

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



Synthese und Relevanz von Oxylipinen in Blättern, Wurzeln und Samen von
Arabidopsis thaliana

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ayla Önel

geboren in Köln

Würzburg, 2016

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. Susanne Berger

Gutachter: Dr. Rosalia Deeken

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

15-HEDE	15-Hydroxy-Eicosadiensäure
15-KEDE	15-Keto-Eicosadiensäure
Ω	Ohm
ABA	Abscisinsäure
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
BHT	Butylhydroxytoluol
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	Kodierende Sequenz („coding sequence“)
COI1	coronatine-insensitive 1
Col-0	Columbia-0 (Wildtyp)
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnOPDA	dinor-12-Oxophytodiensäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Einstein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Farad
fg	Femtogramm
GUS	β-Glucuronidase-Reportergen
h	Stunde („hour“)
HCl	Salzsäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure

HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPOD	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HPOT	Hydroperoxyoctadecatriensäure
Hz	Hertz
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JAR1	jasmonate-resistant 1
JAZ	Jasmonate ZIM-Domäne
KCl	Kaliumchlorid
KODE	Ketooctadecadiensäure
KOTE	Ketooctadecatriensäure
LC-Wasser	Wasser für qPCR („light cycler“ Wasser)
LOX	Lipoxygenase
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
M-MLV	Moloney Murina Leukemia Virus
mA	Milliampere
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute (“minute”)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometer
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
MW	Mittelwert
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
OH-TG	Oxidiertes Triacylglycerol
OPDA	12-Oxophytodiensäure
OPR3	OPDA-Reduktase 3
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (“rounds per minute”)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde (“second”)
siRNA	small interfering RNA
STABW	Standardabweichung
TBS	Tris-Puffer-Saline (“Tris-buffered saline”)
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
TG(30:0)	Tridecanonylglycerol
TPP	Triphenylphosphin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
WS	Wassilewskija (Wildtyp)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Jasmonsäurebiosynthese.....	3
1.2	Funktionen der Jasmonate	5
1.3	13-Lipoxygenasen	9
1.4	Lipide in Samen.....	10
1.5	Lipoxygenasen und Keimung	11
1.6	Natürliche Samenalterung.....	12
1.7	Künstliche Samenalterung.....	16
1.8	Lipoxygenasen und Samenalterung.....	18
1.9	Zielsetzung	19
2	Material.....	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Kits, Enzyme und Puffer.....	23
2.3	Antibiotika	24
2.4	Primer	24
2.5	Geräte	26
3	Methoden	28
3.1	Pflanzenanzucht.....	28
3.1.1	Lösungen und Medien.....	28
3.1.2	Pflanzenmaterial	30
3.1.3	Auslegen der Samen.....	30
3.1.4	Anzucht der Pflanzen bis zum Ernten	31
3.1.5	Pfropfen der Pflanzen.....	31
3.1.6	Behandlungen der Pflanzen, Wurzellängen sowie Asselfraß.....	32
3.2	Lokalisation	34

3.2.1	GUS Färbung.....	34
3.2.2	Klonierung	35
3.3	Genexpressionsanalysen	42
3.3.1	RNA Isolation	42
3.3.2	Messung von RNA und DNA Konzentrationen mit Hilfe des Nanodrops.....	42
3.3.3	Untersuchung der RNA Integrität	43
3.3.4	DNase Verdau und Ausfällung	44
3.3.5	cDNA Synthese	44
3.3.6	Real Time PCR (Quantitative PCR).....	45
3.4	Samenalterung.....	46
3.4.1	Methode der Samenalterung.....	46
3.4.2	Bestimmung der Keimrate	47
3.4.3	Exogene Applikation von Hydroxy- und Ketofettsäuren.....	47
3.5	Proteinanalysen	48
3.5.1	Herstellung der Proteinextrakte	48
3.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
3.5.3	Western Blot Analyse	50
3.6	Analytische Methoden.....	51
3.6.1	Extraktion von Lipiden.....	51
3.6.2	Hydrolyse von veresterten Lipiden	53
3.6.3	Extraktion von Phytohormonen	53
3.6.4	Quantifizierung von Lipiden	54
3.6.5	Quantifizierung von Hydroxyfettsäuren, Ketofettsäuren und Phytohormonen	56
3.6.6	„Untargeted Analyse“	59
4	Ergebnisse	62
4.1	Etablierung der Samenalterung.....	62

4.2	Oxidierete Fettsäuren in Col-0 und Lipoxygenase Mutanten Samen nach künstlicher Alterung	63
4.2.1	Veresterte oxidierte Fettsäuren nach künstlicher Alterung	63
4.2.2	Hydroxyfettsäuren in Col-0 nach künstlicher Alterung und Hydrolyse	70
4.2.3	Freie Hydroxyfettsäuren in Col-0 und Lipoxygenase Mutanten nach künstlicher Alterung	71
4.3	Exogene Applikation von Hydroxyfettsäuren	78
4.4	Keimraten von Lipoxygenase Mutanten nach künstlicher Alterung	80
4.5	Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimrate und Bildung von oxidierten Fettsäuren in Col-0	83
4.5.1	Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimrate von Col-0	83
4.5.2	Veresterte und freie oxidierte Fettsäuren in Col-0 Samen nach Methyljasmonatbehandlung mit und ohne künstliche Alterung	85
4.6	Lokalisation der Lipoxygenase 6 in Blättern und Wurzeln	91
4.6.1	GUS Färbungen in LOX6pGUS Keimlingen und Erdpflanzen	91
4.6.2	Intrazelluläre Lokalisation von Jasmonsäurebiosyntheseenzymen	94
4.7	Lipoxygenase 6 und Trockentoleranz	96
4.8	Charakterisierung der 35SLOX6 Linien	100
4.8.1	LOX6 Expression der 35SLOX6 Linien	101
4.8.2	Phänotyp der 35SLOX6 Pflanzen	103
4.8.3	Trockentoleranz der 35SLOX6 Pflanzen	106
4.8.4	Keimfähigkeit der 35SLOX6 Linien	107
4.8.5	Toleranz von 35SLOX6 Pflanzen bei Fraßexperimenten mit <i>Porcellio scaber</i> .	108
4.8.6	Wurzellängen von 35SLOX6 Pflanzen	110
4.8.7	Jasmonate in Wurzeln von Col-0, 35SLOX6, <i>lox6</i> und <i>dde2</i>	112
4.8.8	Jasmonate nach Trockenstress und Sorbitolbehandlung	114

4.8.9	Jasmonate nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, <i>lox6</i> und <i>dde2</i>	117
4.8.10	„Untargeted Analyse“ von Metaboliten in Col-0, 35SLOX6 und <i>lox6</i>	120
5	Diskussion	124
5.1	Relevanz und Funktionen der Lipoxygenase 6	124
5.2	Lipoxygenasen und Samenalterung.....	132
5.3	Ausblick.....	141
6	Anhang	146
6.1	Hydroxyfettsäuren in Col-0 nach künstlicher Alterung und Hydrolyse.....	146
6.2	Hydroxyfettsäuren in WS nach künstlicher Alterung und Hydrolyse.....	147
6.3	Keimrate von Col-0 und <i>lox1</i> im Col-0 Hintergrund nach künstlicher Alterung.....	148
6.4	Einfluss von Methyljasmonat auf künstlich gealterte Samen	149
6.5	Vektorkarten.....	150
6.5.1	35SLOX6sGFP.....	150
6.5.2	35SLOX2sGFP.....	151
6.5.3	35SAOSsGFP	152
6.5.4	pDONR201::AOS.....	153
6.5.5	pGemTeasy mit LOX6 Promotor bzw. LOX6-CDS.....	154
6.5.6	pDest17 mit LOX6-CDS	156
6.6	Suszeptibilität von <i>lox6</i> bei Trockenstress.....	157
6.7	Jasmonate nach Verwundung und α -Linolensäurebehandlung in Col-0, 35SLOX6, <i>lox6</i> und <i>dde2</i> Blättern	158
6.8	Hydroxyfettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, <i>lox6</i> und <i>dde2</i> Wurzeln.....	161
6.9	Ketofettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, <i>lox6</i> und <i>dde2</i> Wurzeln.....	166
7	Literaturverzeichnis	168

Zusammenfassung

Die Lipidoxidation kann sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch erfolgen. Der erste Schritt der enzymatischen Oxidation wird durch Lipoxygenasen katalysiert, von welchen es in *Arabidopsis thaliana* sechs verschiedene Isoformen gibt. Dabei werden die Lipoxygenasen nach dem Kohlenstoffatom klassifiziert, welches sie oxidieren. Somit gehören die LOX1 und LOX5 zu den 9-Lipoxygenasen, während LOX2, LOX3, LOX4 und LOX6 zu den 13-Lipoxygenasen zählen. Während der Samenalterung findet vermehrt eine Lipidperoxidation statt, welche mit einem Verfall des Samens sowie einer verringerten Keimrate korreliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst erfolgreich ein System zur künstlichen Samenalterung von *Arabidopsis thaliana* etabliert. Bei der künstlichen Alterung stiegen ähnlich wie bei der natürlichen Samenalterung oxidierte Lipide an und die Keimrate fiel ab. Nach Alterung konnte ein Anstieg von sechs verschiedenen oxidierten Triacylglycerolen detektiert werden. Es konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von Mutanten mit Defekten in mehreren der Lipoxygenase Gene gezeigt werden, dass die Oxidation dieser veresterten Fettsäuren zum größten Teil nicht enzymatisch erfolgt. Bei der Alterung stiegen zudem enzymatisch gebildete 9-Lipoxygenase Produkte wie freie Hydroxy- und Ketofettsäuren an. Bei einer Analyse der freien oxidierten Fettsäuren konnte ebenfalls mit Lipoxygenase Mutanten ermittelt werden, dass diese hauptsächlich via LOX1 oxidiert werden. Die Untersuchung der Keimraten der Lipoxygenase Mutanten nach Alterung zeigte in mehreren Versuchen eine leicht erhöhte Keimrate der *lox1* im Vergleich zum Wildtyp. Eine exogene Behandlung von Wildtyp Samen mit verschiedenen 9-Lipoxygenase Produkten, welche bei der Alterung ansteigen, führte allerdings nicht zu einer Keimungshemmung. Somit scheinen Produkte wie Hydroxy- und Ketofettsäuren der 9-Lipoxygenase LOX1 nicht die Hauptursache für die Keimungshemmung nach Alterung zu sein.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung der Blüten des Wildtyps mit Methyljasmonat zu einer signifikant höheren Keimrate der Samen im Vergleich zu Samen von unbehandelten Pflanzen nach Alterung führt. Ein „Lipidprofiling“ der Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen wies signifikant geringere Gehalte sowohl an freien als auch veresterten oxidierten Fettsäuren auf, was mit einer erhöhten Lebensfähigkeit korrelierte. Diese Erkenntnisse könnten von großer Relevanz für die Landwirtschaft sein, falls eine Übertragung auf Nutzpflanzen möglich ist.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war eine eingehende Untersuchung der Rolle und Funktion der LOX6. Mit Hilfe von GUS Färbungen konnte eine Lokalisation der LOX6 in Blättern und Wurzeln nachgewiesen werden.

Zudem wurde ein 35SLOX6GFP Konstrukt erstellt und in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen stabil transformiert. Mit den selektionierten Linien könnte in Zukunft auch die intrazelluläre Lokalisation der LOX6 untersucht werden. Außerdem wurden Konstrukte mit dem Reporter gen *GFP* und *AOS* sowie *LOX2* hinter dem 35S Promotor kloniert, welche ebenfalls für weitere Lokalisations- und Koloalisationsstudien genutzt werden können. Zudem wurde mit der Klonierung eines Konstruktes begonnen, um in Zukunft einen spezifischen LOX6 Antikörper herstellen und auch die endogene LOX6 Lokalisation in dem Wildtyp analysieren zu können. Um die Produkte der LOX6 zu untersuchen, wurden 35SLOX6 Linien sowie die *lox6* Mutante verwendet. Obwohl Hydroxyfettsäuren und Jasmonate Folgeprodukte der LOX6 sind, wiesen die 35SLOX6 Linien weder basal, noch nach Stress erhöhte Gehalte dieser im Vergleich zum Wildtyp auf. Somit geben die 35SLOX6 Linien einen Hinweis darauf, dass LOX6 im Wildtyp nicht limitierend für die Produktion von Hydroxyfettsäuren und Jasmonaten sein könnte. Um zu untersuchen, ob das Substrat der LOX6 der limitierende Faktor sein könnte, wurde eine Behandlung mit α -Linolensäure durchgeführt. Dabei entstanden allerdings nicht mehr Folgeprodukte der LOX6, sondern es fand sowohl in den 35SLOX6 Linien als auch in dem Wildtyp eine massive nicht enzymatische radikalische Oxidation der Fettsäuren statt. Um festzustellen, ob sich durch eine LOX6 Überexpression das Metabolom ändert, wurde eine „untargeted Analyse“ mit 35SLOX6 Linien durchgeführt. Diese zeigte vier Metabolite, welche in den 35SLOX6 Linien im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich stark vorhanden waren. Einer der Metabolite wurde als Glucobacteroin identifiziert. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Physiologie und Stressresistenz in den Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp unterscheiden. Dabei zeichneten sich die 35SLOX6 Linien durch kleinere, hellere und rundere Blätter aus. Zudem wurden die Wurzeln der 35SLOX6 Linien bei Fraßversuchen mit *Pocellio scaber* im Vergleich zum Wildtyp weniger bevorzugt gefressen. Dabei gilt es noch herauszufinden, wie die veränderte Fraßpräferenz mit dem durch die LOX6 Überexpression veränderten Metabolom zusammenhängt. Diese Erkenntnisse sowie die generierten Konstrukte und Pflanzenlinien können in der Zukunft einen weiteren Einblick in die vielfältigen Funktionen und Produkte der LOX6 gewähren.

Summary

Lipidoxidation can take place enzymatically and non-enzymatically. The first step of the enzymatic oxidation is catalysed via lipoxygenases. In *Arabidopsis thaliana* there are six lipoxygenase isoforms. The lipoxygenases are characterized by the carbon atom they oxidise. LOX1 and LOX5 are 9-lipoxygenases, while LOX2, LOX3, LOX4 and LOX6 are 13-lipoxygenases. During seed ageing lipid peroxidation takes place, which correlates with a deterioration of the seed and a lower germination rate. First, a method for artificial ageing of *Arabidopsis thaliana* seeds was successfully established as a part of this work. During artificial seed ageing, oxidised lipids increased and the germination rate decreased similar to natural ageing. During artificial ageing an accumulation of six oxidised triacylglycerols could be detected. In this work, it could be shown with the help of mutants with defects in the lipoxygenase genes, that the oxidation of esterified fatty acids mainly takes place non-enzymatically. Moreover, enzymatically formed free 9-lipoxygenase products such as hydroxy and keto fatty acids increase during the process of ageing. An analysis of the free fatty acids in lipoxygenase mutants lead to the conclusion that they are formed primarily by LOX1. The *lox1* mutant showed a slightly higher germination rate than the wild type after seed ageing in the majority of the experiments. However, an exogenous treatment of wild type seeds with free 9-lipoxygenase products, which increase during ageing, did not inhibit the germination rate. Therefore, LOX1 (9-lipoxygenase) products like hydroxy and keto fatty acids do not seem to be the main cause for the inhibition of germination after ageing.

In addition, this work shows that a methyl jasmonate treatment of wild type flowers leads to a significant higher germination rate of their seeds after ageing in comparison to the seeds of untreated wild type plants. A lipid profiling revealed significantly lower levels of oxidised esterified as well as free fatty acids after ageing in seeds of treated wild type plants compared to untreated ones, which correlates with a higher germination rate. These findings could be of great value for the agriculture if they are transferable to crop plants.

Another focus of this work was set on investigating the function and relevance of LOX6. The localization of LOX6 in leaves and roots could be confirmed with the help of GUS stainings. Furthermore, a 35SLOX6GFP construct was generated and stably transformed in *Arabidopsis thaliana* plants. With the selected lines it will be possible to investigate the intracellular

localization of LOX6 in the future. Moreover, constructs with the reporter gene *GFP* and *AOS* or *LOX2* were cloned behind the 35S promoter which can also be used for additional localization and co-localization experiments. To analyse the endogenous localization of LOX6 in the wild type, the cloning of a construct was started to generate a specific antibody in the future. To investigate the different products of LOX6, 35SLOX6 lines and the *lox6* mutant were used. Although hydroxy fatty acids and jasmonates are secondary products of LOX6, neither basal nor after different stress treatments elevated levels could be detected in the overexpression lines compared to the wild type. This finding indicates that LOX6 may not be limiting for the production of jasmonates and hydroxy fatty acids in the wild type. Moreover, to investigate if the substrate of LOX6 could be a limiting factor, a treatment with α -linolenic acid was performed. However, this did not lead to more LOX6 secondary products but rather to a massive increase of non-enzymatic radical triggered oxidation of fatty acids in the 35SLOX6 lines as well as in the wild type. To examine whether an overexpression of LOX6 leads to changes in the metabolome, an untargeted analysis with 35SLOX6 lines was performed. This analysis revealed four metabolites, which were present in different amounts in 35SLOX6 lines and the wild type. One of these metabolites was identified as glucoberberoin. Apart from that, the physiology and stress resistance of the 35SLOX6 lines should be investigated for differences compared to the wild type. The overexpression lines exhibited smaller, rounder and paler leaves. In feeding experiments, the roots of 35SLOX6 plants were less attractive to the rough woodlouse *Porcellio scaber* than the wild type. However the connection between the feeding behavior of the rough woodlouse and the changes in the metabolome, due to the LOX6 overexpression, remains an issue of future research. The insights of this work, together with the generated constructs and plant lines could help to gain a better understanding of the versatile functions and products of LOX6 in the future.

1 Einleitung

Lipide besitzen zahlreiche sehr unterschiedliche Funktionen in Pflanzen. So dienen sie vor allem als Speichermoleküle – unter anderem in Samen – und kommen in Zellmembranen zur Stabilisierung – beispielsweise in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten – vor. Mehrfach ungesättigte oxidierte Fettsäuren bezeichnet man als Oxylipine, welche in der Pflanze vielfältige und sehr wichtige Aufgaben übernehmen. Dazu gehören unter anderem die Energiegewinnung, der Abbau von Lipiden und ihre Wirkungsweise als Signalmoleküle. In Form von Signalmolekülen beeinflussen sie in Pflanzen beispielsweise Wurzelwachstum, Blütenentwicklung, Fruchtreifung, Seneszenz und Reaktionen gegenüber abiotischem und biotischem Stress (Wasternack und Hause, 2013). Zu den Oxylipinen gehören Hydroperoxyfettsäuren, Hydroxyfettsäuren, Ketone, Alkohole, Aldehyde, Epoxide, Divinylether, Phytoprostane und die Jasmonate (Mosblech et al., 2009).

Aber auch im Tierreich übernehmen Lipoxygenasen (LOX) wichtige Aufgaben. In Menschen wurden bisher sechs und in Mäusen sieben Isoformen beschrieben (Kuhn et al., 2015). Sie sind beispielsweise wichtig für die Modifikation von Lipid-Protein-Komplexen, die Synthese von bioaktiven Lipidmediatoren sowie für die Regulation des intrazellulären Redox-Status, womit auch die Genexpression und Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung beeinflusst werden (Kuhn et al., 2015). In Tieren dienen als Substrate für die Eicosanoid- und Oxylipinsynthese hauptsächlich Arachidonsäure (C20:4) und Linolsäure (C18:2) (Noverr et al., 2003). Arachidonsäure kann durch eine 5-Lipoxygenase zu Leukotrienen umgewandelt werden (Noverr et al., 2003), welche in Tieren wichtig für die Immunantwort sind (Serhan et al., 2008). Zudem entstehen aus der Arachidonsäure mit Hilfe von entweder 5-Lipoxygenasen und 12-Lipoxygenasen oder 15-Lipoxygenasen und 5-Lipoxygenasen Lipoxine, welche ebenfalls eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielen. Lipoxine wirken dabei entzündungshemmend und regulieren unter anderem die Leukozyten Funktion (Serhan et al., 2008).

Die Oxylipine in Pflanzen werden hauptsächlich aus den Substraten α -Linolensäure (C18:3), Linolsäure (C18:2) und Hexadecatriensäure (C16:3) gebildet (Mosblech et al., 2009). Oxylipine können sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch oxidiert werden (siehe Abbildung 1.1). Nicht enzymatisch geschieht dies durch reaktive Sauerstoff Spezies (ROS),

welche als Radikale oder Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) auftreten können. Die Oxidation findet an der Pentadienyl-Gruppe statt, welche durch fünf Kohlenstoffatome und zwei Doppelbindungen gekennzeichnet ist. Bei der mehrfach ungesättigten Fettsäure α -Linolensäure (C18:3) gibt es zwei solcher Pentadienyl-Gruppen. Somit werden die Kohlenstoffatome 9, 10, 12, 13, 15 und 16 oxidiert. Bei der Linolsäure (C18:2), welche nur eine Pentadienyl-Gruppe besitzt, demnach die Positionen 9, 10, 12 und 13. Nicht enzymatisch können Hydroperoxyfettsäuren, Ketole sowie Phytoprostane entstehen (Berger et al., 2001; Mueller, 2004; Mueller et al., 2006; Mosblech et al., 2009).

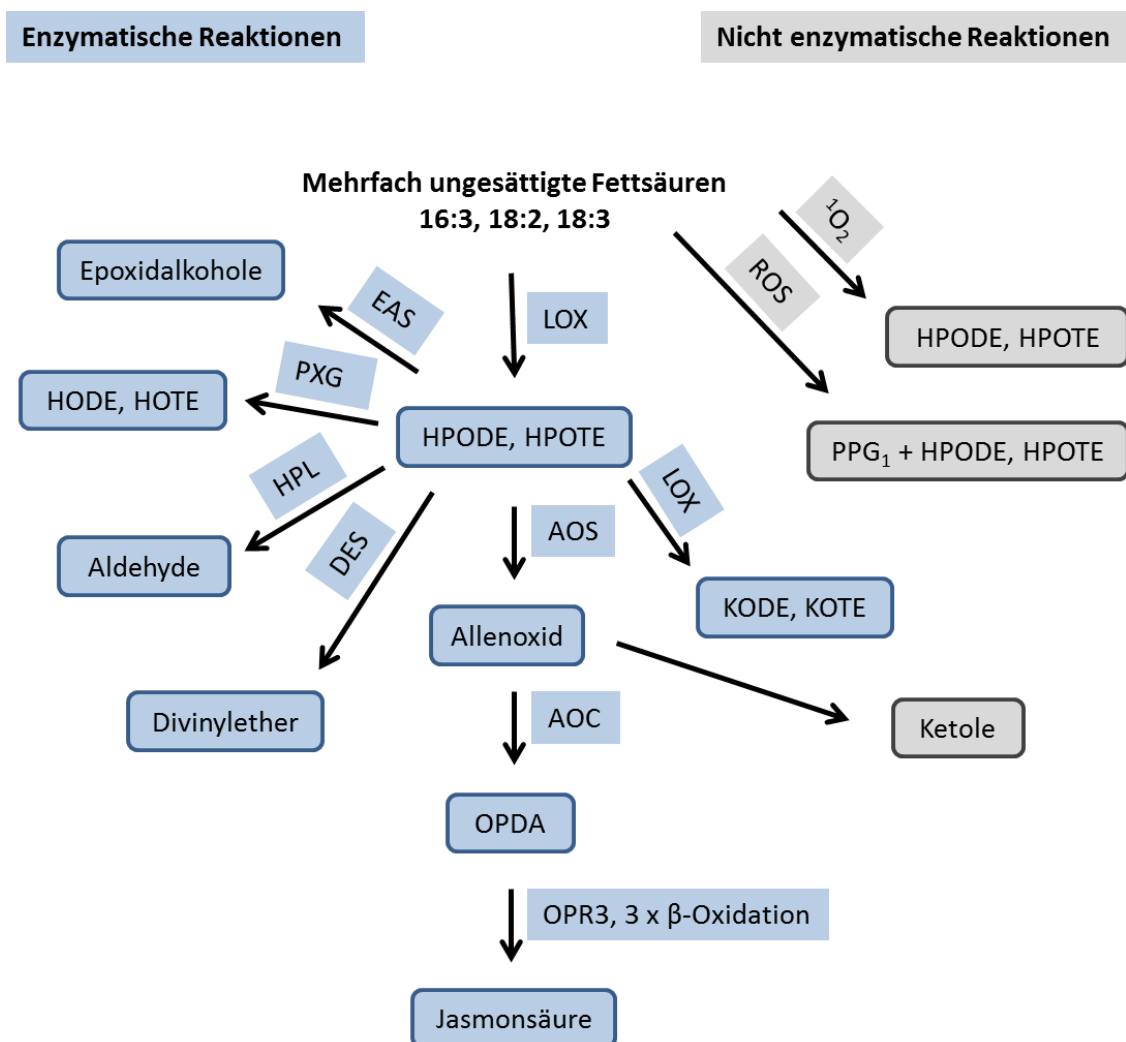


Abbildung 1.1: Enzymatische (hellblau unterlegt) und nicht enzymatische (hellgrau hinterlegt) Reaktionen bei der Synthese von Oxylipinen. Lipoxygenase (LOX), Allenoxidsynthase (AOS), Allenoxidcyclase (AOC), OPDA Reduktase 3 (OPR3), Epoxyalkoholsynthase (EAS), Peroxygenase (PXG), Hydroperoxidlyase (HPL), Divinylethersynthase (DES), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Verändert nach Mosblech et al., 2009.

Bei der enzymatischen Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z. B. α -Linolensäure sind Lipoxygenasen von großer Bedeutung. Sie oxidieren jeweils selektiv und spezifisch nur an einem Kohlenstoffatom. Die Klassifizierung erfolgt nach der Kohlenstoff-Position, an welcher der Sauerstoff angehängt wird (Feussner und Wasternack, 2002). In *Arabidopsis thaliana* gibt es sechs verschiedene Lipoxygenasen. LOX2, LOX3, LOX4 und LOX6 sind Lipoxygenasen, welche nur das 13. Kohlenstoffatom oxidieren (13-Lipoxygenasen), LOX1 und LOX5 dagegen wählen das 9. Kohlenstoffatom (9-Lipoxygenasen) (Bannenberget al., 2009). Auf die unterschiedlichen Aufgaben der 13-Lipoxygenasen in Pflanzen wird in Kapitel 1.3 näher eingegangen. Die 9-LOXen führen zunächst zu der Bildung von Peroxiden, aus denen dann 9-Hydroxyoctadecatriensäure (9-HOTE), 9-Hydroxyoctadecadiensäure (9-HODE), 9-Ketooctadecatriensäure (9-KOTE) und 9-Ketooctadecadiensäure (9-KODE) entstehen. Die 13-LOXen bilden analog zu den 9-LOXen die Produkte 13-HOTE, 13-HODE, 13-KOTE und 13-KODE. Darüber hinaus sind sie für die Bildung der Jasmonate verantwortlich (Caldelari et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Lipoxygenasen im Zusammenhang mit zwei unterschiedlichen Themen untersucht. Zum einen wurde der Zusammenhang zwischen Lipoxygenasen und der Lipidoxidation bei der Samenalterung erforscht. Zum anderen wurde die LOX6, welche eine 13-Lipoxygenase ist, genauer untersucht. Hierbei wurden ihre Produkte, Lokalisation und verschiedene Funktionen in Blättern und Wurzeln betrachtet. Im Folgenden soll zunächst auf die Jasmonsäurebiosynthese (Kapitel 1.1), die Funktionen der Jasmonate (Kapitel 1.2) sowie die 13-Lipoxygenasen (Kapitel 1.3) genauer eingegangen werden. Anschließend werden die Aufgaben der Lipide in Samen (Kapitel 1.4) sowie der Zusammenhang zwischen Lipoxygenasen und der Samenkeimung (Kapitel 1.5) behandelt. Danach wird auf die natürliche und künstliche Samenalterung (Kapitel 1.6 und 1.7) sowie die Rolle der Lipoxygenasen dabei (Kapitel 1.8) eingegangen.

1.1 Jasmonsäurebiosynthese

Jasmonate gehören zu den Oxylipinen und bestehen aus enzymatisch oxidierten 18C und 16C Fettsäuren mit drei Doppelbindungen. Zu der Gruppe der Jasmonate gehören 12-Oxophytodiensäure (OPDA), dinor-12-Oxophytodiensäure (dnOPDA), Jasmonsäure, Jasmonsäure-Isoleucin, Methyljasmonat sowie weitere Derivate (Wasternack und Hause,

2013). Diese Metabolite entstehen bei der Jasmonsäurebiosynthese, welche nun genauer betrachtet werden soll.

Die Jasmonsäurebiosynthese beginnt mit der Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäure α -Linolensäure, welche durch eine 13-Lipoxygenase katalysiert wird. Dabei entsteht 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT), welche mit Hilfe der Allenoxidsynthase (AOS) zu einem instabilen Epoxid (12,13(S)-Epoxylinolensäure) umgesetzt wird. Anschließend wird durch die Allenoxidcyclase (AOC) aus dem Epoxid die OPDA, welche durch die OPDA-Reduktase 3 (OPR3) reduziert wird und nach drei weiteren β -Oxidationsschritten zu Jasmonsäure weiterreagiert (Vick und Zimmermann, 1983; Vick und Zimmermann 1984; Stenzel et al., 2003). Der erste Teil der Jasmonsäurebiosynthese findet in Chloroplasten (und anderen Plastiden) statt. Anschließend wird OPDA in die Peroxysomen transportiert, wo der zweite Teil der Synthese (bis zur Jasmonsäure) stattfindet (Wasternack und Kombrink, 2010). Jasmonsäure ist ein Prohormon, welches anhand eines durch das *jasmonate-resistant 1* (*JAR1*) Gen kodierten Enzymes im Cytosol mit einer Aminosäure konjugiert und in die biologisch aktive Form Jasmonsäure-Isoleucin umgewandelt werden kann (Staswick und Tiryaki, 2004). Jedoch konnte der Transportmechanismus der Jasmonsäure aus dem Peroxysom in das Cytosol noch nicht entschlüsselt werden.

Lange Zeit ging man davon aus, dass der erste Teil der Jasmonsäurebiosynthese nur in Chloroplasten stattfinden würde (Wasternack und Hause, 2000; Delker et al., 2006). Diese These wurde dadurch bekräftigt, dass z. B. für die Biosyntheseenzyme LOX, AOS und AOC eine Lokalisation in Chloroplasten beschrieben wurde (Bell et al., 1995; Feussner und Wasternack, 2002; Schaller et al., 2008). Zudem wird der größte Teil der Jasmonsäure in Blättern produziert (Bell et al., 1995), so dass hauptsächlich Plastiden mit Chlorophyll daran beteiligt zu sein scheinen. Allerdings konnten Grebner et al. (2013) zeigen, dass auch Wurzeln (unabhängig von den Blättern) Jasmonate produzieren können. Somit muss dort der erste Teil der Biosynthese in Wurzelplastiden ablaufen. Wie und wo genau dies in der Wurzel abläuft, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

Jasmonsäure-Isoleucin wirkt bereits bei sehr geringen Konzentrationen und liegt in wesentlich geringeren Konzentrationen als OPDA und Jasmonsäure vor. Zudem gibt es noch weitere Jasmonsäurederivate. Durch die Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase entsteht beispielsweise das flüchtige Methyljasmonat (Gfeller et al., 2010). Des Weiteren wird

12OH-Jasmonsäure-Isoleucin, welches zugleich ein Abbauprodukt des Jasmonsäure-Isoleucins ist, durch eine weitere Hydroxylgruppe an dem 12. Kohlenstoffatom gebildet (Koo et al., 2011).

1.2 Funktionen der Jasmonate

Biologisch aktiv sind neben Jasmonsäure-Isoleucin auch Jasmonsäure-Tryptophan und OPDA sowie dnOPDA. Das Oxylipin dnOPDA entsteht, wenn das Ausgangsprodukt der Jasmonsäurebiosynthese Hexadecatriensäure ist. OPDA wie auch dnOPDA sind unter anderem bei Verwundungsstress in *Arabidopsis thaliana* von Bedeutung (Weber et al., 1997). Zudem kommen beide Jasmonate in Arabidopsiden vor. Arabidopside sind Galaktolipide, in denen eine oder beide Fettsäuren durch OPDA oder dnOPDA ersetzt sind (Böttcher und Pollmann, 2009). Diese Arabidopside werden vermutlich als Substratspeicher genutzt, so dass bei Stress wie z. B. Verwundung schnell große Mengen an OPDA und dnOPDA freigesetzt und zu Jasmonsäure umgewandelt werden können (Turner et al., 2002; Kourtchenko et al., 2007; Wasternack und Kombrink, 2010). Jasmonsäure-Tryptophan spielt in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* eine Rolle und inhibiert die Auxin Signalweiterleitung (Staswick, 2009). Jasmonsäure-Isoleucin scheint sowohl in Blättern als auch in Blüten das wichtigste Signalmolekül zu sein (Fonseca et al., 2009).

Die Jasmonsäure induziert ihre eigene Synthese durch einen „positiven feedback loop“ (Browse, 2009). In Abhängigkeit der Nähe des Gewebes an der Verwundungsstelle ist diese positive Rückkoppelung stärker oder schwächer ausgeprägt (Glauser et al., 2009). Die Signaltransduktion funktioniert wie folgt: Jasmonsäure-Isoleucin bindet an das COI1 Protein (coronatine insensitive 1, sein Rezeptor) und bildet somit einen Teil des SCF Ubiquitin E3 Ligase Komplexes, welcher dann die Jasmonat ZIM-Domäne (JAZ) Proteine ubiquitiniert. Das 26S Proteasom baut die JAZ Proteine, welche als negative Regulatoren fungieren, ab und befreit so die Jasmonsäure responsiven Transkriptionsfaktoren. Dann können Gene wie beispielsweise Jasmonsäurebiosynthesegene und andere Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Die Regulation erfolgt über einen „positiven feedback loop“, was bedeutet, dass die Jasmonate ihre eigene Synthese stimulieren. Um die Jasmonat Signaltransduktion wieder zu beenden, erfolgt wahrscheinlich ein „negativer feedback loop“. Da bei der Jasmonat Signaltransduktion auch JAZ Gene stark exprimiert werden, können die neu hergestellten JAZ

Proteine wieder ihre korrespondierenden Transkriptionsfaktoren hemmen (Browse, 2009; Acosta und Farmer, 2010).

Außerdem wird durch die Produktion der Jasmonsäure die Genexpression von vielen an der Pflanzenabwehr beteiligten Genen induziert. Insgesamt werden über den Jasmonat Signalweg in der Pflanze verschiedene Abwehrstrategien sowohl gegen biotische wie auch abiotische Stressoren induziert. Reymond et al. (2004) zeigten, dass bei einer Analyse von mit Jasmonsäure behandelten Wildtyp und *coi1-1gl1* (*coronatine insensitive1 glabrous1*) Mutanten Pflanzen 67 % - 84 % der durch das Insekt *Pieris rapae* induzierten Gene über den Jasmonat Signalweg gesteuert werden. Darüber hinaus beeinflussen Jasmonate auch das Wachstum von Blättern. Die *fou2* Mutante, welche basal und vor allem nach Verwundung mehr Jasmonsäure aufweist als der Wildtyp, besitzt z. B. kleinere Blätter (Bonaventure et al., 2007).

Auch bei der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen (Kachroo und Kachroo, 2009) sowie bei biotrophen Wurzelpathogenen und Nematoden (Gutjahr und Paszkowski, 2009) sind Jasmonate von großer Bedeutung.

Farmer und Dubugnon (2009) untersuchten den Zusammenhang zwischen Jasmonaten und Detritivoren. Hierfür verwendeten sie die Crustacee *Porcellio scaber* (Kellerassel). Obwohl sie sich normalerweise von abgestorbenem Pflanzenmaterial ernähren, greifen Kellerasseln auch auf intakte Pflanzen zurück, um zu überleben. Die Autoren konnten zeigen, dass Jasmonate die Pflanzen vor dem Fraß der Detritivoren schützen. Die *Arabidopsis thaliana* Mutante *aos* (welche keine Jasmonate besitzt) wurde deutlich schneller von *Porcellio scaber* aufgefressen als die Wildtyp Pflanzen. Die Reis Mutante *hebiba* (auch ohne Jasmonate) wurde von *Porcellio scaber* im Vergleich zu dem Wildtyp ebenfalls klar bevorzugt. Farmer und Dubugnon (2009) postulieren sogar, dass der Jasmonat Signalweg während der Evolution entstanden sein könnte, um die lebenden Pflanzen vor Detritivoren zu schützen.

Zudem sind Jasmonate wichtig bei der durch Insekten und Herbivoren verursachten Verwundung (McConn et al., 1997; Berger et al., 2002). So kann auch ein Anstieg der Jasmonate nach Pathogen- und Herbivorenbefall festgestellt werden (Browse, 2009).

Berger erklärt in ihrem Review 2002, dass Pflanzen allerdings registrieren, ob sie lediglich verwundet sind, oder ob ein Herbivore sie angefressen hat. Dies wird durch Unterschiede in

der Genexpression deutlich, je nachdem ob die Pflanze verwundet oder von Herbivoren befallen wurde (Reymond et al., 2000). Vermutlich liegt dies an Elicitoren, welche in dem Speichel der Insekten vorkommen und von den Pflanzen erkannt werden. Auch diverse Mutanten, wie z. B. die *fad3-2fad7-1fad8* bestätigen den Zusammenhang zwischen Jasmonaten und Herbivoren. Da diese Mutante unter anderem keine Jasmonate enthält, ist sie anfälliger gegenüber der Trauermücke *Bradysia* (McConn et al., 1997). Auch die *coi1* Mutante ist anfälliger als der Wildtyp gegenüber einer Behandlung mit Fraßinsekten (Xie et al., 1998).

Bei der Reaktion auf abiotische Stresse, wie z. B. Trockenstress (Huang et al., 2008; De Domenico et al., 2012), UV-Strahlung (Conconi et al., 1996), Ozon (Rao et al., 2000) sowie osmotischen Stress durch Sorbitol (Lehmann et al., 1995; Kramell et al., 2000; Seltmann et al., 2010) spielen Jasmonate ebenfalls eine große Rolle.

Auch die Generierung von Blüten und Samen ist abhängig von Jasmonaten. Wenn den Pflanzen Jasmonsäure fehlt, sind sie männlich steril und können keine Samen mehr ausbilden. Dies konnte anhand mehrerer Jasmonsäure defizienter Mutanten gezeigt werden. Die *dde2* Mutante (von Malek et al., 2002), welche keine Jasmonate bilden kann, muss ab dem Blütenstadium mit Methyljasmonat besprüht werden, um Samen auszubilden. Die gleiche Auffälligkeit zeigen auch die Jasmonsäure defiziente *dde1/opr3* (Sanders et al., 2000; Stintzi und Browse, 2000) und *fad3-2/fad7-2/fad8* Mutante (McConn und Browse, 1996). Im Einzelnen bewirkt die Jasmonsäure das Ausreifen der Pollen und die Elongation von Stamen Filamenten, so dass die Antheren die Narbe erreichen können. Bei der *dde2* und *fad3-2/fad7-2/fad8* Mutante z. B. funktioniert die Dehiszenz der Pollen in den Antheren nicht, so dass die Pollen nicht auf die Narbe entlassen werden können (McConn und Browse, 1996).

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine exogene Zugabe von Jasmonsäure, Methyljasmonat oder OPDA das Wurzelwachstum hemmt (Yamane et al., 1981; Staswick et al., 1992; Mueller et al., 2008). Diese Erkenntnis wurde für viele Mutanten „Screenings“ herangezogen, so dass mit dieser Methode die erste Jasmonsäure insensitive Mutante *jar1* gefunden werden konnte (Staswick et al., 1992). Die Mutanten *jin1*, *jin4* und *coi1* konnten ebenfalls so ermittelt werden (Feys et al., 1994; Berger et al., 1996). Auch die *cev1* Mutante, welche konstitutiv hohe Jasmonsäure Gehalte aufweist, zeigt ein verkürztes

Wurzelwachstum (Ellis et al., 2002). Darüber hinaus ist im Zusammenhang mit der Ausbildung von Seitenwurzeln einiges über Jasmonsäure bekannt. So produziert die Jasmonsäure insensitive Mutante *coi1-16* weniger Seitenwurzeln. Dazu passt die Erkenntnis, dass an den Stellen an denen neue Seitenwurzeln entstehen, die Promotoraktivität von *AOC3* und *AOC4* sehr hoch ist (Stenzel et al., 2012).

Verwundung ist ein sehr komplexer Stress, da z. B. auch Herbivorenfraß mit Verwundung assoziiert ist und die Verwundungsantwort je nach Verwundungsstress sehr unterschiedlich ausfallen kann (Berger, 2002). Zudem ist die Reaktion auf Verwundung auch in unterschiedlichen Geweben verschieden stark, z. B. ist die Reaktion lokal eine andere als distal. Bei Verwundungsstress in Blättern steigen vor allem die lokalen Jasmonat Gehalte stark an, wobei in systemischen Blättern deutlich geringere Anstiege zu verzeichnen sind (Laudert und Weiler, 1998). Mutanten, bei denen das *LOX2* Gen kaum exprimiert wird, weisen nach Verwundung einen viel geringeren Gehalt (circa 77 % weniger) an Jasmonaten als der Wildtyp auf (Bell et al., 1995). Die Pflanzen zeigen jedoch unter basalen Bedingungen keine Beeinträchtigungen in der Entwicklung und weisen wildtypische Jasmonsäure Spiegel auf. Somit scheint die *LOX2* Expression in diesem Fall nicht limitierend für die Generierung von Jasmonsäure zu sein (Berger, 2002). Auch eine Überexpression des *AOS* Gens führt nur nach Verwundung und nicht basal zu höheren Jasmonsäure Spiegeln (Laudert et al., 2000).

In der Literatur wird zudem der Jasmonsäure teilweise eine Rolle in der Seneszenz zugeschrieben (Wasternack und Hause, 2013), welche aber widerlegt werden konnte. Während der natürlichen Seneszenz sowie einer Behandlung mit längerer Dunkelheit steigen in dem Wildtyp Jasmonate stark an (Seltmann et al., 2010). Trotzdem weisen *LOX2* RNAi Linien, welche keine Jasmonat Gehalte akkumulieren können, keinen Unterschied in dem Chlorophyllabbau zu dem Wildtyp unter natürlicher Seneszenz (sowie einer Behandlung mit Dunkelheit) auf. Zudem fanden sich keine Unterschiede in der Expression des Seneszenz Markers *SAG12* zwischen den *LOX2* RNAi Linien und dem Wildtyp bei natürlicher Alterung. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede in der Seneszenz zwischen dem Wildtyp und Jasmonat defizienten Mutanten gefunden werden. Somit scheinen die bei natürlicher Seneszenz und Dunkelheit akkumulierenden Jasmonate im Wildtyp einem anderen Zweck als der Seneszenz und dem damit einhergehenden Chlorophyllabbau zu dienen (Seltmann et al., 2010).

1.3 13-Lipoxygenasen

Wie bereits beschrieben, katalysieren die 13-Lipoxygenasen den ersten Schritt der Jasmonsäurebiosynthese. Die vier 13-Lipoxygenasen in *Arabidopsis thaliana* besitzen vielfältige und unterschiedliche Funktionen, da sie neben den Jasmonaten auch für die Entstehung von anderen Produkten verantwortlich sind.

Es ist schon länger bekannt, dass LOX2 für den größten Teil der Bildung von Jasmonsäure in Blättern nach Stress verantwortlich ist (Bell et al., 1995). Dies geschieht insbesondere lokal nach Verwundungs- und Sorbitolstress (Seltmann et al., 2010). LOX2 ist in den Blättern bereits basal stark exprimiert und wird z. B. bei Verwundung induziert, in den Wurzeln ist LOX2 jedoch kaum exprimiert (Grebner et al., 2013). LOX2 ist zudem die einzige LOX, für die gezeigt werden konnte, dass sie nicht nur freie, sondern auch veresterte Fettsäuren oxidieren kann (Zoeller et al., 2012). Sie ist außerdem für die Generierung von OPDA und Arabidopsiden in Blättern von *Arabidopsis thaliana* wichtig (Glauser et al., 2009; Seltmann et al., 2010; Zoeller et al., 2012).

LOX6 dagegen ist in den Blättern nur gering exprimiert und die Expression steigt bei Verwundung kaum an (Grebner et al., 2013). Trotzdem ist LOX6 sehr wichtig für eine extrem schnelle Bildung von Jasmonsäure in distalen und verwundeten Blättern (Chauvin et al., 2013). Bereits 190 Sekunden nach Verwundung sind die Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin Gehalte in dem Wildtyp (sowie in *lox2*, *lox3* und *lox4*) in distalen Blättern signifikant höher als in der *lox6* Mutante. Dies kann auch in den verwundeten Blättern nach 190 Sekunden beobachtet werden (Chauvin et al., 2013). Von den 13-Lipoxygenasen wird in Wurzeln die LOX6 basal am stärksten exprimiert. Obwohl die LOX6 Expression nach Verwundungsstress nur wenig ansteigt, ist LOX6 alleine für die Jasmonsäurebildung verantwortlich (Grebner et al., 2013). Zudem konnten Grebner et al. zeigen, dass LOX6 für die basalen OPDA Gehalte sowohl in Blättern als auch in Wurzeln notwendig ist. LOX3 und LOX4 sind wichtig für die Blütenentwicklung. Da sie in ihren Funktionen größtenteils redundant sind, wird die *lox3/4* Doppelmutante für die meisten Studien verwendet. Die *lox3/4* ist männlich steril und kann keine Samen ausbilden (Caldelari et al., 2011). Die *lox2* und *lox6* Mutanten dagegen sind fertil, so dass LOX2 und LOX6 bei der Blütenentwicklung und Fertilität keine Rolle spielen. In Blättern sind LOX3 und LOX4 basal kaum exprimiert, ihre Expression steigt aber nach Verwundung stark an. Sie

tragen in Blättern zu der Jasmonsäureproduktion nach Verwundung bei. In den Wurzeln sind sie kaum exprimiert, werden aber nach Verwundung stärker induziert als LOX6 (vor allem LOX4) (Grebner et al., 2013). Trotzdem spielen sie für die Generierung von Jasmonsäure nach Verwundung in den Wurzeln keine Rolle. Es wurde allerdings kürzlich herausgefunden, dass LOX3 und LOX4 wichtig für die Abwehr gegenüber Wurzelneematoden sind (Ozalvo et al., 2014). In dieser Publikation wird auch deutlich, dass LOX3 und LOX4 durchaus verschiedene Funktionen haben können und nicht immer redundant sind, da z. B. *lox4* Mutanten viel suszeptibler gegenüber einer Nematoden Infektion (*Heterodera schachtii*) waren als der Wildtyp und *lox3*.

1.4 Lipide in Samen

Samen dienen Pflanzen zur Verbreitung, sie müssen deshalb gut vor Umwelteinflüssen geschützt werden und sollten alle wichtigen Metabolite enthalten, um später zum richtigen Zeitpunkt an einer günstigen Stelle keimen und eine neue Pflanze ausbilden zu können. Dabei gibt es unterschiedliche Strategien wie die Reserven in Samen gespeichert werden können. Es gibt Pflanzen wie Reis oder Weizen, welche Stärke als Speicher verwenden. Zudem existieren die sogenannten Ölsamen, welche vorwiegend Fette als Speicher besitzen wie beispielsweise Soja, Erdnüsse, Leinsamen, Raps oder Sonnenblumen. Auch *Arabidopsis thaliana* zählt zu der Gruppe der Ölsamen ausbildenden Pflanzen.

Die in den Ölsamen gespeicherten Lipide bestehen hauptsächlich aus Triacylglycerolen (Ohlrogge und Browse, 1995). Diese Triacylglycerole werden in sogenannten Ölkörpern gespeichert, welche intrazellulär vorliegen (Huang, 1996). Die Triacylglycerole, welche die innere Matrix der Ölkörper bilden, werden dabei von einer Schicht aus Phospholipiden umhüllt. Im Verhältnis haben diese Ölkörper sehr große Oberflächen. Dies hilft Lipasen vermutlich dabei, besser an die Oberflächen binden zu können und bringt Vorteile bei der Lipolyse während der Keimung. Für die Stabilität sorgen Oleosine, welche sich auf der Oberfläche der Ölkörper befinden und diese auch durchdringen. In Brassicacean, zu denen auch *Arabidopsis thaliana* gehört, bestehen 8 % der gesamten Samenproteine aus Oleosinen (Huang, 1996). Hergestellt werden die Ölkörper an dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch einen Knospungsprozess und auch die Triacylglycerole werden im ER synthetisiert und dann abgesondert (Huang, 1992).

Die Speicherlipide Triacylglycerole können bei der Keimung durch Enzyme aktiviert werden. Dabei hydrolysieren Lipasen die Triacylglycerole zu Glycerol und Fettsäuren, welche dann beispielsweise durch Lipoxygenasen oxidiert werden können. Somit wird dem keimenden Samen Energie zum Wachstum bereitgestellt (Angelo und Ory, 1983). An der Degradation der Lipide sind hauptsächlich Lipasen und Lipoxygenasen beteiligt, worauf allerdings in Kapitel 1.5 weiter eingegangen werden soll.

1.5 Lipoxygenasen und Keimung

Doch wie genau beeinflussen die Lipoxygenasen die Keimung der Samen, bzw. was ist ihre Rolle in diesem Prozess? Feussner et al. diskutieren 2001 in ihrem Review den Zusammenhang zwischen Lipoxygenasen und dem Abbau von Speicherlipiden in Samen. In Ölsamen ist der Prozess der Keimung durch die Mobilisierung von Speicherlipiden charakterisiert, welche für das Wachstum des Keimlings eine wichtige Kohlenstoffquelle darstellen. Während der Keimung kommt es zu einer Degradation dieser Ölkörper und es finden sich nun neben den Strukturproteinen Oleosin und Caloleosin auch andere Proteine an der Phospholipidschicht. Unter diesen Proteinen sind 13-Lipoxygenasen, Phospholipasen und Triacylglycerollipasen. Die 13-Lipoxygenasen können auch ohne vorherige Hydrolyse durch eine Lipase veresterte mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidieren (Feussner et al., 2001). Dies führt zu einem starken Anstieg an Hydroperoxiden in den Speicherlipiden. Diese Hydroperoxide werden dann vermutlich von den Ölkörpern entlassen, um β -oxidiert zu werden. Somit wären die 13-Lipoxygenasen für eine Mobilisierung der Speicherlipide verantwortlich. Zunächst geht die Integrität der Membranen der Lipidkörper verloren. Dafür könnte es zwei Ursachen geben: Zum einen die proteolytische Verdauung von Oleosinen, was die Speicherlipide vor der Degradation schützen könnte, bis sie zur Keimung gebraucht werden. Zum anderen die Degradation der Phospholipidschicht dieses Organells durch eine Phospholipase. Dies bleibt allerdings noch zu untersuchen. Jedenfalls wären somit die gespeicherten Triacylglycerole für die 13-Lipoxygenasen verfügbar und könnten oxidiert werden. Anschließend werden die oxidierten Fettsäuren abgespalten (Feussner et al., 2001). Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass in vielen Samen (wie z. B.: Gurke, Kürbis, Sonnenblume, Leinsamen, Ringelblume, Vernonien) die Lipase nur oxidierte Fettsäuren abspaltet (Adlercreutz et al., 1997; Balkenhohl et al., 1998). Von dem ersten Tag der Keimung an sinkt der Gehalt an Linolsäure in den Speicherlipiden, was mit einem vermehrten Auftreten der Lipoxygenase Proteine an der Lipidkörpermembran einhergeht.

Gleichzeitig gibt es einen transienten Anstieg an 13-Hydroperoxyoctadecadiensäure (13-HPOD) in den Speicherlipiden. Einen Tag später ist ein transienter Anstieg an freiem 13-HPOD in den Geweben der Keimlinge zu finden, da die oxidierten Fettsäuren abgespalten und freigesetzt wurden. Dann werden die freien 13-HPOD reduziert. Diese spezielle 13-Lipoxygenase scheint die Fettsäuren zu markieren, damit sie abgebaut werden. So kann die Pflanze zwischen dem normal vorkommenden Lipidumsatz und dem Lipidabbau, welcher für den keimungsspezifischen Lipidabbau gedacht ist, unterscheiden (Feussner et al., 2001).

1.6 Natürliche Samenalterung

Jeweils 1 % weniger Feuchtigkeit oder 5 - 6 °C weniger Hitze kann die Lebensdauer eines Samens verdoppeln (Harrington, 1972). In der Natur können neben dem Wassergehalt der pH-Wert der Erde, Salz- und Sauerstoffgehalt, Licht, Toxine sowie Mikroorganismen (Bewley und Black, 1994) und die Temperatur oder Hypoxie (Corbineau, 2012) den Samen beeinflussen und altern lassen. Darüber hinaus kamen Arc et al. (2011) zu dem Schluss, dass Samen sehr unterschiedlich auf äußere Einflüsse reagieren und somit die Genetik auch eine starke Rolle spielt.

Wenn ein Samen allerdings nicht nach einer bestimmten Zeit keimt und für eine längere Zeit lagert und altert, verliert er weiter an Wasser und trocknet aus. In einem trockenen Samen können durch Autoxidation Radikale generiert werden, welche die mehrfach ungesättigten Lipide oxidieren. Dies kann letztendlich zu zellulären Schäden an Mitochondrien, Enzymen, Membranen sowie der DNA führen (McDonald, 1999). Dabei treten während der Alterung am häufigsten Lipidperoxidation, Enzyminaktivierung, Proteindegradation sowie DNA Schäden aufgrund von oxidativem Stress durch ROS auf (Bailly, 2004; Moller et al., 2007).

Die ROS können aus exogenen und endogenen Quellen stammen. Ultraviolettes Licht, ionisierende Strahlung und Umweltgifte sind Beispiele für exogene Quellen, während Mitochondrien, Peroxisomen und Lipoxygenasen endogen ROS herstellen (Finkel und Holbrook, 2000). Wichtig ist, dass die Menge der ROS in einem Gleichgewicht bleibt, da sowohl eine zu hohe als auch eine zu geringe Menge zu Schäden führen kann (siehe Abbildung 1.2).

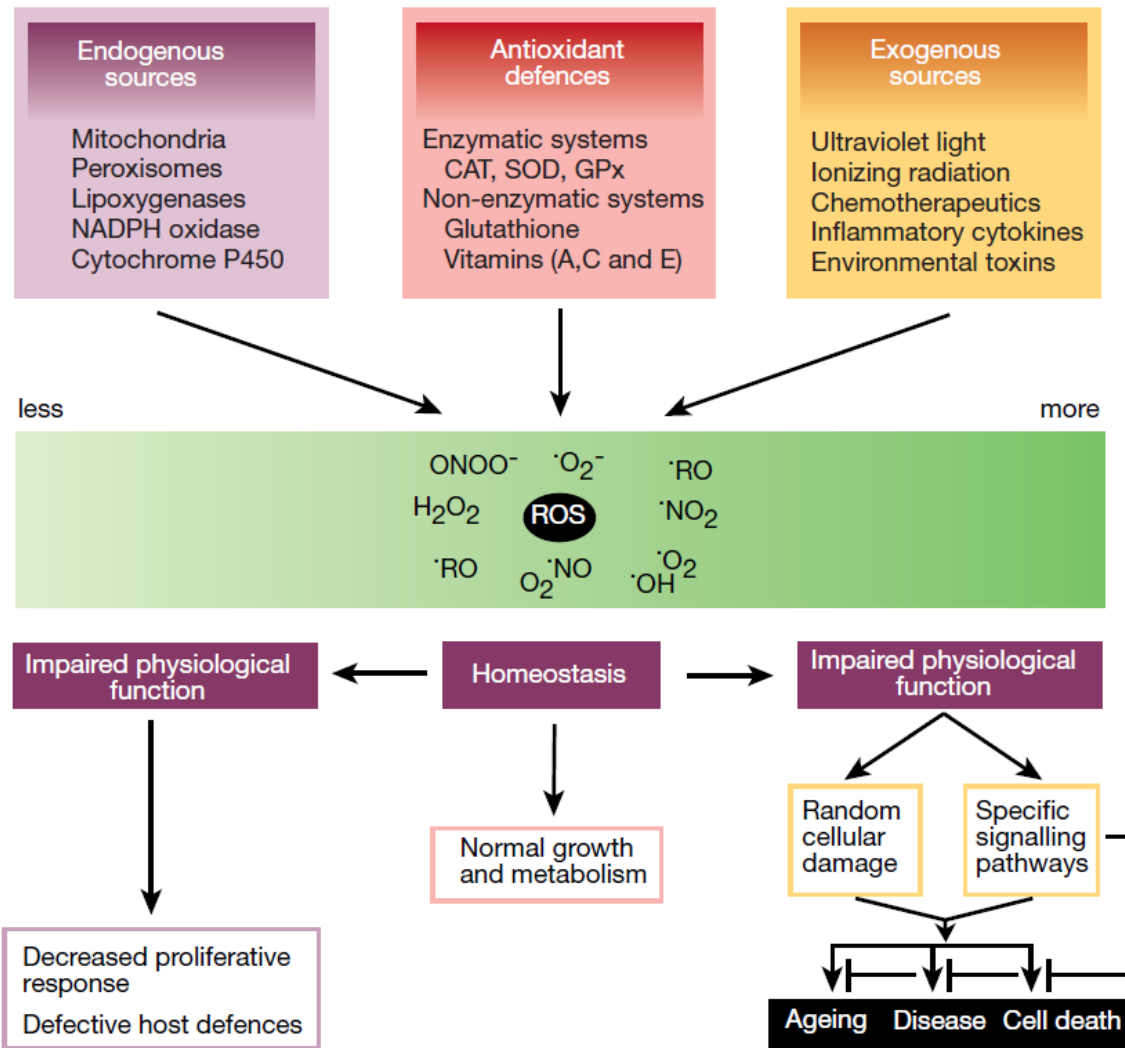


Abbildung 1.2: Quellen von ROS und Reaktionen darauf auf zellulärer Ebene. Katalase (CAT), Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GPx). Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature](#) (Finkel and Holbrook, 2000), copyright (2016).

Darauf soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Bei einem aeroben Metabolismus werden zwangsläufig ROS wie Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Hydrogenperoxid (H_2O_2) gebildet. Dabei sind die größten Ursachen für ROS in Pflanzenzellen die mitochondriale Atmungskette (Moller, 2001) sowie die Photosynthese (Triantaphylidès et al., 2008). In nicht photosynthetisch aktiven Geweben in *Arabidopsis thaliana*, wurde die nicht enzymatische Lipidperoxidation fast ausschließlich durch freie Radikale katalysiert. In Blättern war Singulett-Sauerstoff für mehr als 80 % der nicht enzymatischen Lipidperoxidationen verantwortlich (Triantaphylidès et al., 2008).

Während der Embryogenese findet eine starke Atmung statt, welche dann aber während der Austrocknungsphase wieder stark zurückgeht, bis sie bei den quieszenten Samen ganz

eingestellt wird (Bewley und Black, 1994). Bei der Keimung, welche mit einer Hydrierung einhergeht, nehmen die Atmung und damit auch ROS wieder stark zu (Bailly, 2004). Aber auch die Peroxysomen bilden ROS in nicht quieszenten Samen (Bailly, 2004).

Die Lipidautoxidation scheint bei einem Wassergehalt unter 6 % am stärksten an der Alterung der Samen beteiligt zu sein. Über 14 % kann durch den erhöhten Wassergehalt durch Lipoxygenasen vermittelte Lipidperoxidation stattfinden. Zwischen 6 % und 14 % Wassergehalt erreicht die Lipidperoxidation ein Minimum. Es ist einerseits genug Wasser vorhanden, um als Puffer gegen die autoxidativen Angriffe freier Radikale zu wirken, aber andererseits nicht genug Wasser vorhanden, um eine durch Lipoxygenasen vermittelte freie Radikalproduktion zu induzieren (McDonald, 1999).

Die häufigsten ROS sind Superoxidanionen, Hydrogenperoxid, Singulett-Sauerstoff und Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$). Dabei sind die Hydroxyl-Radikale die reaktivsten Sauerstoff-Radikale. Zudem können Hydrogenperoxide mit Superoxidanionen reagieren und somit Hydroxyl-Radikale ausbilden (McDonald, 1999). Die Akkumulation dieser ROS kann sehr schädlich für die Zelle sein, da vor allem Hydroxyl-Radikale nicht enzymatisch eliminiert werden können (Bailly, 2004). In diesem Zusammenhang wurde besonders die Lipidperoxidation untersucht. Durch freie Radikale können mehrfach ungesättigte Fettsäuren mittels einer Kettenreaktion oxidiert werden, was zu einer Schädigung der Fettsäuren führt. Dies geschieht nicht nur mit den Fettsäuren in den Membranen, sondern auch mit den gespeicherten Lipiden der Ölsamen (Bailly, 2004). Aber auch Proteine sowie DNA können durch ROS beschädigt werden (Beckman und Ames, 1997). Dabei greift das Hydroxyl-Radikal direkt die Desoxyribose, Purine und Pyrimidine in der DNA im Nukleus und in den Organellen an (Breen und Murphy, 1995). Zudem können Enzyme durch ROS geschädigt werden, wenn an dem aktiven Zentrum sitzende Aminosäuren degradiert werden. Das Hydroxyl-Radikal scheint auch in Bezug auf Proteine am reaktivsten zu sein, da es viele verschiedene Aminosäuren angreifen kann (Bailly, 2004). Durch ROS können neben Enzymen auch Transportproteine, Rezeptoren sowie Ionenkanäle beschädigt werden, was ebenfalls zu einer zellulären Funktionsstörung führt (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Jedoch haben ROS ebenso gute Eigenschaften. So dienen sie als Signalmoleküle und spielen bei vielen Stressantworten eine wichtige Rolle. Beispielsweise gibt es bei vielen Interaktionen von Pflanzen und Pathogenen eine Korrelation zwischen dem oxidativem Burst

(„oxidative burst“) und der hypersensitiven Reaktion (Mehdy, 1994). Besonders Hydrogenperoxid scheint eine wichtige Rolle dabei zu spielen. So kann es durch seinen Einfluss auf die Zellwandstruktur Pathogene in den Zellen einschließen, in welchen schließlich die hypersensitive Reaktion stattfinden soll (Tenhaken et al., 1995). Darüber hinaus kann Hydrogenperoxid die Expression von Abwehrgenen induzieren wie die Glutathion-S-Transferase, die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (Lamb und Dixon, 1997; Bolwell, 1999) sowie die Glutathion-Peroxidase (Tenhaken et al., 1995). Triantaphylidès et al. (2008) publizierten ebenfalls, dass ROS als Signalmoleküle dienen, allerdings auch Zellschäden durch oxidierte zelluläre Komponenten wie beispielsweise Lipide provozieren können.

Ein besonders wichtiger Gegenspieler der ROS sind die Antioxidantien. Sie können ROS eliminieren oder auch die ROS Konzentration kontrollieren, um Signalwege zu regulieren (Bailly, 2004). Die Antioxidantien können sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch wirken. Enzymatische Systeme sind beispielweise die Katalase, die Superoxid-Dismutase und die Glutathion-Peroxidase. Dabei kann die Superoxid-Dismutase z. B. Superoxid-Radikale in Hydrogenperoxid und Sauerstoff spalten (Bowler et al., 1992) und Hydrogenperoxide werden durch die Katalase eliminiert (Willekens et al., 1995). Nicht enzymatische Antioxidantien sind vor allem Vitamine (A, C und E) sowie Glutathion (Finkel und Holbrook, 2000). Wenn der trockene Samen über die Umgebung Wasser aufnehmen kann, kommt es auch zu einer enzymatischen Generierung von freien Radikalen. Diesem Prozess können allerdings ebenfalls Antioxidantien entgegenwirken. Die Dauer der Lagerung ist schließlich entscheidend für die Keimfähigkeit des Samens. Wird diese zu lange, sind die zellulären Schäden schließlich so gravierend, dass der Samen nicht mehr lebensfähig ist (McDonald, 1999). Die Antioxidantien α -Tokopherol, Flavonoide, Phenole, Ascorbate und reduzierte Glutathione steigen bei der Quellung und Keimung der Samen an, um den Schäden durch ROS entgegenzuwirken (Bailly, 2004). Sattler et al. (2004) untersuchten die Rolle des Vitamins E als ein Antioxidans. Tokopherole, zu denen Vitamin E gehört, sind lipophile Antioxidantien. Sie werden von allen Pflanzen produziert und kommen gehäuft in Samen vor. Sattler et al. isolierten zwei Vitamin E Loci (*VTE1* und *VTE2*) in *Arabidopsis thaliana*. Die entsprechenden KO-Mutanten zeigten einen Verlust von Tokopherol in allen Geweben. Auch nur eine Mutation an einem Locus führte bereits zu einer verkürzten Lebensdauer der Samen verglichen mit dem Wildtyp. Vitamin E scheint zudem sehr wichtig

für die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit während der Ruhephase des Samens zu sein. Die *vte2* Mutante beispielsweise zeigte starke Defekte im Wachstum des Keimlings und enthielt bis zu vier- bzw. 100-fach höhere Gehalte von Lipidhydroperoxiden bzw. Hydroxyfettsäuren im Vergleich zum Wildtyp. Eine Hauptaufgabe der Tokopherole in Pflanzen scheint zu sein, die nicht enzymatische Lipidoxidation während der Samenlagerung, -keimung und dem Anfang der Keimlingsentwicklung zu limitieren. Dies erklärt auch die evolutionsbiologische Konservierung dieses Biosyntheseweges (Sattler et al., 2004). Auch Stratton und Liebler publizierten 1997, dass α -Tokopherol ein sehr effektives Antioxidans ist, welches radikalische Kettenreaktionen abbrechen kann. Allerdings postulieren sie, dass β -Caroten, welches ein Singulett-Sauerstoff Quencher ist, noch 100-fach effektiver wirkt als α -Tokopherol (Foote, 1979). Klar ist, dass Pflanzen über viele effektive Methoden verfügen, um sich – zumindest unter bestimmten Bedingungen für einige Zeit – vor Lipidoxidation im Samen zu schützen.

1.7 Künstliche Samenalterung

In der Natur ist eine Langlebigkeit bei Samen von großem Vorteil, da sie längere Perioden ohne gute Keimungsbedingungen überdauern und dann auskeimen können, wenn ein günstiger Zeitpunkt erreicht ist. In Laborversuchen wird sich zu Nutze gemacht, dass schlechte Lagerbedingungen wie zu hohe Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit zu einem erhöhten oxidativen Stress und einer verringerten Keimrate führen. Somit kann eine künstliche Alterung der Samen hervorgerufen werden, ohne Samen für mehrere Jahre altern zu müssen. In der Literatur gibt es viele Beispiele für die künstliche Samenalterung. Schon im Jahre 1973 hoben Delouche und Baskin die Bedeutung der Samenlagerung in der Landwirtschaft hervor. Sie publizierten eine Methode für die künstliche Alterung, um die Lagerungsfähigkeit von Samenchargen von viel genutzten Nahrungsmitteln (z. B. Zwiebeln, Sojabohnen, Bohnen, Mais, Rettich, Salat, Wassermelonen und Weizen) zu untersuchen. Dabei erklären sie, dass die aktuelle Keimrate keine gute Auskunft darüber gibt, ob die Samenchargen in den nächsten Jahren gut lagerfähig sein werden. Deshalb halten sie es für sinnvoller, verschiedene Samenchargen künstlich zu altern und anschließend die Charge für die Lagerung auszuwählen, welche nach der Alterung die beste Keimrate zeigt. Die Lagerfähigkeit von Samenchargen kann sehr stark variieren, je nachdem welchen Umwelteinflüssen die Pflanzen bei der Reifung der Samen ausgesetzt waren. Delouche und Baskin verwendeten für die künstliche Alterung entweder härtere Bedingungen wie 40 °C -

45 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit für zwei bis acht Tage oder eine sanftere Methode mit 30 °C und 75 % für zwei Wochen bis zu sechs Monaten. Ihre zahlreichen Untersuchungen zeigen für die meisten Samen eine starke Korrelation zwischen der künstlichen und der natürlichen Alterung (die stärkste Korrelation zeigten Wassermelone, Weizen und Wiesenlieschgras). Je härter die Konditionen für die künstliche Alterung waren, desto stärker korrelierten sie mit auf natürliche Weise länger (drei Jahre) gealterten Samen. Waren die Parameter für die künstliche Alterung sanfter, zeigte sich eine stärkere Korrelation zu den unter natürlichen Bedingungen kürzer (sechs - zwölf Monate) gelagerten Samen.

Über die Jahre haben viele Wissenschaftler die Reaktion von landwirtschaftlich genutzten Samen auf die künstliche Alterung untersucht. Dabei ist es wichtig für die jeweiligen Samen die richtigen Parameter zu finden. Allerdings haben sich die zwei Parameter „hohe Temperatur“ und „hohe Luftfeuchtigkeit“ durchgesetzt. Bailly et al. (1996) alterten beispielsweise Sonnenblumensamen (*Helianthus annuus L.*), wobei sie 45 °C mit verschiedenen Luftfeuchtigkeiten kombinierten. Die Samen waren dabei länger lebensfähig, je niedriger die gewählte Luftfeuchtigkeit war. Je mehr Wasser sich in den Samen befand, desto schädlicher war die gewählte Temperatur. Außerdem stellten sie fest, dass bei der künstlichen Alterung Malondialdehyd akkumuliert, was ebenfalls darauf hinweist, dass der Verfall des Samens mit Lipidperoxidation zusammenhängt. Zudem wurde herausgefunden, dass sowohl die Superoxid-Dismutase, Katalase sowie die Glutathion-Reduktase weniger aktiv waren, je weniger lebensfähig die Samen waren (Bailly et al., 1996).

Hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen Samenalterung und Lipidperoxidation gibt es in der Literatur weitere Erkenntnisse. So wurde herausgefunden, dass die *Arabidopsis thaliana* Doppelmutante AtTILxAtCHL, welcher zwei Lipokaline (ein temperaturinduziertes Lipokalin und ein Chloroplasten Lipokalin) fehlen, sehr sensitiv auf Temperatur, Licht- und Trockenstress reagiert und zudem eine starke Lipidperoxidation aufweist (Boca et al., 2014). Lipokaline sind somit wichtig, um Lipidperoxidation vorzubeugen. Die Samen dieser Doppelmutante reagieren darüber hinaus mit einer verminderten Keimrate – sowohl auf natürliche als auch auf künstliche Alterung, was mit einer Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren einhergeht (Boca et al., 2014).

Das Quellen und die Keimung sind kritische Prozesse bei gelagerten Samen. Hierbei werden durch ROS Akkumulation entstandene zelluläre Dysfunktionen sichtbar. Bei dem Quellen

werden freie Radikale frei, welche während der Lagerung in den Zellen eingeschlossen waren. Zudem werden durch die Wiederaufnahme des Metabolismus neue ROS generiert. Die Zellen sind dann oxidativem Stress ausgesetzt, dessen Stärke davon abhängt, wie die Samen gelagert wurden (Bailly, 2004). Wenn lange gelagerte Samen noch lebensfähig sind und lediglich eine längere Keimungsdauer aufweisen, deutet dies darauf hin, dass die Zellen längere Zeit benötigten, bis die Antioxidantien wieder ausreichend vorhanden und aktiv waren, um dem oxidativen Stress entgegenzuwirken (Bailly et al., 1998; Bailly et al., 2002). Wenn ein Samen schließlich unter günstigen Bedingungen aus der Dormanz ausbrechen und keimen möchte, findet dies laut Corbineau (2012) in drei Phasen statt: Zunächst nimmt der Samen Wasser auf und quillt. Sobald der Wassergehalt im Samen 40 % - 50 % überschreitet, folgt eine Plateauphase. Schließlich erfolgen eine weitere Wasseraufnahme und die Elongation der Radikula (Bewley und Black, 1994; Bewley, 1997).

1.8 Lipoxygenasen und Samenalterung

Entgegen der langjährig vertretenen Meinung, dass Lipoxygenasen nur in Samen von Hülsenfrüchten und Getreiden vorkommen, ist heute bekannt, dass Lipoxygenasen in sehr vielen Samenspezies, wie z. B. Soja, Erdnuss, Kichererbse, Linse, Gerste, Mais, Erbsen, Reis, Bohnen und auch *Arabidopsis thaliana* Samen (Loiseau et al., 2001) vorkommen.

In Reis ist eine 9-Lipoxygenase wesentlich an der Samenkeimung beteiligt. Huang et al. (2014) fanden heraus, dass die Expression von *OsLOX2* in Reis während der Keimung stark induziert wird. Das *OsLOX2* Protein ist am Zytoplasma lokalisiert und weist eine Substratpräferenz für Linolsäure auf. Die Autoren konnten zeigen, dass bei einer *OsLOX2* Überexpression die Samen unter normalen Bedingungen schneller keimen. Nach künstlicher Alterung wiesen die Samen allerdings eine geringere Lebensfähigkeit auf. RNAi Linien dagegen zeigten eine verspätete Keimung unter normalen Bedingungen und eine bessere Samenlanglebigkeit nach Alterung. Allerdings zeigten RNAi Linien mit einer sehr starken Reprimierung der *OsLOX2* Aktivität einen kompletten Verlust der Keimfähigkeit nach künstlicher Alterung. Dies zeigt, dass zumindest eine geringe Menge an *OsLOX2* für die Keimung erforderlich ist, aber zu viel *OsLOX2* bei der Samenalterung zu einer geringeren Keimrate führt. In den Überexprimierern fanden sich zudem mehr Lipidhydroperoxide als in der Kontrolle. Die RNAi Linien wiesen im Vergleich zum Wildtyp weniger Lipidhydroperoxide auf.

Auch Gayen et al. (2014) führten Experimente mit Reissamen durch, in denen die *OsLOX* Genaktivität mit Hilfe von RNAi Linien herunterreguliert wurde. Nach künstlicher Alterung wurde festgestellt, dass auch hier im Vergleich zum Wildtyp der Verfall der Samen durch die Alterung geringer und die Keimrate höher war. Mit Hilfe von GC-MS konnte außerdem gezeigt werden, dass die Degradation von Fettsäuren in den RNAi Linien geringer war als im Wildtyp.

1.9 Zielsetzung

Für die sechs Lipoxygenasen in *Arabidopsis thaliana* konnten bisher einige unterschiedliche, wichtige Funktionen ermittelt werden. Da ihre Synthese und Relevanz vor allem in Geweben wie den Wurzeln und Samen wenig erforscht ist, sollte in dieser Arbeit die Beteiligung aller Lipoxygenasen in der Samenalterung und speziell die Produkte und Relevanz der LOX6 in Wurzeln genauer untersucht werden.

Die Lagerfähigkeit und Langlebigkeit von Samen ist für die Landwirtschaft von großer Bedeutung. Auch in der Wissenschaft wird die künstliche Samenalterung genutzt, um Vorhersagen über die Lagerfähigkeit eines Samens treffen zu können und die der Alterung zu Grunde liegenden Prozesse besser zu verstehen. Zunächst musste für diese Versuche eine Methode zur künstlichen Samenalterung erfolgreich etabliert werden. Hierbei sollte nach einigen Tagen eine deutliche Minderung der Keimrate im Wildtyp zu beobachten sein. Die Alterung in den Samen korreliert mit einer erhöhten Lipidperoxidation. In diesem Zusammenhang sollte mit Hilfe von Mutanten mit Defekten in den Lipoxygenase Genen untersucht werden, ob dabei mehr enzymatische oder nicht enzymatische Prozesse beteiligt sind. Bei einer enzymatischen Reaktion sollte weiterhin mit den Lipoxygenase Mutanten untersucht werden, ob und welche Lipoxygenasen bei der künstlichen Samenalterung in *Arabidopsis thaliana* eine Rolle spielen. Hierfür sollten verschiedene Lipoxygenase Mutanten künstlich gealtert werden, um ein „Lipid-Profiling“ durchzuführen und die Keimraten zu untersuchen. Während der Alterung hemmen möglicherweise ansteigende freie Lipoxygenase Produkte (wie Hydroxy- oder Ketofettsäuren) endogen die Keimung. Deshalb sollten Wildtyp Samen mit diesen Produkten behandelt werden, um einen exogenen Effekt zu untersuchen.

Für die LOX6 wurde bereits gezeigt, dass sie in Wurzeln von den 13-Lipoxygenasen basal am stärksten exprimiert wird und für die Generierung von OPDA und Jasmonsäure wichtig ist.

Um zu untersuchen, welche anderen LOX6 Produkte gebildet werden, sollten mit Hilfe einer „untargeted Analyse“ 35SLOX6 Linien sowie die *lox6* Mutante analysiert werden. Dabei sollten auch speziell Hydroxy- und Ketofettsäuren sowohl basal als auch nach verschiedenen Stressen untersucht werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass LOX6 wichtig für die Trockentoleranz ist. Deshalb sollte anhand der 35SLOX6 Linien der Einfluss der LOX6 auf die Trockentoleranz aber auch die Wurzellänge, Blattphysiologie sowie das Fraßverhalten von Asseln ermittelt werden.

Die Lokalisation der Lipoxygenasen ist bisher hauptsächlich in Blättern untersucht worden. Während in den Blättern von einer Lokalisation in den Chloroplasten ausgegangen wird, ist sie in den Wurzeln weniger gut analysiert. In dieser Arbeit sollten deshalb Fluoreszenz-Konstrukte erstellt werden, um in Zukunft die intrazelluläre Lokalisation der LOX2 sowie LOX6 in den Wurzeln zu ermitteln. Zudem sollte ein Konstrukt kloniert werden, welches als Ausgangspunkt für die Herstellung eines spezifischen LOX6 Antikörpers benötigt wird, um zukünftig auch die intrazelluläre LOX6 Lokalisation in dem Wildtyp untersuchen zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt
[¹⁸O]₂-oxo-Phytodiensäure	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
15-Hydroxy-Eicosadiensäure (15-HEDE)	Cayman Chemical, Cayman Islands
15-Keto-Eicosadiensäure (15-KEDE)	Cayman Chemical, Cayman Islands
ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Scientific, Dreieich
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid (30 %)	AppliChem, Darmstadt
Agar (bacteriology grade)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumacetat (NH₄·CH₃COOH)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat (NH₄H₂PO₄)	Merck, Darmstadt
Ammoniumnitrat (NH₄NO₃)	AppliChem, Darmstadt
Beefextrakt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumcarbonat (CaCO₃)	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat-Tetrahydrat (CA(NO₃)₂·4H₂O)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat (Co(NO₃)₂·6H₂O)	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dihydrojasmonsäure	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Eisensulfat-Heptahydrat (FeSO₄·7H₂O)	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolute Molecular biology grade)	AppliChem, Darmstadt

MATERIAL

Ethanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glykogen	Fermentas, St. Leon-Roth
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt (BioChemica)	AppliChem, Darmstadt
HPLC-Wasser	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	PEQLAB, Erlangen
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumnitrat (KNO₃)	AppliChem, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (CuSO₄·5H₂O)	Merck, Darmstadt
Jasmonsäure-Norvalin	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumsulfat (MgSO₄)	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO₄·7H₂O)	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Biosolve, Valkenswaard, NL
Methyljasmonat	Aldrich, Taufkirchen
Murashige und Skoog Medium (MS-Medium) (Basal Salt Mixture)	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Myo-Inositol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt

MATERIAL

Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorid (NaOCl)	AppliChem, Darmstadt
Phytoagar	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Saccharose	Südzucker International, Ochsenfurt
Silwet L-77	LEHLE SEEDS, Round Rock, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Tridecanonylglycerol (TG30:0)	Larodan, Solna, SWE
TrifastTM Trizol	PEQLAB, Erlangen
Triphenylphosphin (TPP)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Trypton (BioChemica)	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
X-Gluc	Thermo Scientific, Dreieich
X-Ray Entwickler XL 24	Kodak, Stuttgart
X-Ray Fixierer AL 4	Kodak, Stuttgart
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO₄·7H₂O)	Roth, Karlsruhe

2.2 Kits, Enzyme und Puffer

Tab. 2.2: Verwendete Kits, Enzyme und Puffer.

Enzyme	Firma
Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Scientific, Dreieich
DNase I	Fermentas, St. Leon-Roth
Dnase Puffer Dnase I + MgCl₂ (10x)	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP Set (molecular biology grade)	Thermo Scientific, Dreieich
GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Dreieich
LR-Clonase[®] II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl₂; 25 mM)	Thermo Scientific, Dreieich
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus,	Promega, Mannheim

MATERIAL

Point Mutant

M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega, Mannheim
NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure Kit	Macherey und Nagel, Düren
PageRuler[™] Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
peqGOLD TriFast[™]	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Phusion[®] DNA-Polymerase (2 U/μl)	Thermo Scientific, Dreieich
Phusion[®] HF-Puffer (5x)	Thermo Scientific, Dreieich
PolydT₂₇Primer (100 mM)	TIB Molbiol, Berlin
TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Roth

2.3 Antibiotika

Tab. 2.3: Verwendete Antibiotika mit Konzentration, Lösemittel und Firma.

Enzyme	Konzentration [mg/ml]	Lösemittel	Firma
Ampicillin	100	Wasser	Duchefa, Haarlem, NL
Gentamycin	15	Wasser	AppliChem, Darmstadt
Hygromycin	40	Wasser	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	50	Wasser	Roth, Karlsruhe
Rifampicin	50	DMSO	Duchefa, Haarlem, NL
Spectinomycin	100	Wasser	Duchefa, Haarlem, NL

2.4 Primer

Tab. 2.4: LOX6 und SAND Primer für qPCR (5' → 3').

Gen	Primersequenz forward	Primersequenz reverse
LOX6	AAGACTGTTACTGCGGTTG	GGDTGTGAATACGAGGTATC
SAND	AACTCTATGCAGCATT	GGTGGTACTAGCACAA

MATERIAL

Tab. 2.5: Primer für die Klonierung des Konstruktes für einen LOX6 Antikörper (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGCTGTGATCAGCCGTGAAG
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAATGGAAATGCTGTTGGG

Tab. 2.6: Primer für die Klonierung des 35SLOX6sGFP Konstruktes (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTCGTAGCATCTCCG
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAATGGAAATGCTGTTGGG

Tab. 2.7: Primer für die Klonierung des LOX6sGFP Konstruktes mit endogenem Promotor (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACATGAATCTATCGGTTTG
intra rev	CATCTGATCACAGCTCGAACCT
intra fwd	CATCTGATCAGCCGTGAAGAAAA
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAATGGAAATGCTGTTGGG

Tab. 2.8: Primer für die Klonierung des 35SLOX2sGFP Konstruktes (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTATTGTAGAGAGTCC
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAATAGAAATACTATAAGGAA

Tab. 2.9: Primer für die Klonierung des LOX2sGFP Konstruktes mit endogenem Promotor (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATATGTGGAACAGCGTTA
intra rev	TACTGACGTCCAGCGGAGATCG
intra fwd	TACTGACGTGAAACAACCTGC
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAATAGAAATACTATAAGGAA

Tab. 2.10: Primer für die Klonierung des 35SAOSsGFP Konstruktes (5' → 3').

attb1 fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCTTCTATTTCAACC
attb2 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAAGCTAGCTTTCCTTAA

2.5 Geräte

Tab. 2.11: Verwendete Geräte mit Firma.

Geräte	Bezeichnung und Firma
Absorptionsmessung	NANODROP 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific, USA; Software: ND-1000 V3.5.2 MRX _{TC} Revelation, Dynex Technologies, Berlin
Analysenwaage	BP211D und Laborwaage 1600 Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 5075ELV New York, USA
Durchmischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
Geldokumentation	UV-Systeme INTAS GelCapture, Ahmedabad, India
Gefriertrocknung	CHRIST ALPHA 2-4 B. Braun, Pumpe: CIT Alcatel 2004 A, Osterode
Heizblock	Thermo Stat Plus, Eppendorf, Hamburg
Hydrokulturkisten	Kiste (EF 2120), Deckel (EF D21), SSI Schäfer, Neunkirchen/Siegerland
Klimaschränke	AR-36L3 und AR-36L, Percival Scientific, USA
Gefrierschrank -20 °C	Gefrierschrank -20 °C Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Gefrierschrank -80 °C New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kugelmühle	MM 400 Retsch, Haan
Massenspektrometer (MS)	Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer Waters, Micromass, Milford, USA
PCR-Geräte	Mastercycler ep realplex S, Eppendorf, Hamburg CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter	HI 9321 microprocessor pH Meter, Hanna

MATERIAL

	Instruments, Kehl am Rhein
Reinstwasseranlage	RiOs Water Purification System, Millipore, Schwalbach
Rotationsvakuumkonzentrator	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 und RVC 2-25 Heraeus-Christ, Osterode mit Membranvakuumpumpe MZ 2C Vakuubrand, Wertheim
Scanner	Scan Maker 9800 XL Microtek, Hsincu, Taiwan
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex TK52 Bandelin, Berlin
Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatograph (UPLC)	Acquity™ Ultra Performance LC, Waters Micromass, Milford, USA
Querstromsterilbank	Ceag Envirco, Dortmund

3 Methoden

3.1 Pflanzenanzucht

3.1.1 Lösungen und Medien

Medium für Hydrokulturen (Tocquin et al., 2003)

Tab. 3.1: Stocklösung 1, 1:1000 verwendet.

Chemikalie	Konzentration	Menge
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,4 mM	62 mg
EDTA	22,3 mM	446 μl

ad 10 ml ddH₂O

Tab. 3.2: Stocklösung 2, 1:500 verwendet.

Chemikalie	Konzentration	Menge
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,505 M	23,85 g
KNO_3	2,55 M	51,56 g

ad 200 ml ddH₂O

Tab. 3.3: Stocklösung 3, 1:1000 verwendet.

Chemikalie	Konzentration	Menge
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,13 M	1,49 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,498 M	12,27 g

ad 100 ml ddH₂O

METHODEN

Tab. 3.4: Spurenelemente, 1:1000 verwendet.

Chemikalie	Konzentration	Menge
H ₃ BO ₃	9,68 mM	598,51 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,03 mM	401,76 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,314 mM	90,29 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,21 mM	52,43 mg
MoO ₃	0,193 mM	20 mg
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	85,9 µM	25 mg
NH ₄ NO ₃	29,3 mM	2345,17 mg

ad 1000 ml ddH₂O

Es wurden jeweils 10 ml von Stocklösung 1, Stocklösung 3 und den Spurenelementen sowie 20 ml von Stocklösung 2 verwendet. Das Medium wurde anschließend autoklaviert.

Hydrokulturagar

Für Hydrokulturagar wurden jeweils 2 g Phytoagar (Duchefa Biochemie) pro 200 ml Hydrokulturmedium verwendet. Der Hydrokulturagar wurde ebenfalls autoklaviert und anschließend für Kisten zum Auslegen der Samen verwendet.

Tab. 3.5: MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962).

Chemikalie	Menge pro Liter
MS Salt (+MES Buffer)	4,8 g
Vitamin B5	1 ml
β-Inositol	100 mg
Saccharose	30 g (= 3 %)

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxidlösung (1 M) auf 5,7 eingestellt und es wurden 5 g Phytoagar pro 500 ml verwendet.

3.1.2 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp Pflanzenmaterial stammt von den *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia-0 (Col-0) und Wassilewskija (WS). Die 13-Lipoxygenase Mutanten *lox2* (Glauser et al., 2009), *lox3/4*, *lox6*, *lox6B* (Caldelari et al., 2011) und *lox2/3/4/6* (im Col-0 Hintergrund) sowie die 9-Lipoxygenase Mutanten *lox1-1*, *lox5-1* und *lox1-1/5-1* (im WS Hintergrund) wurden freundlicherweise von Edward Farmer, Universität Lausanne, zur Verfügung gestellt. Zudem wurde für ein Experiment eine *lox1* Mutante (SALK_000058) im Col-0 Hintergrund verwendet (siehe Anhang 6.3 Abbildung 6.3). Des Weiteren wurde die *dde2* Mutante (von Malek et al., 2002) verwendet, welche freundlicherweise von B. Keller zur Verfügung gestellt wurde. Die 35SLOX6 Überexpressionslinien wurden von der ehemaligen Doktorandin Wiebke Grebner hergestellt.

3.1.3 Auslegen der Samen

Sterilisieren der Samen

Auf jedes Reaktionsgefäß mit Samen wurde zunächst 1 ml 70 %iges Ethanol pipettiert. Nach 2 min wurde das Ethanol abgenommen und jeweils 1 ml Bleichlösung hinzugegeben. Die Bleichlösung wurde nach 10 min abgenommen und es folgten 5 Waschschrte mit jeweils 1 ml sterilem ddH₂O.

Tab. 3.6: Herstellung der Bleichlösung.

Chemikalie	Menge
NaOCl (13 %)	10 ml
ddH ₂ O	5 ml
Tween 20 (10 %)	10 µl

Auslegen der Samen (in Kisten)

Offene 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden in den Samenkisten mit Hydrokulturagar befüllt und mit jeweils 2 Samen bestückt. Die Samen in den Kisten wurden in einem Klimaschrank (Percival) bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht) kultiviert. Die Anzucht bei Kurztagbedingungen ist wichtig, damit die Pflanzen möglichst viele Blätter bilden und keine Blühinduktion angeregt wird.

3.1.4 Anzucht der Pflanzen bis zum Ernten

Umsetzen der Pflanzen (nach 2 Wochen)

Die 2 Wochen alten Pflanzen wurden in Kisten mit Hydrokulturmedium umgesetzt. Hierfür wurden die Kisten mit jeweils 11 Falkons und 60 ml Medium je Pflanze unter der Sterilbank vorbereitet. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße aus den Samenkisten unten abgeschnitten und in die Kisten gestellt, so dass ihr unteres Ende in das Hydrokulturmedium hineinragte. Die Wurzeln konnten somit in das Falcon mit dem Medium hineinwachsen. Die Kisten mit den Pflanzen wurden in dem Percival bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht) kultiviert.

Pikieren der Pflanzen (nach 3 Wochen)

Die 3 Wochen alten Pflanzen wurden nun pikiert, was bedeutet, dass jeweils eine von zwei Pflanzen aus den Reaktionsgefäßen mit der Wurzel herausgezogen wurde, damit die verbleibende Pflanze genügend Platz zum Wachsen hatte.

Nachfüllen des Mediums (nach 5 Wochen)

Das Medium für die Hydrokulturen wurde nach 5 Wochen nachgefüllt. Die Pflanzen wurden hochgehoben, das Medium aufgefüllt und eventuell verschimmelte Pflanzen und Falkons entfernt. Die durch entfernte Pflanzen entstandenen Löcher wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt, so dass kein Licht an die Wurzeln gelangen konnte.

Ernten der Pflanzen (nach 6 Wochen)

Nach 6 Wochen wurden die Pflanzen geerntet. Dafür wurden jeweils 3 bis 6 Pflanzen genommen und auf einem Papiertuch abgetropft. Die Pflanzen wurden direkt unter den Blättern und unter dem Reaktionsgefäß abgeschnitten, so dass das Hypokotyl verworfen wurde. Bei den Kontrollpflanzen wurden die Blätter sofort in Alufolie gewickelt, die Wurzeln in 15 ml Falkons gegeben und beides in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.5 Pfropfen der Pflanzen

Flüssig sterilisierte Samen wurden zunächst auf MS-Agarplatten mit 1,5 % Saccharose ausgelegt. Bei diesen Platten wurde im oberen sowie im mittleren Bereich jeweils ein Streifen des Agars entfernt, so dass die Samen nahe der Schnittkante ausgelegt werden

konnten. Die Platten wurden aufrecht in ein Regal mit Dauerlicht (42 μE Lichtintensität) gestellt, so dass die Wurzeln nach unten und die Blätter nach oben in den Agar freien Luftraum wachsen konnten. Zusätzlich wurden die mit Parafilm verschlossenen MS-Agarplatten mit Zellstoff abgedeckt. Hierdurch wurde die Lichteinstrahlung gemindert (24 μE Lichtintensität) und die Keimlinge wiesen längere Hypokotyle auf, welche sich besser zum Pfropfen eignen. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge auf MS-Agarplatten mit 1,5 % Saccharose mit einer Rasierklinge am Hypokotyl durchtrennt und auf MS-Agarplatten mit 0,5 % Saccharose unter einem Binokular mit Hilfe von Federstahlpinzetten gepfropft. Bei diesen Platten wurde zuvor in einem Zick-zack Muster im oberen Bereich Agar entfernt (damit die Blätter im oberen Bereich Platz zum Wachsen hatten) und pro Platte 5 Pflanzen (jeweils eine pro Zacken) gepfropft. Diese Platten wurden mit Parafilm verschlossen und erneut mit Zellstoff abgedeckt aufrecht unter Dauerlicht (24 μE Lichtintensität) gestellt. Nach weiteren 7 Tagen wurde überprüft, ob die Pflanzen zusammengewachsen waren. Hierfür wurde mit einer Federstahlpinzette leicht an den Blättern und Wurzeln gezogen, um zu testen, ob die Schnittstellen richtig miteinander verwachsen waren. Anschließend wurden eventuell vorhandene Seitenwurzeln aus dem Hypokotyl oberhalb der Pfropfungsstelle mit einer Pinzette entfernt. Für Trockenexperimente wurden die erfolgreich gepfropften Keimlinge direkt in Erde überführt. Für Hydrokulturexperimente wurden sie für weitere 10 Tage auf Platten mit MS-Agar ohne Saccharose (ebenfalls mit Zick-zack Muster im Agar) im Percival bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht, 80 μE Lichtintensität) weiter wachsen gelassen, wobei die Platten im unteren Bereich mit Parafilm und im oberen Bereich mit Leukopor (für einen besseren Gasaustausch) verschlossen wurden. Schließlich wurden die gepfropften Keimlinge in 50 ml Falkons gefüllt mit Hydrokulturmedium umgesetzt.

3.1.6 Behandlungen der Pflanzen, Wurzellängen sowie Asselfraß

Methyljasmonat (Erdpflanzen)

Die Pflanzen wurden ab dem Zeitpunkt der Blüte 3 mal pro Woche mit 1,38 mM Methyljasmonatlösung besprüht. Für die Methyljasmonatlösung wurden 60 μl verdünntes Methyljasmonat (24 μl 95 %iges Methyljasmonat + 216 μl 100 %iges Ethanol) in 20 ml ddH₂O mit 0,1 % Tween 20 gegeben.

Die Hydrokulturpflanzen (sowohl basal als auch behandelt) wurden beim Ernten jeweils unterhalb und oberhalb des Hypokotyls durchtrennt und die Blätter und Wurzeln separat in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Verwundung (Hydrokulturpflanzen)

Die 6 Wochen alten Pflanzen wurden mit einer Pinzette verwundet. Dabei wurde jedes Blatt 1 mal über die Mittelrippe gequetscht und jede Wurzel 5 mal. Die Blätter und Wurzeln inkubierten für 30 min bei RT, wobei die Wurzeln im Dunkeln lagen. Danach wurden sie sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Sorbitol (Hydrokulturpflanzen)

Die 6 Wochen alten Pflanzen wurden für 8 h mit 500 mM Sorbitol gelöst in ddH₂O und die basalen Proben nur mit ddH₂O behandelt. Die basalen und die behandelten Pflanzen wurden danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Trockenstress (Hydrokulturpflanzen)

Den 6 Wochen alten Pflanzen wurde das Hydrokulturmedium entzogen, indem ihre Falkons ausgeschüttet und die Wurzeln wieder in den leeren Falkons in Kisten platziert wurden. Nach einer Inkubation von 48 h wurden sie zusammen mit den basalen Proben geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

α -Linolensäure (Hydrokulturpflanzen)

In das Medium der 6 Wochen alten Pflanzen wurde für 2 h α -Linolensäure gelöst in Methanol hinzugefügt, so dass eine Endkonzentration von 50 μ M erreicht wurde. Für die Kontrollen wurde Methanol zu dem Medium mit einer Endkonzentration von 0,1 % gegeben. Die basalen und behandelten Pflanzen wurden danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Trockenstress (Erdpflanzen)

Vor dem Beginn der Trocknungsphase wurden 4 Wochen alte Erdpflanzen (angezogen mit Standard Anzuchterde), welche in Klimakammern (Kurztagbedingungen, 9 h Licht, 20 °C) angezogen wurden, stark gewässert und 16 h später das überschüssige Wasser abgegossen.

Somit wurde gewährleistet, dass alle Pflanzen gleich viel Wasser aufgesogen hatten. Anschließend wurden die Pflanzen trocknen gelassen und nach deutlichen Welkesymptomen (nach circa 3 Wochen) erneut gegossen. Die Pflanzen befanden sich in durchmischter Reihenfolge in großen Schalen (à 40 Pflanzen), welche alle 2 Tage gedreht wurden. Die Überlebensrate wurde 48 h nach dem erneuten Wässern bestimmt.

Bestimmung der Wurzellänge

Für die Messung der Wurzellänge wurden zunächst sterile Samen auf viereckigen MS-Agarplatten ohne Saccharose ausgelegt. Hierbei wurden auf jeder Platte Samen von allen Genotypen verwendet. Die mit Parafilm verschlossenen Platten wurden anschließend aufrecht in den Percival bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht) gestellt und ab Tag 7 eingescannt. Die Wurzeln auf den Bildern wurden mit Hilfe des Programmes „Agnes Roots Tool“ ausgemessen und in Excel ausgewertet.

Asselfraßversuche (Hydrokulturlpflanzen)

Für die Fraßversuche wurden kleine Kisten zu circa 1/3 mit Erde und jeweils 10 Kellerasseln (*Porcellio scaber*) befüllt. Nach einer Aushungerungsphase von 3 Tagen wurden in den Kisten entweder Blätter (jeweils 10 von jedem Genotyp) oder Wurzeln (jeweils 3 von jedem Genotyp) von Hydrokulturlpflanzen zu den Asseln gelegt. Die Kisten wurden mit einem Deckel verschlossen und zusätzlich mit einem Tuch bedeckt, um möglichst viel Licht auszuschließen. Das Fraßverhalten der Asseln wurde jeden Tag mit der Kamera festgehalten.

3.2 Lokalisation

3.2.1 GUS Färbung

Für die β -Glucuronidase-Reportergen (GUS) Färbung wurden die Keimlinge zunächst in 50 ml Falkons mit 90 %igem, -20 °C kaltem Aceton gegeben. Danach wurde eine Vakuuminfiltration (3 mal 1 min) in einem Exsikkator durchgeführt. Für die Fixierung verblieben die Keimlinge mit dem Aceton für 1 h bei -20 °C. Anschließend wurden die Pflanzen 2 mal (erst 1 min, dann 10 min) mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen. Dann wurden 10 ml X-Gluc-Lösung (für 60 ml 0,0312g X-Glucuro Pulver in 200 μ l DMF lösen und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7 auffüllen) zu den Keimlingen gegeben und es erfolgte erneut eine Vakuuminfiltration (3

mal 1 min) im Exsikkator. Anschließend wurden die Falkons mit den Keimlingen bei 37 °C inkubiert, bis eine blaue Färbung zu sehen war. Um die Reaktion abzustoppen wurden die Keimlinge mit 70 %igem Ethanol 2 mal (erst 1 min, dann 10 min) gewaschen und anschließend ebenfalls in 70 %igem Ethanol über Nacht bei Raumtemperatur (RT) entfärbt. Bei der Entfärbung wird das Chlorophyll entfernt, so dass die blaue Färbung besser zu erkennen ist. Am nächsten Tag wurden die Keimlinge mit Phosphatpuffer kurz gewaschen und anschließend in einer Petrischale unter dem Binokular betrachtet und fotografiert.

3.2.2 Klonierung

3.2.2.1 Lösungen und Medien

Tab. 3.7: Herstellung des SOC-Mediums.

Chemikalie	Menge pro Liter
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
1 M KCl	2,5 ml
1 M MgCl ₂	10 ml
1 M MgSO ₄	10 ml
1 M Glucose	20 ml

Es wurden alle Substanzen außer der Glucose eingewogen und mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt sowie autoklaviert. Die Glucose wurde in Form einer steril filtrierten 1 M Lösung dem Medium unter sterilen Bedingungen zugegeben.

Tab. 3.8: Herstellung von LB-Medium und LB-Agarplatten.

Chemikalie	Menge pro Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

METHODEN

Die Bestandteile wurden eingewogen, mit ddH₂O auf einen Liter aufgefüllt, ein pH-Wert von 7 eingestellt sowie autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/Liter Agar (bacteriology grade) hinzugefügt.

Tab. 3.9: Herstellung von YEB-Medium und YEB-Agarplatten.

Chemikalie	Menge pro Liter
Trypton	5 g
Hefeextrakt	1 g
Beefextrakt	5 g
Saccharose	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,49 g

Alle Bestandteile außer MgSO₄·7H₂O wurden eingewogen, mit ddH₂O auf einen Liter aufgefüllt, ein pH-Wert von 7,2 eingestellt sowie autoklaviert. Das MgSO₄·7H₂O wurde separat hergestellt, autoklaviert und vor der Verwendung des YEB-Mediums unter sterilen Bedingungen hinzugefügt (2 ml pro Liter). Für die Herstellung von YEB-Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/Liter Agar (bacteriology grade) hinzugefügt.

3.2.2.2 Klonierung der Reportergerkonstrukte

Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Gateway Systems. Dabei sollten folgende in der Tabelle 3.10 dargestellten Konstrukte erstellt werden.

Tab. 3.10: Reportergerkonstrukte mit starkem Promotor (sGFP = superfolder grün fluoreszierendes Protein, RFP = rot fluoreszierendes Protein, ORF = offenes Leseraster, Ubq10 = Ubiquitin10Promotor, 35S = CaMV-Promotor).

Promotor	ORF	Reporter (C-Terminus)	Vektor (binär)	Pflanzenresistenz
35S	LOX6	sGFP	pGWB5, Gateway [®]	Hygromycin
35S	LOX2	sGFP	pGWB5, Gateway [®]	Hygromycin
35S	AOS	sGFP	pGWB5, Gateway [®]	Hygromycin
Ubq10	AOS	RFP	pUBC-RFP-DEST, Gateway [®]	BASTA [®]

Um die Ausgangs-DNA für die Polymerasekettenreaktionen (PCR) zu vervielfältigen, wurden zunächst *E. coli* TOP10 Bakterien mit entsprechender LOX6- bzw. LOX2-CDS von der ehemaligen Doktorandin Wiebke Grebner an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurde eine BP-Reaktion mit dem Eingangsvektor pDONR201 sowie nach Überprüfung und Sequenzierung eine LR-Reaktion mit dem Zielvektor pGWB5 durchgeführt (Vektorkarten siehe Anhang 6.5.1 Abbildung 6.5 und Anhang 6.5.2 Abbildung 6.6).

Um die AOS Ausgangs-DNA zu vervielfältigen wurde eine *Nested* Phusion PCR angewandt und cDNA aus einer *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Blattprobe von Susanne Gillig (Doktorandin an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg) verwendet. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und für eine BP-Reaktion mit dem pDONR201 eingesetzt. Der Vektor wurde in kompetente DH5 α (*E. coli*) transformiert, vervielfältigt und das Plasmid mit einer Plasmidpräparation gewonnen. Nach erfolgreicher Überprüfung und Sequenzierung wurde der pDONR201::AOS für eine LR-Reaktion mit dem pGWB5 Vektor verwendet (Vektorkarte siehe Anhang 6.5.4 Abbildung 6.8). Zusätzlich wurde mehrfach eine LR Reaktion mit dem pUBC-RFP-DEST Vektor versucht, welche bisher erfolglos blieb.

Zudem sollten Konstrukte mit den endogenen LOX6 und LOX2 Promotoren erstellt werden (siehe Tabelle 3.11). Da der endogene LOX6 Promotor zusammen mit dem *LOX6* Gen sehr groß ist, sollte die DNA Sequenz durch zwei PCRs hergestellt werden. Für die erste PCR mit dem endogenen Promotor wurde genomische Wildtyp DNA und für die zweite PCR wildtypische cDNA verwendet. Diese beiden Teilabschnitte wurden getrennt in den pGemTeasy kloniert (siehe Protokoll „pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems“ von Promega) und es wurde ein „blue/white screening“ auf LB X-Gal-IPTG Platten mit Ampicillin durchgeführt (Vektorkarten siehe Anhang 6.5.5 Abbildungen 6.9 und 6.10). In Zukunft können diese Teilstücke zusammen legiert werden, um dann in den pDONR201 und letztendlich in den pGWB4 Vektor kloniert zu werden. Auch für die Lokalisationsanalyse von LOX2 und AOS wurden Klonierungsstrategien mit endogenen Promotoren entwickelt. Allerdings wurde hier bisher nur für LOX2 die erste Hälfte der für das Konstrukt notwendigen DNA amplifiziert (mit genomischer Wildtyp DNA), welche zukünftig in den pGemTeasy kloniert werden kann.

Tab. 3.11: Reporter-genkonstrukte mit endogenem Promotor (sGFP = superfolder grün fluoreszierendes Protein, RFP = rot fluoreszierendes Protein, ORF = offenes Leseraster).

Promotor	ORF	Reporter (C-Terminus)	Vektor (binär)	Pflanzenresistenz
LOX6	LOX6	sGFP	pGWB4, Gateway®	Hygromycin
LOX2	LOX2	sGFP	pGWB4, Gateway®	Hygromycin

Für die genaue Durchführung und Parameter der PCRs, Gateway-Reaktionen, Plasmidpräparationen, Colony-PCR, Transformationen sowie Sequenzierungen siehe Bachelorarbeit von Isabella Gorus (2014a) sowie Spezielle Biowissenschaften III Protokoll von Isabella Gorus (2014b), Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, betreut durch die Autorin.

3.2.2.3 Transformation in Agrobakterien

Das 35SLOX6sGFP Konstrukt wurde anschließend in Agrobakterien (GV 3103 PMP90KR) transformiert. Hierfür wurde zunächst eine Elektroporationsküvette (0,2 mm) mit ddH₂O und 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurden die Agrobakterien auf Eis aufgetaut und in die Küvette gegeben. Dazu wurden 200 ng von dem gewünschten Plasmid gegeben und die Elektroporation bei 2,5 kV, 400 kΩ und 25 µF durchgeführt. Es wurden 2 ml SOC-Medium dazugegeben und die Bakterien für 2 h bei 28 °C und 600 - 800 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf YEB-Agarplatten mit den Antibiotika Kanamycin, Rifampicin und Gentamycin ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden zudem 3 Glycerin-Stocks angefertigt. Dafür wurden Kolonien gepickt und in YEB-Medium mit Kanamycin, Rifampicin und Gentamycin für 2 Tage bei 28 °C und 600 - 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 700 µl Bakterienlösung mit 700 µl steriler 40 %iger Glycerinlösung versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.4 Stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana*

Von einem 35SLOX6sGFP Agrobakterien Glycerin-Stock wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt und schließlich ein 200 ml Kolben mit YEB-Medium und Kanamycin, Rifampicin sowie Gentamycin angeimpft und für einen weiteren Tag wachsen gelassen. Für die stabile

Transformation von *Arabidopsis thaliana lox6* Mutanten wurden die 200 ml Bakterienlösung auf 4 verschiedene 50 ml Falkons aufgeteilt und für 10 - 20 min bei RT und 5500 g abzentrifugiert. Die Pellets wurden in dem gleichen Volumen mit 5 %iger Saccharoselösung resuspendiert. Anschließend wurde eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt. Dann wurde zur Reduzierung der Oberflächenspannung Silwet L-77 in einer Konzentration von 0,05 % dazugegeben. Bei den verwendeten Pflanzen wurden zunächst bereits ausgebildete Samenschoten abgeschnitten und dann die Blüten für circa 20 sec in die Bakterienlösung eingetaucht und leicht bewegt. Danach wurden die Pflanzen in eine Schale gestellt und mit Frischhaltefolie umwickelt (welche durch Holzstäbchen gestützt wurde), um die Pflanzen feucht zu halten. Die Pflanzen wurden gegossen und für 24 h im Dunkeln gelassen. Danach wurden die Pflanzen bei Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) weiterwachsen gelassen. Für die Selektion (nach Harrison et al., 2006) wurden die gewonnenen Samen sterilisiert und auf MS-Agarplatten mit Hygromycin und ohne Saccharose ausgelegt (jeweils circa 100 Samen pro Platte) und für 48 h bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurden sie für 6 h ins Licht gestellt und danach für weitere 48 h in Dunkelheit gelagert. Nach einem weiteren Tag im Licht konnten die Keimlinge selektioniert werden. Alle Keimlinge mit einem verlängerten Hypokotyl wurden danach auf MS-Agarplatten mit 3 % Saccharose umgesetzt und in dem Percival bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht) weiterwachsen gelassen, bis sie in Erde umgesetzt wurden.

3.2.2.5 Klonierung des Konstruktes für einen LOX6 Antikörpers

Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Gateway Systems. Zunächst wurde die berechnete Primerbindungs-Temperatur der LOX6 Primer durch eine Gradienten-PCR bestätigt. Danach wurde mit Hilfe einer Phusion PCR (siehe Tabellen 3.13 und 3.14) die LOX6-CDS (von einem sequenzierten LOX6pDONR201 Konstrukt) amplifiziert. Anschließend wurde eine BP Reaktion mit der LOX6-CDS und dem pDONR201 Vektor durchgeführt, in DH5α Zellen (*E. coli*) transformiert und auf Kanamycin (und das Selbstmordgen) selektioniert.

Für die Transformation wurden zunächst chemisch kompetente DH5α Zellen (jeweils 100 µl) auf Eis aufgetaut. Dazu wurde das DNA-Konstrukt gegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 1 h wurde für 45 sec bei 42 °C ein Hitzeschock in einem Heizblock durchgeführt. Nach einer Abkühlphase auf Eis von 30 min wurde zu jedem Ansatz 1 ml

steriles SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterien für 1 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (300 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurden jeweils 200 µl zur Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde die Überprüfung der Plasmid DNA der Kolonien (Plasmidpräparation durchgeführt mit dem Macherey-Nagel Kit NucleoSpin® Plasmid) mittels Colony-PCR durchgeführt und für die LR Reaktion der pDEST17 Vektor verwendet, welcher einen His-Tag sowie ein IPTG induzierbares System beinhaltet (Vektorkarte siehe Anhang 6.5.6 Abbildung 6.11). Nach einer Transformation in DH5α Zellen wurden die Kolonien auf Ampicillin (und das Selbstmordgen) selektioniert, mittels PCR überprüft und die DNA in BL21 (*E. coli*) Zellen transformiert. Nach einer Überprüfung der Kolonien mittels PCR wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C angezogen und am nächsten Tag (nach einer Akklimatisierung bei 26 °C für 30 min) mit 3 µl IPTG (Endkonzentration 1 mM) versetzt und für weitere 4 h bei 26 °C inkubiert, um die *LOX6* Expression zu induzieren.

Um Proteinextrakte herzustellen, wurden 2 mal 1,5 ml Bakterien jeweils für 5 min bei 5000 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) resuspendiert und durchmischt sowie mit einem Ultraschallstab 3 mal für 5 sec (auf Eis) weiter homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm wurde als Kontrolle 20 µl Überstand mit je 5 µl Lämmli-Puffer (5 x) versetzt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Zudem wurde eine Ni-His-Tag Aufreinigung durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100 µl Proteinüberstand verwendet und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit circa 2 Spatelspitzen Nickel-Silica-Material vereint. Diese Suspension inkubierte für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler und wurde anschließend für 1 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden 3 mal mit jeweils 200 µl LEW-Puffer gewaschen und für 1 min und 4 °C bei 1000 g zentrifugiert. Die Elution wurde 3 mal mit jeweils 30 µl Elutionspuffer (LEW-Puffer mit 10 mM β-Mercaptoethanol und 250 mM Imidazol) durchgeführt und erneut für 1 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Die daraus gewonnenen 30 µl Eluate wurden anschließend mit jeweils 7,5 µl Lämmli-Puffer (5 x) versetzt und ebenfalls für 10 min bei 80°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf ein SDS-Gel (hergestellt wie unter 3.5.2 beschrieben) aufgetragen.

METHODEN

Tab. 3.12: Zusammensetzung für 10 ml des Lämmli-Puffers (5 x).

Chemikalie	Menge
Stacking buffer 4 x	2,5 ml
10 % SDS	4 ml
Glycerin	2,3 ml
β -Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	1 ml
ddH ₂ O	0,7 ml

Tab. 3.13: Phusion PCR Ansatz pro Probe.

Chemikalie	Menge pro Probe
Forward Primer 100 μ M	1 μ l
Reverse Primer 100 μ M	1 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Phusion HF-Puffer (5x)	10 μ l
Phusion DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	1 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
HPLC-Wasser	34,5 μ l

Es wurden zudem 150 ng LOX6 DNA eingesetzt. Die verwendete μ l Anzahl an DNA (1,5 μ l) wurde von der HPLC-Wassermenge abgezogen.

Tab. 3.14: Phusion PCR-Programm.

Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
1 Initiale	98	30 sec	1
Denaturierung			
2 Denaturierung	98	10 sec	
3 Primerbindung	71	20 sec	18
4 Elongation	72	1,40 min	
5 Finale	72	5 min	1
Denaturierung			

3.3 Genexpressionsanalysen

3.3.1 RNA Isolation

Es wurden circa 100 mg gemörstertes und gefrorenes Blattmaterial in Schraubdeckelgefäßen verwendet. Zu den noch gefrorenen Proben wurde jeweils 1 ml Trizol gegeben und so lange durchmischt, bis die Proben aufgetaut waren.

Dann wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl Chloroform dazugegeben, erneut durchmischt und für 5 min inkubiert. Die Proben wurden für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand (circa 600 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 600 µl Isopropanol gegeben und durchmischt, so dass die RNA ausfällt. Die Proben wurden für mindestens 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet mit 750 µl kaltem 75 %igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde das Pellet durch kurzes Durchmischen aufgeschwemmt. Anschließend wurde erneut für 8 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 500 µl 75 %igem Ethanol wiederholt. Nachdem der Überstand sehr gründlich abgenommen wurde, konnte das Pellet für 10 min bei RT trocknen. Zuletzt wurde das Pellet in 30 - 100 µl DEPC-ddH₂O gelöst, indem es für 15 min auf Eis gestellt und danach noch einmal kurz durchmischt wurde.

3.3.2 Messung von RNA und DNA Konzentrationen mit Hilfe des Nanodrops

Die RNA bzw. DNA Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Spectralphotometers gemessen. Dazu wurde das Gerät erst mit 1 µl ddH₂O kalibriert, als Leerwert („Blank“) 1 µl DEPC-ddH₂O verwendet und anschließend mit jeweils 1 µl die Proben gemessen. Die Konzentrationen werden durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Konz. [ng/}\mu\text{l]} = E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

E_{260} bezieht sich auf die Wellenlänge, bei der absorbiert wird. Bei einer optischen Dichte (OD) von 1,0 sind 40 ng/µl RNA bzw. 50 ng/µl DNA in der Probe enthalten.

Es gibt zudem Werte, welche eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der DNA oder RNA zulassen. Je kleiner der 260/230 Wert wird, desto größer ist die Verunreinigung der

Probe. Wenn bei dem 260/280 Wert eine 1,8 steht, bedeutet dies, dass die Probe einen hohen DNA Gehalt aufweist und wenn der Wert eine 2,0 aufweist, bedeutet dies, dass in der Probe ein hoher RNA Gehalt vorhanden ist.

3.3.3 Untersuchung der RNA Integrität

Mit Hilfe einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese wurde die Qualität der RNA überprüft, um eine Degradierung auszuschließen. Es wurde ein 1,2 %iges Gel verwendet, wofür 1,2 g Agarose und 62,5 ml ddH₂O in einem Kolben für 2 min bei 800 W in einer Mikrowelle gelöst und zum Kochen gebracht wurden. Danach wurden 20 ml 5 x RB-Puffer und 17,5 ml 37 %ige Formaldehydlösung dazugegeben. Die Lösung in dem Kolben wurde kurz geschwenkt und anschließend in einen Schlitten gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Während das Gel abkühlte, wurden die RNA Proben vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 3 µl der RNA Proben mit 2 µl DEPC-ddH₂O und 5 µl 2 x RNA Ladepuffer versetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden für 10 min bei 65 °C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Dann wurde das RNA-Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit 1 x RB-Puffer gefüllt war. Anschließend wurde der Probenkamm entfernt und die 10 µl Proben aufgetragen. Das Gel wurde bei einer Spannung von 80 V für 40 min laufen gelassen.

Tab. 3.15: RNA Laufpuffer (RB, 5 x).

Chemikalie	Menge
MOPS	1,86 g
Natriumacetat	6,8 g
Natriumhydroxid	1,4 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Der Puffer wurde mit 1 ml DEPC versetzt und über Nacht bei RT inkubiert, um RNasen zu denaturieren. Danach wurde er autoklaviert.

Tab. 3.16: RNA Ladepuffer (2 x).

Chemikalie	Menge
5 x RNA Laufpuffer (DEPC behandelt)	76 µl
Formaldehyd (32 %)	126 µl
Formamid	378 µl
Agarosegel loading dye (DEPC behandelt)	76 µl
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	5 µl

3.3.4 DNase Verdau und Ausfällung

Es wurden jeweils 1 µg RNA in 8 µl DEPC-ddH₂O in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verwendet. Dazu wurden jeweils 1 µl 10 x DNase Puffer und jeweils 1 µl DNase Enzym gegeben. Dieses Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1 µl EDTA (25 mM) dazugegeben und für 10 min bei 65 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Danach wurde folgender Mastermix zum Ausfällen hergestellt:

Tab. 3.17: Mastermix für den DNase Verdau pro Probe.

Chemikalie	Konzentration	Menge
DEPC-ddH ₂ O	4 M	9 µl
Glykogen	20 mg/ml	1 µl
Ammoniumacetat	5 M	2,1 µl
Isopropanol		23,1 µl

Es wurden anschließend zu jeder Probe 35,2 µl von dem Mastermix gegeben und die Proben bei -20 °C über Nacht inkubiert.

3.3.5 cDNA Synthese

Die RNA Proben von dem DNase Verdau und der Ausfällung wurden zunächst in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend gründlich abgenommen und verworfen. Dann wurden jeweils 500 µl vorgekühltes 75 % Ethanol dazugegeben und kurz durchmischt. Die Proben wurden für 8 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand erneut sehr gründlich

abgenommen. Anschließend wurde das Pellet bei RT für 5 - 10 min trocknen gelassen und in 7 µl DEPC-ddH₂O zum Lösen für weitere 15 - 20 min auf Eis gestellt.

Tab. 3.18: Mastermix für Reverse Transkriptase pro Probe.

Chemikalie	Konzentration	Menge
Reverse Transkriptase Puffer	4 M	2 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
PolydT ₂₇ Primer	100 mM	0,4 µl

In PCR Reaktionsgefäßen wurden jeweils 6,7 µl RNA vorgelegt und in einer PCR Maschine für 5 min bei 70 °C erhitzt. Anschließend kamen die Proben wieder auf Eis. Jetzt erst wurden in den Mastermix zusätzlich 0,4 µl pro Probe M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl) hinzugefügt und auf Eis gestellt. Nun wurden zu jeder Probe 3,3 µl von dem Mastermix (inklusive Reverse Transkriptase) gegeben und die Proben in die PCR Maschine für 1 h bei 42 °C und anschließend für 15 min bei 75 °C gestellt. Die DNA wurde bei -20 °C eingefroren, bis sie weiter verwendet wurde.

3.3.6 Real Time PCR (Quantitative PCR)

Zunächst wurde die DNA 1:20 verdünnt. Danach wurde der Primermix hergestellt. Bei Primern mit einer Stock Konzentration von 12 wurden jeweils 12 µl forward und 12 µl reverse Primer mit 376 µl LC-Wasser verdünnt. Bei Primern mit einer Stock Konzentration von 18 wurden jeweils 18 µl forward und 18 µl reverse Primer mit 364 µl LC-Wasser verdünnt. Danach wurde folgender Mastermix hergestellt:

Tab. 3.19: Real Time PCR Mastermix.

Chemikalie	Menge pro Probe
SYBR Mix green (ABSolute SYBR Capillary Mix Thermo Scientific 2 x)	10 µl
Primermix	8 µl

Dazu kamen jeweils 2 µl Standard, cDNA oder LC-Wasser. Für jedes untersuchte Gen werden jeweils 4 Standards (Eichgeraden mit einer Verdünnungsreihe von 20>2>0,2>0,02 fg DNA

Moleküle) und eine Negativkontrolle benötigt. Außerdem wird ein Referenzgen mit ebenfalls 4 Standards und einer Negativkontrolle gebraucht (z. B. *SAND*).

Zuerst wurden überall die jeweiligen Mastermixe mit den entsprechenden Primern auf Eis in die Lightcycler Reaktionsgefäße pipettiert. Danach wurden die Standards, die cDNA und das LC-Wasser in die jeweiligen Reaktionsgefäße dazugegeben.

Tab. 3.20: Real Time PCR-Programm.

Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
1 Initiale	95	15 min	1
Denaturierung			
2 Denaturierung	95	15 sec	
3 Primerbindung	58	20 sec	
4 Elongation	72	20 sec	45
5 Messung	79	10 sec	
6 Finale	95	10 sec	1
Denaturierung			
7 Schmelzkurve	65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten		

Die gemessenen Daten wurden anschließend mit Hilfe der Bio-Rad Software CFX Manager und Excel ausgewertet

3.4 Samenalterung

3.4.1 Methode der Samenalterung

Für die Samenalterung wurden die Samen in einem hermetisch abgeschlossenen Gefäß einer Luftfeuchtigkeit von 83 % und einer Temperatur von 42 °C für 1 bis 4 Tage ausgesetzt. Hierfür wurde ein Plastikgefäß verwendet, an dessen Boden sich eine gesättigte KCl-Lösung befand. Auf der Lösung flotierte ein Plastikdeckel mit einem Reaktionsgefäß-Ständer aus Schaumstoff, in welchen die Reaktionsgefäße mit den Samen mit geöffnetem Deckel gestellt wurden. Das verschlossene Plastikgefäß mit den Samen wurde anschließend in einem Heizschrank für 1 bis 4 Tage inkubiert. Mit Hilfe eines Dataloggers konnten Temperatur sowie Luftfeuchtigkeit bei jedem Alterungsvorgang überprüft werden. Für die Methode der

Samenalterung siehe auch Masterarbeit von Sophie Faul (2015), Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, betreut durch die Autorin.

3.4.2 Bestimmung der Keimrate

Für die Bestimmung der Keimrate wurden die Samen flüssig sterilisiert und anschließend auf MS-Agarplatten ohne oder mit 3 % Saccharose ausgelegt (jeweils 40 Samen pro Platte). Nach einer Stratifikation von 3 Tagen im Kühlschrank wechselten die Platten in den Percival mit Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht). Anschließend wurde die Keimrate jeden Tag für 8 Tage mit Hilfe eines Binokulars ausgezählt. Sobald die Radikula zu sehen war, galt der Samen als gekeimt.

3.4.3 Exogene Applikation von Hydroxy- und Ketofettsäuren

Die Behandlung wurde mit den freien oxidierten Fettsäuren 9-HOTE, 9-HODE, 9-KODE, 13-HOTE, 13-HODE und 13-KODE durchgeführt. WS Samen wurden mit den 9-Lipoxygenase Produkten behandelt. Hierfür wurden die Samen zunächst flüssig sterilisiert, anschließend mit Hilfe von 316,8 µl sterilem ddH₂O in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu den jeweiligen in 3,2 µl Methanol gelösten freien Fettsäuren gegeben (Endkonzentration Methanol 1 %) und für 16 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei wurden für die Hydroxy- und Ketofettsäuren Konzentrationen von 10 µM und 50 µM in einem Endvolumen von 320 µl verwendet. Als Kontrollbehandlung diente 1 % Methanol in ddH₂O. Danach wurden die Samen auf MS-Agarplatten ohne Saccharose ausgelegt (jeweils circa 50 Stück und 3 Schalen pro Behandlung) und in den Percival bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 22 °C Tag, 20 °C Nacht) gelegt.

Für die Behandlung mit den 13-Lipoxygenase Produkten wurden Col-0 Samen verwendet. Hierfür wurden zunächst sterile Filterpapiere (Whatman Blottingpapier GB46) in Petri-Schalen gelegt und mit jeweils 1 ml der jeweiligen freien Fettsäuren getränkt. Es wurden ebenfalls die Konzentrationen 10 µM und 50 µM sowie eine 0,86 %ige Methanol Kontrolle verwendet. Die flüssig sterilisierten Col-0 Samen wurden auf das Filterpapier ausgelegt (jeweils 40 Stück und 3 Schalen pro Behandlung) und die Schalen für 3 Tage bei 4 °C im Dunkeln vernalisiert, bevor sie in den Percival gelegt wurden.

Bei beiden Experimenten wurden die Keimraten ab Tag 1 im Percival jeden Tag bis zum Tag 8 unter dem Binokular ausgezählt.

3.5 Proteinanalysen

3.5.1 Herstellung der Proteinextrakte

Zunächst wurden 10 mg gemörstertes und gefriergetrocknetes Blattmaterial in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Dazu wurden 200 µl Harnstoffextraktionspuffer gegeben und alles gut durchmischt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 75 °C inkubiert und währenddessen mehrmals invertiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort für einen SDS-PAGE verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Tab. 3.21: Zusammensetzung des Harnstoffextraktionspuffers.

Chemikalie	Konzentration
Harnstoff 4 M	9,6 g
Glycerin	7,6 ml
β-Mercaptoethanol	2 ml
SDS	10 ml
Bromphenolblau	Eine Spatelspitze
ddH ₂ O	ad 40 ml

3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Apparatur wurden zunächst die Glasplatten, „Spacer“ und Kämmen mit ddH₂O und 70 %igem Ethanol gesäubert. Dann wurde mit einer Glaspipette das Trenngel gegossen, sofort mit 1 ml Isopropanol überschichtet und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach circa 15 min wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel gegossen. Hier musste ein Kamm eingesetzt werden, ohne Luftblasen zu bilden. Das fertige Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und mit 1 x Laufpuffer überschichtet. Der Kamm wurde herausgelöst und die Taschen mit 1 x Laufpuffer durchgespült. Es wurden 30 µl Proteinextrakt pro Tasche aufgetragen. Zudem wurden 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth) aufgetragen und leere

METHODEN

Taschen mit dem gleichen Volumen Harnstoffextraktionspuffer beladen. Das Gel wurde bei 120 V laufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Danach wurden 140 V eingestellt und gewartet, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte.

Tab. 3.22: Trenngel 12,5 % (10 ml).

Chemikalie	Menge
Acrylamid Stock Solution (30 %)	4 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8	4,2 ml
ddH ₂ O	1,65 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	40 µl

Tab. 3.23: Sammelgel 5 % (10 ml).

Chemikalie	Menge
Acrylamid Stock Solution (30 %)	1,7 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
ddH ₂ O	5,85 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	40 µl
TEMED	10 µl

Tab. 3.24: 5 x SDS-Page Laufpuffer 1 Liter.

Chemikalie	Menge
Tris	15,1 g
Glycin	94 g
10 % SDS	50 ml

METHODEN

Tab. 3.25: Transferpuffer 1 Liter.

Chemikalie	Menge
Tris-HCl, pH 8,3	5,85 g
Glycin	2,93 g
10 % SDS	1 ml
Methanol	200 ml

Tab. 3.26: 10 x TBS 1 Liter.

Chemikalie	Menge
Tris-HCl, pH 7,4	24,2 g
NaCl	80 g

Tab. 3.27: 1 x TBST.

Chemikalie	Menge
Tris-HCl, pH 7,4	24,2 g
NaCl	80 g
Tween 20	0,1 %

3.5.3 Western Blot Analyse

Das Gel wurde aus den Glasplatten herausgelöst und das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten. Anschließend wurde das Gel in eine Western Blotting Apparatur gegeben. Dafür wurden 7 Schwämme in Transferpuffer äquilibriert und 3 davon auf den Pluspol der Apparatur gelegt. Auf die Schwämme wurde eine Lage ebenfalls in Transferpuffer äquilibriertes Whatman Blottingpapier GB46 gelegt. Dann wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran kurz in Methanol aktiviert, mit Transferpuffer gewaschen und auf das Whatman Papier gelegt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen. Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Auf das Gel wurde erneut eine Lage Whatman Papier geschichtet und darauf die restlichen 4 Schwämme gelegt. Die Apparatur wurde zusammgebaut und die innere Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die äußeren Kammern wurden zur besseren

Kühlung der Apparatur mit Wasser gefüllt. Dann wurde für 45 min bei 140 mA der Elektro-Transfer der Proteine gestartet.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF Membran wurde die Membran kurz in 1 x Tris-Puffer-Saline (TBS) gewaschen und anschließend für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS geblockt. Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in 5 % Milchpulver in 1 x TBST über Nacht bei 4 °C. In diesem Fall wurde ein polyklonaler HA-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) mit einer Verdünnung von 1:600 verwendet.

Danach wurde die Membran 3 mal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 2 h bei RT mit 5 % Milchpulver in TBST inkubiert. Der Sekundärantikörper war eine α -Rabbit Peroxidase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und wurde mit einer Verdünnung von 1:7500 verwendet. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 5 mal für 5 min mit 1 x TBS gewaschen.

Die Entwicklung der Western Blot Filme wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Zunächst wurde ein ECL-Substrat-Mix hergestellt, indem die Lösungen A und B 1:1 gemischt wurden. Für eine 9,5 x 6,5 cm Membran werden circa 3 ml Substratmix benötigt. Dann wurde diese Lösung auf die Membran gegeben, welche zuvor auf eine Folie in eine Western Blot Kasette gelegt wurde. Die Membran wurde für 1 min mit dem Substratmix inkubiert und mit einer weiteren Folie bedeckt. Schließlich wurde ein Röntgenfilm (Fujifilm, Düsseldorf) aufgelegt und die Kasette geschlossen. Für die Röntgenfilme wurden verschiedene Expositionszeiten (circa 5 sec bis 30 min) verwendet, je nachdem wie stark das Signal war. Um die Filme zu entwickeln, wurden sie für 3 min in die Entwicklerlösung gelegt, danach kurz gewässert und für weitere 3 min in der Fixierlösung gelassen. Zum Schluss wurden die Filme erneut mit Wasser gewaschen und zum Trocknen aufgehängt.

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Extraktion von Lipiden

Für die Extraktion wurden 3 mg \pm 0,2 Samen verwendet. Zu den in Schraubdeckelgefäßen eingewogenen Samen wurden 500 μ l Extraktionslösung (Chloroform und Methanol 2:1, Volumenverhältnis (v/v), BHT (1 mg/ml), TPP (1 mg/ml) sowie die Internen Standards 15-HEDE und 15-KEDE (je 150 ng/Probe) und TG30:0 (100 ng/Probe) sowie 5 Minibeads aus

Stahl (Durchmesser 2 mm) gegeben. Die Samen wurden bei 21 Hz für 4 min in einer Kugelmühle homogenisiert.

Danach wurden die Proben für 10 min bei 10.000 rpm und RT zentrifugiert. Nachdem die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt wurden, wurden die Pellets mit weiteren 500 µl Extraktionslösung reextrahiert. Nach erneutem Homogenisieren und Zentrifugieren wurden beide organischen Phasen vereint. Zunächst wurden die Überstände mit einem Druckluftstrom bis zu 2/3 eingengt, bevor sie in einem Rotationsvakuumkonzentrator bei 40 °C komplett getrocknet wurden. Die eingetrockneten Rückstände wurden in 100 µl Methanol gelöst und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben durchmischt, für 3 min im Ultraschallbad gelöst, für 10 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert und jeweils 50 µl in HPLC-(Halbmicro)-Vials überführt.

Tab. 3.28: Analyten mit ihren jeweiligen Internen Standards und deren Konzentration. Die Responsefaktoren wurden neu ermittelt oder aus der Dissertation von Maria Zoeller (2012), Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg übernommen (kursive Werte).

Analyt	Standard	Konzentration	Response Faktor
9-HOTE	15-HEDE	150 ng	1,66
10-HOTE	15-HEDE	150 ng	4,09
12-HOTE	15-HEDE	150 ng	2,39
13-HOTE	15-HEDE	150 ng	4,43
15-HOTE	15-HEDE	150 ng	0,66
16-HOTE	15-HEDE	150 ng	2,13
9-HODE	15-HEDE	150 ng	1,09
10-HODE	15-HEDE	150 ng	5,12
12-HODE	15-HEDE	150 ng	34,96
13-HODE	15-HEDE	150 ng	1,93
9-KOTE	15-KEDE	150 ng	1,8
13-KOTE	15-KEDE	150 ng	-
9-KODE	15-KEDE	150 ng	1,51
13-KODE	15-KEDE	150 ng	0,94

3.6.2 Hydrolyse von veresterten Lipiden

Für die Hydrolyse wurde die Extraktion wie unter 3.6.1 beschrieben (1 µg 15-HEDE als Interner Standard) bis zu der Trocknung der Rückstände durchgeführt. Anschließend wurde zu den trockenen Rückständen 500 µl 15 %iges wässriges Natriumhydroxid gegeben. Dann wurden die Proben durchmischt und für 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Die Proben inkubierten danach für 60 min in einem Wasserbad bei 60 °C. Anschließend wurden die Proben in Schraubdeckel-Reagenzgläser umgefüllt und zum Abkühlen in ein Eisbad gestellt. Der pH-Wert wurde mit 3,5 ml 1 M Zitronensäure eingestellt und (mit Hilfe von pH-Messstäbchen) auf einen pH-Wert von 3 überprüft. Dann wurden die Proben 2 mal mit 2 ml Hexan/Diethylether 1:1 (v/v) ausgeschüttelt. Dafür wurden die Proben durchmischt, für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und die obere Phase mit einer Pipette abgenommen. Die beiden organischen Phasen wurden in Reagenzgläsern vereint und unter einem Druckluftstrom zu 2/3 eingedampft. Die Lösemittelreste wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Reagenzgläser jeweils mit 500 µl Hexan/Diethylether 1:1 (v/v) nachgespült, um anschließend erneut unter dem Druckluftstrom zu 2/3 eingeeengt zu werden. Die verbleibenden Lösemittelreste wurden in einem Rotationsvakuumkonzentrator zur Trockne eingeeengt. Die Rückstände wurden zunächst in 25 µl Methanol gelöst, bevor weitere 25 µl 1 mM Ammoniumacetat hinzugegeben wurden. Nach 10 min Ultraschallbad wurden die Proben bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände in HPLC-(Halbmicro)-Vials überführt.

3.6.3 Extraktion von Phytohormonen

Die Proben wurden vorher gemörsert, gefriergetrocknet und in Schraubdeckelgefäße eingewogen. Es wurden 25 mg $\pm 0,5$ Blätter und 18 mg $\pm 0,5$ Wurzeln verwendet. Zunächst wurde auf jede Probe 950 µl Ethylacetat mit 1 % Ameisensäure und 50 µl Standardmix (Phytohormon-IS-Mix) gegeben (siehe Stingl et al. (2013)).

Tab. 3.29: Analyten mit ihren jeweiligen internen Standards und deren Konzentration sowie Responsefaktoren.

Analyt	Standard	Konzentration	Response Faktor
Jasmonsäure	Dihydrojasmonsäure	50 ng	1
Jasmonsäure-	Jasmonsäure-	50 ng	1,3
Isoleucin	Norvalin		
OPDA	[¹⁸ O ₂]-OPDA	50 ng	1,4
dnOPDA	[¹⁸ O ₂]-OPDA	50 ng	1,5

Die Markierungsgrade des [¹⁸O₂]-OPDA betragen 0,6 - 11,4 - 87,7 - 0,3. Dies bedeutet, dass bei 0,6 % der OPDA kein Sauerstoff markiert ist, bei 11,4 % ein Sauerstoffatom stabil isotopenmarkiert ist, bei 87,7 % 2 Sauerstoffatome und bei 0,3 % alle 3 Sauerstoffatome stabil isotopenmarkiert sind.

Anschließend wurde jede Probe mit einer Keramikkugel versehen und für 3 min bei 20 Hz in der Kugelmühle homogenisiert. Danach wurden sie für 10 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und dann in einem Rotationsvakuumkonzentrator bei 40 °C zur Trockne eingengt. In der Zwischenzeit wurde auf das Pellet in den Schraubdeckelgefäßen erneut pro Probe 1 ml Ethylacetat mit 1 % Ameisensäure gegeben und kam wiederum für 3 min bei 20 Hz in die Kugelmühle. Die Proben wurden wieder bei 12.000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand abgenommen und mit dem ersten Überstand vereinigt. Der Extrakt kam erneut in den Rotationsvakuumkonzentrator und wurde bei 40 °C zur Trockne eingengt. Nachdem die Proben trocken waren, wurden sie in 20 µl Acetonitril gelöst und für 20 sec durchmischt. Danach wurden 20 µl ddH₂O dazugegeben und es wurde erneut für 10 sec durchmischt. Die Proben kamen für 2 min in ein Ultraschallbad und wurden für 10 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand in HPLC-(Halbmicro)-Vials überführt. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.6.4 Quantifizierung von Lipiden

Um die Metabolite chromatographisch aufzutrennen, wurde eine AcquityTM Ultra Performance LC (UPLC, Waters) verwendet und die Detektion mit einem Quadrupol-Flugzeit-

Massenspektrometer (qTOF, Synapt G2 HDMS, Waters) durchgeführt. Für die Ionisation wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI mit Lockspray, Waters) verwendet.

Für die Messung wurde eine Acquity UPLC BEH C18 Säule von Waters (Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 100 mm, Partikelgröße: 1,7 µm) mit einem Inline-Partikelfilter und einer VanGuard-Vorsäule mit einer Säulentemperatur von 60 °C verwendet. Als Eluenten wurden für die mobile Phase (A) 60 % ddH₂O und 40 % Acetonitril mit 10 mM Ammoniumacetat und für die mobile Phase (B) 90 % Isopropanol und 10 % Acetonitril mit 10 mM Ammoniumacetat verwendet. Das Gradientenprofil änderte sich von 3 % B auf 100 % in 10 min und blieb so für weitere 2 min bestehen. Zum Spülen wurde für 2 min 100 % B und zum Equilibrieren für 3 min 30 % B verwendet. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 5 µl und die Autosampler-Temperatur 10 °C. Als Weak wash-Lösung wurde Acetonitril:ddH₂O 1:1 und als Strong wash-Lösung nur Acetonitril verwendet.

Tab. 3.30: Verschiedene Parameter der Lipid Messung.

Parameter	Lipid Methode
Ionisationstechnik	ESI + und ESI -
Mass range Modus	Broad band
Mass range	50 - 1200 Da
Mass analyzer	TOF
Resolution	Sensitivity, 10000
Modus	MSe modus

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm MassLynx. Hier wurde für die Analyten ein Fenster mit einer Masse von 30 mDa verwendet, um das Extracted-Ion-Chromatogram darzustellen. Dabei wurde ein Retentionszeitfenster von 0,1 min für die Identifikation der Analyten verwendet. Anhand der in Tabelle 3.31 dargestellten Massen sowie Retentionszeiten wurden die oxidierten Triacylglycerole (OH-TGs) identifiziert. Die Quantifizierung wurde anhand der unter 3.6.5 angegebenen Formel gegen die Fläche des Internen Standards TG30:0 berechnet.

Tab. 3.31: Molekül-Ionen und Fragment-Ionen sowie die Retentionszeit von veresterten oxidierten Fettsäuren (OH-TGs).

Lipid	Molekül-Ion (m/z)	Fragment-Ion (m/z)	Retentionszeit (min)
(30:0)TG	572,488	383,386	7,81
(OH18:3-18:3-18:3)TG	906,718	595,468 611,465	8,32
(OH18:3-18:3-18:2)TG	908,732	601,515 615,493 613,478	8,51
(OH18:3-18:2-18:2)TG	910,746	597,484 61,465 613,478	8,72
(OH18:3-18:2-18:1)TG	912,762	599,500 613,478	8,90
(OH18:3-18:3-20:1)TG	938,778	627,537 611,466 643,527	8,95
(OH18:3-18:2-20:1)TG	940,794	629,551 613,487 643,530	9,10

3.6.5 Quantifizierung von Hydroxyfettsäuren, Ketofettsäuren und Phytohormonen

Die Extrakte wurden mit Hilfe einer Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC, Waters) analysiert. Zu dem UPLC™-System gehören ein Acquity UPLC binärer Hochdruckgradientenmanager, ein Acquity UPLC Probenmanager und ein Acquity UPLC Säulenofen. Die Detektion der Analyten wurde mit einem Quattro Premier Triple Quadrupol-Massenspektrometer mittels „multiple reaction monitoring“ durchgeführt.

Für die Auftrennung der Hydroxyfettsäuren, Ketofettsäuren und Phytohormone wurde eine Acquity UPLC BEH C18 Säule von Waters (Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm, Partikelgröße: 1,7 µm) mit einem 0,2 µm Partikelfilter und eine Vorsäule (Acquity BEH C18

VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm) bei einer Säulentemperatur von 40 °C verwendet. Als Eluenten wurden 1 mM Ammoniumacetat in ddH₂O (A) und Acetonitril (B) verwendet. Das Gradientenprofil änderte sich bei den Hydroxy- und Ketofettsäuren linear mit einer Flussrate von 0,25 ml/min von einem anfänglichen Verhältnis von 65:35 (A:B, v/v) auf 30:70 (A:B, v/v) innerhalb von 6 min.

Die mobile Phase bestand bei den Phytohormonen aus einer Mischung von 0,1 % Ameisensäure in ddH₂O (A) und Acetonitril (B). Der lineare Gradient begann mit einem Lösemittelverhältnis A:B von 97:3 (v/v), welches sich zu 0:100 (v/v) mit einer Flussrate von 0,25 ml/min innerhalb von 7 min änderte.

Für die Detektion der Hydroxyfettsäuren, Ketofettsäuren und Phytohormone wurde ein Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer der Firma Waters verwendet. Mit Hilfe des „multiple reaction monitoring“ können die Analyten anhand spezifischer Übergänge mittels MS/MS detektiert werden. Hierfür werden Molekül-Ionen aufgrund ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) im ersten Quadrupol isoliert und nur die Analyten mit den gewünschten Massen durchgelassen. Danach findet im zweiten Quadrupol, der Kollisionszelle, eine kollisionsinduzierte Dissoziation mit Argon-Gas statt, wodurch die Analyten fragmentiert werden. Schließlich erfolgt im dritten Quadrupol eine Isolierung von charakteristischen Fragmenten.

Tab. 3.32: Verschiedene MS-Parameter der Oxylin und Phytohormon Messung.

Parameter	Hydroxy- und Ketofettsäuren	Phytohormone
Elektrospray-Modus (ESI)	negativ	negativ
Kapillarspannung	3 kV	3 kV
Quellentemperatur	120 °C	120 °C
Desolvatisierungstemperatur	350 °C	400 °C
Desolvatisierungsgas (Stickstoff)	800 l/h	800 l/h
Konusgas (Stickstoff)	50 l/h	50 l/h

METHODEN

Tab. 3.33: Massenübergänge (m/z), Fragment-Ionen und Kollisionsenergie von Oxylipinen und Phytohormonen.

Oxylipin	Molekül-Ion (m/z)	Fragment-Ion (m/z)	Kollisions-energie (V)	Konus-spannung (V)
Jasmonsäure	209	59	17	19
Dihydrojasmonsäure	211	59	17	19
Jasmonsäure-Isoleucin	322	130	18	24
Jasmonsäure-Norvalin	308	116	18	24
OPDA	291	165	26	22
dnOPDA	263	165	16	22
[¹⁸ O] ₂ -OPDA	295	165	26	22
15-HEDE	323	223	20	26
9-HOTE	293	171	20	26
10-HOTE	293	155	20	26
12-HOTE	293	211	20	26
13-HOTE	293	195	20	26
15-HOTE	293	223	20	26
16-HOTE	293	235	20	26
9-HODE	295	171	20	26
13-HODE	295	195	20	26
15-KEDE	321	113	25	34
9-KOTE	291	185	25	34
13-KOTE	291	195	25	34
9-KODE	293	185	25	34
13-KODE	293	113	25	34

Die Peakflächen der Analyten wurden mit Hilfe der QuanLynx Software (Waters) bestimmt. Um die genaue Konzentration der Messwerte zu ermitteln, wurden die Flächen der detektierten Analyten mit denen der Internen Standards (siehe beispielsweise Tabelle 3.29) verglichen.

Für die exakte Berechnung müssen zudem die Substanz-spezifischen Responsefaktoren einberechnet werden, damit werden Substanz-spezifische Unterschiede bei der Fragmentierung der Analyten miteinbezogen. Die Responsefaktoren berechnen sich aus der Fläche des internen Standards geteilt durch die Fläche des Analyten gleicher Konzentration (siehe Tabellen 3.28 und 3.29). Um die Konzentration zu berechnen, wird folgende Formel angewendet:

$$c(A) = \frac{\text{Fläche}(A)}{\text{Fläche}(IS)} * c(IS) = x; \quad x * RF = x_{ng}$$

Somit ist die Konzentration des Analyten das Verhältnis der Fläche des Analyten durch die Fläche des internen Standards multipliziert mit der eingesetzten Konzentration des internen Standards. Dieser Wert muss noch mit dem jeweiligen Responsefaktor multipliziert werden, um die exakte Konzentration zu berechnen.

3.6.6 „Untargeted Analyse“

Für die „untargeted Analyse“ wurden die Proben mit der Phytohormonextraktion (siehe 3.6.3) extrahiert. Um die Metabolite chromatographisch aufzutrennen wurde eine Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC, Waters) verwendet und die Detektion mit einem Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (qTOF, Synapt G2 HDMS, Waters) durchgeführt. Für die Ionisation wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI, Zspray™ Lockspray EXI₁APCI₁ESCI, Waters) verwendet.

Für die Messung wurde eine Acquity UPLC BEH C18 Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 100 mm und einer Partikelgröße von 1,7 µm von Waters mit einer Vorsäule zum Herausfiltern von Schmutzpartikeln verwendet. Die Säulentemperatur betrug 40 °C.

Das Lösungsmittel A bestand aus 60 % ddH₂O und 40 % Acetonitril mit 10 mM Ammoniumacetat. Das Lösungsmittel B bestand aus 10 % Acetonitril und 90 % Isopropanol ebenfalls mit 10 mM Ammoniumacetat. Die Messung startete mit 70 % Lösemittel A und 30 % Lösemittel B. Innerhalb von 10 min änderte sich das Lösemittel-Verhältnis auf 99 % B und 1 % A für 2 min. Anschließend änderte sich das Verhältnis zu letztendlich 70 %

METHODEN

Lösemittel A und 30 % B bis zur min 15. Dieses Lösemittelverhältnis wurde auch für die Equilibration verwendet.

Für die MS-Methode wurden für die „positive“ und „negative resolution“ das Datenformat „continuum“ verwendet. Die „low mass“ und „high mass“ betrug 50 Da bzw. 1200 Da. In der ersten Spur wurde das „total ion chromatogram“ gemessen und in der zweiten Spur die Fragmente.

Tab. 3.34: Verschiedene Parameter der „untargeted Messung“.

Parameter	„Untargeted Methode“
Run Time	15 min
Flow rate	0,3 mL/min
Weak wash	90 % ddH ₂ O, 10 % Acetonitril
Strong wash	100 % Acetonitril
Sample temperature	10 °C
Collision energy	15 - 35 V
Capillary	0,8 kV
Sampling cone	25
Trap collision energy	4
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	800 (L/Hr)
Cone gas flow	30 (L/Hr)
HeliumCell gas flow	180
Sample infusion flow rate	20 µl/min

Tab. 3.35: „Lock spray configuration“ der „untargeted Messung“.

Parameter	„Untargeted Methode“
Reference cone voltage	25 V
Reference capillary voltage	2,5 kV
Reference trap collision energy	4,0
Reference scan frequency	20 sec

Die bei den Messungen gewonnenen Daten wurden in einer Präprozessierung mit ProGenesis QI untersucht, wobei 1057 Metabolite bei Messungen mit negativer und 1000 Metabolite mit positiver ESI detektiert wurden. Diese Treffer wurden dann mit Hilfe einer Univariate Analyse gefiltert ($p < 0,02$; „fold change“ > 5) und später auf Muster hin untersucht. Es wurde erwartet, dass die Metabolite entweder in der *lox6* Mutante am niedrigsten und in den Überexprimierern am höchsten sein würden oder genau umgekehrt. Es gab schließlich 28 mit negativer und 11 mit positiver ESI gemessene Metabolite, auf die dieser Trend näherungsweise zutraf. Bevor die gefundenen Marker identifiziert werden sollten, wurde in einem zweiten Experiment ihre Wiederholbarkeit geprüft. Es fanden sich in beiden Experimenten 3 mit negativer und 1 mit positiver ESI gemessene Marker.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Samenalterung

Zunächst sollte ein System für die künstliche Samenalterung etabliert werden. Hierfür wurden eine Temperatur von 42 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 83 % benötigt. Um eine präzise, gleichbleibende Temperatur zu gewährleisten wurde ein Heizschrank verwendet und für die Luftfeuchtigkeit eine gesättigte KCl-Lösung in einem hermetisch abgeschlossenen Gefäß, in welches geöffnete Reaktionsgefäße mit den Samen gestellt wurden. Um die Validität dieses Systems zu überprüfen, wurden die Samen zunächst für verschiedene Zeiträume gealtert und die Keimraten nach der Alterung ausgezählt. Wie bereits Boca et al. (2014) publiziert haben, ist nach vier Tagen Alterung eine deutliche Keimungsreduktion festzustellen. Hier sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse bei diesem Versuchsaufbau reproduzierbar sind. Hierfür wurden Col-0 Samen für zwei, drei, oder vier Tage künstlich gealtert und auf Platten mit MS-Agar und 3 % Saccharose ausgelegt. Nach acht Tagen wurde die Keimrate bestimmt.

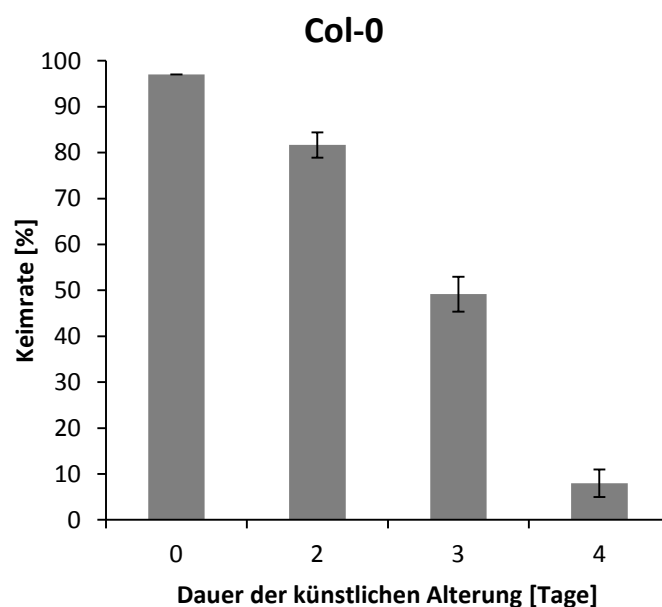


Abbildung 4.1: Keimrate von Col-0 vor und nach 2, 3 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 Platten á 40 Samen auf MS-Agar mit 3 % Saccharose ausgelegt, für 8 Tage bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 15 h Dunkelheit) inkubiert und die Keimraten ausgezählt. Diese Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten. (MW+STABW)

Ohne Alterung liegt die Keimrate des Wildtyps Col-0 bei 97 %. Nach zwei, drei bzw. vier Tagen künstlicher Alterung nimmt die Keimrate um 16 %, 50 % bzw. 92 % ab. Je länger die Alterung andauert, desto stärker ist der Rückgang der Keimfähigkeit der Samen. In den von Boca et al. (2014) durchgeführten Experimenten zur künstlichen Alterung, lag die Keimrate des Wildtyps Col-0 nach drei Tagen künstlicher Alterung bei circa 65 % und nach vier Tagen bei 35 %. In dem in Abbildung 4.1 dargestellten Versuch liegen die Werte mit 49 % bei drei Tagen und 8 % bei vier Tagen etwas darunter. Allerdings wurden bei Boca et al. (2014) sowohl andere Temperaturen und Lichtverhältnisse als auch Filterpapier anstatt MS-Agar zum Keimen und Auszählen der Samen verwendet, wodurch sich die Abweichungen hinsichtlich der Keimrate erklären lassen. Dieser Versuch wurde mit 3 % Saccharose in MS-Agar durchgeführt, da zu der Zeit der Etablierung der Samenalterung zunächst Saccharose-haltiges Medium präferiert wurde. Allerdings ließen sich die Ergebnisse nach Etablierung der künstlichen Samenalterung in späteren Versuchen auch ohne Saccharose mit dem Wildtyp WS bestätigen. Hier lagen die Keimraten von WS nach vier Tagen künstlicher Alterung bei verschiedenen Versuchen einmal bei 13 % (Keimungsreduktion um 87 %) und zweimal bei 3 % (Keimungsreduktionen um 97 %). Dies passt zu der gezeigten Keimungsreduktion von 92 % im Wildtyp Col-0 nach vier Tagen Alterung und Saccharose-haltigem Medium. Da die Keimrate nicht abhängig von dem Saccharose Gehalt ist, wurde in allen folgenden Versuchen MS-Agar ohne Saccharose verwendet.

4.2 Oxidierte Fettsäuren in Col-0 und Lipoxygenase Mutanten Samen nach künstlicher Alterung

4.2.1 Veresterte oxidierte Fettsäuren nach künstlicher Alterung

Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren wird schon länger in Zusammenhang mit der Alterung diskutiert. Dabei kann diese Oxidation einerseits nicht enzymatisch entstehen, durch ROS und freie Radikale, welche sowohl durch exogene als auch durch endogene Prozesse initiiert werden können. Andererseits kann diese Oxidation enzymatisch erfolgen, wobei die Lipoxygenasen eine wichtige Rolle spielen.

Hier sollte untersucht werden, ob auch in der künstlichen Samenalterung durch Lipoxygenasen katalysierte Lipidoxidationen ablaufen. Da von Boca et al. (2014) gezeigt

werden konnte, dass nach vier Tagen künstlicher Samenalterung mehrere veresterte oxidierte Fettsäuren ansteigen, welche als Altersmarker angesehen werden können, sollten die Gehalte der veresterten oxidierten Fettsäuren vor und nach künstlicher Alterung in dem Wildtyp und in verschiedenen Lipoxygenase Mutanten untersucht werden. Hierfür wurden jeweils Samen von dem Wildtyp WS und den 9-Lipoxygenase Mutanten *lox1*, *lox5* und *lox1/5* künstlich für vier Tage gealtert und anschließend extrahiert, um die Gehalte von veresterten oxidierten Fettsäuren in den Samen zu bestimmen.

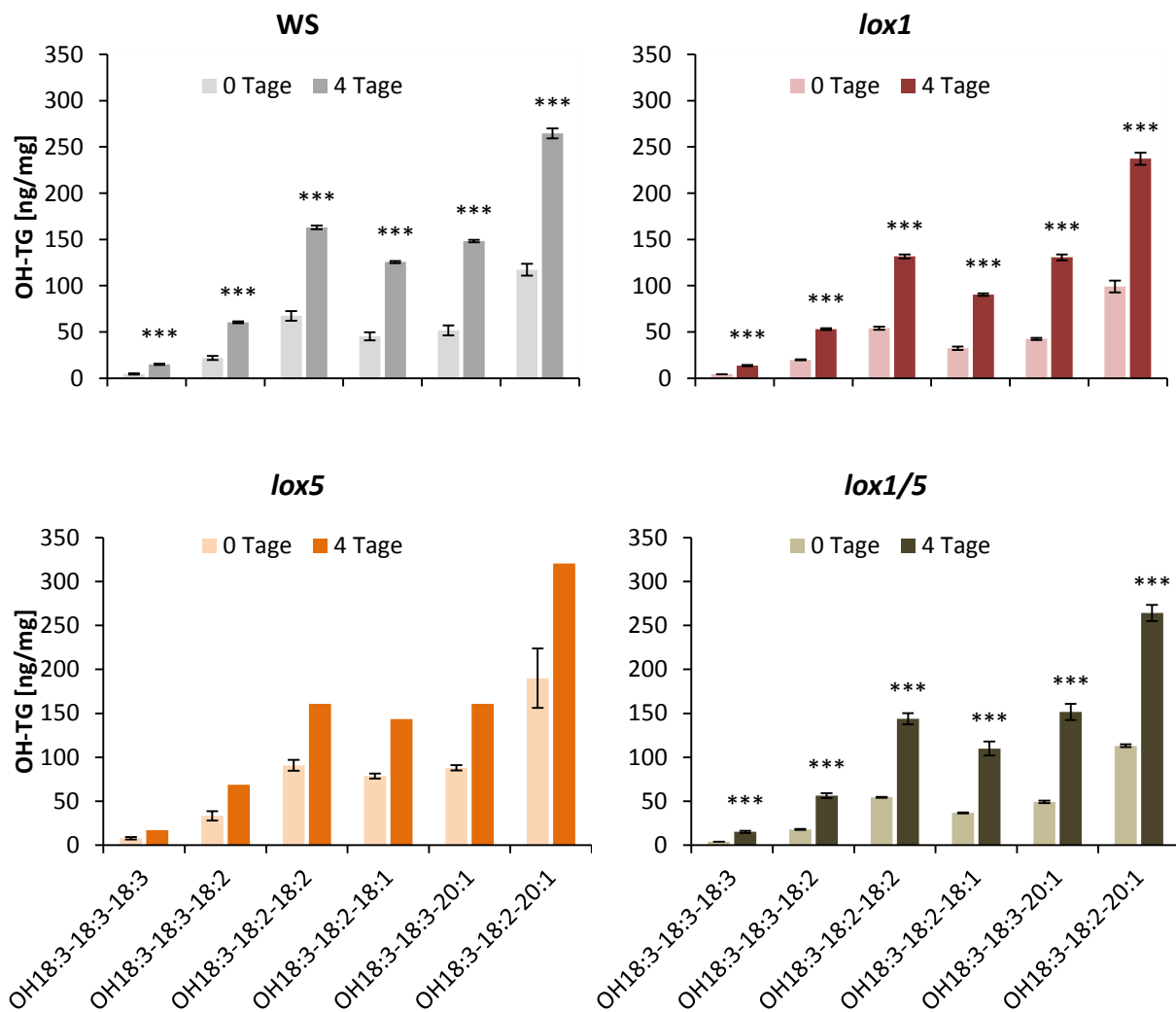


Abbildung 4.2: Gehalte der veresterten oxidierten Fettsäuren im Wildtyp WS und den Mutanten *lox1*, *lox5* und *lox1/5* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 (bei *lox5* nur 2 bei 0 Tagen bzw. 1 bei 4 Tagen) biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Die Daten von *lox5* sind aus einem unabhängigen Experiment. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen 0 und 4 Tagen von jedem OH-TG innerhalb der Mutanten (bis auf *lox5*). (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Tabelle 4.1: Signifikanzen der verschiedenen OH-TGs jeweils zwischen WS und *lox1* bzw. WS und *lox1/5* nach 0 und nach 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.2 dargestellten Daten. (T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

		OH18:3- 18:3-18:3	OH18:3- 18:3-18:2	OH18:3- 18:2-18:2	OH18:3- 18:2-18:1	OH18:3- 18:3-20:1	OH18:3- 18:2-20:1
WS vs <i>lox1</i>	0 Tage			**	**	*	*
	4 Tage		***	***	***	***	**
WS vs <i>lox1/5</i>	0 Tage		*	**	*		
	4 Tage			**	*		

Die Gehalte der verschiedenen OH-TGs liegen beim Wildtyp basal ohne künstliche Alterung zwischen 5 (OH18:3-18:3-18:3) und 117 (OH18:3-18:2-20:1) ng/mg. Nach vier Tagen künstlicher Alterung steigen die Gehalte aller OH-TGs signifikant auf das Zwei- bis Dreifache an. Die basalen OH-TG Werte in den 9-Lipoxygenase Mutanten sind denen des Wildtyps in Bezug auf ihre Gehalte und somit auch das Muster der Verteilung größtenteils ähnlich. Allerdings sind manche OH-TGs basal in *lox1* und *lox1/5* im Vergleich zu Col-0 signifikant niedriger (siehe Tabelle 4.1). Auch in den 9-Lipoxygenase Mutanten *lox1* und *lox1/5* ist ein signifikanter Anstieg der OH-TGs auf das Zwei- bis Dreifache nach vier Tagen künstlicher Alterung zu erkennen. Trotzdem sind die Werte von *lox1/5* und vor allem *lox1* nach vier Tagen signifikant niedriger, als im Wildtyp (siehe Tabelle 4.1). Die *lox5* Mutante zeigt die gleichen Tendenzen wie der Wildtyp, *lox1* und *lox1/5*, auch wenn hier lediglich Anstiege auf das Zweifache zu beobachten sind. Allerdings kann hier aufgrund einer zu geringen Anzahl an biologischen Replikaten keine Signifikanz berechnet werden. Da bei allen Genotypen die basale Verteilung sowie der Anstieg an OH-TGs weitestgehend ähnlich sind, scheinen 9-Lipoxygenasen keine große Rolle bei der Oxidation der Fettsäuren bei künstlicher Alterung zu spielen. Bei einer Wiederholung dieses Versuches konnten die Ergebnisse reproduziert werden, lediglich *lox5* wurde nur einmal untersucht.

Ebenso sollten auch die 13-Lipoxygenase Mutanten *lox2*, *lox3/4*, *lox6* und *lox2/3/4/6* mit ihrem korrespondierenden Wildtyp Col-0 untersucht werden. Somit sollte festgestellt werden, ob die gleichen veresterten oxidierten Fettsäuren auch in diesen Mutanten in gleichem Maße ansteigen. Dies würde bedeuten, dass diese Fettsäuren nicht enzymatisch gebildet werden.

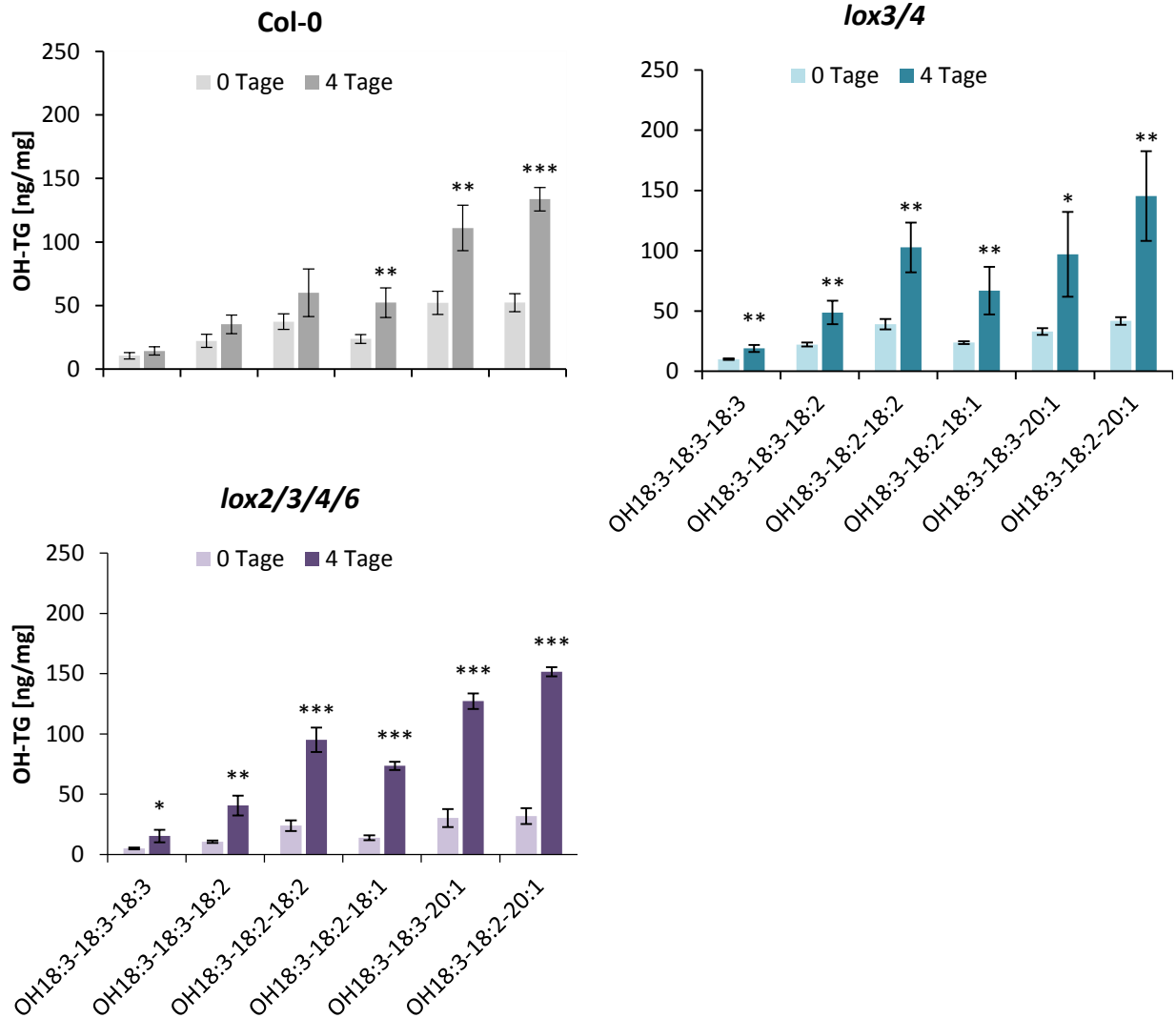


Abbildung 4.3: Gehalte der veresterten oxidierten Fettsäuren im Wildtyp Col-0, *lox3/4* und *lox2/3/4/6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die für dieses Experiment verwendeten Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen zusammen angezogen und alle mit 1,38 mM Methyljasmonat ab dem Blütenstadium behandelt. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen 0 und 4 Tagen von jedem OH-TG innerhalb der Mutanten. (MW+STABW, T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

Tabelle 4.2: Signifikanzen der verschiedenen OH-TGs jeweils zwischen Col-0 und *lox3/4* bzw. Col-0 und *lox2/3/4/6* nach 0 und nach 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.3 dargestellten Daten. (T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

		OH18:3-18:3-18:3	OH18:3-18:3-18:2	OH18:3-18:2-18:2	OH18:3-18:2-18:1	OH18:3-18:3-20:1	OH18:3-18:2-20:1
Col-0 vs <i>lox3/4</i>	0 Tage						
	4 Tage						
Col-0 vs <i>lox2/3/4/6</i>	0 Tage	*	**	*	**	*	*
	4 Tage			*	*		*

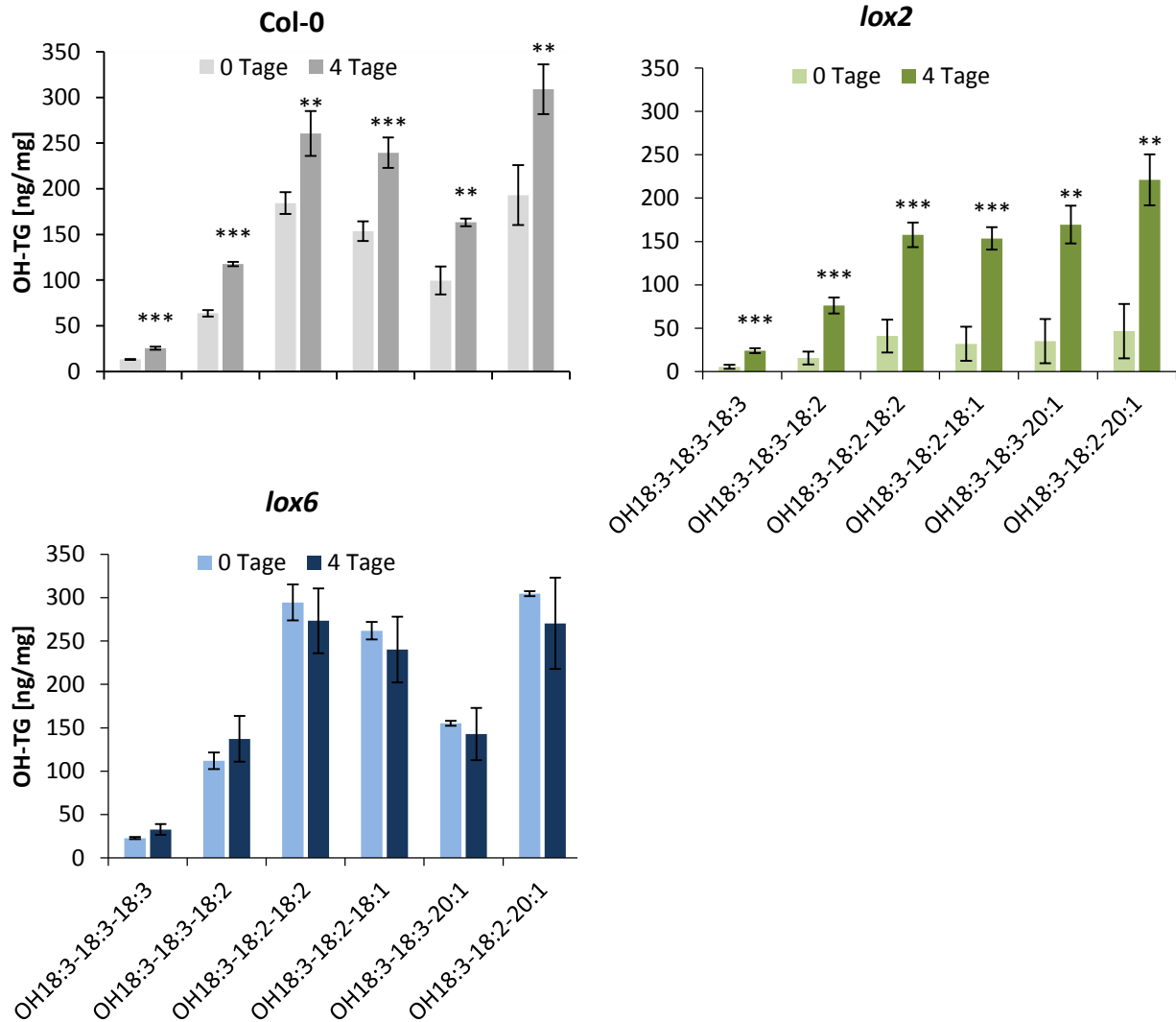


Abbildung 4.4: Gehalte der veresterten oxidierten Fettsäuren im Wildtyp Col-0, *lox2* und *lox6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die für dieses Experiment verwendeten Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen zusammen angezogen. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen 0 und 4 Tagen von jedem OH-TG innerhalb der Mutanten. (MW+STABW, T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

Tabelle 4.3: Signifikanzen der verschiedenen OH-TGs jeweils zwischen Col-0 und *lox2* bzw. Col-0 und *lox6* nach 0 und nach 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.4 dargestellten Daten. (T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

		OH18:3-18:3-18:3	OH18:3-18:3-18:2	OH18:3-18:2-18:2	OH18:3-18:2-18:1	OH18:3-18:3-20:1	OH18:3-18:2-20:1
Col-0 vs <i>lox2</i>	0 Tage	**	***	**	***	**	**
	4 Tage		***	**	**		**
Col-0 vs <i>lox6</i>	0 Tage	***	***	***	***	**	**
	4 Tage						

In Abbildung 4.3 liegen die basalen Werte des Wildtyps zwischen 10 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) und 52 ng/mg (OH18:3-18:3-20:1 und OH18:3-18:2-20:1). Nach vier Tagen Alterung liegen die Gehalte zwischen 14 ng/mg OH18:3-18:3-18:3 und 134 ng/mg OH18:3-18:2-20:1), so dass ein signifikanter Anstieg lediglich in den letzten drei OH-TGs (auf das Zweifache, Zweifache und Dreifache) zu verzeichnen ist. Die basalen Werte der *lox3/4* Mutante ähneln denen des Wildtyps sehr stark, die basalen Werte der *lox2/3/4/6* Mutante sind signifikant geringer als die des Wildtyps (siehe Tabelle 4.2). Nach künstlicher Alterung steigen alle Gehalte der OH-TGs in der *lox3/4* Mutante signifikant an und erreichen höhere Gehalte als bei dem Wildtyp (zwischen 15 ng/mg OH18:3-18:3-18:3 und 152 ng/mg OH18:3-18:2-20:1). Auch in der Quadrupelmutante ist ein signifikanter Anstieg in allen OH-TGs nach Alterung zu beobachten, wodurch alle OH-TGs höher als beim Wildtyp (drei davon signifikant, siehe Tabelle 4.2) sind. Die Daten für Col-0, *lox3/4* und *lox2/3/4/6* konnten in einem weiteren unabhängigen Experiment mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt werden. Allerdings war in diesem Experiment nur ein OH-TG basal signifikant niedriger in der Quadrupelmutante im Vergleich zum Wildtyp und kein OH-TG in *lox2/3/4/6* signifikant höher nach Alterung im Vergleich zu Col-0.

Sowohl die basalen als auch die OH-TG Gehalte nach vier Tagen künstlicher Alterung sind bei dem Wildtyp Col-0 in Abbildung 4.4 deutlich höher als die in Abbildung 4.3. Hier liegen die basalen Werte zwischen 13 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) und 193 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1) und die Gehalte nach Alterung sogar zwischen 25 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) und 309 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1), so dass bei allen OH-TGs ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist. Die basalen Werte der *lox2* Mutante liegen signifikant unter denen des Wildtyps (siehe Tabelle 4.3), sie bewegen sich alle zwischen 5 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) und 47 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1). Nach Alterung steigen zwar alle Werte signifikant an, aber auch diese liegen bei allen OH-TGs (bis auf OH18:3-18:3-18:3) signifikant unter denen des Wildtyps nach vier Tagen Alterung (siehe Tabelle 4.3). Die *lox6* Mutante zeigt eine ähnliche Verteilung der Fettsäuren wie Col-0, sie besitzt allerdings signifikant höhere basale Werte (siehe Tabelle 4.3) und nach Alterung erfolgt kein Anstieg an OH-TGs. Die basalen Werte der *lox6* Mutante ähneln somit eher den Werten des Wildtyps nach vier Tagen Alterung. Dies und die signifikant niedrigeren basalen OH-TG Spiegel in *lox2* werden vor allem deutlich, wenn der Gesamtgehalt der OH-TGs betrachtet wird (siehe Abbildung 4.5). Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt. Bei der ersten Wiederholung dieses Versuches zeigten sich sowohl in

Col-0 als auch in *lox2* die gleichen Tendenzen. Die *lox6* Mutante zeigte bei dem zweiten Versuch einen geringen Anstieg an dem Gesamtgehalt der OH-TGs nach vier Tagen Alterung (auf das 1,3-Fache). Die basalen OH-TG Werte von *lox6* waren jedoch auch in diesem Versuch bei drei von sechs OH-TGs signifikant höher als die von Col-0. Bei der zweiten Wiederholung zeigten sich ebenfalls die gleichen Tendenzen wie in dem ersten Versuch.

Die OH-TG Gehalte in den 9- und 13-Lipoxygenase Mutanten basal und nach Alterung lassen vermuten, dass die OH-TGs Lipoxygenase unabhängig und somit nicht enzymatisch produziert werden. Allerdings könnten die geringeren Gehalte in der *lox2* Mutante auf eine mögliche Beteiligung des LOX2 Enzyms bei der Entstehung von OH-TGs schließen lassen. Zudem scheint LOX6 bei basalen OH-TG Gehalten eine Rolle zu spielen. Außerdem fallen die geringeren Spiegel in der Wildtyp Kontrolle in Abbildung 4.3 auf, wo die Blütenstände von Col-0 wie auch bei den Mutanten *lox3/4* und *lox2/3/4/6* mit Methyljasmonat behandelt wurden.

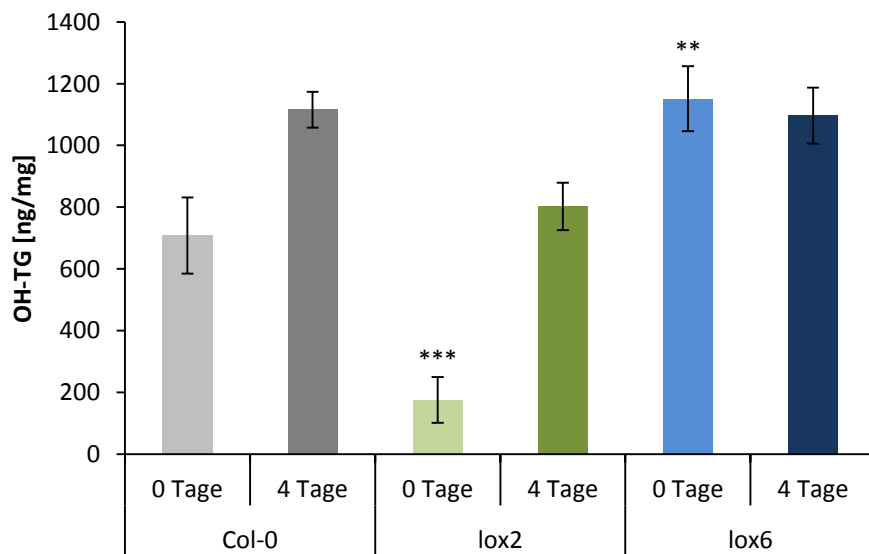


Abbildung 4.5: Gesamtgehalt der veresterten oxidierten Fettsäuren im Wildtyp Col-0, *lox2* und *lox6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Dies sind die gleichen Daten wie in Abbildung 4.4, allerdings zur Verdeutlichung noch einmal anders dargestellt. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 und *lox2* bzw. Col-0 und *lox6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, * $p < 0,002$)**

4.2.2 Hydroxyfettsäuren in Col-0 nach künstlicher Alterung und Hydrolyse

Nach künstlicher Alterung steigen die Gehalte von veresterten oxidierten Fettsäuren an. Um die Annahme zu untermauern, dass dieser Prozess nicht enzymatisch abläuft, wurde im Folgenden eine Lipidextraktion von vier Tage gealterten Wildtyp Samen (Col-0) mit einer anschließenden Hydrolyse durchgeführt, um die Verteilung der verschiedenen Isoformen der durch künstliche Alterung entstandenen oxidierten Fettsäuren zu ermitteln. Dabei gestaltete sich die Hydrolyse schwierig, da die Wiederfindungsrate des Standards sehr gering war (circa 5 %). In Abbildung 4.6 ist der Wildtyp Col-0 dargestellt (für den Wildtyp WS siehe Anhang 6.2 Abbildung 6.2). Aufgrund der gleichmäßigen Anstiege der OH-TGs im Wildtyp und in allen Lipoxygenase Mutanten wurde ein radikalisches, nicht enzymatisches Muster der oxidierten Fettsäuren erwartet.

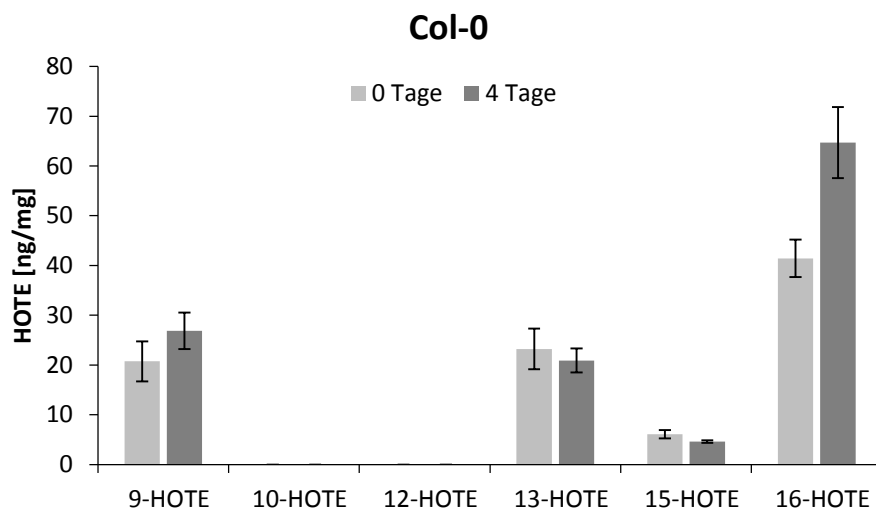


Abbildung 4.6: Gehalte der Hydroxyfettsäuren in Samen des Wildtyps Col-0 nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung und anschließender Hydrolyse. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. (MW+STABW)

Ohne Alterung liegen die 9-HOTE Gehalte im Wildtyp bei 21 ng/mg, 13-HOTE bei 23 ng/mg, 15-HOTE bei 6 ng/mg und 16-HOTE bei 41 ng/mg. Nach vier Tagen künstlicher Alterung ändern sich die Gehalte kaum, lediglich 16-HOTE steigt um 56,2 % auf 65 ng/mg an. 10- und 12-HOTE konnten nicht detektiert werden. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Ergebnisse waren teilweise unterschiedlich. In einem der weiteren Versuche konnten alle Isoformen detektiert werden, aber auch hier gab es keinen Anstieg in den Hydroxyfettsäuren, außer in 9-HOTE von 51 ng/mg auf 136 ng/mg (siehe Anhang 6.1 Abbildung 6.1). In dem anderen Versuch waren die Fehlerbalken zu groß, um eine Aussage

treffen zu können. Insgesamt konnte weder ein radikalisches Muster noch ein starker Anstieg in den Hydroxyfettsäuren nach vier Tagen künstlicher Alterung festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu den starken Anstiegen der veresterten Fettsäuren nach Alterung, welche nach Hydrolyse in Form von freien Fettsäuren immer noch vorliegen sollten. Diese Ergebnisse scheinen allerdings mit experimentellen Problemen zusammenzuhängen, da die Wiederfindungsrate des Standards nach Hydrolyse nur noch circa 5 % betrug. Es wurde in mehreren unabhängigen Experimenten versucht die Methode zu optimieren, allerdings konnten die experimentellen Probleme letztendlich nicht geklärt werden, weshalb diese Ergebnisse nur mit Vorsicht zu betrachten sind.

4.2.3 Freie Hydroxyfettsäuren in Col-0 und Lipoxygenase Mutanten nach künstlicher Alterung

Nachdem die veresterten oxidierten Fettsäuren untersucht worden waren und eine Lipoxygenase Aktivität bei ihrer Bildung zumindest weitgehend ausgeschlossen werden konnte, sollte untersucht werden, ob die Bildung der freien oxidierten Fettsäuren enzymatischen oder nicht enzymatischen Ursprungs ist. Dafür wurde zunächst die Verteilung der verschiedenen Isoformen der freien Hydroxyfettsäuren im Wildtyp Col-0 untersucht. Hierfür wurden ebenfalls Col-0 Samen für vier Tage gealtert und anschließend extrahiert.

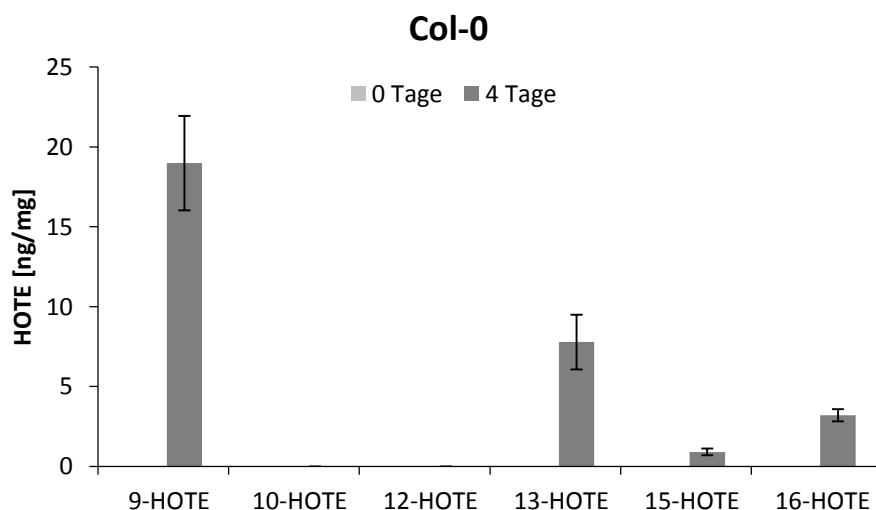


Abbildung 4.7: Gehalte der freien Hydroxyfettsäuren in Samen des Wildtyps Col-0 nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. (MW+STABW)

Basal waren keine freien Fettsäuren detektierbar. Nach vier Tagen künstlicher Alterung weisen die 9-HOTE Gehalte den stärksten Anstieg auf (von 0 ng/mg auf 19 ng/mg). Auch 13-HOTE, 15-HOTE und 16-HOTE steigen jeweils an (auf 8 ng/mg, 1 ng/mg bzw. 3 ng/mg).

Somit steigen nach Alterung im Wildtyp vor allem 9- und 13-Lipoxygenase Produkte an. Dies lässt auf einen enzymatischen Anstieg schließen, da bei einer radikalischen Reaktion 9-, 12-, 13-, und 16-HOTE gleich stark ansteigen würden (Montillet et al., 2004; Mueller et al., 2006; Triantaphylidès et al., 2008). Trotzdem sind auch nicht enzymatische Prozesse bei der Entstehung von freien Fettsäuren bei künstlicher Alterung vorhanden, was durch den Anstieg in 15- und 16-HOTE deutlich wird.

Um eine mögliche Rolle der Lipoxygenasen bei der enzymatischen Entstehung der freien Fettsäuren zu untersuchen, wurden erneut Samen des Wildtyps (WS bzw. Col-0) und der 9-Lipoxygenase Mutanten (*lox1*, *lox5*, *lox1/5*), sowie der 13-Lipoxygenase Mutanten (*lox2*, *lox6*, *lox3/4*, *lox2/3/4/6*) vor und nach vier Tagen künstlicher Alterung extrahiert und der Gehalt verschiedener freier 9- und 13-Lipoxygenase Produkte bestimmt. Dabei wurden auch 9- und 13-Keto-Verbindungen untersucht.

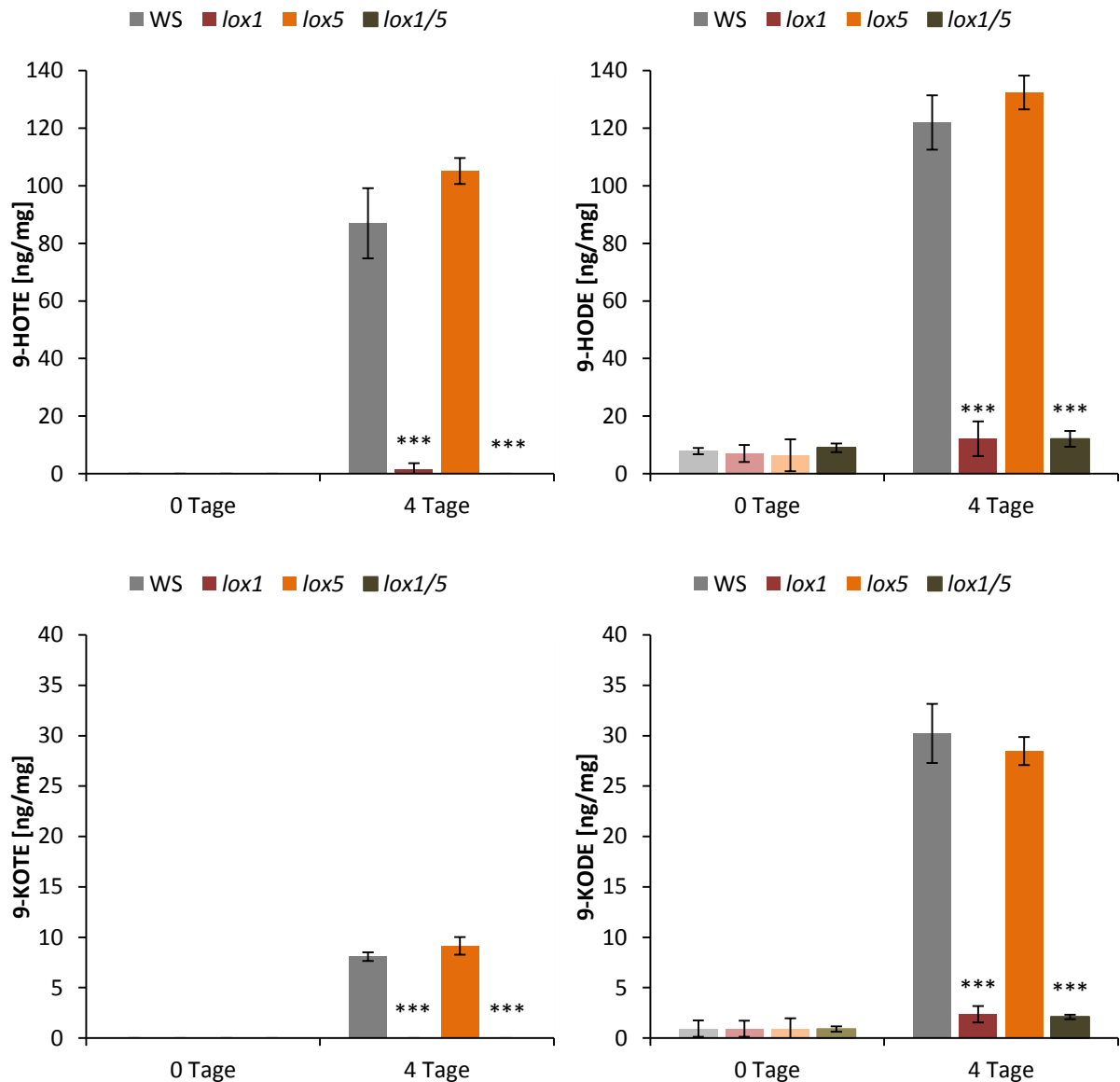


Abbildung 4.8: Gehalte der freien an Position 9 oxidierten Fettsäuren im Wildtyp WS und den Mutanten *lox1*, *lox5* und *lox1/5* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen WS und *lox1*, WS und *lox5*, sowie zwischen WS und *lox1/5* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Basal sind im Wildtyp WS keine 9-HOTE Gehalte detektierbar. Nach vier Tagen Alterung steigt der Gehalt signifikant auf 87 ng/mg an. Auch in den 9-Lipoxygenase Mutanten sind basal keine 9-HOTE Gehalte detektierbar. Nach Alterung findet sich nur in der *lox5* Mutante ein signifikanter Anstieg an 9-HOTE (vergleichbar mit dem Wildtyp), und zwar auf 105 ng/mg. In der *lox1* und *lox1/5* Mutante ist kein Anstieg zu erkennen. Für die anderen 9-Lipoxygenase Produkte 9-HODE, 9-KOTE und 9-KODE sehen die Ergebnisse ähnlich aus.

Auch hier steigen lediglich die Gehalte bei WS und *lox5* nach vier Tagen künstlicher Alterung signifikant an, wobei die Spiegel an 9-HODE mit 122 ng/mg bei WS und mit 132 ng/mg bei *lox5* am höchsten sind. Die 9-KODE und 9-KOTE Gehalte sind geringer, als die 9-HODE und 9-HOTE Gehalte. Diese Ergebnisse zeigen, dass LOX1 für die Bildung der freien 9-Lipoxygenase Produkte verantwortlich zu sein scheint. In der *lox1/5* Mutante ist zwar bei 9-KODE ein signifikanter Anstieg zu sehen, allerdings ist dieser im Vergleich zu den Anstiegen in WS und *lox5* vernachlässigbar. Zudem ist dieser Anstieg höchstwahrscheinlich auf nicht enzymatische Prozesse zurückzuführen. Diese Ergebnisse konnten in einem zweiten Versuch (allerdings ohne *lox5*) und in einem dritten Versuch mit allen Mutanten bestätigt werden.

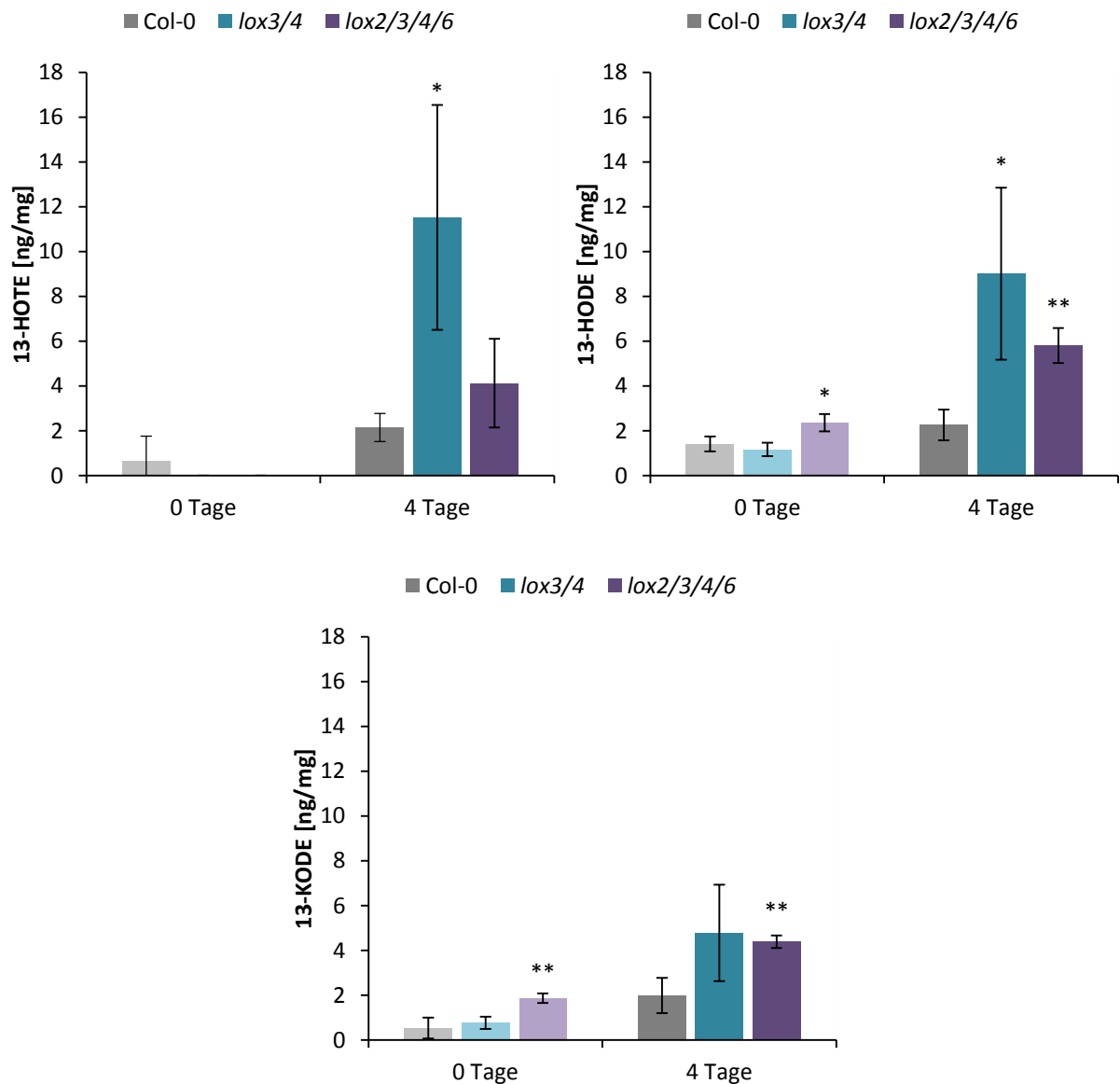


Abbildung 4.9: Gehalte der freien an Position 13 oxidierten Fettsäuren im Wildtyp Col-0 und den Mutanten *lox3/4* und *lox2/3/4/6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die für dieses Experiment verwendeten Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen zusammen angezogen und alle ab dem Blütenstadium mit Methyljasmonat behandelt. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 und *lox3/4* bzw. Col-0 und *lox2/3/4/6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Um eine Bildung von Samen in den sonst männlich sterilen Mutanten zu gewährleisten, wurden diese (wie auch Col-0 als Kontrolle) ab ihrer Blütephase mit 1,38 mM Methyljasmonat besprüht. Basal sind die freien 13-Lipoxygenase Produkte 13-HODE, 13-HOTE und 13-KODE (13-KOTE konnte nicht gemessen werden) mit 1 ng/mg sehr gering. Nach vier Tagen Alterung steigen sie jeweils nur wenig, und zwar auf 2 ng/mg an. Die *lox3/4* Mutante zeigt basal die gleichen Werte wie der Wildtyp, nur von 13-HOTE konnten keine

Gehalte detektiert werden. Nach Alterung steigen alle Gehalte der freien Fettsäuren in *lox3/4* signifikant an. Zudem sind nach künstlicher Alterung die 13-HOTE (12 ng/mg) und 13-HODE (9 ng/mg) Gehalte bei *lox3/4* signifikant höher als bei dem Wildtyp Col-0. Die Quadrupelmutante dagegen weist basal im Vergleich zu Col-0 signifikant höhere 13-HODE (2 ng/mg) und 13-KODE (2 ng/mg) Gehalte auf. 13-HOTE konnte in *lox2/3/4/6* basal nicht detektiert werden. Nach vier Tagen künstlicher Alterung steigen auch in der Quadrupelmutante alle drei oxidierten Fettsäuren signifikant an, wobei die Werte dennoch unter denen von *lox3/4* liegen. Trotzdem sind die Gehalte an 13-HODE (6 ng/mg) und 13-KODE (4 ng/mg) in der Quadrupelmutante nach Alterung signifikant höher als im Wildtyp. Insgesamt ist der Anstieg an freien oxidierten Fettsäuren in den Mutanten *lox3/4* und *lox2/3/4/6* nach vier Tagen künstlicher Alterung höher als im Wildtyp. Die Anstiege an oxidierten Fettsäuren in der *lox2/3/4/6* Mutante, in welcher alle vier 13-Lipoxygenasen fehlen, lassen sich durch nicht enzymatische Prozesse erklären. Bei der *lox3/4* Mutante, bei welcher LOX2 und LOX6 noch vorhanden sind, setzen sich die Gehalte an freien oxidierten Fettsäuren vermutlich sowohl durch enzymatische als auch durch nicht enzymatische Produkte zusammen. Dennoch sind die niedrigeren Spiegel an freien oxidierten Fettsäuren im Wildtyp auffallend.

Zudem sollten die Einzelmutanten betrachtet werden, um eine mögliche Beteiligung dieser Lipoxygenasen an den Gehalten der freien oxidierten Fettsäuren nach künstlicher Alterung zu untersuchen.

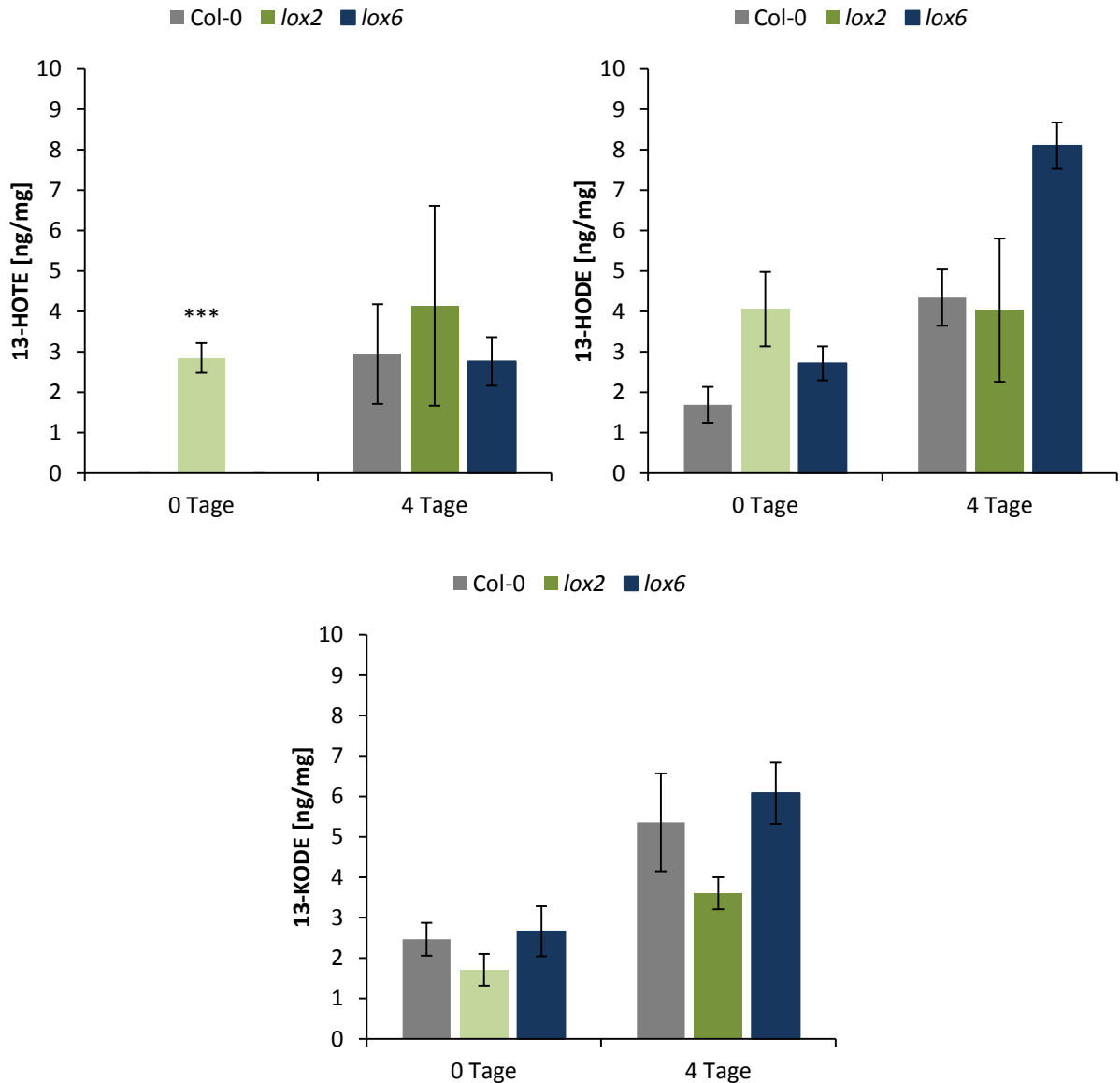


Abbildung 4.10: Gehalte der freien an Position 13 oxidierten Fettsäuren im Wildtyp Col-0 und den Mutanten *lox2* und *lox6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 und *lox2* bzw. Col-0 und *lox6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Basal liegen die 13-HODE und 13-KODE Gehalte im Wildtyp Col-0 bei 2 ng/mg. 13-HOTE konnte basal nicht detektiert werden. Nach vier Tagen künstlicher Alterung steigen 13-HODE und 13-KODE im Wildtyp auf 4 ng/mg bzw. 5 ng/mg an. 13-HOTE steigt signifikant auf 3 ng/mg an. Die basalen *lox2* und *lox6* Werte von 13-HODE und 13-KODE sind ähnlich denen des Wildtyps. 13-HOTE konnte allerdings nur in *lox2* detektiert werden. Nach Alterung ist der Anstieg an 13-HOTE im Wildtyp und *lox6* signifikant, bei *lox2* allerdings nicht. Bei 13-HODE gibt es lediglich in *lox6* einen signifikanten Anstieg nach Alterung. 13-KODE dagegen steigt in

allen Genotypen nach Alterung signifikant an. Wenn die Gehalte nach vier Tagen Alterung unter den Genotypen verglichen werden, fällt auf, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt. Zusammenfassend scheint es so, als ob die 13-Lipoxygenasen während der künstlichen Samenalterung keine wichtige Rolle bei der Generierung von freien oxidierten Fettsäuren spielen. Da aber in der *lox2* Mutante die Gehalte von 13-HOTE und 13-HODE nach Alterung nicht ansteigen, könnte vielleicht eine geringe Beteiligung des LOX2 Enzyms bei der Produktion von freien Hydroxyfettsäuren nach Alterung vorliegen.

4.3 Exogene Applikation von Hydroxyfettsäuren

Es konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass künstlich gealterte Samen eine schlechtere Keimrate aufweisen und bei künstlicher Alterung mehrere freie oxidierte Fettsäuren ansteigen. Um zu untersuchen, ob die bei der Alterung ansteigenden freien Fettsäuren einen hemmenden Einfluss auf die Samenkeimung haben, sollten nun Wildtyp Samen mit den freien Fettsäuren behandelt werden. Die Behandlungen wurden mit den bei künstlicher Alterung ansteigenden freien oxidierten Fettsäuren 9-HOTE, 9-HODE, 9-KODE und 13-HOTE, 13-HODE sowie 13-KODE durchgeführt. Zum Vergleich wurden die nicht oxidierten freien Fettsäuren Linolsäure sowie α -Linolensäure verwendet. Für diese Versuche wurden nicht gealterte Wildtyp Samen entweder auf mit den verschiedenen Metaboliten getränkten Filterpapieren ausgelegt (Col-0), oder erst mit den jeweiligen Metaboliten flüssig inkubiert und dann auf MS-Agarplatten ohne Saccharose ausgelegt (WS). Alle Platten wurden bei Kurztagbedingungen inkubiert und die Keimraten jeden Tag über einen Zeitraum von acht Tagen ausgezählt.

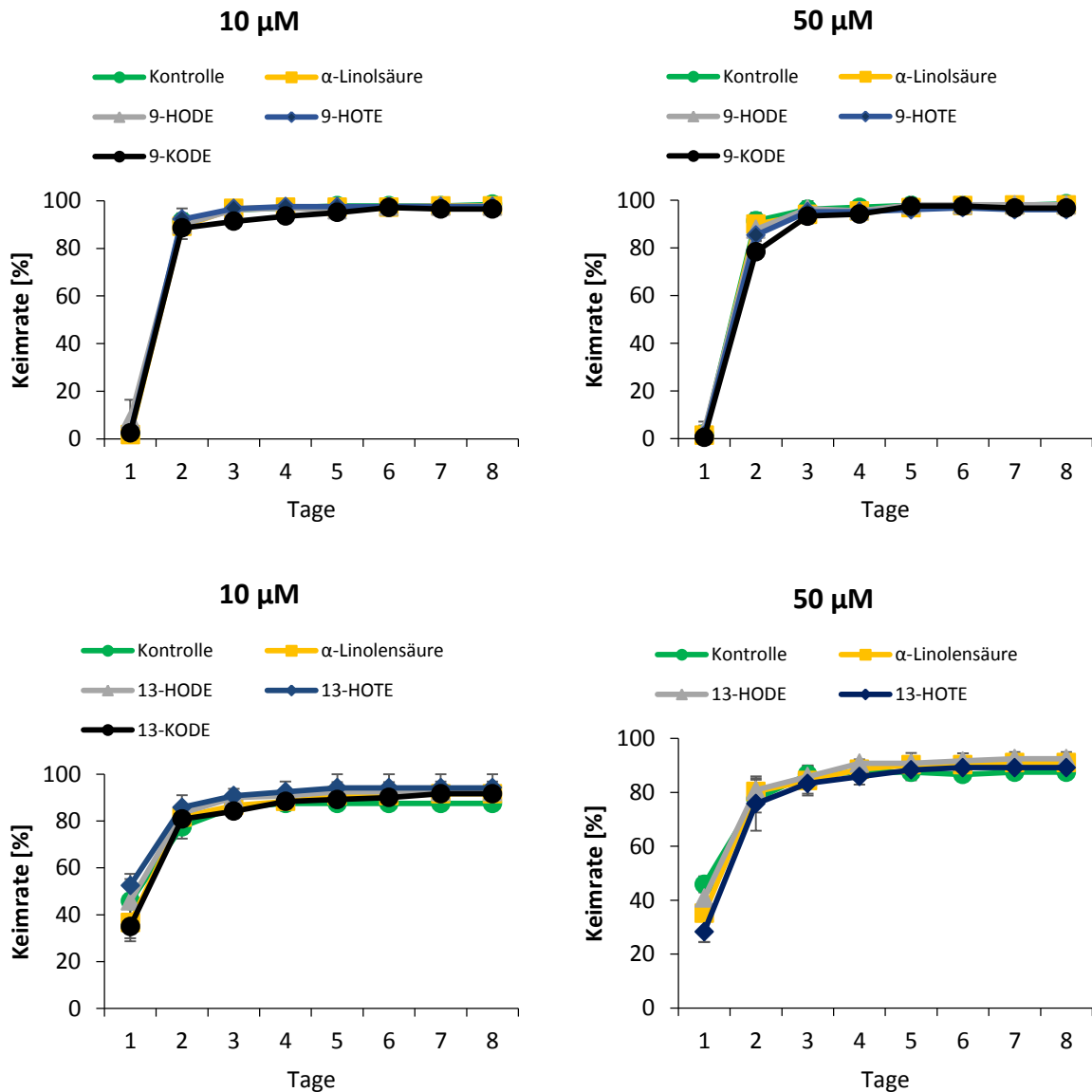


Abbildung 4.11: Keimraten des Wildtyps WS, behandelt mit freien an Position 9 oxidierten Fettsäuren, und des Wildtyps Col-0, behandelt mit freien an Position 13 oxidierten Fettsäuren. Zudem wurden sowohl Linolsäure (im Vergleich zu den 9-Lipoxygenase Produkten) als auch α-Linolensäure (im Vergleich zu den 13-Lipoxygenase Produkten) untersucht. WS Samen wurden zunächst in Lösungen mit den jeweiligen freien Fettsäuren für 16 h inkubiert und anschließend auf MS-Agarplatten ausgelegt und 8 Tage lang ausgezählt. Col-0 Samen wurden auf mit den jeweiligen freien oxidierten Fettsäuren getränkten Whatman Filterpapieren ausgelegt und ebenfalls 8 Tage lang ausgezählt. Die Behandlungen erfolgten jeweils mit 10 µM bzw. 50 µM und als Lösemittelkontrolle wurde 1 % Methanol (bei WS) sowie 0,86 % Methanol (bei Col-0) verwendet. Es wurden jeweils drei Platten á 40 Samen ausgelegt. (MW+STABW)

Die Kontrollbehandlung zeigt bei dem Versuch mit den 9-Lipoxygenase Produkten an Tag eins noch kaum gekeimte Samen. An Tag zwei liegt die Keimrate allerdings schon bei 90 % und steigt dann langsam weiter bis Tag acht, an dem die Keimrate 99 % beträgt. Die Keimraten der mit 10 µM und 50 µM 9-HODE, 9-HOTE, 9-KODE und Linolsäure behandelten Wildtyp Samen zeigen kaum Abweichungen zur Kontrolle. Lediglich mit 9-KODE behandelte

Samen zeigen bei 10 μM bis zum Tag fünf und bei 50 μM an Tag zwei eine etwas geringere Keimrate als die Kontrolle.

Bei den mit 13-Lipoxygenase Produkten behandelten Wildtyp Samen liegt die Keimrate an Tag eins bei 46 % und steigt an Tag zwei auf 78 %. Ab Tag vier liegt die Keimrate bei 88 % und stagniert dort bis Tag acht. Auch bei der Behandlung mit 13-Lipoxygenase Produkten sowie α -Linolensäure weichen die Behandlungen nicht signifikant von der Kontrolle ab. Lediglich bei 10 μM scheint die Keimrate der mit 13-HOTE behandelten Samen geringfügig höher zu sein.

Somit konnte durch die Behandlung von 9- und 13-Lipoxygenase Produkten bei den Wildtypen keine Hemmung der Keimung erreicht werden.

4.4 Keimraten von Lipoxygenase Mutanten nach künstlicher Alterung

Um den Einfluss der bei der künstlichen Alterung entstehenden Metabolite genauer zu untersuchen, wurde ein weiterer Ansatz gewählt. Es sollten nun verschiedene 9-Lipoxygenase Mutanten (*lox1*, *lox5*, *lox1/5*) und 13-Lipoxygenase Mutanten (*lox2*, *lox6*, *lox3/4*, *lox2/3/4/6*) in Bezug auf ihre Keimraten ohne und nach vier Tagen Alterung analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob möglicherweise das Fehlen bestimmter freier Fettsäuren, die bei der Alterung entstehen, einen Einfluss auf die Keimfähigkeit hat.

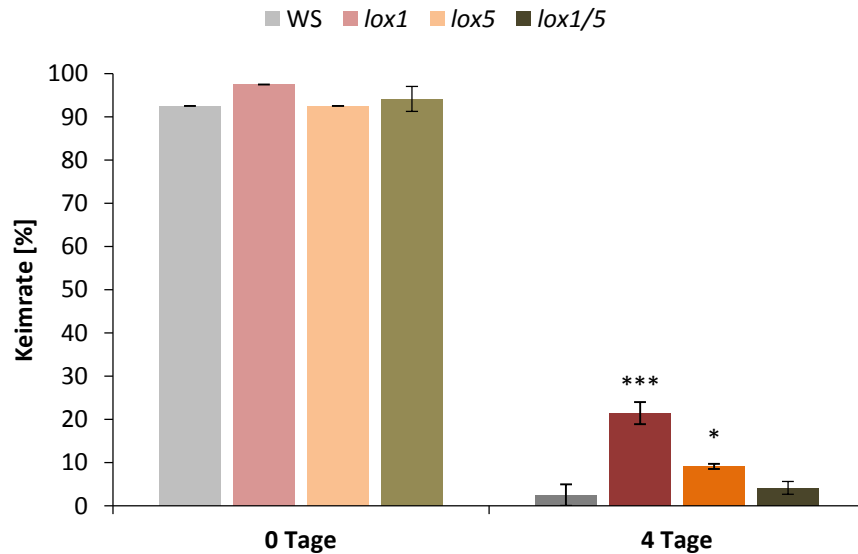


Abbildung 4.12: Keimraten an Tag 7 von dem Wildtyp WS und den 9-Lipoxygenase Mutanten *lox1*, *lox5* und *lox1/5* ohne und mit 4 Tagen künstlicher Alterung auf MS-Agarplatten. Es wurden jeweils drei Platten á 40 Samen ausgezählt. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen WS und *lox1*, WS und *lox5*, sowie zwischen WS und *lox1/5* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Die Keimrate des Wildtyps WS beträgt nach sieben Tagen 93 %. Nach vier Tagen künstlicher Alterung liegt die Keimrate nach sieben Tagen nur noch bei 3 %, was einer Keimungsreduktion von 97 % entspricht. Die basalen Keimraten der 9-Lipoxygenase Mutanten sind vergleichbar mit der des Wildtyps. Auch bei der *lox5* und *lox1/5* Mutante sinken die Keimraten nach Alterung deutlich (um 90 % und 96 %) auf 9 % und 4 %. Lediglich *lox1* besitzt nach Alterung immer noch eine Keimrate von 21 %, da die Keimfähigkeit nur um 78 % zurückgeht. In circa 2/3 der Versuche konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Auch mit einer anderen *lox1* Mutante im Col-0 Hintergrund konnte dieser Effekt wiederholt werden (siehe Anhang 6.3 Abbildung 6.3).

Bei den 13-Lipoxygenase Mutanten wurden einerseits Col-0, *lox2* und *lox6* untersucht und andererseits Col-0, *lox3/4* und *lox2/3/4/6*. Bei diesen unabhängigen Experimenten wurden die Pflanzen jeweils gleich angezogen und behandelt. Da *lox3/4* und *lox2/3/4/6* Mutanten männlich steril sind und keine Samen ausbilden können, wurden sie zusammen mit der Col-0 Kontrolle ab dem Blütenstadium mit 1,38 mM Methyljasmonat besprüht, um Samen zu generieren.

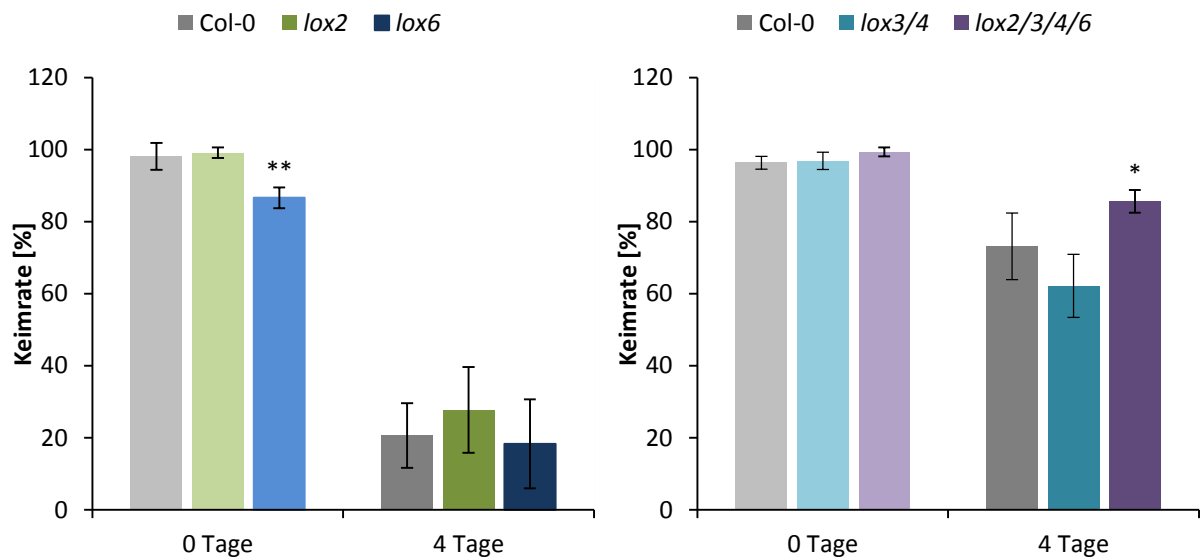


Abbildung 4.13: Keimraten an Tag 8 von dem Wildtyp Col-0 und den 13-Lipoxygenase Mutanten *lox2*, *lox6*, *lox3/4* und *lox2/3/4/6* ohne und mit 4 Tagen künstlicher Alterung auf MS-Agarplatten. Dies sind zwei unabhängige Experimente, bei denen die Pflanzen jeweils gleich angezogen und behandelt wurden. Es wurden jeweils vier Platten á 40 Samen ausgezählt. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 und *lox2* bzw. Col-0 und *lox6*, sowie zwischen Col-0 und *lox3/4* bzw. Col-0 und *lox2/3/4/6* nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Basal liegt die Keimrate der nicht mit Methyljasmonat behandelten Wildtyp Kontrolle bei 98 %. Nach vier Tagen künstlicher Alterung sinkt die Keimrate um 79 % auf 21 %. Die *lox2* Mutante weist eine ähnliche basale Keimrate auf, wobei die basale Keimrate der *lox6* Mutante mit 87 % niedriger ist, wodurch sich auch die niedrigste Keimrate mit 18 % nach Alterung erklären lässt. Während bei Col-0 und *lox6* die Keimraten nach Alterung um 79 % abnehmen, verzeichnet *lox2* lediglich eine Abnahme von 72 % in der Keimfähigkeit.

Im Vergleich dazu nimmt die mit Methyljasmonat behandelte Col-0 Kontrolle, welche basal bei 96 % liegt, nach vier Tagen Alterung nur um 24 % ab. Die *lox3/4* und *lox2/3/4/6* Mutanten weisen ähnliche basale Keimraten wie der Wildtyp auf (97 % bzw. 99 %). Nach Alterung verhalten sich *lox3/4* und *lox2/3/4/6* ähnlich dem ebenfalls mit Methyljasmonat behandelten Wildtyp. Bei *lox3/4* sinkt die Keimfähigkeit um 36 % und bei *lox2/3/4/6* lediglich um 14 %. Somit ist nach vier Tagen Alterung die Keimfähigkeit der mit Methyljasmonat behandelten Wildtyp Kontrolle, sowie bei den Mutanten erheblich höher, als bei den nicht vorher mit Methyljasmonat behandelten Genotypen. Somit scheint eine vorherige Methyljasmonatbehandlung der blühenden Pflanzen die Lebensfähigkeit der Samen bei

künstlicher Alterung zu begünstigen. Die Ergebnisse dieser beiden unabhängigen Experimente konnten jeweils in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

Aufgrund dieser gravierenden Unterschiede in der Keimungsfähigkeit von Samen ohne und mit vorheriger Methyljasmonatbehandlung und aufgrund der bereits getätigten Beobachtung von geringeren oxidierten Fettsäure Spiegeln in Samen von mit Methyljasmonat behandelten Col-0 Pflanzen (siehe Abbildungen 4.3 und 4.9), sollte nun der Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimrate, sowie die Gehalte der oxidierten Fettsäuren im nächsten Kapitel genauer untersucht werden.

4.5 Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimrate und Bildung von oxidierten Fettsäuren in Col-0

4.5.1 Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimrate von Col-0

Um den Einfluss von Methyljasmonat auf die Keimfähigkeit des Wildtyps zu untersuchen, wurden Col-0 Pflanzen ab ihrer Blütephase mit 1,38 mM Methyljasmonat besprüht. Nach der Ernte der Samen und einer Vernalisationsphase von einer Woche wurden sie zusammen mit Samen von nicht besprühten Col-0 Pflanzen für vier Tage gealtert und anschließend auf MS-Agarplatten ausgelegt. Die Samen wurden für acht Tage bei Kurztagbedingungen inkubiert und die Keimrate an Tag acht bestimmt.

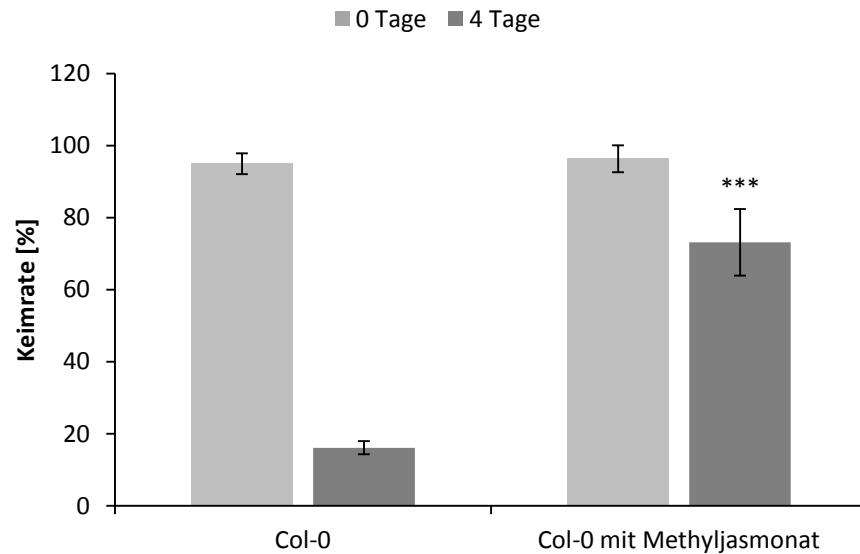


Abbildung 4.14: Keimraten von Col-0 Samen und Samen von mit 1,38 mM Methyljasmonat besprühten Col-0 Pflanzen vor und nach 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 4 Platten á 40 Samen auf MS-Agarplatten ausgelegt an Tag 8 ausgezählt. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 unbehandelt und Col-0 behandelt nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Die Keimrate der nicht gealterten Col-0 Samen ohne Methyljasmonatbehandlung liegt bei 95 %. Nach vier Tagen künstlicher Alterung sinkt die Keimrate um 83 % auf 16 %. Ohne Alterung ist die Keimrate der Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen ähnlich hoch (96 %) wie bei den Col-0 Samen von unbehandelten Pflanzen. Nach vier Tagen Alterung liegt die Keimrate allerdings bei 73 % und ist somit signifikant höher, als bei dem vier Tage gealterten unbehandelten Wildtyp. Dies unterstützt die Annahme, dass eine vorherige Methyljasmonatbehandlung der blühenden Pflanzen die Lebensfähigkeit der Samen bei künstlicher Alterung verlängert. Diese Ergebnisse konnten in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt werden.

Darüber hinaus wurden Col-0 Samen zunächst mit 1,38 mM Methyljasmonat besprüht, dann in einem Exikkator getrocknet und entweder für vier Tage bei 4 °C gelagert, oder für vier Tage künstlich gealtert. Anschließend wurden die Keimraten bestimmt. Dabei wurden allerdings weder basal noch nach Alterung Unterschiede zwischen den mit Methyljasmonat und zur Kontrolle mit Sprühlösung (ddH₂O mit 0,1 % Tween 20) behandelten Samen deutlich (siehe Anhang 6.4 Abbildung 6.4).

4.5.2 Veresterte und freie oxidierte Fettsäuren in Col-0 Samen nach Methyljasmonatbehandlung mit und ohne künstliche Alterung

Zudem wurden die Samen der unbehandelten und der mit Methyljasmonat besprühten Col-0 Pflanzen ohne und nach vier Tagen künstlicher Alterung extrahiert und die veresterten sowie die freien Fettsäuren gemessen. Es sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Methyljasmonat Auswirkungen auf die Fettsäure Gehalte in den Samen mit und ohne Alterung hat.

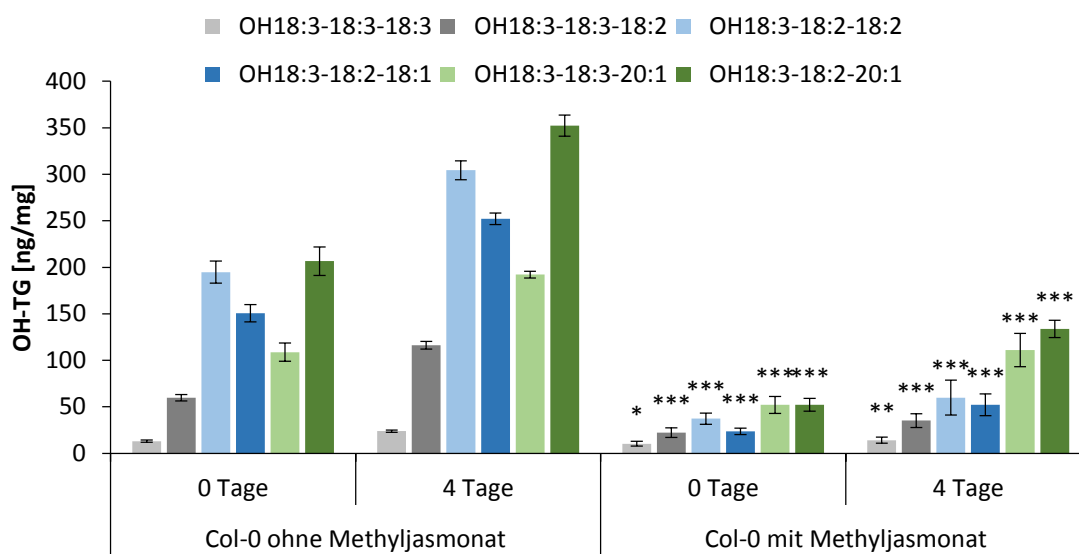


Abbildung 4.15: Gehalte von veresterten oxidierten Fettsäuren in Col-0 Samen von Pflanzen mit und ohne 1,38 mM Methyljasmonatbehandlung, nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Ergebnisse stammen von 2 unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 ohne Methyljasmonat und Col-0 mit Methyljasmonat nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

Tabelle 4.4: Signifikanzen der verschiedenen OH-TGs jeweils zwischen Col-0 0 und 4 Tagen, ohne und mit Methyljasmonatbehandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.15 dargestellten Daten. (T-test: * p<0,05, ** p<0,02, *** p<0,002)

	OH18:3-18:3-18:3	OH18:3-18:3-18:2	OH18:3-18:2-18:2	OH18:3-18:2-18:1	OH18:3-18:3-20:1	OH18:3-18:2-20:1
Col-0 ohne Methyljasmonat 0 vs 4 Tage	***	***	***	***	***	***
Col-0 mit Methyljasmonat 0 vs 4 Tage				**	**	***

Basal liegen die OH-TG Werte der Samen von nicht mit Methyljasmonat behandelten Col-0 Pflanzen zwischen 13 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) und 207 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1). Im Vergleich dazu sind die Gehalte bei Col-0 Samen, deren Pflanzen vorher mit Methyljasmonat behandelt wurden, signifikant geringer (siehe Abbildung 4.15). Hier reichen die Werte nur von 10 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) bis zu den zwei höchsten Werten mit 52 ng/mg (OH18:3-18:3-20:1 und OH18:3-18:2-20:1). Nach vier Tagen künstlicher Alterung steigen bei der Col-0 Kontrolle alle OH-TGs signifikant auf Werte zwischen 24 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) bis zu 352 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1) an (siehe Tabelle 4.4). Bei den Col-0 Samen von zuvor mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen steigen die Werte zwar auch teilweise signifikant nach vier Tagen Alterung an (siehe Tabelle 4.4), sie bleiben allerdings mit 14 ng/mg (OH18:3-18:3-18:3) bis zu 134 ng/mg (OH18:3-18:2-20:1) signifikant unter den Werten der vier Tage gealterten Col-0 Samen ohne Methyljasmonatbehandlung bzw. die Gehalte sind sogar noch geringer als die basalen Werte der unbehandelten Col-0 Kontrolle (siehe Abbildung 4.15). Diese Daten stammen zwar von zwei unabhängigen Experimenten, wurden allerdings mittlerweile in einem Experiment mit gleichen Ergebnissen wiederholt.

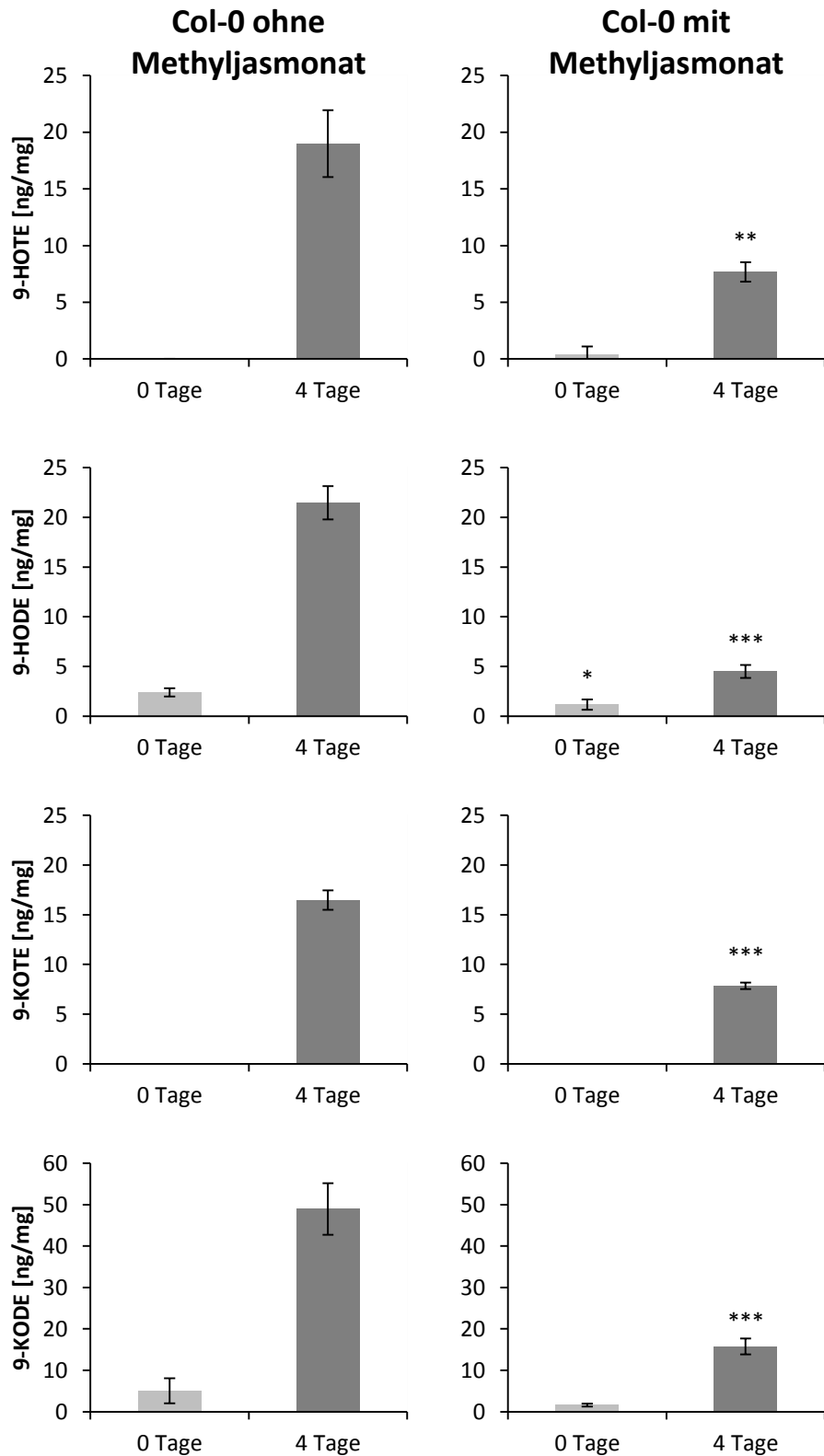


Abbildung 4.16: Freie an Position 9 oxidierte Fettsäuren im Wildtyp Col-0 mit und ohne vorherige Behandlung der Pflanzen mit 1,38 mM Methyljasmonat nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Ergebnisse stammen von 2 unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 Samen von Pflanzen mit und ohne Methyljasmonatbehandlung nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Tabelle 4.5: Signifikanzen zwischen Col-0 0 und 4 Tagen, jeweils ohne und mit Methyljasmonatbehandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.16 dargestellten Daten. (T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, * $p < 0,002$)**

	9-HOTE	9-HODE	9-KOTE	9-KODE
Col-0 ohne Methyljasmonat 0 vs 4 Tage	***	***	***	***
Col-0 mit Methyljasmonat 0 vs 4 Tage	***	**	***	***

Basal liegen die Gehalte der freien an Position 9 oxidierten Fettsäuren im nicht behandelten Wildtyp zwischen 0 (9-HOTE, 9-KOTE) und 5 ng/mg (9-KODE). Nach vier Tagen künstlicher Alterung steigen alle oxidierten Fettsäuren signifikant an (siehe Tabelle 4.5). Am höchsten ist der Gehalt von 9-KODE nach vier Tagen künstlicher Alterung mit 49 ng/mg (auf das Zehnfache) und den niedrigsten Wert weist 9-KOTE auf (16 ng/mg). 9-HOTE und 9-HODE liegen mit 19 ng/mg und 21 ng/mg nah beieinander. Die Samen der vorher mit Methyljasmonat behandelten Col-0 Pflanzen weisen ähnliche basale Gehalte an oxidierten Fettsäuren auf, lediglich 9-HODE weist signifikant niedrigere Spiegel in den Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen auf (siehe Abbildung 4.16). Die basalen Gehalte liegen in den Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen zwischen 0,4 ng/mg und 2 ng/mg. Nach vier Tagen Alterung zeigen sich allerdings große Unterschiede. Der Gehalt von 9-KODE ist zwar auch hier am höchsten, beträgt aber nur 16 ng/mg (auf das Achtfache). 9-HOTE und 9-KOTE steigen lediglich auf 8 ng/mg und 9-HODE weist mit 4 ng/mg den niedrigsten Gehalt auf. Somit sind alle freien an Position 9 oxidierten Fettsäuren, auch wenn sie nach vier Tagen Alterung signifikant ansteigen (siehe Tabelle 4.5), in den Samen von vorher mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen signifikant niedriger als in den nicht behandelten Samen (siehe Abbildung 4.16).

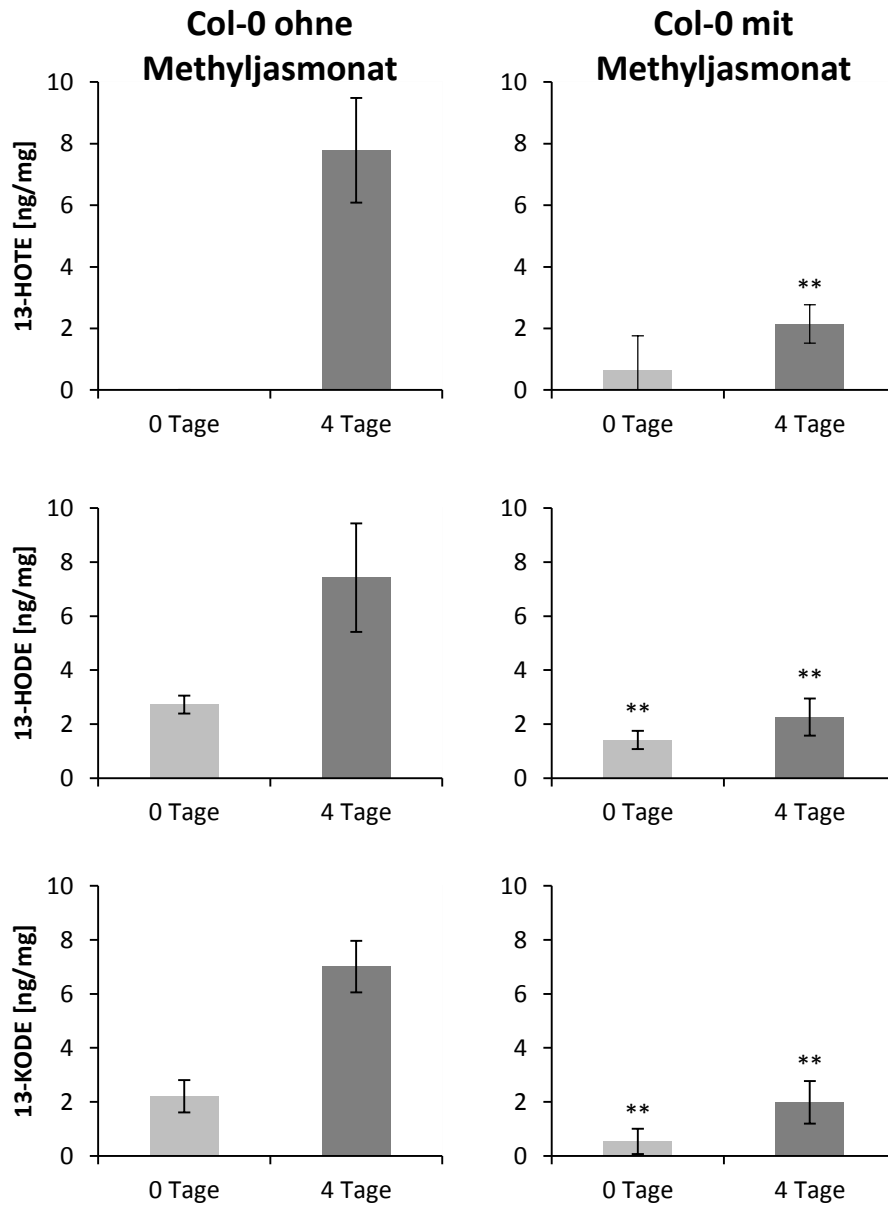


Abbildung 4.17: Freie an Position 13 oxidierte Fettsäuren im Wildtyp Col-0 mit und ohne vorherige Behandlung der Pflanzen mit 1,38 mM Methyljasmonat nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Die Ergebnisse stammen von 2 unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 Samen von Pflanzen mit und ohne Methyljasmonatbehandlung nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung. (MW+STABW, T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Tabelle 4.6: Signifikanzen zwischen Col-0 0 und 4 Tagen, jeweils ohne und mit Methyljasmonatbehandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die in Abbildung 4.17 dargestellten Daten. (T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

	13-HOTE	13-HODE	13-KODE
Col-0 ohne Methyljasmonat 0 vs 4 Tage	***	**	**
Col-0 mit Methyljasmonat 0 vs 4 Tage			

Basal sind auch die an Position 13 oxidierten Fettsäuren sehr niedrig und liegen zwischen 0 ng/mg und 3 ng/mg. Nach vier Tagen Alterung steigen sie weniger stark an als die 9-Hydroxyfettsäuren, sie erreichen lediglich Gehalte von 7 ng/mg (13-HODE, 13-KODE) bzw. 8 ng/mg (13-HOTE). Trotzdem sind diese Anstiege für alle an Position 13 oxidierten Fettsäuren signifikant (siehe Tabelle 4.6). Die basalen Werte der oxidierten Fettsäuren in den Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen liegen alle bei 1 ng/mg, damit sind 13-HODE und 13-KODE signifikant niedriger als in den nicht behandelten Samen (siehe Abbildung 4.17). Nach Alterung steigen die Werte nur geringfügig auf jeweils 2 ng/mg an. Die Gehalte an freien oxidierten Fettsäuren sind jeweils in den Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen signifikant niedriger, als in den nicht behandelten Samen (siehe Abbildung 4.17).

Somit scheint eine Methyljasmonatbehandlung von Col-0 Pflanzen dazu zu führen, dass in den daraus gewonnenen Samen bei künstlicher Alterung weniger freie an Position 9 und 13 oxidierte Fettsäuren gebildet werden.

4.6 Lokalisation der Lipoxygenase 6 in Blättern und Wurzeln

Da an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg bereits einige interessante Ergebnisse im Hinblick auf die Funktionen von LOX6 gefunden wurden, soll im Rahmen dieser Arbeit nun spezieller auf die LOX6 und ihre Lokalisation in *Arabidopsis thaliana* eingegangen werden.

4.6.1 GUS Färbungen in LOX6pGUS Keimlingen und Erdpflanzen

Über die Lokalisation von 13-Lipoxygenasen sind bereits einige Theorien veröffentlicht worden. Alle vier 13-Lipoxygenasen scheinen in Plastiden lokalisiert zu sein. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass der erste Teil der Jasmonsäurebiosynthese, an welcher die 13-Lipoxygenasen beteiligt sind, in den Chloroplasten der Blätter stattfindet. Jedoch konnten von Grebner et al. (2013) gezeigt werden, dass Jasmonsäure ebenso in den Wurzeln unabhängig von den Blättern produziert werden kann. Dies geschieht allerdings ausschließlich durch LOX6 (Grebner et al., 2013). Da in den Wurzeln keine Chloroplasten vorhanden sind, ist es möglich, dass LOX6 dort in anderen Plastiden lokalisiert ist. Deshalb sollte anhand von GUS Färbungen vor allem in Wurzeln von auf MS-Agarplatten angezogenen LOX6pGUS Keimlingen die LOX6 Lokalisation untersucht werden.

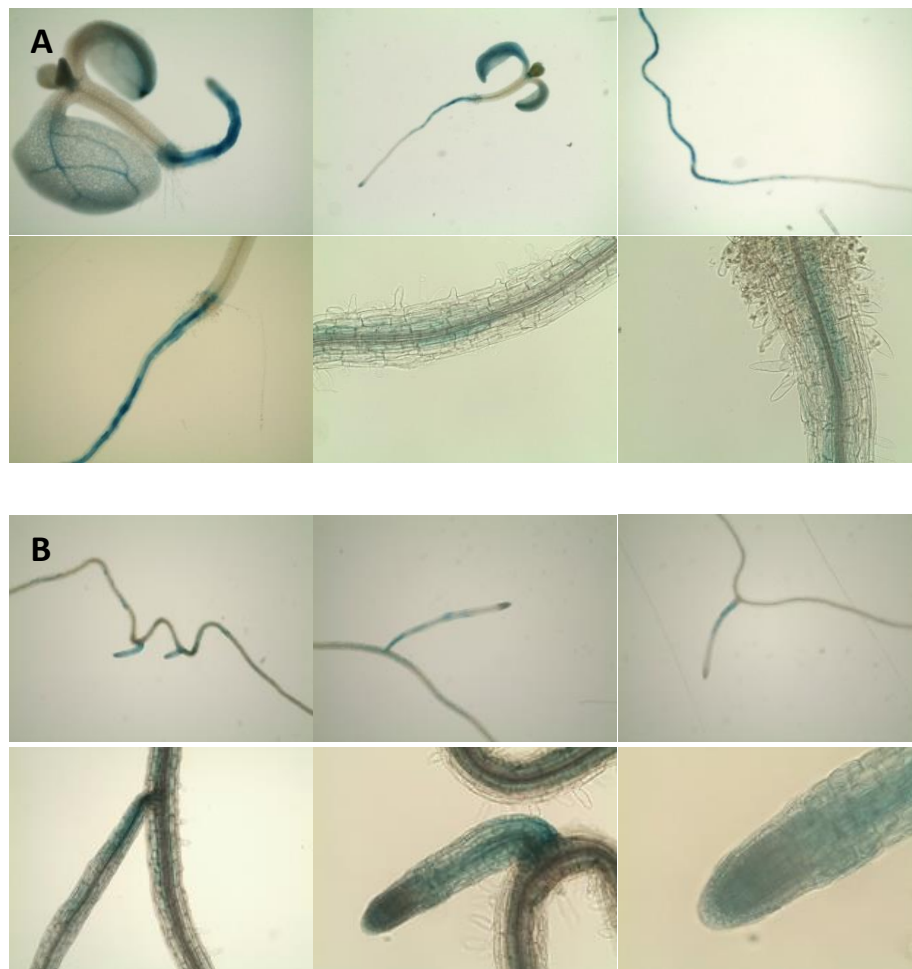


Abbildung 4.18: GUS Färbungen mit Wurzeln von 14 Tage alten (A) und 23 Tage alten (B) LOX6pGUS Keimlingen.

Die GUS Färbung in den Wurzeln von Col-0 zeigt ein diffuses unregelmäßiges Muster vom Hypokotyl abwärts. Das Hypokotyl ist nicht gefärbt, sowie in dem überwiegenden Teil der Fälle auch der Abschnitt kurz vor der Wurzelspitze, wobei die Wurzelspitze meistens blau gefärbt ist (siehe Abbildung 4.18 A). Zudem sind immer jene Stellen gefärbt, an denen neue Seitenwurzeln entstehen, welche ebenfalls eine blaue Färbung aufweisen (siehe Abbildung 4.18 B). Allerdings kann bei dieser Methode weder mit dem Binokular, noch mit dem Mikroskop eine eindeutige Lokalisation bestimmt werden. Diese Ergebnisse konnten in sechs weiteren Versuchen reproduziert werden. Außerdem wurden auch Versuche mit verschiedenen Stressoren durchgeführt, wie Verwundung mit einer Pinzette an der Wurzel und Flotierung in 500 mM Sorbitollösung, um die Expression von *LOX6* zu induzieren. Diese Versuche zeigten allerdings keine Unterschiede zu der Kontrolle (Ergebnisse nicht dargestellt). Möglicherweise war die Verwundung mit der Pinzette nicht ausreichend, da es

methodisch schwierig war, die dünnen Wurzeln ausreichend zu quetschen. Zudem konnten die Verwundungsstellen nicht markiert werden. Somit war bei den verwundeten Wurzeln das gleiche diffuse Muster zu erkennen, wie auch bei den Kontrollen. 500 mM Sorbitol scheint die Expression von *LOX6* nicht ausreichend zu induzieren.

Des Weiteren sollten Blätter von *LOX6pGUS* Erdpflanzen angefärbt und untersucht werden, um die Verteilung von *LOX6* in den Blättern ebenfalls genauer zu beobachten.

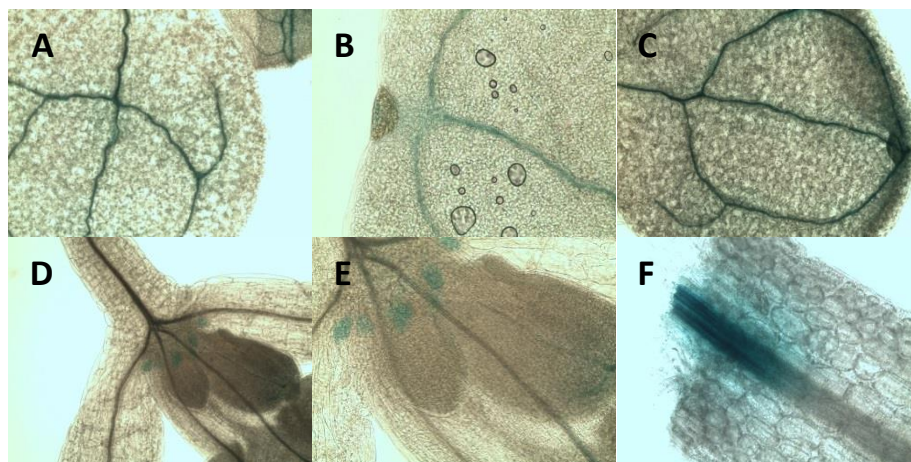


Abbildung 4.19: GUS Färbungen mit 14 Tage alten *LOX6pGUS* Keimlingen (A - E) und einem Blatt einer 27 Tage alten *LOX6pGUS* Erdpflanze (F).

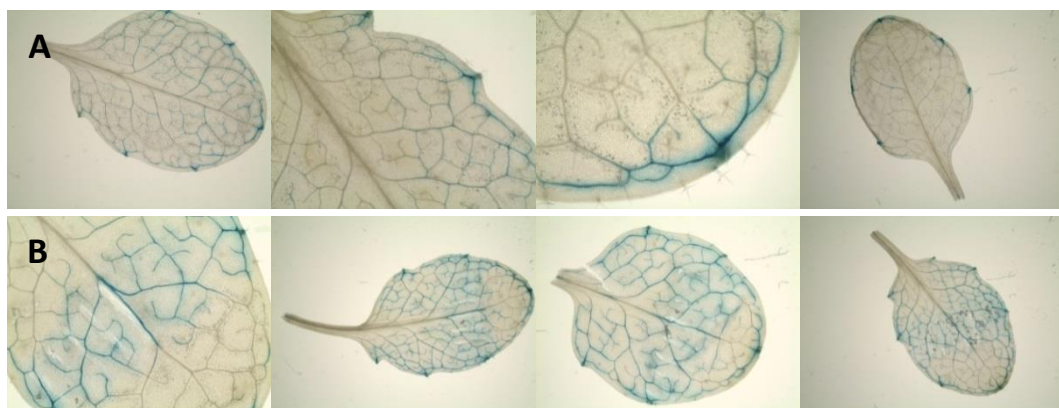


Abbildung 4.20: GUS Färbungen mit Blättern von 23 Tage alten *LOX6pGUS* Erdpflanzen basal (A) und nach Verwundung quer über die Mittelrippe (B).

In den Blättern der unbehandelten *LOX6pGUS* Erdpflanzen ist die Färbung an den Blatträndern (siehe Abbildung 4.20 A) und der Schnittstelle am Stiel (siehe Abbildung 4.19 F) am stärksten. Zudem sind in Abbildung 4.19 D und E noch punktförmige Färbungen an dem

Blattansatz bei den 14 Tage alten gefärbten Keimlingen festzustellen. Jedoch war weder anhand des Binokulars, noch anhand eines Mikroskops erkennbar, in welchen Zellen genau sich diese Färbung befindet.

Nach Verwundung mit einer Pinzette quer über die Mittelrippe ist eine deutliche Blaufärbung in dem verwundeten Bereich erkennbar (siehe Abbildung 4.20 B). Die Färbung ist vor allem in den Verästelungen der Blattadern zu beobachten. Bei Wiederholungen dieses Versuchs wurden allerdings auch unbehandelte Blätter gefunden, bei denen die Adern des ganzen Blattes blau gefärbt waren. Allerdings war bei allen verwundeten Blättern eine stärkere Färbung im Bereich der Verwundungsstelle zu erkennen. Es ist allerdings möglich, dass die blaue Färbung im Bereich der Schnittstelle des Stiels und der verwundeten Blattstellen nicht nur auf eine erhöhte Promotoraktivität von *LOX6* zurückzuführen ist, sondern auch auf eine oxidative Reaktion aufgrund der mechanischen Verletzung. Auch in den Blättern kann keine eindeutige Aussage über die Lokalisation von *LOX6* getroffen werden, da die Färbung zu diffus ist, um einzelne Zellen auszumachen.

Insgesamt ist mit dieser Methode keine genaue Lokalisation von *LOX6* festzustellen und die Interpretation der Bilder ist aufgrund der diffusen Färbung ebenfalls schwierig.

4.6.2 Intrazelluläre Lokalisation von Jasmonsäurebiosyntheseenzymen

Um die exakte Lokalisation der Lipoxygenasen und eine mögliche Kolo-kalisation mit der AOS zu untersuchen, wurde damit begonnen, verschiedene Konstrukte zu klonieren. Es wurde ein 35SLOX6sGFP Konstrukt im pGWB5 Vektor hergestellt (Vektorkarte siehe Anhang 6.5.1 Abbildung 6.5) und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in *lox6* Pflanzen transformiert. Die Pflanzen werden zurzeit mit Hygromyzin selektioniert und können in Zukunft auf ihre GFP Fluoreszenz hin untersucht werden. Eine transiente Transformation in Tabakblättern mit *Agrobacterium tumefaciens* sowie eine Transformation des DNA Materials mit Hilfe einer „Gene-Gun“ in Wurzeln von *lox6* Hydrokulturlpflanzen lieferten keine weiteren Erkenntnisse.

Zudem wurde damit begonnen, 35SLOX2sGFP und 35SAOSsGFP Konstrukte zu erstellen, welche sich ebenfalls im Zielvektor pGWB5 befinden (Vektorkarten siehe Anhang 6.5.2 Abbildung 6.6 und Anhang 6.5.3 Abbildung 6.7). Für ein UbiAOSRFP Konstrukt wurde zunächst die benötigte DNA mittels PCR amplifiziert und in den pDONR Vektor kloniert

(Vektorkarte siehe Anhang 6.5.4 Abbildung 6.8). Eine Klonierung in den pUBC-RFP-DEST Vektor war bisher erfolglos.

Darüber hinaus sollten Konstrukte mit den endogenen Promotoren hergestellt werden, um das natürliche Vorkommen der Lipoxygenasen und der AOS zu untersuchen, ohne mögliche Artefakte durch eine zu starke Überexpression durch den 35S Promotor zu riskieren. Somit sollte auch die Gefahr eines „Gen-Silencings“ umgangen werden. Da der endogene *LOX6* Promotor zusammen mit dem *LOX6* Gen sehr groß ist, sollte die DNA Sequenz durch zwei PCRs hergestellt werden. Diese beiden Teilabschnitte wurden getrennt in den pGemTeasy kloniert und es wurde ein „blue/white screening“ durchgeführt (Vektorkarten siehe Anhang 6.5.5 Abbildungen 6.9 und 6.10). In Zukunft können diese Teilstücke zusammen legiert werden, um dann in den pDONR und letztendlich in den pGWB4 Vektor kloniert zu werden. Auch für die Lokalisationsanalyse von *LOX2* und *AOS* wurden Klonierungsstrategien mit endogenen Promotoren entwickelt, allerdings wurde hier bisher nur für *LOX2* die erste Hälfte der für das Konstrukt notwendigen DNA amplifiziert und kann in den pGemTeasy kloniert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem versucht mit von Edward Farmer generierten Antikörper-Seren die natürlicherweise vorkommenden *LOX6* Gehalte sowohl im Wildtyp als auch in 35S*LOX6* Linien zu untersuchen. Hierfür wurden einige Experimente mit zwei aufgereinigten Seren von zwei verschiedenen Kaninchen durchgeführt. In diesen Experimenten stellten sich die Seren – auch bei der Verwendung von verschiedenen Konzentrationen und Versuchsbedingungen – als nicht spezifisch genug heraus, so dass damit keine Aussagen getroffen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde für die Herstellung der Antikörper-Seren nur ein Teilpeptid verwendet, weshalb in dieser Arbeit damit begonnen werden sollte, ein Konstrukt zu klonieren, um in Zukunft einen spezifischen Antikörper gegen das *LOX6* Gesamtprotein herzustellen, welches in *E. coli* exprimiert werden sollte. Mit Hilfe des *LOX6* Antikörpers könnte z. B. bei 35S*LOX6* Pflanzen nicht nur mit einem HA-Antikörper das überexprimierte *LOX6* Protein detektiert werden, sondern der Gesamtgehalt an natürlich vorkommendem und durch die Überexpression entstandenem *LOX6* quantifiziert werden. Daneben könnten auch histologische Schnitte von Col-0 Pflanzen mit dem Antikörper untersucht werden. Das *LOX6* Konstrukt wurde bisher mit Hilfe des Gateway Systems in den pDest17 Vektor, welcher einen His-Tag beinhaltet, kloniert

und in *E. coli* Zellen transformiert (Vektorkarte siehe Anhang 6.5.6 Abbildung 6.11). Hierbei wurde ein mit IPTG induzierbares System verwendet. Nach IPTG Induktion wurden die Proteine isoliert und auf einem SDS Gel aufgetrennt. Darauf war eine Bande im erwarteten Bereich des Molekulargewichtes von LOX6 erkennbar. Somit können in Zukunft größere Mengen des LOX6 Proteins gewonnen und mit Hilfe des His-Tags aufgereinigt werden.

4.7 Lipoxygenase 6 und Trockentoleranz

An dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die *lox6* Mutante im Vergleich zum Wildtyp anfälliger gegenüber Trockenstress ist (Grebner et al., 2013). Da die *dde2* Mutante in dieser Studie keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte, wurden Jasmonate als Ursache für eine geringere Sensibilität gegenüber Trockenheit zunächst nicht weiter verfolgt. Savchenko et al. konnten 2014 allerdings einen Zusammenhang zwischen OPDA und der Trockentoleranz nachweisen. Transgene Linien mit höheren Gehalten an OPDA zeigten eine größere Trockentoleranz und eine schnellere Schließung der Stomata (Savchenko et al., 2014).

Um die Sensibilität von *lox6* Mutanten gegenüber Trockenheit weiter zu erforschen, wurden erneut Trockenexperimente mit Col-0 und *lox6* sowie *dde2* Erdpflanzen durchgeführt.

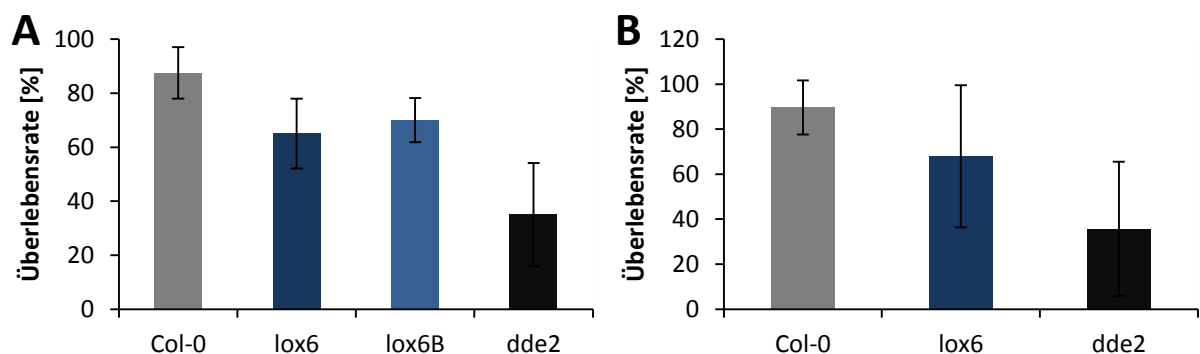


Abbildung 4.21: Überlebensrate von (A) Col-0, *lox6*, *lox6B* und *dde2* und (B) Col-0, *lox6* und *dde2* Erdpflanzen in % nach Trockenstress. 4 Wochen alte Pflanzen wurden trocken gelassen und dann erneut gewässert. Nach 48 h wurde die Überlebensrate bestimmt. (A) Die Daten stammen aus 4 zeitgleich durchgeführten unabhängigen Experimenten mit zusammen angezogenen Pflanzen (Col-0 n=39; *lox6*, *lox6B* und *dde2* n=40). (B) Die Daten stammen aus 5 zeitgleich durchgeführten unabhängigen Experimenten mit zusammen angezogenen Pflanzen (Col-0 und *dde2* n=67; *lox6* n=66). (MW+STABW)

In Abbildung 4.21 A liegt die Überlebensrate von Col-0 bei 88 %. Zudem wurden zwei verschiedene *lox6* Mutantenlinien untersucht, welche mit 65 % und 70 % ähnliche Ergebnisse aufweisen. Die Mutante *dde2* weist mit 35 % die geringste Überlebensrate auf. Die Ergebnisse aus Abbildung 4.21 A zeigen die gleichen Tendenzen wie Abbildung 4.21 B. Hier hat Col-0 eine Überlebensrate von 90 %, *lox6* von 68 % und *dde2* von 36 %.

In diesen Experimenten liegt die Überlebensrate der *lox6* Mutante über dem in der Literatur beschriebenen Wert von 14 % (Grebner et al., 2013). Für Col-0 wird in der Literatur ein ähnlich hoher Wert von 78 % beschrieben (Grebner et al., 2013). Auch wenn die Ergebnisse hier weniger deutlich zu sein scheinen, kann dennoch die Aussage aus der Literatur in Bezug auf eine geringere Trockenresistenz bei *lox6* Pflanzen bestätigt werden. Die hohen Fehlerbalken sind durch die hohe Varianz der Überlebensraten bei Trockenexperimenten zu erklären. Es muss der optimale Zeitpunkt zum erneuten Gießen nach der Trockenperiode so gewählt werden, dass nicht zu viele oder gar keine Pflanzen mehr überleben. Somit kann auch die Überlebensrate des Wildtyps zwischen den Experimenten stark variieren, je nachdem zu welchem Zeitpunkt das erneute Wässern stattgefunden hat. Außerdem muss erwähnt werden, dass häufig die überlebenden *lox6* Pflanzen deutlich schlechter aussahen als die überlebenden Col-0 Pflanzen. Darüber hinaus glichen in einem anderen Trockenexperiment, welches nur mit Col-0 und *lox6* Pflanzen durchgeführt wurde, die Keimraten eher den Daten von Grebner et al. (2013) (siehe Anhang 6.6 Abbildung 6.12). Die geringe Überlebensrate von *dde2* passt zu den Versuchen von Savchenko et al. (2014) bei denen Jasmonat defiziente Mutanten ebenfalls eine geringere Trockentoleranz aufwiesen. Somit scheinen tatsächlich Jasmonate für die Trockenresistenz von Col-0 von entscheidender Bedeutung zu sein.

Da die *lox6* Mutante zumindest in den Wurzeln keine Jasmonate aufweist, deutet dies darauf hin, dass LOX6 Produkte in den Wurzeln für die Trockenresistenz wichtig sind. Da allerdings in der Literatur eine Rolle für die Jasmonate in den Stomata beschrieben wurde (Savchenko et al., 2014), sollte genauer untersucht werden, welche Rolle sie in den Wurzeln im Vergleich zu den Blättern spielen. Hierfür sollten Pfropfungsexperimente mit Col-0 und *lox6* sowie Col-0 und *dde2* durchgeführt werden. Hierfür wurden Keimlinge auf MS-Agarplatten mit 1,5 % Saccharose angezogen und nach einer Woche am Hypokotyl durchtrennt und die verschiedenen Genotypen aufeinander gepfropft. Anschließend wurden die Keimlinge auf MS-Agarplatten mit 0,5 % Saccharose gesetzt und für eine Woche zusammenwachsen

gelassen. Die zusammengewachsenen Pflanzen wurden in Erde umgesetzt und bis zum Trockenexperiment wachsen gelassen.

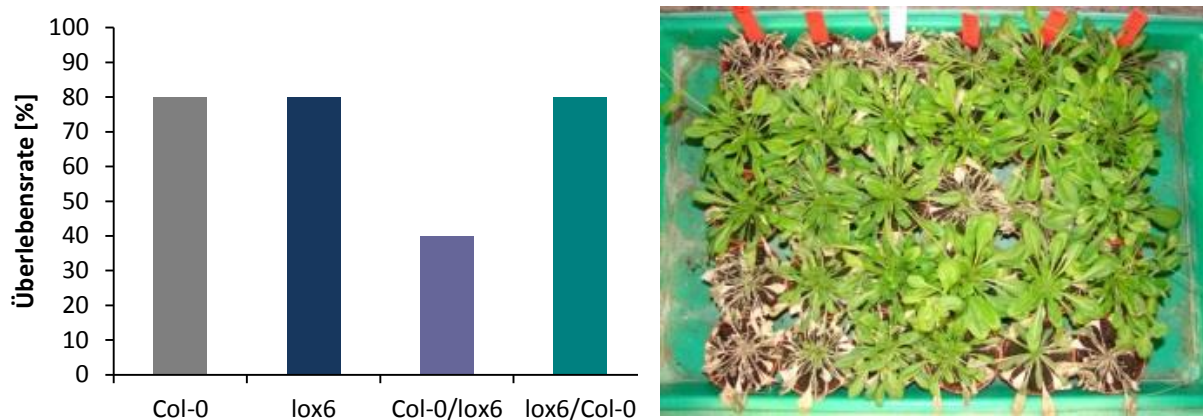


Abbildung 4.22: Überlebensrate von Col-0, *lox6* und gepfropften Col-0/*lox6* und *lox6*/Col-0 Erdpflanzen in % nach Trockenstress. 7 Tage alte auf MS-Agarplatten mit 1,5 % Saccharose angezogene Keimlinge wurden gepfropft und eine weitere Woche auf MS-Agarplatten mit 0,5 % Saccharose zusammengewachsen gelassen. Danach wurden die Keimlinge in Erde gesetzt, mit 6 Wochen trocken gelassen und dann erneut gewässert. Nach 48 h wurde die Überlebensrate bestimmt. Die Daten stammen aus 1 Experiment. (MW, Col-0 n=5, *lox6* n=10, Col-0/*lox6* n= 5, *lox6*/Col-0 n=10)

Die Kontrollpflanzen Col-0 und *lox6* weisen eine Überlebensrate von 80 % auf sowie auch die *lox6* Blatt/Col-0 Wurzel Pfropfung. Die Col-0 Blatt/*lox6* Wurzel Pfropfung weist eine niedrigere Überlebensrate von 40 % auf. Dieses Experiment wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Da diese Experimente zeitlich unabhängig durchgeführt wurden und somit die Pflanzen nicht mit den Pflanzen aus Abbildung 4.22 zusammen angezogen wurden, wird hier von der Bildung eines Mittelwertes (MW) dieser beiden Experimente abgesehen. In der Wiederholung dieses Experimentes (mit Mittelwerten von zwei zusammen angezogenen Experimenten, Col-0 n=22, *lox6* n=21 und Col-0/*lox6* bzw. *lox6*/Col-0 n=14) zeigte erneut die Pfropfkombination Col-0 Blatt/*lox6* Wurzel eine geringere Überlebensrate (48 %) als die Kombination mit *lox6* Blättern und Col-0 Wurzeln (68 %). Allerdings war hier die Überlebensrate von Col-0 sehr gering (3 %) und von *lox6* sehr hoch (59 %).

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend die Tendenz, dass Pfropfkombinationen mit der *lox6* Wurzel anfälliger gegenüber Trockenheit sind und somit LOX6 Produkte in der Wurzel an der Trockentoleranz beteiligt sind. Allerdings sollte dann die *lox6* Kontrolle ebenfalls eine niedrigere Überlebensrate aufweisen. Erwähnt werden sollte jedoch, dass die überlebenden *lox6* Pflanzen deutlich schlechter aussahen als die überlebenden Col-0 Pflanzen.

Insgesamt ist es aufgrund der geringen Anzahl an erfolgreich gepfropften Pflanzen schwierig, eine aussagekräftige Annahme zu treffen. Dies liegt darin begründet, dass nur circa 10 % der gepfropften Pflanzen richtig zusammenwachsen und somit von beispielsweise 300 gepfropften Pflanzen nur 30 in Erde umgesetzt werden können. Da der Wechsel von MS-Agarplatten in Erde bei den Keimlingen starken Stress auslöst, überleben zudem viele Pflanzen die Umsetzung nicht. Obwohl darüber hinaus eine neue Pfropfmethode nach Marsch-Martínez et al. (2013) ausprobiert wurde, bei welcher bis zu 100 % der gepfropften Keimlinge zusammenwachsen sollen, konnte die Rate an zusammengewachsenen Keimlingen nicht gesteigert werden.

Mit diesen Pfropfkombinationen wurden außerdem Trockenexperimente in Hydrokultur durchgeführt. Hierfür wurden die gepfropften und zusammengewachsenen Pflanzen in ein Hydrokultursystem mit flüssigem Medium umgesetzt. Im Alter von sechs Wochen wurde ihnen das Medium für 48 Stunden entzogen und sie wurden anschließend in flüssigem Stickstoff geerntet. Optisch waren bei diesen Experimenten keine Unterschiede zwischen den einzelnen gepfropften Genotypen in der Trockentoleranz erkennbar. Deshalb sollten die Gehalte an Jasmonaten in den Blättern und Wurzeln dieser Pflanzen, sowie der Kontrollpflanzen untersucht werden. Diese Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Messungen zeigten, dass die Pfropfungen keinen Einfluss auf die Oxylin Spiegel hatten (Daten nicht gezeigt).

Da in der *lox6* Mutante zumindest in den Blättern vor allem durch LOX2 noch Jasmonate vorhanden sind, sollten auch mit *dde2* Pflanzen Pfropfungen durchgeführt werden, da diese weder in Wurzeln noch in Blättern Jasmonate besitzen.

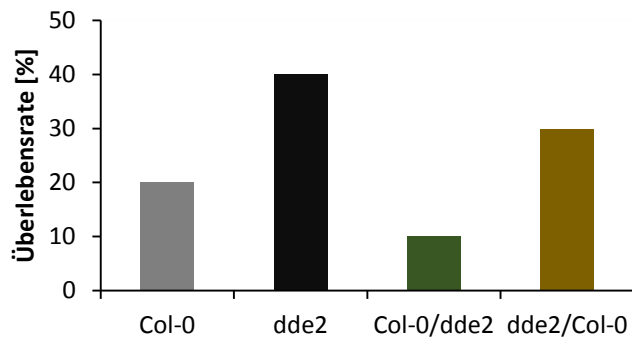


Abbildung 4.23: Überlebensrate von Col-0, *dde2* und gepfropften Col-0/*dde2* und *dde2*/Col-0 Erdpflanzen in % nach Trockenstress. 7 Tage alte auf MS-Agarplatten mit 1,5 % Saccharose angezogene Keimlinge wurden gepfropft und eine weitere Woche auf MS-Agarplatten mit 0,5 % Saccharose zusammenwachsen gelassen. Danach wurden die Keimlinge in Erde gesetzt, mit 5 Wochen trocken gelassen und dann erneut gewässert. Nach 48 h wurde die Überlebensrate bestimmt. Die Daten stammen aus 1 Experiment. (MW, n=10)

In dem Experiment in Abbildung 4.23 liegt die Überlebensrate von Col-0 bei 20 %. Die Tatsache, dass die Überlebensrate der Pfropfkombination mit der *dde2* Wurzel (10 %) unter der Pfropfkombination mit Col-0 als Wurzel (30 %) liegt, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Jasmonate auch in Wurzeln einen wichtigen Beitrag zur Trockentoleranz leisten und nicht nur in den Blättern wichtig sind. Da allerdings die Überlebensrate von *dde2* bei 40 % liegt und die Anzahl an Pflanzen bei diesem Experiment gering ist, lassen sich keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen ziehen.

Um unter anderem die Rolle von LOX6 in Bezug auf Trockenstress besser zu untersuchen, sollten bereits vorhandene 35SLOX6 Linien charakterisiert werden. Zudem sollten somit auch die von LOX6 gebildeten Produkte und deren Funktionen genauer analysiert werden.

4.8 Charakterisierung der 35SLOX6 Linien

Die 35SLOX6 Pflanzenlinien enthalten einen Überexpressionsvektor mit einem viralen, konstitutiv aktiven 35S Promotor, einer BASTA Resistenz und einem HA-Tag für eine Proteinextraktion sowie einen Proteinnachweis. Diese Linien wurden von der Doktorandin Wiebke Grebner an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg kloniert, transformiert und auf BASTA selektioniert. Zunächst sollten die selektionierten Pflanzenlinien auf ihre Überexpression hin untersucht werden.

4.8.1 *LOX6* Expression der 35S*LOX6* Linien

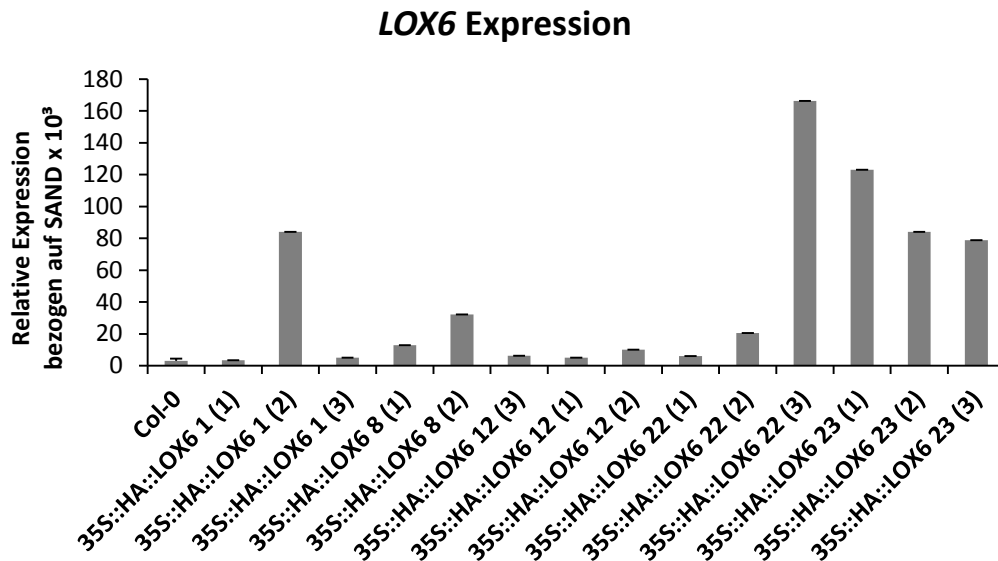


Abbildung 4.24: Relative *LOX6* Expression bezogen auf *SAND* in Col-0 und verschiedenen 35S*LOX6* Linien.

Col-0 weist eine relative Genexpression von 3038 Molekülen bezogen auf *SAND* auf. Die höchste Überexpression weisen die 35S*LOX6* Linien 22.3 (auf das 55-Fache), 23.1 (auf das 41-Fache) und 1.2 (auf das 28-Fache) auf. Diese Linien wurden aus diesem Grund für weitere Experimente ausgewählt.

Um zu überprüfen, ob auch das *LOX6* Protein in den ausgewählten Überexpressionslinien gebildet wird, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde als Negativkontrolle Col-0 Blatt- und Wurzelmaterial verwendet, da dieses im Gegensatz zu den 35S*LOX6* Linien kein *LOX6* Protein mit HA-Tag enthalten sollte. Da ein für den HA-Tag spezifischer Antikörper verwendet wurde, konnte das natürlicherweise vorkommende *LOX6* in Col-0 und den Überexpressionslinien nicht detektiert werden.

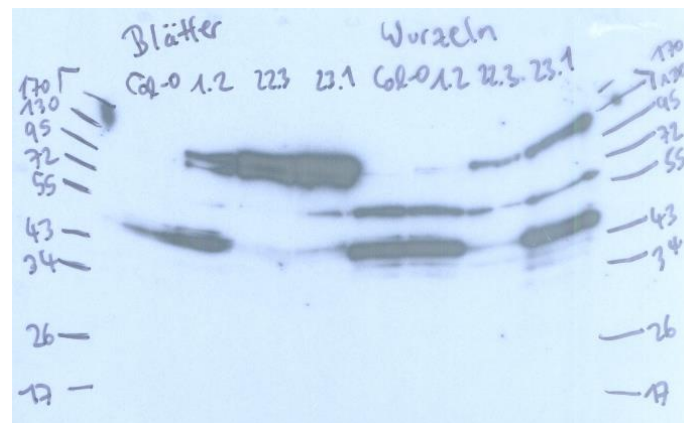


Abbildung 4.25: Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus Blättern und Wurzeln von Col-0 und den 35SLOX6 Linien 1.2, 22.3 und 23.1. Nachweis von HA::LOX6 Protein mit Hilfe von einem HA-Tag spezifischen Antikörper.

In der Western Blot Analyse ist bei den Col-0 Kontrollen sowohl bei den Blättern als auch bei den Wurzeln keine HA::LOX6 Bande bei 106,5 kDa (LOX6 = 104,5 kDa; HA-Tag = 2 kDa) zu beobachten. Bei allen Überexpressionslinien ist in den Blättern eine starke Produktion des HA::LOX6 Proteins erkennbar, wobei die Bande bei Linie 23.1 am stärksten und bei Linie 1.2 am schwächsten ist. Bei genauerer Betrachtung sind zudem zwei sehr nah beieinander liegende Banden sichtbar. Dies liegt vermutlich an einer posttranslationalen Modifikation des LOX6 Proteins, z. B. einer Phosphorylierung. In den Wurzeln hingegen ist jeweils nur eine Bande erkennbar, welche ebenfalls bei Linie 23.1 am stärksten ist. Wiederum zeigt Linie 1.2 die schwächste Bande. Die unspezifischen Banden sind auf Kreuzreaktionen mit dem HA-Antikörper zurückzuführen. Aufgrund der Ergebnisse der Western Blot Analyse wurde die 35SLOX6 Linie 23.1 (wenn nicht anders gekennzeichnet) für alle weiteren Experimente favorisiert.

4.8.2 Phänotyp der 35SLOX6 Pflanzen

Anschließend sollten die 35SLOX6 Pflanzen auf ihren Phänotyp hin untersucht werden. Dafür wurden zunächst die Blätter von Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Hydrokulturpflanzen betrachtet.

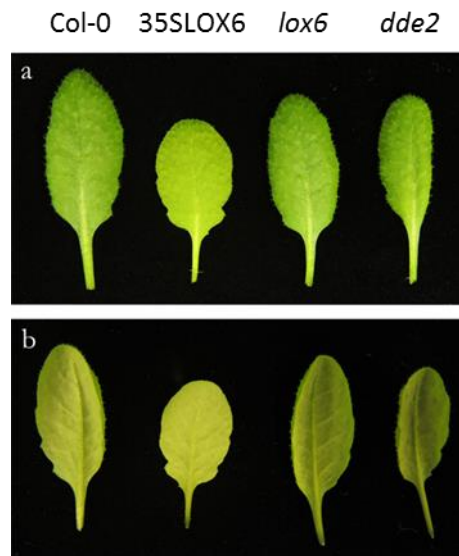


Abbildung 4.26: Blätter von 6 Wochen alten Col-0, 35SLOX6 23.1, *lox6* und *dde2* Hydrokulturpflanzen von der Vorderseite (a) und von der Rückseite (b). (Quelle: Bild mit freundlicher Genehmigung von der Bachelorstudentin Isabella Gorus an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, betreut durch die Autorin.)

Die Blätter der 35SLOX6 Pflanzen sehen kleiner, runder und heller aus als die Col-0, *lox6* und *dde2* Blätter. Zudem lässt sich in Abbildung 4.26 b erkennen, dass sie zudem flacher sind als die Blätter der beiden anderen Genotypen. Diese optischen Unterschiede konnten bei mehreren unabhängigen Experimenten sowohl mit Hydrokulturpflanzen, als auch mit Erdpflanzen bestätigt werden. Zwischen Col-0 und der *lox6* Mutante, welche in den Wurzeln keine Jasmonate enthält, sowie der *dde2*, welche in der gesamten Pflanze keine Jasmonate enthält, gibt es keine Unterschiede in der Blattform.

Aufgrund dieser optischen Unterschiede sollten die Blätter vermessen und auf ihre Blattbreite und -länge hin untersucht werden. Die durchschnittliche Blattlänge von sechs Wochen alten Col-0 Hydrokulturpflanzen lag bei 14 mm und die Blattbreite bei 8 mm. Die anderen Genotypen 35SLOX6, *lox6* und *dde2* zeigen keinen Unterschied zu den Werten des Wildtyps (Daten nicht gezeigt).

Da in Bezug auf Blattlänge und Blattbreite keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten, allerdings optisch Unterschiede zu sehen waren, wurden die Blattlängen und Blattbreiten der vier Genotypen in verschiedene Gruppen (je nach Länge bzw. Breite) eingeteilt. Hierbei lassen sich unterschiedliche Größenverteilungen der Genotypen besser erkennen.

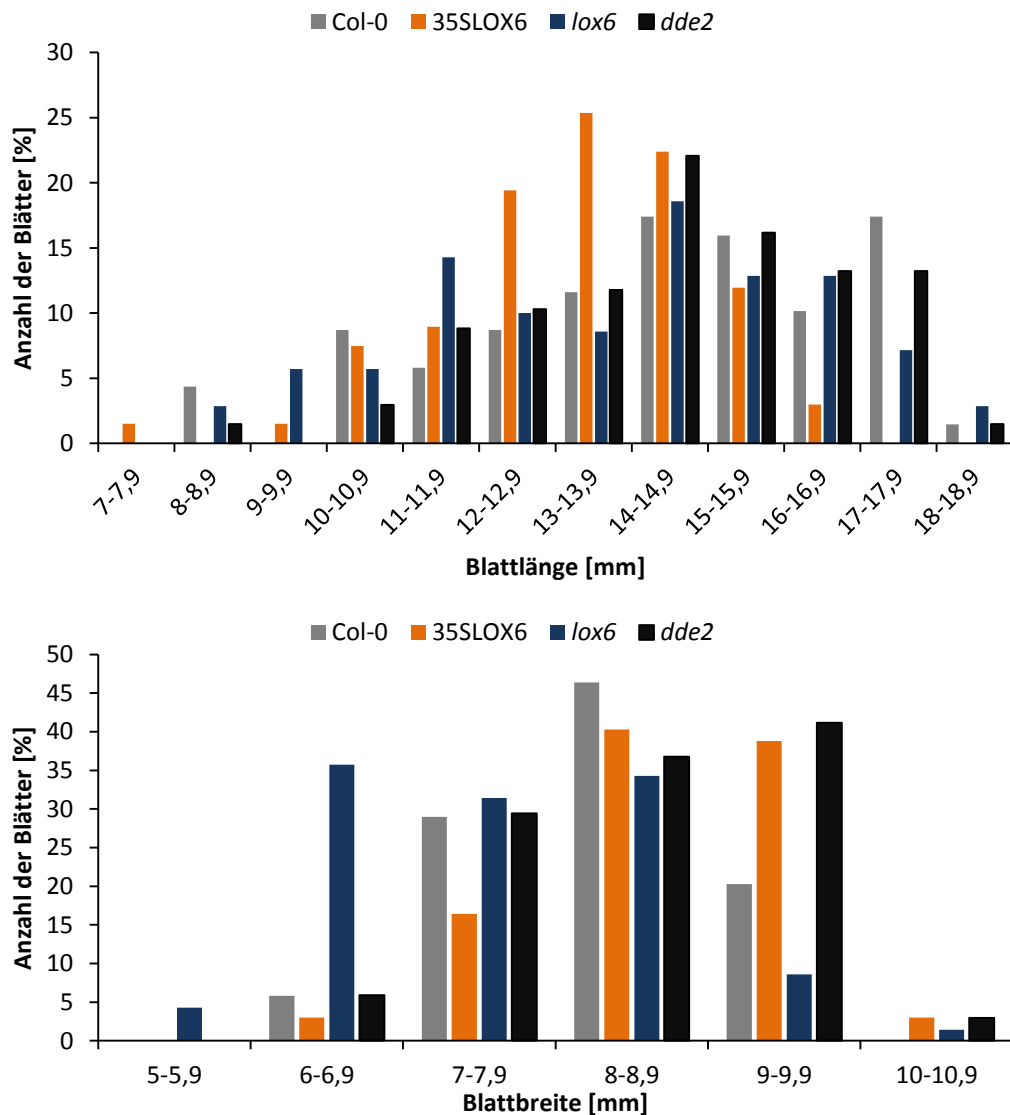


Abbildung 4.27: Prozentuale Verteilung der Blattlänge und Blattbreite in mm von 6 Wochen alten Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Hydrokulturpflanzen. (MW, Col-0 n=69, 35SLOX6 n=67, *lox6* n=70, *dde2* n= 68)

Bei der Blattlänge ist die Verteilung des Wildtyps relativ gleichmäßig auf fast alle Größen gegeben, lediglich bei der kleinsten (7 - 7,9 mm) taucht er nicht auf. Allerdings zeigt er eine Verschiebung zu den größeren Blattlängen hin. 35SLOX6 dagegen weist eher eine Verteilung zur Mitte bzw. zu den kleineren Blattlängen hin auf. 35SLOX6 ist der einzige Genotyp,

welcher noch bei der kleinsten Blattlänge (7 - 7,9 mm) vorhanden ist und bei der größten Blattlänge (18 - 18,9 mm) fehlt. Die *lox6* und *dde2* Mutanten weisen keine großen Unterschiede im Vergleich zu Col-0 auf.

Bei der Blattbreite zeigt der Wildtyp Col-0 eine Verteilung mit einer Gewichtung zur Mitte hin (8 - 8,9 mm). In den Randbereichen bei sehr kleinen (5 - 5,9 mm) und sehr großen Blattbreiten (10 - 10,9 mm) taucht er nicht auf. Dagegen weisen 35SLOX6 und *dde2* eine Verteilung zu einer größeren Blattbreite hin auf und finden sich überwiegend in den Bereichen 8 - 8,9 mm und 9 - 9,9 mm wieder. Die *lox6* Mutante zeigt eher eine Verteilung zu den kleineren Blattbreiten, die meisten Werte finden sich in dem Bereich von 6 - 6,9 mm.

Somit kann durch die Größenverteilung der Blattlängen und Blattbreiten der optische Eindruck von kleineren, breiteren und runderen Blättern von 35SLOX6 im Vergleich zu Col-0 bestätigt werden. Die *lox6* Blätter dagegen scheinen am schmalsten zu sein und die Blätter der *dde2* Pflanzen scheinen denen von 35SLOX6 in der Breite zu ähneln, allerdings gehören sie trotzdem zu den längsten.

Da ein weiterer optischer Unterschied zwischen den LOX6 Überexpressionslinien und dem Wildtyp die hellere Färbung der 35SLOX6 Blätter war, wurde eine Bestimmung des Chlorophyllgehaltes durchgeführt. In den Blättern von sechs Wochen alten Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Hydrokulturpflanzen wurden die Gehalte von Chlorophyll a, Chlorophyll b und der Gesamtchlorophyllgehalt bestimmt. Allerdings waren zwischen den Genotypen in keinem der Gehalte Unterschiede zu sehen, sodass dieser optische Unterschied nicht belegt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.8.3 Trockentoleranz der 35SLOX6 Pflanzen

Wie bereits in Kapitel 4.7 dargestellt, ist die *lox6* Mutante anfälliger gegenüber Trockenstress als Col-0. Deshalb sollte untersucht werden, ob die LOX6 Überexpressionslinien eine stärkere Toleranz gegenüber Trockenheit besitzen als der Wildtyp. Hierfür wurden Erdpflanzen der 35SLOX6 Linie 23.1 und zum Vergleich außerdem die *lox6* und *dde2* Mutanten verwendet.

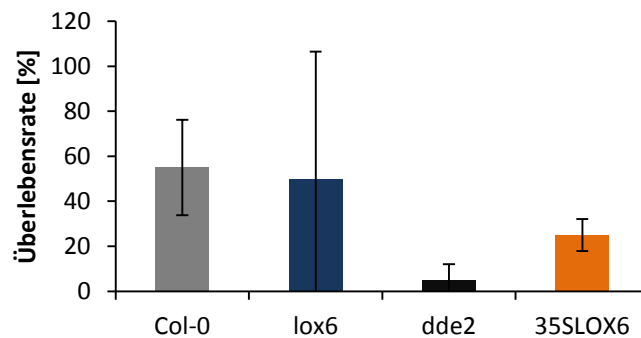


Abbildung 4.28: Überlebensrate von Col-0, *lox6*, *dde2* und 35SLOX6 Erdpflanzen in % nach Trockenstress. Die 4 Wochen alten Pflanzen wurden trocken gelassen und dann erneut gewässert. Nach 48 h wurde die Überlebensrate bestimmt. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten. (MW+STABW, n=20)

Col-0 weist in Abbildung 4.28 eine Überlebensrate von 55 % auf, während 35SLOX6 mit 25 % darunter liegt. Allerdings ist die Überlebensrate von *lox6* mit 50 % fast so hoch wie die des Wildtyps. Die *dde2* Mutante weist erneut die geringste Überlebensrate mit 5 % auf. Insgesamt scheint die 35SLOX6 Überexpressionslinie nicht resistenter gegenüber Trockenheit zu sein als der Wildtyp, im Gegenteil, sie scheint eher anfälliger zu sein. Auch hier ist, wie bereits in Kapitel 4.7 gezeigt, die Überlebensrate der *dde2* Mutante deutlich geringer als die des Wildtyps, was an den fehlenden Jasmonaten liegen könnte. Unerklärlich ist dagegen die hohe Überlebensrate von *lox6*, allerdings mit sehr hohen Standardabweichungen (STABW). Außerdem sollte erwähnt werden, dass zum Teil überlebende *lox6* Pflanzen schlechter aussahen als die überlebenden Col-0 Pflanzen. Während sich der Wildtyp zumeist komplett erholte, wiesen einige überlebende *lox6* Pflanzen abgestorbene Blätter auf. Somit konnte der Trockenphänotyp von *lox6* nicht bei jedem Experiment wiederholt werden.

Es wurden zudem Trockenexperimente in Hydrokultur mit den gleichen Genotypen durchgeführt. Dabei wurde den sechs Wochen alten Hydrokulturpflanzen das Medium entzogen und mit Hilfe einer Kamera alle zwei Minuten ein Bild erstellt. Auf den daraus

zusammengestellten Filmen konnte jedoch optisch kein Unterschied in der Trockentoleranz der Genotypen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.8.4 Keimfähigkeit der 35SLOX6 Linien

Da in einigen Versuchen bereits die schlechtere Keimfähigkeit von *lox6* im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde (siehe Abbildung 4.13), sollte nun die Keimrate von 35SLOX6 Linie 23.1 im Vergleich zu Col-0 und der *lox6* Mutante untersucht werden. Dabei wurde vermutet, dass die LOX6 Überexpressionslinien möglicherweise eine höhere Keimfähigkeit als der Wildtyp besitzen könnten.

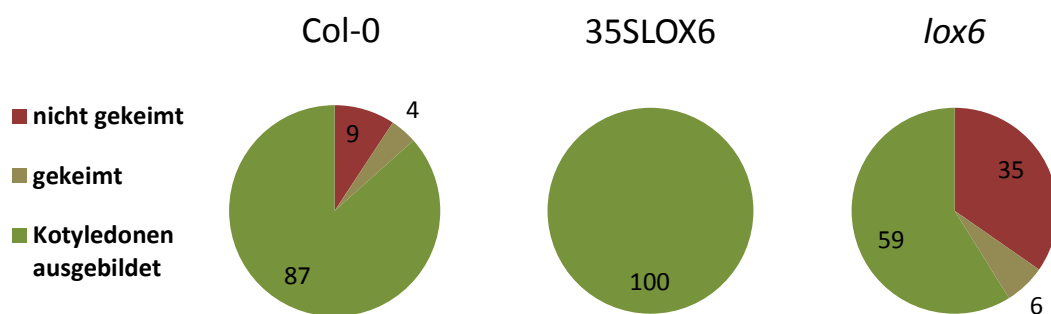


Abbildung 4.29: Keimraten von Col-0, 35SLOX6 23.1 und *lox6* in %. Die Unterteilung erfolgte in nicht gekeimte Samen, gekeimte Samen und gekeimte Samen, welche zudem Kotyledonen ausgebildet hatten. Die Samen wurden auf MS-Agarplatten mit 3 % Saccharose ausgelegt und die Keimraten an Tag 10 bestimmt.

Nach zehn Tagen sind 91 % der Col-0 Samen gekeimt, wobei 87 % auch die ersten Keimblätter ausgebildet haben. Lediglich 9 % der Samen keimten nicht. Bei der LOX6 Überexpressionslinie waren sogar alle Samen gekeimt und hatten die ersten Keimblätter ausgebildet. Die schlechteste Keimrate wies *lox6* auf, hier waren 35 % nicht gekeimt, 6 % gekeimt ohne Kotyledonen und nur 59 % waren gekeimt und hatten erste Keimblätter ausgebildet. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Samen von *lox6* Mutanten eine schlechtere Keimrate besitzen und die 35SLOX6 Samen dagegen eine bessere Keimrate als der Wildtyp aufweisen. In einem weiteren Experiment konnten ähnliche Ergebnisse generiert werden. Obwohl in diesem zweiten Experiment sowohl bei Col-0 als auch bei 35SLOX6 89 % der Samen gekeimt waren und grüne Blätter ausgebildet hatten,

waren bei der Überexpressionslinie nur 5,6 % nicht gekeimt, wobei beim Wildtyp 9 % nicht gekeimt waren. Die *lox6* Mutante zeigte mit nur 63 % gekeimten Samen mit Kotyledonen eine ähnlich schlechte Keimrate wie in dem Versuch in Abbildung 4.29. In einem dritten Experiment war erneut die Rate der Keimlinge mit grünen Blättern bei 35SLOX6 mit 90 % höher als bei Col-0 mit 73 %. Zudem war nur 1 % der Überexpressionslinie nicht gekeimt, wobei es bei Col-0 3 % waren. Col-0 wies außerdem mit 23 % eine große Rate an gekeimten Samen auf, welche keine Kotyledonen entwickelt hatten (35SLOX6 7 %). Allerdings lag in diesem Versuch die Rate von Pflänzchen mit grünen Blättern bei *lox6* bei 90% und war somit so hoch wie bei 35SLOX6. Trotzdem gab es bei *lox6* mit 5 % mehr nicht gekeimte Samen, als bei der Überexpressionslinie (1 %). Zusammenfassend erscheint eine geringere Keimfähigkeit der *lox6* Mutante trotzdem als reproduzierbare Tatsache. 35SLOX6 scheint zumindest eine geringfügig bessere Keimfähigkeit als Col-0 zu besitzen.

4.8.5 Toleranz von 35SLOX6 Pflanzen bei Fraßexperimenten mit *Porcellio scaber*

Im Jahre 2009 publizierten Farmer und Dubugnon, dass Blätter der *dde2* Mutante, welche keine Jasmonate bilden kann, schneller von Detritivoren gefressen werden als Wildtyp Blätter. Aufbauend auf diesen Experimenten wurden an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg die Wurzeln von hydroponisch angezogenen *dde2* Pflanzen für Fraßversuche verwendet. Dabei wurden sie ebenfalls von der Kellerassel (*Porcellio scaber*) schneller gefressen als wildtypische Wurzeln (Grebner et al., 2013). Somit schienen die nicht vorhandenen Jasmonate in den Mutanten dazu zu führen, dass sie von den Detritivoren präferiert wurden. Bei Fraßversuchen mit *lox6* Mutanten konnte bei den Blättern kein Unterschied zu dem Wildtyp festgestellt werden, was vermutlich daran liegt, dass sie durch die anderen 13-Lipoxygenasen immer noch genug Jasmonate enthalten. Anders sah es bei den Wurzeln aus: *lox6* Wurzeln (welche keine Jasmonate enthalten) wurden von den Asseln schneller gefressen als Col-0 Wurzeln (Grebner et al., 2013). Aufgrund einer möglichen Erhöhung der Jasmonate in den 35SLOX6 Pflanzen sollten auch sie mit Hilfe eines Asselfraßexperimentes untersucht werden. Hierfür wurden Col-0 und 35SLOX6 Linie 23.1 Hydrokulturlpflanzen angezogen, die Wurzeln bzw. Blätter abgetrennt und in Kisten mit Erde und Asseln gelegt. Die Kisten mit den Wurzeln bzw. Blättern wurden täglich fotografiert, um das Fraßverhalten der Asseln zu dokumentieren.



Abbildung 4.30: Bilder von *Porcellio scaber* Fraßversuchen mit Wurzeln und Blättern von Col-0 und 35SLOX6 Linie 23.1 nach 0 und 12 bzw. 6 Tagen. Es wurden 10 Asseln pro Kiste verwendet, sowie jeweils 3 Wurzeln bzw. 10 Blätter von 8 Wochen alten Hydrokulturpflanzen.

An Tag 0 sind die Blätter und Wurzeln von Col-0 und 35SLOX6 noch unangetastet. Nach zwölf Tagen sind bei den Wurzeln deutliche Fraßspuren erkennbar und während die wildtypischen Wurzeln bereits aufgefressen sind, sind noch 35SLOX6 Wurzeln vorhanden. Die Blätter werden wesentlich schneller gefressen, allerdings kann hier kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Von den insgesamt acht Versuchen mit Wurzeln wurde fünfmal der Wildtyp bevorzugt gefressen, nur zweimal 35SLOX6 und einmal war kein Unterschied erkennbar.

Bei den Blättern war in keinem der vier durchgeführten Experimente ein deutlicher Unterschied zu erkennen, obwohl in zwei Experimenten eine Fraßpräferenz zu 35SLOX6 Blättern möglich wäre. Allerdings wurde hier die optische Auswertung durch das Herumtragen der Blätter durch die Asseln erschwert.

Insgesamt scheint es bei der Fraßpräferenz der Asseln aber eine Tendenz zu den Col-0 Wurzeln zu geben. Zu untersuchen bleibt allerdings, ob die Überexpressionslinien wirklich einen erhöhten Jasmonat Gehalt aufweisen, welcher dazu führen könnte, dass sie weniger gerne gefressen werden.

4.8.6 Wurzellängen von 35SLOX6 Pflanzen

In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die exogene Gabe von Jasmonaten das Wurzelwachstum hemmt (Yamane et al., 1981; Mueller et al., 2008). Allerdings spielen endogene Jasmonat Spiegel auch eine Rolle. Dies wird dadurch deutlich, dass *lox6* Mutanten längere Wurzeln als der Wildtyp aufweisen (siehe Diplomarbeit Katrin Borowsky (2012), Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg). Da *lox6* in den Wurzeln keine Jasmonate besitzt, kann somit möglicherweise keine endogene Wurzelwachstumshemmung durch Jasmonate erfolgen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob 35SLOX6 Pflanzen aufgrund eines möglicherweise erhöhten Vorkommens von Jasmonaten in den Wurzeln ein kürzeres Wurzelwachstum als der Wildtyp aufweisen. Hierzu wurden Col-0, 35SLOX6 und *lox6* Samen auf MS-Agarplatten ausgelegt und die Wurzellängen nach 14 Tagen bestimmt.

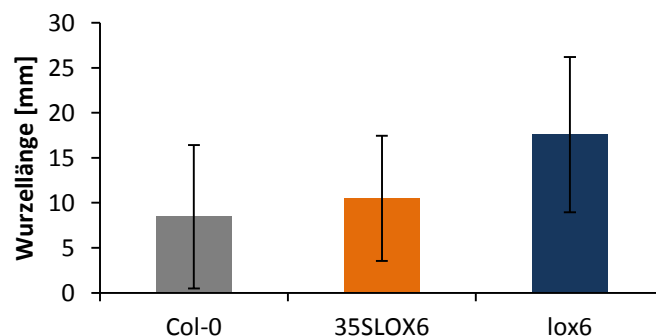


Abbildung 4.31: Wurzellängen von Col-0, 35SLOX6 und *lox6* in mm. Die Samen wurden auf MS-Agarplatten ausgelegt und die Wurzellängen mit Agnes Roots Tool nach 14 Tagen bestimmt. (MW+STABW)

Col-0 weist nach 14 Tagen eine durchschnittliche Wurzellänge von 8 mm auf. Die Wurzellänge der 35SLOX6 Keimlinge ist mit 10 mm vergleichbar mit dem Wildtyp. Am längsten sind die Wurzeln der *lox6* Mutante mit durchschnittlich 18 mm. Allerdings lassen die großen Fehlerbalken keine eindeutigen Aussagen zu. Trotzdem konnte die Tendenz der *lox6* Mutante zu längeren Wurzeln zumindest im Ansatz reproduziert werden. Dagegen scheint die LOX6 Überexpression nicht zu einem kürzeren Wurzelwachstum zu führen.

Zudem wurden einige Versuche durchgeführt, in denen die Überexpressionslinien Kupferstress ausgesetzt waren, da eine mögliche Aktivierung von LOX6 durch Stress

vermutet wurde. Hierfür wurden 35SLOX6 Linie 23.1, Col-0 und *lox6* Samen zunächst auf MS-Agarplatten mit 3 % Saccharose ausgelegt und die Keimlinge anschließend auf MS-Agarplatten mit 3 % Saccharose und zusätzlich 50 μ M oder 75 μ M Kupfer-II-Sulfat ausgelegt. Bei einem dieser Versuche wiesen bei beiden Konzentrationen die 35SLOX6 Pflanzen die längsten und *lox6* Pflanzen die kürzesten Wurzeln auf. Bei einer Wiederholung dieses Versuches waren allerdings keine Unterschiede mehr sichtbar. Bei einem weiteren Versuchsaufbau mit Platten, welche zur Hälfte aus MS-Agar mit 3 % Saccharose und zur anderen Hälfte aus MS-Agar ohne Saccharose mit jeweils 50 μ M, 75 μ M oder 100 μ M Kupfer-II-Sulfat bestanden, waren ebenfalls entweder Tendenzen zu längeren Wurzeln in den 35SLOX6 Pflanzen oder keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes sollten die Gehalte an Jasmonaten in der 35SLOX6 Linie 23.1 im Vergleich zu dem Wildtyp, *lox6* und *dde2* untersucht werden. Da LOX6 in den Wurzeln die einzige Lipoxygenase ist, welche für die Jasmonatproduktion verantwortlich ist, wurden für dieses Experiment die Wurzeln untersucht. Es wurde erwartet, dass die Überexpressionslinien in den Wurzeln mehr Jasmonate aufweisen würden als der Wildtyp. Außerdem wäre der höhere Jasmonat Gehalt in den Wurzeln komplett auf die Überexpression von LOX6 zurückzuführen. In den Wurzeln von *lox6* und *dde2* sollten keine Jasmonate vorzufinden sein. Für diesen Versuch wurden die Wurzeln von sechs Wochen alten Hydrokulturlinien geerntet und anschließend extrahiert.

4.8.7 Jasmonate in Wurzeln von Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2*

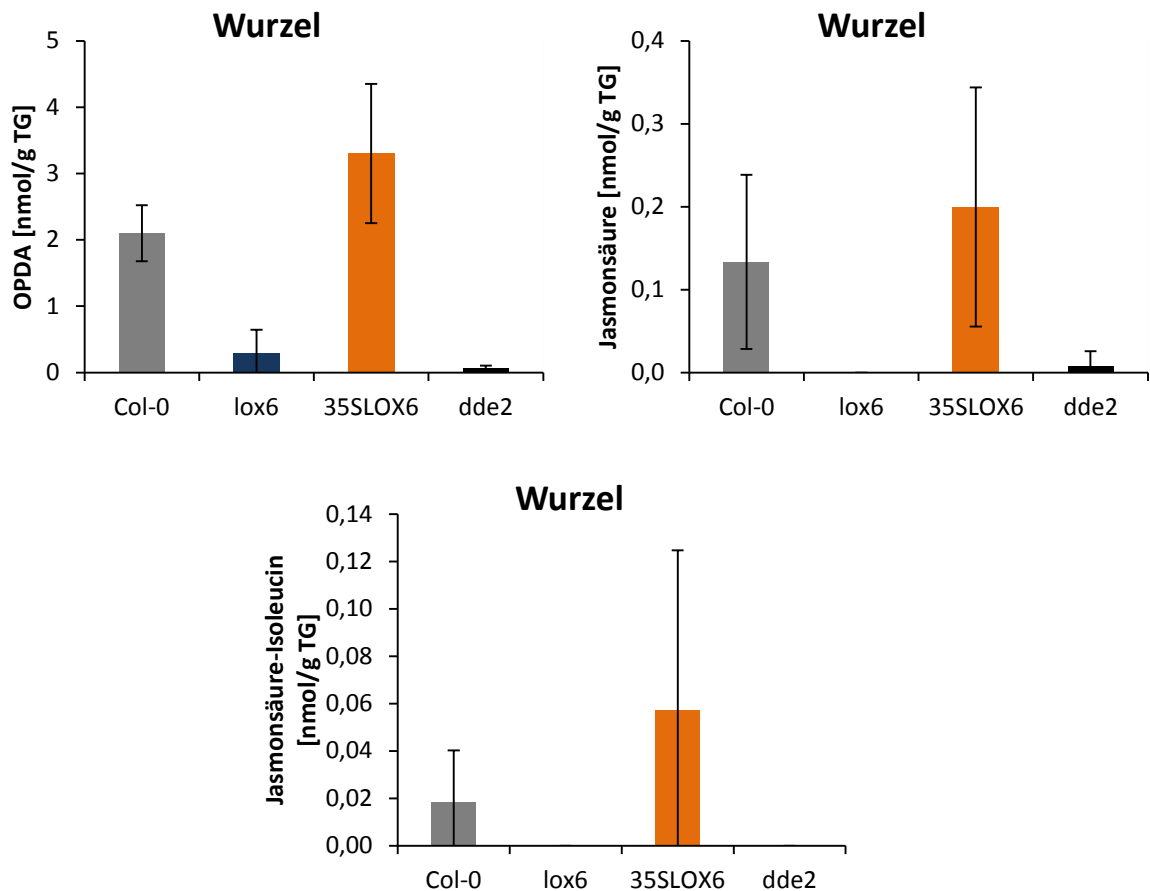


Abbildung 4.32: Jasmonat Gehalte in Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturlpflanzen in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 5 biologischen Replikaten (bei *lox6* 4 biologische Replikate) dargestellt. (MW+STABW)

Basal liegt der OPDA Gehalt im Wildtyp bei 2,1 nmol/g Trockengewicht (TG). Der Gehalt liegt bei den LOX6 Überexpressionslinien mit 3,3 nmol/g TG etwas höher. Wie erwartet weisen *lox6* und *dde2* kaum OPDA auf, sie liegen bei 0,3 nmol/g TG und 0,07 nmol/g TG. Die Jasmonsäure Gehalte liegen im Wildtyp bei 0,13 nmol/g TG, der Wert von 35SLOX6 mit 0,2 nmol/g TG unterscheidet sich kaum von dem Wildtyp. In *lox6* und *dde2* ist Jasmonsäure erneut kaum nachweisbar. Jasmonsäure-Isoleucin, die biologisch aktive Form von Jasmonsäure, zeigt die gleichen Tendenzen wie Jasmonsäure, nur mit geringeren Werten. Die Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin Werte sind beim Wildtyp wie erwartet gering, da es basale Werte sind und ein Anstieg erst nach Stress – wie z. B. Verwundung – erfolgt. Allerdings weisen die Überexpressionslinien keine höheren basalen Jasmonat Werte im Vergleich zum Wildtyp auf.

Da LOX6 möglicherweise erst durch einen Stress aktiviert wird, wurde in dem nächsten Versuch ein Trocken- bzw. Sorbitolstress durchgeführt, um die Produktion von Jasmonaten anzuregen. Da LOX6 sowohl bei Trocken-, als auch bei Sorbitolstress eine Rolle spielt, wurde eine Aktivierung von LOX6 erwartet (Seltmann et al., 2010; Grebner et al., 2013). Hierfür wurden Blätter und Wurzeln von sechs Wochen alten Hydrokulturpflanzen verwendet. Dabei sollten die drei stärksten Überexpressionslinien verwendet werden. Die Jasmonat Gehalte in den Blättern sind nun nicht mehr nur auf LOX6 zurückzuführen, sondern auch (hauptsächlich) auf LOX2 und (in kleineren Teilen) auf LOX3 und LOX4. Trotzdem wurde ebenfalls in den Blättern ein Effekt durch die LOX6 Überexpression erwartet.

4.8.8 Jasmonate nach Trockenstress und Sorbitolbehandlung

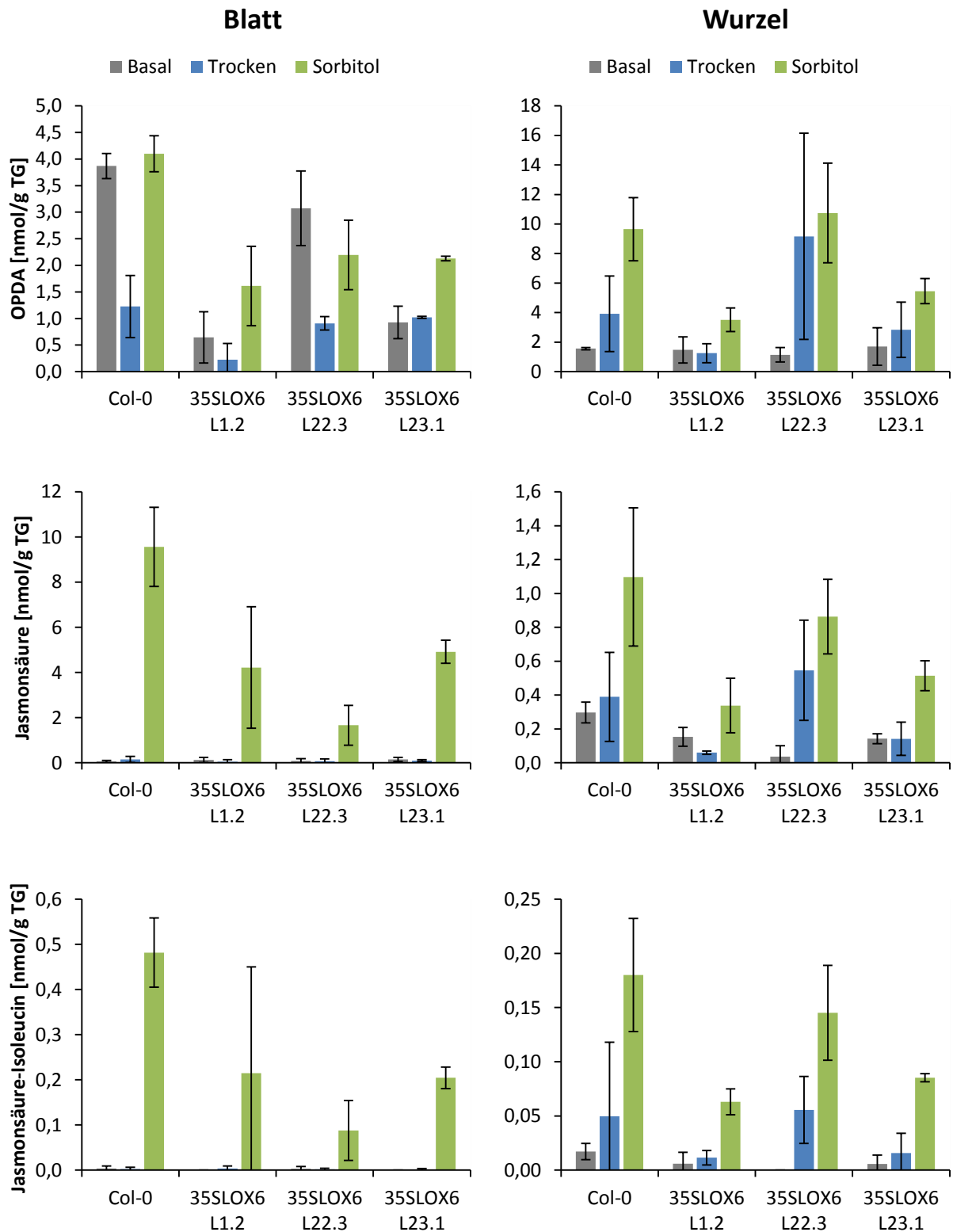


Abbildung 4.33: Jasmonat Gehalte in Blättern und Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, 35SLOX6 Linie 1.2, Linie 22.3 und Linie 23.1 Hydrokulturlpflanzen basal, nach 48 h Trockenstress sowie 500 mM Sorbitolstress in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten (bei 35SLOX6 Linie 22.3 nur 2 Blätter bei dem Trockenstress und bei Linie 23.1 basal nur 2 Wurzeln) dargestellt. (MW+STABW)

In diesem Versuch liegt der OPDA Gehalt von Col-0 Blättern basal bei 3,9 nmol/g TG. Nach 48 Stunden Trockenstress sinkt der OPDA Spiegel auf 1,2 nmol/g TG. Bei Sorbitolstress ändert er sich allerdings kaum und liegt ähnlich dem basalen Wert bei 4,1 nmol/g TG. Die Werte der drei 35SLOX6 Linien liegen basal zwischen 0,6 nmol/g TG und 3,1 nmol/g TG. Bei Trockenstress sinken in den Linien 1.2 und 22.3 ähnlich wie beim Wildtyp die OPDA Spiegel, nur bei Linie 23.1 gibt es keinen Unterschied zum basalen Wert. Bei Behandlung mit Sorbitol liegen die OPDA Werte in den Überexpressionslinien zwischen 1,6 nmol/g TG und 2,2 nmol/g TG und somit unter dem Wert des Wildtyps (4,1 nmol/g TG). Insgesamt weisen die 35SLOX6 Linien in den Blättern basal und nach Trocken- bzw. Sorbitolstress keine erhöhten OPDA Werte im Vergleich zu Col-0 auf.

In den Wurzeln liegt der basale OPDA Wert von Col-0 lediglich bei 1,6 nmol/g TG. Nach Trocken- sowie Sorbitolstress steigt dieser auf 3,9 nmol/g TG bzw. 9,6 nmol/g TG an. Das gleiche Muster findet sich auch in den drei Überexpressionslinien. Die basalen Werte ähneln denen des Wildtyps. Nach Trockenstress kommt es zu einem Anstieg von OPDA in den Wurzeln der 35SLOX6 Pflanzen in Linie 22.3 (auf 9,2 nmol/g TG) und in Linie 23.1 (auf 2,8 nmol/g TG). Lediglich der OPDA Gehalt in Linie 1.2 ändert sich nicht. Die OPDA Spiegel steigen nach Sorbitolstress weiter an, in Linie 1.2 auf 3,5 nmol/g TG, in Linie 22.3 auf 10,7 nmol/g TG und in Linie 23.1 auf 5,5 nmol/g TG. Zusammenfassend verhält sich Linie 22.3 ähnlich wie der Wildtyp und Linie 1.2 sowie 23.1 zeigen das gleiche Muster, weisen aber teilweise niedrigere Werte auf. Allerdings weisen die 35SLOX6 Linien auch in den Wurzeln weder basal, noch nach Stress erhöhte OPDA Werte im Vergleich zu dem Wildtyp auf.

Jasmonsäure ist sowohl basal als auch nach Trockenstress in den Blättern von Col-0 wie auch in den Überexpressionslinien kaum detektierbar. Lediglich bei Sorbitolstress findet ein starker Anstieg statt. Die Jasmonsäure Gehalte steigen in dem Wildtyp auf 9,6 nmol/g TG. Bei den 35SLOX6 Linien liegen die Gehalte nach Sorbitolstress zwischen 1,7 nmol/g TG (Linie 22.3) und 4,9 nmol/g TG (Linie 23.1). Somit sind auch die Jasmonsäure Gehalte in den Blättern der LOX6 Überexpressionslinien nicht höher als in Col-0. In den Wurzeln sind die basalen Jasmonsäure Spiegel von allen Genotypen ähnlich denen der Blätter. Nach Trockenstress bleiben sie unverändert, außer bei Linie 35SLOX6 22.3 ist ein Anstieg auf 0,5 nmol/g TG zu beobachten. Nach Sorbitolstress steigt Jasmonsäure in allen Genotypen an. Allerdings ist auch hier der Gehalt an Jasmonsäure in den Col-0 Wurzeln mit 1,1 nmol/g TG am höchsten.

Jasmonsäure-Isoleucin zeigt sowohl in Blättern als auch in Wurzeln die gleiche Verteilung wie Jasmonsäure, jedoch mit geringeren Werten. Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass eine Überexpression von LOX6 basal sowie nach Trocken- bzw. Sorbitolstress nicht zu einer vermehrten Produktion von Jasmonaten in Blättern und Wurzeln führt. Bei einer Wiederholung dieses Versuches konnte ebenfalls keine deutliche Erhöhung von Jasmonaten in den Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Lediglich in der Linie 23.1 zeigte sich eine leichte Tendenz zu höheren Jasmonsäure-Isoleucin Werten in Blättern und Wurzeln nach Sorbitolbehandlung und zu einem höheren Jasmonsäure Gehalt in den Wurzeln ebenfalls nach Sorbitolbehandlung. Diese Ergebnisse zeigen, dass LOX6 in dem Wildtyp für die Jasmonat Synthese nicht limitierend zu sein scheint.

Da trotz einer Überexpression von *LOX6* auf Genexpressionsebene, sowie der vermehrten Bildung des LOX6 Proteins keine Effekte bei den Jasmonaten deutlich wurden, wurde die Vermutung aufgestellt, dass das Substrat α -Linolensäure limitierend sein könnte. Um diese Annahme zu untersuchen wurden erneut sechs Wochen alte Hydrokulturpflanzen angezogen und diese mit 50 μ M α -Linolensäure behandelt. Hierfür wurde die α -Linolensäure direkt in das Hydrokulturmedium gegeben und die Wurzeln von ganzen Pflanzen darin für zwei Stunden inkubiert. Zusätzlich zu der Substratzugabe wurden die Wurzeln verwundet, da Verwundung ebenfalls in den Wurzeln einen Anstieg an Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin hervorruft. Für diesen Versuch wurden neben dem Wildtyp und der 35SLOX6 Linie 23.1 die *lox6* und *dde2* Mutante als Kontrolle verwendet. Da in dem vorangegangenen Versuch nur die 35SLOX6 Linie 23.1 eine Tendenz zu höheren Jasmonat Werten aufwies, wurde nur diese Linie für das Experiment verwendet. Hierfür war vor allem die Untersuchung der Wurzeln interessant, da hier der größte Effekt erwartet wurde, da die α -Linolensäure direkt von den Wurzeln aus dem umgebenden Medium aufgenommen wird.

4.8.9 Jasmonate nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2*

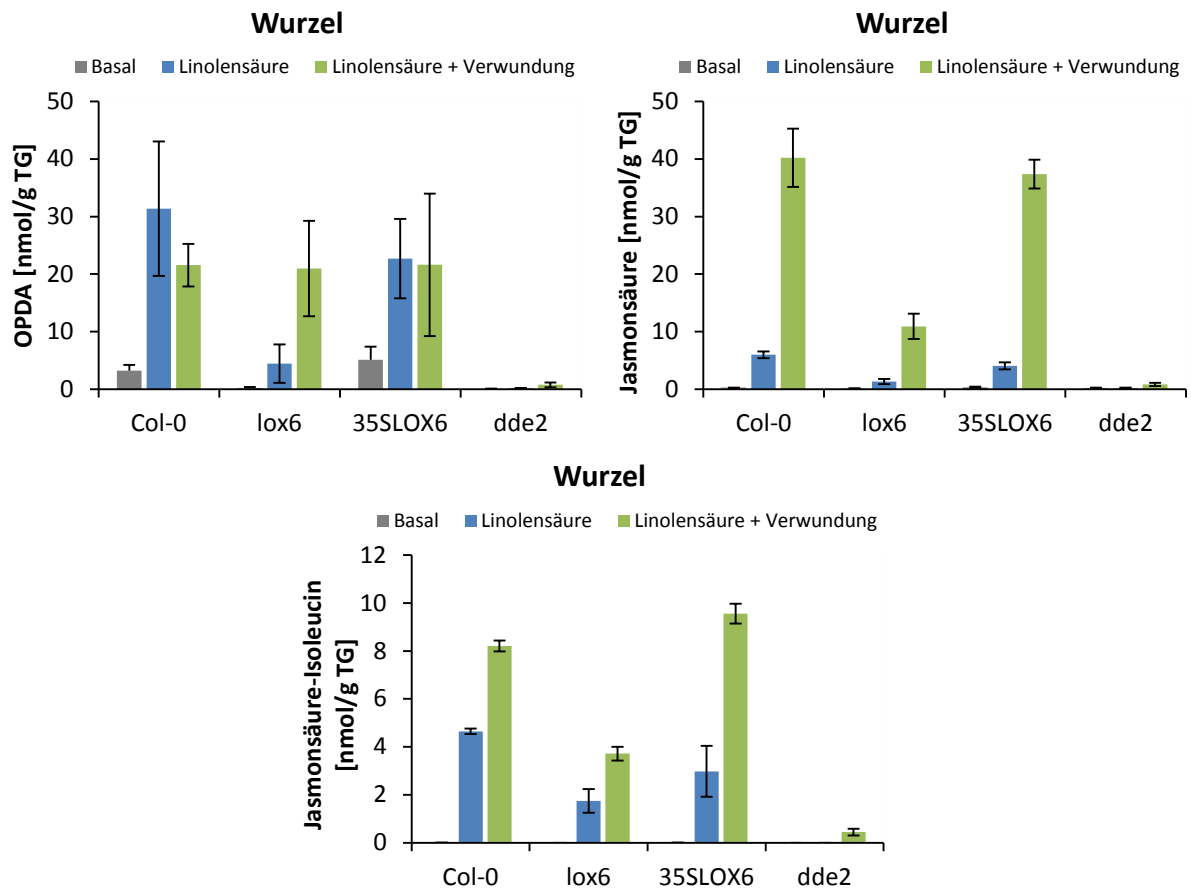


Abbildung 4.34: Jasmonat Gehalte in Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturrpflanzen basal, nach Behandlung mit 50 μ M α -Linolensäure für 2 h sowie 50 μ M α -Linolensäurebehandlung für 2 h und anschließender Verwundung mit 30 min Inkubationszeit in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten (bei 35SLOX6 23.1 und *dde2* α -Linolensäure mit Verwundung 2 biologische Replikate) dargestellt. (MW+STABW)

Der OPDA Gehalt im Wildtyp liegt basal bei 3,2 nmol/g TG. Nach α -Linolensäurebehandlung steigt der Gehalt auf 31,4 nmol/g TG an. Bei einer Kombination aus α -Linolensäurebehandlung und Verwundung steigt der Wert nicht weiter an, er liegt bei 21,6 nmol/g TG. Die 35SLOX6 Linie 23.1 zeigt die gleichen Tendenzen wie der Wildtyp. Von einem basalen Wert von 5,1 nmol/g TG steigt der OPDA Gehalt nach α -Linolensäurebehandlung auf 22,7 nmol/g TG. Durch zusätzliche Verwundung wird dieser Wert ebenfalls nicht weiter erhöht, er liegt wie bei dem Wildtyp bei 21,6 nmol/g TG. Auch in der *lox6* Mutante steigt der OPDA Spiegel von basalen 0,2 nmol/g TG auf 4,5 nmol/g TG. Hier steigt der Wert allerdings durch die zusätzliche Verwundung weiter an, und zwar auf 21 nmol/g TG wie bei dem Wildtyp und 35SLOX6. In der *dde2* Mutante sind dagegen kaum Spiegel vorhanden, weder

basal noch nach den Behandlungen. Allerdings sind die OPDA Gehalte in den Überexpressionslinien nach α -Linolensäurebehandlung sowie zusätzlicher Verwundung nicht höher als im Wildtyp. Lediglich der basale Wert ist hier etwas erhöht.

Jasmonsäure ist basal bei allen Genotypen kaum vorhanden. Nach α -Linolensäurebehandlung steigt der Jasmonsäure Gehalt in Col-0 auf 6 nmol/g TG und bei zusätzlicher Verwundung sogar auf 40,2 nmol/g TG. 35SLOX6 zeigt den gleichen Verlauf mit 4 nmol/g TG nach α -Linolensäurebehandlung und 37,4 nmol/g TG bei zusätzlicher Verwundung und weist somit keine höheren Werte auf als Col-0. *lox6* weist zwar das gleiche Muster auf, aber mit viel geringeren Werten. In *dde2* sind dagegen bei keiner Behandlung Gehalte an Jasmonsäure detektierbar.

Jasmonsäure-Isoleucin zeigt die gleichen Muster wie Jasmonsäure, jedoch mit geringeren Werten. Allerdings ist hier der Unterschied zwischen der α -Linolensäurebehandlung separat und mit zusätzlicher Verwundung nicht so groß wie bei der Jasmonsäure. Hier ist lediglich der Jasmonsäure-Isoleucin Wert nach α -Linolensäurebehandlung und zusätzlicher Verwundung in 35SLOX6 höher (9,6 nmol/g TG) als im Wildtyp (8,2 nmol/g TG).

Zusammenfassend führt die α -Linolensäurebehandlung zu einem starken Anstieg der Jasmonate, wobei Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin bei zusätzlicher Verwundung weiter ansteigen. Diese Anstiege sind allerdings in der Überexpressionslinie nicht höher als im Wildtyp. Somit scheint die Substratmenge in den 35SLOX6 Linien nicht der Grund dafür zu sein, dass keine erhöhte Produktion von Jasmonaten im Vergleich zum Wildtyp stattfindet. Die Jasmonate in den Wurzeln der *lox6* Mutante können sich durch radikalische Reaktionen erklären lassen. Auch durch Radikale kann das Ausgangssubstrat α -Linolensäure oxidiert werden. Dabei entsteht ebenfalls 13-HPOT, welche dann zu den Jasmonaten weiter reagieren kann. Bei *dde2* ist dies nicht möglich, da die AOS fehlt, welche zur Generierung der Jasmonate notwendig ist. Bei einer Wiederholung dieses Versuches, allerdings ohne zusätzliche Verwundung, konnten die Ergebnisse reproduziert werden.

Es wurden außerdem die Blätter der mit α -Linolensäure behandelten Pflanzen untersucht, aber auch hier konnten keine erhöhten Jasmonat Werte in der Überexpressionslinie im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Anhang 6.7 Abbildung 6.13).

Da die Jasmonate in den Überexpressionslinien trotz erhöhtem Vorkommen von LOX6 und ausreichenden Substratmengen nicht höher als in dem Wildtyp waren, sollten weitere Produkte von LOX6 untersucht werden, da diese möglicherweise erhöht sein könnten. Somit wurden Hydroxyfettsäuren sowie Ketoverbindungen untersucht. Allerdings konnte auch bei diesen Versuchen in den Wurzeln kein erhöhtes Vorkommen von LOX6 Produkten in den Überexpressionslinien im Vergleich zu dem Wildtyp gefunden werden (siehe Anhang 6.8 Abbildungen 6.14 und 6.15 und Anhang 6.9 Abbildung 6.16). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine alleinige α -Linolensäurebehandlung oder auch mit zusätzlicher Verwundung eine massive nicht enzymatische, radikalische Bildung von HOTEs stattfindet, da vor allem 9-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE anstiegen (siehe Anhang 6.8 Abbildung 6.14). Bei den HODEs stiegen hauptsächlich 9-HODE sowie 13-HODE an, so dass hier von einer enzymatischen Reaktion ausgegangen werden kann, da sonst auch die Gehalte an 12-HODE ansteigen müssten (siehe Anhang 6.8 Abbildung 6.15). Von den Ketofettsäuren wurden 9-KOTE, 9-KODE, 13-KOTE sowie 13-KODE untersucht. Es konnte vor allem ein Anstieg an 9-KODE im Wildtyp nach α -Linolensäurebehandlung und in allen Genotypen nach α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung festgestellt werden (siehe Anhang 6.8 Abbildung 6.16).

Auch in den Blättern konnten keine höheren Spiegel an Hydroxyfettsäuren oder Ketofettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, siehe Bachelorarbeit von Melissa Unger (2015), Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, betreut durch die Autorin).

Da die Untersuchung anderer LOX6 Produkte wie Hydroxyfettsäuren und Ketoverbindungen ebenfalls keine erhöhten Werte in den Überexpressionslinien im Vergleich zu dem Wildtyp zeigte, sollten nun durch eine „untargeted Analyse“ alle in den 35SLOX6 Linie 23.1 Pflanzen enthaltenen Metabolite mit denen von Col-0 verglichen werden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob es bisher nicht untersuchte Metabolite in den Überexpressionslinien gibt, welche im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder erniedrigt sind. Hierfür wurden erneut Col-0, 35SLOX6 Linie 23.1 und *lox6* Hydrokulturrpflanzen angezogen, deren Wurzeln nach sechs Wochen geerntet und anschließend extrahiert wurden.

4.8.10 „Untargeted Analyse“ von Metaboliten in Col-0, 35SLOX6 und *lox6*

Zunächst wurden die bei den Messungen gewonnenen Daten in einer Präprozessierung mit ProGenesis QI untersucht. Dabei wurden 1057 Metabolite bei Messungen mit negativer und 1000 Metabolite mit positiver ESI detektiert. Diese Treffer wurden dann mit Hilfe einer Univariate Analyse gefiltert ($p < 0,02$; „fold change“ > 5), sodass noch jeweils 30 Metabolite, welche mit positiver sowie negativer ESI gemessen worden waren, übrig blieben. Diese Marker wurden auf Muster hin untersucht. Es wurde erwartet, dass die Metabolite entweder in der *lox6* Mutante am niedrigsten und in den Überexpressionslinien am höchsten sein würden oder genau umgekehrt. Es gab schließlich 28 mit negativer und elf mit positiver ESI gemessene Metabolite, auf die dieser Trend näherungsweise zutraf. Bevor die gefundenen Marker identifiziert werden sollten, wurde in einem zweiten Experiment ihre Wiederholbarkeit geprüft. Es fanden sich in beiden Experimenten drei mit negativer und ein mit positiver ESI gemessene Marker. Diese sollen nun im Folgenden genauer betrachtet werden.

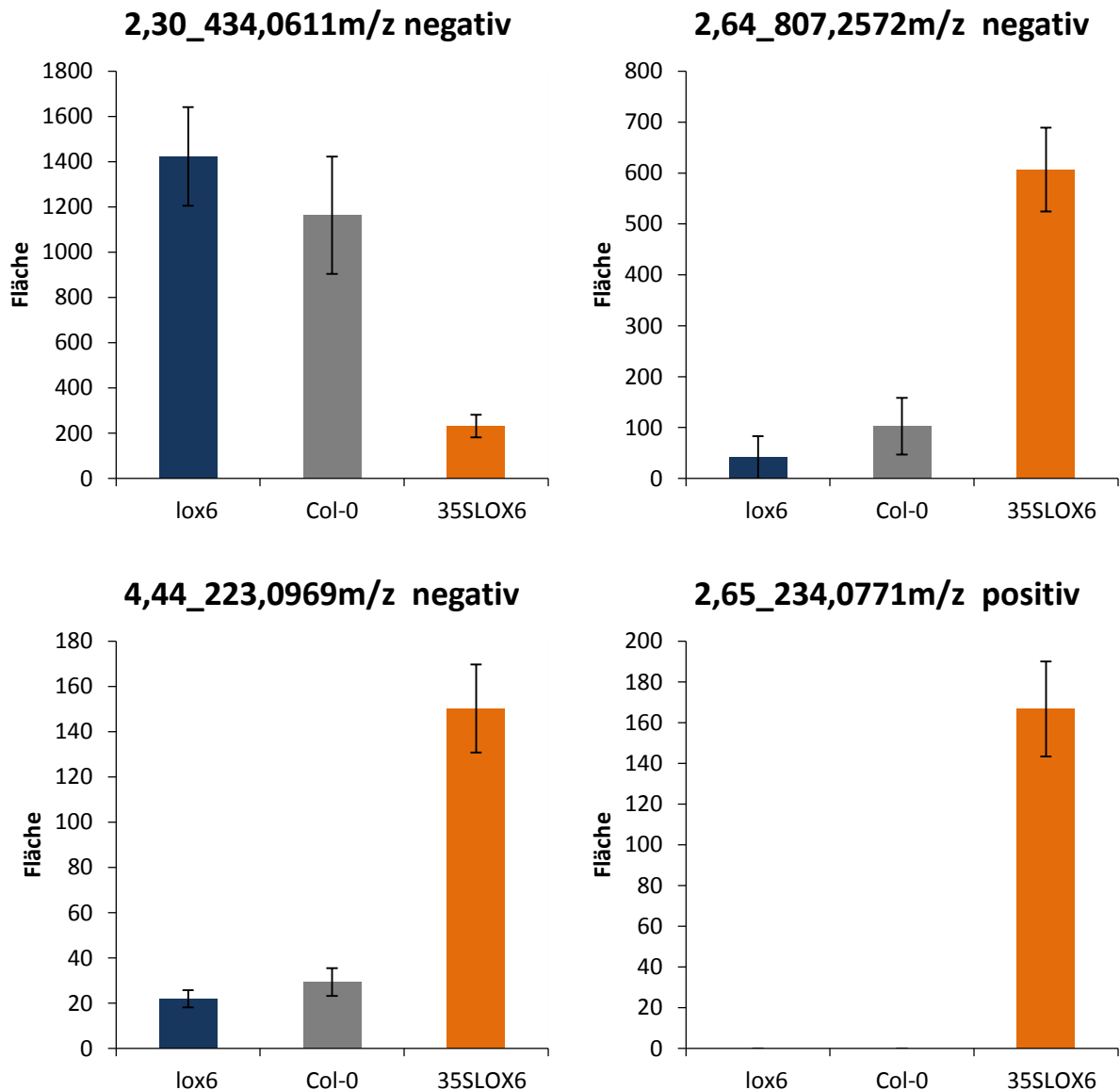


Abbildung 4.35: Metabolite, welche bei einer „untargeted Analyse“ Unterschiede zwischen 35SLOX6 23.1 und Col-0 bzw. *lox6* aufwiesen. Die Metabolite wurden mit der Retentionszeit und dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis benannt. Es wurden 3 im negativen ESI und 1 im positiven ESI gefunden. Es sind jeweils die Ergebnisse von 5 biologischen Replikaten (bei *lox6* nur 4) dargestellt. (MW+STABW)

Der Marker mit einer Retentionszeit von 2,3 Minuten und einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 434,0611 ist am stärksten in *lox6* vertreten (Fläche von 1424) und am schwächsten in der Überexpressionslinie (Fläche von 231). Der Wert des Wildtyps liegt mit einer Fläche von 1163 dazwischen. Im Gegensatz dazu sind die zwei anderen negativen Marker hauptsächlich in 35SLOX6 zu finden. Der Metabolit mit einer Retentionszeit von 2,64 Minuten und einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 807,2572 kommt nur geringfügig in *lox6* vor (Fläche von 41). In der Überexpressionslinie sind es dagegen 607 und im Wildtyp 102. Auch der Marker mit einer Retentionszeit von 4,44 Minuten und einem Masse-zu-

Ladung-Verhältnis von 223,0969 ist mit einer Fläche von 150 hauptsächlich in 35SLOX6 vorhanden. In Col-0 beträgt die Fläche nur 29 und in *lox6* mit 22 annähernd gleichviel. Der einzige positive Marker (Retentionszeit 1,65 und Masse-zu-Ladung-Verhältnis 234,0771) ist nur in 35SLOX6 mit einer Fläche von 167 detektierbar.

Die Identifizierung solcher Marker mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie ist nicht einfach und bietet häufig keine 100 %igen Aussagen. Dennoch wurde versucht, die Marker zuzuordnen. Der erste Marker (2,30_434,0611m/z) war am einfachsten zu identifizieren. Er weist eine geringe Retentionszeit, eine hohe Polarität und eine mittelgroße Masse auf. Die Elementarkomposition lautet höchstwahrscheinlich (zu 99,34 %) $C_{13}H_{24}NO_9S_3$ und mit Hilfe der Datenbank Metlin wurde Glucoberteroin als der wahrscheinlichste Metabolit identifiziert. Die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank zeigt, dass Glucoberteroin in Pflanzen zu finden ist und bei der Glucosinolatbiosynthese vorkommt (Blažević et al., 2011).

Der zweite Marker (2,64_807,2572m/z) ist höchstwahrscheinlich ein Dimer und weist deshalb eine so große Masse auf (das Masse-zu-Ladung-Verhältnis von dem Monomer beträgt 403,124). Zudem besitzt er ebenfalls eine geringe Retentionszeit und somit eine hohe Polarität. Die Elementarkomposition von dem Monomer ist mit 87,52 %iger Wahrscheinlichkeit $C_{17}H_{23}O_{11}$. In der Metlin Datenbank wurden dazu passend 10 Metabolite gefunden, wobei die 3 wahrscheinlichsten Scandosidmethylester, Gardenosid und Oleosid-11-methylester sind, welche alle in Pflanzen vorkommen (Li et al., 2009; Wang et al., 2015; Ben Mansour et al., 2015).

Der dritte gefundene Metabolit (4,44_223,0969m/z) besitzt eine höhere Retentionszeit, ist somit weniger polar und weist eine kleinere Masse auf. Vermutlich ist er ein „In-Source“ Fragment von der Masse 339,107. Mit der Masse 339,108 wurden in Metlin zwölf Treffer gefunden und mit der Masse 223,097 39 Treffer. Zwischen der Elementarkomposition von der Masse 339,108 ($C_{16}H_{19}O_8$) und der Masse 223,097 ($C_{12}H_{15}O_4$) liegt $C_4H_4O_4$. In der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank findet man für $C_{16}H_{20}O_8$ die Treffer Linocinnamarin und Oenanthosid A. Beide sind Glucoside und konnten in Pflanzen nachgewiesen werden (Klosterman et al., 1955; Fujita et al., 1995).

Der vierte Metabolit welcher nur in 35SLOX6 vorkommt, ebenfalls eine geringe Retentionszeit und Polarität sowie eine mittelgroße Masse aufweist, konnte nicht identifiziert werden.

Da dieser Marker vielleicht auch nur ein Artefakt sein könnte, welches möglicherweise durch die Überexpression entstanden ist, sollten die bereits gefundenen Metabolite auch in anderen 35SLOX6 Linien gesucht werden. Dafür wurden die Linien 1.2 und 22.3 verwendet. Der erste (2,30_434,0611m/z) und der dritte (4,44_223,0969m/z) Metabolit konnten auch in den beiden anderen Überexpressionslinien gefunden werden und zeigten die gleichen Tendenzen. Allerdings waren die Flächen um einiges geringer, was wahrscheinlich mit technischen Gründen und einer zu geringen Sensitivität des Messgerätes zusammenhing. Vermutlich konnten aus diesem Grund die anderen beiden Metabolite bei diesem dritten Versuch nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend scheint es interessante Unterschiede in den Metaboliten zwischen den LOX6 Überexpressionslinien und dem Wildtyp zu geben. Allerdings bleibt zu untersuchen, welche Rolle diese Metabolite spielen.

5 Diskussion

Oxylipine sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche enzymatisch oder nicht enzymatisch oxidiert werden können. Für die enzymatische Oxidation spielen Lipoxygenasen eine maßgebliche Rolle, von denen in *Arabidopsis thaliana* sechs verschiedene Isoformen (zwei 9-Lipoxygenasen und vier 13-Lipoxygenasen) vorhanden sind. Die dabei entstehenden Oxylipine sind für die Pflanzen wichtige Produkte, welche als Signalmoleküle bedeutende Aufgaben bei der Abwehr gegenüber abiotischem und biotischem Stress sowie bei Entwicklungsprozessen übernehmen. Eine wesentliche Untergruppe dieser Oxylipine sind die Jasmonate, welche bei Stressen wie z. B. Herbivorenfraß, Verwundung, Trockenstress und Blüten- sowie Samenentwicklung eine Funktion innehaben. Zur Bildung der Jasmonate tragen allerdings nur die vier 13-Lipoxygenasen LOX2, LOX3, LOX4 und LOX6 bei. In dieser Arbeit sollten unter anderem die in *Arabidopsis thaliana* vorkommenden 13-Lipoxygenasen auf ihre Funktionen, verschiedenen Produkte und ihre Lokalisation hin untersucht werden. Besonders in Bezug auf LOX6 konnten schon einige interessante Entdeckungen an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg gemacht werden.

5.1 Relevanz und Funktionen der Lipoxygenase 6

Es konnte bisher gezeigt werden, dass auch Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* unabhängig von den Blättern Jasmonate generieren können. Grebner et al. (2013) konnten mit Hilfe von Pfropfungsversuchen mit der Jasmonsäure defizienten Mutante *dde2* und dem korrespondierenden Wildtyp zeigen, dass Jasmonate in *Arabidopsis thaliana* nicht von den Blättern in die Wurzeln transportiert werden, sondern die Wurzeln unabhängig von den Blättern OPDA generieren und zu Jasmonsäure konvertieren können. Allerdings wurde erst kürzlich von Gasperini et al. (2015) gezeigt, dass Jasmonate und ihre Vorläufer axial von verwundeten Blättern zu unverwundeten Wurzeln transportiert werden können, wobei dies LOX2 abhängig geschieht. Ebenfalls mit Hilfe von Pfropfungsversuchen von Jasmonsäure defizienten *aos* Mutanten konnte eine Translokation von dem Blatt in die Wurzel beobachtet werden. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass nach Verwundung eine radiale Ausbreitung von Jasmonaten in der Blattrosette möglich ist. Auch wenn dies Erklärungen für die distalen Reaktionen in der Pflanze nach Verwundung liefert, besteht noch großer Forschungsbedarf. Insgesamt gibt es unterschiedliche Meinungen in der Literatur zu dem Oxylipin Transport in Pflanzen. Es gibt Untersuchungen, in denen z. B. in der Tomate

(*Solanum lycopersicum*) von einem Jasmonsäure Transport von Zelle zu Zelle in den Blättern ausgegangen wird (Farmer et al., 1992). Auch in Tabak konnte ein Transport von Jasmonsäure von Blättern in Wurzeln gezeigt werden (Zhang und Baldwin, 1997). Dagegen konnten Strassner et al. (2002) in der Tomate keine Hinweise dafür finden, dass Jasmonate von verwundeten in distale unverwundete Blätter transportiert werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Pfropfungsexperimenten mit Col-0 und *dde2* konnte ebenfalls kein Hinweis auf einen Transport gefunden werden. Gepfropfte Col-0 und *dde2* Kombinationen zeigten ähnliche Jasmonat Gehalte basal und nach Verwundung wie die nicht gepfropften Kontrollpflanzen. Auch Koo et al. haben 2009 publiziert, dass in *Arabidopsis thaliana* die Jasmonsäure-Isoleucin Akkumulation in distalen Blättern nach Verwundung von einer *de novo* Synthese und nicht von einem Transport von Jasmonsäure oder Jasmonsäure-Isoleucin stammt. Trotzdem scheint es wahrscheinlich, dass es Verwundungssignale gibt, welche zu einem Anstieg von Jasmonaten und den damit verbundenen Abwehrmechanismen in distalen unverwundeten Pflanzenbereichen führen (Koo und Howe, 2009; Farmer et al., 2014).

LOX6 ist unter anderem für die basale OPDA Produktion in den Blättern notwendig. Zudem ist LOX6 die einzige 13-Lipoxygenase, welche in den Wurzeln für die Jasmonatproduktion sowohl basal als auch nach Stress verantwortlich ist (Grebner et al., 2013). Gasperini et al. bestätigten 2015 (mit Hilfe einer *lox2/3/4* Mutante) ebenfalls, dass LOX6 die einzige Lipoxygenase ist, welche in *Arabidopsis thaliana* Jasmonsäure Vorläufer generieren kann. Interessant ist dabei auch, dass der erste Teil der Jasmonsäurebiosynthese eigentlich in den Chloroplasten stattfindet. Die dort generierte OPDA wird dann in die Peroxisomen transportiert, um dort zu Jasmonsäure konvertiert zu werden. Diese These wird dadurch unterstützt, dass bisher für die Jasmonsäurebiosyntheseenzyme LOX, AOS und AOC eine Lokalisation in Chloroplasten beschrieben wurde (Feussner und Wasternack, 2002; Schaller et al., 2008). Allerdings scheinen diese Enzyme auch in Plastiden in Wurzeln lokalisiert zu sein, da Wurzeln ebenfalls OPDA herstellen können (Grebner et al., 2013). Auch Acosta und Farmer (2010) erwähnen in ihrem Review, dass aufgrund der höheren Jasmonat Spiegel in Blättern im Vergleich zu den Wurzeln wahrscheinlich Zellen mit Chloroplasten die meisten Jasmonate generieren, aber das nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch andere Plastiden (in den meisten Wurzelzellen und den äußersten epidermalen Zellen) Jasmonate produzieren können.

Chauvin et al. (2013) zeigten mit Hilfe von GUS Pflanzen, dass LOX6 in dem Xylem (Protoxylem und Metaxylem) der Blätter zu finden ist. Außerdem waren bei GUS Färbungen die jüngeren Blätter stets stärker blau gefärbt als die älteren. Gasperini et al. (2015) konnten ebenfalls mit Hilfe von GUS Färbungen bestätigen, dass LOX6 in Xylem Kontaktzellen lokalisiert ist. Von dort könnten durch LOX6 generierte Oxylipine möglicherweise in Siebelemente des Phloems oder in Gefäße des Xylems gelangen, von wo aus sie möglicherweise andere Organe erreichen könnten.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls mit LOX6pGUS Keimlingen eine Lokalisation von LOX6 durch eine Promotoraktivität in den Wurzeln bestätigt werden (siehe Abbildung 4.18). In den Blättern war hauptsächlich eine Färbung in den Verästelungen der Blattadern sowie an den Blatträndern zu sehen. Zudem wurde die LOX6 Promotoraktivität in den Blättern durch Verwundung induziert (siehe Abbildungen 4.19 und 4.20). Allerdings konnte mit dieser Methode keine eindeutige Aussage über die genaue zelluläre Lokalisation erfolgen. Um die subzelluläre Lokalisation von LOX6 zu untersuchen, wurden Konstrukte mit dem fluoreszierenden Protein GFP hinter dem 35S Promotor kloniert und in Pflanzen transformiert, welche in Zukunft noch selektioniert werden müssen. Zudem wurden Konstrukte mit LOX2 und AOS hinter dem 35S Promotor kloniert, aber noch nicht in Pflanzen transformiert. Weiterhin wurde damit begonnen, hinter dem endogenen Promotor Konstrukte mit LOX6, LOX2 und AOS mit GFP zu klonieren, um Artefakten – verursacht durch eine zu starke und unnatürliche Überexpression durch den 35S Promotor – entgegenzuwirken. Mit Hilfe dieser Konstrukte kann in der Zukunft die subzelluläre Lokalisation der Jasmonsäurebiosyntheseenzyme vor allem in den Wurzeln untersucht werden. Darüber hinaus wäre eine Untersuchung einer möglichen Kolokalisation zwischen LOX6 bzw. LOX2 und AOS interessant, da hier ein „Substrat Channeling“ vorliegen könnte. Dies würde bei der Effizienz und Schnelligkeit der Jasmonsäurebiosynthese Sinn machen. Zudem gibt es in der Literatur Belege für ein „Substrat Channeling“ in *Arabidopsis thaliana*, beispielsweise in der Biotin Synthese (Cobessi et al., 2012). In den Chloroplasten der Blätter könnte außerdem bei Stress eine Translokation des LOX2 Enzyms zu den Thylakoidmembranen des Granums möglich sein, da für LOX2 bereits publiziert wurde, dass sie auch veresterte Fettsäuren oxidieren kann (Zoeller et al., 2012). Dort könnte dann AOS mit LOX2 kolokalisieren, da eine räumliche Nähe der Biosyntheseenzyme für eine schnellere Jasmonsäurebiosynthese von Vorteil wäre. Für LOX6 konnte bisher keine Aktivität an

Membranen mit veresterten Fettsäuren gezeigt werden. Hier ist es wahrscheinlicher, dass sie im Cytosol an den freien Fettsäuren arbeitet. Allerdings ist hier ebenfalls eine Kollokalisierung von LOX6 und AOS z. B. in Wurzelplastiden vorstellbar. Mit Hilfe der verschiedenen Konstrukte wären ebenfalls Färbungen mit Antikörpern gegen GFP in Blatt- und Wurzelschnitten möglich. Es könnte zudem ein mit Gold markierter Zweitantikörper verwendet werden, so dass auch Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop möglich wären, um den genauen Standort der Enzyme in der Zelle zu lokalisieren.

Die LOX6 katalysiert die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren am 13. Kohlenstoffatom. Dabei entsteht eine Vielzahl an Produkten. Neben den Jasmonaten entstehen Hydroperoxyfettsäuren, Hydroxyfettsäuren, Ketone, Alkohole, Epoxide sowie Aldehyde (nicht in Col-0) und Divinylether. Mit Hilfe der 35SLOX6 Pflanzen sollten die LOX6 Produkte und deren Funktionen genauer untersucht werden. Zunächst ließen sich trotz der Überexpression von *LOX6* auf Genexpressionsebene und Proteinebene, sowohl basal als auch nach Stress (Sorbitol, Trockenheit und Verwundung) keine Unterschiede in den Jasmonat Gehalten im Vergleich zum Wildtyp feststellen (für Sorbitol und Trockenheit siehe Abbildung 4.33; Verwundung nicht gezeigt). Eine Überexpression des LOX6 Proteins führte weder basal noch nach Stress zu einer erhöhten Produktion von Jasmonaten. Somit scheint das LOX6 Protein im Wildtyp nicht limitierend für die Jasmonsäurebiosynthese zu sein. Dies wurde auch schon für LOX2 beschrieben: So zeigte eine Mutante mit verminderter *LOX2* Expression unbehandelt keine Beeinträchtigungen im Wachstum und keine niedrigeren Jasmonsäure Gehalte im Vergleich zum Wildtyp. Somit scheint LOX2 unter diesen Umständen auch nicht limitierend zu sein. Nach Verwundung allerdings weisen *lox2* Mutanten niedrigere Jasmonsäure Spiegel auf (Bell et al., 1995).

Um die Jasmonsäure Gehalte zu verändern, ist es also erforderlich, mehr über die Regulation der Jasmonsäurebiosynthese zu wissen. Einige der Biosyntheseenzyme sind redundant, wie die Lipoxygenasen, von welchen es sechs verschiedene gibt. Auch für AOC kodieren vier Gene, während die AOS nur durch ein Gen kodiert wird. Zudem gibt es in *Arabidopsis thaliana* sechs OPDA Reduktasen, wovon aber nur OPR3 eine Rolle in der Jasmonsäurebiosynthese spielt (Wasternack und Hause, 2013). Es ist auch möglich, dass bei Überexpressionslinien die Überexpression in einem anderen Kompartiment in der Zelle stattfindet und somit keinen Effekt hat. Oder die Pflanze könnte die Überexpression wieder

herunter regulieren (Berger, 2002). Diese beiden Effekte und eine mögliche erforderliche Aktivierung der LOX6 könnten erklären, warum die 35SLOX6 Pflanzen keine erhöhten Jasmonat Gehalte zeigen.

Auch nach Zugabe des Substrates α -Linolensäure zeigten sich bei 35SLOX6 Pflanzen keine erhöhten Jasmonat Werte im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise könnten auch die anderen Enzyme der Biosynthese wie z. B. AOS oder AOC limitierend sein, so dass keine weiteren Jasmonate gebildet werden können. Allerdings publizierten Laudert et al. (2000), dass AOS zumindest unter basalen Bedingungen nicht limitierend ist. Eine AOS Überexpressionslinie zeigt in dieser Studie basal nicht mehr Jasmonsäure als der Wildtyp. Allerdings weist sie nach Verwundung höhere Spiegel als der Wildtyp auf (Laudert et al., 2000).

Zudem wurde untersucht, ob andere Metabolite durch die erhöhte Verfügbarkeit von α -Linolensäure entstehen. Bei einer Untersuchung der Hydroxyfettsäuren zeigte sich, dass die Substratzugabe zu starken radikalischen Reaktionen geführt hatte, was vermutlich an einem starken oxidativen Stress lag. Dies wurde dadurch deutlich, dass vor allem 9-, 12-, 13- und 16-HOTE stark und vergleichbar anstiegen und somit ein radikalisches Muster aufzeigten (siehe Anhang 6.8 Abbildung 6.14). Durch zusätzliche Verwundung konnten die Gehalte nicht mehr gesteigert werden und zeigten das gleiche radikalische Muster. Offenbar nahmen die Pflanzen die α -Linolensäure nicht als Substrat wahr, sondern als abiotischen Stress. Es bleibt zu untersuchen, ob eine niedrigere Konzentration zu einem geringeren oxidativen Stress führt und somit als Substratzugabe dienen würde. Es gibt bisher nur wenig Literatur zu dem Zusammenhang von α -Linolensäure und der Regulation der Genexpression während abiotischem Stress. Mata-Pérez et al. (2015) konnten aber mittels eines RNA-Seq zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen α -Linolensäure, oxidativem Stress und ROS gibt. Die α -Linolensäure scheint Gene regulieren zu können, welche in einer abiotischen Stressantwort, vor allem bei ROS, exprimiert werden.

Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass durch eine LOX6 Überexpression Metabolite entstehen, welche im Wildtyp in einer anderen Konzentration zu finden sind. Mit Hilfe einer „untargeted Analyse“ mittels eines SYNAPT Q-TOF Massenspektrometers wurden vier Metabolite gefunden, welche in den 35SLOX6 Pflanzen im Gegensatz zum Wildtyp erhöht oder erniedrigt waren (siehe Abbildung 4.35). Einer dieser Metabolite wurde als

Glucobroteroin identifiziert, welches in Brassicaceen (zu denen auch *Arabidopsis thaliana* gehört) ein Produkt der Glucosinolatbiosynthese ist (Blažević et al., 2011).

In dem Zusammenhang mit Glucosinolaten wurden einige Fraßversuche durchgeführt. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Pflanzen mit einem niedrigeren Glucosinolat Gehalt bevorzugt gefressen wurden. Es wurde beispielsweise bereits publiziert, dass Hydrolyseprodukte von Glucosinolaten die Überlebensrate von *Porcellio scaber* negativ beeinflussen können (van Ommen Kloeke et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten Experimente, dass 35SLOX6 Wurzeln im Vergleich zu der Wildtyp Kontrolle weniger stark gefressen werden (siehe Abbildung 4.30). Dies steht in Konflikt zu der oben genannten Annahme, da das Glucobroteroin in den 35SLOX6 Pflanzen deutlich weniger vorkommt, als in dem Wildtyp. Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen Glucosinolaten und Jasmonsäure bei der Abwehr von Fliegen. Humphrey et al. konnten 2016 zeigen, dass eine Behandlung mit Jasmonsäure die Glucosinolatbiosynthese in *Cardamine cordifolia* (Brassicaceae) induziert und somit adulte weibliche *Scaptomyza nigrita* (Drosophilidae) Fliegen abwehrt. Darüber hinaus wird auch das Wachstum der Larven negativ beeinflusst (Humphrey et al., 2016).

Farmer und Dubugnon publizierten 2009, dass Jasmonate das Fraßverhalten von Detritivoren beeinflussen. Pflanzen ohne Jasmonate wie *dde2* Mutanten wurden von Kellerasseln (*Porcellio scaber*) schneller gefressen als der Wildtyp. Dies konnte von Grebner et al. (2013) bestätigt werden, da auch *lox6* Wurzeln (welche keine Jasmonate besitzen) von Kellerasseln schneller aufgefressen wurden als Col-0 Wurzeln. Allerdings weisen die 35SLOX6 Pflanzen keine erhöhten Jasmonat Werte im Vergleich zum Wildtyp auf (siehe Abbildungen 4.32 und 4.33). Trotzdem könnte das vermehrte Vorhandensein (oder auch ein geringeres Vorhandensein) eines oder mehrerer der anderen in den 35SLOX6 Wurzeln gefundenen Metabolite zu einem Schutz der Wurzeln vor Detritivoren führen.

Für die Identifikation der anderen Metabolite können nur Vermutungen für zwei andere geäußert werden, der vierte Metabolit konnte nicht identifiziert werden. Einer der anderen Metabolite könnte Scandosidmethylester, Gardenosid oder Oleosid-11-methylester sein, welche ebenfalls in Pflanzen (*Hedyotis chrysotricha*, Gardenie und Olive) vorkommen (Li et al., 2009; Wang et al., 2015; Ben Mansour et al., 2015). Ein weiterer könnte Linocinnamarin oder Oenanthosid A sein. Beides sind Glucoside, welche bereits in Pflanzen nachgewiesen

werden konnten (Klosterman et al., 1955; Fujita et al., 1995). Bisher wurde noch kein Zusammenhang zwischen diesen Metaboliten und dem Fraßverhalten von Asseln untersucht, so dass noch geklärt werden muss, warum die Asseln den Wildtyp im Vergleich zu den 35SLOX6 Wurzeln präferieren. Auch die Rolle der anderen Metabolite, welche in den 35SLOX6 Pflanzen vorkommen, muss noch weiter auf ihre Funktion hin untersucht werden. Bonaventure et al. (2007) konnten zeigen, dass z. B. Mutanten mit einem höheren Jasmonat Gehalt wie die *fou2* Mutante kleinere Blätter aufweisen. Die 35SLOX6 Pflanzen besitzen zwar keine höheren Jasmonat Gehalte, jedoch wäre es möglich, dass einer der anderen Metabolite ebenfalls in einem Zusammenhang mit dem kleineren Blattwachstum der 35SLOX6 Pflanzen steht. Diesbezüglich besteht allerdings noch zukünftiger Forschungsbedarf.

Doch LOX6 weist noch andere wichtige Funktionen auf. Die *lox6* Mutante, welche in den Wurzeln keine Jasmonate besitzt, ist anfälliger gegenüber Trockenstress als der Wildtyp Col-0 (Grebner et al., 2013). Da in vorangegangenen Arbeiten die *dde2* Mutante (welche keine Jasmonate besitzt) keine Unterschiede in der Trockenresistenz gegenüber dem Wildtyp aufwies (Grebner et al., 2013), wurden zunächst Jasmonate als Ursache ausgeschlossen und nach anderen LOX6 Produkten gesucht. Im Jahre 2014 publizierten Savchenko et al. jedoch, dass die Jasmonate bei Trockenstress eine Rolle spielen. Sie fanden heraus, dass transgene Linien mit einem höheren Gehalt an OPDA eine größere Trockentoleranz aufweisen und ihre Stomata schneller schließen können. Außerdem führt nicht nur Abscisinsäure (ABA), sondern auch OPDA (separat oder in Kombination mit ABA) zu einem Stomataschluss bei ABA und AOS Biosynthese Mutanten (*aos* und *aba2-1*). Sowohl die Anfälligkeit der *lox6* Mutante gegenüber Trockenheit als auch ein schnelleres Welken der *dde2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 4.21 und Anhang 6.6 Abbildung 6.12). Somit scheinen Jasmonate tatsächlich eine maßgebliche Rolle bei der Trockentoleranz zu spielen. Savchenko et al. (2014) haben in diesem Zusammenhang besonders die Rolle der Stomata untersucht. Allerdings scheinen auch die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* eine wichtige Rolle zu spielen. Die *lox6* Mutante besitzt in den Blättern noch Jasmonate, da LOX2 den Großteil der Jasmonate dort produziert (Bell et al., 1995). Somit müsste sie in der Lage sein, bei Trockenheit die Stomata schließen zu können. Zwar beeinflusst das Fehlen der LOX6 auch den basalen OPDA Gehalt in den Blättern, aber bei Stress kann OPDA durchaus auch durch die anderen verbleibenden

Lipoxygenasen gebildet werden. Die *lox6* Mutante besitzt keinerlei Jasmonate in den Wurzeln, so dass eine Rolle der Wurzeln bei Trockenstress naheliegend ist. Zudem müssten die Wurzeln zuerst eine verminderte Zugänglichkeit zu Wasser in der Erde spüren. Um die Bedeutung der Wurzeln in Bezug auf die Trockentoleranz weiter zu untersuchen wurden Pfropfungsexperimente mit Col-0 und *lox6* sowie Col-0 und *dde2* durchgeführt. Bei den Pfropfungsexperimenten konnte eine Tendenz zu einer größeren Suszeptibilität gegenüber Trockenheit festgestellt werden, wenn die Jasmonat freie Mutante als Wurzel in der Pfropfkombination zu finden war (siehe Abbildungen 4.22 und 4.23). Dies lässt vermuten, dass die Wurzeln ebenso eine wichtige Rolle bei der Trockentoleranz spielen und nicht nur die Blätter und Stomata. Ein schnelleres Welken der Col-0 Blatt und *lox6* Wurzel Pfropfkombination könnte zudem für eine Rolle der durch die LOX6 generierten Jasmonate in der Wurzel bei Trockentoleranz sprechen. Allerdings sind die Pfropfungsexperimente aufgrund der geringen Anzahl an Pflanzen sowie der ungewöhnlichen Reaktionen der Kontrollen auf den Trockenstress nicht völlig aussagekräftig. In diesem Zusammenhang sollten noch weitere Trockenexperimente mit gepfropften Pflanzen in Erde durchgeführt werden.

Trockenexperimente mit 35SLOX6 Erdpflanzen zeigten nicht wie erwartet eine stärkere Resistenz gegenüber Trockenstress als der Wildtyp. Dies lässt sich allerdings damit erklären, dass die Überexpressionslinien keine erhöhten Jasmonat Gehalte im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Somit scheint weiterhin die Annahme zutreffend zu sein, dass Jasmonate die Trockentoleranz vermitteln. Es wäre interessant, diese Trockenexperimente mit *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit erhöhtem Jasmonat Spiegel durchzuführen und eine möglicherweise erhöhte Trockentoleranz zu überprüfen.

Auch bei der Regulation der Wurzellänge spielt LOX6 eine große Rolle. Es ist bereits bekannt, dass die exogene Gabe von Jasmonaten das Wurzelwachstum hemmt (Yamane et al., 1981; Mueller et al., 2008). Aber auch die endogenen Jasmonat Gehalte sind von großer Bedeutung, welches durch die längeren Wurzeln der *lox6* Mutante deutlich wird (siehe Abbildung 4.31). Dies konnte in vielen Versuchen an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg bestätigt werden (siehe Diplomarbeit Katrin Borowsky, 2012). Vermutlich wird durch das Fehlen der Jasmonate in den Wurzeln eine endogene Wurzelwachstumshemmung verhindert. Die 35SLOX6 Pflanzen weisen keine kürzeren

Wurzeln als der Wildtyp auf (siehe Abbildung 4.31), was dadurch erklärt werden kann, dass sie keine erhöhten Jasmonat Spiegel im Vergleich zum Wildtyp zeigen (siehe Abbildungen 4.32 und 4.33).

5.2 Lipoxygenasen und Samenalterung

Zudem sollte in dieser Arbeit eine mögliche Rolle der Lipoxygenasen bei der Samenalterung untersucht werden. Hierfür wurde zunächst eine künstliche Alterung der Samen bei 42 °C und 83 % Luftfeuchtigkeit erfolgreich etabliert. Bei der künstlichen Alterung konnte eine Reduktion der Keimrate festgestellt werden, welche stärker war, je länger der Alterungsprozess andauerte. Beispielsweise wurde bei Col-0 Samen mit einer ursprünglichen Keimrate von 97 % nach zwei, drei bzw. vier Tagen künstlicher Alterung eine Keimungsreduktion von 16 %, 50 % bzw. 92 % festgestellt (siehe Abbildung 4.1). Diese Daten sind mit Ergebnissen bestehender Literatur vergleichbar (Boca et al., 2014). Für die künstliche Samenalterung haben sich die zwei Parameter „hohe Temperatur“ und „hohe Luftfeuchtigkeit“ durchgesetzt, wobei Temperaturen von 40 °C (bei *Arabidopsis thaliana* (Sattler et al., 2004) und Baumwolle (Goel et al., 2003)) bis 45 °C (bei Soja (Sung, 1996), Erdnuss (Sung und Jeng, 1994), Sonnenblume (Bailly et al., 1996) und Reis (Gayen et al., 2014)) und Luftfechtigkeiten von 79 % (bei Erdnuss (Sung und Jeng, 1994) und Wassermelone (Chiu et al., 1995)) bis 100 % (bei Sonnenblume (Gidrol et al., 1989) und Baumwolle (Goel et al., 2003)) in der Literatur eingesetzt werden.

Nachdem dieses System zur Alterung erfolgreich eingeführt werden konnte, sollte nach alterungsbedingten Markern – bestehend aus veresterten oxidierten Fettsäuren – gesucht werden, wie sie in der Literatur bereits beschrieben werden konnten (Boca et al., 2014). Dabei konnten sechs verschiedene OH-TGs detektiert werden, welche nach künstlicher Alterung im Wildtyp stark ansteigen. Die OH-TGs waren basal unterschiedlich stark vorhanden, stiegen aber alle um einen ähnlichen Faktor an (auf das 2,3- bis 3-Fache bei WS, siehe Abbildung 4.2 und auf das 1,4- bis 1,9-Fache bei Col-0, siehe Abbildung 4.4). Es konnten alle von Boca et al. (2014) publizierten Marker detektiert und vergleichbare Anstiege beobachtet werden. In der Literatur gibt es neben *Arabidopsis thaliana* viele Beispiele, in denen die Alterung mit einer verstärkten Lipidperoxidation einhergeht, z. B. bei Wassermelone (Chiu et al., 1995), Bittermelone (Hsu et al., 2003), Soja (Sung, 1996), Erdnuss (Sung und Jeng, 1994), Paprika (Kaewnaree et al., 2011), Sonnenblume (Gidrol et al., 1989;

Bailly et al., 1996) und Baumwolle (Goel et al., 2003). In den Samen der Sonnenblume beispielsweise sanken schon nach einem Tag Alterung die Gehalte der polaren Lipide um 40 % (Gidrol et al., 1989). Nach acht Tagen Alterung fand eine Verringerung der Diacylglycerole um 67 % und der Triacylglycerole um 14 % statt. Dabei wurden insbesondere Linolsäure und Ölsäure aus Diacylglycerolen und polaren Lipiden degradiert und es konnte eine Zunahme der freien Fettsäuren verzeichnet werden (Gidrol et al., 1989). Die geringere Keimrate nach Alterung hängt wahrscheinlich zusätzlich zu der Lipidperoxidation mit einer Oxidation der Proteine sowie einer Schädigung der DNA zusammen (Beckman und Ames, 1997). Um zu untersuchen, ob diese Oxidation enzymatisch oder nicht enzymatisch stattfindet, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Samen verschiedener 9-Lipoxygenase und 13-Lipoxygenase Mutanten gealtert und ihre Spiegel an veresterten oxidierten Fettsäuren bestimmt. In allen 9-Lipoxygenase Mutanten (*lox1*, *lox5* und *lox1/5*) stiegen die sechs OH-TGs vergleichbar stark an wie bei dem Wildtyp (siehe Abbildung 4.2). Auch in den 13-Lipoxygenase Mutanten *lox3/4* und *lox2/3/4/6* waren ähnliche Anstiege wie bei dem Wildtyp zu beobachten (siehe Abbildung 4.3). Es konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Generierung der veresterten oxidierten Fettsäuren fast ausschließlich nicht enzymatisch erfolgt. Nur in der *lox2* Mutante waren sowohl alle basalen als auch bei vier OH-TGs die Spiegel nach Alterung signifikant geringer als in dem Wildtyp (siehe Abbildung 4.4). Dies lässt eine Rolle der *lox2* bei der Generierung von veresterten oxidierten Fettsäuren vermuten.

In der Literatur finden sich viele Beispiele, dass Lipoxygenasen auch veresterte Fettsäuren oxidieren können. Obwohl die meisten Lipoxygenasen freie Fettsäuren bevorzugen, konnte bereits für zwei 13-Lipoxygenasen sowohl in der Sojabohne (LOX1) als auch in Gurkenwurzeln eine Aktivität an mehrfach ungesättigten an Phospholipiden veresterten Fettsäuren festgestellt werden (Feussner und Wasternack, 2002). Auch für eine „Lipidkörper 13-Lipoxygenase“ in Gurken- und anderen Ölsamenkeimlingen, eine 13-Lipoxygenase in Gerstensamen und die vegetative LOXd (VLX-D, Strukturähnlichkeit zu den Samenlipoxygenasen LOX1 und LOX3 (Youn et al., 2006)) in Blättern von Soja konnte eine Aktivität mit in Triacylglycerolen veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren gezeigt werden (Feussner et al., 2001; Feussner und Wasternack, 2002). In Gerste kann LOX2 (13-Lipoxygenase) veresterte Fettsäuren oxidieren (Holtman et al., 1997). Dabei oxidiert LOX2 Speicherlipide, was vermutlich am Anfang der Keimung in den Gerstensamen

stattfindet. Dies könnte dem Katabolismus der Lipide dienen, so dass die Degradationsprodukte als endogenes Substrat für die β -Oxidation (und somit als Kohlenstoffquelle) zum Wachstum des Keimlings beitragen (Holtman et al., 1997).

Die *lox6* Mutante dagegen zeigt basal signifikant höhere OH-TG Gehalte als der Wildtyp und es erfolgt nach Alterung kein weiterer Anstieg (siehe Abbildungen 4.4 und 4.5). Dies wiederum lässt möglicherweise eine basale Regulation der OH-TG Gehalte durch die LOX6 vermuten. Zudem wäre es interessant, die Gesamtgehalte an Triacylglycerolen in *lox6* zu untersuchen. Möglicherweise liegen in der *lox6* Mutante höhere Triacylglycerol Gehalte vor als im Wildtyp, so dass der Prozentsatz an OH-TGs wiederum ähnlich wie beim Wildtyp ist.

Bei der Untersuchung der freien oxidierten Fettsäuren fällt auf, dass diese im Wildtyp Col-0 basal nicht detektierbar sind. Nach Alterung steigt vor allem 9-HOTE stark an (siehe Abbildung 4.7). Daneben steigen nach Alterung 13-HOTE, 16-HOTE und in geringerem Maße auch 15-HOTE an. Da vor allem 9- und 13-Lipoxygenase Produkte ansteigen, lässt dies auf eine enzymatische Bildung der freien oxidierten Fettsäuren schließen (siehe Abbildung 4.7). Bei einer rein radikalischen Bildung von oxidierten Fettsäuren würden 9-, 12-, 13- und 16-HOTE alle gleich stark ansteigen. Allerdings scheint nur ein Teil enzymatisch zu entstehen, was durch den Anstieg von 15- und 16-HOTE deutlich wird. Um die enzymatische Entstehung der freien oxidierten Fettsäuren und eine mögliche Rolle der Lipoxygenasen darin weiter zu untersuchen, wurden zunächst die Lipoxygenase Mutanten sowie ihre korrespondierenden Wildtypen auf ihre Gehalte an HOTE, HODE, KOTE und KODE hin untersucht. Dabei stieg in dem Wildtyp WS vor allem 9-HODE gefolgt von 9-HOTE, 9-KODE und 9-KOTE an (siehe Abbildung 4.8). Da sowohl in dem korrespondierenden Wildtyp (WS), als auch in *lox5* die Gehalte von freien oxidierten Fettsäuren anstiegen, allerdings bei *lox1* und *lox1/lox5* kaum ein Anstieg zu verzeichnen war, scheint LOX1 hauptsächlich für die Oxidation der freien Fettsäuren verantwortlich zu sein (siehe Abbildung 4.8). Die 13-Lipoxygenasen scheinen dabei kaum eine Rolle zu spielen. Möglich wäre eine geringe Beteiligung der LOX2, da in der *lox2* Mutante die Gehalte an 13-HOTE und 13-HODE nach Alterung nicht ansteigen (siehe Abbildung 4.10). Auch in der Literatur findet man überwiegend 9-Lipoxygenasen, welche eine Rolle in der Samenalterung spielen (Huang et al., 2014; Xu et al., 2015). Die Gehalte an 13-HOTE, 13-HODE und 13-KODE in der *lox2/3/4/6* Mutante (siehe Abbildung 4.9)

verdeutlichen aber, dass anscheinend auch nicht enzymatische Oxidation an den freien Fettsäuren stattfindet.

Um zu untersuchen, ob die bei der Alterung ansteigenden freien oxidierten Fettsäuren die Keimung im Wildtyp hemmen, wurden Samen mit 9-Lipoxygenase und 13-Lipoxygenase Produkten in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 μ M und 50 μ M) behandelt. Dabei unterschied sich die Behandlung mit den oxidierten Fettsäuren weder von der Lösemittelkontrolle noch von einer Behandlung mit den freien Fettsäuren α -Linolensäure und Linolsäure. Es konnte exogen kein hemmender Effekt auf die Keimfähigkeit der Wildtyp Samen festgestellt werden. Demnach scheinen neben den Lipoxygenase Produkten weitere Faktoren für eine Hemmung der Keimung in den gealterten Samen verantwortlich zu sein. Es gibt einige Belege in der Literatur über die endogenen Aufgaben, welche 9-Lipoxygenase Produkte in *Arabidopsis thaliana* innehaben. Dabei führt 9-HOTE in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen zu dem sogenannten „root waving“ Phänotyp, einem Verlust der Wurzelapikaldominanz, verkürzt das Wurzelwachstum und inhibiert das laterale Wurzelwachstum (Vellosillo et al., 2007). Wurzelprimordien exprimieren 9-Lipoxygenase Gene und Wurzeln zeigen eine starke 9-Lipoxygenase Aktivität. Mutanten, welche einen Defekt in der 9-Lipoxygenase Aktivität besitzen, weisen zudem mehr Seitenwurzeln auf. Es wird vermutet, dass 9-HOTE oder ein 9-HOTE Produkt als endogener Regulator der lateralen Wurzelbildung dient. Zudem aktiviert 9-HOTE wahrscheinlich Prozesse, welche bei der Entwicklung aber auch der Abwehr von Bedeutung sind (Vellosillo et al., 2007). Darüber hinaus kann eine Behandlung mit 9-Lipoxygenase Produkten (wie 9-KOTE) *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vor einer *P. syringae* Infektion schützen (Vicente et al., 2012).

Neben der exogenen Zugabe der freien oxidierten Fettsäuren, sollte die Alterung der 13-Lipoxygenase und 9-Lipoxygenase Mutanten ermittelt werden, um mögliche endogene Effekte zu untersuchen. Dabei zeigte sich bei der *lox1* Mutante in 2/3 der Versuche eine bessere Keimfähigkeit im Vergleich zu dem Wildtyp nach vier Tagen künstlicher Alterung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Fehlen der 9-Lipoxygenase Produkte in der *lox1* Mutante, welche zwar exogen nicht die Keimung hemmen konnten, allerdings vermutlich endogen doch eine größere Rolle spielen. Warum aber die *lox1/lox5* Doppelmutante nicht ebenfalls besser keimt, bleibt zu untersuchen. Auch in der Literatur gibt es Belege für eine bessere Keimrate in Mutanten, in denen die Lipoxygenase Aktivität

herunterreguliert wurde. Wenn im Reis die Genaktivität der Lipoxygenasen mit Hilfe von RNAi Linien stark herunterreguliert wird (um 67 % - 68 %), ist die Schädigung der Samen bei der Alterung weniger gravierend und sie keimen besser als der Wildtyp (Gayen et al., 2014). Es konnte zudem mit GC-MS Messungen gezeigt werden, dass in dem Wildtyp die Degradation von Fettsäuren nach Alterung stärker war als bei den RNAi Linien (Gayen et al., 2014). In Reis (*Oryza sativa* L.) führt eine Unterdrückung der LOX3 (eine 9-Lipoxygenase) Genexpression mit Hilfe von Antisense Linien zu einer längeren Lebensdauer der Samen (Xu et al., 2015). Die Mutanten wiesen unter normalen Bedingungen keine Unterschiede im Phänotyp im Vergleich zu dem Wildtyp auf. Nach künstlicher Alterung für 21 Tage, bzw. natürlicher Alterung für zwölf Monate war die Keimrate der Antisense Linie um 29 % bzw. 40 % höher als bei dem Wildtyp. Da in Reis die Lipidperoxidation durch die LOX3 katalysiert wird, könnte dies eine mögliche Erklärung sein (Xu et al., 2015). Nach künstlicher Alterung von Reis mit einer LOX2 Überexpression wiesen die Samen eine geringere Lebensfähigkeit auf (Huang et al., 2014). RNAi Linien dagegen zeigten eine bessere Samenlanglebigkeit nach Alterung. Die erhöhten bzw. erniedrigten Gehalte an Lipidhydroperoxiden in den Überexpressionslinien bzw. RNAi Linien im Vergleich zum Wildtyp scheinen damit zusammenzuhängen (Huang et al., 2014).

Trotzdem scheint LOX1 (eine 9-Lipoxygenase) auch wichtige Aufgaben bei der Keimung innezuhaben. In *Arabidopsis thaliana* ist LOX1 während der Keimung transient exprimiert (Melan et al., 1994). Dabei finden sich größere mRNA Mengen in der Epidermis der Radikula, der Aleuronschicht (die eng mit der Radikula verbunden ist) und der adaxialen Seite der Kotyledonen (Melan et al., 1994). Wird die Datenbank „Genevestigator“ betrachtet, so wird festgestellt, dass LOX1 in *Arabidopsis thaliana* im Samen und während der Keimung stark exprimiert wird, die Expression dann während des Pflanzenwachstums und der Bildung von Blüten etwas abnimmt und schließlich wieder bei der Bildung von Schoten und neuen Samen steigt. LOX5 (auch eine 9-Lipoxygenase) weist in allen Stadien eine niedrige Expression auf (Genevestigator). Es wird zudem angenommen, dass LOX1 in *Arabidopsis thaliana* nicht nur in Blättern und Wurzeln, sondern auch in Blütenständen und jungen Keimlingen exprimiert wird und im Zytoplasma lokalisiert ist (Creelman und Mullet, 1997). LOX1 ist zudem stärker in Wurzeln und drei Tage alten Keimlingen exprimiert als in Blättern (Melan et al., 1993). Diese Expression ist unter einer strikten räumlichen und zeitlichen Kontrolle, so dass eine Rolle der LOX1 in der frühen Keimungsphase in der Funktionsfähigkeit der Epidermis

postuliert wird (Melan et al., 1994). Auch in anderen Pflanzen wie Soja, Erbse, Gerste, Gurke, Weizen und Lupinen steigt die Lipoxygenase Aktivität bei der Keimung an (Melan et al., 1994). *LOX2* wird nicht in trockenen Samen exprimiert, sondern erst nach der Keimung (Bell und Mullet, 1993). Während die Expression in sieben Tage alten Keimlingen noch geringer ist, findet sich vor allem in voll entwickelten Blättern und den Blütenständen sehr viel *LOX2* (Bell und Mullet, 1993). Bei einer *LOX2* Überexpression keimen Reissamen unter normalen Bedingungen schneller (Huang et al., 2014). Zudem zeigen RNAi Linien mit einer sehr starken Reprimierung der *LOX2* Aktivität einen kompletten Verlust der Keimfähigkeit nach künstlicher Alterung. Demnach ist zumindest eine geringe Menge an *LOX2* in Reis für die Keimung erforderlich (Huang et al., 2014).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 13-Lipoxygenase Mutanten *lox2*, *lox6* und *lox3/4* keine Unterschiede zu dem Wildtyp in ihrem Keimverhalten nach künstlicher Alterung aufweisen. Die Quadrupelmutante *lox2/3/4/6* zeigt dagegen eine signifikant höhere Keimrate nach Alterung im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 4.13). Da in der Quadrupelmutante keine 13-Lipoxygenase vorhanden ist, könnte ein Fehlen der 13-Lipoxygenase Produkte, wie beispielsweise Jasmonate, zu einer verbesserten Keimung führen. Bei einer Analyse von schlecht keimenden Mutanten mit Defekten in der peroxisomalen β -Oxidation (wie *cts-2* bzw. *pxa1-1* (COMATOSE), *acx1-2 acx2-1* (Acyl CoA Oxidase1 Acyl CoA oxidase2) und *kat2-1* (Ketoacylthiolase2)), zeigte sich, dass sie höhere Gehalte an OPDA, Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin beinhalten als der Wildtyp (Dave et al., 2011). Die *cts-2* Samen besaßen dreimal mehr OPDA und siebenmal mehr Jasmonsäure als WS. In *cts-2* fand diese Akkumulation während der späten Reifephase im Samen statt. Durch Analysen von Doppelmutanten aus *cts-2* und Mutanten aus dem Jasmonsäurebiosyntheseweg konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich OPDA für die Inhibierung der Keimung verantwortlich ist. OPDA konnte außerdem die Keimung von Wildtyp Samen zehnmal stärker hemmen als Jasmonsäure und zeigte mit 10 μ M die gleichen Effekte, wie Jasmonsäure mit 100 μ M bei Col-0 und WS. Dabei konnten schon 50 μ M OPDA die Keimung in WS nach zwei Tagen komplett hemmen. Dieser Effekt war COI1 unabhängig aber synergistisch mit ABA. Eine Konzentration von 0,5 μ M ABA mit 1 oder 2 μ M OPDA konnten zusammen die Keimung hemmen, was individuell nicht möglich war. Folglich scheinen OPDA und ABA zusammen die Keimfähigkeit von *Arabidopsis thaliana* zu regulieren (Dave et al., 2011).

Bemerkenswert ist auch die signifikant niedrigere basale Keimrate der *lox6* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildungen 4.13 und 4.29). Dies könnte im Zusammenhang mit den gemessenen höheren basalen OH-TG Spiegeln in der *lox6* Mutante stehen (siehe Abbildungen 4.4 und 4.5). Möglicherweise hemmen die zu hohen basalen OH-TG Gehalte die Samenkeimung. Dies wird dadurch bekräftigt, dass durch Alterung ansteigende OH-TGs sich ebenfalls negativ auf die Keimrate auswirken (Boca et al., 2014). Zudem scheinen 35SLOX6 Samen besser zu keimen als der Wildtyp. Ob die 35SLOX6 Samen allerdings erniedrigte basale OH-TG Gehalte aufweisen, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassend ergeben sich anhand dieser Ergebnisse zwei mögliche Theorien. Einerseits wäre es denkbar, dass veresterte Fettsäuren wie Triacylglycerole, Phospholipide und Galaktolipide zuerst von einer Lipase abgespalten werden, anschließend LOX1 die nun freien Fettsäuren oxidiert und somit 9-Lipoxygenase Produkte wie 9-Hydroxyfettsäuren oder auch 9-Ketofettsäuren bildet. Andererseits wäre es möglich, dass die noch veresterten Fettsäuren zuerst oxidiert werden (beispielsweise durch ROS oder LOX2) und erst anschließend eine Lipase die oxidierten Fettsäuren abspaltet. Für die erste Theorie spricht, dass für LOX1 in *Arabidopsis thaliana* noch keine Aktivität an veresterten Fettsäuren nachgewiesen werden konnte. Zudem wird für die LOX2 eine Lokalisation in Plastiden vermutet, wodurch sie keinen Zugang zu den sich in Ölkörpern befindenden Fettsäuren hätte (Bell et al., 1995; Feussner und Wasternack, 2002; Schaller et al., 2008). Für die zweite Theorie spricht allerdings, dass vielfach in der Literatur eine Aktivität von 13-Lipoxygenasen an veresterten Fettsäuren nachgewiesen werden konnte (Feussner et al., 1997; Feussner et al., 2001; Feussner und Wasternack, 2002). Außerdem könnte sich die Lokalisation in Samen von der in Blättern oder Wurzeln unterscheiden. In den Kotyledonen von gerade keimenden Gurkensamen wird eine spezielle 13-Lipoxygenase exprimiert, welche an den Lipidspeicherorganellen lokalisiert ist und die gespeicherten Triacylglycerole oxidiert (Feussner et al., 1997). Zwei Jahre später wurde ebenfalls in Gurkenkotyledonen von Keimlingen gezeigt, dass LOX1 und eine spezielle Lipidkörper LOX1 von einem Gen produziert werden (Matsui et al., 1999). Dabei liegt LOX1 einerseits als lösliches Protein im Zytosol und andererseits als ein membran-assoziiertes Protein an der Oberfläche von Lipidkörpern vor. Das an die Lipidkörper gebundene LOX1 Protein scheint aber nicht direkt an den Lipiden arbeiten zu können, so lange sie noch in intakten Lipidkörpern verweilen. Sobald Lipidkörper Proteine degradiert werden, sind die Lipide zugänglich für die LOX1

(Matsui et al., 1999). Demnach würden auch in diesem Fall zunächst veresterte Fettsäuren oxidiert und erst anschließend hydrolysiert und zu freien Fettsäuren umgewandelt werden. Es gibt aber auch andere Belege für spezielle 13-Lipoxygenasen in Ölsamen, bei denen die Lipoxygenasen eine räumliche Nähe zu den Fettsäuren aufbauen können. Während der Keimung finden sich bei der Degradation der Ölkörper an der Phospholipidschicht auch 13-Lipoxygenasen (Feussner et al., 2001). Zudem wurde in vielen Samen (Gurke, Kürbis, Sonnenblume, Leinsamen und Ringelblume) gezeigt, dass die Lipase nur oxidierte Fettsäuren abspaltet (Adlercreutz et al., 1997; Balkenhohl et al., 1998). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die OH-TG Gehalte in der *lox2* Mutante signifikant geringer als in dem Wildtyp sind, was ein Hinweis auf eine Rolle der LOX2 bei der Generierung von veresterten oxidierten Fettsäuren sein könnte (siehe Abbildungen 4.4 und 4.5 sowie Tabelle 4.3). Welches Modell in *Arabidopsis thaliana* bevorzugt wird oder ob beide Möglichkeiten parallel ablaufen (möglicherweise unter unterschiedlichen Bedingungen), gilt es noch zu untersuchen.

Da die 13-Lipoxygenase Mutanten *lox3/4* und *lox2/3/4/6* männlich steril sind, wurden sie mit Methyljasmonat besprüht, um die Ausbildung von Samen zu gewährleisten. Die als Wildtyp Kontrollen verwendeten Col-0 Samen wurden gleichermaßen behandelt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Dabei fielen durchgehend geringere Gehalte an freien und veresterten oxidierten Fettsäuren in den mit Methyljasmonat behandelten Wildtyp Samen im Vergleich zu unbehandelten Samen auf. Dies ließ sich sowohl basal als auch nach Alterung feststellen (siehe Abbildungen 4.15, 4.16 und 4.17). Zudem wiesen die zuvor mit Methyljasmonat behandelten Samen nach vier Tagen künstlicher Alterung eine signifikant höhere Keimrate im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp Samen auf. Während die Keimrate bei unbehandelten Col-0 Samen nach Alterung um 83 % sank, waren es bei den mit Methyljasmonat behandelten Samen nur 24 % (siehe Abbildung 4.14). Ohne Alterung zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Keimrate, was aber daran liegen könnte, dass auch schon die Kontrollsamens fast eine 100 %ige Keimrate erreichten. Auch in diesen Versuchen korrelieren geringere endogene Gehalte an oxidierten Fettsäuren mit einer besseren Keimrate nach Alterung. Die Behandlung der Blüten mit Methyljasmonat während der Samenreifung scheint Prozesse zu beeinflussen, so dass letztendlich weniger freie und veresterte oxidierte Fettsäuren entstehen. Der genaue Ablauf dieser Prozesse muss allerdings noch untersucht werden. Es ist schon länger bekannt, dass neben der

Genetik vor allem Umwelteinflüsse, denen die Pflanzen bei der Samenreifung ausgesetzt waren, deren Lagerfähigkeit und Langlebigkeit stark beeinflussen (Delouche und Baskin, 1973; Walters et al., 2010). Folglich kann Methyljasmonat durchaus als ein Umwelteinfluss angesehen werden. Möglich wären in diesem Zusammenhang eine geringere Lipoxygenase Expression und infolgedessen geringere Mengen an oxidierten Fettsäuren. Es könnte jedoch ebenso die Entstehung von ROS inhibiert werden. Oder die vor Lipidoxidation schützenden Enzyme und Antioxidantien wie beispielsweise die Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Vitamine könnten möglicherweise erhöht vorliegen. Normalerweise findet zusätzlich zu der Lipidperoxidation und einer damit einhergehenden Akkumulation von Malondialdehyd (Bailly et al., 1996; Sattler et al., 2006; Devaiah et al., 2007) und Hydroxynonenal (Gayen et al., 2014) in den meisten Pflanzensamen ein Rückgang der Antioxidantien und schützenden Enzyme statt: In der Wassermelone verringert sich die Aktivität von Peroxid abfangenden Enzymen (Chiu et al., 1995). Bittermelonen besitzen weniger Enzyme, welche freie Radikale und Peroxide abfangen können (Hsu et al., 2003). In Soja ist die Aktivität der Superoxid-Dismutase, Katalase, Ascorbat-Peroxidase und Peroxidase durch das Altern inhibiert (Sung, 1996). Auch in der Erdnuss ist die Aktivität der Superoxid-Dismutase, Lipoxygenase, Ascorbat-Peroxidase und Peroxidase bei der künstlichen Alterung verringert (Sung und Jeng, 1994). In der Sonnenblume nehmen die Zelldetoxifizierungsenzyme ab (Kibinza et al., 2006) und die Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Reduktase sind weniger aktiv (Bailly et al., 1996). Und auch in Baumwolle geht die Aktivität von der Peroxidase, Katalase, Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Superoxid-Dismutase verloren (Goel et al., 2003; Goel und Sheoran, 2003).

Denkbar wären auch durch Methyljasmonat verursachte epigenetische Effekte, welche sich auf die Samen auswirken. Somit könnte in der nächsten Generation die Regulation der Genexpression beeinflusst werden (Sanchez und Paszkowski, 2014). Dabei spielen viele verschiedene Enzyme eine Rolle, welche zudem unterschiedlich reguliert werden. Allerdings kann schon eine Veränderung in der Regulation eines Gens große Auswirkungen haben. Wenn in *Arabidopsis thaliana* beispielweise die Phospholipase D (PLD α 1) (welche Membranlipide hydrolysiert, die häufigste PLD in *Arabidopsis thaliana*) mit Hilfe einer Antisense Linie herunter reguliert wird (85 % weniger Protein), keimen die Samen nach künstlicher Alterung besser als der Wildtyp (Devaiah et al., 2007). Während die Keimrate des Wildtyps nach künstlicher Alterung (43 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit für 48 Stunden) bei circa

30 % lag, lag die Keimrate der Antisense Linie bei 75 %. Zudem waren die Lipide stabiler bei Lagerung und zeigten einen geringeren Verlust von ungesättigten Fettsäuren. Die Antisense Linie zeigte außerdem eine geringere Akkumulation von Lipidperoxiden und Malondialdehyd als der Wildtyp. Es ist allerdings unbekannt, ob ein Anstieg an PLD Aktivität zur Samenalterung führt oder ob es eine Konsequenz der Samenschädigung ist (Devaiah et al., 2007).

Diese Erkenntnisse bieten die Grundlage für weitere interessante Versuche, in denen geklärt werden könnte, ob sich diese Beobachtungen auch auf andere Pflanzen wie beispielsweise wichtige Nutzpflanzen übertragen lassen. Dies würde in Zukunft eine günstige und sichere Möglichkeit bieten, die Lagerfähigkeit von landwirtschaftlich oder auch wissenschaftlich wichtigen Samen zu verbessern.

5.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Generierung von veresterten oxidierten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei künstlicher Alterung hauptsächlich nicht enzymatisch verläuft. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, sollte eine Hydrolyse der veresterten oxidierten Fettsäuren durchgeführt werden. Dadurch könnte ermittelt werden, an welcher Position die Kohlenstoffatome bevorzugt oxidiert werden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode für die Hydrolyse sollte in Bezug auf die Wiederfindungsrate des Standards und der Fettsäuren weiter optimiert werden, um die Ergebnisse zu verifizieren. Zudem sollte die Möglichkeit, dass LOX2 einen Beitrag zu der Generierung von veresterten oxidierten Fettsäuren leistet, weiter untersucht werden. Hierfür könnten die OH-TGs in der *lox2* Mutante nach Alterung extrahiert sowie hydrolysiert werden, um die Verteilung der oxidierten Kohlenstoffatome zu ermitteln. Das Fehlen von an dem 13. Kohlenstoffatom oxidierten Hydroxyfettsäuren könnte Rückschlüsse auf eine Involvierung der LOX2 zulassen. Die niedrigere Keimrate der *lox6* Mutante könnte in Zusammenhang mit den erhöhten basalen OH-TG Spiegeln stehen. Es könnten OH-TGs isoliert werden um Wildtyp Samen damit zu behandeln. Somit könnte ermittelt werden, ob sie exogen die Samenkeimung hemmen können. Außerdem könnte untersucht werden, ob die 35SLOX6 Überexpressionslinie, welche eine bessere Keimrate als der Wildtyp aufweist, erniedrigte OH-TG Gehalte zeigt. Zudem wäre es interessant, die basale LOX6 Expression in Samen in diesem Zusammenhang zu untersuchen.

Freie oxidierte Fettsäuren dagegen werden hauptsächlich enzymatisch durch die LOX1 hergestellt. Eine bessere Keimrate der *lox1* und *lox2/3/4/6* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach künstlicher Alterung führte zu der Annahme, dass Lipoxygenase Produkte die Keimung inhibieren. Da bei einer exogenen Gabe dieser Produkte jedoch kein Effekt zu sehen war, könnten diese Versuche mit höheren Konzentrationen oder weiteren Lipoxygenase Produkten (wie beispielsweise 9-KOTE und 13-KOTE) durchgeführt werden. Allerdings scheint es neben den Lipoxygenase Produkten noch weitere Faktoren zu geben, welche die Keimung nach Alterung inhibieren und weiter untersucht werden sollten. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass OPDA und Jasmonsäure die Samenkeimung hemmen (Dave et al., 2011; Dave et al., 2016). Folglich wäre es interessant, die Jasmonat Spiegel in der *lox1* Mutante (auf geringere Gehalte) zu untersuchen. In Samen ist der Jasmonsäure Gehalt generell sehr gering, nimmt aber bei der Keimung zu (Creelman und Mullet, 1997). Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob Samen über alle zur Jasmonsäureproduktion notwendigen Enzyme verfügen (Loiseau et al., 2001). Zudem könnte eine 35SLOX1 Überexpressionslinie auf eine mögliche verminderte Keimrate und einen möglicherweise erhöhten Gehalt an Hydroxy- und Ketofettsäuren hin untersucht werden. Warum in diesem Zusammenhang die *lox1/lox5* Doppelmutante keine bessere Keimrate als der Wildtyp aufweist, sollte ebenfalls genauer untersucht werden.

Besonders spannend für die Zukunft scheint die Erkenntnis zu sein, dass eine Methyljasmonatbehandlung von Col-0 Blüten zu Samen führt, welche resistenter gegenüber künstlicher Alterung sind. Dabei müsste noch überprüft werden, ob dieser Effekt auch bei einer natürlichen Alterung (wie bei einer landwirtschaftlichen Lagerung) eintritt. Um zu verstehen, wie dieser Prozess abläuft, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden. Möglich wäre beispielsweise eine veränderte Genexpression, welche man mit Hilfe einer Transkriptomanalyse untersuchen könnte. Ebenso wären epigenetische Effekte durch Modifikationen wie z. B. Methylierungen denkbar. Da in den Samen von mit Methyljasmonat behandelten Pflanzen basal und nach künstlicher Alterung weniger veresterte und freie oxidierte Fettsäuren vorkommen, wäre beispielsweise eine geringere Lipoxygenase Expression in den Samen möglich. Darüber hinaus wären ebenfalls höhere Gehalte an verschiedenen Antioxidantien, wie verschiedene Enzyme (Glutathion-Peroxidase, Katalase und Superoxid-Dismutase) und Vitamine (Vitamin E, C und A), denkbar.

Des Weiteren wäre es interessant, die Blüten von Jasmonsäure Signaltransduktionsmutanten (wie *coi1*, *jar1*, *jin1* und *jin4*) mit Methyljasmonat zu behandeln und anschließend deren Samen zu altern. Somit könnte festgestellt werden, ob es sich hierbei um einen Jasmonat spezifischen Effekt handelt. Dabei sollten allerdings die Kontrollpflanzen ebenfalls mit einer Kontrolllösung besprüht werden, um Effekte durch das Tween 20 in der Lösung auszuschließen. In Zukunft sollte auch untersucht werden, ob sich diese Erkenntnisse auf andere Pflanzenspezies übertragen lassen. Da eine längere Lagerfähigkeit in der Landwirtschaft von Vorteil ist, sollten Nutzpflanzen wie beispielsweise Reis, Weizen, Sonnenblume, Baumwolle, Tomate und Tabak untersucht werden. Aber auch in der Wissenschaft ist eine lange Lagerfähigkeit von großem Nutzen. In Spitzbergen (Norwegen) werden in dem „weltweiten Saatgut-Tresor“ die 21 wichtigsten Nutzpflanzen sowie deren verschiedene Sorten aufbewahrt. Die Lagerfähigkeit von Samen in solchen Samenbanken zu verlängern, wäre für zukünftige Generationen von großem Nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 35SLOX6GFP Konstrukt hergestellt und bereits in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen transformiert. Nach einer Überprüfung der daraus selektierten Linien, könnte die genaue intrazelluläre Lokalisation von LOX6 in Wurzeln und Blättern untersucht werden. Zudem kann eine mögliche Translokation der LOX6 nach Stress erforscht werden. Es wurden außerdem Fluoreszenz-Konstrukte mit LOX2 und AOS erstellt, mit deren Hilfe eine mögliche Kolo-kalisation zwischen den Lipoxygenasen und AOS sowie ebenfalls eine mögliche Translokation der LOX2 bei Stress untersucht werden könnte. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, histologische Schnitte anzufertigen und mit den fixierten Pflanzenzellen Antikörperfärbungen durchzuführen. Dabei könnte zwar keine Translokation, allerdings eine Lokalisation sowie Kolo-kalisation ermittelt werden. Wenn als zweiter Antikörper zu dem Anti GFP ein mit Gold markierter Antikörper verwendet wird, könnte die Lokalisation zudem unter einem Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden. Darüber hinaus wurde damit begonnen, einen spezifischen LOX6 Antikörper herzustellen, um auch die endogenen LOX6 Gehalte im Wildtyp betrachten zu können. Mit einem spezifischen LOX6 Antikörper könnte man zudem die Lokalisation der LOX6 in den 35SLOX6 Überexpressionslinien überprüfen.

In einer „untargeted Analyse“ wurden einige Unterschiede in den Metaboliten zwischen den 35SLOX6 Linien und dem Wildtyp gefunden. Da diese Marker nur teilweise identifiziert

werden konnten, sollten die Metabolite weiter analysiert werden. Zudem sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den gefundenen Metaboliten in den 35SLOX6 Linien und ihrer Blattphysiologie sowie dem Fraßverhalten der Asseln untersucht werden.

LOX6 scheint darüber hinaus eine Rolle in der Trockentoleranz zu spielen. Wenn sich die Hinweise mit einer größeren Anzahl an Pflanzen bestätigen lassen, dass Pfropfkombinationen mit Wildtyp Blättern und *lox6* Wurzeln schneller welken als der Wildtyp und Pfropfkombinationen mit *lox6* Blättern und Wildtyp Wurzeln, so lässt dies auf eine Beteiligung von LOX6 Produkten in den Wurzeln bei der Trockentoleranz schließen. Interessant wäre zudem, die Stomataschließung von Wildtyp Blättern bei einer Pfropfkombination mit *lox6* Wurzeln zu untersuchen. Wenn die Stomataschließung nicht mehr funktioniert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass in *lox6* kein „root-to-shoot signalling“ stattfindet, mit welchem die Wurzeln den Blättern den Trockenstress signalisieren könnten. Anschließend könnte ermittelt werden, was das Signal ist und wie die Signalweiterleitung funktioniert. Möglich wäre ein Transport von Oxylipinen von den Wurzeln in die Blätter. In der Literatur finden sich Hinweise, dass ein solcher Transport möglich ist (Gasperini et al., 2015). Möglich wäre allerdings auch ein Transport von mRNA. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass mRNA in *Arabidopsis thaliana* durch das Phloem transportiert wird und als Signal wirken kann (Zhang et al., 2016). Um einzugrenzen, welche Metabolite an der Signalweiterleitung beteiligt sind, könnten Pfropfungen mit Wildtyp Blättern und *dde2* Wurzeln durchgeführt werden. Wenn bei Trockenstress auch bei dieser Pfropfkombination die Stomataschließung des Wildtyps beeinträchtigt ist, könnten Jasmonate für das „root-to-shoot signalling“ verantwortlich sein. Es wäre dabei denkbar, dass in den Wurzeln gebildetes OPDA in die Blätter transportiert wird, um vor einer Trockenperiode zu warnen und ein schnelles durch OPDA vermitteltes Schließen der Stomata einzuleiten. Da in den Blättern genug durch die LOX2 produziertes OPDA vorhanden sein sollte, würde es sich hierbei eher um ein zeitlich gesehen schnelles Signal handeln und nicht um die Notwendigkeit mehr OPDA in den Blättern zur Verfügung zu haben. Falls tatsächlich eine Jasmonatproduktion in den Wurzeln wichtig für die Stomataschließung in den Blättern ist, könnte ein ähnliches Experiment wie bei Gasperini et al. (2015) durchgeführt werden. Dabei könnten Wildtyp Wurzeln mit Blättern der *dde2* Mutante mit einem JAZ10pGUS Konstrukt gepfropft und einem Trockenstress ausgesetzt werden. Falls bei

Trockenheit ein Transport von Jasmonaten aus den Wurzeln in die Blätter stattfindet, könnte man dies indirekt durch GUS Färbungen untersuchen.

Wenn allerdings die Stomataschließung bei der Pfropfkombination mit Wildtyp Blättern und *dde2* Wurzeln funktionieren sollte und ein fehlender Stomataschluss nur bei einer Pfropfkombination mit *lox6* Wurzeln beobachtet werden kann, dann wären vermutlich andere LOX6 Produkte (als Jasmonate) für das „root-to-shoot signalling“ verantwortlich. Dieses LOX6 Produkt könnte entweder in den Wurzeln ein „root-to-shoot signalling“ auslösen oder selbst in die Blätter transportiert werden.

6 Anhang

6.1 Hydroxyfettsäuren in Col-0 nach künstlicher Alterung und Hydrolyse

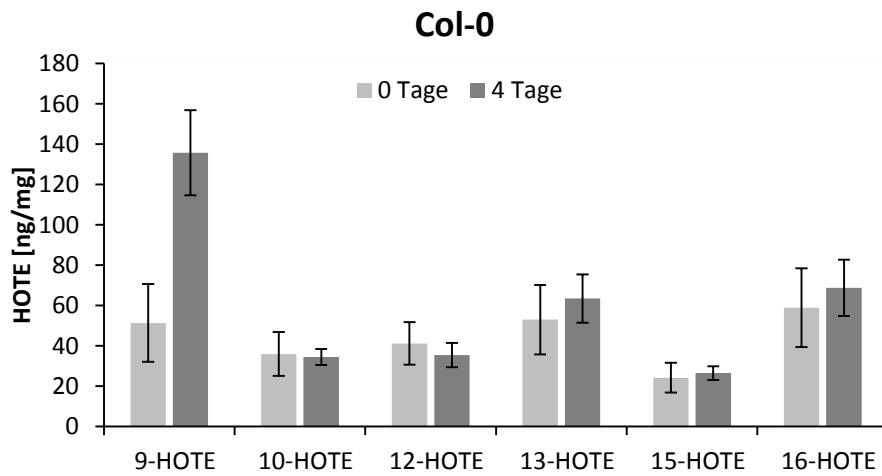


Abbildung 6.1: Gehalte der Hydroxyfettsäuren in Samen des Wildtyps Col-0 nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung und anschließender Hydrolyse. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. (MW+STABW)

In diesem Versuch konnten alle HOTE Isoformen sowohl basal als auch nach künstlicher Alterung detektiert werden. Allerdings kann hier lediglich ein Anstieg an 9-HOTE von 51 ng/mg auf 136 ng/mg beobachtet werden. Alle anderen Hydroxyfettsäuren weisen keinen Anstieg nach Alterung auf.

6.2 Hydroxyfettsäuren in WS nach künstlicher Alterung und Hydrolyse

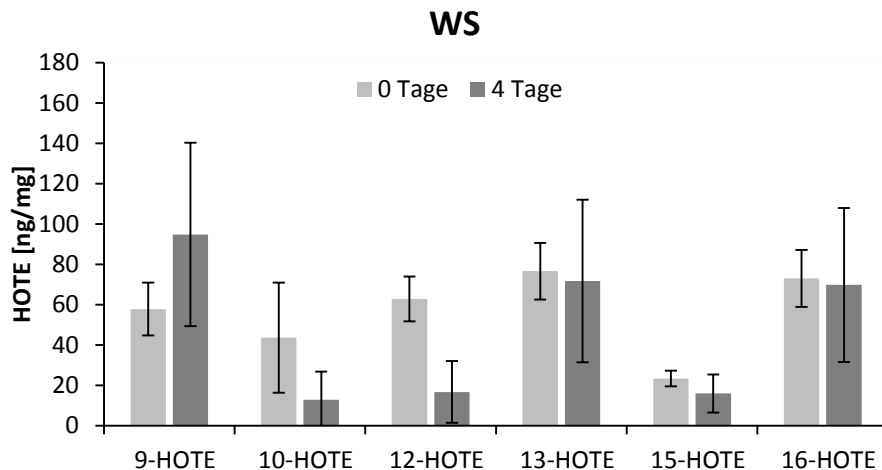


Abbildung 6.2: Gehalte der Hydroxyfettsäuren in Samen des Wildtyps WS nach 0 und 4 Tagen künstlicher Alterung und anschließender Hydrolyse. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate á 3 mg Samen verwendet. (MW+STABW)

Basal sind die Gehalte an Hydroxyfettsäuren in dem Wildtyp WS ähnlich denen des Wildtyps Col-0 (siehe Abbildung 6.1). Auch hier ist nach Alterung nur ein Anstieg von 9-HOTE zu verzeichnen, wobei dieser von 58 ng/mg Samen auf 95 ng/mg Samen schwächer ist. Zudem findet sich bei 10-HOTE und 12-HOTE sogar eine Abnahme der Gehalte von 44 ng/mg Samen auf 13 ng/mg Samen, bzw. von 63 ng/mg Samen auf 17 ng/mg Samen. In einem weiteren Hydrolyseversuch mit WS wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Auch hier war lediglich bei 9-HOTE ein geringer Anstieg von 36 ng/mg Samen auf 47 ng/mg Samen zu beobachten. Allerdings waren hier nicht nur bei 10-HOTE und 12-HOTE Abnahmen der Gehalte zu verzeichnen, sondern auch bei 13-HOTE, 15-HOTE und 16-HOTE.

6.3 Keimrate von Col-0 und *lox1* im Col-0 Hintergrund nach künstlicher Alterung

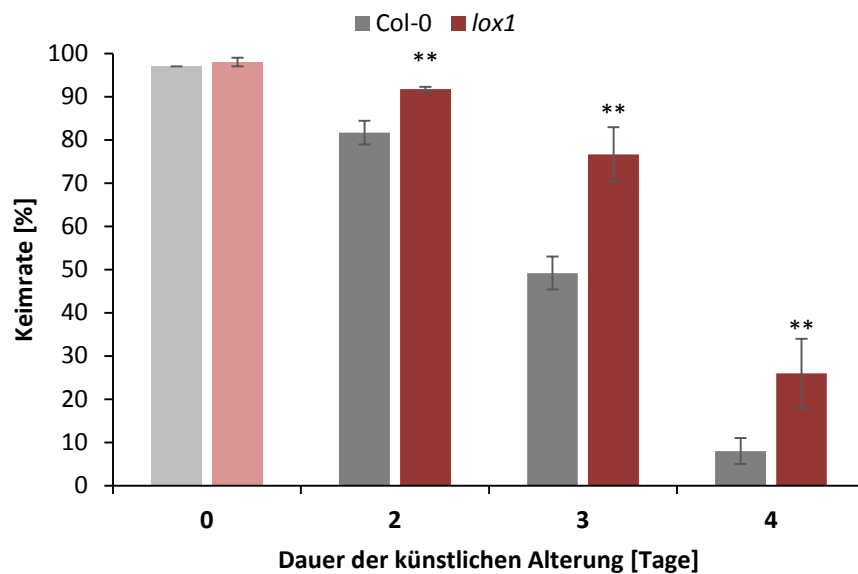


Abbildung 6.3: Keimrate von Col-0 und *lox1* im Col-0 Hintergrund vor und nach 2, 3 und 4 Tagen künstlicher Alterung. Es wurden jeweils 3 Platten á 40 Samen auf MS-Agarplatten mit 3 % Saccharose ausgelegt, für 8 Tage bei Kurztagbedingungen (9 h Licht, 15 h Dunkelheit) inkubiert und die Keimraten ausgezählt. Diese Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen Col-0 und *lox1* für alle Zeitpunkte. (MW+STABW, T-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$)

Bei Col-0 liegt die Keimrate nach acht Tagen ohne künstliche Alterung bei 97 %. Nach zwei, drei bzw. vier Tagen sinkt die Keimrate auf 82 %, 49 % bzw. 8 %. Die *lox1* Mutante zeigt ohne Alterung mit 98 % eine ähnliche Keimrate wie der Wildtyp. Allerdings liegen nach zwei, drei bzw. vier Tagen künstlicher Alterung die Keimraten mit 92 %, 77 % bzw. 26 % signifikant über denen des Wildtyps. Somit scheint auch die *lox1* Mutante im Col-0 Hintergrund eine bessere Keimfähigkeit nach künstlicher Alterung gegenüber dem Wildtyp aufzuweisen.

6.4 Einfluss von Methyljasmonat auf künstlich gealterte Samen

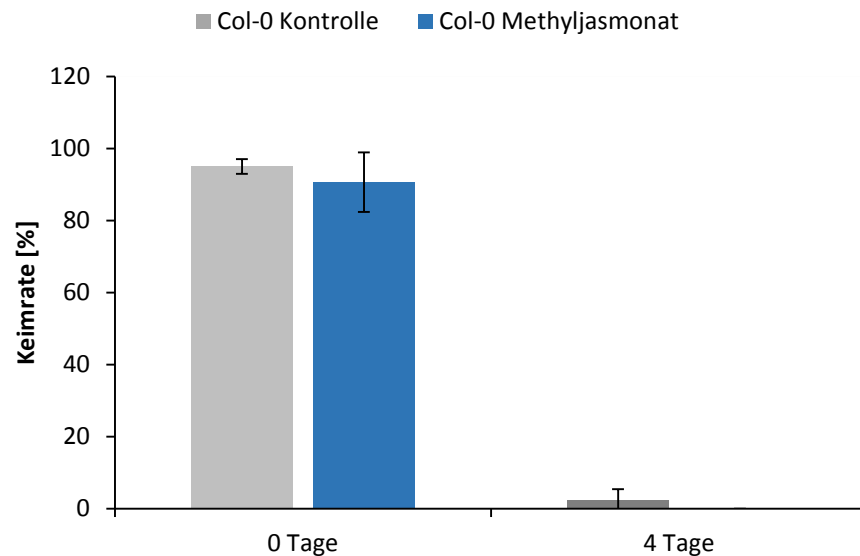


Abbildung 6.4: Keimraten an Tag 8 von dem Wildtyp Col-0 ohne und mit 1,38 mM Methyljasmonatbehandlung vor und nach 4 Tagen künstlicher Alterung auf MS-Agarplatten. Es wurden jeweils 4 Platten á 40 Samen ausgezählt.

Die mit der Kontrolllösung (ddH₂O mit 0,1 % Tween 20) besprühten und anschließend getrockneten Samen zeigen eine Keimrate von 95 %. Im Vergleich dazu liegt die Keimrate bei den zusätzlich noch vier Tage gealterten Samen bei 2,3 %. Mit Methyljasmonat besprühte und dann getrocknete Samen zeigen mit 90,7 % eine ähnliche Keimrate, wie die mit der Kontrolllösung besprühten Samen. Nach zusätzlichen vier Tagen Alterung keimt allerdings kein Samen mehr. Es zeigt sich sowohl bei der Kontrollbehandlung als auch bei der Methyljasmonatbehandlung nach vier Tagen ein sehr starker Rückgang der Keimrate (97,8 % bzw. 100 %). Das anfängliche Quellen nach dem Besprühen und die anschließende erneute Trocknung der Samen im Exikkator vor der Alterung könnte zu den sehr niedrigen Keimraten geführt haben. Zusammenfassend gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen.

6.5 Vektorkarten

6.5.1 35SLOX6sGFP

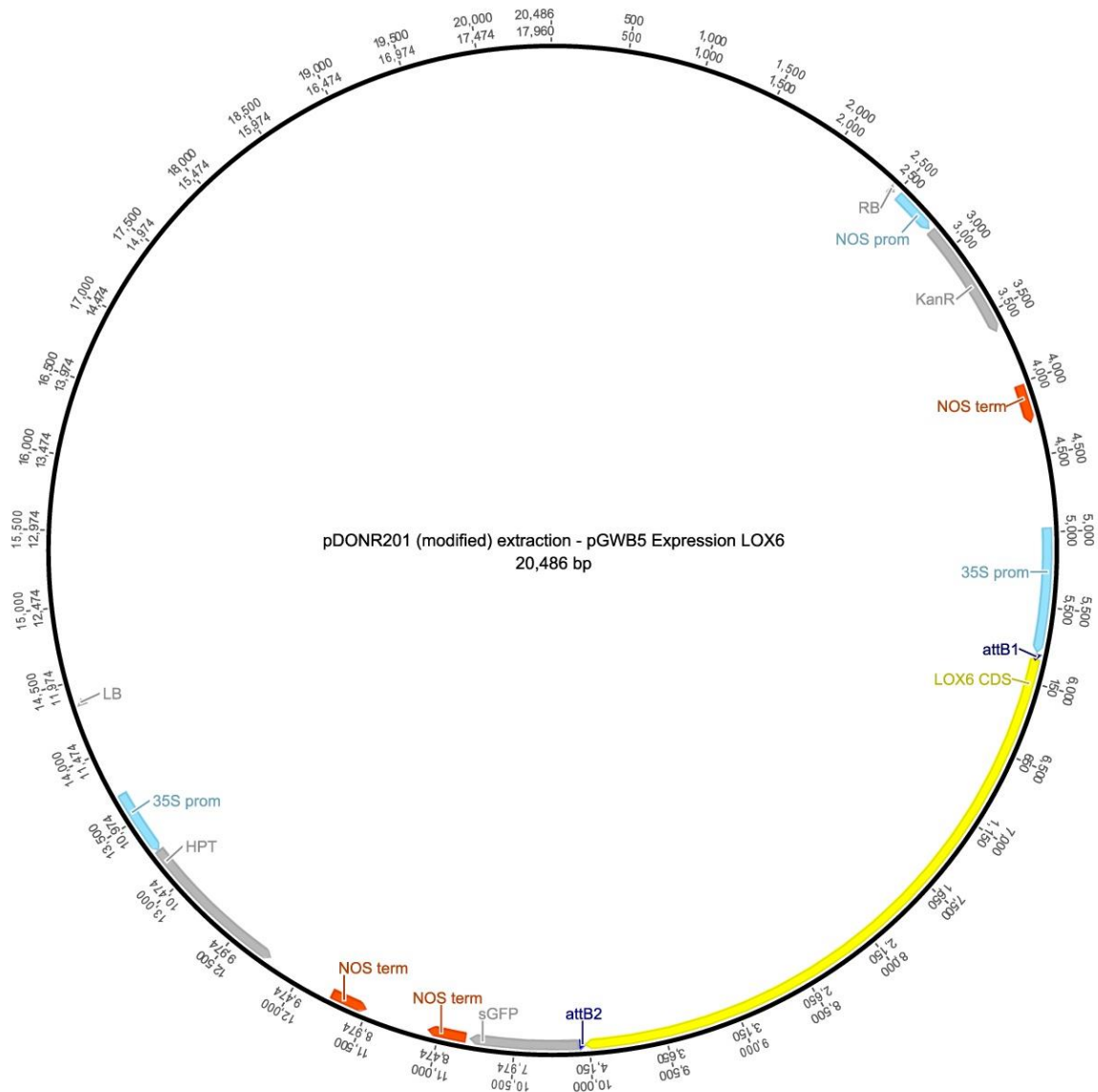


Abbildung 6.5: Zielvektor PGWB5 mit inserierter LOX6-CDS.

6.5.2 35SLOX2sGFP

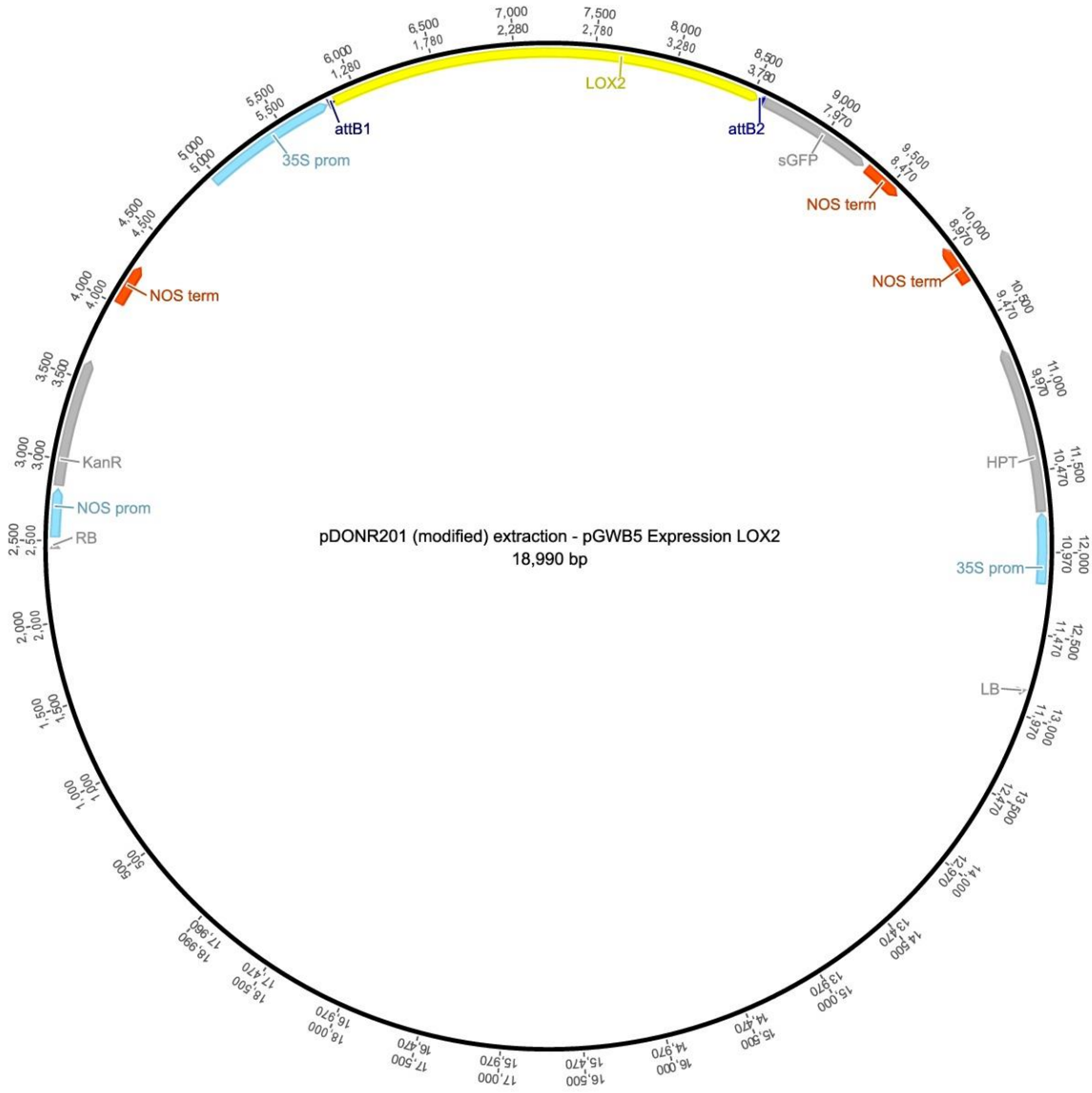


Abbildung 6.6: Zielvektor PGWB5 mit inserierter LOX2-CDS.

6.5.3 35SAOSsGFP

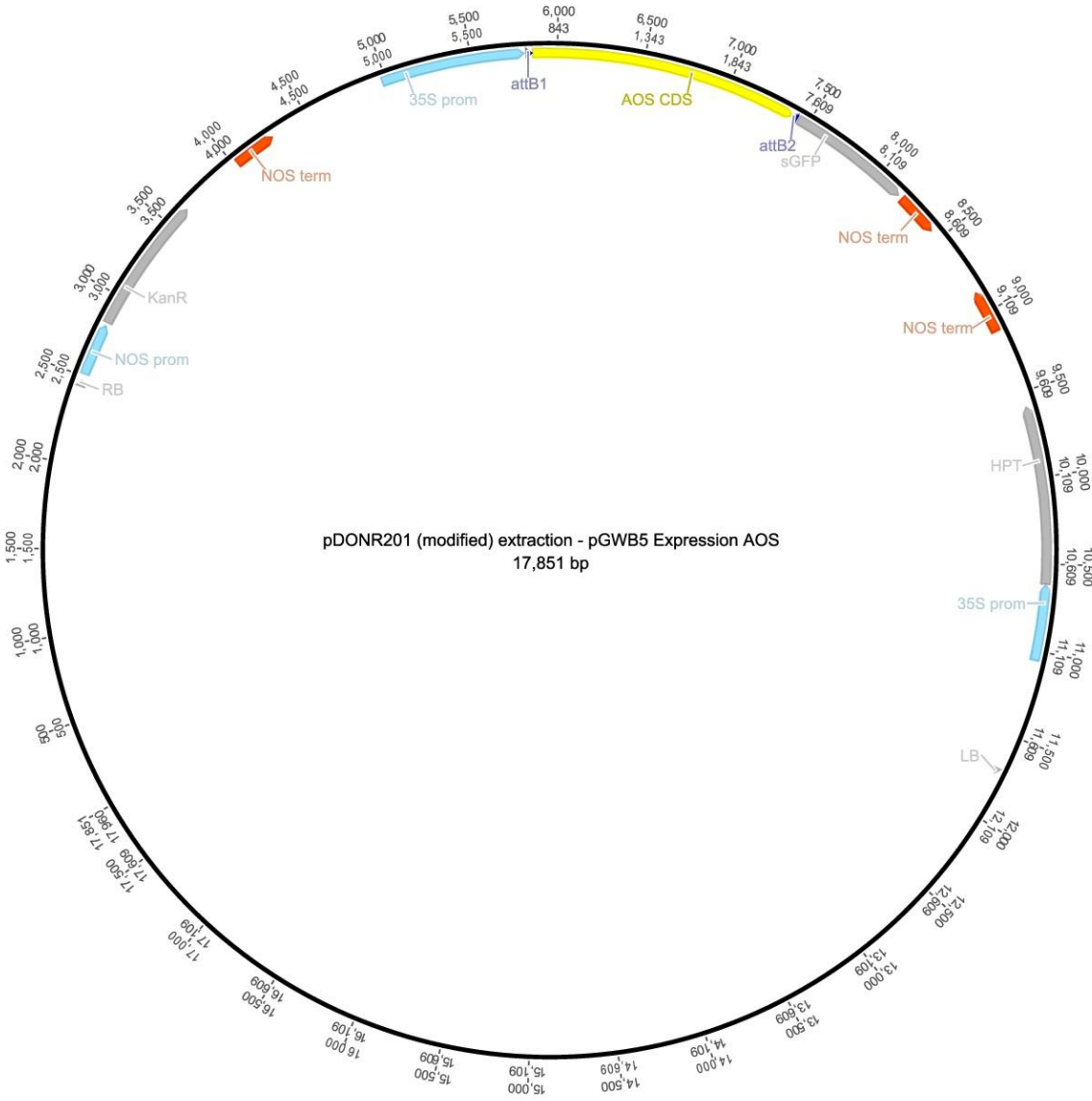


Abbildung 6.7: Zielvektor PGWB5 mit inserierter AOS-CDS.

6.5.4 pDONR201::AOS

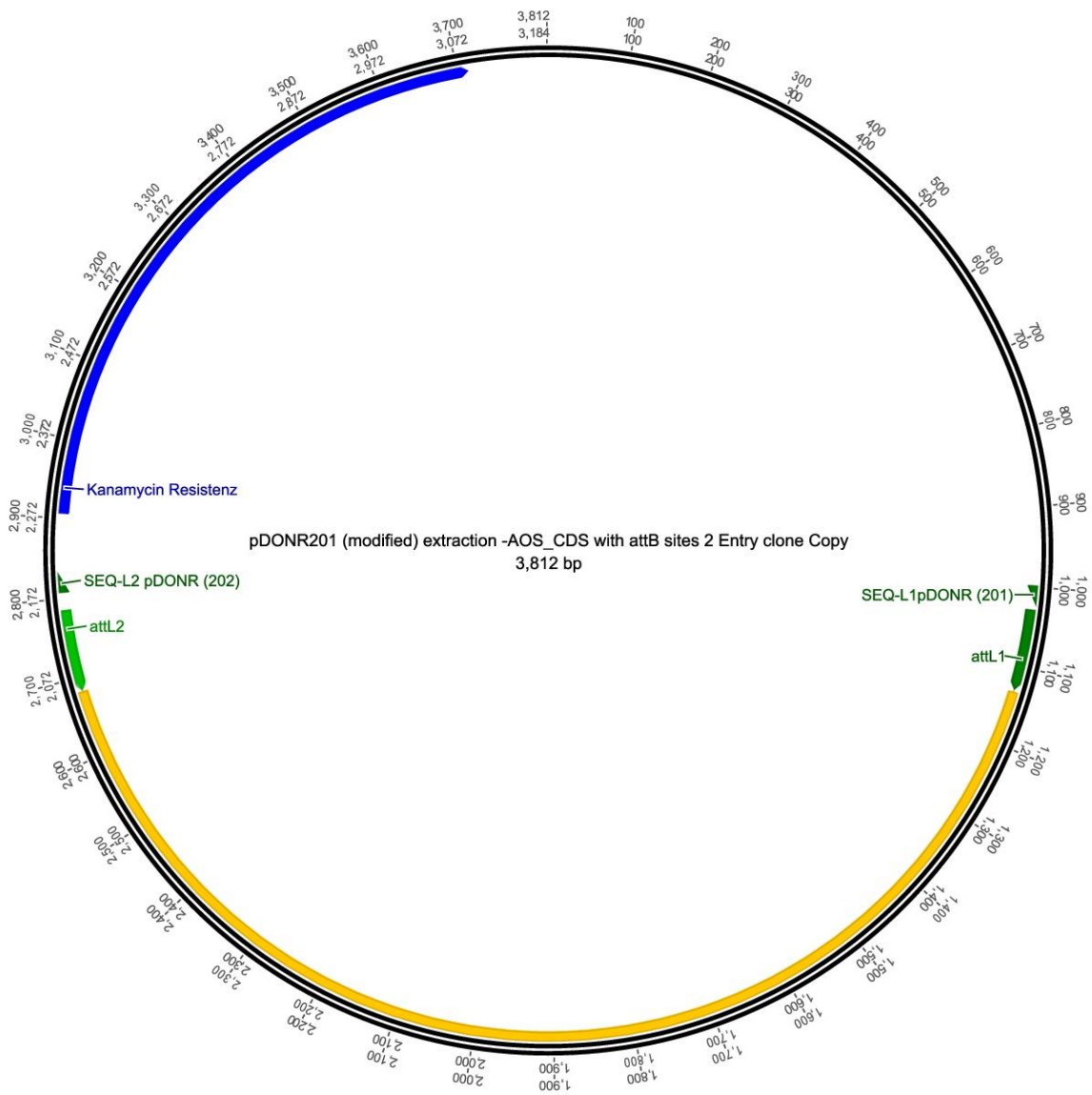


Abbildung 6.8: Eingangsvektor pDONR201 mit inserierter AOS-CDS.

6.5.5 pGemTeasy mit LOX6 Promotor bzw. LOX6-CDS

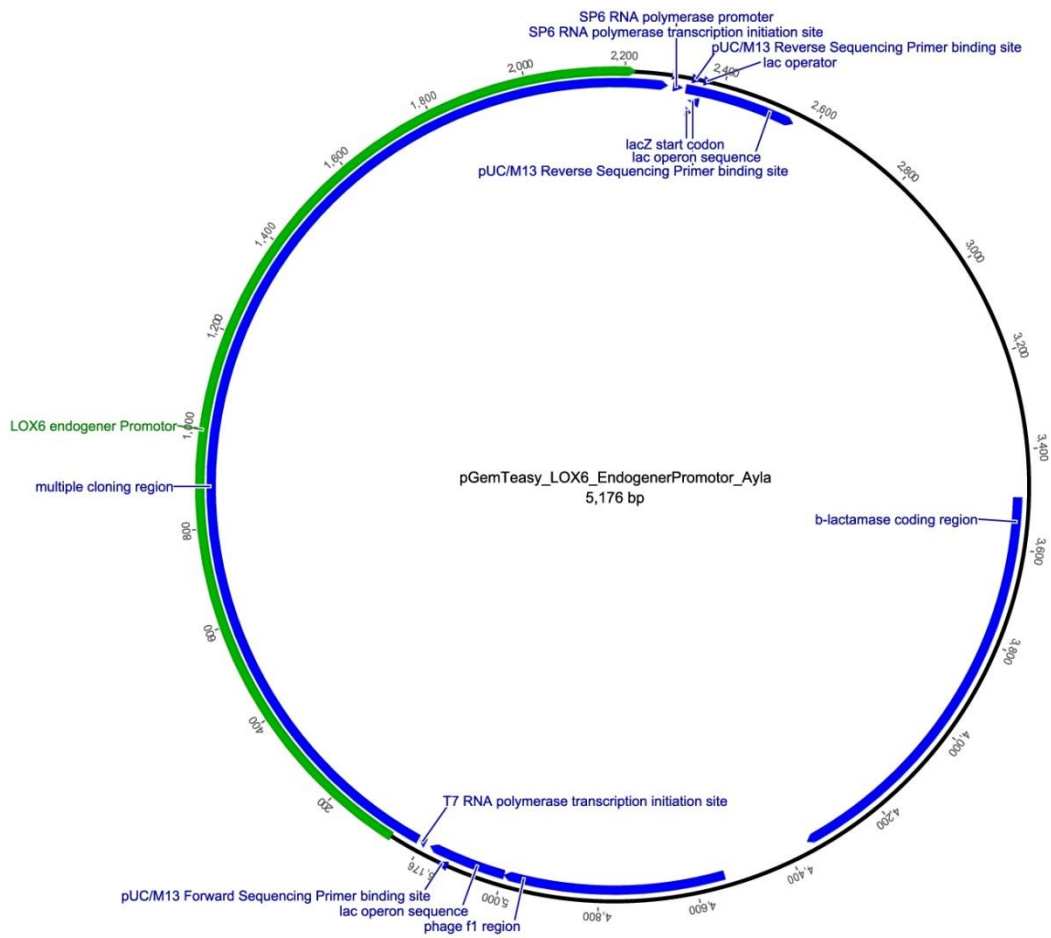


Abbildung 6.9: Eingangsvektor pGemTeasy mit inseriertem endogenem LOX6 Promotor.

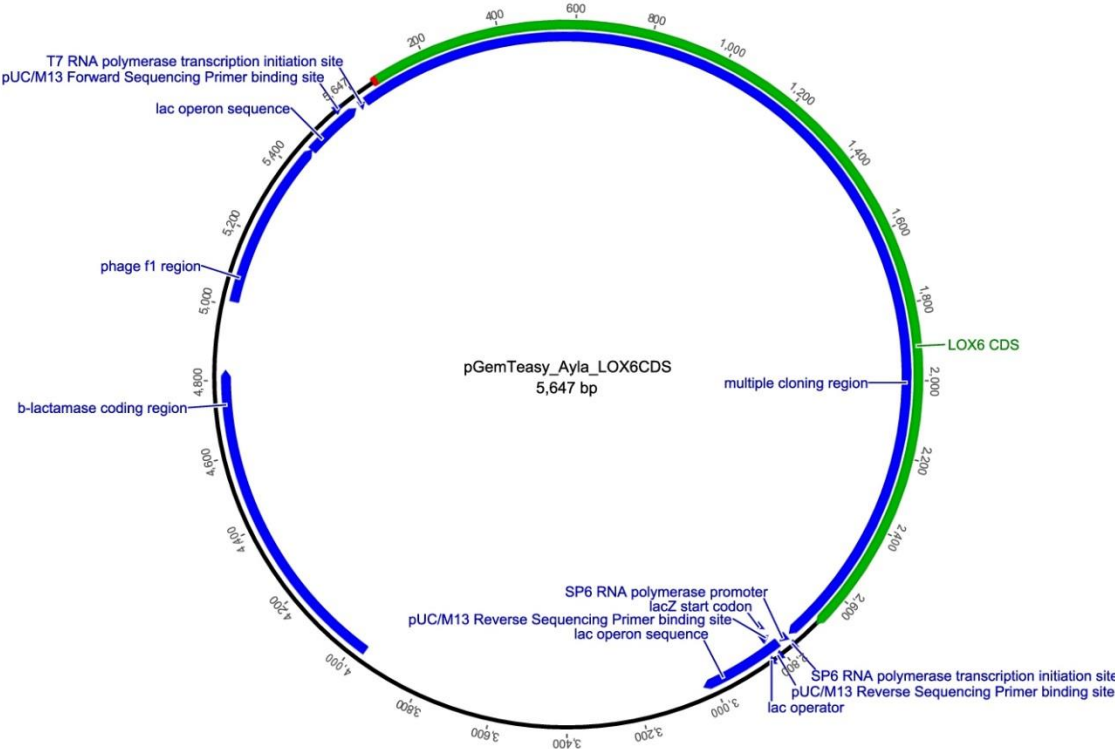


Abbildung 6.10: Eingangsvektor pGemTeasy mit inserierter LOX6-CDS.

6.5.6 pDest17 mit LOX6-CDS



Abbildung 6.11: Zielvektor pDest17 mit LOX6-CDS.

6.6 Suszeptibilität von *lox6* bei Trockenstress

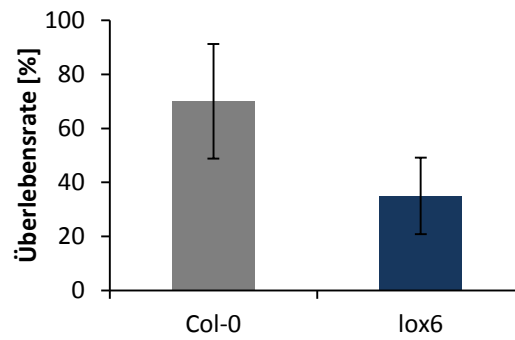


Abbildung 6.12: Überlebensrate von Col-0 und *lox6* Erdpflanzen in % nach Trockenstress. 4 Wochen alte Pflanzen wurden trocken gelassen und dann erneut gewässert. Nach 48 h wurde die Überlebensrate bestimmt. Die Daten stammen aus 2 zeitgleich durchgeführten unabhängigen Experimenten mit zusammen angezogenen Pflanzen. Col-0 und *lox6* n=40.

Die Überlebensrate von Col-0 Pflanzen liegt bei 70 %, wobei die Überlebensrate bei *lox6* Pflanzen lediglich 35 % beträgt.

6.7 Jasmonate nach Verwundung und α -Linolensäurebehandlung in Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Blättern

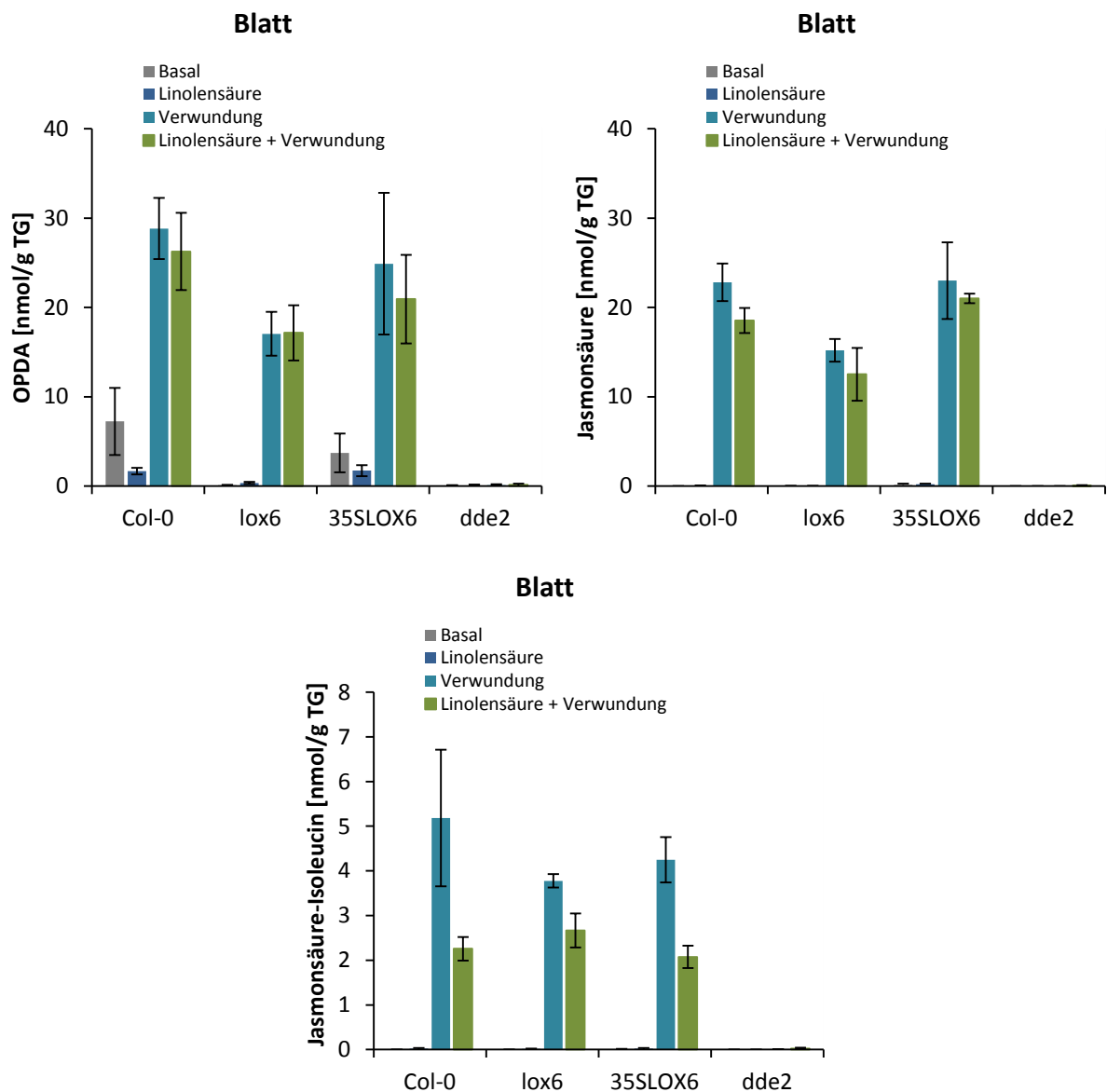


Abbildung 6.13: Jasmonat Gehalte in Blättern von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturlpflanzen basal, nach Behandlung mit 50 μ M α -Linolensäure für 2 h, Verwundung mit 30 min Inkubationszeit sowie 50 μ M α -Linolensäurebehandlung für 2 h und anschließender Verwundung mit 30 min Inkubationszeit in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten dargestellt. (MW+STABW)

In den Blättern ist basal nur in Col-0 (7 nmol/g TG) und 35SLOX6 (4 nmol/g TG) OPDA vorhanden. Eine α -Linolensäurebehandlung alleine führt nicht zu einem Anstieg an OPDA. Wieder finden sich nur Gehalte in Col-0 und 35SLOX6 mit 2 nmol/g TG. Bei Verwundung steigen die OPDA Gehalte stark an, wobei die Spiegel in 35SLOX6 mit 25 nmol/g TG nicht höher sind als im Wildtyp (29 nmol/g TG). In der *lox6* Mutante sind die Gehalte mit

17 nmol/g TG etwas geringer. Bei einer α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung steigen die OPDA Gehalte in Col-0, *lox6* und 35SLOX6 nicht weiter an. In der *dde2* Mutante findet sich wie erwartet weder basal noch nach Behandlung OPDA.

Es sind in keinen Genotypen – weder basal, noch nach α -Linolensäurebehandlung – Jasmonsäure Gehalte festzustellen. Nach Verwundung findet in allen Genotypen außer *dde2* ein Anstieg statt, wobei dieser in 35SLOX6 mit 23 nmol/g TG genauso hoch ist wie in dem Wildtyp. Der Anstieg ist in der *lox6* Mutante mit 15 nmol/g TG etwas geringer. Auch die Jasmonsäure Spiegel steigen nach α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung nicht weiter an. Auch bei dieser Behandlung finden sich in der *dde2* Mutante keinerlei Gehalte an Jasmonsäure.

Die Jasmonsäure-Isoleucin Gehalte spiegeln die der Jasmonsäure wider. Auch hier finden sich in keinen Genotypen – weder basal noch nach α -Linolensäurebehandlung – Gehalte. Nach Verwundung gibt es einen Anstieg, welcher in dem Wildtyp mit 5 nmol/g TG am höchsten ist. Die 35SLOX6 Linie und *lox6* Mutante weisen mit 4 nmol/g TG leicht geringere Spiegel auf. In der *dde2* Mutante ist wie erwartet auch nach den verschiedenen Behandlungen kein Anstieg an Jasmonsäure-Isoleucin vorhanden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die 35SLOX6 Linie in den Blättern keine erhöhten OPDA, Jasmonsäure oder Jasmonsäure-Isoleucin Gehalte – weder basal noch nach α -Linolensäurebehandlung, Verwundung oder einer Kombination dieser beiden Behandlungen – aufweist. In der *lox6* Mutante sind wie erwartet keine basalen OPDA Gehalte zu beobachten, da LOX6 für die basale OPDA-Produktion in Blättern verantwortlich ist (Grebner et al., 2013). Auch weist sie nach Verwundung sowie α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung etwas geringere Gehalte an OPDA, Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin auf als der Wildtyp, da LOX6 in den Blättern zu der Jasmonatsynthese nach Stress beiträgt. In der *dde2* Mutante sind wie erwartet weder basal noch nach Stress Jasmonate zu beobachten.

Interessanterweise führt eine α -Linolensäurebehandlung alleine nicht zu erhöhten Jasmonat Gehalten. Zudem steigen die Gehalte bei vorheriger α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung nicht stärker an als bei alleiniger Verwundung. Dies könnte zwei Ursachen haben. Entweder die α -Linolensäure erreicht die Blätter nicht (da sie von den

Wurzeln über das Medium aufgenommen wird) oder dieses Substrat ist in den Blättern für die Jasmonatsynthese nicht limitierend. In einem ersten Versuch (allerdings ohne alleinige Verwundung) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Hier zeigten sich aber nach α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung etwas höhere OPDA (28 nmol/g TG gegenüber 18 nmol/g TG), Jasmonsäure (21 nmol/g TG gegenüber 15 nmol/g TG) sowie Jasmonsäure-Isoleucin (3 nmol/g TG gegenüber 2 nmol/g TG) Werte in der 35SLOX6 Linie im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings wies die *lox6* Mutante mit 3 nmol/g TG den höchsten Jasmonsäure-Isoleucin Wert auf. Diese anfänglich beobachteten Unterschiede zwischen 35SLOX6 und Col-0 nach α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung konnten sich allerdings in der hier dargestellten Wiederholung nicht bestätigen. In einem weiteren Versuch wurden nur die basalen Gehalte sowie die Spiegel nach α -Linolensäurebehandlung untersucht. Dieser Versuch zeigte ähnliche Ergebnisse wie das hier dargestellte Experiment.

6.8 Hydroxyfettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Wurzeln

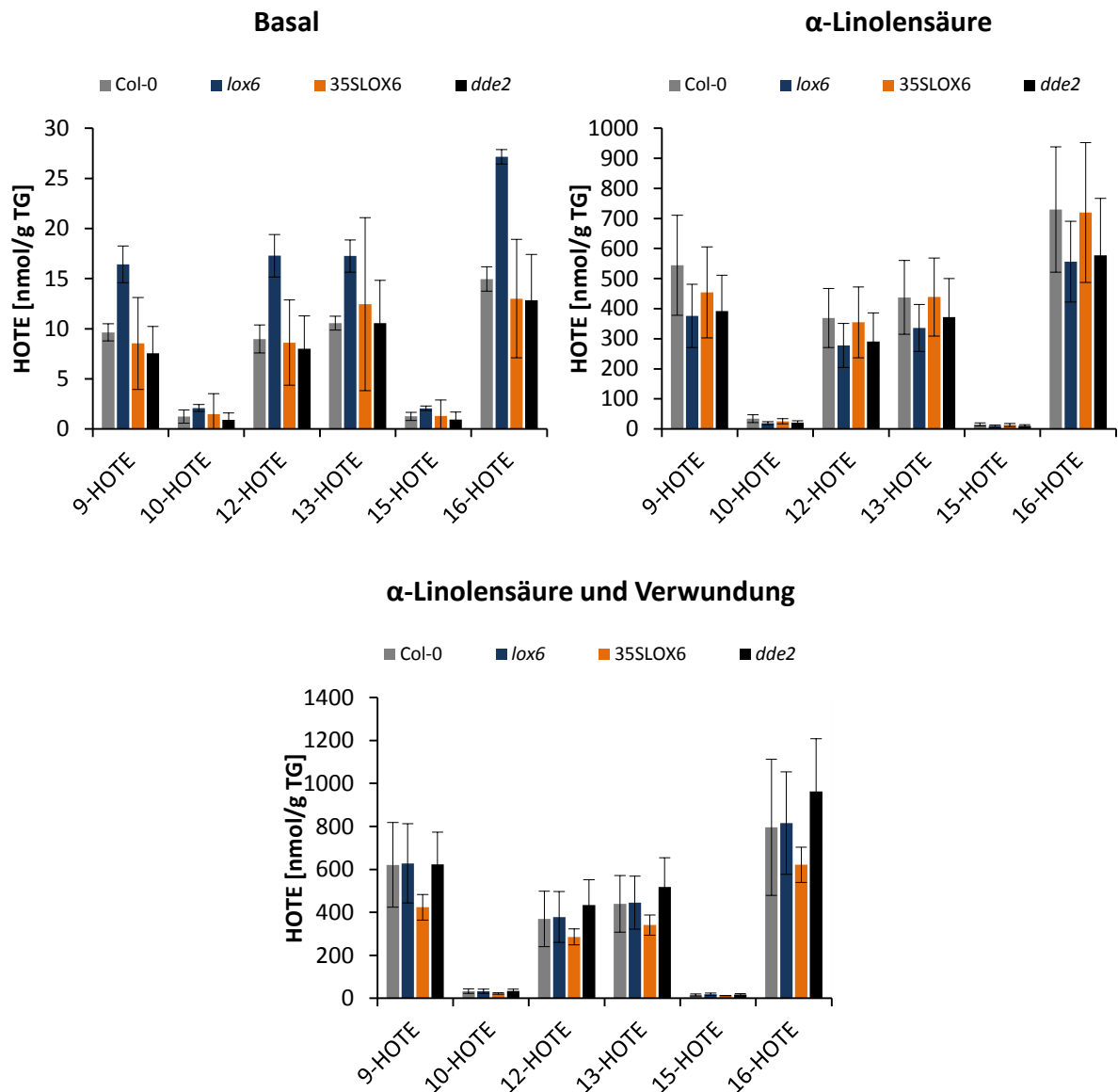


Abbildung 6.14: HOTE Gehalte in Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturlpflanzen basal, nach Behandlung mit 50 μ M α -Linolensäure für 2 h sowie 50 μ M α -Linolensäurebehandlung für 2 h und anschließender Verwundung mit 30 min Inkubationszeit in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten dargestellt. (MW+STABW)

Basal sind in dem Wildtyp vor allem 9-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE vorhanden, welche zwischen 9 nmol/g TG (12-HOTE) und 15 nmol/g TG (16-HOTE) liegen. 10-HOTE und 15-HOTE dagegen sind mit 1 nmol/g TG kaum vorhanden. Auch die anderen Genotypen zeigen eine ähnliche Verteilung, wobei die *lox6* Mutante die höchsten Gehalte an 9-HOTE,

12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE aufweist. Hier liegen die Werte zwischen 16 nmol/g TG (9-HOTE) und 27 nmol/g TG (16-HOTE).

Nach α -Linolensäurebehandlung steigen die Werte stark an. Die vier Hydroxyfettsäuren 9-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE weisen weiterhin die höchsten Gehalte in dem Wildtyp mit Werten zwischen 369 nmol/g TG (12-HOTE) und 730 nmol/g TG (16-HOTE) auf. Die Gehalte an 10-HOTE und 15-HOTE liegen bei 34 nmol/g TG bzw. 16 nmol/g TG. Die Werte der anderen Genotypen sind ähnlich hoch und zeigen die gleiche Verteilung wie der Wildtyp.

Die zusätzlich zu der α -Linolensäurebehandlung durchgeführte Verwundung führt nicht zu einem weiteren starken Anstieg an Hydroxyfettsäuren. Hier liegen die Gehalte an 9-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE in dem Wildtyp zwischen 370 nmol/g TG (12-HOTE) und 796 nmol/g TG (16-HOTE). Auch hier ähneln die anderen Genotypen dem Wildtyp in der Höhe und Verteilung der Hydroxyfettsäure Gehalte.

Insgesamt sind die Gehalte an HOTES in der 35SLOX6 Linie nicht höher als die des Wildtyps. Zudem kann durch die Verteilung der Hydroxyfettsäuren eine größtenteils enzymatische Reaktion ausgeschlossen werden, da hier die Gehalte an 9-HOTE und 13-HOTE am stärksten wären. Somit wird von einer radikalischen Reaktion ausgegangen, welche hauptsächlich durch die α -Linolensäurebehandlung ausgelöst wird, da nach zusätzlicher Verwundung kein großer Anstieg mehr erfolgt. Es wäre möglich, dass die Pflanzen die α -Linolensäurezugabe nicht als Substratzugabe, sondern vielmehr als Stress empfunden und mit einer massiven Produktion von Hydroxyfettsäuren reagiert haben.

Bei einer Wiederholung dieses Versuches konnten ähnliche Ergebnisse generiert werden. Auch hier waren basal, nach α -Linolensäurebehandlung sowie nach α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung hauptsächlich Gehalte an 9-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE und 16-HOTE zu finden. Auch fand wieder ein starker Anstieg nach α -Linolensäurebehandlung statt. Allerdings stiegen die Gehalte in diesem Fall nach zusätzlicher Verwundung teilweise noch stärker an (vor allem 9-HOTE). In dem zweiten Experiment waren basal die Gehalte an Hydroxyfettsäuren in der *lox6* Mutante und der 35SLOX6 Linie höher als im Wildtyp. Nach α -Linolensäurebehandlung wies die 35SLOX6 Linie die höchsten Gehalte auf. Bei α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung

waren allerdings die Gehalte in dem Wildtyp am höchsten (9-HOTE und 13-HOTE) oder gleich hoch (12-HOTE und 16-HOTE) wie in der 35SLOX6 Linie.

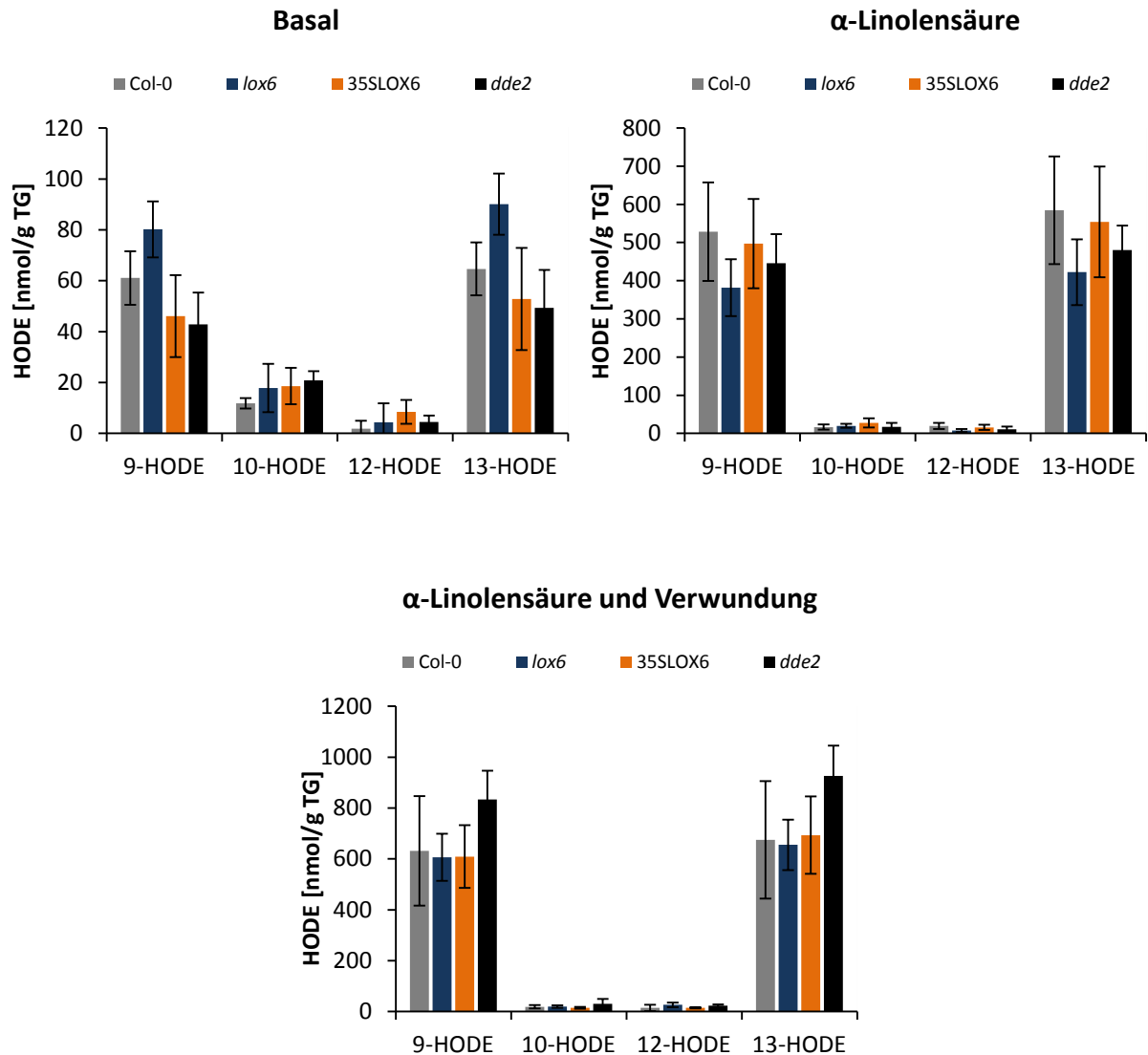


Abbildung 6.15: HODE Gehalte in Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturlinien basal, nach Behandlung mit 50 μ M α -Linolensäure für 2 h sowie 50 μ M α -Linolensäurebehandlung für 2 h und anschließender Verwundung mit 30 min Inkubationszeit in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten dargestellt. (MW+STABW)

Basal sind in dem Wildtyp vor allem 9-HODE (61 nmol/g TG) und 13-HODE (65 nmol/g TG) Gehalte zu finden. Die Hydroxyfettsäuren 10-HODE und 12-HODE sind mit 12 nmol/g TG bzw. 2 nmol/g TG weniger stark vorhanden. Die anderen Genotypen zeigen ähnliche Gehalte

sowie eine ähnliche Verteilung der Hydroxyfettsäuren, wobei *lox6* bei 9-HODE (80 nmol/g TG) und 13-HODE (90 nmol/g TG) die höchsten Gehalte aufweist.

Nach α -Linolensäurebehandlung ist ein starker Anstieg zu verzeichnen. Die Gehalte in dem Wildtyp liegen bei 529 nmol/g TG für 9-HODE und 584 nmol/g TG für 13-HODE. Auch hier sind die Gehalte an 10-HODE (17 nmol/g TG) und 12-HODE (20 nmol/g TG) am geringsten. Die Gehalte und die Verteilung der Hydroxyfettsäuren der anderen Genotypen sehen ähnlich aus.

Bei einer α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung findet nur ein geringer weiterer Anstieg statt. Hier liegen die 9-HODE und 13-HODE Gehalte im Wildtyp bei 632 nmol/g TG bzw. 675 nmol/g TG. Die Gehalte an 10-HODE (19 nmol/g TG) und 12-HODE (14 nmol/g TG) liegen weiterhin deutlich darunter. Die Gehalte und Verteilungen der Hydroxyfettsäuren in den anderen Genotypen sehen auch hier ähnlich aus, wobei *dde2* die höchsten 9-HODE (834 nmol/g TG) und 13-HODE (926 nmol/g TG) Gehalte aufweist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auch die HODE Gehalte in der 35SLOX6 Linie nicht höher sind als in dem Wildtyp. Basal sowie bei allen Behandlungen sind vor allem 9-HODE und 13-HODE zu finden, was auf eine enzymatische Generierung dieser Hydroxyfettsäuren hinweisen könnte, da sonst auch die 12-HODE Gehalte höher sein müssten.

Bei einer Wiederholung dieses Versuches konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden, da auch hier die Gehalte an 9-HODE und 13-HODE am höchsten und 10-HODE sowie 12 HODE kaum vorhanden waren. In diesem Versuch waren die basalen Werte etwas geringer und wieder wies *lox6* etwas höhere Werte als der Wildtyp auf. Obwohl 35SLOX6 auch etwas höhere Spiegel an 9-HODE und 13-HODE enthielt, können aufgrund der hohen Fehlerbalken keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Nach α -Linolensäurebehandlung stiegen auch in diesem Versuch die Gehalte an, blieben aber mit 165 nmol/g TG für 9-HODE und 127 nmol/g TG für 13-HODE deutlich unter dem hier dargestellten Versuch. Nach α -Linolensäure wies *lox6* mit 479 nmol/g TG für 9-HODE und 393 nmol/g TG für 13-HODE die höchsten Werte auf, wobei die hohen Fehlerbalken keine eindeutige Aussage zulassen. Die Gehalte an Hydroxyfettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung lagen bei dem Wildtyp bei

1074 nmol/g TG für 9-HODE und 849 nmol/g TG für 13-HODE. Die Gehalte der anderen Genotypen lagen alle unter diesen Werten. Vor allem 35SLOX6 und *dde2* lagen deutlich darunter. Für 10-HODE und 12-HODE konnten nur sehr geringe Anstiege festgestellt werden.

Zusammenfassend liegen auch die Gehalte der HODEs in der 35SLOX6 Linie nicht über denen des Wildtyps. Auch hier scheint eine enzymatische Generierung möglich, da vor allem 9-HODE und 13-HODE angestiegen sind.

6.9 Ketofettsäuren nach α -Linolensäurebehandlung mit und ohne anschließende Verwundung in Col-0, 35SLOX6, *lox6* und *dde2* Wurzeln

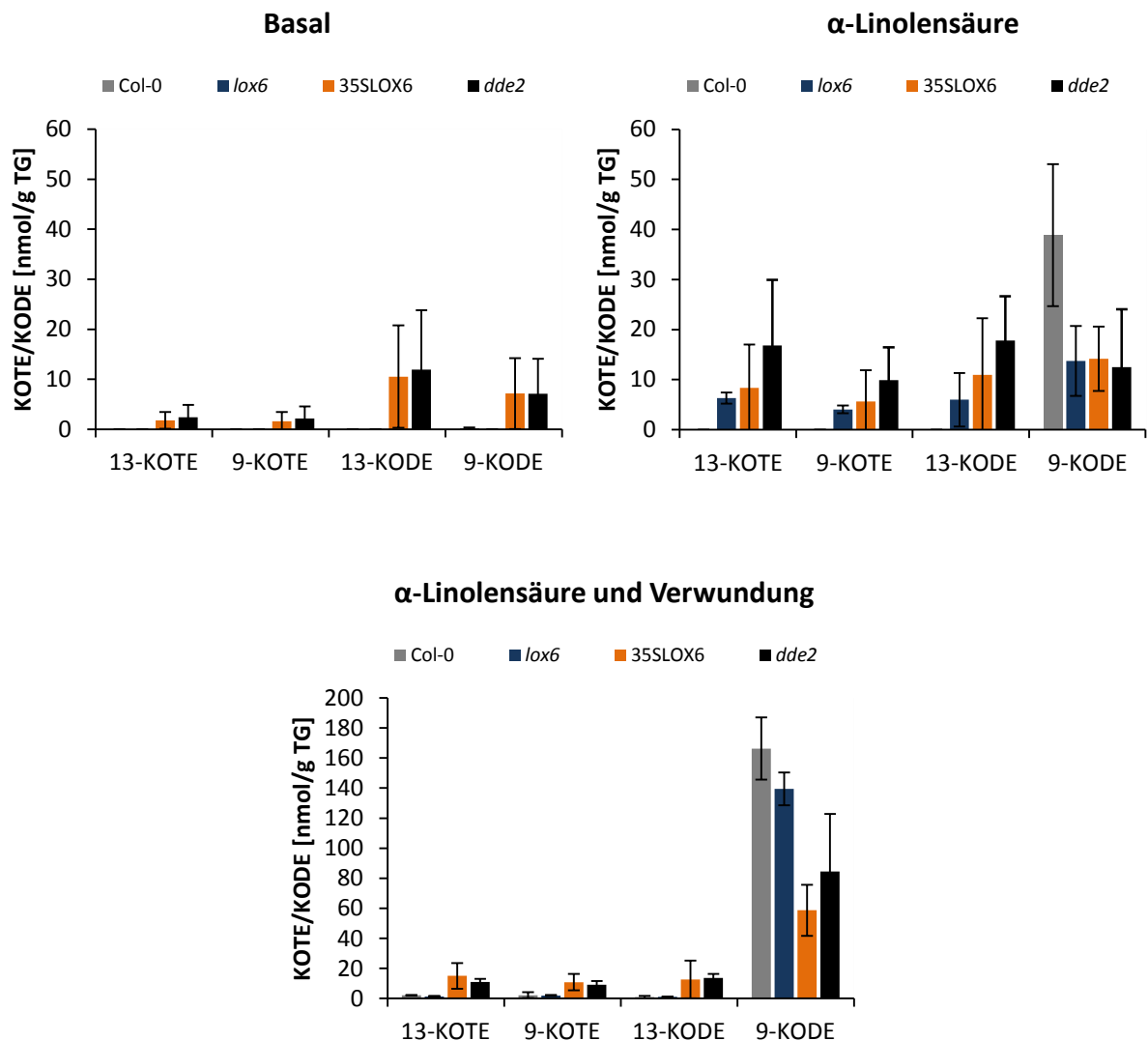


Abbildung 6.16: Ketofettsäure Gehalte in Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0, *lox6*, 35SLOX6 23.1 und *dde2* Hydrokulturpflanzen basal, nach Behandlung mit 50 μ M α -Linolensäure für 2 h sowie 50 μ M α -Linolensäurebehandlung für 2 h und anschließender Verwundung mit 30 min Inkubationszeit in nmol/g TG. Es sind die Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten dargestellt. Hier wurde als Response Faktor 1 verwendet, da bei der Messung der 15-HEDE Standard verwendet wurde. (MW+STABW)

Basal sind in dem Wildtyp und der *lox6* Mutante keine Gehalte an Ketofettsäuren vorhanden. In der 35SLOX6 Linie finden sich hauptsächlich 13-KODE (11 nmol/g TG) und 9 KODE (7 nmol/g TG). Die *dde2* Mutante weist ähnliche Gehalte auf. Nach α -Linolensäurebehandlung sind in dem Wildtyp lediglich 9-KODE Gehalte vorhanden, welche aber mit 39 nmol/g TG am höchsten sind. Die 35SLOX6 Linie weist für alle Ketofettsäuren

Spiegel zwischen 6 nmol/g TG (9-KOTE) und 14 nmol/g TG (9-KODE) auf. Die Gehalte der anderen Genotypen sind ähnlich hoch. Nach α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung steigen hauptsächlich die Gehalte an 9-KODE an. Der Wildtyp weist mit 166 nmol/g TG den höchsten Wert auf, darauf folgen *lox6* mit 139 nmol/g TG, *dde2* mit 84 nmol/g TG und 35SLOX6 mit 59 nmol/g TG.

Zusammenfassend liegen zwar die Gehalte an Ketofettsäuren in der 35SLOX6 Linie basal, nach α -Linolensäurebehandlung (außer für 9-KODE) sowie nach α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung (außer für 9-KODE) höher als in dem Wildtyp, allerdings können aufgrund der hohen Fehlerbalken der 35SLOX6 Linie keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.

In einem zweiten Versuch konnten basal Gehalte an Ketofettsäuren in alle Genotypen gefunden werden. Die Gehalte waren dabei ähnlich hoch wie in dem hier dargestellten Versuch. Obwohl die Spiegel an 13-KODE und 9-KODE leicht erhöht waren, kann aufgrund der hohen Fehlerbalken keine eindeutige Aussage getroffen werden. Nach α -Linolensäurebehandlung stiegen die Gehalte der Ketofettsäuren nicht an und zeigten in allen Genotypen die gleiche Verteilung. Die Gehalte waren in der *lox6* Mutante und dem Wildtyp am höchsten, wobei diese auch die größten Fehlerbalken zu verzeichnen hatten. Nach α -Linolensäurebehandlung mit zusätzlicher Verwundung konnte in dem Wildtyp ein Anstieg an allen Ketofettsäuren beobachtet werden, wobei 9-KODE mit 296 nmol/g TG deutlich stärker als die anderen (zwischen 34 nmol/g TG und 40 nmol/g TG) anstieg. Die *lox6* und *dde2* Mutanten zeigten bei 9-KODE mit 170 nmol/g TG und 33 nmol/g TG die nächsthöheren Anstiege, allerdings bei *lox6* mit einem sehr großen Fehlerbalken. Insgesamt waren auch in diesem Versuch nach α -Linolensäurebehandlung sowie α -Linolensäurebehandlung mit anschließender Verwundung in der 35SLOX6 Linie keine höheren Ketofettsäure Gehalte im Vergleich zum Wildtyp zu finden.

7 Literaturverzeichnis

- Acosta, I. F., Farmer, E. E.** (2010) Jasmonates. The *Arabidopsis* Book Vol. 8, Article 129.
- Adlercreutz, P., Gitlesen, T., Ncube, I., Read, J. S.** (1997) *Vernonia* lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. *Methods in Enzymology* Vol. 284, pp220-232.
- Angelo, A. J. St., Ory R. L.** (1983) Lipid degradation during seed deterioration. *Phytopathology* Vol. 73, No. 2, pp315-317.
- Arc, E., Ogé, L., Grappin, P., Rajjou, L.** (2011) Plant seed: A relevant model to study aging processes. Olgun, A. (Ed.) *The field of biological aging: Past, present and future.* Transworld Research Network, Kerala, pp87-102.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Côme, D.** (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum* Vol. 97, Issue 1, pp104-110.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Côme, D.** (1998) Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiologia Plantarum* Vol. 104, Issue 4, pp646-652.
- Bailly, C., Bogatek-Leszczynska, R., Côme, D., Corbineau, F.** (2002) Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research* Vol. 12, Issue 1, pp47-55.
- Bailly, C.** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* Vol. 14, Issue 2, pp93-107.
- Balkenhohl, T., Kühn, H., Wasternack, C., Feussner, I.** (1998) A lipase specific for esterified oxygenated polyenoic fatty acids in lipid bodies of cucumber cotyledons. Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., Martínez-Force, E. (Eds.) *Advances in plant lipid research. The proceedings of the 13th international symposium on plant lipids, Sevilla*, pp320-322.
- Bannenberg, G., Martinez, M., Hamber, M., Castresana, C.** (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids AOCs* Vol. 44, No. 2, pp85-95.
- Beckman, K. B., Ames, B. N.** (1997) Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 32, pp19633-19636.
- Bell, E., Mullet, J. E.** (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* Vol. 103, Issue 4, pp1133-1137.
- Bell, E., Creelman, A., Mullet, J. E.** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 92, No. 19, pp8675-8679.
- Ben Mansour, A., Porter, E. A., Kite, G. C., Simmonds, M. S. J., Abdelhedi, R., Bouaziz, M.** (2015) Phenolic profile characterization of chemlali olive stones by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 63, Issue 7, pp1990-1995.

- Berger, S., Bell, E., Mullet, J. E.** (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* Vol. 111, Issue 2, pp525-531.
- Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kühn, H., Feussner, I.** (2001) Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1533, Issue 3, pp266-276.
- Berger, S.** (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta* Vol. 214, Issue 4, pp497-504.
- Berger, S., Mitchell-Olds, T., Stotz, H. U.** (2002) Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* Vol. 114, Issue 1, pp85-91.
- Bewley, J. D., Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Second edition, Plenum Press, New York.
- Bewley, J. D.** (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* Vol. 9, pp1055-1066.
- Blažević, I., Radonić, A., Skočibušić, M., De Nicola, G. R., Montaut, S., Iori, R., Rollin, P., Mastelić, J., Zekić, M., Maravić, A.** (2011) Glucosinolate Profiling and Antimicrobial Screening of *Aurinia leucadea* (Brassicaceae). *Chemistry and Biodiversity* Vol. 8, pp2310-2321.
- Boca, S., Koestler, F., Ksas, B., Chevalier, A., Leymarie, J. Fekete, A., Mueller, M. J., Havaux, M.** (2014) *Arabidopsis* lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. *Plant, Cell and Environment* Vol. 37, Issue 2, pp368-381.
- Bolwell, G. P.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology* Vol. 2, Issue 4, pp287-294.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W. M., Hörtensteiner, S., Chételat, A., Martinoia E., Farmer, E. E.** (2007) A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* Vol. 49, Issue 5, pp889-898.
- Borowsky, K.** (2012) Bedeutung der 13-Lipoxygenasen für die Entwicklung und Etablierung eines *Arabidopsis*-Phytophthora Pathosystems. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D.** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 43, pp83-116.
- Böttcher, C., Pollmann, S.** (2009) Plant Oxylipins: Plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *The FEBS Journal* Vol. 276, No. 17, pp4693-4704.
- Breen, A. P., Murphy J. A.** (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 18, Issue 6, pp1033-1077.
- Browse, J.** (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* Vol. 60, pp183-205.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. E., Dong, X.** (2011) *Arabidopsis lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Molecular Biology* Vol. 75, pp25-33.

- Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J.-L., Farmer, E. E.** (2013) Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: A role for lipoxygenase 6 in response to long-distance wound signals. *New Phytologist* Vol. 197, Issue 2, pp566-575.
- Chiu, K. Y., Wang, C. S., Sung, J. M.** (1995) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Physiologia Plantarum* Vol. 94, Issue 3, pp441-446.
- Cobessi, D., Dumas, R., Pautre, V., Meinguet, C., Ferrer, J.-L., Alban, C.** (2012) Biochemical and structural characterization of the *Arabidopsis* bifunctional enzyme dethiobiotin synthetase-diaminopelargonic acid aminotransferase: Evidence for substrate channeling in biotin synthesis. *The Plant Cell* Vol. 24, pp1608-1625.
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A., Ryan, C. A.** (1996) The octadecanoic signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* Vol. 383, No. 6603, pp826-829.
- Corbineau, F.** (2012) Markers of seed quality: From present to future. *Seed Science Research* Vol. 22, No. Suppl. 1, ppS61-S68.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 48, pp355-381.
- Dave, A., Hernández, M. L., He, Z., Andriotis, V. M. E., Vaistij, F. E., Larson, T. R., Graham, I. A.** (2011) 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* Vol. 23, pp583-599.
- Dave, A., Vaistij, F. E., Gilday, A. D., Penfield, S. D., Graham, I. A.** (2016) Regulation of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy and germination by 12-oxo-phytodienoic acid. *Journal of Experimental Botany* Vol. 67, Issue 8, pp2277-2284.
- De Domenico, S., Bonsegna, S., Horres, R., Pator, V., Taurino, M., Poltronieri, P., Imtiaz, M., Kahl, G., Flors, V., Winter, P., Santino, A.** (2012) Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* Vol. 61, pp115-122.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., Wasternack, C.** (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – enzymes, products, regulation. *Plant Biology* Vol. 8, Issue 3, pp297-306.
- Delouche, J. C., Baskin, C. C.** (1973) Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology* Vol. 1, pp427-452.
- Devaiah, S. P., Pan, X., Hong, Y., Roth, M., Welti, R., Wang, X.** (2007) Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* Vol. 50, Issue 6, pp950-957.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., Turner, J. G.** (2002) The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* Vol. 14, pp1557-1566.

- Farmer, E. E., Johnson, R. R., Ryan, C. A.** (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* Vol. 98, Issue 3, pp995-1002.
- Farmer, E. E., Dubugnon, L.** (2009) Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 106, No. 3, pp935-940.
- Farmer, E. E., Gasperini, D., Acosta, I. F.** (2014) The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytologist* Vol. 204, Issue 2, pp282-288.
- Faul, S. C.** (2015) Samenalterung in *Arabidopsis thaliana*: Analyse von Oxylipinen und Untersuchung der Funktion von Lipoxygenasen. Masterarbeit, Universität Würzburg.
- Feussner, I., Balkenhohl, T. J., Porzel, A., Kühn, H., Wasternack, C.** (1997) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 34, pp21635-21641.
- Feussner, I., Kühn H., Wasternack, C.** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science* Vol. 6, No. 6, pp268-273.
- Feussner, I., Wasternack, C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* Vol. 53, pp275-297.
- Feys, B. J. F., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., Turner, J. G.** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* Vol. 6, pp751-759.
- Finkel, T., Holbrook, N. J.** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* Vol. 408, pp239-247.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R.** (2009) (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* Vol. 5, No. 5, pp344-350.
- Foote, C. S.** (1979) Quenching of singlet oxygen. Wasserman, H. H., Murray, R. W. (Eds.) *Singlet Oxygen*. Vol. 40, Academic Press, New York, pp139-171.
- Fujita, T., Kadoya, Y., Aota, H., Nakayama, M.** (1995) A new phenylpropanoid glucoside and other constituents of *Oenanthe javanica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* Vol. 59, No. 3, pp526-528.
- Gasperini, D., Chauvin, A., Acosta, I. F., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., Wolfender, J.-L., Farmer, E. E.** (2015) Axial and radial oxylipin transport. *Plant Physiology* Vol. 169, Issue 3, pp2244-2254.
- Gayen, D., Ali, N., Ganguly, M., Paul, S., Datta, K., Datta, S. K.** (2014) RNAi mediated silencing of *lipoxygenase* gene to maintain rice grain quality and viability during storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Vol. 118, Issue 2, pp229-243.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E. E.** (2010) Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling* Vol. 3, Issue 109, cm3.

- Gidrol, X., Serghini, H., Noubhani, A., Mocouot, B., Mazliak, P.** (1989) Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum* Vol. 76, Issue 4, pp591-597.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavei, S. A., Rudaz, S., Wolfender, J. L., Farmer, E. E.** (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 284, No. 50, pp34506-34513.
- Goel, A., Goel, A. K., Sheoran, I. S.** (2003) Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* Vol. 160, No. 9, pp1093-1100.
- Goel, A., Sheoran, I. S.** (2003) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum* Vol. 46, Issue 3, pp429-434.
- Gorus, I.** (2014a) Untersuchung zur Funktion von Oxylipinen in Wurzeln von *Arabidopsis*: Metabolitanalyse und „Tagging“ der Biosyntheseenzyme. Bachelorarbeit, Universität Würzburg.
- Gorus, I.** (2014b) Spezielle Biowissenschaften III Pharmazeutische Biologie. Protokoll, Universität Würzburg.
- Grebner, W., Stingl, N. E., Oenel, A., Mueller, M. J., Berger, S.** (2013) Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* Vol. 161, Issue 4, pp2159-2170.
- Gutjahr, C., Paszkowski, U.** (2009) Weights in the balance: Jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 22, No. 7, pp763-772.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.** (1999) Free radicals in biology and medicine. Third edition, Oxford University Press, Oxford.
- Harrington, J. F.** (1972) Seed storage and longevity. Kozlowski, T. T. (Ed.) *Seed biology*. Vol. 3, Academic Press, New York, pp145-245.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., Cottage, A.** (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* Vol. 2, Article 19.
- Holtman, W. L., Vredenburg-Heistek, J. C., Schmitt, N. F., Feussner, I.** (1997) Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. *European Journal of Biochemistry* Vol. 248, Issue 2, pp452-458.
- Hsu, C. C., Chen, C. L., Chen, J. J., Sung, J. M.** (2003) Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter melon seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. *Scientia Horticulturae* Vol. 98, Issue 3, pp201-212.
- Huang, A. H. C.** (1992) Oil bodies and oleosins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 43, pp177-200.
- Huang, A. H. C.** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology* Vol. 110, Issue 4, pp1055-1061.

- Huang, D., Wu, W., Abrams, S. R., Cutler, A. J.** (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* Vol. 59, Issue 11, pp2991-3007.
- Huang, J., Cai, M., Long, Q., Liu, L., Lin, Q., Jiang, L., Chen, S., Wan, J.** (2014) *OsLOX2*, a rice type I lipoxygenase, confers opposite effects on seed germination and longevity. *Transgenic Research* Vol. 23, Issue 4, pp643-655.
- Humphrey, P. T., Gloss, A. D., Alexandre, N. M., Villalobos, M. M., Fremgen, M. R., Groen, S. C., Meihls, L. N., Jander, G., Whiteman, N. K.** (2016) Aversion and attraction to harmful plant secondary compounds jointly shape the foraging ecology of a specialist herbivore. *Ecology and Evolution* Vol. 6, Issue 10, pp3256-3268.
- Kachroo, A., Kachroo, P.** (2009) Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* Vol. 47, pp153-176.
- Kaewnaree, P., Vichitphan, S., Klanrit, P., Siri, B., Vichitphan, K.** (2011) Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes in sweet pepper (*Capsicum annuum* Linn.) seeds. *Biotechnology* Vol. 10, Issue 2, pp175-182.
- Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C., Corbineau, F.** (2006) Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiologia Plantarum* Vol. 128, Issue 3, pp496-506.
- Klosterman, H. J., Smith, F., Clagett, C. O.** (1955) The constitution of linocinnamarin. *Journal of the American Chemical Society* Vol. 77, Issue 2, pp420-421.
- Koo, A. J. K., Howe, G. A.** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* Vol. 70, Issues 13-14, pp1571-1580.
- Koo, A. J. K., Gao, X., Jones, A. D., Howe, G. A.** (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* Vol. 59, Issue 6, pp974-986.
- Koo, A. J. K., Cooke, T. F., Howe, G. A.** (2011) Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 108, No. 22, pp9298-9303.
- Kourtchenko, O., Andersson, M. X., Hamberg, M., Brunström, Å., Göbel, C., McPhail, K. L., Gerwick, W. H., Feussner, I., Ellerström, M.** (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in *Arabidopsis*: Jasmonate signalling dependence. *Plant Physiology* Vol. 145, pp1658-1669.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B., Wasternack, C.** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* Vol. 123, Issue 1, pp177-187.
- Kuhn, H., Banthiya, S., van Leyen, K.** (2015) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1851, Issue 4, pp308-330.
- Lamb, C., Dixon, R. A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 48, pp251-275.

- Laudert, D., Weiler, E. W.** (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal* Vol. 15, Issue 5, pp675-684.
- Laudert, D., Schaller, F., Weiler, E. W.** (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* Vol. 211, Issue 1, pp163-165.
- Lehmann, J., Atzorn, R., Brückner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C., Parthier, B.** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* Vol. 197, Issue 1, pp156-162.
- Li, J., Zhou, G., Li, C., Wen, P., Ying, P., Yu, J., Wu, H.** (2009) Determination of scandoside methyl ester in *Hedyotis chrysotricha* by HPLC. *Zhongguo Zhong Za Zhi* Vol. 34, No. 20, pp2619-2621.
- Loiseau, J., Vu, B. L., Macherel, M.-H., Le Deunff, Y.** (2001) Seed lipoxygenases: Occurrence and functions. *Seed Science Research* Vol. 11, Issue 3, pp199-211.
- Marsch-Martínez, N., Franken, J., Gonzalez-Aguilera, K. L., de Folter, S., Angenent, G.** (2013) An efficient flat-surface collar-free grafting method for *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Methods* Vol. 9, Article 14.
- Mata-Pérez, C., Sánchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Luque, F., Jiménez-Ruiz, J., Padilla, M. N., Fierro-Risco, J., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A., Corpas, F. J., Barroso, J. B.** (2015) Transcriptomic profiling of linolenic acid-responsive genes in ROS signaling from RNA-seq data in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* Vol. 6, Article 122.
- Matsui, K., Hijika, K., Tabuchi, Y., Kajiwara, T.** (1999) Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiology* Vol. 119, Issue 4, pp1279-1287.
- McConn, M., Browse, J.** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* Vol. 8, pp403-416.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 94, No. 10, pp5473-5477.
- McDonald, M. B.** (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* Vol. 27, No. 1, pp177-237.
- Mehdy, M. C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105, Issue 2, pp467-472.
- Melan, M. A., Dong, X., Endara, M. E. Davis, K. R., Ausubel, F. M., Peterman, T. K.** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* Vol. 101, Issue 2, pp441-450.
- Melan, M. A., Enriquez, A. L. D., Peterman, T. K.** (1994) The *LOX1* gene of *Arabidopsis* is temporally and spatially regulated in germinating seedlings. *Plant Physiology* Vol. 105, Issue 1, pp385-393.

- Moller, I. M.** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 52, pp561-591.
- Moller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A.** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* Vol. 58, pp459-481.
- Montillet J.-L., Cacas, J.-L., Garnier, L., Montané, M.-H., Douki, T., Bessoule, J.-J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J.-P., Vial, A., Triantaphylidès, C.** (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses. *The Plant Journal* Vol. 40, Issue 3, pp439-451.
- Mosblech, A. Feussner, I., Heilmann I.** (2009) Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* Vol. 47, Issue 6, pp511-517.
- Mueller, M. J.** (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology* Vol. 7, Issue 4, pp441-448.
- Mueller, M. J., Mène-Saffrané, L., Grun, C., Karg, K., Farmer, E. E.** (2006) Oxylipin analysis methods. *The Plant Journal* Vol. 45, Issue 4, pp472-489.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M. J., Berger, S.** (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* Vol. 20, pp768-785.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* Vol. 15, Issue 3, pp473-497.
- Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R., Huffnagle, G. B.** (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 16, No. 3, pp517-533.
- Ohlrogge, J., Browse, J.** (1995) Lipid Biosynthesis. *The Plant Cell* Vol. 7, pp957-970.
- Ozalvo, R., Cabrera, J., Escobar, C., Christensen, S. A., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Castresana, C., Iberkleid, I., Horowitz, S. B.** (2014) Two closely related members of *Arabidopsis* 13-lipoxygenases (13-LOXs), LOX3 and LOX4, reveal distinct functions in response to plant-parasitic nematode infection. *Molecular Plant Pathology* Vol. 15, Issue 4, pp319-332.
- Rao, M. V., Lee, H., Creelman, R. A., Mullet, J. E., Davis, K. R.** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* Vol. 12, pp1633-1646.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E. E.** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* Vol. 12, pp707-719.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P. Krishnamurthy, V., Dicke, M., Farmer, E. E.** (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell* Vol. 16, pp3132-3147.
- Sanchez, D. H., Paszkowski, J.** (2014) Heat-induced release of epigenetic silencing reveals the concealed role of an imprinted plant gene. *PLOS Genetics* Vol. 10, Issue 11, pp1-11.

- Sanders, P. M., Lee, P. Y., Biesgen, C., Boone, J. D., Beals, T. P., Weiler, E. W., Goldberg, R. B.** (2000) The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* Vol. 12, pp1041-1061.
- Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D.** (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* Vol. 16, pp1419-1432.
- Sattler, S. E., Mene-Saffrane, L., Farmer, E. E., Krischke, M., Mueller, M. J., DellaPenna, D.** (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *The Plant Cell* Vol. 18, pp3706-3720.
- Savchenko, T., Kolla, V. A., Wang, C.-Q., Nasafi, Z., Hicks, D. R., Phadungchob, B., Chehab, W. E., Brandizzi, F., Froehlich, J., Dehesh, K.** (2014) Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiology* Vol. 164, pp1151-1160.
- Schaller, F., Zerbe, P., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Hofmann, E., Pollmann, S.** (2008) The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* – localization and cyclization. *The FEBS Journal* Vol. 275, Issue 10, pp2428-2441.
- Seltmann, M. A., Stingl, N. E., Lautenschlaeger, J. K., Krischke, M., Mueller, M. J., Berger, S.** (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* Vol. 152, Issue 4, pp1940-1950.
- Serhan, C. N., Chiang, N., Van Dyke, T. E.** (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* Vol. 8, No. 5, pp349-361.
- Staswick, P. E., Su, W., Howell, S. H.** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 89, No. 15, pp6837-6840.
- Staswick, P. E., Tiryaki, I.** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* Vol. 16, pp2117-2127.
- Staswick, P. E.** (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiology* Vol. 150, Issue 3, pp1310-1321.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., Wasternack, C.** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* Vol. 51, No. 6, pp895-911.
- Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., Wasternack, C.** (2012) ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and *in vivo* heteromerization. *Journal of Experimental Botany* Vol. 63, Issue 17, pp6125-6138.
- Stingl, N., Krischke, M., Fekete, Agnes, Mueller, M. J.** (2013) Analysis of defense signals in *Arabidopsis thaliana* leaves by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: jasmonates, salicylic acid, abscisic acid. Munnik, T., Heilmann, I. (Eds.) *Plant lipid signaling protocols, methods in molecular biology* Vol. 1009, Springer, Heidelberg, pp103-113.

- Stintzi, A., Browse, J.** (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 97, No.19, pp10625-10630.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P., Schaller, A.** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. The Plant Journal Vol. 32, Issue 4, pp585-601.
- Stratton, S. P., Liebler, D. C.** (1997) Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of β -carotene and α -tocopherol. Biochemistry Vol. 36, No. 42, pp12911-12920.
- Sung, J. M., Jeng, T. L.** (1994) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. Physiologia Plantarum Vol. 91, Issue 1, pp51-55.
- Sung, J. M.** (1996) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. Physiologia Plantarum Vol. 97, Issue 1, pp85-89.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A., Lamb, C.** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 92, No. 10, pp4158-4163.
- Tocquin, P., Corbesier, L., Havelange, A., Pieltain, A., Kurtem, E., Bernier, G., Perilleux, C.** (2003) A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology Vol. 3, No. 2.
- Triantaphylidès, C. Krischke, M., Hoerberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Breusegem, F. V., Mueller, M. J.** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. Plant Physiology Vol. 148, Issue 2, pp960-968.
- Turner, J. G., Ellis, C., Devoto, A.** (2002) The jasmonate signal pathway. The Plant Cell Vol. 14, No. Suppl. 1, ppS153-S164.
- Unger, M.** (2015) Untersuchung der Lipoxygenase 6: Metabolitanalyse und Relevanz des Enzyms bei abiotischem und biotischem Stress in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Universität Würzburg.
- van Ommen Kloeke, A. E., Jager, T. van Gestel, C. A., Ellers, J., van Pomeran, M., Krommenhoek, T., Styrihave, B., Hansen, M., Roelofs, D.** (2012) Time-related survival effects of two gluconasturtiin hydrolysis products on the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Chemosphere Vol. 89, Issue 9, pp1084-1090.
- Vellosillo, T. Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C.** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. The Plant Cell Vol. 19, pp831-846.
- Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Augustín, P., Hamberg, M., Castresana, C.** (2012) Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. Molecular Plant Vol. 5, No. 4, pp914-928.

- Vick, B. A., Zimmermann, D. C.** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research communications* Vol. 111, No. 2, pp470-477.
- Vick, B. A., Zimmermann, D. C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* Vol. 75, Issue 2, pp458-461.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., Keller, B.** (2002) The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the *ALLENE OXIDE SYNTHASE* gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* Vol. 216, Issue 1, pp187-192.
- Walters, C., Ballesteros, D., Vertucci, V. A.** (2010) Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science* Vol. 179, Issue 6, pp565-573.
- Wang, Y., Liu, H., Shen, L., Yao, L., Ma, Y., Yu, D., Chen, J., Li, P., Chen, Y., Zhang, C.** (2015) Isolation and purification of six iridoid glycosides from *gardenia jasminoides* fruit by medium-pressure liquid chromatography combined with macroporous resin chromatography. *Journal of Separation Science* Vol. 38, Issue 23, pp4119-4126.
- Wasternack, C., Hause, B.** (2000) Jasmonate – chemische Signale in Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* Nr. 6, pp312-320.
- Wasternack, C., Kombrink, E.** (2010) Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* Vol. 5, No. 1, pp63-77.
- Wasternack, C., Hause, B.** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* Vol. 111, Issue 6, pp1021-1058.
- Weber, H., Vick, B. A., Farmer, E. E.** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 94, No. 19, pp10473-10478.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Camp, W.** (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding* Vol. 1, Issue 3, pp207-228.
- Xie, D. -X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J. G.** (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* Vol. 280, Issue 5366, pp1091-1094.
- Xu, H., Wei, Y., Zhu, Y., Lian, L., Xie, H., Cai, Q., Chen, Q., Lin, Z., Wang, Z., Xie, H., Zhang, J.** (2015) Antisense suppression of *LOX3* gene expression in rice endosperm enhances seed longevity. *Plant Biotechnology Journal* Vol.13, Issue 4, pp526-539.
- Yamane, H., Takagi, H., Abe, H., Yokota, T., Takahashi, N.** (1981) Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiology* Vol. 22, Issue 4, pp689-697.
- Youn, B., Sellhorn, G. E., Mirchel, R. J., Gaffney, B. J., Grimes, H. D., Kang, C.-H.** (2006) Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparison with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins* Vol. 65, Issue 4, pp1008-1020.

- Zhang, Z.-P., Baldwin, I. T.** (1997) Transport of [2-¹⁴C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* Vol. 203, Issue 4, pp436-441.
- Zhang, W., Thieme, C. J., Kollwig, G., Apelt, F., Yang, L., Winter, N., Andresen, N., Walther, D., Kragler, F.** (2016) tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. *The Plant Cell* Vol. 28, pp1237-1249.
- Zoeller, M.** (2012) Lipidperoxidation in der inkompatiblen *Pseudomonas-Arabidopsis* Interaktion: Biosynthese von Pimelin- und Azelainsäure. Dissertation, Universität Würzburg.
- Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., Mueller, M. J.** (2012) Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxydation and fragmentation processes: Biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology* Vol. 160, Issue 1, pp365-378.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Susanne Berger für die großartige Betreuung bedanken. Die unzähligen konstruktiven Ratschläge, Denkanstöße und aufmunternden Worte bei den Besprechungen sowie ihre Unterstützung bei allen Dingen haben mir sehr geholfen. Du hattest immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für mich!

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Dr. Rosalia Deeken für die Übernahme der Zweitkorrektur sowie die überaus fruchtbaren Besprechungen über meine Dissertation im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Prof. Dr. Dr. Martin Müller möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Lehrstuhl die Dissertation anzufertigen. Darüber hinaus haben die vielen Besprechungen und Ideen für Versuche meine Arbeit sehr bereichert.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Müller. Vielen Dank für die Beantwortung von Fragen, für gute Ideen und die Hilfe im Labor. Markus und Agnes möchte ich überdies ganz besonders für ihre fachkundige Hilfe bei Fragen und Problemen zur Analytik danken. Barbara, Maria und Claudia möchte ich zudem für ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit bei allen möglichen Fragen und Problemen danken. Außerdem möchte ich mich bei allen Doktoranden und vor allem bei Miriam für die schöne Zeit bedanken. In dir habe ich nicht nur eine tolle und hilfsbereite Kollegin, sondern auch eine gute Freundin gefunden. Zudem möchte ich mich bei allen meinen Praktikanten und insbesondere bei Sophie und Isabella für die tolle Zusammenarbeit, das Engagement und die Hilfe bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dröge-Laser für ihre Hilfe und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Überdies möchte ich von Herzen meinem Freund Sven danken, der mich zu jeder Zeit unterstützt und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie, welche mich mein Leben lang auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützt, motiviert und darin bestärkt hat, dass ich alles erreichen kann, was ich will. Vielen Dank!

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „ **Synthese und Relevanz von Oxylipinen in Blättern, Wurzeln und Samen von *Arabidopsis thaliana***“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Synthese und Relevanz von Oxylipinen in Blättern, Wurzeln und Samen von *Arabidopsis thaliana***“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den _____

Unterschrift