



1 EINLEITUNG

Pflanzen haben aufgrund ihrer Sessilität im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um sich gegen diverse Feinde wehren zu können (Walling, 2000; Kessler und Baldwin, 2002). Nicht nur große, zu den Vertebraten zählende Herbivoren können zu massiven Schädigungen und zu einem für die Pflanze lebensgefährlichen Verlust an Biomasse führen, sondern auch Insekten, Pilze, Bakterien und Viren. Diese sehr verschiedenen Feinde erfordern auch sehr verschiedene Abwehrmechanismen: während makrobiologische Strukturen wie Stacheln oder Dornen effektiv gegen manche Vertebraten wirken können, sind sie zur Abwehr von Mikroorganismen vollständig ungeeignet.

Auf molekularbiologischer Ebene werden die verschiedenen Abwehrreaktionen in der Pflanze im wesentlichen durch die drei Phytohormone Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen vermittelt. Der Salizylsäure wird vor allem eine Bedeutung in der Abwehr biotropher Pathogene, wie Viren, Bakterien und Pilzen zugeschrieben (Glazebrook, 2005). Salizylsäure führt bei Befall durch diese Schädlinge zu einer hypersensitiven Reaktion, also einem induzierten Zelltod, welcher dazu führt, dass das die Infektionsstelle umgebende Gewebe nekrotisch wird. Somit wird eine Ausbreitung des Pathogens, das auf lebendes Gewebe angewiesen ist, verhindert (Alvarez, 2000).

Jasmonsäure und Ethylen zusammen übernehmen dagegen die Vermittlung der Abwehrreaktion auf Befall mit nekrotrophen Pathogenen, und Jasmonsäure jene in Reaktion auf Befall mit herbivoren Insekten (Reymond und Farmer, 1998; Wasternack, 2007; Browse, 2009b).

Der Jasmonsäure kommen überdies weitere wichtige Funktionen in der pflanzlichen Entwicklung zu (Wasternack, 2007; Browse, 2009a, b; Avanci *et al.*, 2010).

1.1 Jasmonate: essentiell für Entwicklung und die Abwehr von Fressfeinden

Jasmonate, also Jasmonsäure (JA) sowie ihre Vorläufermoleküle und Konjugate, sind pflanzliche Wachstumsregulatoren (Vick und Zimmermann, 1984; Staswick und Tiriyaki, 2004), die an der Steuerung einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen beteiligt sind (Creelman und Mullet, 1997), darunter das Wurzelwachstum (Staswick *et al.*, 1992; Feys *et al.*, 1994; Hummel *et al.*, 2009), die Knollenbildung (Yoshihara *et al.*, 1989), die Seneszenz (Ueda und Kato, 1980) und die Entwicklung von Trichomen (Li *et al.*, 2004; van Schi *et al.*, 2007) sowie von Antheren und Pollen (McConn und Browse, 1996; Sanders *et al.*, 2000;

EINLEITUNG

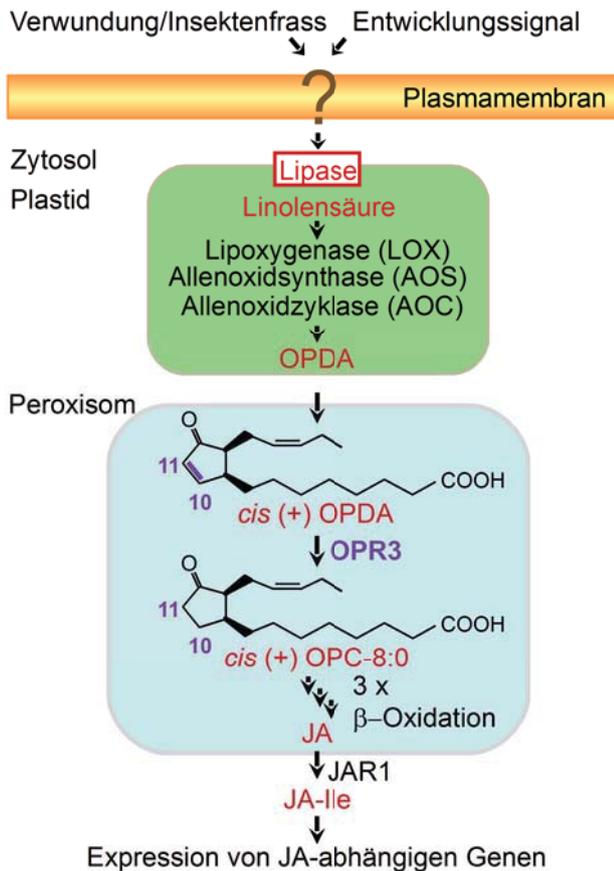


Abbildung 1.01: der Oktadekanoidweg ist für die Biosynthese der Jasmonsäure verantwortlich; die Linolensäure wird aus der Chloroplastenmembran freigesetzt und durch LOX, AOS und AOC in (9S, 13S)-OPDA umgewandelt; im Peroxisom wird diese durch OPR3 reduziert und durch drei Zyklen β -Oxidation zu JA verkürzt; die Konjugation mit Isoleucin durch JAR1 führt zur Entstehung von JA-Ile, welches als bioaktives Jasmonat die Expression der JA-abhängigen Gene induziert.

Stintzi und Browse, 2000). Daneben ist eine weitere bedeutende Funktion der JA die Vermittlung der pflanzlichen Abwehrreaktionen, insbesondere die gegen herbivore Insekten und nekrotrophe Pathogene (Farmer *et al.*, 2003; Wasternack, 2007; Browse, 2009b).

Die Biosynthese der JA erfolgt über den Oktadekanoidweg (Abb. 1.01). Ausgelöst durch ein Entwicklungs-abhängiges Signal oder durch einen Verwundungsstimulus wird die Linolensäure, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (Oktadekatriensäure (18:3)) durch eine Lipase aus der Plastidenmembran freigesetzt (Conconi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000). Ausgehend von dieser Fettsäure wird dann durch die Enzyme Lipoxygenase (LOX; Bell und Mullet, 1993), Allenoxidsynthase (AOS; Laudert *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2000) und Allenoxidzyklase (AOC; Ziegler *et al.*, 1997; Stenzel *et al.*, 2003a, b) die 12-Oxophytodiensäure ((9S, 13S)-12-OPDA), gebildet (Abb. 1.01). Diese wird auf nicht vollständig geklärte Weise, wahrscheinlich jedoch zum größten Teil mit Hilfe des ABC-Transporters „COMATOSE“ (CTS; Theodoulou *et al.*, 2005; Footitt *et al.*, 2007; Dietrich *et al.*, 2009, Dave *et al.*,

2011), jedoch auch CTS-unabhängig (Dave *et al.*, 2011), in das Peroxisom transportiert, wo schließlich ihr Cyclopentenonring durch die OPR3 NADPH-abhängig reduziert wird (Schaller *et al.*, 2000; Abb. 1.01). Drei Zyklen β -Oxidation (Cruz Castillo *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2006) führen dann zur Bildung von JA (Vick und Zimmermann, 1984; Schaller und Stintzi, 2009; Abb. 1.01). JA bildet Konjugate mit einer Reihe von Molekülen, (Aminosäuren, Zuckern, Sulfat, Hydroxylresten), welche ein zum Teil unterschiedliches Wirkspektrum aufweisen

EINLEITUNG

(Wasternack, 2007; Miersch *et al.*, 2008; Staswick, 2009). Vor allem JA-Isoleucin (JA-Ile), dessen Biosynthese durch das Enzym JAR1 (Jasmonate Resistant 1 = Jasmonic Acid Amido Synthetase; Staswick und Tiryaki, 2004; Suza und Staswick, 2008; Abb. 1.01) katalysiert wird, ist hier von besonderer Bedeutung (Suza und Staswick, 2008; Fonseca *et al.*, 2009) und wurde als eigentliches bioaktives Jasmonat beschrieben (Fonseca *et al.*, 2009).

Induziert durch die über den Oktadekanoidweg gebildeten Moleküle kommt es zur Interaktion der JAZ („jasmonate ZIM-domain“-)Proteine mit der SCF^{COI1} E3-Ubiquitin-Ligase (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008), deren F-Box-Komponente in *Arabidopsis* COI1 bzw. in Tomate JAI1 genannt wird. Diese durch die Jas-Domäne („jasmonate associated“; Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009) der JAZ-Proteine vermittelte Interaktion führt zu deren Ubiquitinierung und dem daraus resultierenden proteasomalen Abbau (Pauwels und Goossens, 2011; Abb. 1.02).

In Abwesenheit von JA bzw. JA-Ile binden JAZ Proteine, als durch die ZIM/TIFY-Domäne (Vanholme *et al.*, 2007) stabilisierte Homo- oder Hetero-Dimere, die für die JA-abhängige Transkription verantwortlichen MYC- und MYB-Transkriptionsfaktoren (Wager und Browse, 2012) und verhindern so die Expression der JA-induzierten Gene. Nach dem Abbau der JAZ-Proteine kommt es demzufolge zu einer Änderung der Transkriptionsrate von Genen, deren Produkte in die Abwehr von Fressfeinden involviert bzw. für den augenblicklichen Entwicklungsprozess der Pflanze wichtig sind (Abb. 1.02).

Zu den sogenannten „early respore genes“, deren Transkripte in Reaktion auf Verwundung

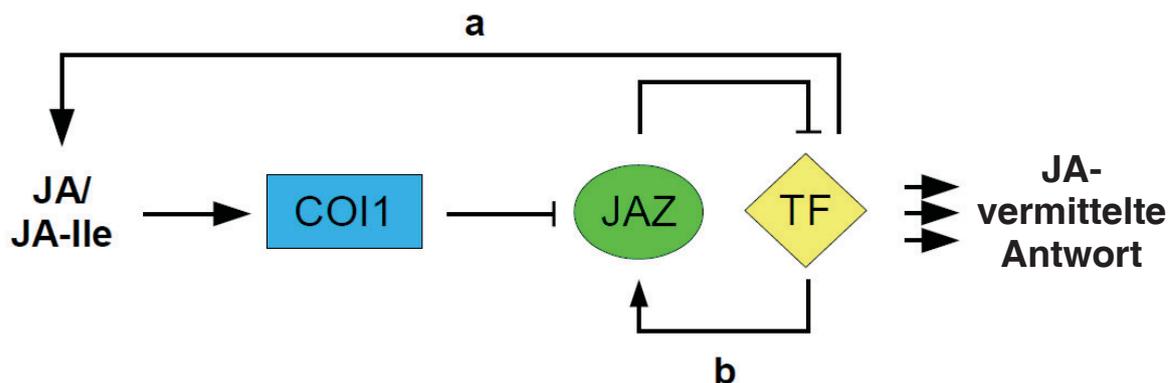


Abbildung 1.02: Darstellung der Schlüsselkomponenten des JA Signalweges (geändert nach Banerjee und Bose, 2011; Farmer, 2007). JA wird mit Isoleucin konjugiert. Durch die Interaktion mit COI1 (blau) kommt es zum Abbau der JAZ-Proteine (grün). JA-induzierbare Transkriptionsfaktoren (TF, z.B. MYC2; gelb) führen, neben der Vermittlung der Abwehrreaktion, sowohl zur vermehrten Bildung von JA durch vermehrte Expression der Enzyme des Oktadekanoidweges (a), als auch zur vermehrten Expression der inhibitorischen JAZ-Proteine (b).



EINLEITUNG

innerhalb weniger Minuten akkumulieren, gehören die für die Inhibitoren der JA-Antwort kodierenden JAZ-Gene (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008; Figueroa und Browse, 2012; Abb. 1.02). Vermittelt durch JA kommt es also neben der vermehrten Expression Abwehr-relevanter Gene auch zur vermehrten Bildung dieser negativen Regulatoren. Dies führt, neben der Synthese von stabilisierten JAZ-Varianten, die durch alternatives Splicing entstehen (Chung und Howe, 2009; Chung *et al.*, 2010) und dem Abbau von JA-Ile (Kitaoka *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2011), zu einer baldigen Abschaltung der Antwort und somit zur Vermeidung einer zu heftigen bzw. zu andauernden Reaktion.

Arabidopsis Pflanzen, welchen Enzyme des Oktadekanoidweges fehlen, zum Beispiel durch eine T-DNA-Insertion im *OPR3* (*At2g06050*; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi und Browse, 2000) oder im *AOS* (*At5g42650*; Park *et al.*, 2002; von Malek *et al.*, 2002) können keine JA produzieren und sind männlich steril. Dies ist außerdem der Fall für die JA-Perzeptionsmutante *coi 1-1* (Feys *et al.*, 1994). Die Defekte in der Antheren- und Pollenentwicklung, die sich in verkürzten Antherenfilamenten und vermindert keimfähigen Pollenkörnern äußern, lassen sich in den Biosynthesemutanten, nicht jedoch in der Perzeptionsmutante, durch die Behandlung mit exogener Methyljasmonsäure im Blütenstadium 12 (Smyth *et al.*, 1990) aufheben (Sanders *et al.*, 2000; Stintzi und Browse, 2000), eine spätere Behandlung der Blüten bleibt jedoch wirkungslos. Damit lässt sich der Bedarf von JA für eine normale Entwicklung von Antheren und Pollen auf das Stadium 12 der Blütenentwicklung begrenzen (Stintzi und Browse, 2000). Auch Tomatenpflanzen, die nicht mehr zur Synthese von JA oder zu ihrer Perzeption in der Lage sind, zeigen Defekte in der Blüten- bzw. Embryoentwicklung (Li *et al.*, 2004; Goetz *et al.*, 2012; Bosch und Schaller, unveröffentlicht). Anders als in *Arabidopsis* ist dies nicht ausschließlich durch männliche Sterilität bedingt, sondern scheint zudem den weiblichen Gametophyten zu betreffen (Li *et al.*, 2004; Goetz *et al.*, 2012; Bosch und Schaller, unveröffentlicht).

Nach einem Verwundungsstimulus werden, induziert durch JA bzw. JA-Ile, in Tomatenpflanzen verschiedene Proteine gebildet, die die Verwertbarkeit des Pflanzenmaterials für Herbivoren herabsetzen (Farmer und Ryan, 1990; Felton, 2005). Hierzu zählen die Proteinaseinhibitoren I und II (PI-I, PI-II; Green und Ryan, 1972; Farmer und Ryan, 1990), sowie der Carboxypeptidaseinhibitor (CPI; Martineau *et al.*, 1991), der CathepsinD-Inhibitor (CDI; Hansen und Hannapel, 1992), die Leucinaminopeptidase (LAP; Pautot *et al.*, 1993), die Polyphenoloxidase (PPO; Constabel *et al.*, 1995) und die Threonindeaminase (TD; Samach *et al.*, 1995). Werden *Manduca sexta* Larven auf Tomatenpflanzen gesetzt, die über eine reduzierte Menge an Proteinaseinhibitoren verfügen, zum Beispiel die JA-Biosynthesemutante JL5 (Howe *et al.*, 1996), erreichen sie nach neun



EINLEITUNG

bis zehn Tagen das zwei- bis zweieinhalbfache Gewicht von Raupen, die auf Wildtyp-Pflanzen fressen konnten (Howe *et al.*, 1996). Die JL5-Pflanzen zeigten zudem eine wesentlich höhere Schädigung durch den Insektenfrass als der Wildtyp (Howe *et al.*, 1996).

In *Arabidopsis* wird durch JA bzw. JA-Ile unter anderem die Transkription der Gene induziert, welche die "Vegetativen Speicherproteine" („vegetative storage proteins“, VSPs; Benedetti *et al.*, 1995) kodieren. Das JA-Vorläufermolekül (9S, 13S)-OPDA ist nicht in der Lage, diese zu induzieren. Die Rolle dieser Proteine in der Abwehrreaktion ist noch nicht vollständig geklärt, Liu *et al.* (2005) postulieren eine Saure Phosphatase-Aktivität für AtVSP1 (kodiert in At5g24780) und AtVSP2 (kodiert in At5g24770), die für ihre Verdauungs-hemmende Aktivität wichtig ist.

Neben AtVSPs zeigte sich auch die Expression des Genes für ein Myrosinase-bindendes Protein (AtMBP1.2, At1g52030) als stark JA-abhängig (Capella *et al.*, 2001; Stintzi *et al.*, 2001). MBPs sind über die Interaktion mit Myrosinasen in das Myrosinase-Glukosinolat System involviert, welches durch Hydrolyse von Glukosinolaten zur Entstehung von Substanzen führt, für die eine Reihe von Wirkungen im Zusammenhang mit Entwicklung und Abwehr vorhergesagt werden (Bones und Rossiter, 1996; Rask *et al.*, 2000). So beeinflussen sie zum Beispiel das Frassverhalten von Insekten und deren Oviposition, sie können eine Vorstufe von Auxinen darstellen oder den Pflanzen die Versorgung mit Schwefel und Stickstoff gewährleisten (Bones und Rossiter, 1996; Rask *et al.*, 2000). Die Rolle der MBPs ist in diesem Zusammenhang jedoch noch ungeklärt.

Für die meisten der JA-regulierten Gene lässt sich eine Regulation durch ein oder mehrere weitere Phytohormone feststellen (Xu *et al.*, 1994; Rojo *et al.*, 1999; Felton *et al.*, 1999; Ellis und Turner, 2002; Glazebrook, 2005). So ist zum Beispiel AtPDF1.2 (PLANT DEFENSIN 1.2; At5g44420; Manners *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998) auf der einen Seite durch JA induzierbar, bei völliger Abwesenheit von JA wird es allerdings ebenfalls vermehrt transkribiert. Dieser Effekt lässt sich durch einen JA-Ethylen-Crosstalk (Lorenzo *et al.*, 2003; Pré *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2009) erklären, welcher in JA-defizienten Pflanzen missreguliert ist (Okamoto *et al.*, 2009). Bekannt ist überdies, dass JA und Salizylsäure (SA) in vielen Fällen antagonistische Wirkung zeigen (Beckers und Spoel, 2006; Smith *et al.*, 2009), jedoch gibt es auch Hinweise auf eine konzentrationsabhängige synergistische Wirkung dieser beiden Hormone (O'Donnell *et al.*, 2003; Maldonado-Calderón *et al.*, 2012).

SA vermittelt nach Befall durch biotrophe Pathogene die Abwehrreaktionen in der Pflanze, welche die hypersensitive Reaktion (HR) und die systemisch erworbene Resistenz („Systemic Acquired Resistance“, SAR) beinhalten (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Durrant und Dong, 2004).



EINLEITUNG

Einige Pathogene nutzen den JA-SA-Antagonismus, indem sie den gegen sie unwirksamen Weg sehr gezielt induzieren und somit den wirksamen unterdrücken (Walling, 2000; Abramovitch und Martin, 2004; Walling, 2008). So konnten Zarate *et al.* (2007) feststellen, dass es in *Arabidopsis* nach Befall mit der weißen Fliege *Bemisia tabaci* zu einer lokalen und systemischen Induktion SA-abhängig exprimierter Gene kommt. JA- und Ethylen-vermittelte Antworten, welche gegen den Befall wirksam wären, werden reprimiert.

In den meisten Fällen jedoch kommt es in Reaktion auf Verwundung oder auf Befall mit herbivoren Insekten zur Aktivierung des Oktadekanoidweges und damit zu einer raschen und transienten Akkumulation von JA, welche bereits nach fünf Minuten nachweisbar ist und nach einer Stunde ihr Maximum erreicht (Wang *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2001; Glauser *et al.*, 2008; Heil *et al.*, 2012). Diese JA-Bildung wurde häufig durch eine vermehrte wundinduzierte Expression von Genen, die Enzyme des Oktadekanoidweges kodieren, erklärt. Tatsächlich kommt es nach Verwundung auch zu einer Akkumulation dieser Transkripte (Howe *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2000; Strassner *et al.*, 2002), die Kinetik dieser Induktion ist allerdings nicht schnell genug, um die Akkumulation von JA nach Verwundung erklären zu können (Ziegler *et al.*, 2001; Strassner *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2008). An dieser Stelle müssen also weitere Regulationsmechanismen greifen. Diese Annahme wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass die Enzyme LOX, AOS, AOC und OPR3, wenn auch auf niedrigem Niveau, doch konstitutiv exprimiert werden und somit auch in unverwundeten Blättern vorliegen, wobei es nicht zu einer Akkumulation von JA kommt (Hause *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003b). Auch eine Überexpression von AOS oder AOC führt nicht zu einer Erhöhung des JA-Grundspiegels, jedoch zu einer verstärkten Akkumulation nach Verwundung (Wang *et al.*, 1999; Laudert *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003a).

Diese Beobachtungen können nun anhand von verschiedenen Hypothesen erklärt werden: Zum einen mag die Substratverfügbarkeit, also das Vorhandensein von Linolensäure im Chloroplasten bzw. von OPDA im Peroxisom, den limitierenden Faktor darstellen (Wasternack, 2007). In *Arabidopsis* wurden Galaktolipide nachgewiesen, welche als OPDA-Speicher fungieren (Stelmach *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2006; Buseman *et al.*, 2006) und damit deren Verfügbarkeit regulieren könnten. Sie tragen als Reste OPDA bzw. dnOPDA, das aus der Hexadekatriensäure entstehende C16 Equivalent der OPDA (Weber *et al.*, 1997; Stelmach *et al.*, 2001; Hisamatsu *et al.*, 2005). Ein Verwundungsstimulus führt zur Akkumulation der Arabidopside (Buseman *et al.*, 2006; Böttcher und Weiler, 2007), deren Dynamik sehr der von JA gleicht (Kourtchenko *et al.*, 2007). Das Vorkommen der Arabidopside beschränkt sich jedoch tatsächlich auf *Arabidopsis*. Das mag zum einen

bedeuten, dass sie für die Pflanzen nicht unbedingt notwendig sind oder aber, dass in anderen Pflanzen alternative Moleküle die Aufgabe der Arabidopside übernehmen (Kourtchenko *et al.*, 2007).

Messungen der Konzentrationen von OPDA und JA belegen, dass freie OPDA in höheren Konzentrationen vorliegt als JA, zum Beispiel in Blüten von Tomatenpflanzen (Miersch *et al.*, 2004) oder in *Arabidopsis*-Blättern (Stintzi *et al.*, 2001) und -Samen (Dave *et al.*, 2011). Auch in Blättern von Tomatenpflanzen ist der Gehalt an OPDA gegenüber dem Gehalt an JA deutlich erhöht (Bosch und Schaller, unveröffentlicht). Diese Befunde können zwar nicht ausschließen, dass die OPDA-Verfügbarkeit für die OPR3 im Peroxisom limitierend ist, deuten aber auch darauf hin, dass eine Regulation auf Ebene der OPDA-Umsetzung möglich ist.

Als alternativer Regulationsmechanismus, der die JA-Biosynthese limitieren könnte, könnten Enzyme des Oktadekanoidweges in inaktiver Form vorliegen. Eine posttranslationale Modifizierung, welche zur Aktivierung von Schlüsselenzymen nach Verwundung führt, könnte dann den sprunghaften Anstieg des JA-Spiegel zur Folge haben. Aufgrund der Daten von Stintzi *et al.* (2001), Miersch *et al.* (2004), Dave *et al.* (2011) und von Marko Bosch, welche nahelegen, dass freie OPDA für die Umsetzung zu JA nicht limitierend ist, ist OPR3 der favorisierte Kandidat für eine derartige Regulation.

1.2 Regulation der Enzymaktivität von OPR3 durch posttranslationale Modifikationen

Breithaupt *et al.* konnten 2006 die Struktur der *S*OPR3 aufklären. Aufgrund dieser Kristallstruktur wurde ein möglicher Mechanismus zur Kontrolle der JA-Synthese und damit zur Steuerung pflanzlicher Abwehrreaktionen durch posttranslationale Modifikationen vorgeschlagen (Breithaupt *et al.*, 2006): *S*OPR3 kristallisiert als Dimer, in welchem eine fingerartige Struktur (L6-Loop; Serin 272 - Glycin 314) der einen Untereinheit das aktive Zentrum der jeweils anderen blockiert (Abb. 1.03, A; Breithaupt *et al.*, 2006). Diese fingerartige Struktur stellt einen wesentlichen Unterschied zwischen OPR3 und OPR1, ihrer nächsten Verwandten in der Familie der Oxophytodiensäurereductasen, dar (Breithaupt *et al.*, 2009).

Die Bildung eines *S*OPR3-Dimers konnte anhand von "Dynamic Light Scattering" und "Analytical Ultracentrifugation" auch in Lösung gezeigt werden (Breithaupt *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Aktivität der *S*OPR3 *in vivo* durch die Lage des Monomer/Dimer-Gleichgewichts reguliert wird, wobei das Monomer, bei

EINLEITUNG

welchem das aktive Zentrum für das Substrat (*9S*, *13S*)-OPDA zugänglich ist, die aktive Form darstellt (Breithaupt *et al.*, 2006).

Im Kristall wird das *S*/OPR3-Dimer durch ein Sulfation stabilisiert, welches mehrere Wasserstoffbrücken zu beiden Untereinheiten ausbildet (Abb. 1.03, B). Dieses Sulfation befindet sich in unmittelbarer Nähe zu einem Tyrosin an Position 364 (Y364, entspricht Y365 in *Arabidopsis*), mit welchem es eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht (Abb. 1.03, B). Dass dieser Tyrosinrest und dessen Sulfat-Bindung für die Dimerisierung unerlässlich ist, wurde durch zielgerichtete Mutagenese bestätigt: eine veränderte *S*/OPR3, in welcher dieses Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt wurde (*S*/OPR3^{Y364F}), bindet kein Sulfat mehr und

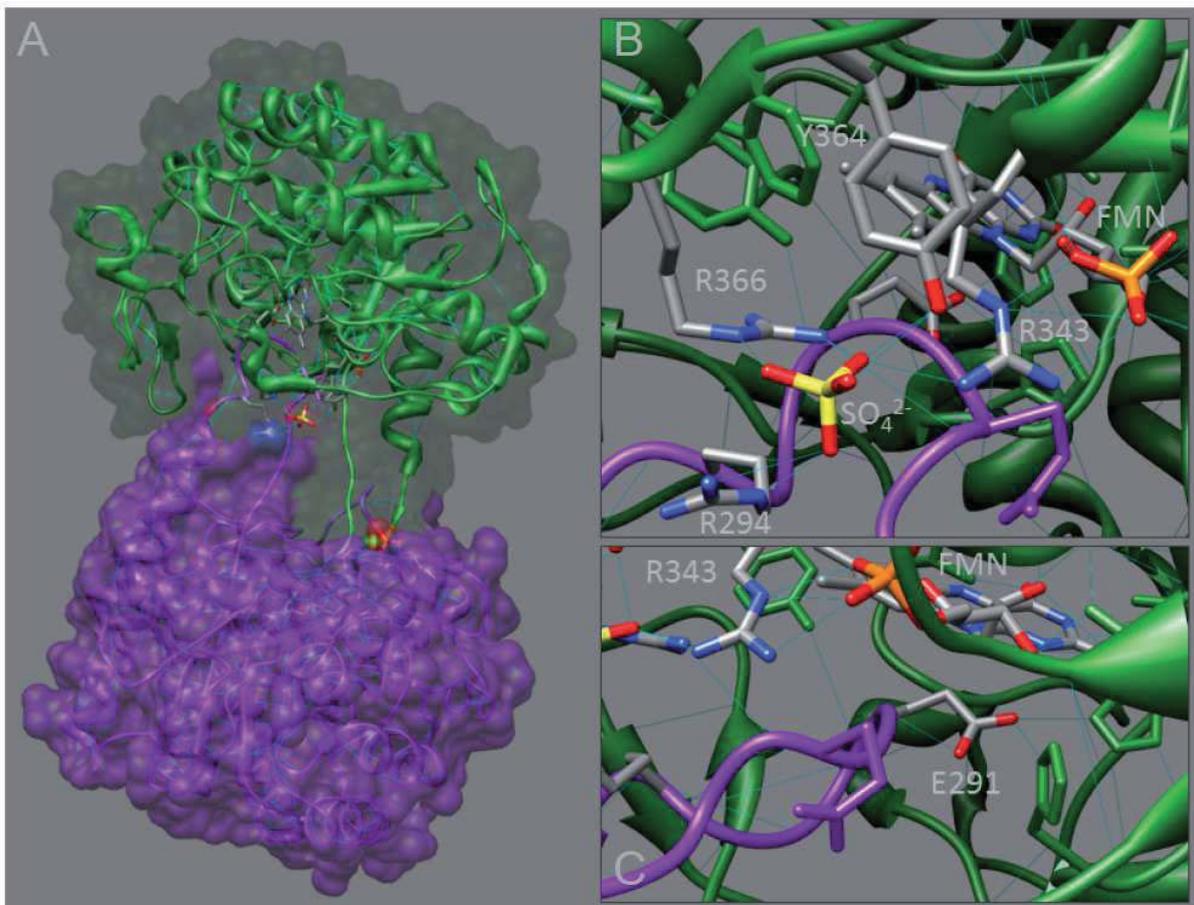


Abbildung 1.03: Kristallstruktur der OPR3 aus Tomate. **A:** OPR3 kristallisiert als ein sich selbst inhibierendes Dimer, in dem eine fingerartige Struktur jeder Untereinheit das aktive Zentrum der anderen besetzt. **B:** Ein Sulfation (gelb-rotes Kreuz; SO_4^{2-}) in unmittelbarer Nachbarschaft von Y364 simuliert einen Phosphotyrosinrest und bildet mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Untereinheiten, unter anderem zu den Argininen an Position 294 (lila Untereinheit), 343 und 366 (grüne Untereinheit) aus. **C:** Auch das Glutamat an Position 291 (lila Untereinheit) trägt wesentlich zur Stabilisierung des Dimers bei (2HSA.pdb, Breithaupt *et al.*, 2006; UCSF Chimera, Pettersen *et al.*, 2004).

kristallisiert als Monomer (Breithaupt *et al.*, 2006). Interessanterweise ergibt sich durch die strukturelle Ähnlichkeit von Sulfat und Phosphat und die Positionierung des Sulfations im Kristall eine hohe Analogie mit Phosphotyrosin. Diese Beobachtungen sind Grundlage für die These, dass das Monomer/Dimer-Gleichgewicht und damit die Aktivität der *SI*OPR3 *in vivo* durch reversible Phosphorylierung des Y364 reguliert wird.

Das Sulfation bildet des Weiteren Wasserstoffbrücken mit drei ebenfalls phosphorylierbaren Aminosäuren aus (Smith *et al.*, 1976; Fuhrmann *et al.*, 2009; Cieśła *et al.*, 2011), den Argininen an Position 294, 343 und 366 (R294, R343, R366). R343 und R366 sind, im Gegensatz zu R294, in *Arabidopsis*, Tomate, Reis und Mais konserviert und könnten demzufolge eine wichtige Funktion für die Struktur der OPR3 innehaben. Das Arginin an Position 343 interagiert zudem mit der Phosphatgruppe des FMN-Cofaktors (Abb. 1.03; B). Eine Argininphosphorylierung ist im Vergleich zu Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierungen sehr selten, jedoch nicht weniger wichtig (Fuhrmann *et al.*, 2009; Cieśła *et al.*, 2011). So verhindert eine Argininphosphorylierung zum Beispiel die DNA-Bindung des Hitzeschockregulators CtsR in *Bacillus subtilis* (Fuhrmann *et al.*, 2009) und ist eine wichtige Histonmodifikation in ruhenden Zellen im Rattenherz (Wakim *et al.*, 1995).

Neben der favorisierten Phosphorylierung an Y364 (Breithaupt *et al.*, 2006) sind also weitere Modifikationen denkbar, welche regulativ auf das Monomer/Dimer-Gleichgewicht wirken könnten. Dabei sind nicht nur alternative phosphorylierbare Reste, wie die Arginine an Position 343 und 366 zu beachten, sondern auch eine Vielzahl anderer Modifikationen, die sich auf Struktur und Dimerisierungspotential der OPR3 auswirken könnten.

Unabhängig von der Art der Modifikationen, welche Einfluss auf das OPR3-Dimer/Monomer-Gleichgewicht nehmen, kann die Korrelation zwischen Verwundungszustand der Pflanzen, JA-Spiegel, OPR3-Dimerisierungsstatus und Bedarf an Konfigurations-ändernden Modifikationen der OPR3 vereinfacht dargestellt werden (Abb. 1.04). Im unverwundeten Zustand liegt OPR3 vorwiegend als stabilisiertes Dimer vor. Auch einzelne aktive OPR3-Monomere mögen existieren, sind aber mengenmäßig irrelevant, JA wird nicht synthetisiert (Abb. 1.04, unverwundet). Nach einem Verwundungsstimulus ändert sich das Bild (Abb. 1.04, Verwundung). Es kommt zu einer sehr raschen Akkumulation von JA. Dafür ist im Wesentlichen die Aktivierung der bereits vorliegenden OPR3 durch eine posttranslationale Modifikation verantwortlich (Abb. 1.04, + 5 Minuten). Darüber hinaus wird auch vermehrt OPR3 gebildet (Abb. 1.04, + 30 Minuten). Mit der Zeit klingt die JA-Synthese wieder ab, bedingt durch die Inaktivierung der OPR3 durch eine posttranslationale Modifikation (Abb. 1.04, + 2 Stunden). Auch wenn in den entsprechenden Pflanzen noch große Mengen OPR3 vorhanden sind, wird also keine weitere JA mehr gebildet. Die aktivierende und die

VERWUNDUNG

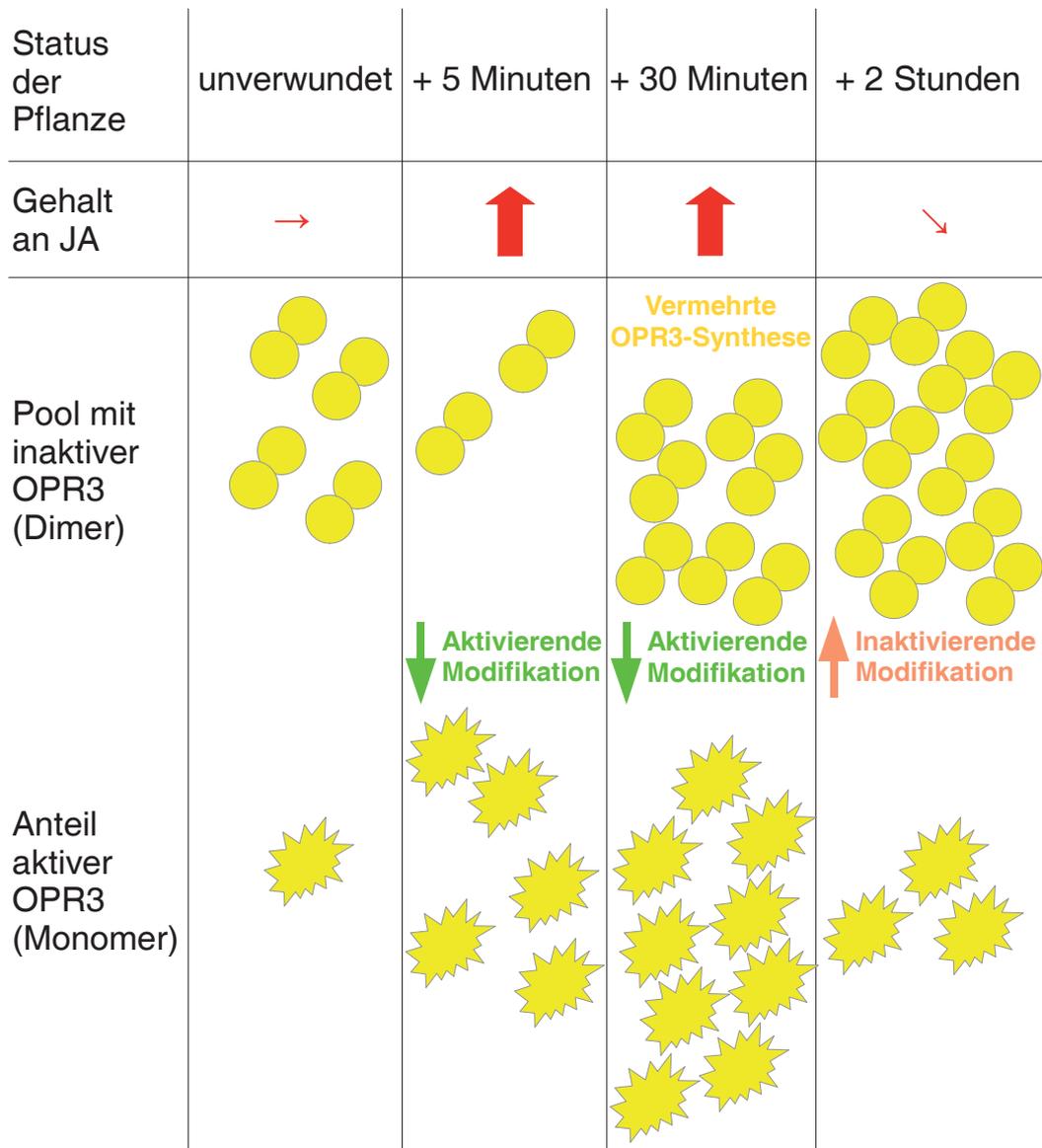


Abbildung 1.04: Hypotetische Regulation des Dimer/Monomer-Gleichgewichts der OPR3 im Zusammenhang mit der Wundreaktion. In unverwundetem Zustand ist der Gehalt an JA niedrig, OPR3 liegt im Wesentlichen als Dimer vor. Verwundung führt zur Aktivierung der OPR3 und dadurch zum Anstieg des JA-Gehalts durch eine aktivierende Modifikation der OPR3, zudem wird vermehrt OPR3 gebildet. Zu späteren Zeitpunkten nach Verwundung sinkt der JA-Gehalt, da OPR3 durch eine inaktivierende Modifikation wieder in den Dimer-Status überführt wurde.



inaktivierende Modifikation (Abb. 1.04) können hierbei der jeweils selbe Vorgang in umgekehrter Richtung sein (z.B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung am selben Aminosäurerest), es ist aber auch denkbar, dass es sich um völlig unabhängige Modifikationen handelt.

1.3 Posttranslationale Modifikationen im Zusammenhang mit der Wundreaktion

Verschiedenste posttranslationale Modifikationen von Proteinen führen zu einer Diversifizierung des Proteoms gegenüber dem aufgrund des Genoms anzunehmenden um ungefähr das tausendfache (Walsh *et al.*, 2005). Neben Proteinphosphorylierung, gehören die -acylierung, -alkylierung, -oxidation und -glykosylierung zu den fünf bekanntesten der über 300 möglichen posttranslationalen Modifikationen, welche Funktion und Stabilität eines Proteins beeinflussen können (Jensen 2004; Walsh *et al.*, 2005). Die Seitenketten von fünfzehn der zwanzig proteinogenen Aminosäuren können auf mindestens eine Weise kovalent modifiziert werden. Ausschließlich für die Reste der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin und Phenylalanin sind bisher keine Modifikationen bekannt (Walsh *et al.*, 2005). Viele eukaryontische Proteine tragen Zuckerreste, welche zum einen, wie die Phosphorylierung, von regulatorischer Bedeutung sein können (Zachara und Hart, 2006; Butkinaree *et al.*, 2010), zum anderen aber auch für ihre Löslichkeit und damit Funktionalität und Stabilität benötigt werden können (Marquardt und Helenius, 1992; Banks, 2011).

Auch andere Modifikationen sind in der Lage, die Stabilität eines Proteins zu beeinflussen. So kann zum Beispiel eine N-terminale Acetylierung (Jörnvall, 1975; Martinez *et al.*, 2008) zum Schutz gegen Exopeptidasen dienen, welche vor allem in Organellen für den Proteinabbau verantwortlich sind (Jörnvall, 1975; Bienvenut *et al.*, 2011), während diese Modifikation bei zytosolischen Proteinen zum Abbau durch das Proteasom führt (Hwang *et al.*, 2010).

Interessant im Hinblick auf Reaktionen eines Organismus auf einen Stresstimulus sind besonders Proteinmodifikationen, die einen Aktivitäts-regulierenden Effekt auf das jeweilige Protein haben. Beispiele hierfür sind sowohl MAPKinase-Kaskaden (Zhang und Klessig, 2001), die unter anderem in die JA-Antwort involviert sind (Seo *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2007; Schweighofer und Meskiene, 2008), als auch die reversiblen Phosphorylierungen in Zwei-Komponentensystemen in Bakterien (Burbulys *et al.*, 1991; Egger *et al.*, 1997) und verwandte Signaltransduktionswege in Pflanzen wie die durch Cytokinine oder Ethylen induzierten (Schaller, 1997).



EINLEITUNG

Neben der Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten spielen bei derartigen Regulationen auch kurzkettige O-Glykosylierungen, vor allem die „O-linked N-Acetylglucosaminierung“ (O-GlcNAc) eine wichtige Rolle (Torres and Hart, 1984; Copeland *et al.*, 2008; Butkinaree *et al.*, 2010). Diese, von O-GlcNAc-Transferasen (OGTs; **SECRET AGENT** und **SPINDLY** in *Arabidopsis*; Hartweck *et al.*, 2002; Butkinaree *et al.*, 2010) vermittelten Modifikationen, können sowohl selbst als Regulator dienen, können aber auch die Bindung eines Phosphates an den glykosylierten bzw. einen benachbarten Rest verhindern (Butkinaree *et al.*, 2010; Rexach *et al.*, 2010). In *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine Mutation in *SEC* oder *SPY* tragen, werden schwache Phänotypen beobachtet, welche mit Gibberelin- und Cytokinin-Signaltransduktionen, der Reaktion auf rotes Licht und der Regulation der zirkadianen Uhr in Verbindung gebracht werden können (Jacobsen und Olszewski, 1993; Tseng *et al.*, 2004; Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005; Silverstone *et al.*, 2007; Maymon *et al.*, 2009). Pflanzen, die keine der beiden OGTs produzieren können (*sec/spy*) sind nicht lebensfähig (Hartweck *et al.*, 2002). Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Enzyme, die vermutlich über diverse Interaktionen für das gesamte „O-GlcNAcome“ in *Arabidopsis* verantwortlich sind.

Regulatorische Modifikationen bieten einer Zelle die Möglichkeit, ausgesprochen schnell auf einen Stimulus zu reagieren (Xing und Laroche, 2011). Liegt das für die Vermittlung der entsprechenden Reaktion benötigte Protein bereits vor und muss nur noch aktiviert werden, ist die Antwort im Zeitraum von wenigen Minuten möglich, wie zum Beispiel innerhalb von fünf Minuten im Falle einer SA-induzierten Protein Kinase in Tabak (SIPK; Zhang und Klessig, 1998). In diesem Fall muss keine *de novo*-Synthese des Proteins stattfinden (Zhang und Klessig, 1998).

Tatsächlich kommt es in Pflanzen als Reaktion auf Verwundung zur Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase): in Tomatenpflanzen wird die zu den MAPK gehörende MBPK (Myelin Basic Protein Kinase) durch Verwundung oder Insektenfrass aktiviert. Dies führt zur Expression von Proteinase-Inhibitor I in lokalem und systemischem Gewebe (Stratmann und Ryan, 1997). In *Arabidopsis* führt ein Verwundungsstimulus zur Aktivierung der *AtMEKK1* (*Arabidopsis* MAPK Kinase Kinase 1), welche dann die *AtMEK1* (*Arabidopsis* MAPK Kinase 1) an einem Threonin an Position 218 und an einem Serin an Position 244 phosphoryliert (Hadiarto *et al.*, 2006). Zudem aktiviert JA die MPK6 (MAPK6) vermittelt durch die MKK3 (MAPK Kinase 3; Takahashi *et al.*, 2007). Dies wiederum führt zur verstärkten Transkription von *AtLOX2*, dessen Genprodukt in die JA-Biosynthese involviert ist (Bell *et al.*, 1995).

Auch für Kalzium-abhängige Kinasen (Calcium-dependent Protein Kinase; CDPK) konnte beobachtet werden, dass ihre Abundanz und Aktivität durch Verwundung gesteigert wird. Die Expression der CDPK1 aus Mais (*ZmCDPK1*) wird durch mechanische Verwundung sowohl im verwundeten Gewebe als auch systemisch induziert und eine Berührung der Blätter ist ausreichend, um die Kinase zu aktivieren (Szczegieliak *et al.*, 2012). Überdies konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit dem JA-Antagonisten SA die wundinduzierte Aktivierung der *ZmCDPK1* abschwächt (Szczegieliak *et al.*, 2012). In Tomate konnte ebenfalls eine CDPK identifiziert werden, welche durch Verwundung und JA induziert werden kann (CPK2; Chang *et al.*, 2009). Für *AtCPK6* wird eine Rolle in der JA-vermittelten Stomataschließung postuliert (Munemasa *et al.*, 2011).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es sowohl als Reaktion auf Verwundung als auch bei weiteren JA-vermittelten Vorgängen in der Pflanze zu Änderungen im Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine kommt. Eine Beteiligung reversibler Phosphorylierung an der Regulation der Wundantwort konnte weiterhin durch den Einsatz von Proteinkinase- und Phosphataseinhibitoren gezeigt werden (Rojo *et al.*, 1998; Schaller und Oecking, 1999).

Jedoch sind neben Phosphorylierungen auch andere posttranslationale Modifikationen in die Wundantwort involviert (Spadaro *et al.*, 2010; Thivierge *et al.*, 2010) und könnten somit ebenfalls eine Rolle in der Regulation der OPR3-Aktivität spielen.

OPR3 verfügt über ein Sequenzmotiv, das als ein potentiell Signal für eine O-GlcNAc-Modifizierung identifiziert werden konnte: in den OPR3-Orthologen tritt das Glykosylierungsmotiv Prolin-Valin-Serin-Serin (P V S S; Vosseller *et al.*, 2006) in der etwas modifizierten Form Prolin-Isoleucin-Serin-Serin (P I S S) an den Positionen 125 - 128 in *Arabidopsis* und Tomate, 126 - 129 in Mais bzw. 129 - 132 in Reis auf. Die Option, dass OPR3 glykosyliert sein könnte, erweckt durchaus Aufmerksamkeit, nicht zuletzt aus dem Grund, da eine kurzkettige Glykosylierung wie sie durch die OGT SPINDLY übertragen wird, selbst einen regulatorischen Effekt ausüben kann. Überdies ist berichtet, dass Proteinglykosylierung und -phosphorylierung sich gegenseitig beeinflussen (Butkinaree *et al.*, 2010; Rexach *et al.*, 2010).

Sollte eine Regulation der OPR3 stattfinden, sind also neben der aufgrund des Kristalls vermuteten Phosphorylierung des Y364 durchaus weitere Modifikationen denkbar, die ebenfalls eine Dimer-stabilisierende Funktion erfüllen könnten.

Ein physiologischer Zustand, in welchem eine induzierte Akkumulation inaktiver OPR3 von besonderer Bedeutung sein könnte, ist das sogenannte „Priming“.



1.4 Kommunikation unter Pflanzen: das Phänomen des "Primings"

Als "Priming" bezeichnet man das Phänomen, dass Pflanzen bzw. Gewebe durch Reize geringer Intensität in einen Alarmzustand versetzt werden, der es ihnen ermöglicht, auf einen späteren Aggressor mit einer rascheren und stärkeren Antwort zu reagieren (Conrath *et al.*, 2006). Relativ gut untersucht ist das „Priming“ in unbefallenem Gewebe einer mit biotrophen Pathogenen infizierten Pflanze im Zusammenhang mit der durch SA vermittelten Antwort. Verschiedene Elizitoren, wie PAMPs, MAMPs oder DAMPs (Pathogen-, Microbe- bzw. Damage Associated Pattern) lösen nicht nur in direkt betroffenen Zellen eine Reaktion aus, sondern führen zu einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR), welche es den nicht primär betroffenen Zellen bei Bedarf erlaubt, schneller und stärker zu reagieren (Conrath *et al.*, 2002; 2006; Conrath 2011). Zwei grundsätzliche Mechanismen werden in Bezug auf die Vorbereitung der Zellen als wichtig erachtet: zum einen kommt es zur Akkumulation von inaktiven Proteinen, wie zum Beispiel „schlafenden“ MAP Kinasen (Beckers *et al.*, 2009), welche erst bei Bedarf aktiviert werden, jedoch nicht mehr synthetisiert werden müssen. Auf der anderen Seite kommt es beim „Priming“ zu Veränderungen in der Chromatinstruktur. Jaskiewicz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch Benzothiadiazol, ein synthetischer Induktor der SAR, eine Änderung im Modifikationsstatus der Histone im Promotorbereich von *WRKY29* induziert wird (Jaskiewicz *et al.*, 2011), dass dieser Coaktivator der SAR aber erst nach einem weiteren Stresstimulus tatsächlich transkribiert wird. Es werden während des „Primings“ also Transkriptions-inhibierende Strukturen gelöst, um bei Bedarf eine schnellere Akkumulation von Transkripten erreichen zu können.

Bei einer Verwundung von Pflanzen werden volatile Substanzen freigesetzt, die in benachbarten unverwundeten Pflanzen einen entsprechenden Alarmzustand auslösen können (Baldwin *et al.*, 2006). Im Zusammenhang mit der Wundreaktion wurde das "Priming" zuerst in Mais von Engelberth und Mitarbeitern beobachtet und beschrieben (Engelberth *et al.*, 2004). Maispflanzen reagieren auf flüchtige Substanzen, die von verwundeten Nachbarpflanzen emittiert werden, mit einer Initialisierung ihrer Abwehrmechanismen. In diesen Pflanzen kommt es zu einer sehr schwachen und transienten Akkumulation von JA. Bei nachfolgender Verwundung oder Insektenbefall sind diese Pflanzen in der Lage, schneller und stärker zu reagieren: sie akkumulierten 30 Minuten nach Verwundung und Behandlung mit Elizitoren von *Spodoptera exigua* etwa doppelt so viel JA (190 ng pro Gramm Frischgewicht) wie die Kontrollpflanzen (96 ng pro Gramm Frischgewicht; Engelberth *et al.*, 2004).

Bereits beim „Priming“ scheint auch der JA-SA-Antagonismus eine Rolle zu spielen. So ändert sich beim „Priming“ für SA-vermittelte Reaktionen nicht nur die Chromatinstruktur in



den Promotoren SA-abhängig transkribierter Gene, sondern auch die in Promotoren, die in Reaktion auf JA aktiviert werden (Tsai *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012).

Sogenannte "Green Leaf Volatiles" (GLVs), eine Mischung aus C6-Alkoholen, -Aldehyden und Estern, die wie die JA nach Verwundung aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet werden, sind als für das „Priming“ verantwortliche Signale identifiziert worden (Engelberth *et al.*, 2004; Engelberth *et al.*, 2007). Ähnlich wie Mais reagieren auch *Nicotiana attenuata* und *Populus* auf flüchtige Signale anderer Pflanzen mit der „Vorbereitung“ auf einen bevorstehenden Insektenbefall (Kessler *et al.*, 2006; Paschold *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2008).

Zu den Genen, deren Expression während des „Priming“ induziert werden, gehört im Mais das Ortholog von OPR3, ein vergleichbar zu einer Wundreaktion erhöhter JA-Spiegel konnte jedoch nicht festgestellt werden (Engelberth *et al.*, 2007). Auch in der Pappel wird ein für eine Oxophytodiensäurereduktase kodierendes Gen durch GLV-Exposition verstärkt exprimiert (Frost *et al.*, 2008). In Tomaten konnte ebenfalls eine Akkumulation des Proteins S_IOPR3 in Reaktion auf GLVs beobachtet werden (Schwörer, 2007). Sollte S_IOPR3 als Dimer und damit in inaktiver Form akkumulieren, könnte dies eine essentielle Rolle für das „Priming“ spielen: Durch die Akkumulation inaktiver S_IOPR3 kommt es nicht zur sofortigen Aktivierung der Abwehrmechanismen, es wird also noch keine JA gebildet. Die Pflanzen wären somit in der Lage, sich für einen eventuellen Befall durch Schädlinge zu rüsten, ohne dabei zunächst unnötige, energieaufwendige Syntheseleistungen zu erbringen.

Im Falle einer späteren Verwundung wären die Kapazitäten für die JA-Bildung und die Aktivierung der Abwehrmechanismen erhöht, die Reaktion würde deutlich schneller und stärker erfolgen können.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die Hypothese, dass das Monomer/Dimer-Gleichgewicht und damit die Aktivität der S_IOPR3 durch reversible Phosphorylierung des Tyrosin an Position 364 (Y364) reguliert wird, ist Ausgangspunkt dieser Arbeit. Nachdem der Nachweis der OPR3-Dimerisierung auch *in vivo* erbracht werden konnte (Sperling, 2012), ergeben sich im wesentlichen vier Fragen:

- a) Welche Rolle spielt die Dimerisierung für die Aktivität von OPR3?
- b) Spielt die Dimerisierung von OPR3 eine Rolle beim „Priming“?
- c) Wie wird die reversible Dimerisierung/Monomerisierung realisiert?
- d) Welche Aminosäuren in OPR3 werden posttranslational modifiziert?



EINLEITUNG

Zu a): Welche Rolle spielt die Dimerisierung für die Aktivität von OPR3?

Um zu klären, ob das Dimer tatsächlich die inaktive Form von OPR3 darstellt, werden in dieser Arbeit die veränderten OPR3-Proteine mit vermindertem Dimerisierungspotential *S*OPR3^{E291K}, *S*OPR3^{Y364F}, *A*tOPR3^{E292K} und *A*tOPR3^{Y365F} (Breithaupt *et al.*, 2006; Sperling, 2012) herangezogen. Bei Expression dieser veränderten Proteine in transgenen Pflanzen würde eine konstitutive JA-Produktion darauf hinweisen, dass OPR3 im aktiven Zustand vorliegt. Dies soll zunächst anhand der Transkriptspiegel JA-induzierbarer Gene ermittelt werden. Ein konstitutiv erhöhter JA- bzw. JA-Derivatspiegel sowie konstitutiv erhöhte Transkriptspiegel JA-abhängiger Gene wären in Pflanzen mit *S*OPR3^{E291K}, *S*OPR3^{Y364F}, *A*tOPR3^{E292K} und *A*tOPR3^{Y365F} im Vergleich zu den Pflanzen mit unveränderter OPR3 zu erwarten.

Zu b): Spielt die Dimerisierung von OPR3 eine Rolle beim „Priming“?

Die Reaktion einer Pflanze auf volatile Substanzen, die von verwundeten Nachbarpflanzen emittiert werden (Engelberth *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2006), ist nicht nur ein sehr faszinierender Vorgang, sondern birgt überdies Potential zur Verstärkung der Widerstandsfähigkeit von Nutzpflanzen. Das „Priming“ im Bezug auf JA-vermittelte Reaktionen ist bisher nur ungenügend verstanden. Eine Rolle für OPR3 in diesem Zusammenhang (Engelberth *et al.*, 2007; Schwörer, 2007) würde eine Akkumulation des Proteins im inaktiven Zustand nahelegen. Diese Annahme soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

Sollte sich OPR3 in Reaktion auf einen „Priming“-Stimulus anreichern, ohne dass es zu einer verstärkten JA-Biosynthese kommt, würden sich die entsprechenden Proben zudem für die Analysen der inaktivierenden Mechanismen anbieten.

Tomatenpflanzen sollen Volatilen verwundeter Tomatenpflanzen ausgesetzt werden. In den Versuchspflanzen soll sowohl die Akkumulation des OPR3-Proteins, als auch die Transkriptspiegel JA- und SA-induzierbarer Gene (Ward *et al.*, 1991; Maleck *et al.*, 2000) bestimmt werden. Des Weiteren soll analysiert werden, ob „Priming“ tatsächlich eine schnellere und stärkere Reaktion auf einen Verwundungsreiz erlaubt (Conrath *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2007).

Zu c): Wie wird die reversible Dimerisierung/Monomerisierung realisiert?

Aufgrund der Kristallstruktur von *S/OPR3* (Breithaupt *et al.*, 2006) wird eine Phosphorylierung des Tyrosin an Position 364 als Dimer-stabilisierende Modifikation postuliert. Da erwartet wird, dass das Dimer die inaktive Form der OPR3 darstellt, sollte diese Tyrosinmodifikation unter physiologischen Bedingungen vorliegen, in welchen keine JA gebildet wird. Dies sollte zum einen in unverwundeten vegetativen Pflanzenteilen der Fall sein (Blechert *et al.*, 1995; Glauser *et al.*, 2008), zum anderen ist auch zu erwarten, dass OPR3 zu einem gewissen Zeitpunkt nach Verwundung wieder inaktiviert werden muss. Auch in Blüten, ganz besonders in Antherenfilamenten, wird in verschiedenen Stadien mehr (im Stadium 12) oder weniger (ab dem Stadium 13) JA benötigt (Hause *et al.*, 2000; Stintzi und Browse, 2000; Park *et al.*, 2002; von Malek *et al.*, 2002). Dies sollte sich im Modifikationszustand der OPR3 widerspiegeln.

Da eine Proteinphosphorylierung, wie nahezu jede posttranslationale Modifikation, den isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins beeinflusst (Zhu *et al.*, 2005), sollen entsprechende Modifikationen von OPR3 mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht werden. Änderungen im Modifikationszustand würden sich hierbei in einer Änderung des Spotmusters äußern (Zhu *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2010).

Zu d): Welche Aminosäuren in OPR3 werden posttranslational modifiziert?

Die posttranslationale Modifikation der OPR3 soll schließlich massenspektrometrisch bestätigt und einem Aminosäurerest zugeordnet werden. Um dies zu ermöglichen, müssen zunächst Methoden entwickelt werden, durch die OPR3 aus einem pflanzlichen Proteinrohextrakt gereinigt werden kann. Hier sollen sowohl Methoden zum Einsatz kommen, die die Isolierung nativer OPR3 ermöglichen (Polyethylenglykolfractionierung, Xi *et al.*, 2006; Immunopräzipitation mit einem gegen das OPR3 Protein gerichteten Antikörper), Methoden zur Reinigung von OPR3-Fusionsproteinen (μ MACS affinity chromatography; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach), als auch solche, die eine Modifikations-spezifische Aufreinigung erlauben (Metalloxid/hydroxid-Affinitätschromatographie; Wolschin *et al.*, 2005; Wolschin und Weckwerth, 2005).