA werden biologische Aktivität und unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben (Wasternack 2007, Wasternack & Kombrink 2010), sondern auch ihren biosynthetischen Vorläufern. Die Behandlung von *opr3*-Pflanzen mit OPDA zeigt, dass OPDA in der Lage ist, Gene der Wundantwort zu induzieren (Stintzi et al. 2001) und weitere durch OPDA regulierte Gene wurden in Transkriptionsanalysen identifiziert (Taki et al. 2005).

Als bedeutendes biologisch aktives Hormon des JA-Signalwegs wird allgemein JA-Ile anerkannt. JA-Ile ist das einzige Jasmonat, für das eine Aktivität auf molekularer Ebene nachgewiesen wurde (Browse 2009a). Die Konjugation der Aminosäure erfolgt mit Hilfe der JA-Aminoacyl Synthetase JAR1 (Staswick & Tiryaki 2004). Für JA-Ile konnte gezeigt werden, dass es eine wesentliche Rolle in der JA-Signaltransduktion einnimmt, indem es den Abbau von JAZ-Proteinen, Repressoren des Jasmonat-Signalwegs, steuert (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Yan et al. 2009).

Die JAZ-Proteine (JAZ1-12) werden von zwölf unterschiedlichen Genen in *Arabidopsis* codiert und hemmen Transkriptionsfaktoren (z. B. MYC2), welche für die Aktivierung der JA-abhängigen Gene verantwortlich sind (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von JA-Ile an den Rezeptor COI1, der Abbau der JAZ-Proteine vermittelt wird (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Katsir et al. 2008, Yan et al. 2009, Sheard et al. 2010). COI1 ist ein F-Box Protein (Xie et al. 1998) und Teil des Skp/Cullin/Fbox $(SCF)^{COI1}$-Komplexes, welcher als E3 Ubiquitin Ligase agiert und Ubiquitin auf die JAZ-Proteine überträgt. Durch Ubiquitinierung werden die JAZ-Proteine durch das 26S Proteasom abgebaut (Chini et al. 2007). Kürzlich wurde ein Modell veröffentlicht, das zusätzlich negative Regulatoren des Jasmonat-Signalwegs einbezieht: das Adaptorprotein NINJA sowie die Korepressoren TOPLESS (TPL) und seine Homologe TPR2 und TPR3. Die Repression der JA-abhängigen Gene erfolgt dabei nur indirekt über die JAZ-Proteine. TPL Korepressoren, welche die Expression JA-abhängiger Gene hemmen, werden über das Adaptorprotein NINJA rekrutiert, welches nicht nur mit den Korepressoren, sondern auch mit den JAZ-Proteinen interagiert (Pauwels et al. 2010). Der Abbau der JAZ-Proteine führt zur Frei-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

setzung der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, woraufhin JA-abhängige Gene exprimiert werden (Wager & Browse 2012).

Der erste Transkriptionsfaktor, für den eine Interaktion mit der JAZ-Protein Familie nachgewiesen wurde, ist MYC2 (Thines et al. 2007). Mittlerweile sind weitere JAZ-regulierte Transkriptionsfaktoren bekannt: die MYC2 Homologe MYC3 und MYC4 (Cheng et al. 2011, Fernández-Calvo et al. 2011, Niu et al. 2011), Transkriptionsfaktoren der MYB-Familie MYB21, MYB24, MYB75 und GL1, der bHLH Familie GL3, EGL3 und TT8 (Song et al. 2011, Qi et al. 2011) sowie des Ethylen-Signalwegs EIN3 und EIL1 (Zhu et al. 2011). Den Transkriptionsfaktoren werden dabei unterschiedliche Rollen in der Jasmonat-vermittelten Signalantwort zugeschrieben (Wager & Browse 2012), wie beispielsweise die Regulation der Fertilität im Falle von MYB21 und MYB24 (Mandaokar et al. 2006, Mandaokar & Browse 2009).

1.5 Regulation der Blütenentwicklung *in A. thaliana* und Bedeutung der *opr3 (oxophytodiensäurereduktase 3)*-Mutante

Jasmonsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Fortpflanzung und der Staminaentwicklung (Schaller & Stintzi 2008, Avanci et al. 2010). Die Stamina werden wie die drei anderen Blütenorgane (Sepale, Petale, Carpel) durch ein Zusammenspiel regulatorischer Gene spezifiziert. Die Staminaentwicklung steht unter der Kontrolle der Gene *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA1-3* und *AGAMOUS* (AG) (Sablowski 2010). Dem homeotischen Protein AGAMOUS kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. In den Blütenständen *ag* mutanter Pflanzen werden über tausend Gene differentiell exprimiert (Wellmer et al. 2004). Dabei ist AG nicht nur für die Spezifizierung der Stamina wichtig, sondern steuert die weitere Entwicklung der Stamina durch die Aktivierung der JA-Biosynthese, indem es direkt die Expression des Gens *DAD1* (*Defective in Anther Dehiscence*) reguliert (Ito et al. 2007). Das Gen *DAD1* codiert für die in den Chloroplasten lokalisierte Lipase A1, welche den ersten Schritt der JA-Biosynthese katalysiert. Die *Arabidopsis* Mutante *dad1* ist männlich steril und zeigt Defekte in der Dehiszenz der Antheren, in der Pollenreifung und der Entwicklung der Blütenknospe (Ishiguro et al. 2001).

Die Bedeutung der Jasmonate für die Fertilität konnte auch anhand anderer Jasmonat-Mutanten gezeigt werden. In *Arabidopsis* sind Jasmonat-Biosynthese-Mutanten wie *fad3 fad7 fad8* (McConn & Browse 1996), *aos* (Park et al. 2002, von Malek et al. 2002) und *opr3* (Sanders et al. 2000, Stintzi & Browse 2000) und Jasmonat-Signaltransduktions-Mutanten wie *coi1* (Feys et al. 1994) gleichfalls männlich steril.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

In *Arabidopsis* ist Jasmonsäure für die Pollenentwicklung, die Elongation der Antherenfilamente und das Öffnen des Stomiums für die Freisetzung der Pollen erforderlich (Abb. 1.2). Die Blütenorgane entwickeln sich zwar in der geschlossenen Blüte normal, aber die Längenzunahme der Antherenfilamente läuft nicht erfolgreich ab. Dies hat zur Folge, dass die Pollensäcke sich nicht zum richtigen Zeitpunkt – wenn die Blüte sich geöffnet hat – über der Narbe befinden. Die Antheren brechen entlang des Stomiums nicht rechtzeitig auf (teilweise tritt eine verspätete Dehiszenz ein), wodurch der Pollen nicht freigesetzt wird (McConn & Browse 1996, Stintzi & Browse 2000). Zudem sind die Pollen der *opr3*-Mutante überwiegend nicht keimungs- und lebensfähig (Abb. 1.2). Es keimen weniger als 4 % (Stintzi & Browse 2000).

Die Applikation von Jasmonsäure führt bei Jasmonsäure-Synthese-Mutanten wie *fad3 fad7 fad8*, *aos* und *opr3* zur Aufhebung der Defekte und zur Fertilität (McConn & Browse 1996, Stintzi & Browse 2000, Park et al. 2002). Die Fähigkeit der Jasmonsäure die Fertilität widerherzustellen, ist jedoch vom Stadium der Blütenentwicklung abhängig. Nur Blütenknospen im Stadium 12 reagieren auf die Jasmonsäure-Behandlung (Stintzi & Browse 2000).

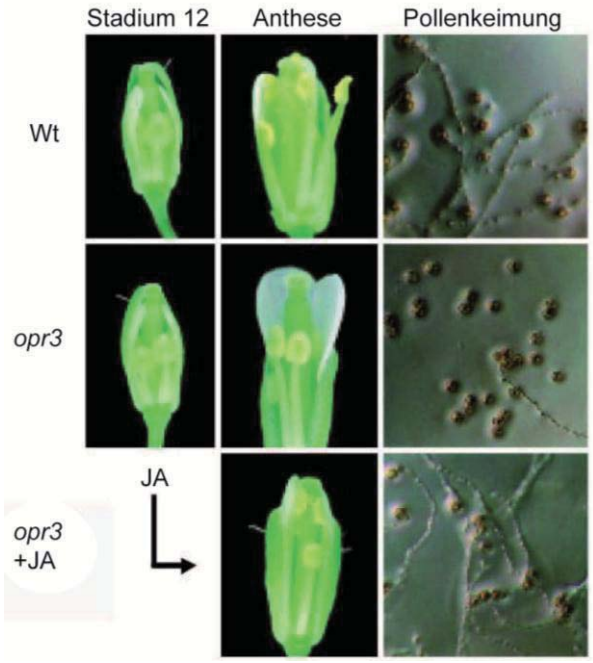

Abb. 1.2: Phänotyp wildtypischer und OPR3 mutanter Pflanzen bei der Blüten- und Pollenentwicklung von *A. thaliana*
Die *opr3*-Mutante ist aufgrund pleiotroper Effekte männlich steril: Die Antherfilamente sind verkürzt, der Pollen wird nicht freigesetzt und zeigt verminderte Keim- bzw. Lebensfähigkeit. Durch die Applikation von MeJA im Stadium 12 der Blütenentwicklung - vor dem Öffnen der Blüte - kann die Fertilität widerhergestellt werden (verändert nach Stintzi & Browse 2000).

Mikroarray-Analysen, in welchen Jasmonsäure-behandelte Stamina von *opr3*-Pflanzen (Stadium 12) untersucht wurden, führten zu der Identifizierung von 13 Transkriptionsfaktoren, denen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Jasmonsäure gesteuerten Blütenentwicklung zugeschrieben wird. Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren wird nach Jasmonsäure-Behandlung in den Stamina der *opr3*-Pflanzen stark induziert. Unter den Jasmonsäure indu-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

zierten Transkriptionsfaktoren befinden sich Mitglieder der MYB-Familie. MYB21 und MYB24 zeigen eine überlappende Funktion bei der Regulation der Staminaentwicklung. Die Doppelmutante *myb21-1 myb24-1* ist männlich steril (Mandaokar et al. 2006). Die Fertilität kann in diesem Fall durch JA-Applikation nicht wiederhergestellt werden. Dies beweist, dass die regulatorische Rolle der MYB-Proteine bei der Staminaentwicklung erst nach der JA-Biosynthese stattfindet (Mandaokar et al. 2006). Auch für ein weiteres Mitglied der MYB-Familie konnte gezeigt werden, dass es bei der Staminaentwicklung von Bedeutung ist. MYB108, dessen Expression möglicherweise durch MYB21 reguliert wird, ist für den richtigen Zeitpunkt der Antherendehiszenz verantwortlich und steuert zusammen mit MYB24 die männliche Fertilität (Mandaokar & Browse 2009).

1.6 Wie erfolgt die Regulation der Jasmonat-Biosynthese?

Die Jasmonsäure-Synthese wird sowohl durch positive, als auch negative Rückkopplung reguliert (Farmer 2007). Eine positive Rückkopplung erfährt der Syntheseweg nach Verwundung oder JA-Behandlung durch die JA-abhängige Induktion der Biosyntheseenzyme (Wasternack 2007, Browse 2009a). Jasmonsäure aktiviert dadurch seine eigene Synthese (Farmer 2007).

Chini und Mitarbeiter (2007) postulieren, dass die Jasmonsäure-Antwort durch eine negative Rückkopplung beendet wird. Durch JA-Behandlung wird die Transkription der *JAZ*-Gene eingeleitet, wodurch es zu einer schnellen Repression der JA-Genexpression kommt. Die Synthese neuer JAZ-Proteine führt zu einer erneuten Inhibierung des Transkriptionsfaktors MYC2 (Chini et al. 2007).

Positive und negative Rückkopplung können erst stattfinden, wenn Jasmonsäure vorhanden ist. Doch wie ist es möglich, dass Pflanzen in Folge auf Verwundung oder Herbivorie so rasch mit der Akkumulation der Jasmonsäure reagieren können? In kürzester Zeit kommt es in den betroffenen wie auch in systemisch unverwundeten Blättern zu einem schnellen und transienten Anstieg der Jasmonsäure-Konzentration. Innerhalb von fünf Minuten steigt in Blättern die JA-Konzentration von 30-130 pmol/g auf etwa 800 pmol/g bzw. die JA-Ile Konzentration von 5-30 pmol/g auf 50-110 pmol/g. Nach etwa einer Stunde ist das Maximum der JA und JA-Ile Konzentration erreicht. In mechanisch verwundeten Blättern werden Werte von 4000-6000 pmol/g bzw. 300-1000 pmol/g gemessen (Chung et al. 2008, Suza & Staswick 2008, Koo et al. 2009).

Nach Verwundung werden die Gene für die Enzyme der Jasmonat-Biosynthese induziert und entsprechende Transkripte akkumulieren (Reymond et al. 2000, Howe et al. 2000, Strassner et

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

al. 2002, Ralph et al. 2006). Die *de novo* Synthese der Enzyme kann den raschen Anstieg der JA-Konzentration aber nicht erklären, da die Zunahme der JA vor der Expression der Biosynthesegene erfolgt (Howe et al. 2000, Ziegler et al. 2001, Strassner et al. 2002, Stenzel et al. 2003a, b).

Dass es eine andere Erklärung für den sprunghaften Anstieg der Jasmonsäure geben muss und diese nicht durch Menge und Verfügbarkeit der JA-Biosyntheseenzyme erklärt werden kann, wird durch zwei weitere Beobachtungen unterstützt. Zum einen ist in unverwundeten Pflanzen, der Gehalt an JA nur gering – trotz konstitutiver Expression der JA-Biosynthesegene (Schaller & Stintzi 2009). Zum anderen weisen Pflanzen, welche JA-Biosynthesegene konstitutiv überexprimieren ohne Verwundung oder einen anderen Stimulus keine erhöhte JA-Konzentration auf (Wasternack 2007).

Es müssen also zusätzliche Regulationsmechanismen existieren, die den sprunghaften Anstieg der Jasmonate nach Verwundung erklären.

Nach einer Hypothese von Wasternack (2007) ist die JA-Synthese von der Verfügbarkeit ihrer Substrate abhängig (Wasternack 2007). Danach werden die Substrate des Oktadekanoidweges, sobald sie verfügbar sind, von konstitutiv vorliegenden Enzymen des Oktadekanoidweges zu JA umgesetzt. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Freisetzung von JA-Vorläufern aus den Membranlipiden der limitierende Schritt der Jasmonat-Biosynthese sein könnte (Stenzel 2003a, b). Gegen diese Hypothese steht jedoch, dass in unverwundeten Blättern der Vorläufer OPDA bereits in hoher Konzentration vorliegt. Im Vergleich zu der relativ geringen Konzentration der JA (30-100 pmol/g FW) sind hohe Mengen an OPDA (300-1000 pmol/g FW) im unverwundeten Pflanzengewebe vorhanden (Stintzi et al. 2001, Stenzel et al. 2003a, Delker et al. 2007).

Diese konstitutiv hohe Konzentration an OPDA in unverwundeten Blättern spricht dafür Regulationsmechanismen an diesem Punkt der Synthese anzunehmen und OPDA als direkte Quelle für die schnelle Bildung des bioaktiven Hormons JA-Ile in Betracht zu ziehen (Schaller et al. 2005, Browse 2009a). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Verwundung in *Arabidopsis* eine rasche Abnahme der OPDA-Konzentration mit der raschen Akkumulation von JA und JA-Ile in den systemischen Blättern der Pflanzen einhergeht (Koo et al. 2009). Demzufolge könnte der sprunghafte Anstieg der JA-Konzentration nach Verwundung durch die Aktivierung der konstitutiv exprimierten Biosyntheseenzyme im Anschluss an OPDA erklärt werden, die in unverwundeten gesunden Pflanzen in einem inaktiven Zustand vorliegen. Durch posttranslationale Modifizierung könnten

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

die Enzyme rasch aktiviert werden und damit die Jasmonat-Synthese anstoßen (Schaller & Stintzi 2009, Bonaventure & Baldwin 2010).

1.7 OPR3 als Kontrollpunkt der Jasmonat-Synthese in der Wundantwort

Die Kontrolle der Jasmonat-Biosynthese und der sprunghafte Anstieg der Jasmonate lassen sich möglicherweise durch die Regulation des Enzyms OPR3 erklären. Wie oben bereits erwähnt, katalysiert OPR3 die Umsetzung von (9*S*,13*S*)-OPDA und dnOPDA zu OPC-8:0 bzw. OPC-6:0 (Schaller et al. 2000, Stintzi & Browse 2000) und stellt damit einen wichtigen Kontrollpunkt in der JA-Biosynthese dar (Stintzi et al. 2001). Da OPDA bereits in hoher Konzentration in unverwundeten Blättern vorliegt, erscheint die Hypothese, dass eine Regulation der Jasmonat-Biosynthese durch das Enzym OPR3 erfolgen könnte, folgerichtig.

OPR3 gehört zu einer kleinen Familie von Flavin-enthaltenden Oxidoreduktasen. In *Arabidopsis* wurden sechs *OPR* Gene identifiziert. OPR3 ist jedoch das einzige Mitglied dieser Familie, welches das (9*S*,13*S*)-Enantiomer der OPDA (eines von vier möglichen Stereoisomeren), die Vorläuferform der JA als Substrat akzeptiert (Schaller & Stintzi 2009). OPR3 weist eine hohe Ähnlichkeit in der Struktur zu der Familie der OYE (Old Yellow Enzyme) auf, was durch Aufklärung der Kristallstruktur der OPR3 aus Tomate mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte (Breithaupt et al. 2006). OYE gilt als das erste identifizierte Flavoprotein und wurde aus *S. cerevisiae* isoliert (Warburg & Christian 1932).

OYE und seine Homologe besitzen eine $(\beta/\alpha)_8$-Fass-Struktur, in welcher acht parallele β-Stränge in zylindrischer Anordnung von acht α-Helices umgeben sind. Der FMN Kofakor wird nicht-kovalent gebunden. Die charakteristische, enzymatische Eigenschaft des OYE und seiner Homologen besteht darin die C=C Doppelbindung von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen zu reduzieren (Oberdorfer et al. 2011).

Eine Besonderheit der OPR3 ist der „Loop“ L6 des Enzyms. Im Gegensatz zu OYE und OPR1 (Breithaupt et al. 2001), in welchen der Loop L6 das aktive Zentrum begrenzt, ragt dieser bei OPR3 wie ein Finger aus der Struktur heraus (Abb. 1.3 und 1.4, A). Ansonsten zeigen OPR1 und OYE weitgehende Überstimmung zu OPR3. Der L6-Loop der OPR3 Unterfamilie enthält im Vergleich zu der OPR1 Unterfamilie sieben zusätzliche Aminosäuren. Ein weiterer Unterschied zwischen OPR1 und OPR3 besteht in dem Loop L3 (Abb. 1.3). Dieser ragt bei OPR1 weit in die Substrat-Bindetasche des Enzyms und ist mit dafür verantwortlich, dass diese im Vergleich zur Substrat-Bindetasche der OPR3 verengt wird (Breithaupt et al. 2006). Die strukturellen Unterschiede sind für die Substratselektivität der beiden Enzyme verantwortlich. OPR1 akzeptiert nur (9*R*,13*R*)-OPDA als Substrat (Schaller et al. 1998,

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Breithaupt et al. 2009). Dagegen reduziert OPR3 *in vitro* alle vier OPDA Enantiomere (Schaller et al. 1998).

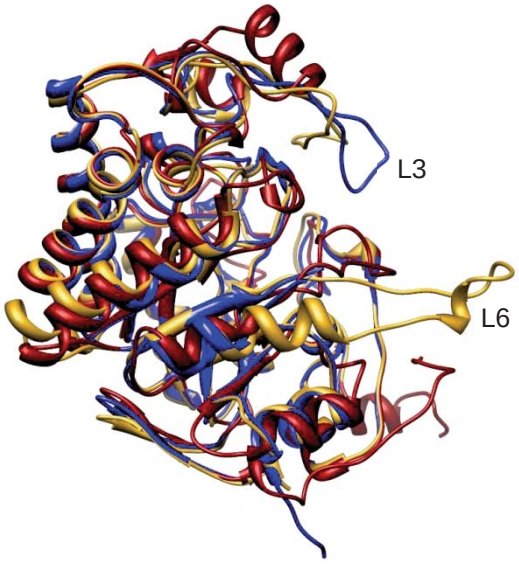

Abb. 1.3: Darstellung der überlagerten Strukturen von OPR3 (gelb), OPR1 (blau) und OYE (rot)
OPR3, OPR1 und OYE bilden eine $(\beta/\alpha)_8$-Fass-Struktur, in welcher acht parallele β-Stränge in zylindrischer Anordnung von acht α-Helices umgeben sind. Der L6-Loop der OPR3 ragt wie ein Finger aus der Struktur heraus, wodurch sich OPR3 von OPR1 und OYE unterscheidet. OPR1 besitzt dagegen eine erweiterten L3-Loop, was zu einer Verengung der Substrat-Bindetasche führt (Breithaupt et al. 2006).
(OPR3: 2HSA.pdb (Breithaupt et al. 2006); OPR1: 1ICS.pdb (Breithaupt et al. 2001); OYE: 1OYC.pdb (Fox & Karplus 1994); Darstellung mittels Chimera (Petterson et al. 2004))

Im Gegensatz zu OPR1 kristallisiert OPR3 als Dimer, wobei die fingerähnliche Struktur des L6-Loops eine wichtige Rolle spielt. Der Finger der einen Untereinheit ragt jeweils in das aktive Zentrum der anderen Untereinheit und blockiert es dadurch (Abb. 1.4). Auf diese Weise entsteht ein sich selbst-inhibierendes Dimer. Zwischen dem Finger des einen Protomers und dem aktiven Zentrums des anderen Protomers entstehen zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen, welche das Dimer stabilisieren (Breithaupt et al. 2006) (Abb. 1.4).
Die Aminosäuren an der Spitze des L6-Loops sind in der Unterfamilie der OPR3-Proteine hochkonserviert, was darauf hinweist, dass hier ein allgemeiner Mechanismus zur Inhibierung des Enzyms vorliegt (Breithaupt et al. 2006).
Bei der Analyse der OPR3 aus *Solanum lycopersicum* hat sich gezeigt, dass das Glutamat an Position 291 (E291), welches sich an der Spitze des L6-Loops befindet, eine für die Dimerisierung wichtige Aminosäure darstellt. Dieses Glutamat bildet H-Brücken mit His185 und His188, welche sich direkt oberhalb des FMN Kofaktors in der Substrat-Bindetasche der anderen OPR3-Untereinheit befinden und blockiert so das aktive Zentrum (Abb. 1.4, B). Durch zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass bei Austausch von E291 durch Lysin, die Bildung des OPR3-Dimers gestört wird. Keine der Bindungen, die beim wildtypischen OPR3 zwischen den Dimeren bestehen, bleibt in der Mutante erhalten. Die Mutante E291K kristallisiert ausschließlich als Monomer. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Dimerisierung der

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

OPR3 mit einem Verlust der Aktivität einhergeht. Die Mutante E291K weist einen sechsmal schnelleren Substratumsatz als wildtypisches OPR3 auf (Breithaupt et al. 2006).
Folglich könnte das Dimer die *in vivo* inaktive Form der OPR3 darstellen und die Aktivität der OPR3 und damit die JA-Biosynthese durch das Monomer/Dimer Gleichgewicht der OPR3 reguliert werden (Schaller & Stintzi 2009).

Basierend auf der Anwesenheit eines Sulfat-Ionen in der Kristallstruktur des OPR3-Dimers, welches sich in unmittelbarer Nähe der Hydroxylgruppe des Tyrosins an Position 364 (Y364) befindet, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der OPR3-Aktivität durch reversible Phosphorylierung stattfinden könnte. Das Sulfat-Ion bildet im Kristall zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Untereinheiten aus und stabilisiert auf diese Weise die Interaktion (Abb. 1.4, B). Es ist so positioniert, dass es perfekt die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Tyrosins (Y364) imitiert.

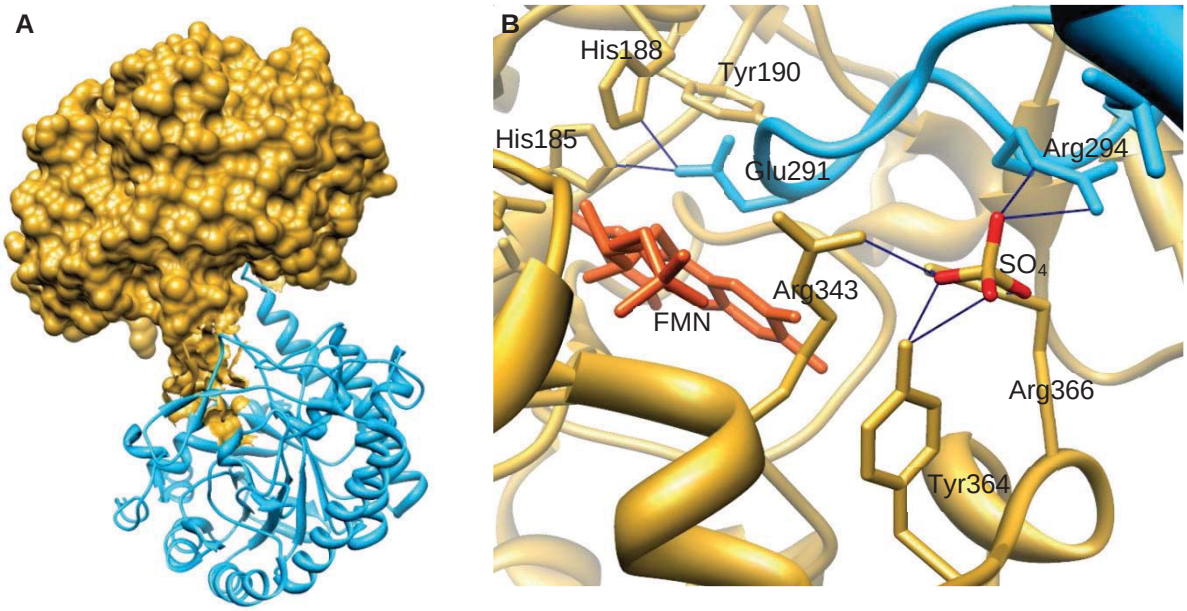

Abb. 1.4: Strukturmodell der OPR3 aus *S. lycopersicum*
A OPR3 kristallisiert als Homodimer. Dabei blockiert die fingerartige Struktur des einen Protomers das aktive Zentrum des anderen. **B** Wichtige Aminosäuren bei der Stabilisierung des Dimers sind das Glutamat in Position 291 und das Tyrosin in Position 364. Das E291 der einen Untereinheit (blau) interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen (blaue Linien) mit den Histidinen 185 und 188 der anderen Untereinheit (gelb). In der Nähe des Y364 befindet sich ein Sulfat-Ion (SO_4), welches die Phosphatgruppe eines Phosphotyrosins imitieren könnte und welches zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Untereinheiten ausbildet (Breithaupt et al. 2006, 2HSA.pdb; Darstellung mittels Chimera (Petterson et al. 2004)).

Durch zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass eine OPR3-Mutante, in welcher das Tyrosin an Position 364 gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde (Y364F), als Monomer

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

kristallisiert (Breithaupt et al. 2006). Dies unterstützt die Bedeutung des Sulfat-Ions und die These einer möglichen Phosphorylierung für die Dimerisierung.

Eine Regulation der OPR3-Aktivität durch reversible Phosphorylierung könnte die rasche und transiente Akkumulation von JA nach Verwundung erklären. In unverwundeten Pflanzen könnte OPR3 durch die Aktivität einer Proteinkinase phosphoryliert und damit als inaktives Dimer vorliegen. Nach Verwundung wird die Phosphorylierung durch eine Phosphatase entfernt, wodurch die Dimerisierung der OPR3 aufgehoben wird und das aktive Monomer entsteht, welches bereits vorhandenes OPDA reduziert (Schaller & Stintzi 2009). Auf diese Weise könnte der sprunghafte Anstieg der Jasmonate – nur wenige Minuten nach Verwundung – ermöglicht werden. Eine erneute Phosphorylierung, welche die Inaktivierung der OPR3 zur Folge hätte, könnte zu der beobachteten Abnahme der Jasmonat-Konzentration nach etwa einer Stunde führen, obwohl das OPR3 Enzym noch gegenwärtig ist.

1.8 Proteinkinasen und deren Rolle bei der Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen

Falls die Dimerisierung und damit die Regulation der OPR3 über reversible Phosphorylierung erfolgt, müssten eine Proteinkinase und eine Phosphatase existieren, welche in der Lage sind, OPR3 zu phosphorylieren bzw. zu dephosphorylieren. Proteinkinasen katalysieren den Transfer einer Phosphatgruppe auf die Hydroxyl-(OH)-Gruppe einer Aminosäure, dagegen kehren Phosphatasen diesen Prozess um. Für *A. thaliana* wurden mehr als 800 Proteinkinasen und 150 Proteinphosphatasen identifiziert (Ghelis 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Identifizierung einer OPR3-phosphorylierenden Kinase gelegt.

Am häufigsten werden die Aminosäuren Serin und Threonin und in einem geringeren Ausmaß Tyrosin phosphoryliert (Ghelis 2011). Es konnten jedoch auch Phosphorylierungen an den Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin, Cystein, Glutamat und Aspartat nachgewiesen werden (Cieśla et al. 2011).

Traditionell wurden Proteinkinasen in zwei getrennte Familien eingeteilt, in Tyrosin-spezifische und in Serin/Threonin-spezifische Kinasen (Hanks et al. 1988, Hanks & Quinn 1991). Später wurden jedoch Proteinkinasen identifiziert, die alle drei Aminosäuren phosphorylieren können, die sogenannten dualspezifischen STY (Serin/Threonin/Tyrosin) Kinasen (Lindberg et al. 1992, Rudrabhatla et al. 2006). Heute erfolgt die Einteilung daher in ausnahmslos Ser/Thr bzw. Tyr-phosphorylierende Kinasen (PTKs) und in dualspezifische PTKs (dsPTKs) (Ghelis 2011). Beide Proteinkinase-Klassen besitzen eine katalytische Domäne aus

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

etwa 250-300 AS, innerhalb derer sich elf konservierte Subdomänen befinden. Consensussequenzen in den Subdomänen VI, VIII und XI sind Indikatoren für die Spezifität der Kinasen. 2006 wurden in einer genomischen Studie 57 potentielle Tyr-Kinasen für *Arabidopsis* identifiziert, die alle sowohl Motive für eine Ser/Thr-Spezifität (Subdomäne VI) als auch eine Tyr-Spezifität (Subdomäne XI) aufweisen. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass Pflanzen keine klassischen Tyrosin-Kinasen besitzen und dualspezifische Kinasen die Tyrosin-Phosphorylierung vollständig übernehmen könnten (Rudrabhatla et al. 2006). Zwischenzeitlich wurde für verschiedenen Pflanzenspezies PTKs mit einer Tyr-Spezifität vorhergesagt. Der Nachweis ihrer katalytischen Aktivität wurde jedoch noch nicht erbracht (Ghelis 2011).

Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger posttranslationaler Mechanismus für die Regulation zellulärer Prozesse. Durch Phosphorylierung können Zielproteine, wie Enzyme, Rezeptoren und Regulatoren aktiviert oder inhibiert, die subzelluläre Lokalisation bestimmt oder Proteininteraktionen reguliert werden (Manning 2005). Tyr-Phosphorylierungen nehmen in Pflanzen nur einen geringen prozentualen Anteil ein. Bei einer Phosphoproteomanalyse in *A. thaliana* wurde für Phosphoserine, Phosphothreonine bzw. Phosphotyrosine eine Verteilung von 82,7 %, 13,1 % bzw. 4,2 % angegeben (Nakagami et al. 2010). Über die Rolle der Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Hauptsächlich anhand von Genexpressionsanalysen, pharmakologischen Studien und Analysen mit „loss-of-function"-Mutanten wurde gezeigt, dass Tyr-Phosphorylierungen von entscheidender Bedeutung bei Entwicklungsprozessen (Gametophytentwicklung, Samenkeimung, Embryoentwicklung), abiotischen Stressantworten (Trockenheit, Kälte, Hitze, Salz), der Abwehr von Pathogenen sowie Hormonantworten sind. Die genaue Funktion der Tyr-Phosphorylierung in diesen Prozessen ist jedoch noch ungeklärt (Ghelis 2011). Bekannt ist bisher, dass verschiedene dsPTKs spezifisch während früher und später Stadien der Blütenentwicklung sowie während der Keim- und frühen Wachstumsphase exprimiert werden. Neun der 57 von Rudrabhatla und Mitarbeitern (2006) identifizierten dsPTKs werden ausschließlich in den Stamina exprimiert. Spezifische Stressoren wie Kälte, Hitze, Salze oder Hormonbehandlung führen ebenfalls zur Hochregulation verschiedener dsPTKs. Ethylen und MeJA induzieren die Hochregulation von bis zu sieben STY Kinase Genen (Rudrabhatla et al. 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Phosphoproteom-Studie konnten 152 Phosphopeptide identifiziert werden, die nach einer Phytohormonbehandlung mit Abscisinsäure, Indol-3-essigsäure, Gibberellinsäure, Kinetin oder JA differentiell phosphoryliert waren. JA-Behandlung führte zu der Identifizierung von

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

67 differentiell phosphorylierten Peptiden, darunter auch das Peptid einer Kinase (BSK2) (Chen et al. 2010).

Aufgrund des rudimentären Wissens über die Tyr-Phosphorylierung in Pflanzen wurde bisher noch keine Studie veröffentlicht, in welcher die Tyr-Phosphorylierung eines Proteins zu dessen Homodimerisierung führt und eine Selbstinhibierung des Proteins zur Folge hat. Dass Homodimerisierung mit der Selbstinhibierung eines Proteins einhergehen kann, belegen zahlreiche Studien (Wickner et al. 1991, Bilwes et al. 1996, Merz et al. 1997, Takeda et al. 2004). Beispielsweise konnte für das Protein CD45 – ein membranständiger Rezeptor von Leukozyten mit Tyrosin Phosphatase Aktivität – gezeigt werden, dass die Aktivität im dimeren Zustand herabgesetzt ist (Takeda et al. 2004).

1.9 Proteinimport peroxisomaler Matrixproteine

OPR3 ist im Peroxisom lokalisiert und enthält C-terminal eine Signalsequenz (SRL) (Stintzi & Browse 2000), welche dafür sorgt, dass OPR3 ins Peroxisom importiert wird (Strassner et al. 2002).

Peroxisomen besitzen weder eigene DNA noch eine Translationsmaschinerie. Daher müssen alle peroxisomalen Matrixproteine zunächst an freien Polyribosomen synthetisiert und posttranslationell in die Peroxisomen importiert werden (Lazarow & Fujiki 1985). Für den Transport in Peroxisomen benötigen Proteine ein peroxisomales „targeting“-Signal (PTS).

Es gibt zwei verschiedene PTS-Sequenzen, PTS1 und PTS2. Das PTS1-Motiv, welches auch OPR3 besitzt, findet sich in der Mehrheit der peroxisomalen Matrixproteine (Rucktäschel et al. 2011). Es besteht aus einem Tripeptid, für das die Consensussequenz (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) ermittelt wurde (Lametschwandtner et al. 1998) und befindet sich am C-Terminus (Gould et al. 1987). Die Sequenz wird von dem peroxisomalen Rezeptor-Peroxin Pex5p erkannt und gebunden (Brocard et al. 1994, Terlecky et al. 1995).

Ein Drittel der peroxisomalen Proteine in Pflanzen besitzen eine PTS2-Sequenz (Reumann et al. 2009), die aus einem konservierten Nonapeptid besteht und sich im N-Terminus der Proteine befindet (Osumi et al. 1991, Swinkels et al. 1991, Rehling et al. 1996). Für die Erkennung der PTS2-Sequenz ist das Rezeptorprotein Pex7p zuständig (Rehling et al. 1996), welches zusätzlich Korezeptoren benötigt (Rucktäschel et al. 2011). Die Bindung der peroxisomalen Proteine an die Rezeptoren erfolgt im Cytosol. Die PTS-Rezeptoren leiten die gebundenen Kargoproteine zur Membran der Peroxisomen, wo sie an einen Docking-Komplex binden, dessen zentrale Bestandteile die Peroxine Pex13p, Pex14p und Pex17p sind (Brown &

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Baker 2008, Rucktäschel et al. 2011). Im nächsten Schritt werden die Rezeptorproteine in die Membran integriert und die Translokation des Kargoproteins durch die Membran erfolgt. Nach der Freisetzung des Kargoproteins werden die Rezeptorproteine entweder durch Monoubiquitinierung rezykliert und stehen damit für eine neue Runde des Matrixproteinimportes zur Verfügung, oder sie werden nach einer Polyubiquitinierung abgebaut (Ma et al. 2011). Für die Translokation der Matrixproteine ist das Importomer zuständig (Rucktäschel et al. 2011), das aus zahlreichen Peroxinen besteht, zu denen der Docking-Komplex und ein „RING-Finger" („Really Interesting New Gene")-Komplex gehören (Agne et al. 2003).

Peroxisomen sind in der Lage native und oligomerisierte Proteine über ihre Lipiddoppelschicht aufzunehmen (Glover et al. 1994, McNew & Goodman 1994, Häusler et al. 1996). Sogar Goldpartikel, die mit einer peroxisomalen Zielsequenz ausgestattet wurden und einen Durchmesser von 9 nm aufweisen, können die Membran durchqueren (Walton et al. 1995). Wie die Matrixprotein-Translokation genau erfolgt, war lange Zeit unklar. Neue Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Rezeptor Pex5p zusammen mit dem Peroxin Pex14p des Docking-Komplexes eine transiente Pore bilden (Meinecke et al. 2010), welche den Import der Matrixproteine – auch großer Komplexe – ermöglichen könnte (Erdmann & Schliebs 2005). Ob OPR3 ebenso in komplexer Form als Oligomer in Peroxisomen importiert werden könnte, bleibt zu beantworten.

1.10 Organ- und gewebespezifische Lokalisation der JA-Biosyntheseenzyme und der Jasmonsäure

Die subzelluläre Lokalisation der OPR3 in Peroxisomen ist bekannt (Strassner et al. 2002). Über die gewebespezifische Lokalisation von OPR3 gibt es bisher jedoch nicht viele Daten.
Die Transkriptmenge der OPR3 ist in Blättern geringer als in Blüten, Antheren oder Wurzeln (Stintzi & Browse 2000, Strassner et al. 2002). OPR3-Transkripte akkumulieren jedoch sehr rasch in Blättern nach Verwundung oder JA-Behandlung (Costa et al. 2000, Müssig et al. 2000, Stintzi & Browse 2000, Strassner et al. 2002, Chung et al. 2008, Díaz et al. 2012). In unverwundeten Pflanzen sind außer in Blüten, Blättern und Wurzeln geringe Mengen der *OPR3* mRNA in Keimlingen und Schoten vorhanden (Costa et al. 2000).

Die höchste Konzentration an JA weisen Blüten, reproduzierendes Gewebe und seneszierende Blätter auf (Creelman & Mullet 1995, Hause et al. 2003a). Wurzeln zeigen eine geringere JA-Konzentration, obwohl die Wurzelspitzen signifikante Mengen des Hormons enthalten

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

(Creelmann & Mullet 1995). Der Gehalt an Jasmonsäure in Wurzeln ist niedriger als in Blättern und Blüten (Hause et al. 2003a). Deswegen wird angenommen, dass Zellen mit Chloroplasten den größten Anteil an OPDA und JA synthetisieren (Acosta & Farmer 2010). Es bleibt aber offen, ob nicht auch Zellen ohne Chloroplasten (wie die meisten Wurzelzellen) in der Lage sind, JA zu produzieren (Acosta & Farmer 2010), da das *LOX2*-Gen in der Elongationszone der Wurzeln exprimiert wird (Birnbaum et al. 2003).

Vieles spricht dafür, dass die gewebespezifische Biosynthese und der Transport der JA in den Leitbündeln stattfinden könnte: Für Tomate konnte gezeigt werden, dass JA und OPDA in den Hauptadern der Blätter nach Verwundung akkumulieren (Stenzel et al. 2003b). Reportergen-Analysen mit dem AOS-Promotor zeigen eine Expression des Gens in den Blattadern nach Verwundung (Kubigsteltig et al. 1999). Zudem findet die Expression der AOC aus Tomate in den Leitbündeln von Wurzeln, Stängeln und Blättern statt und Blütenstiele zeigen eine besonders hohe Jasmonat-Konzentration (Hause et al. 2000). In den Leitbündeln akkumuliert AOC in den Siebelementen und Geleitzellen. Ebenso können LOX und AOS in den Siebelementen von Blütenstielen detektiert werden (Hause et al. 2003b).

Die Akkumulation von JA und die Anwesenheit von Enzymen des Oktadekanoidweges in den Leitbündeln sprechen dafür, dass Jasmonsäure oder ein JA-Derivativ, das Phloem-mobile Signal sein könnte, welches die systemische Antwort und die Aktivierung der Abwehrgene nach Verwundung vermittelt (Schaller & Stintzi 2008).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Aktivität der Oxophytodiensäurereduktase 3 (OPR3) von deren Dimerisierungszustand abhängig und möglicherweise durch reversible Phosphorylierung reguliert wird. Eine Tyrosin-spezifische Proteinkinase könnte durch Phosphorylierung der OPR3 an Position Y364 (Tomate) bzw. Y365 (*Arabidopsis*) die Ausbildung eines inaktiven Homodimers bewirken. Die Aminosäure Y364 erscheint für eine Phosphorylierung prädestiniert, da sich in der Kristallstruktur des OPR3 aus Tomate in der Nähe dieser Aminosäure ein Sulfat-Ion befindet, welches die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Tyrosins imitieren könnte. Durch bestimmte Umweltbedingungen – wie beispielsweise Verwundung oder entwicklungsphysiologische Prozesse – könnte der inaktive phosphorylierte Zustand durch eine Phosphatase aufgehoben und OPR3 aktiviert werden, wodurch die rasche Synthese der Jasmonsäure ermöglicht werden würde. *In vitro* konnte bereits die Dimerisierung der OPR3 nachgewiesen werden (Breithaupt et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Dimerisierung der OPR3 *in vivo* untersucht werden. Der Dimerisierungszustand der OPR3 sollte dabei sowohl in unterschiedlichen Organismen und Pflanzenorganen untersucht, als auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und nach mechanischer Verwundung der Pflanzen getestet werden.

Außerdem sollte *in vivo* analysiert werden, ob durch die Veränderung spezifischer Aminosäuren der OPR3 Einfluss auf deren Dimerisierungspotential genommen werden kann. Dabei sollten Varianten der OPR3 untersucht werden, für die *in vitro* eine verminderte Fähigkeit zur Dimerisierung nachgewiesen wurde (Breithaupt et al. 2006).

Da peroxisomale Matrixproteine auch als Dimer importiert werden können (Brown & Baker 2008), sollte mittels eines Huckepack-Experimentes überprüft werden, ob dies auch für OPR3 möglich ist. Auf diese Weise sollte sich klären lassen, ob eine Dimerisierung der OPR3 schon im Cytosol oder erst in Peroxisomen stattfindet und ob cytosolisch lokalisierte Kinasen in die Kandidatensuche für eine OPR3-Phosphorylierung miteinbezogen werden müssen.

Zudem sollte für zwei potentiell OPR3-regulierende Proteinkinasen untersucht werden, ob diese einen Einfluss auf die Interaktion der OPR3 nehmen. In einem solchen Falle wäre zu erwarten, dass „loss-of-function“-Mutanten der ausgewählten Kinasen durch Zunahme der Jasmonsäure-Konzentration einen erhöhten Transkriptspiegel JA-abhängiger Gene aufweisen, was im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.