

**Transkriptionelle, metabolische und physiologische Anpassung nach  
Selbstintoxikation mit reaktiven Sekundärstoffen: die Glukosinolat-Bombe in  
*Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von

**Elena Ferber**

geboren in

Würzburg

Würzburg, 2019

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: \_\_\_\_\_

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Martin Müller

2. Gutachter: Dr. Rosalia Deeken

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1	Glukosinolat-Myrosinase-System .....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Biosynthese der GS .....	1
1.1.3	Lokalisation der GS und deren hydrolysierenden Enzymen .....	3
1.1.4	GS Reaktion mit Myrosinase: die Senfölglykosid-Bombe .....	4
1.2	Reaktive elektrophile Spezies (RES) .....	6
1.2.1	Definition.....	6
1.2.2	Reaktivität .....	7
1.2.3	Biologische Aktivität von RES .....	10
1.3	Mögliche Mechanismen der RES vermittelten Geninduktion .....	13
1.3.1	Kovalente Bindung von RES an Zielproteine .....	14
1.3.2	Änderung des GSH-Redox-Systems durch RES .....	15
1.4	Das Glutathion Redox-Potential .....	17
1.5	Metabolische Reaktion von <i>Arabidopsis</i> auf RES-Intoxikation .....	21
1.6	Zielsetzung .....	24
2.	Material und Methoden.....	26
2.1	Chemikalien.....	26
2.2	Spezielle Chemikalien .....	26
2.3	Enzyme, Puffer und andere Reagenzien .....	26
2.4	Interne Standards (IS) .....	27
2.5	Laborgeräte .....	27
2.6	Pflanzenanzuchtsmedium (Murashige-Skoog-Medium) .....	28

2.7	Pflanzenmaterial .....	28
2.7.1	Samensterilisation.....	29
2.7.2	Pflanzenanzucht auf Erde .....	29
2.7.3	Pflanzenanzucht in Flüssigmedium.....	29
2.8	Experimentelle Behandlung der Pflanzen.....	30
2.8.1	Chemische Behandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
2.8.2	Bestimmung der Überlebensrate.....	30
2.8.3	Verwundung.....	31
2.9	Molekularbiologische Arbeiten.....	31
2.9.1	RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial .....	31
2.9.2	Quantifizierung der RNA .....	32
2.9.3	DNase-Verdau und RNA-Fällung.....	32
2.9.4	cDNA-Synthese.....	32
2.9.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR .....	33
2.9.6	Microarray-Analyse.....	35
2.10	Analytik.....	36
2.10.1	Extraktionen.....	36
2.10.2	HPLC-Methoden.....	38
2.10.3	Massenspektrometrie (MS) .....	40
2.11	Nachweis der biologischen Aktivität unterschiedlicher Substanzen .....	44
2.11.1	Bestimmung der Expressionsaktivität mittels der <i>Arabidopsis thaliana</i> GST6:: <i>Luc</i> -Reportergenlinie .....	44
2.11.2	Puls-Amplituden-Modulation (PAM) Fluorometrie .....	45
3	Ergebnisse .....	47

3.1	Biologischen Aktivität von Sulforaphan .....	47
3.1.1	Konzentrationsabhängige Induktion der GST6:: <i>Luc</i> -Reportergerlinie durch Isothiocyanate.....	47
3.1.2	Identifikation charakteristischer RES-regulierter Markergene.....	48
3.1.3.	Transkriptionelle Reaktion auf SF, BITC und das Oxylipin PGA <sub>1</sub> .....	51
3.2	Mögliche Mechanismen der RES-vermittelten Genregulation.....	61
3.2.1	Zelluläre Aufnahme und metabolische Wirkung von SF.....	61
3.2.2	Niedrige Konzentrationen an RES ändern das Redox-Potential nicht .....	63
3.2.3	Konzentrationsabhängige Änderung des Redox-Potentials durch RES .....	65
3.2.4	Konzentrationsabhängige Änderung des Redox-Potentials durch Thiol-Reagenzien .....	67
3.2.5	SF- und BITC-induzierte Genregulierung ist keine Folge einer Senkung des GSH-Gehalts .....	71
3.3	Physiologische Bedeutung von SF als Signalmolekül .....	73
3.3.1	Charakterisierung der SF-Induktion durch Verwundung.....	74
3.3.2	Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation.....	78
3.3.3	Bestimmung der Toxizität von SF und BITC .....	81
3.3.4	Chemisches Priming induziert Resistenz gegenüber BITC Intoxikation.....	83
3.3.5	<i>Arabidopsis</i> HSFA1-TF sind wichtig bei der Vorbeugung vor einer Intoxikation mit BITC .....	86
3.3.6	Hitze Priming induziert keine Resistenz gegenüber BITC Intoxikation .....	88
3.4	Metabolische Reaktion auf RES .....	90
3.4.1	Toxische ITC-Konzentrationen führen zu einer spezifischen TAG-Akkumulation in <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen .....	90

3.4.2	TAG-Akkumulation ist keine allgemeine Reaktion auf chemische Intoxikation und unabhängig von der Toxizität der Chemikalien .....	96
4.	Diskussion.....	102
4.1	Biologische Aktivität der ITCs SF und BITC sowie des Oxylipins $PGA_1$ .....	102
4.2	RES-vermittelte Genregulation .....	106
4.3	SF als Signal-Molekül.....	111
4.4	RES als Schutz vor chemischer Intoxikation.....	114
4.5	Beteiligung der HSR bei chemischer Intoxikation.....	115
4.6	Metabolische Reaktion von <i>Arabidopsis</i> bei chemischer Intoxikation.....	117
5.	Zusammenfassung .....	121
6.	Summary .....	123
	Literaturverzeichnis.....	125

## I Abkürzungsverzeichnis

AITC	Allylisothiocyanat
AOI	Englisch: Area of interest
ARE	antioxidant response element
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BITC	Benzylisothiocyanat
bp	Basenpaare
BSO	Buthioninsulfoximin
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0
DA	Diamid
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
DTC	Dithiocarbamat
EPT	Epithionitril
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	Englisch: fold change
FG	Frischgewicht
Fv/Fm	Maximale Quantenausbeute des Photosystems II
fwd	Forward
GS	Glukosinolat
GSH	Reduziertes Glutathion
GSH-EE	Glutathion-Ethylester
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
HNE	4-Hydroxy-Nonenal
HSAB	Englisch: hard and soft acid and base-Theorie
HSF	Hitzeschocktranskriptionsfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HSR	Hitzeschockreaktion
IA	Iodacetamid
IS	Interner Standard
ITC	Isothiocyanat
JA	Jasmonsäure
KOTE	13- Ketoctadecatriensäure
LogP	Lipophilie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MMTS	S-Methylmethanethiosulfonat
MVK	Methylvinylketon
MW	Mittelwert

## Abkürzungsverzeichnis

---

NEM	N-Ethylmaleimid
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Englisch: Polymerase Chain Reaction
PEITC	Phenylisothiocyanat
PGA <sub>1</sub>	Prostaglandin A1
PPA1	Phytoprostan A1
PS II	Photosystem II
PQ	Plastochinon
RES	Reaktive elektrophile Spezies
Rev	Englisch: reverse
ROS	Englisch: Reactive oxygen Spezies (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Englisch: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SF	Sulforaphan
TAG	Triacylglycerol
TF	Transkriptionsfaktor
TU	Thioharnstoff
WS	Wassilewskia



## 1. Einleitung

### 1.1 Glukosinolat-Myrosinase-System

#### 1.1.1 Definition

Glukosinolate (GS) sind Schwefel- und Stickstoff-beinhaltende sekundäre Pflanzenstoffe in Pflanzen aus der Ordnung Brassicales. GS werden von allen Mitgliedern der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae), der unter anderem wichtige Nutzpflanzen wie Raps (*Brassica napus*) und Kohl (*Brassica oleracea*) sowie die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* angehören, gebildet (Halkier and Gershenzon, 2006; Sønderby et al., 2010). Über 130 verschiedene GS sind insgesamt beschrieben (Clarke, 2010; Agerbirk and Olsen, 2012), in Samen und Blättern von *Arabidopsis* Ökotypen sind bisher 34 individuelle GS identifiziert (Clarke, 2010).

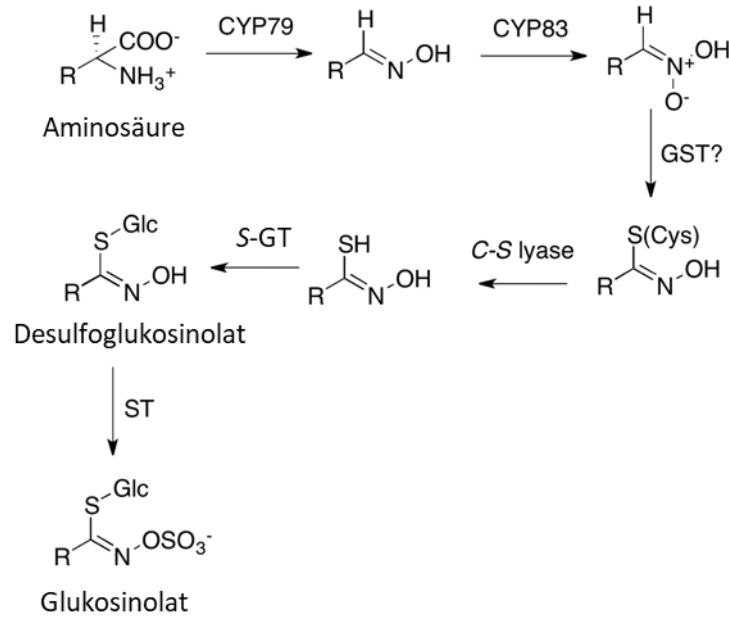
GS und deren abbauendes Enzym, die Myrosinase, werden als Senfölglykosid-Bombe bezeichnet und bilden ein Verteidigungssystem der Pflanze gegen Pathogene und Herbivore (Wittstock and Burow, 2010). GS und v.a. ihre toxischen Hydrolyse-Produkte wie z.B. die Isothiocyanate (ITC), sind bekannt für ihren scharfen/reizenden Geschmack als Verteidigung gegen Herbivore und ihre antimikrobielle Aktivitäten gegen Bakterien und Pilze. Zudem weisen sie nematizide und insektizide Eigenschaften auf (Fahey et al., 2001). Die meisten Hydrolyse-Produkte sind lipophil und flüchtig, wodurch sie über die Gasphase in Zellen über dem geschädigten Pflanzenmaterial eindringen können. Pflanzen setzen die GS bzw. ITCs auch als Allelopathika gegen andere Pflanzen, mit denen sie um Ressourcen wie Wasser, Licht oder Nährstoffe in Konkurrenz stehen, ein (Fahey et al., 2001). Auch ein antikanzerogener Effekt der ITCs wird in einigen Studien diskutiert (Ramirez et al., 2017).

#### 1.1.2 Biosynthese der GS

GS bestehen aus einer  $\beta$ -D-Thioglucose-Gruppe, einem sulfoniertem Aldoxim, und einem Seitenkettenrest. Das Aldoxim sowie der Seitenkettenrest gehen aus proteinogenen Vorläufer-Aminosäuren hervor (Halkier and Gershenzon, 2006). In Brassicales können GS aufgrund dieser Aminosäure-Vorstufe in drei Gruppen klassifiziert werden: aliphatische GS, die sich aus Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Valin ableiten, aromatische GS, die aus Phenylalanin und

Tyrosin entstehen sowie indolische GS, welche sich aus Tryptophan ableiten (Hanschen et al., 2014).

Die GS Biosynthese kann in mehrere Schritte unterteilt werden (Abbildung 1). Zunächst können die Seitenketten der Vorstufenaminoacids durch den Einbau von bis zu neun Methylengruppen verlängert werden (Halkier and Gershenzon, 2006). Anschließend werden die Zwischenprodukte durch N-Hydroxylierung und anschließender Decarboxylierung in die entsprechende Aldoxime umgewandelt. Dieser Prozess wird katalysiert durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP79-Familie) (Wittstock and Halkier, 2000; Fahey et al., 2001). Aldoxime werden durch CYP83 Enzyme oxidiert, wobei eine aci-Nitroverbindung entsteht. Das instabile Produkt wird effektiv an nucleophilen S-Donoren konjugiert. Das entstandene S-Alkylthiohydroximat wird anschließend mittels einer C-S-Lyase zu Thiohydroximinsäure umgewandelt. Die S-Glykosylierung der Thiohydroximinsäure wird anschließend durch eine UDPG:thiohydroximat-Glukosyltransferase (UGT74B1) katalysiert. Es entsteht ein Desulfoglukosinolat (Fahey et al., 2001). Zur Ausbildung des endgültigen Glykosinolats wird das Desulfoglukosinolat sulfoniert. Dies wird durch die lösliche 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat(PAPS):Desulfoglukosinolatsulfotransferase katalysiert (Fahey et al., 2001; Halkier and Gershenzon, 2006; Hanschen et al., 2014). Die große Variantenvielfalt der GS entsteht durch unterschiedliche Modifikationen der Seitenkette oder der Glukose. Eine initiale Oxidation des Schwefelatoms in der Seitenkette von Methionin und deren Homologe mit unterschiedlicher Kettenlänge stellt die Ausgangssubstanz für die Synthese einer großen Familie an Methylsulfinyl- und Methylsulfonyl-GS dar (Fahey et al., 2001). In aromatischen und indolischen GS kann durch Hydroxylierung, Desaturierung und Oxidation die Seitenkette modifiziert werden (Fahey et al., 2001).



**Abbildung 1:** Glukosinolat-Biosynthese.

R: variable Seitenkette, ST: Sulfotransferase, S-GT: S-Glukosyltransferase, GST: Glutathion-S-Transferase  
Verändert nach Halkier und Gershenzon, 2006.

### 1.1.3 Lokalisation der GS und deren hydrolisierenden Enzymen

In der intakten Pflanze sind die GS und das Enzym Myrosinase in zwei unterschiedlich spezialisierten Zellen lokalisiert und somit voneinander getrennt (Shirakawa and Hara-Nishimura, 2018).

Koroleva et al. (2000) konnten durch Schwefel-Messungen in *Arabidopsis thaliana* Zellen identifizieren, welche einen besonders hohen Gehalt an GS aufweisen, sogenannte S-Zellen. Die genaue Lokalisation der GS innerhalb der Zelle ist bislang für *Arabidopsis thaliana* noch nicht geklärt. Nach Studien an *Armoracia rusticana*, *Brassica napus* und *Brassica juncea* scheint die Vakuole als Speicherort der GS in Frage zu kommen (Kissen et al., 2009). In *Arabidopsis thaliana* Pflanzen konnten die S-Zellen zwischen der Endodermis und den Phloem-Zellen der Leitbündel in Blütenstilen (Koroleva et al., 2000) sowie in der Nähe des Phloems in Rosettenblätter (Koroleva et al., 2010) lokalisiert werden. Damit befinden sich diese zum Teil in direktem Kontakt zu den Myrosin-Zellen, welche die Myrosinase beinhalten (Bones et al., 1991; Andreasson et al., 2001; Husebye et al., 2002). Das Enzym Myrosinase (EC 3.2.1.147) ist eine  $\beta$ -

Thioglukosidase mit einer Aminosäure-Sequenz, welche starke Ähnlichkeiten zu der Familie der *O*-Glykosylhydrolasen oder Glykosidasen aufweist (EC 3.2.1-3.2.3) (Rask et al., 2000).

Im Unterschied zu anderen Spezies innerhalb der Brassicaceae existiert in *Arabidopsis thaliana* eine einzige Myrosinase-Gen Familie. Diese beinhaltet insgesamt sechs THIO GLUKOSID GLUKOHYDROLASE-Gene (TGG1-TGG6), wovon vier auch funktional sind (Xu et al., 2004; Halkier and Gershenzon, 2006). Charakteristisch für diese Genfamilie ist ein evolutionär konservierter basischer Rest (Lysin, Arginin oder Glutamin) in der Substratbindungstasche, welcher eine elektrostatische Bindung mit der negativ geladenen Sulfat-Gruppe eines aliphatischen GS ausbilden kann (Nakano et al., 2014). TGG1 und TGG2 werden in den oberirdischen Pflanzenteilen in speziellen Myrosin-Zellen entlang der Blattnervatur im Phloemparenchym (Beekwilder et al., 2008) und in Schließzellen der Stomata (Andreasson et al., 2001) exprimiert. TGG1 und TGG2 sind an der Verteidigung gegen Herbivoren beteiligt (Shirakawa and Hara-Nishimura, 2018). Demgegenüber werden TGG4 und TGG5 speziell in der Wurzelspitze, und TGG3 sowie TGG6 in Pollen exprimiert (Shirakawa and Hara-Nishimura, 2018). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass in Myrosin-Zellen die Myrosinase in hohen Konzentrationen in der Vakuole akkumuliert (Shirakawa and Hara-Nishimura, 2018).

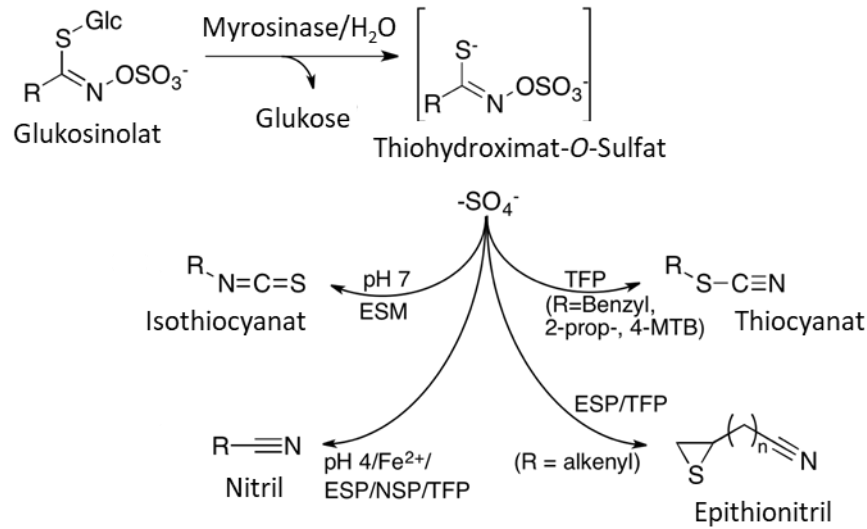
Neben den Thioglukosidglukohydrolase Myrosinasen existieren in *Arabidopsis thaliana* noch zwei weitere atypische Myrosinasen: PENETRATION2 (PEN2) und PYK10 (Bednarek et al., 2009; Nakano et al., 2017). Beide Myrosinasen akkumulieren nicht in speziellen Myrosin-Zellen, sondern in Wurzelzellen (PYK10) bzw. in Blatt-Epidermiszellen (PEN2). Beide Myrosinasen werden auch nicht in der Vakuole sondern in Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert (Matsushima et al., 2003; Lipka et al., 2005). PEN2 hydrolisiert spezifisch indolische GS und ist damit unter anderem an der Abwehr von Pilzen beteiligt, PYK10 hydrolisiert zudem aliphatische GS (Nakano et al., 2017; Stein et al., 2006; Bednarek et al., 2009; Bednarek, 2012).

### **1.1.4 GS Reaktion mit Myrosinase: die Senfölglykosid-Bombe**

GS sind sehr stabile, nicht reaktive Substanzen. Durch Verwundung oder Gewebeverletzung z.B. Quetschen, Frostbeanspruchung oder Mastikation durch Fraßfeinde kommt es durch

Dekompartimentierung zum Kontakt der GS mit der Myrosinase (Fahey et al., 2001). Zwischen GS und Myrosinase findet umgehend eine enzymatische Reaktion statt (Abbildung 2). Die Myrosinase hydrolysiert die thioglukosidische Bindung der GS, was die Abspaltung der  $\beta$ -D-Glukose zur Folge hat. Es entsteht ein instabiles Aglycon, das Thiohydroximat-O-Sulfat bei aliphatischen und aromatischen GS. Dieses Aglycon formt sich anschließend durch Lossen-Umlagerung zu einem ITC um oder zerfällt in andere reaktive Substanzen wie Thiocyanate, Nitrile, Epithionitrile oder Oxazolidine-2-Thione (Fahey et al., 2001; Bones and Rossiter, 2006). Aufgrund der Schnelligkeit, in der die reaktiven Substanzen nach Verlust der Zellintegrität gebildet werden, wird dieses System auch als „Senfölbombe“ bezeichnet.

Welche Hydrolyse Produkte entstehen ist hauptsächlich abhängig von der Seitenkette des GS, aber auch von der Anwesenheit von Proteinen und Cofaktoren sowie der Anwesenheit von Eisenionen und dem pH-Wert (Halkier and Gershenzon, 2006). L-(+)-Ascorbinsäure kann die Myrosinase-Aktivität steigern (bis zu 20-fach bei 1 mM Ascorbinsäure), was zu einer beschleunigten ITC Bildung führen kann (Burmeister et al., 2000; Burow et al., 2006; Wittstock and Burow, 2010). Besonders bei einem für Pflanzen typischen pH-Wert von 5–6 sind in vielen Spezies ITCs die Hydrolyseprodukte, die am häufigsten entstehen (Halkier and Gershenzon, 2006; Hanschen et al., 2018). Nitrile hingegen werden bevorzugt bei sehr niedrigem pH Wert (<4) oder der Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gebildet, falls am Ende der Seitenkette der GS keine Doppelbindung vorhanden ist (Halkier and Gershenzon, 2006). Daneben können unter Mitwirkung von speziellen Proteinen wie dem Epithionitril-spezifisierenden Protein (ESP), dem Thiocyanat-formenden Protein (TFP) oder dem Nitril-spezifisierenden Protein (NSP), auch Thiocyanate, Nitrile oder Epithionitrile (EPT) entstehen (Wittstock and Burow, 2010). Diese Proteine stabilisieren das Aglycon, um eine spontane ITC-Bildung zu verhindern und beeinflussen die Entstehung verschiedener GS-Hydrolyseprodukte ohne dabei selbst eine direkte katalytische Wirkung auf die GS zu haben (Wittstock and Burow, 2010). Die Aktivität von ESPs ist vor allem von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen abhängig (Zabala et al., 2005).



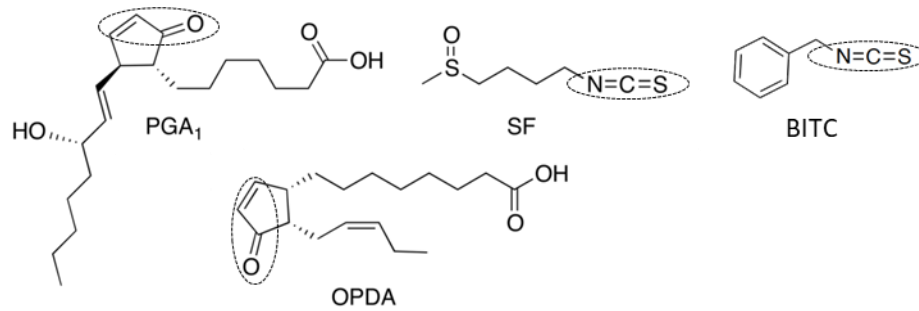
**Abbildung 2:** Enzymatische GS-Hydrolyse und Entstehung möglicher Abbau-Produkte in *Arabidopsis thaliana* nach Dekompartimentierung.

4-MTB: 4-Methylsulfanyl-GS, 2-Prop: 2-Propenyl-GS, ESM: Epithio-spezififizierendes Modifikatorprotein, ESP: Epithionitril-spezififizierendes Protein, R: variable Seitenkette, NSP: Nitril-spezififizierendes Protein, TFP: Thiocyanat-formendes Protein. Verändert nach Hanschen et al., 2018.

## 1.2 Reaktive elektrophile Spezies (RES)

### 1.2.1 Definition

Wie bereits erwähnt, sind besonders die nach Hydrolyse der GS entstandenen ITCs sehr reaktiv. Sulforaphan (SF) und Benzylisothiocyanat (BITC) verfügen in der ITC-Gruppe (-N=C=S) über ein sehr reaktives elektrophiles Kohlenstoff-Atom und gehören zu der Gruppe der reaktiven elektrophilen Spezies (RES). Verbindungen, die zu dieser Gruppe gehören, können Elektronen akzeptieren und somit spontan mit nukleophilen Gruppen oder Atomen wie Schwefel- oder Stickstoffatomen reagieren. Neben den ITC existieren in Pflanzen noch weitere RES wie z.B. bestimmte Oxylipine. Dies sind Substanzen, welche durch Lipidoxidation gebildet werden und eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe besitzen (Mueller and Berger, 2009). Beispiele hierfür ist 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA), das an der pflanzlichen Stressantwort beteiligt ist (Stintzi et al., 2001). Neben OPDA weisen auch sowohl einige pflanzliche Phytoprostane wie das Phytoprostan A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>) als auch ihrer tierischen Analogon wie die Prostaglandine (zB. Prostaglandin A<sub>1</sub>; PGA<sub>1</sub>) eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe auf (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Strukturformeln verschiedener RES mit ITC-Verbindungen (BITC, SF) sowie  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen (OPDA, PGA<sub>1</sub>). Die elektrophilen Gruppen sind mit gestrichelten Linien umrandet.

### 1.2.2 Reaktivität

Die Reaktivität der Oxylipine und der ITCs wird durch die elektrophile Gruppe beeinflusst. Es wurde beobachtet, dass unterschiedliche Elektrophile mit unterschiedlichen Nucleophilen reagieren (Ayers et al., 2006). Die Reaktion hierbei kann mit dem „hard/soft acid/base“ (harte und weiche Säuren und Basen, kurz HSAB)-Prinzip beschrieben werden, sofern die Stärke der Säure und der Base vergleichbar sind (Mueller and Berger, 2009; Ayers et al., 2006). Im Allgemeinen bevorzugen hierbei harte Elektrophile auch harte Nucleophile und weiche Elektrophile weiche Nucleophile. Harte Spezies haben einen kleinen Atomradius, eine hohe Elektronegativität und eine niedrige Polarisierbarkeit. Im Vergleich dazu sind weiche Spezies größer und besitzen eine geringere Elektronegativität. RES mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe zählen zu den weichen Spezies und reagieren bevorzugt mit weichen nucleophilen Spezies wie beispielsweise in der Thiol-Gruppe der Aminosäure Cystein (Mueller and Berger, 2009). Die Konjugation an Proteine erfolgt durch eine Michael-Addition wobei eine irreversible kovalente Bindung entsteht (Dueckershoff et al., 2008; Mueller and Berger, 2009). Für das RES-Oxylipin 4-Hydroxy-Nonenal (HNE) konnte gezeigt werden, dass die Addition von HNE an Proteine über Michael Addition an Cystein-, Histidin- oder Lysin-Reste erfolgt (Jacobs and Marnett, 2010). Zusätzlich wurde beobachtet, dass HNE mit Lysin eine Schiff'sche Base ausbilden kann, welche anschließend durch eine Ringschluss- und Dehydrierungsreaktion ein stabiles Pyrol-Addukt formt. Dies geschieht jedoch im Vergleich zur Michael-Addukt-Bildung quantitativ betrachtet weitaus weniger (Jacobs and Marnett, 2010). Für RES-Oxylipine konnte

gezeigt werden, dass die kovalente Konjugation an Proteine unter physiologischen Bedingungen nahezu irreversibel ist (Stamatakis and Pérez-Sala, 2006).

ITCs verfügen ein sehr reaktives elektrophiles Kohlenstoff-Atom, welches leicht mit Nucleophilen (Elektronen-Donoren) reagieren kann. Die in Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen enthaltenen Amino-, Thiol- oder Hydroxylgruppen können als solche Elektronen-Donoren fungieren (Abbildung 4) (Hanschen et al., 2014).

Da ITCs im wässrigen Milieu gebildet werden, ist einer der Hauptreaktionspartner von ITCs unter neutralen oder alkalischen Bedingungen Wasser. Diese Reaktion wird durch hohe Temperaturen sowie alkalischen pH-Werten begünstigt (Hanschen et al., 2014). Die Addition eines Hydroxylions ( $R-O^-$ ) oder von Wasser an die ITC-Verbindung von aliphatischen ITCs sowie einigen aromatischen-ITCs wie BITC oder 3-Methoxybenzyl-ITC führt zur Bildung von *O*-Thiocarbamatsäure (Hanschen et al., 2014). Diese zerfällt weiter in Amine und Carbonylsulfid, welches anschließend durch eine weitere Addition an Wasser zu Dihydrogensulfid und Kohlenstoffdioxid abgebaut wird (Hanschen et al., 2014). Die entstandenen Amine können ihrerseits wiederum mit der ITC-Verbindung reagieren (Nakamura et al., 2017). Die sehr instabilen Indol-ITCs und einige *ortho*- oder *para*-hydroxylierte BITCs bilden hingegen bei der Reaktion mit Wasser einen Alkohol und Thiocyanat (Hanschen et al., 2014). Auf Grund der strukturellen Vielfalt der ITCs existieren vermutlich noch weitere Abbaumöglichkeiten der ITC-Verbindungen unter wässrigen Bedingungen (Hanschen et al., 2014).

Neben Hydroxyl-Gruppen stellen Aminogruppen ( $R-NH_2$ ) von Aminosäuren einen weiteren nucleophilen Substituenten für ITC-Verbindungen in Zellen dar: es entsteht Thioharnstoff (Thiourea, TU). Die Additionsreaktion bedarf mindestens eines neutralen pH-Werts und verläuft langsamer als die Reaktion mit Thiolgruppen. Allerdings sind die entstandenen Addukte stabiler (Hanschen et al., 2014).

Die Konjugation von ITC an Thiolgruppen ( $R-SH$ ) von Cystein oder reduziertem Glutathion (GSH) erfolgt relativ schnell und kann auch unter sauren Bedingungen stattfinden. Die Bindung kann entweder direkt oder über eine Thiol-Austausch-Reaktion erfolgen. Hierbei entsteht ein Dithiocarbamat (DTC). Cystein-Addukte sind weniger stabil als Addukte mit GSH (Hanschen et



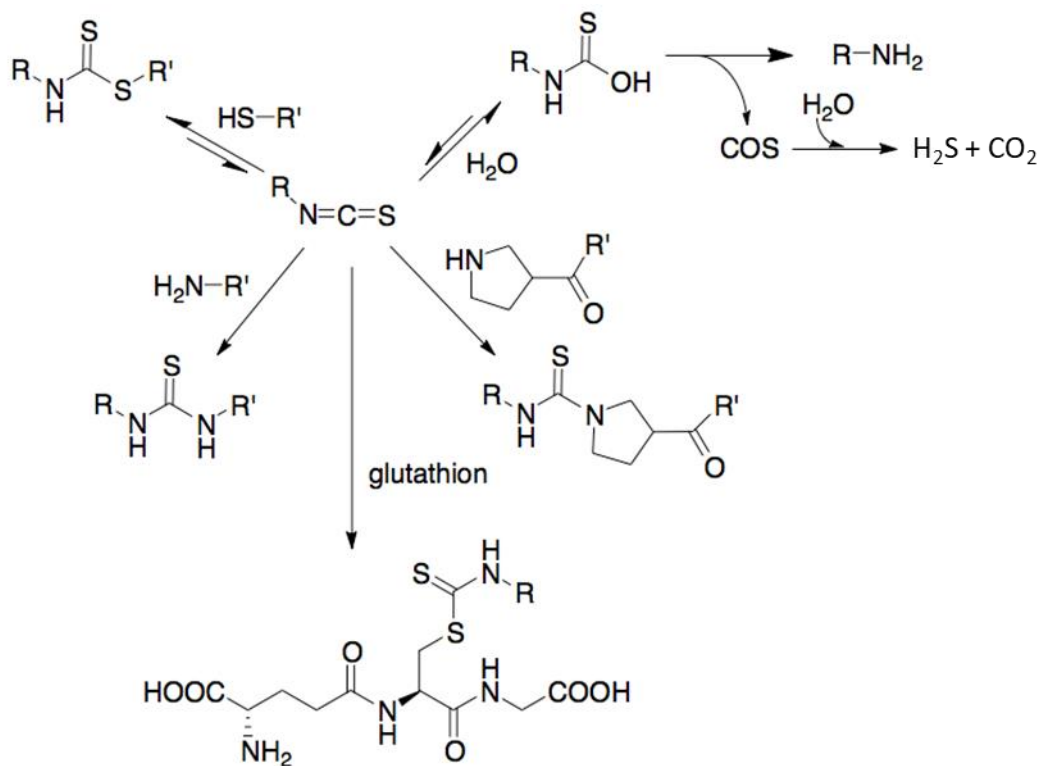
al., 2014). GSH ist in Zellen das abundanteste Molekül (1–10 mM) mit einer Thiolgruppe (Nakamura et al., 2017). Die kovalente Konjugation von ITCs an GSH ist eine bevorzugte Reaktion in Zellen, um diese vor DNA-Modifikationen und RES-Zytotoxizität zu schützen (Mueller and Berger, 2009; Nakamura et al., 2017). Die Bildung eines DTC kann zudem durch die enzymatische Aktivität von Glutathion-S-Transferasen (GST) beschleunigt werden. Die enzymatische als auch nicht-enzymatische Addition an GSH ist eine reversible Reaktion. Die Rückreaktion erfolgt unter Anwesenheit von Aminoverbindungen oder anderer Thiole, welche stabilere DTC bilden können. DTC zerfällt dann entweder unter Basenhydrolyse wieder in ITC und in die entsprechende Aminosäure, oder es erfolgt eine Reaktion mit Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass ITCs in Proteinen Aminogruppen wie die  $\alpha$ -Aminogruppe in N-terminalen Resten,  $\epsilon$ -Aminogruppe in Lysinseitenketten oder sekundäre Aminogruppen wie in N-terminalen Prolin irreversibel modifizieren können (Hanschen et al., 2014).

Neben der Addition an freie Thiole, können ITC-Verbindungen auch die Disulfidbindung von oxidiertem Glutathion, dem Glutathiondisulfid (GSSG), oder Cystein oxidativ spalten. Dabei entsteht ein DTC und eine Sulfen (Hanschen et al., 2014).

Generell gilt für die Reaktivität von ITC-Verbindungen, dass die Reaktionsrate zur DTC-Bildung deutlich höher ( $10^3$ – $10^4$ -fach) ist als die für die TU-Bildung mit Aminen in Proteinen oder der Reaktion mit Wasser (Hanschen et al., 2014; Nakamura et al., 2017). Die Reaktivität gegenüber Hydroxylgruppen ist im Vergleich zu Thiol- und Aminogruppen am geringsten (Hanschen et al., 2014).

Der Mechanismus der nicht-enzymatischen Thiolmodifikation von Proteinen ist höchst selektiv. Die gebundenen RES stehen im Gleichgewicht mit freien RES (Nakamura et al., 2017). Auf welcher Seite sich das Reaktionsgleichgewicht befindet ist abhängig von den chemischen Eigenschaften sowohl der Thiolgruppe und als auch der RES. So spielt der pKs-Wert der Amino- oder Thiolgruppe eine Rolle. Eine hoher pH-Wert führt zu einer höheren Basizität, welche die Reaktion mit ITC begünstigt (Hanschen et al., 2014). Weiche RES bevorzugen zum Beispiel die Konjugation an das Thiolat-Anion ( $R-S^-$ ) vor der Reaktion mit dem Thiol ( $R-SH$ ) (Mueller and Berger, 2009). Ein weiterer wichtiger physikochemischer Parameter ist die Lipophilie (gemessen

als LogP) des RES. Diese beeinflusst die Interaktion von RES mit den Zielproteinen positiv und bewirkt, dass RES an die hydrophobe Bindetasche des Proteins gelangen und somit binden können (Mueller and Berger, 2009). Die chemischen Eigenschaften der ITC-Moleküle werden auch durch die jeweilige Seitenkette bestimmt. So führt eine geringere Größe, welche Einfluss auf die sterische Hinderung des RES nimmt, und eine geringere Elektronendichte am Kohlenstoff-Atom der elektrophilen Gruppe zu einer höheren Reaktivität der RES (Mueller and Berger, 2009; Hanschen et al., 2014; Nakamura et al., 2017).



**Abbildung 4:** Reaktionen zwischen ITC und nukleophilen Gruppen mit Wasser, Thiolen, primären Aminen, sekundären Aminen (Prolin) oder Glutathion zur Bildung von Monothiocarbamat, DTCs, TUs und GSH-Addukte. Abbildung verändert nach Nakamura et al., 2018.

### 1.2.3 Biologische Aktivität von RES

Die biologische Aktivität von ITCs wurde bisher in vielerlei Experimenten in tierischen Modellen und epidemiologischen Studien untersucht, wobei der Fokus häufig auf der möglichen therapeutischen Wirkung von ITC beim Menschen lag. Bei unterschiedlichen Krebsarten zeigen ITCs in Studien mit Nagetieren ein hohes Präventionspotential und bei epidemiologischen

Studien antikanzerogene Effekte (Zhang, 2004) sowie entzündungshemmende Eigenschaften (Nakamura et al., 2017). Das Isothiocyanat Sulforaphan (SF), das abundant in Brokkoli vorkommt und über die Ernährung aufgenommen werden kann, war hierbei häufig Gegenstand der Forschung. Für SF konnte gezeigt werden, dass es die Formierung und Entwicklung von Krebs auf mehreren Wegen inhibieren könnte. So führt SF zur Induktion detoxifizierender Enzymen sowie dem programmierten Zelltod, inhibiert die Zellteilung, reduziert die Angiogenese, hemmt Entzündungsprozesse und die Tumorprogression (Bertl et al., 2006; Myzak and Dashwood, 2006; Juge et al., 2007; Nakamura et al., 2017).

Daneben liegen Studien vor, die Zytotoxizität, Wachstumsinhibition oder die abschreckende Wirkung von GS/ITC in Beziehung auf Pflanzenschädlinge wie Säugetiere, Vögel, Insekten, Schnecken, Bakterien, Pilzen und Nematoden zeigen (Halkier and Gershenzon, 2006). Im Vergleich dazu ist bisher wenig bekannt zu der biologischen Aktivität und Wirkung von ITCs auf pflanzliche Zellen (Bones et al., 2015). Es ist bekannt, dass ITCs als Allelochemikale fungieren können und bei Sulfat-Speicherung, Wassertransport, Hitzetoleranz, Regulation der Stomata, Apoptose, Wachstumsinhibition und Signaltransduktionsmechanismen involviert sind (Bones et al., 2015).

Eine Besonderheit von RES ist, dass sie in hohen Konzentrationen (Substanz-abhängig > 50–100  $\mu\text{M}$ ) generell toxisch und mutagen für Zellen sind, in niedrigen Konzentrationen (Substanz-abhängig 1–100  $\mu\text{M}$ ) Gene induzieren können (Vollenweider et al., 2000; Mueller and Berger, 2009).

In den Blättern von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 ist Glucoraphanin das abundanteste GS (Kliebenstein, 2001; Brown et al., 2003). Auf der Suche nach einer Zelltod-induzierenden Substanz konnten Andersson et al. (2015) dessen Hydrolyse-Produkt, SF, identifizieren. Die Infiltration von *Arabidopsis*-Blättern mit dem avirulenten Stamm *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 führte zu einer Akkumulation von 180 nmol/g FG an SF 12 Stunden nach der Behandlung (Andersson et al., 2015). Da dieser Wert ein über das gesamte Blatt gemittelter Wert ist, ist die Konzentration von SF lokal am Ort der Interaktion mit dem Pathogen vermutlich deutlich höher. Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass SF ab einer Konzentration von

0,5 mM zu deutlich sichtbarem Zelltod in den infiltrierten Blättern führt. Zudem konnte ab 100  $\mu$ M ein signifikanter Elektrolytverlust verzeichnet werden. Dies zeigte sich auch bei weiteren ITCs wie Benzyl-ITC und Butyl-ITC mit unterschiedlicher Wirkungsstärke (Andersson et al., 2015). Eine 24 stündige Vorbehandlung mit SF bewirkte einen Schutz gegen das virulente Pilzisolat *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa Cala2). Die Autoren diskutieren, dass SF möglicherweise eine Funktion bei der Regulation von Abwehrgenen spielt (Andersson et al., 2015).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen (10–100 mM) an Allyl-ITC (AITC), Phenyl-ITC (PEITC) und Methyl-ITC (appliziert durch Spraytechnik als Wasseremulsion) herbizide Wirkungen besitzen (Hara et al., 2010). So konnte eine Inhibition des Pflanzenwachstums und Ausbleichen der Rosettenblätter, welches durch Elektrolytaustritt und Generierung von Wasserstoffperoxid begleitet wurde, beobachtet werden (Hara et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass eine niedrige ITC-Dosis von 0,1 mM eine Akkumulation verschiedener GST Transkripte in *Arabidopsis* fördert (Hara et al., 2010). PEITC stellte sich zudem als möglicher Verstärker der Hitzetoleranz heraus. Pflanzen, die ein oder zwei Tage vor einem Hitzestress (55 °C, eine Stunde) mit 1 mM oder 2 mM PEITC behandelt wurden, zeigten eine verminderte Wachstumsinhibition als die chemisch unbehandelte Kontrollgruppe (Hara et al., 2013). Auch für AITC und Methyl-ITC konnte ein verbessertes Wachstum nach Hitzestress gezeigt werden (Hara et al., 2013). Genexpressionsanalysen an Vertretern der HSP70-Familie, welche mit der Ausbildung einer erhöhten Hitzetoleranz in *Arabidopsis thaliana* in Zusammenhang gebracht werden kann (Lee and Schöffl, 1996), zeigten eine erhöhte Akkumulation an Transkripten nach Behandlung mit 2 mM PEITC (Hara et al., 2013). Für AITC konnte gezeigt werden, dass es zur Schließung der Stomata führt. Dieser Effekt wird begleitet von einer extrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), intrazellulär kommt es zur Akkumulation von ROS sowie einer oszillierenden zytosolischen Kalzium-Konzentration in *Arabidopsis thaliana* (Khokon et al., 2011; Hossain et al., 2013). Eine genomweite Transkriptionsanalyse von *Arabidopsis* nach exogener Behandlung mit AITC zeigte eine Regulation einer Vielzahl an Genen, welche insbesondere in Prozesse bei multiplen Stressen involviert sind. So wurden Gene, welche bei der Antwort auf Hitzestress und oxidativen Stress

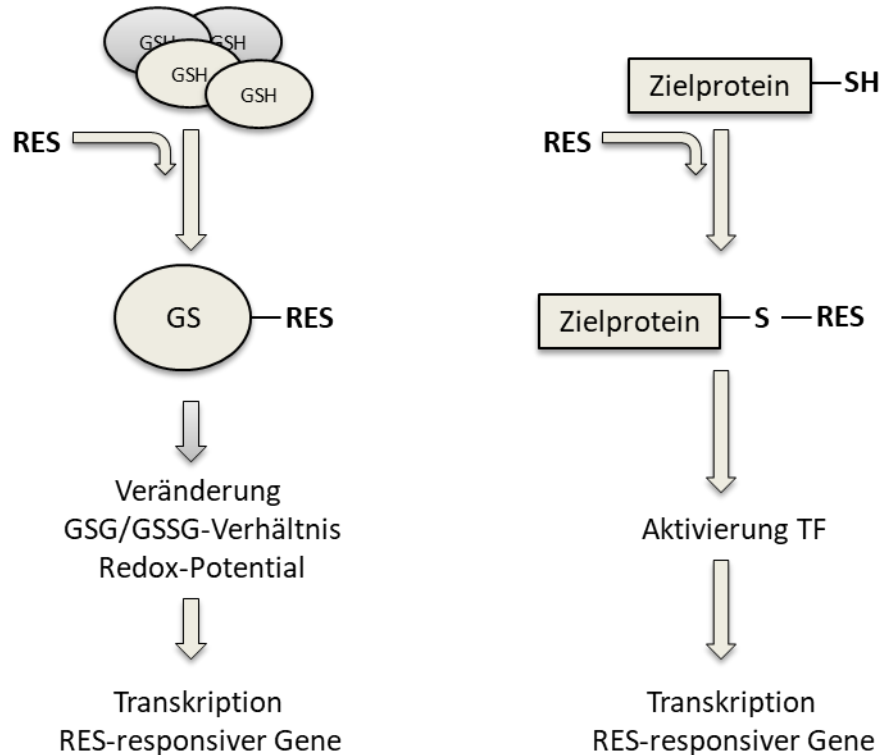
beteiligt sind, induziert. Weiter wurden Gene signifikant reguliert, welche in der Erkennung von Elicitoren, des pflanzlichen Abwehrsystems als auch Zelltodmechanismen involviert sind. Zudem konnten Gene identifiziert werden, welche im Glukosinolat-Metabolismus, bei der Sulfat-Aufnahme sowie -Assimilation involviert sind (Kissen et al., 2016).

Untersuchungen zur biologischen Aktivität verschiedener RES-Oxylipinen zeigten eine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, Pilze und Oomyceten, inhibierende Effekte auf das Wurzelwachstum und die Progression des Zellzyklus sowie eine Schädigung des Photosystems II (PSII). Einiger dieser Wirkungen sind allerdings nicht RES-Oxylipin spezifisch. So konnte mitunter auch bei Jasmonsäure (JA), welches nicht zu der Gruppe der RES gehört, ein hemmender Effekt auf das Wurzelwachstums und den Zellzyklus beobachtet werden (Mueller and Berger, 2009). Transkriptomstudien mit Methylvinylketon (MVK), Malondialdehyd, cis-Jasmon, PPA<sub>1</sub> sowie OPDA zeigten einer Regulation an Genen, welche hauptsächlich zwei Gruppen zugeordnet werden können: Detoxifizierung und thermaler Stress (Farmer and Mueller, 2013). Bei *Arabidopsis thaliana* führte eine externe Gabe von OPDA oder PPA<sub>1</sub> zu einer Induktion von verschiedenen Genfamilien involviert in Detoxifizierungsprozesse wie Cytochrom P450 (CYP), GST, UDP-Glukosyltransferasen, Oxidoreductasen sowie verschiedener ABC-Transporter (Mueller et al., 2008). Zudem zeigte sich auch eine gemeinsame Regulierung von Hitzeschockgenen wie beispielsweise dem Gen, welches für das Hitzeschockprotein (HSP) HSP101 codiert (Mueller et al., 2008). HSP101 stellt eines der kritischen HSPs zum Aufbau einer Thermotoleranz dar (Queitsch, 2000). Yamauchi et al. (2015) konnten für die RES-Oxylipine Hexenal und (E)-2-Butenal ebenfalls einen Effekt auf die Hitzeschockreaktion (HSR) zeigen. So führten die Behandlungen mit den oben genannten RES-Oxylipinen zu einer Induktion des Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF) HSFA2 und des dehydration-responsive element-binding proteins A2 (DREB2A) (Yamauchi et al., 2015).

### **1.3 Mögliche Mechanismen der RES vermittelten Geninduktion**

Es ist auffällig, dass strukturell sehr verschiedene RES einen ähnlichen Satz an Genen induzieren. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung nicht über einen klassischen Liganden-Rezeptor-Komplex, sondern über eine Muster-spezifische Erkennung von RES erfolgt (Mueller and Berger, 2009). Für die RES-vermittelte Geninduktion wird in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf zwei

mögliche Mechanismen gelegt: Regulierung der Aktivität bestimmter Zielproteine durch kovalente Bindung von RES und Änderung des zellulären Redox-Potentials durch Depletion von GSH durch RES (Abbildung 5) (Farmer and Mueller, 2013).



**Abbildung 5:** Mögliche Mechanismen der RES-vermittelten Geninduktion.

Regulierung der Geninduktion über Bindung der RES an GSH (links), Regulierung der Geninduktion über Bindung der RES an Zielproteine (rechts).

### 1.3.1 Kovalente Bindung von RES an Zielproteine

Entsprechend der ersten Hypothese vermitteln RES ihre Wirkung durch kovalente Bindung an Zielproteine, die direkt (über Bindung an Transkriptionsfaktoren; TF) oder indirekt (über Bindung an hemmende oder aktivierende Regulatorproteine) die Transkription beeinflussen. Dieser Mechanismus ist in Tieren sehr gut belegt. Als Reaktion auf RES oder bei oxidativen Stress spielt das Nrf2-Keap1-System eine große Rolle in der Induktion unterschiedlichster protektiver Gene (Nakamura et al., 2017). Keap1 („Kelch-like ECH-associated protein 1“) ist mit Nrf2 („nuclear factor-erythroid 2-related factor 2“) im Zytosol assoziiert und sorgt für dessen Ubiquitinierung und dem anschließenden proteosomalen Abbau. Binden nun RES an die Thiol-Gruppe im Cysteinrest von Keap1, kann dieses Nrf2 nicht mehr kontrollieren und es erfolgt eine

Translokation und Akkumulation von Nrf2 im Zellkern. Dies führt anschließend zur Genaktivierung durch Bindung mit weiteren TF, den Maf-Proteinen, an das Antioxidant Response Element (ARE), welches ein DNA-Element in der Promotorregion verschiedener Phase II-Detoxifizierungsenzyme darstellt (Farmer and Davoine, 2007). Für einige ITC wie SF, BITC und PEITC konnte mit Hilfe von Säugetierzellkultur-Studien bereits gezeigt werden, dass sie die Nrf2-vermittelte Genexpression aktivieren können (Nakamura et al., 2017).

Allerdings sind bisher zu Nrf2 Proteinen keine Homologen in Pflanzen bekannt (Farmer and Davoine, 2007). Bei *Arabidopsis thaliana* konnte eine hohe Abundanz zwischen TGA-Motiven (TGACG) speziell in den Promotoren von PPA<sub>1</sub>-induzierten Genen gezeigt werden (Mueller et al. 2008). In Pflanzen spielt insbesondere die Klasse II der TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2, TGA5 und TGA6) eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Xenobiotika (Farmer and Mueller, 2013). Bislang ist allerdings noch nicht bekannt, wie diese Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Eine kovalente Modifikation von Proteinen durch RES-Oxylipine scheint hierbei ein möglicher Mechanismus der Signaltransduktion zu sein (Mueller and Berger, 2009). RES-Oxylipine führen wie bereits erwähnt zur Induktion der HSR. Allerdings erfolgt die Induktion der hitzeresponsiven Gene unabhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren (Mueller et al., 2008). Der genaue Mechanismus der HSP-Regulation ist bisher ebenfalls noch nicht bekannt.

### **1.3.2 Änderung des GSH-Redox-Systems durch RES**

Entsprechend der zweiten Hypothese, vermitteln RES ihre Wirkung indirekt über die Depletion von Reduktionsmittel wie beispielsweise durch die Bindung an GSH, was eine Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichts von einem reduzierten zu einem mehr oxidierten Zustand zur Folge hat (Andersson et al., 2006; Farmer and Davoine, 2007; Valgimigli and Iori, 2009). Eine niedrige zelluläre Konzentration an GSH führt zu einer Aktivierung von Genen, welche in Stresstoleranz, Abwehr und Zell-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* involviert sind (Ball et al., 2004). Einige dieser Gene werden auch durch RES induziert (Mueller and Berger, 2009).

Das Tripeptid Glutathion, bestehend aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, ist der bedeutendste Metabolit in pflanzlichen Zellen mit vielfältigen Funktionen. Er wird in zwei aufeinanderfolgenden Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Schritten synthetisiert, wobei der

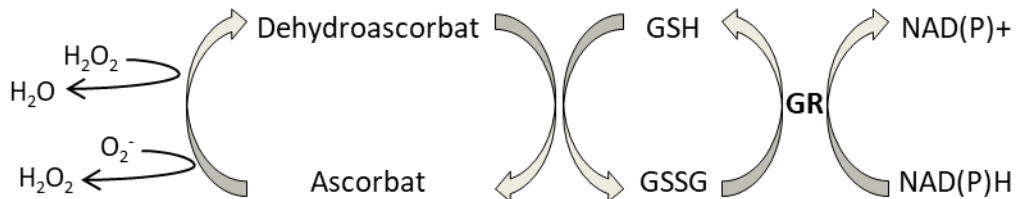
erste Schritt in der Biosynthese in den Plastiden stattfindet und der zweite vermutlich hauptsächlich im Zytosol (Noctor et al., 2012). Zunächst wird aus Glutaminsäure und Cystein katalysiert durch die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase (GSH1, EC 6.3.2.2) L-Glutamincystein gebildet. Anschließend wird daran mit Hilfe der Glutathionsynthetase (GSH2, EC 6.3.2.3), welche durch alternatives Splicing sowohl in den Plastiden als auch im Zytosol vorliegt, Glycin addiert (Noctor et al., 2012). Knockout-Mutanten von *GSH1* sind embryoletal, von *GSH2* letal auf Keimlingsebene (Noctor et al., 2012).

Als eines der wichtigsten Antioxidantien der Zellen hält GSH als Bestandteil des Redox-Puffers die Redox-Homöostase aufrecht. Zudem ist es in Detoxifizierungsprozessen und einigen fundamentalen zellulären Prozessen involviert (Noctor et al., 2012). So spielt es eine Rolle bei Wachstum- und Entwicklungsprozessen wie der Embryo- und Meristementwicklung, im Zellzyklus, sowie bei der pflanzlichen Reaktion auf abiotische und biotische Stresssituationen. Hierbei ist es in der Biosynthese von Phytochelatinen involviert, welche bei Reaktion auf Cadmium und andere Schwermetalle gebildet werden, sowie von pflanzlichen Abwehrstoffen wie GS und Camalexin (Noctor et al., 2012). Die Besonderheit von Glutathion ist die reversible Thiol-Disulfid-Interaktion der Thiolgruppe am Cystein. GSH kann hierüber mit einem weiteren GSH oder mit einem anderen Thiol wie beispielsweise von endogenen oder xenobiotischen RES oxidiert werden (Noctor et al., 2011). Die kovalente Addition von GSH an RES kann wie bereits unter 1.2.2 erwähnt chemisch oder durch Katalyse von GSTs erfolgen (Noctor et al., 2012). Die entstandenen GS-Konjugate und Disulfide können im weiteren Verlauf durch Multidrug Resistance-Related Proteine (MRP) in die Vakuole transportiert werden. Die Akkumulation von Glutathiondisulfid (GSSG) in der Vakuole scheint ein physiologisch wichtiger Teil bei der Antwort auf oxidativen Stress zu sein (Queval et al., 2011). GSSG kann zudem in einem NADPH-abhängigen Schritt von der Glutathion-Reduktase (GR, EC 1.8.1.7) wieder in die reduzierte Form zurückgeführt werden (Noctor et al., 2012). Von GR existieren zwei Isoformen, welche von zwei Genen (*GR1* und *GR2*) kodiert werden. *GR1* ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert, *GR2* sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien (Diaz-Vivancos et al., 2015). Mittels GR können die Zellen ein Redoxgleichgewicht zwischen GSH und GSSG einstellen, wobei unter optimalen Bedingungen der Glutathionpool mit über 90 % in der reduzierten Form vorliegt (Mullineaux



and Rausch, 2005; Noctor et al., 2012). Das gemessene Verhältnis von GSH zu GSSG liegt in Blättern von *Arabidopsis thaliana* bei mindestens 20:1 unter Berücksichtigung, dass einzelne zelluläre Kompartimente unterschiedliche GSH Konzentrationen aufweisen (Noctor et al., 2012). Durch Berechnungen aus Immunlokalisationsstudien an *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen konnte eine endogene Konzentration an GSH von 1–6 mM in Plastiden, dem Zytosol und Mitochondrien bestimmt werden (Queval et al., 2011). Mitochondrien zeigten hierbei den größten Gehalt an GSH mit 6,3 mM. Die Vakuole weist den niedrigsten Gehalt an GSH mit 0,03 mM auf. Sie dient hauptsächlich als Kompartiment für Speicherung und Degradierung von GSH-Konjugaten (Meyer and Hell, 2005). Alle anderen Kompartimente können einen funktionalen Glutathion Redox-Puffer bilden (Meyer and Hell, 2005).

In der Zelle fungiert Glutathion zudem als Barriere gegenüber ROS wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und anderen Peroxiden. So kann es zum einen direkt vor  $H_2O_2$  schützen, zum anderen wirkt es indirekt über den Glutathion-Ascorbat-Zyklus (Abbildung 6). Hierin sorgt es chemisch oder mittels Dehydroascorbat-Reductase (DHAR) für einen reduzierten Ascorbat-Pool (Foyer and Noctor, 2011).



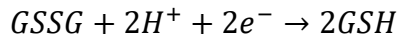
**Abbildung 6:** Glutathion-Ascorbat-Redox-Zyklus

#### 1.4 Das Glutathion Redox-Potential

Zum Schutz vor reaktiven Spezies haben Zellen Systeme entwickelt, unkontrollierte Oxidationsprozesse zu puffern und bereits oxidierte Proteine wieder zu reduzieren. Für Zellen ist es somit von Vorteil das innere Zellmilieu in einem reduzierten Status zu erhalten. Glutathion stellt den wichtigsten Bestandteile eines komplexen Redox-Puffer-System dar (Meyer and Hell, 2005). In Studien mit diversen Stressbedingungen wie Salzstress, Trockenstress oder UV-B-Bestrahlung zeigte sich, dass der zelluläre Glutathion Redox-Status die Schwere der

Stresssituation widerspiegelte (Potters et al., 2010). Das Redox-Potential stellt eine Messgröße dar, welche Auskunft über das Oxidations- und Reduktionsverhalten eines Redox-Paares gibt. Je negativer das Redox-Potential, desto stärker ist die Reduktionskraft.

Die Halbzellenreaktion für Glutathion lautet:



Somit ergibt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung für das Glutathion-Redox-Potential ( $E_{GSSG/2GSH}$ ) folgende Gleichung:

$$E_{GSSG/2GSH} = E^{0, pH} - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right)$$

$E^{0, pH}$  Standardelektrodenpotential

R Gaskonstante ( $8,31447 \text{ C}\cdot\text{V}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )

T Absolute Temperatur (298 K)

F Faraday-Konstante ( $96485,34 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

n Anzahl der übertragenen Elektronen

Durch Zusammenfassen der Naturkonstanten und dem Umrechnungsfaktor für den natürlichen zum dekadischen Logarithmus sowie dem Einsetzen der Standardbedingungen (pH=7 und 25 °C) und einem Standardelektrodenpotential für Glutathion von – 240 mV, vereinfacht sich die Redox-Potential-Gleichung für GSH/GSSG auf:

$$E_{GSSG/2GSH} = -240 \text{ mV} - \left( \frac{59,1 \text{ mV}}{2} \right) \log \left( \frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right)$$

Die exakte Bestimmung des Redox-Potentials *in vivo* stellt sich als schwierig heraus. Ratiometrische Messungen *in vivo* im Zytosol von *Arabidopsis* Wurzelzellen mittels redox-sensitiven grün fluoreszierenden Proteinen (roGFPs) ergab Werte für das Redox-Potential niedriger als – 300 mV (Meyer et al., 2007; Jubany-Mari et al., 2010; Schnaubelt et al., 2015). Die Interaktion und Anwesenheit von Thioredoxin (TRX)-Systemen und verschiedenen Typen an Glutaredoxinen (GRX) mit Glutathion bzw. den roGFP lassen noch Zweifel zu, ob diese *in vivo*

Messungen wirklich nur das Glutathion-Redox-Potential wieder geben (Foyer and Noctor, 2011). Dagegen ergaben Messungen des GSH:GSSG Verhältnisses in Gewebeextrakten von *Arabidopsis thaliana* deutlich höhere Werte für das Redox-Potential (ca. – 200 mV) (Foyer and Noctor, 2011; Diaz-Vivancos et al., 2015). Die Problematik bei dieser Technik ist jedoch, dass zum einen über mehrere heterogene Zelltypen, welche physiologisch unterschiedliche sein können und dementsprechend unterschiedliche Konzentrationen an Glutathion beinhalten können, eines Gewebes gemittelt wird (Meyer and Hell, 2005). Zum anderen kann nicht berücksichtigt werden, dass der größte Teil des gemessenen GSSG nicht im Zytosol vorliegt, sondern kontinuierlich in die Vakuole transportiert wird, um das zytosolische Redox-Potential zu stabilisieren. Des Weiteren kann eine Oxidation von GSH während der Extraktion nicht ausgeschlossen werden (Diaz-Vivancos et al., 2015).

Wie man an der Redox-Potential-Gleichung für GSH/GSSG erkennen kann (siehe oben), ist das Redox-Potential sowohl von dem Verhältnis GSH:GSSG als auch von der absoluten Konzentration von Glutathion ( $[GSH] + 2[GSSG]$ ) abhängig (Meyer and Hell, 2005). Da die Konzentration von GSH im Quadrat in die Gleichung eingeht, sind es nicht nur Redox-Prozesse, sondern auch Biosynthese und Katabolismusprozesse, die das Redox-Potential kontrollieren (Potters et al., 2010). Eine alleinige Änderung des GSH-Gehalts bei gleichbleibendem GSH:GSSG Verhältnisses ist ausreichend für einen Einfluss auf das zelluläre Redox-Potential und kann möglicherweise redox-sensitive Regulatoren beeinflussen (Schafer and Buettner, 2001; Noctor et al., 2002; Meyer et al., 2007). So wird die TRX-regulierte Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase bei einer Verlagerung des Redox-Potentials (von – 350 mV auf – 300 mV) von einem nahezu inaktiven in einen aktiven Zustand umgewandelt (Noctor et al., 2012).

Seit einiger Zeit ist für *Arabidopsis* bekannt, dass eine niedrige GSH-Verfügbarkeit in einer erhöhten Expression von Genen resultiert, welche in Stresstoleranz, Abwehr und Signaltransduktion involviert sind (Ball et al., 2004). Koprivova et al. (2010) konnten diese Ergebnisse bestätigen. Sie zeigten eine differenzielle Regulation von 99 Genen in Keimlingen, welche mit dem GSH-Synthese-Inhibitor Buthioninsulfoximin (BSO) behandelt wurden, (Koprivova et al., 2010). Dabei konnte kein spezifischer Prozess oder Stoffwechselweg ausgemacht werden, allerdings waren Prozesse in der Antwort auf unterschiedliche

Stressbedingungen sowie der Auxinsynthese bzw. -transport überrepräsentiert (Koprivova et al., 2010).

Schnaubelt et al. (2015) führten eine Transkriptomanalyse mit niedrigen GSH-Gehalten durch. Hierzu verglichen sie das Transkriptom von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Col-0) mit dem der GSH-defizitären *root meristemless 1-1 (rml1-1)* Mutante. Diese Mutante hat einen Defekt in dem ersten Enzym der GSH-Biosynthese (GSH1) (Vernoux et al., 2000) und weist lediglich 2–5 % des GSH-Gehalts von Wildtyp-Pflanzen auf (Diaz-Vivancos et al., 2015; Schnaubelt et al., 2015). In sieben Tage alten *rml1-1* Keimlingen waren 799 Transkripten mehr als zweifach induziert und 650 Transkripte mehr als zweifach reprimiert. Viele der in der *rml1-1* Mutante aktivierten Gene kodieren für TF und Proteine, welche in Metabolismus, Protein-Umsatz, Stress-Antwort, Transport sowie Signaltransduktion involviert sind. Weiterhin zeigte sich in der *rml1-1* Mutante eine unterschiedliche Expression von Genen, die an Zellteilung sowie Auxin-abhängigen Prozessen beteiligt sind. Niedrige GSH-Spiegel scheinen somit negative Effekte auf das hormonell gesteuerte Pflanzenwachstum und die pflanzliche Entwicklung zu haben (Schnaubelt et al., 2015).

Ein Vergleich des Transkriptoms von *rml1-1* mit einer anderen GSH-defizitären Mutante zeigte wenig Übereinstimmung. Die CATALASE2-Mutante (*cat2*) weist niedrige GSH-Spiegel durch einen Defekt in dem Entgiftungsvorgang von  $H_2O_2$  auf. Von den 454 differenziell regulierten Genen in *cat2*, waren lediglich 122 Gene mit *rml1-1* gemeinsam reguliert. Darunter waren einige TF, UDP-Glukosyltransferasen sowie GSTs (Queval and Foyer, 2012). Im Vergleich dazu wurden HSP-Transkripte wie HSP70 oder AtHSP90.1 in der in *cat2* induziert und in der *rml1-1* Mutante reprimiert (Queval and Foyer, 2012; Schnaubelt et al., 2015). Die BSO-Behandlung führte zu keiner Regulation dieser Gene (Koprivova et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen *rml1-1* und *cat2* liegen in der fehlenden Veränderung des GSH:GSSG-Verhältnisses in *rml1-1*. *Cat2* hingegen akkumuliert unter photorespiratorischen Bedingungen anstelle von GSH GSSG (Queval et al., 2007).

Es ist bekannt, dass eine BSO-Behandlung zu einer starken Oxidation des Zytosols führt (Meyer et al., 2007). Zudem zeigte eine Behandlung von zehn Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen mit

1 mM BSO eine nahezu vollständige Depletion des GSH-Pools sowie ein Anstieg des Redox-Potentials auf  $-260$  mV (Schnaubelt et al., 2015). Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, haben zudem strukturell unterschiedliche RES die Fähigkeit kovalent an GSH zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass SF und AITC in einer konzentrationsabhängigen Weise zu einer Depletion des zellulären GSH-Pool führen (Øverby et al., 2015; Andersson et al., 2015). Andersson et al. (2015) konnten nach Inkubation mit SF zudem eine Erhöhung des GSH/GSSG Redox-Potential verzeichnen. Øverby et al. (2015) folgerten, dass eine reversible Depletion des Glutathion-Pools, neben der Induktion oxidativen Stresses und erhöhter GST-Genexpression, ein Teil der physiologischen Antwort der Pflanze auf exogene AITC-Gabe sein kann. Eine Änderung des Redox-Potentials als Folge von GSH-Depletion wird für SF als ein potentieller Wirkmechanismus in Pflanzenzellen sowie in Säugetierzellen diskutiert (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015).

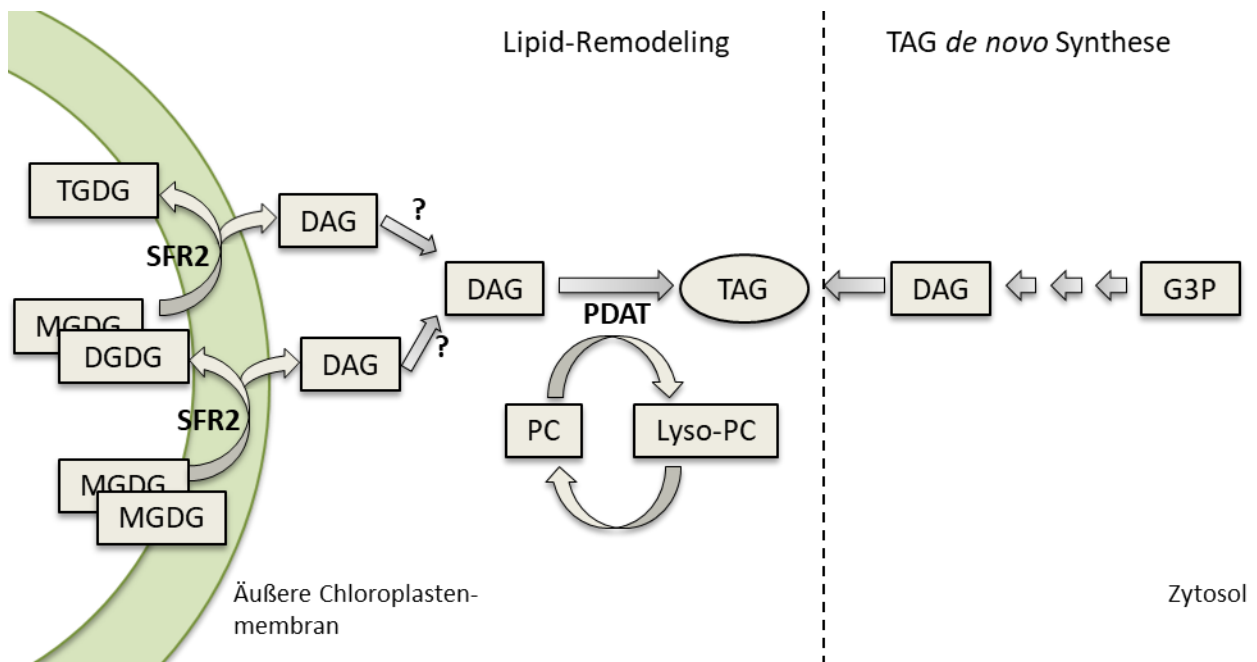
### **1.5 Metabolische Reaktion von *Arabidopsis* auf RES-Intoxikation**

RES sind in hohen Konzentrationen generell toxisch und mutagen für pflanzliche Zellen (Mueller and Berger, 2009). Zudem haben einige RES eine schädigende Wirkung auf das Photosystem II (PSII) (Alméras et al., 2003; Berger et al., 2007). Für OPDA, Acrolein, 13-Ketooctadecatriensäure (KOTE), MVK und einige weitere RES mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe konnte in *Arabidopsis*-Blätter nach Infiltration mit einer Konzentrationen von je  $20 \mu\text{mol/l}$  eine extreme Reduzierung der maximalen Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) des PS II gezeigt werden (Alméras et al., 2003). Im Allgemeinen sind Chloroplasten die empfindlichsten pflanzlichen Organellen unter oxidativen Stressbedingungen. Die innere Chloroplasten- sowie die Thylakoidmembran bestehen hauptsächlich aus den Galactolipiden Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) (Block et al., 1983). Neben ihrem beachtlichen Anteil von ca. 80 % innerhalb der Chloroplastenmembran sind sie Bestandteile der Photosysteme I und II. MGDG ist zudem im Cytochrom-b6f-Komplex vorhanden. Es konnte bestätigt werden, dass diese Galactolipide für diverse Prozesse in der Photosynthesereaktion von elementarer Bedeutung sind (Li and Yu, 2018). Chloroplastidäre MGDGs und DGDGs bestehen aus einem Diacylglycerol (DAG) mit einer ungesättigten C18-Fettsäure an der sn2 Position und einer ungesättigten C18 oder C16 Fettsäure an der sn1 Position. Als Kopfgruppe sind an der sn3 Position eine oder zwei

Galaktose-Gruppen gebunden. Unter verschiedenen Stressbedingungen sind die mehrfach ungesättigten C18- und C16-Fettsäuren wie Linolensäure (C18:3, Anzahl Kohlenstoffatome:Anzahl *cis* Doppelbindungen) ein häufiger Angriffspunkt von enzymatischen oder nicht-enzymatischen Oxidationen und fungieren als Substrat für die Generierung von Oxylipinen wie OPDA (Li and Yu, 2018). OPDA kann entweder in den Chloroplasten mit MGDG zu sogenannten Arabidopsiden verestern oder aus den Chloroplasten exportiert werden. Der exakte katabolische Prozess des MGDG Umsatzes unter Stressbedingungen ist noch nicht bekannt, da die Lipase, welche Fettsäuren freisetzt, weiterhin unbekannt ist (Li and Yu, 2018).

Eine Änderung der Lipidkomposition mit einer Akkumulation an Triacylglycerolen (TAG) ist ein Phänomen, was bereits bei Hitzestress, Exposition gegenüber Ozon, Trockenstress und Stickstoff-Mangel beobachtet wurde (Sakaki et al., 1990; Gaude et al., 2007; Mueller et al., 2015). TAG-Verbindungen bestehen aus drei Fettsäuren verestert an ein Glycerin Rückgrat. Sie bilden aufgrund unterschiedlicher Kettenlänge und Grad der Saturierung eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften (Yen et al., 2008). Bei der *de novo* Synthese erfolgt eine schrittweise Acylierung der Ausgangssubstanz Glycerol-3-Phosphat (G3P) im ER (Chapman and Ohlrogge, 2012). In Untersuchungen der metabolischen Reaktion von *Arabidopsis*-Keimlingen auf Hitzestress konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich C18:3 und C16:3 Fettsäuren in TAG akkumulieren. Diese Lipid-Komposition deutet auf einen chloroplastidären Ursprung und MGDGs als Fettsäure-Spender hin (Mueller et al., 2017). Neben der *de novo* Synthese, dem sogenannten Kennedy-Weg (Dennis and Kennedy, 1972), wurde im Jahr 2000 bei Studien mit Hefen und Pflanzen ein weiterer TAG-Syntheseweg identifiziert (Dahlqvist et al., 2000). Unter Stressbedingungen können die TAG-Vorläufermoleküle DAG als Nebenprodukt der Aktivität des membranständigen Enzyms SENSITIVE TO FREEZING 2 (SFR2) entstehen, welches die Übertragung einer Galactosegruppe von einem MGDG auf ein weiteres Galactolipid katalysiert (Moellering et al., 2010). Das Enzym PHOSPHOLIPID:DIACYLGLYCEROL-ACYLTRANSFERASE (PDAT) katalysiert anschließend die Übertragung einer Fettsäure auf die sn3 Position in DAGs. Diese Fettsäure stammt aus dem Phosphatidylcholin (PC)-Pool (Dahlqvist et al., 2000). Es entsteht ein TAG und als Nebenprodukt ein Lyso-PC, welches über eine Acyltransferase wieder zu PC regeneriert werden kann (Dahlqvist et al., 2000; Banaś et al., 2000;

Xu et al., 2012). Die verschiedenen TAG-Synthesewege sind in Abbildung 7 dargestellt. In *Arabidopsis* wurden sechs PDAT-like-Gene identifiziert, welche PDAT Enzyme kodieren, wobei PDAT1 die meiste Aktivität zeigte (Chapman and Ohlrogge, 2012). In Analysen der T-DNA-Insertionsmutante *pdat1* konnten unter Normalbedingungen deutlich reduzierte TAG Levels (57 % des Wildtyp-Gehalts) gemessen werden (Fan et al., 2013b). Weiterhin zeigten *pdat1* Keimlinge eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber freien Fettsäuren (Fan et al., 2013a).



**Abbildung 7:** Modell verschiedener TAG-Synthese Wege. Abbildung verändert nach Müller, 2017.

In hohen Konzentrationen wirken freien Fettsäuren und andere Lipid-Intermediate toxisch auf Zellen und können zum Tod der Zelle führen. Untersuchungen in Hefen und tierischen Zellen weisen darauf hin, dass eine TAG Akkumulation eine große Rolle beim Abfangen freier Fettsäuren in Lipid-Tröpfchen spielt und so vor Lipotoxizität schützen kann (Zhang et al., 2003; Listenberger et al., 2003; Ducharme and Bickel, 2008; Kohlwein, 2010). Fan et al. (2013a) folgerten, dass auch in *Arabidopsis* eine intakte TAG Synthese Zellen vor einem Zelltod, welcher durch eine Überladung von freien Fettsäuren induziert wird, schützen kann.

Neben ihrer Beteiligung am Membran-Umbau sowie dem Schutz vor freien toxischen Fettsäuren, haben TAGs noch weitere Funktionen. So fungieren sie in den meisten Organismen als Speichermolekül für Fettsäuren sowie als hochkonzentrierte Kohlenstoff- und Energiespeicher. *Arabidopsis* Samen bestehen zu ca. 35 % des Gesamtgewichts aus TAGs (Li-Beisson et al., 2013).

### 1.6 Zielsetzung

Reaktive elektrophile Spezies liegen unter basalen Bedingungen in sehr geringen Konzentrationen in den Zellen vor. Eine Gewebsverletzung wie Verwundung führt in *Arabidopsis thaliana* lokal zur Generierung sehr hoher Konzentrationen an ITC (Andersson et al., 2015). Da ITCs lipophil und membrangängig sind, kann sich die ITC-Konzentration mit zunehmendem Abstand vom Ort des Schadens durch Diffusion in das umliegende Gewebe verdünnen. Während RES in hohen Konzentrationen toxisch für Zellen sind, kann bei niedrigeren Konzentrationen (Substanzabhängig 1–100  $\mu\text{M}$ ) eine Induktion von Genen in der Wirtspflanze beobachtet werden (Vollenweider et al., 2000; Mueller and Berger, 2009). Diese Gene sind hauptsächlich an zwei Prozessen beteiligt: Hitzeschock und Entgiftungsvorgängen (Farmer and Mueller, 2013).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob eine RES-vermittelte Geninduktion für die Pflanze eine protektive Wirkung vor weiteren Stressstimuli hat. Als möglichen Mechanismus zur Regulation von RES-induzierten Markergenen wurden in der vorliegenden Arbeit die Hypothese der kovalenten Bindung von RES an Zielproteine und die Hypothese der Veränderung des zellulären Redox-Potentials durch kovalente Modifikation von GSH, wie es von Andersson et al. (2015) für SF postuliert wird, diskutiert.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher:

1. Identifizierung charakteristischer RES-induzierter bzw. reprimierter Markergene.  
Dazu sollten Transkriptomanalysen nach Zugabe verschiedener RES wie SF, BITC und  $\text{PGA}_1$  durchgeführt und mit publizierten Transkriptomanalysen verglichen werden.



### 2. Identifizierung des RES-Signaltransduktionsmechanismus.

Dazu sollte zunächst geklärt werden, inwieweit abhängig von der Konzentration an RES das GSH/GSSG Gleichgewicht sowie das Redox-Potential verschoben werden und ob mögliche Änderungen mit Geninduktionen korrelieren. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die publizierten GSH/GSSG-abhängigen Redox-Markergene auch durch SF reguliert werden.

### 3. Aufklärung der physiologischen Bedeutung von SF als Signalmolekül.

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden ob nach Stress relevante SF-Konzentrationen erreicht werden und inwieweit die SF-induzierte Genregulation zur Re-programmierung der Genexpression nach Stress beiträgt. Dazu sollten zunächst endogene SF-Konzentrationen nach Verwundungsstress bestimmt werden. Der Nachweis über eine Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation sollte mit Hilfe von SF-Biosynthesemutanten geführt werden. Zudem sollten Hinweise erhalten werden, ob RES vor chemischer Intoxikation schützen können.

### 4. Untersuchung endogener Mechanismen der Wirtspflanze zum Schutz vor Selbst-Intoxikation.

Dazu sollen durch die Analyse des Lipidmetabolismus und dabei insbesondere des TAG-Akkumulation Hinweise auf einen möglichen Membran-Lipid-Remodeling-Prozess nach Intoxikation mit toxischen RES-Konzentrationen erhalten werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die Chemikalien und die Lösemittel, die unter 2.2. nicht aufgelistet sind, wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) oder Roth (Karlsruhe).

### 2.2 Spezielle Chemikalien

Benzyl-Isothiocyanat (BITC)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Butylhydroxytoluol (BHT)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dicamba	Syngenta Agro GmbH, Maintal, DE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Diuron (DCMU)	Fluka, Neu-Ulm, DE
Gamborg B5-Vitamine	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, NL
Glycogen	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Glyphosat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Metribuzin	Bayer AG, Leverkusen, DE
Murashige&Skoog (MS) Salze	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, NL
myo-Inositol	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Nuklease-freies Wasser (R0582)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
S-Methylmethanethiosulfonate (MMTS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
cis-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA)	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
Prostaglandin A <sub>1</sub> (PGA <sub>1</sub> )	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Phyto Agar	Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, NL
Radicicol	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA

### 2.3 Enzyme, Puffer und andere Reagenzien

Absolute™ qPCR SYBR® Green Capillary Mix	Thermo Scientific, Schwerte, DE
DNase I Amplification Grade	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Set	Thermo Scientific, Schwerte, DE

M-MLV Reverse Transkriptase RNase H(-)	Promega GmbH, Mannheim, DE
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, DE
NucleoSpin®RNA	Macherey-Nagel, Düren, DE
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE

### 2.4 Interne Standards (IS)

BITC-GSH (100 µM, gelöst in 90 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure)	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
D <sub>8</sub> -DL-Sulforaphan (10 µM, gelöst in 90 % MeOH)	Lipidox, Stockholm, SWE
Glutathion-Ethylester (GSH-EE) (500 µM, gelöst in H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1; v:v))	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Sinigrin (10 mM, gelöst in 59 % MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TAG 30:0 (10:0–10:0–10:0) (0,1 mg/ml, gelöst in CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (4:1:0,1; v:v:v))	Merck KGaA, Darmstadt, DE

### 2.5 Laborgeräte

Autoklav Systec-VE-150	Systec GmbH, Linden, DE
Agarose-Gel Dokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Binder-Wachstumsschrank (KBW 240)	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
CFX Connect™ real-time System	Bio-Rad Laboratories Inc., München, DE
Chemilumineszenzkamera/ VisiLuxx Imager	Visitron Systems GmbH, Puchheim, DE
Thermo Stat plus Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Imaging-Pam <i>M-Series</i> MAXI Version	Heinz Walz GmbH, Effeltrich, DE
Pflanzenwachstumsschrank AR66L	Percival Scientific, Inc., Perry, Iowa, USA
Kreisschüttler 3015 (ca. 100 U/min)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbB, Burgwedel, DE
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
pH-Meter inoLab pH 7110	WTW GmbH, Weilheim, DE

Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach, DE
Rotations-Vakuum-Konzentrator 2-18	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, DE
Schwingmühle MM400	Retsch GmbH, Haan, DE
Spektrophotometer Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, DE
XPE205-Analysewaage	Mettler-Toledo AG, Greifensee, CHE

### 2.6 Pflanzenanzuchtsmedium (Murashige-Skoog-Medium)

	3 %-iges Zuckermedium	Zuckerfreies Medium
MS-Salze (incl. MES)	4,8 g/l	4,8 g/l
B5-Vitamine	1 ml/l	1 ml/l
Myo-Inositol	0,2 g/l	0,1 g/l
Saccharose	30 g/l	-
pH (eingestellt mit KOH)	5.7 +/- 0.3	5.7 +/- 0.3

Die Medien wurde jeweils bei einer Temperatur von 121° C und einem Druck von 2 bar autoklaviert.

### 2.7 Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyp Columbia 0 (Col-0) verwendet. Die verwendeten Mutanten-Linien haben Col-0 als Hintergrund. *Hsfa1abde* hat zudem Wassilewskia (WS) als Hintergrund. Die transgenen *Arabidopsis*-Linien mit deren Bezugsquelle sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Transgene *Arabidopsis*-Linien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Referenz</b>
<i>cyp79b2cyp79b3</i>	Dr. Tamara Gigolashvili (Lehrstuhl für Botanik, Universität Köln)
GST6:: <i>Luc</i>	Karam B. Sinh (Centre for Environmental and Life Sciences, Australia)
<i>hsfa1abde</i>	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Tokio, Japan (Yoshida et al., 2011)
<i>myb28myb29</i>	Dr. Tamara Gigolashvili (Lehrstuhl für Botanik, Universität Köln)
<i>myb28myb29cyp79b2cyp79b3</i>	Dr. Tamara Gigolashvili (Lehrstuhl für Botanik, Universität Köln)
<i>tgg1tgg2</i>	Dr. George Jander (Boyce Thompson Institut, Universität Cornell)

### **2.7.1 Samensterilisation**

Zur Sterilisation der Samen wurden diese in einem 1,5-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (75 %) für 2 Minuten inkubiert. Nach Abnahme des Alkohols wurden die Samen mit 700 µl 1,5 %-iger (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung, die mit 0,1 % Tween versetzt war, für 10 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Samen 5 Mal mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen.

### **2.7.2 Pflanzenanzucht auf Erde**

Für die Pflanzenanzucht auf Erde wurden Samen direkt auf Standardanzuchterde ausgesät und nach 11 Tagen pikiert. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer mit Kurztagbedingungen (22 °C, 8 Stunden Licht) mit einer Lichtintensität von 80 µE.

### **2.7.3 Pflanzenanzucht in Flüssigmedium**

Zur Pflanzenanzucht in Flüssigmedium wurden jeweils 10 sterile Samen in einem Loch der 24-Lochplatte der Firma Nunc™, gefüllt mit 1 ml sterilem MS-Medium mit 3 % Zucker (siehe Material und Methoden 2.6), kultiviert. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Samen

zunächst für 2–3 Tage bei 4 °C stratifiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung bei 22 °C bei einer Belichtungszeit von acht Stunden und Belichtungsstärke von 80  $\mu\text{E}$  in einem Klimaschrank der Firma Percival auf einer Schüttelplatte (100 U/min). Nach sieben Tagen wurde das Medium steril gegen frisches MS-Flüssigmedium ausgetauscht. Bei Experimenten zur Bestimmung der Photosynthese-Effizienz und der Überlebensrate wurden die Keimlinge am Tag sieben auf MS-Medium ohne Zucker umgestellt.

### **2.8 Experimentelle Behandlung der Pflanzen**

#### **2.8.1 Chemische Behandlung von *Arabidopsis thaliana***

Für die chemische Behandlung wurden zehn Tage alte Keimlinge verwendet, die in MS-Flüssigmedium mit 3 % Zucker angezogen wurden. Die Behandlung erfolgte in 500  $\mu\text{l}$  frischen MS-Medium (mit 3 % Zucker oder ohne Zucker), das mit der zu testenden Chemikalie in entsprechender Konzentration versetzt war. Um toxische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen, wurde eine Endkonzentration des Lösungsmittels von 2 % (v/v) nicht überschritten. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Keimlinge auf einem Zellstofftuch abgetupft und in 2 ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

Für Experimente zum chemischen Priming wurden die Keimlinge einen Tag vor der Behandlung mit toxischen BITC-Konzentrationen in 500  $\mu\text{l}$  zuckerfreiem MS-Medium und den zu untersuchenden Chemikalien behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen Medium mit der toxischen Behandlung ausgetauscht. Für Experimente zum Hitze-Priming inkubierten die Keimlinge in 1 ml zuckerfreiem MS-Medium zunächst für zwei Stunden bei 37 °C in einem Binder Wärmeschrank und anschließend für weitere zwei Stunden bei 22 °C. Danach wurden die Keimlinge wie oben beschrieben für zwei Stunden chemisch behandelt.

#### **2.8.2 Bestimmung der Überlebensrate**

Zur Quantifizierung der Überlebensrate wurden die Keimlinge nach der Behandlung für weitere sieben Tage im Klimaschrank unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Überlebensrate durch Auszählen bestimmt. Keimlinge galten als „lebend“, wenn sie

weitere Blätter ausgebildet hatten. Als „tot“ wurden Keimlinge klassifiziert, wenn die Folgeblätter ausgebleichen waren und kein weiteres Wachstum stattfand.

### **2.8.3 Verwundung**

Die Verwundung erfolgte nur an wohl entwickelte Rosettenblätter von 6–7 Wochen alten Pflanzen. Hierfür wurde mit einer Pinzette je einmal längs die Mittelrippe des Rosettenblattes durch Quetschung verwundet. Nach festgelegten Zeitpunkten wurden je 6 Blätter abgeschnitten, in Alufolie eingepackt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

## **2.9 Molekularbiologische Arbeiten**

### **2.9.1 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial**

Zur Isolierung der RNA wurden Keimlinge (ca. 100 mg), welche nach der Ernte in einem 2 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und mit flüssigen Stickstoff eingefroren wurden, für 2 Minuten bei 20 Hz mit einer Zirkoniumoxid-Kugel in der Kugelmühle homogenisiert. Pflanzenmaterial von Erdpflanzen wurde manuell homogenisiert und ca. 100 mg in ein 2 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß eingewogen. Anschließend wurde 1 ml Trizol hinzugegeben, die Probe gut durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 4 °C, 14000 rpm) wurde die wässrige Phase in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt, um die RNA auszufällen. Hierfür wurde die Probe 15 Sekunden geschüttelt und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (15 Minuten, 4 °C, 14000 rpm) und der Überstand verworfen. Die pelletierte RNA wurde mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 14000 rpm). Der Waschschrift wurde mit 500 µl 70 % Ethanol wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. RNA-Proben, welche zur Microarray-Analyse vorbereitet wurden, wurden in 35 µl Nuclease-freiem Wasser gelöst.

### 2.9.2 Quantifizierung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem UV/Vis-Spektralphotometer bestimmt. 40 ng RNA in einen Mikroliter Lösung weisen eine optische Dichte (OD) von 1 auf. Die Konzentration der RNA ( $c_{\text{RNA}}$ ) lässt sich anschließend durch folgende Formel berechnen:

$$c_{\text{RNA}} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) = E_{260} * 40 \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)$$

### 2.9.3 DNase-Verdau und RNA-Fällung

Die Entfernung störender DNA in der Probe erfolgte durch eine DNase I Restriktion. Dazu wurde zu 1 µg Gesamt-RNA 1 µl 10 x DNase-Puffer, 1 µl DNase und 8 µl DEPC-Wasser zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Danach wurde die Probe mit 90 µl DEPC-Wasser versetzt. Durch Zugabe von 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 10 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl gekühltem Isopropanol wurde die RNA über Nacht bei – 20 °C gefällt.

### 2.9.4 cDNA-Synthese

Nach Reinigung und Fällung der RNA wurde diese zentrifugiert (15 Minuten, 4 °C, 14000 rpm), um anschließend das entstandene Pellet 2 Mal mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol zu waschen (15 Minuten, 4 °C, 14000 rpm). Die Überstände wurden verworfen, die RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 7 µl DEPC-Wasser aufgenommen und auf Eis gekühlt. Zur cDNA-Synthese wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß zu der gelösten RNA 2 µl 5 x M-MLVxRT Reaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs und 0,4 µl 100 mM Oligo dT-Primer hinzugegeben und der Ansatz für 2 Minuten auf 65 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden je 0,4 µl Reverse-Transkriptase hinzugegeben. Die Ansätze inkubierten eine Stunde bei 42 °C. Die Denaturierung der Reverse-Transkriptase erfolgte anschließend durch eine 15-minütige Hitzebehandlung bei 70 °C.



### 2.9.5 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR stellt eine sensitive Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren dar. Die Detektion und Quantifizierung der DNA in Echtzeit erfolgt durch Fluoreszenzmessung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green. Dieser lagert sich während der PCR-Reaktion in die doppelsträngige DNA ein. Die Quantifizierung wird möglich, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der Amplifikate zunimmt. Mit Hilfe dieser Kinetik kann anschließend die eingesetzte Menge an DNA bestimmt werden. Bei der Verwendung von SYBR-Green handelt es sich um eine Methode mit hoher Sensitivität und geringer Spezifität, daher sollte zusätzlich die Spezifität durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR untersucht werden.

Zur Quantifizierung der Genprodukte wurde cDNA als Matrize verwendet. Je 2 µl cDNA wurden dazu in 20-facher Verdünnung in eine 96-Lochplatte mit je 10 µl SYBR-Green Mix und je 8 µl des Primermix (siehe Tabelle 2) versetzt. Zur relativen Quantifizierung wurde das externe Referenzgen AKTIN2/8 gemessen. Die quantitative *real-time* PCR wurde im RealPlex Mastercycler (Eppendorf) mit dem SYBR Green Mix (Thermo) mit dem Amplifizierungsprogramm in Tabelle 3 und den Primern in Tabelle 4 durchgeführt.

**Tabelle 2:** Reaktionsansatz quantitativer *real-time* PCR

cDNA	2 µl
SYBR-Green Mix	10 µl
Primer-Mix:	8 µL
Primer forward (100 µM gelöst in HPLC-grade-H <sub>2</sub> O)	4 µl (Endkonzentration 1,5 µM)
Primer reverse (100 µM gelöst in HPLC-grade-H <sub>2</sub> O)	4 µl (Endkonzentration 1,5 µM)
HPLC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

---

**Tabelle 3:** Amplifizierungsprogramm

Initiale Denaturierung	15 min		
Denaturierung	15 sek	95 °C	45 Zyklen
Primerhybridisierung	20 sek	58 °C	
Polymerisation	20 sek	72 °C	
Finale Polymerisation	10 sek	95 °C	
Finale Denaturierung	5 sek	65–95 °C	
Kühlung	∞	10 °C	

**Tabelle 4:** Primer zur Amplifikation der cDNA mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (fwd= forward, rev= reverse)

Gen	Amplifikat [bp]	Primersequenz: (5`→3`)
<i>CYP81D11</i> (AT3G28740)	343	fwd ATTGCCGAGGTAGTTGT rev TTGCCTTTCGTAATACT
<i>GST6</i> (AT2G47730)	273	fwd CTCGGTGGGAAAAGTTTAG rev AACATTAAGTGACAGAAC
<i>GSTU25</i> (AT1G17180)	233	for ACATCGACGAAGTTTGGCCT rev CTCCCCAAATCAACCTCGCT
<i>HSP101</i> (AT1G74310)	287	for TGAGCTAGCTGTGAATGCAG rev TCAACTGGTCAACAGCCAAA
<i>TOLB</i> (AT4G01870)	282	for CAACAGACTCTATTTTCATC rev CGCTCGCAGATAACCACTC
<i>HSP26-5</i> (AT1G52560)	175	for GTGAAAGAGGTTTGGTCGG rev TGTTACGCCAGAGGCTTTTT
<i>HSFA2</i> (AT2G26150)	121	for CAGCAAGGATCTGGGATGTC rev GCTGTTGCCTCAACCTAACT
<i>HSP17.6II</i> (AT5G12020)	102	for AAGTCCCCGAAGACCACAAC rev CGATGACGTCAGCAGGTGTA

### 2.9.6 Microarray-Analyse

Zur Probenahme für die Hybridisierung wurden je zwei Löcher einer 24-Lochplatte mit jeweils 10 zehn Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge, welche zuvor für vier Stunden in MS-Medium mit 3 % Zucker versetzt mit 100 µM SF, 100 µM BITC oder 75 µM PGA<sub>1</sub> behandelt wurden, in einem 2 ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäß vereinigt und mit flüssigen Stickstoff eingefroren. Pro Behandlung wurden insgesamt drei unabhängige Replikate hergestellt. Nach manueller Homogenisierung wurden ca. 80–100 mg zur RNA Isolation (wie unter 2.9.1 beschrieben)

entnommen. Die isolierte RNA wurde in 60 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und anschließend durch das NucleoSpin®RNA-Kit von Macherey-Nagel auf aufgereinigt. Hierbei wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

Am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Erlangen erfolgte die Transkriptom-Analyse. Hierfür wurden Agilent 4x44K *Arabidopsis* V4 (Design-Nr. 021169) Microarray-Chip (<http://www.agilent.com>) verwendet. Die RNA-Qualität wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Chip Kit in einem Agilent 2100 Bioanalyzer (vB.02.03.BSI307) untersucht. Die RNA-Quantität wurde mit einem ND-100 Spektrophotometer (v3.3.0) bestimmt. Für die Cy3 cDNA Markierung wurden 200 ng RNA verwendet. Die Markierung und Aufbereitung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem One-Color Microarray-basiertem Genexpression-Analyse Protokoll, welches das One-Color RNA-Spike-in Kit (v5.0.1, 2006; Agilent Technologies, Santa Clara) beinhaltet. Die Hybridisierung auf die Microarray-Chips erfolgte bei 65 °C für 17 Stunden. Die Microarray-Chips wurden anschließend mit dem Agilent Microarray Scanner im „extended Dynamic range“-Modus (XDR) bei einer Hochauflösung von 5 µm erfasst. Zuletzt wurden die Daten unter Verwendung der „feature extraction“-Software (v11.5.1.1; Agilent Technologies) mittels eines Standard-Protokolls (GE1\_1105\_Oct1) extrahiert.

Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg. Für die Datenvorbereitung wurde die open Source Software „Bioconductor“ verwendet (Huber et al., 2015). Die Normalisierung der Rohdaten erfolgte mittels des R-Paket „Limma“ (Bioconductor). Differenziell exprimierte Gene wurden ebenfalls mittels dieses Paktes selektiert. P-Werte wurden durch die „false discovery rate“ (FDR) korrigiert (Benjamini, Y. and Hochberg, Y., 1995).

## **2.10 Analytik**

### **2.10.1 Extraktionen**

#### **2.10.1.1 Extraktion von SF und SF-GSH**

Zur Extraktion von SF sowie SF-GSH wurden ca. 50 mg gefrorenes, pulverisiertes Pflanzenmaterial mit 500 µl 80 °C warmen MeOH (90 %, p.a.) mit 0,1 % Ameisensäure versetzt.

Als IS wurden pro Probe 50 pmol D<sub>8</sub>-DL-SF, 50 nmol Sinigrin und 500 pmol BITC-GSH hinzugegeben. Anschließend inkubierten die Proben eine Minute bei 80 °C in einem Wasserbad und wurden bei 23 Hz mit einer Zirkoniumoxid-Kugel in der Kugelmühle für 2 Minuten homogenisiert. Nach einer Zentrifugation (10 Minuten, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Schluss wurde der Überstand für 6 Minuten zentrifugiert (14000 rpm, RT) und 70 µl des Überstands in ein UPLC-Halbmikro-Gläschen überführt. Die Proben wurden bei – 20 °C bis zur Analyse mittels UPLC-MS/MS aufbewahrt.

### **2.10.1.2 Extraktion von Glutathion**

Zur Extraktion von oxidiertem und reduziertem Glutathion wurden ca. 50 mg gefrorenes, pulverisiertes Pflanzenmaterial mit 500 µl Extraktionslösung [MeOH/Wasser (1:1; v:v), 8,47 mM MMTS, 0,5 % HCl] versetzt. Als IS wurden pro Probe 10 nmol GSH-EE hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Zum Schluss wurde der Überstand in ein UPLC-Halbmikro-Gläschen überführt und bei – 20 °C bis zur Analyse mittels UPLC-TOF aufbewahrt.

### **2.10.1.3 Extraktion von Lipiden**

Zur Extraktion der Lipide wurde ca. 50 mg gefrorenes Pflanzenmaterial mit 1 ml Chloroform/MeOH (3:2; v:v) mit 0,6 mg/ml BHT versetzt. Als IS wurden pro Probe 100 ng TAG 30:0 (10:0–10:0–10:0) hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 21 Hz in gekühlten Revolvern mit einer Zirkoniumoxid-Kugel in der Kugelmühle homogenisiert. Danach wurde zu den Proben 200 µl MilliQ-Wasser hinzugefügt, erneut bei 21 Hz in der Kugelmühle für 10 Minuten homogenisiert und zentrifugiert (10 Minuten, 14000 rpm, RT). 500 µl der Chloroform-Phase wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels Vakuum-Rotationsverdampfer bei 30 °C zur Trockene eingengt. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden bei RT in 50 µl Isopropanol rückgelöst. Zum Schluss wurden die Proben erneut zentrifugiert (6 Minuten, 14000 rpm, RT) und 50 µl des Überstands in ein UPLC-Halbmikro-Gläschen überführt. Die Proben wurden bei – 20 °C bis zur Analyse mittels UPLC-TOF aufbewahrt.

### 2.10.2 HPLC-Methoden

Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte mittels Ultra High Performance Liquid Chromatograph Acquity UPLC™ der Firma Waters. Diese Anlage setzt sich aus einem Acquity UPLC Binärem Hochdruck-Gradientenmanagement System, einem Acquity UPLC Probenmanager sowie einem Acquity UPLC Säulenofen zusammen. Die Lösemittelgradienten der Analyten sind im Folgenden beschrieben.

#### 2.10.2.1 Chromatographische Auftrennung von SF und SF-GSH

Zur chromatographische Auftrennung von SF und SF-GSH wurde eine Acquity UPLC™ BEH C18 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm) verwendet, welcher zum Schutz ein In-Line-Partikelfilter (0,2 µm) sowie eine Vorsäule Acquity UPLC VanGuard™ BEH C18 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) vorgeschalten war. Tabelle 5 zeigt den verwendeten Lösemittelgradient zur Analyse von SF und SF-GSH.

**Tabelle 5:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Auftrennung von SF und SF-GSH Eluent A: 1 mM Ammoniumacetat, Eluent B: Methanol

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,00	0,2	95	5
5,00	0,2	40	60
5,01	0,2	0	100
6,50	0,2	0	100
6,51	0,2	95	5
9,50	0,2	95	5

#### 2.10.2.2 Chromatographische Auftrennung von GSH und GSSG

Zur chromatographische Auftrennung von GSH und GSSG wurde eine Acquity UPLC™ BEH C18 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 100 mm) verwendet, welcher zum Schutz ein In-Line-Partikelfilter (0,2 µm) sowie die Vorsäule Acquity UPLC VanGuard™ BEH C18 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) vorgeschaltet wurde. Tabelle 6 zeigt den verwendeten Lösemittelgradient zur Analyse von GSH und GSSG.

**Tabelle 6:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Auftrennung von GSH und GSSG  
 Eluent A: 0,1% Ameisensäure in Wasser, Eluent B: Acetonitril

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
Initial	0,3	99,9	0,1
1,20	0,3	98,0	2,0
3,50	0,3	70,0	30,0
3,51	0,3	5,0	95,0
4,79	0,3	5,0	95,0
4,80	0,3	99,9	0,1
6,00	0,3	99,9	0,1

### 2.10.2.3 Chromatographische Auftrennung freier Lipide

Zur chromatographische Auftrennung freier Lipide wurde eine Acquity UPLC™ BEH C18 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 100 mm, 60°C) verwendet, welcher zum Schutz ein In-Line-Partikelfilter (0,2 µm) sowie die Vorsäule Acquity UPLC VanGuard™ BEH C18 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) vorgeschaltet wurde. Tabelle 7 zeigt den verwendeten Lösemittelgradient zur Analyse von freien Fettsäuren.

**Tabelle 7:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Auftrennung von freien Lipiden Eluent A: 10 mM Ammoniumacetat in Wasser/MeOH (60/40; v/v), Eluent B: 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Isopropanol (10/90; v:v)

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
Initial	0,3	70,0	30,0
10,0	0,3	1,0	99,0
12,0	0,3	1,0	99,0
12,1	0,3	70,0	30,0
15,0	0,3	70,0	30,0

### 2.10.3 Massenspektrometrie (MS)

#### 2.10.3.1 Flugzeitmassenspektrometer

Die massenspektrometrische Analyse der TAG-Spezies sowie von Glutathion erfolgte mittels eines Synapt-G2 HDMS<sup>TM</sup> Flugzeitmassenspektrometer der Firma Waters im Sensitivity-Modus. Die Elektrospray-Ionisierung erfolgte im positiven Modus (ESI<sup>+</sup>). Die gewählten Geräteparameter sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die Auswertung der Messung erfolgte mit dem Programm MassLynx und QuanLynx von Waters.

**Tabelle 8:** Geräteeinstellungen Synapt-G2

Kapillarspannung [kV]	0,80
Quellenspannung [V]	25
Extraktor [V]	4
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatisierungstemperatur [°C]	350
Konusgasfluss [l/h]	30
Desolvatisierungsgasfluss [l/h]	800
Massenbereich (Da)	50–1200
Scan-Zeit (sec)	0,3
Datenformat	Centroid
Modus	MS

Die Identifikationsparameter [Masse/Ladungsverhältniss ( $m/z$ ), Retentionszeit (RT)] für die TAG-Spezies ionisiert als Ammoniumaddukt ( $[M+ NH_4^+]^+$ ) sind Tabelle 9 zu entnehmen. Für die semiquantitative Analyse der TAG-Spezies wurden 100 ng/Probe TAG- sowie ein Responsfaktor von 1 verwendet. Die Berechnung der endogenen Konzentrationen der einzelnen TAG-Spezies erfolgte durch die Formel:



$$c(A) = \left( \frac{A(A)}{A(IS)} * c(IS) \right) * \frac{\left( \frac{1000 \text{ (mg)}}{\text{Einwaage (mg)}} \right)}{M_w(\text{Analyt})}$$

- A(A): Fläche Analyt                                      c(IS): Konzentration Interner Standard  
 A(IS): Fläche interner Standard                      c(A): Konzentration Analyt/FG (nmol/g)  
 M<sub>w</sub>: Molekulargewicht Analyt

**Tabelle 9:** Identifikationsparameter TAG-Spezies

	m/z	RT [min]
<b>TAG 30:0 (IS)</b>	572,488	7,65
TAG 54:9	890,726	9,07
TAG 54:8	892,741	9,24
TAG 54:7	894,757	9,40
TAG 54:6	896,773	9,56
TAG 54:5	898,788	9,71
TAG 54:4	900,805	9,86
TAG 54:3	902,820	10,01
TAG 54:2	904,834	10,14
TAG 54:1	906,846	10,28
TAG 52:9	862,693	8,86
TAG 52:8	864,711	9,05
TAG 52:7	866,727	9,22
TAG 52:6	868,741	9,41
TAG 52:5	870,756	9,56
TAG 52:4	872,774	9,71
TAG 52:3	874,790	9,86
TAG 52:2	876,804	10,01
TAG 52:1	878,813	10,15

Die Identifikationsparameter (m/z; RT) für Glutathion ionisiert als Ammoniumaddukt ([M+ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup>) sind Tabelle 10 zu entnehmen. Für die semiquantitative Analyse von GSH sowie GSSG wurden 10 nmol/Probe GSH-EE als IS verwendet sowie ein Responsfaktor von 0,23 für GSH bzw. ein Responsfaktor von 0,6 für GSSG. Da in den GSH-EE-Proben ca. 4 % GSH gefunden wurden, wurde für die Berechnung der GSH-Konzentration dieser Gehalt abgezogen.

Die Berechnung der endogenen Konzentration erfolgte durch die Formel:

$$c(A) = \left( \frac{A(A) - A(IS) * 0,04}{A(IS)} * c(IS) * R_f \right) * \left( \frac{1000 \text{ (mg)}}{\text{Einwaage (mg)}} \right)$$

A(A): Fläche Analyt

c(IS): Konzentration interner Standard

A(IS): Fläche interner Standard

c(A): Konzentration Analyt/FG (nmol/g)

R<sub>f</sub>: Responsefaktor  $R_f = \frac{A(IS)}{A(A)}$

**Tabelle 10:** Identifikationsparameter Glutathion

	<b>m/z</b>	<b>RT [min]</b>
<b>GSH-EE-MMTS (IS)</b>	382,110	3,99
GSH-MMTS	354,079	3,23
GSSG	613,159	3,87

### 2.10.3.2 Tandem-MS

Die massenspektrometrische Analyse von SF erfolgte mittels eines Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer der Firma Waters. SF wurde im positiven Modus (ESI<sup>+</sup>) ionisiert. Die Detektion erfolgte anschließend im „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Modus. In diesem Modus werden Molekülonen anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) im ersten Quadrupol des Tandem-MS isoliert. Durch die Kollision mit Argon werden Fragmentationen in der Kollisionszelle generiert (Collision induced dissociation, CID). Im dritten Quadrupol können diese anschließend spezifisch selektiert werden (Selektionsparameter siehe Tabelle 12). Die Auflösung des Massenspektrometers betrug 0,6–0,7 Dalton bei halbmaximaler Peakbreite. Desolvatisierungs- sowie Konusgas war jeweils Stickstoff. Die spezifischen Geräteparameter sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Geräteeinstellung zur Bestimmung der Analyten im Tandem-MS

Kapillarspannung [kV]	2,75
Quellenspannung [V]	32,0
Extraktor [V]	4,0
Quellentemperatur [°C]	120,0
Desolvatisierungstemperatur [°C]	400,0
Konusgasfluss [l/h]	10,0
Desolvatisierungsgasfluss [l/h]	800,0
Kollisionsgasfluss [ml/min]	0,3

Für die semiquantitative Analyse von SF wurden 0,05 nmol/Probe D8-SF als IS verwendet sowie ein Responsefaktor von 0,72. Für die semiquantitative Analyse von Glucoraphanin wurden 50 nmol/Probe Sinigrin als IS verwendet sowie ein Responsefaktor von 1,7. Die spezifischen Massenübergänge der einzelnen Analyten sind in Tabelle 12 tabellarisch aufgeführt. Die Berechnung der endogenen Konzentrationen erfolgte durch die Formel:

$$c(A) = \left( \frac{A(A)}{A(IS)} * c(IS) * R_f \right) * \left( \frac{1000 \text{ (mg)}}{\text{Einwaage (mg)}} \right)$$

A(A): Fläche Analyt

c(IS): Konzentration interner Standard

A(IS): Fläche interner Standard

c(A): Konzentration Analyt/FG (nmol/g)

R<sub>f</sub>: Responsefaktor

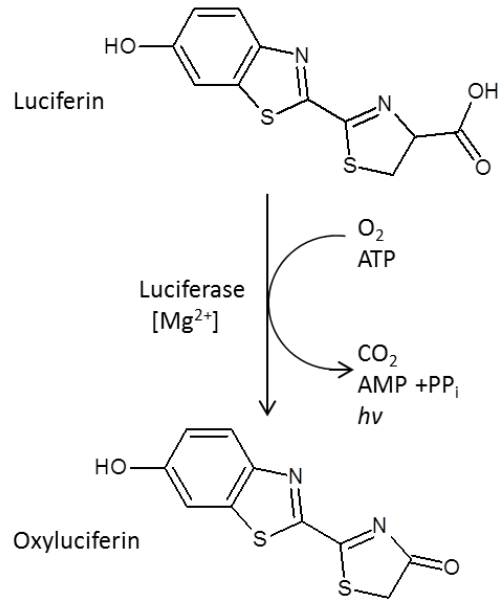
**Tabelle 12:** Spezifische Massenübergänge (m/z) von SF und SF-GSH

Analyt	Parention [m/z]	Fragmention [m/z]	Kollisionsenergie [V]	Konusspannung [V]
SF	178	114	12	20
SF	178	119	12	20
D8-SF	186	122	12	20
D8-SF	186	127	12	20
BITC-GSH	457	108	16	33
BITC-GSH	457	179	16	33
SF-GSH	485	136	16	32
SF-GSH	485	179	16	32

## 2.11 Nachweis der biologischen Aktivität unterschiedlicher Substanzen

### 2.11.1 Bestimmung der Expressionsaktivität mittels der GST6::*Luc*-Reportergenlinie

Durch die Verwendung des Reportergens Luciferase (*Luc*) können zeitliche und räumliche Informationen über die Aktivität eines Promotors erfasst werden. Durch *in vivo*-Messungen der Lumineszenz über verschiedene Zeiträume lassen sich Dynamiken der Genexpression erfassen. Das Enzym LUC katalysiert unter Anwesenheit von Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ), Sauerstoff und ATP die Umsetzung des Substrats Luciferin in instabile, energiereiche Dioxetane. Der Zerfall dieser Substanz resultiert weiter in einer Biolumineszenz (Abbildung 8). Die emittierte Photonen der Wellenlänge 560 nm werden in einer auf  $-90\text{ °C}$  gekühlten CCD- (charged coupled device) Kamera visualisiert (Kolb et al. 2001).



**Abbildung 8:** Luciferin wird, katalysiert durch das Enzym Luciferase, zu Oxyluciferin oxidiert. Magnesiumionen (Mg<sup>2+</sup>) dienen hierbei LUC als Cofaktoren und ATP liefert die Energie. Beim Zerfall dieser Substanz findet eine Lichtemission statt.

Zur Untersuchung der Expressionsaktivität von *Arabidopsis*-Keimlingen in Flüssigmedium (500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) wurde die Reporterogenlinie GST6::*Luc* verwendet. Dazu wurde die Lumineszenz eine sowie fünf Stunden nach Behandlung mit SF und BITC gemessen. Um eine Expressionsinduktion durch Methanol ausschließen zu können, wurde eine Endkonzentration von 0,5 % (v/v) Methanol nicht überschritten. Als positiv Kontrolle diente 75 µM PGA<sub>1</sub>. Vor der Messung wurden jeweils 50 µl der Substratlösung (1954 µl ddH<sub>2</sub>O, 4 µl Triton X100, 40 µl Luciferin 50 mM) zu den Proben gegeben. Auf eine Zugabe von ATP konnte verzichtet werden, da dies endogen in den Pflanzen gebildet wird. Die Expressionsaktivität wurde im Aufnahmemodus (Exposure time 10 min, Binning 4, Live Bin 4, Autoscale: on, Setting, Luminescence, Light: off) mittels einer CCD-Kamera dokumentiert.

### 2.11.2 Puls-Amplituden-Modulation (PAM) Fluorometrie

Die photosynthetische Aktivität von Pflanzen kann mittels der nicht-invasiven Chlorophyllfluoreszenz-Messung bestimmt werden. Dazu wurde ein Fluorometer des Typs Imaging PAM M-Series MAXI (Firma Walz) mit einem voreingestellten Messprotokolls in der Software ImagingWin.exe (Firma Walz) verwendet. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzparameter

erfolgte in vorher definierten Bereichen, sogenannte „areas of interest“ (AOI), in welchen die Mittelwerte der jeweiligen Parametern berechnet und als Zahlenwert dargestellt werden. Vorbereitend für die Messung wurden die Keimlinge in zuckerfreiem Medium in einer 24-Lochplatte der Firma Nunc™ 20 Minuten dunkeladaptiert. Durch einen schwachen, nicht-aktinischen Photonen-Puls wird zunächst die minimale Fluoreszenz  $F_0$  ermittelt. Erhalten darauffolgend die Keimlinge einen kurzen aktinischen Lichtpuls, kann die maximale Fluoreszenz  $F_m$  im dunkeladaptierten Zustand abgeleitet werden. Die maximale Quantenausbeute im Photosystem II ( $F_v/F_m$ ) wird nun mit Hilfe dieser Parameter durch das Programm ImagingWin nach folgender Formel berechnet:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

$F_v$  variable Fluoreszenz

$F_m$  maximale Fluoreszenz

$F_0$  minimale Fluoreszenz

## 3 Ergebnisse

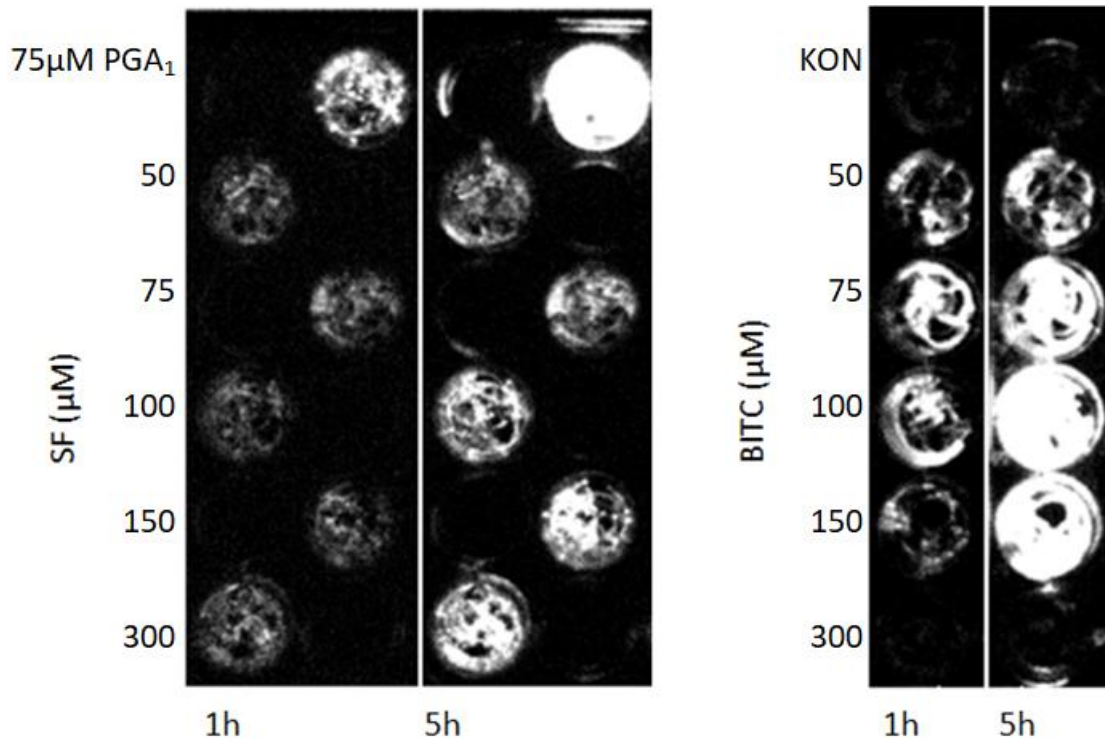
### 3.1 Biologischen Aktivität von Sulforaphan

Zunächst sollte ermittelt werden, in welchem Konzentrationsbereich SF in *Arabidopsis*-Keimlingen typische Markergene von RES aktiviert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ITCs Hitzeschock- (Hara et al., 2013) und Detoxifizierungsgene (Hara et al., 2010) bei niedrigen Konzentrationen (0,1–1 mM, Sprüh-Applikation) induzieren können.

#### 3.1.1 Konzentrationsabhängige Induktion der GST6::*Luc*-Reportergenlinie durch Isothiocyanate

Zur Analyse der biologischen Aktivität des ITCs SF in *Arabidopsis* wurde das nicht-invasive GST6::*Luc*-System verwendet. GSTs werden als Reaktion auf eine Vielzahl an abiotischen und biotischen Stressoren induziert, darunter RES und ROS (Marrs, 1996; Chen et al., 1996; Loeffler et al., 2005). Transgene Luciferase-Pflanzen ermöglichen die Analyse der zeitlichen und räumlichen Aktivierung des *GST6* Promotors nach Gabe des Substrats Luciferin *in vivo* über mehrere Stunden. Um die Wirkungen von SF mit anderen ITCs vergleichen zu können, wurde als weitere RES BITC getestet. Dazu wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach acht Tagen mit verschiedenen Konzentrationen von SF (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt. Nach einer sowie fünf Stunden wurde die Luciferaseaktivität unter einer CCD Kamera wie unter 2.11.1 beschrieben detektiert. In der an diesem Lehrstuhl durchgeführten Diplomarbeit von Maria Zöller konnte bereits gezeigt werden, dass 75 µM PGA<sub>1</sub> die GST6::*Luc* Aktivität induziert. Deshalb wurde 75 µM PGA<sub>1</sub> in der vorliegenden Arbeit als Positiv-Kontrolle verwendet.

Bereits nach einer Stunde und ab einer Konzentration von jeweils 50 µM an SF und BITC ist eine deutliche Induktion der Luciferase Aktivität zu erkennen (Abbildung 9). Nach fünf Stunden Inkubationszeit ist die Lumineszenz nochmals verstärkt. Während nach Gabe von 300 µM SF eine erhöhte Lumineszenz detektierbar ist, hat die gleiche Konzentration an BITC keinen Effekt. Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Aktivität des *GST6*-Promotors durch SF und BITC bei Konzentrationen von 50–150 µM deutlich induziert werden kann.



**Abbildung 9:** Luciferase-Aktivität von 8 Tage alten *GSTU6::Luc*-Keimlingen (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) nach Behandlung mit entsprechenden ITC Konzentrationen. Die Lumineszenz wurde nach einer und fünf Stunden mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Als Negativ-Kontrolle wurde 2 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker gemessen (KON). Positiv-Kontrolle war 75 µM  $PGA_1$ .

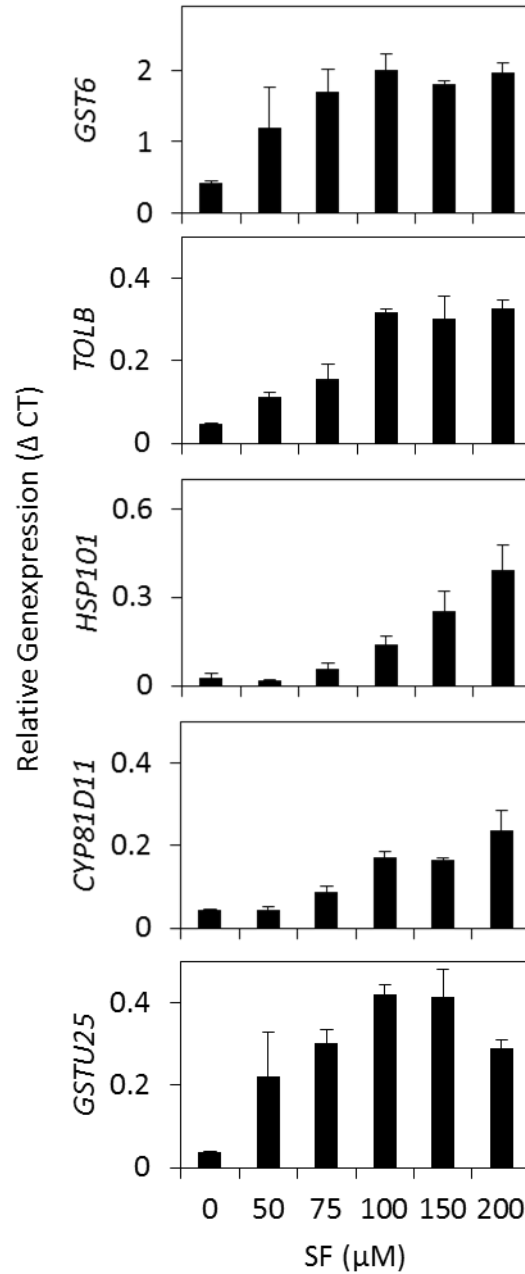
### 3.1.2 Identifikation charakteristischer RES-regulierter Markergene

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität von SF wurde neben dem Luciferase-Assay die Expression von RES-induzierbaren Markergenen, die an der pflanzlichen Stressreaktion beteiligt sind, analysiert. Wie unter 1.2.3 erwähnt, werden GSTs durch unterschiedliche Xenobiotika und RES induziert (Marrs, 1996; Loeffler et al., 2005). Eine Behandlung mit RES-Oxylipinen wie  $PGA_1$  und OPDA führt zu einer Induktion der Stressgene *CYP81D11* und *TOLB* (Mueller et al., 2008) sowie dem *HSP101*-Gen (Mueller et al., 2008; Muench et al., 2016).

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität von SF wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach neun Tagen für vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an SF (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt. Anschließend wurde aus den Keimlingen RNA isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Expression



der Gene *CYP81D11*, *TOLB*, *GST6*, *GSTU25* und *HSP101* quantitativ mittels *real-time* PCR bestimmt. In Abbildung 10 sind die Expressionsspiegel nach vier Stunden dargestellt. Die Analyse zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression aller oben genannten Gene. Bereits 50  $\mu\text{M}$  SF führte zu einer deutlichen Akkumulation der Transkriptmenge von *TOLB*, *GST6* sowie *GSTU25*. 75  $\mu\text{M}$  SF führten zu einem signifikanten Anstieg von *CYP81D11* und 100  $\mu\text{M}$  bei *HSP101*. Die Transkriptmenge von *TOLB* und *GST6* stieg bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  an und blieb trotz einer Erhöhung der Konzentration konstant. Die mRNA-Menge von *CYP81D11* sowie *HSP101* stieg mit steigender Konzentration und war bei 200  $\mu\text{M}$  um das 5,4- bzw. 15,5-Fache des Basalwertes erhöht. Die Expression von *GSTU25* erreichte ihr Maximum bei 100 und 150  $\mu\text{M}$  (10-fach stärker im Vergleich zum Basalwert).



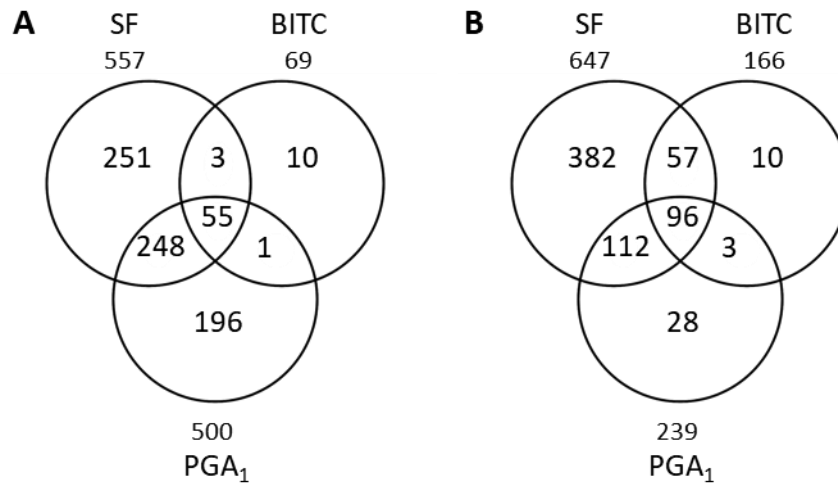
**Abbildung 10:** Genexpressionsanalyse von *CYP81D11*, *TOLB*, *HSP101*, *GST6* sowie *GSTU25* bezogen auf *Actin2/8* mittels quantitativer *real-time* PCR von 9 Tage alten Col-0-Keimlingen (10 Keimlinge in 500  $\mu$ l MS-Medium mit 3 % Zucker) nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an SF. Als Kontrolle wurde 2 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker verwendet. Die Keimlinge inkubierten für vier Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren (MW $\pm$ SD, n=3).

### 3.1.3. Transkriptionelle Reaktion auf SF, BITC und das Oxylin PGA<sub>1</sub>

Zur Analyse der transkriptionellen Reaktion von *Arabidopsis* auf eine exogene Behandlung mit SF (100 µM in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) wurde eine Transkriptom-Analyse mittels Microarray-Technik durchgeführt. Um die Antwort auf SF mit einem strukturell anderen ITC sowie RES-Oxylin vergleichen zu können, wurden ebenfalls BITC und PGA<sub>1</sub> (100 µM bzw. 75 µM in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) untersucht. Zur Analyse wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3% Zucker) angezogen und nach 10 Tagen mit den oben erwähnten RES (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: 0,5 %) für vier Stunden versetzt. Anschließend wurde aus den Keimlingen RNA isoliert und aufgereinigt. Die Hybridisierungsreaktion und Durchführung der Transkriptom-Studie auf Agilent 4x44K *Arabidopsis* V4 Microarray-Chips erfolgte am Lehrstuhl für Biochemie an der Universität Erlangen. Die anschließende statistische Auswertung der Microarrays erfolgte am Lehrstuhl für Bioinformatik an der Universität Würzburg. Die Daten wurden anschließend bezüglich des P-Wertes (< 0,05) sowie der Regulationsstärke (englisch: Fold Change, Fc) gefiltert. Für die VENN-Analyse der differentiell regulierten Gene wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, deren Expression im Vergleich zur Kontrolle mindestens zweifach reguliert waren (Fc > 2 sowie Fc < 0,5). Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, zeigte die Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen nach Zugabe von SF (100 µM, vier Stunden) eine Induktion von 557 Genen. PGA<sub>1</sub> induzierte 500 Gene und BITC führte im Vergleich zu SF und PGA<sub>1</sub> zu einer deutlich geringeren Induktion. Hier zeigten lediglich 69 Gene eine erhöhte Expression. Rund 84 % der BITC-responsiven Gene wurden ebenfalls durch SF induziert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine exogene Applikation der beiden ITCs in *Arabidopsis*-Keimlingen eine ähnliche Reaktion hervorruft. Ungefähr die Hälfte aller durch SF und PGA<sub>1</sub> induzierten Gene werden durch beide RES reguliert (54 % der SF und 60 % der PGA<sub>1</sub> induzierten Gene). PGA<sub>1</sub> induziert 81 % der durch BITC regulierten Gene.

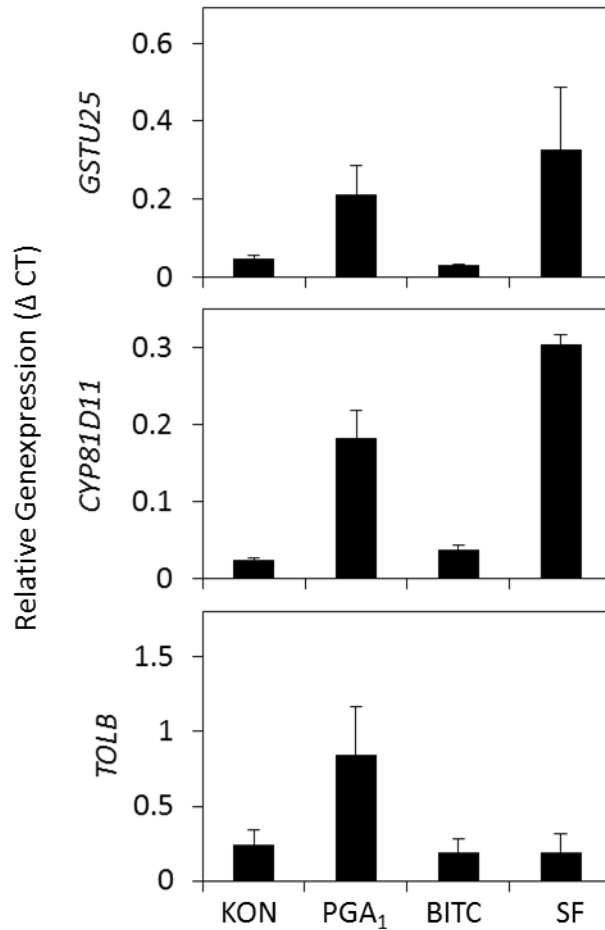
Die Analyse der reprimierten Gene untermauert die Beobachtung einer ähnlichen Reaktion von *Arabidopsis* auf strukturell unterschiedliche ITCs. Dabei wurden 92 % der durch BITC reprimierten Gene ebenfalls durch SF reprimiert. Im Gegensatz dazu sind lediglich 69 % der BITC

und 32 % der SF regulierten Gene mit  $PGA_1$  gemeinsam. Zudem fällt auf, dass nach BITC-Behandlung deutlich mehr Gene reprimiert (166) als induziert (69) wurden.



**Abbildung 11:** VENN-Diagramme zum Vergleich der induzierten (A) und reprimierten (B) Gene nach Behandlung mit SF, BITC und  $PGA_1$ . Die Transkriptomanalyse wurde in zehn Tage alten Col-0- Keimlingen nach Inkubation für vier Stunden mit 100  $\mu$ M SF, 100  $\mu$ M BITC sowie 75  $\mu$ M  $PGA_1$  durchgeführt ( $F_c > 2$  (A),  $F_c < 0,5$  (B);  $pValue < 0,05$ ).

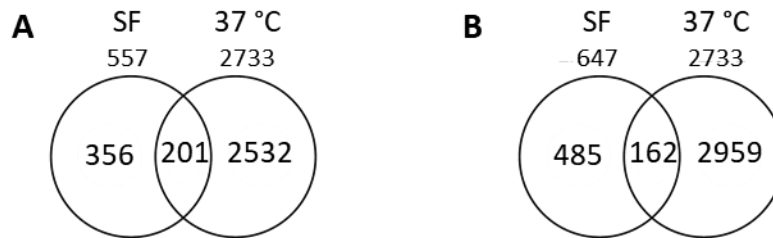
Zur Validierung der Microarray-Analyse wurde die Expression von Markergenen, welche bekanntlich durch exogene RES-Applikation reguliert werden, überprüft. Nach Synthese der cDNA aus der isolierten RNA wurde eine qPCR durchgeführt. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, führte die Behandlung der Keimlinge mit  $PGA_1$  und SF zu einer deutliche Induktion der Expression von *CYP81D11* (7,5- und 12,5-fach) sowie *GSTU25* (4,4- und 6,9-fach). Im Vergleich dazu führte BITC zu keiner Akkumulation der untersuchten Gene. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle Markergene in der qPCR das gleiche Regulationsmuster zeigen wie in der Microarray-Analyse. Ausnahme bildet dabei *TOLB*. Dieses Gen war in der Expressionsanalyse mittels qPCR nach SF Behandlung um das 6,8-Fache im Vergleich zur Kontroll-Behandlung induziert (Abbildung 10). In der Transkriptomanalyse sowie in der qPCR zur Verifizierung des Microarrays hingegen konnte keine *TOLB*-Induktion detektiert werden (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Genexpressionsanalyse von *CYP81D11*, *GSTU25* sowie *TOLB* bezogen auf *Actin2/8* mittels quantitativer *real-time* PCR von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen (10 Keimlinge in 500  $\mu$ l MS-Medium mit 3 % Zucker) nach Behandlung mit 75  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>, 100  $\mu$ M BITC und 100  $\mu$ M SF. Als Kontrollbehandlung wurde 0,5 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker (KON) verwendet. Die Keimlinge inkubierten für vier Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff geerntet (MW $\pm$ SD, n=6).

Da RES eine Induktion von Hitzeschockproteinen auslösen (Muench et al., 2016), wurden die Transkriptomdaten mit Daten eines Hitze-induzierten Transkriptoms verglichen (Abbildung 13). Hierfür wurde die Analyse von Nguyen gewählt, in welcher vierzehntage alte *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge für eine Stunde mit 37 °C behandelt wurden (Nguyen et al., 2015). Nach dieser Behandlung ist die Expression von 2733 Genen mehr als zweifach induziert und von 3121 Genen mehr als zweifach reprimiert. Die VENN-Analyse ergab, dass 36 % (201) der durch SF induzierten Gene ebenfalls durch Hitze eine erhöhte Expression zeigten. Bei den gemeinsam

reprimierten Genen wurden 25 % durch SF und Hitze reguliert. Wie die Auswertung des VENN-Vergleichs zeigt, wurde ca. ein Drittel der SF-regulierten Gene ebenfalls durch Hitze reguliert.



**Abbildung 13:** VENN-Diagramme zum Vergleich der induzierten (A) und reprimierten (B) Gene nach Behandlung mit SF und Hitze. Der *in silico* Vergleich wurde mit Transkriptomdaten von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach vier Stunden Inkubation mit 100  $\mu$ M SF sowie Transkriptomdaten von vierzehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen, welche für eine Stunde mit 37 °C behandelt wurden, durchgeführt (Nguyen et al., 2015) ( $f_c > 2$  (A),  $f_c < 0,5$  (B);  $p\text{Value} < 0,05$ ).

In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die 50 am höchsten induzierten- sowie reprimierten Gene durch Gabe von SF dargestellt. Die Auflistung wurde zudem mithilfe der datenbankbasierten Software „Gene Set Enrichment Analysis“ (GSEA) analysiert, um signifikant regulierte biologische Prozesse zu identifizieren. GSEA zeigt sogenannte definierte Gensets auf. Dies sind Gruppen von Genen, welche gemeinsame biologische Funktionen, chromosomale Lokalisation oder Regulation aufweisen (Subramanian et al., 2005). Die Anreicherung von zahlreichen GeneOntology (GO)-Begriffen und „protein family gene sets“ wurde durch Nutzung des „PlantGSEA tools“ (<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/analysis.php>) durchgeführt (Yi et al., 2013). Verschiedene Gensets waren überrepräsentiert (false discovery rate  $< 0,05$ ) in den differenziell regulierten Genen. Es ist wenig überraschend, dass sich die größten Überlappe aller SF-induzierten Gene mit den GO Termen „response to chemical stimulus“ (218, 39,1 %) und „response to stress“ (180, 32,3 %) zeigten. Die Analyse der 50 am höchsten induzierten Gene durch Gabe von SF zeigte, dass 31 Gene (62 %) mit dem GO Term „response to heat“ assoziiert werden können. Darunter ist eine große Anzahl an Hitzeschockproteinen, die auch bei der Hitze-Akklimatisierung eine wichtige Rolle spielen. So können 12 dieser Gene zudem dem GO Terms „heat acclimation“, welches eine Teilmenge des GO Terms „response to heat“ darstellt, zugeordnet werden. Bei Betrachtung aller durch SF-induzierten Gene (557) sind

insgesamt 72 Gene (12,9 %) mit dieser Kategorie assoziiert. Bezüglich aller als Hitze-annotierter Gene (303) werden 23,7 % ebenfalls durch SF induziert.

Bei Betrachtung spezifischerer GO Kategorien findet man den GO Term „response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“ bei 27 (54 %) der 50 am höchsten induzierten Gene durch Gabe von SF und bei 54 (9,7 %) aller SF-induzierten Gene (> 2-fach). Dies entspricht 20,5 % von allen annotierten Genen dieser Kategorie (263). Allerdings sind fast alle SF- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsiven Gene auch in dem Gegensatz „response to heat“ zu finden. Auch andere GO Terme sind für die meisten SF-induzierten Gene der „response to heat“ Kategorie annotiert, z.B. „response to ER stress“, „response to high light intensity“ und „protein folding“. Einige der SF-induzierten Gene sind mit dem GO Term „toxin metabolic process“ (33 Gene von 557 SF-induzierten Genen) assoziiert und enthält eine Reihe von Glutathion S-Transferasen (10 Gene).

Verschiedene Proteinfamilien, welche in den SF-induzierten Genen signifikant überrepräsentiert sind, wurden mittels der DAVID Microarray Annotation „DAVID: Functional Annotation Tool“ (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>) identifiziert (Huang et al., 2007). So konnten aus allen SF-induzierten Genen 40 Gene aus der Kategorie Detoxifizierung und Sekundärstoffmetabolismus zugeordnet werden wie: 14 CytP450, 7 Glucosidasen, 10 GST (davon 9 aus der tau Gruppe) und 9 UDP-Glucosyltransferasen. Unter den 50 am höchsten induzierten Genen wurden 22 (44 %) mittels DAVID als hitzeresponsiv klassifiziert.

Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da von verschiedenen RES bereits gezeigt wurde, dass sie Gene des Hitzeschockresponses (HSF und HSP) stark induzieren (Mueller et al., 2008; Hara et al., 2013). Da diese Gene basal kaum exprimiert werden, verwundert es nicht, dass sich diese Gene unter den am höchsten induzierten Genen befinden. Neben den aktivierten Genen ist es deshalb auch interessant, die weniger stark induzierten Gene zu analysieren (Tabelle 14). Unter den 50 am stärksten reprimierten Genen nach SF Zugabe sind 23 Gene (46 %) mit dem GO-Term „extracellular region“ assoziiert. 6 Gene können Kategorien zugeordnet werden, welche auf unterschiedliche Weise mit Wurzelentwicklung in Verbindung stehen wie „root development“, „lateral root development“ oder „trichoblast maturation“. Insgesamt 10 der 50 am stärksten reprimierten Gene sind dem Term „oxidation-reduction process“ zugeschrieben. Bei

Betrachtung aller durch SF reprimierter Gene (648) sind insgesamt 101 Gene (15,5 %) mit dieser Kategorie assoziiert. Ähnlich zu den induzierten Genen nach SF Zugabe, ist auch bei den reprimierten Genen die Kategorie „response to chemical stimulus“ überrepräsentiert. So können 123 (18,9 %) der insgesamt 648 durch SF-Gabe reprimierten Gene diesem Term zugeordnet werden.



**Tabelle 13:** Liste der 50 am höchsten durch SF induzierten Gene (FC > 2). Fett gedruckte Werte haben einen adj.-p-Wert < 0,05. Zum Vergleich sind die FCs von BITC und PGA<sub>1</sub> ebenfalls in der Liste aufgeführt. Die Gene wurden mittels des PlantGSEA Tools nach biologischen Prozessen klassifiziert.

Gen-Locus	Beschreibung	Gen-Name	SF FC	BITC FC	PGA <sub>1</sub> FC	response to heat	heat acclimation	response to H2O2	response to ER stress
AT1G52560	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>168,4</b>	<b>91,8</b>	<b>672,2</b>				
AT1G60750	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein		<b>146,7</b>	<b>2,8</b>	<b>66,3</b>				
AT4G10250	HSP20-like chaperones superfamily protein	ATHSP22.0	<b>109,9</b>	<b>136,0</b>	<b>193,2</b>				
AT3G09640	ascorbate peroxidase 2	APX1B, APX2	<b>108,1</b>	<b>19,7</b>	<b>18,4</b>				
AT4G27670	heat shock protein 21	HSP21	<b>97,7</b>	<b>34,9</b>	<b>74,6</b>				
AT3G46230	heat shock protein 17.4	HSP17.4	<b>68,4</b>	<b>24,3</b>	<b>59,6</b>				
AT4G25380	stress-associated protein 10	SAP10	<b>65,5</b>	<b>4,1</b>	<b>33,6</b>				
AT5G12030	heat shock protein 17.6A	HSP17.6A	<b>65,0</b>	<b>20,5</b>	<b>65,6</b>				
AT1G53540	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>64,8</b>	<b>40,1</b>	<b>75,8</b>				
AT1G48700	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein		<b>56,0</b>	<b>8,5</b>	<b>25,4</b>				
AT5G07330	unknown protein		<b>48,6</b>	<b>29,5</b>	<b>15,3</b>				
AT5G12020	17.6 kDa class II heat shock protein	HSP17.6II	<b>34,9</b>	<b>21,2</b>	<b>41,3</b>				
AT4G11393	Defensin-like (DEFL) family protein	DEFL202	<b>28,9</b>	1,0	1,1				
AT1G16030	heat shock protein 70B	HSP70b	<b>27,3</b>	<b>16,2</b>	<b>86,9</b>				
AT1G72660	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein		<b>22,1</b>	<b>5,1</b>	<b>6,0</b>				
AT2G36255	Defensin-like (DEFL) family protein		<b>21,8</b>	0,8	1,3				
AT2G32120	heat-shock protein 70T-2	HSP70T-2	<b>20,1</b>	<b>4,1</b>	<b>12,4</b>				
AT1G03070	Bax inhibitor-1 family protein	LFG4	<b>19,5</b>	<b>4,0</b>	<b>18,4</b>				
AT1G07500	unknown protein		<b>19,1</b>	<b>2,8</b>	<b>4,5</b>				
AT4G33020	ZIP metal ion transporter family	ZIP9	<b>16,2</b>	0,7	0,8				
AT5G53680	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein		<b>15,5</b>	3,2	<b>16,6</b>				
AT1G74310	heat shock protein 101	HSP101	<b>15,2</b>	<b>5,6</b>	<b>27,2</b>				
AT1G71000	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein		<b>15,2</b>	1,7	<b>10,1</b>				
AT4G21320	Aldolase-type TIM barrel family protein	HSA32	<b>14,5</b>	<b>9,4</b>	<b>8,8</b>				
AT2G26150	heat shock transcription factor A2	HSFA2	<b>14,2</b>	<b>2,2</b>	<b>8,8</b>				

# Ergebnisse

Gen-Locus	Beschreibung	Gen-Name	SF FC	BITC FC	PGA <sub>1</sub> FC	response to heat	heat acclimation	response to H2O2	Response to ER stress
AT3G61940	Cation efflux family protein	MTPA1	<b>14,1</b>	1,0	1,1				
AT5G54165	unknown protein		<b>13,5</b>	2,0	<b>15,4</b>				
AT3G60140	Glycosyl hydrolase superfamily protein	BGLU30, DIN2, SRG2	<b>13,3</b>	<b>3,1</b>	<b>7,5</b>				
AT5G66780	unknown protein		<b>13,3</b>	<b>4,2</b>	<b>4,6</b>				
AT2G29500	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>12,9</b>	<b>7,9</b>	<b>12,4</b>				
AT5G37670	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>11,7</b>	2,1	<b>6,8</b>				
AT5G10695	unknown protein		<b>11,7</b>	<b>1,9</b>	<b>9,1</b>				
AT2G47180	galactinol synthase 1	GolS1	<b>11,1</b>	<b>3,2</b>	<b>7,6</b>				
AT1G59860	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>10,1</b>	<b>3,1</b>	<b>13,0</b>				
AT2G46240	BCL-2-associated athanogene 6	BAG6	<b>10,0</b>	<b>2,5</b>	<b>11,4</b>				
AT4G25200	mitochondrion-localized small heat shock protein 23.6	HSP23.6- MITO	<b>9,8</b>	<b>4,8</b>	<b>5,3</b>				
AT1G07400	HSP20-like chaperones superfamily protein		<b>9,5</b>	<b>2,5</b>	<b>11,2</b>				
AT4G21323	Subtilase family protein		<b>9,1</b>	1,1	1,2				
AT4G39360	unknown protein		<b>9,0</b>	<b>2,4</b>	<b>9,0</b>				
AT4G23493	unknown protein		<b>8,8</b>	2,3	<b>3,0</b>				
AT5G52640	heat shock protein 90.1	HSP90.1	<b>8,7</b>	3,1	<b>6,1</b>				
AT3G28740	Cytochrome P450 superfamily protein	CYP81D11	<b>8,7</b>	1,7	<b>5,2</b>				
AT5G22140	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein		<b>8,7</b>	1,7	<b>9,8</b>				
AT2G29470	glutathione S-transferase tau 3	GST21, GSTU3	<b>8,4</b>	1,1	<b>5,7</b>				
AT2G01430	homeobox-leucine zipper protein 17	HB17	<b>8,2</b>	1,2	<b>3,3</b>				
AT5G05220	unknown protein		<b>8,1</b>	<b>5,5</b>	<b>34,3</b>				
AT4G12400	stress-inducible protein, putative	Hop3	<b>7,9</b>	<b>5,5</b>	<b>6,3</b>				
AT1G17870	ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green-like 3	EGY3	<b>7,6</b>	2,4	<b>11,0</b>				
AT1G07985	Expressed protein		<b>7,3</b>	<b>4,3</b>	<b>4,5</b>				
AT4G28110	myb domain protein 41	MYB41	<b>7,3</b>	1,0	<b>3,9</b>				

**Tabelle 14:** Liste der 50 am stärksten durch SF reprimierten Gene (FC > 2). Fett gedruckte Werte haben einen adj.-p-Wert < 0,05. Zum Vergleich sind die FCs von BITC und PGA<sub>1</sub> ebenfalls in der Liste aufgeführt. Die Gene wurden mittels des PlantGSEA Tools nach biologischen Prozessen klassifiziert.

Gen-Locus	Beschreibung	Gen-Name	SF FC	BITC FC	PGA <sub>1</sub> FC	extracellular region	root development	oxidation/reduction- process
AT4G12510	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	AZ15	<b>0,15</b>	<b>0,21</b>	<b>0,29</b>	■		
AT2G18800	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 21	XTH21	<b>0,15</b>	<b>0,22</b>	<b>0,38</b>	■	■	
AT5G62340	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein		<b>0,15</b>	0,17	<b>0,14</b>	■	■	
AT3G29430	Terpenoid synthases superfamily protein		<b>0,15</b>	0,42	0,57			
AT5G42180	Peroxidase superfamily protein	PER64	<b>0,15</b>	0,93	<b>0,53</b>	■		■
AT1G08090	nitrate transporter 2:1	NRT2, NRT2.1	<b>0,15</b>	1,76	0,42		■	
AT5G47990	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 5	CYP705A5	<b>0,15</b>	1,03	<b>0,39</b>		■	
AT1G54890	Late embryogenesis abundant (LEA) protein-related		<b>0,15</b>	0,43	0,6	■		
AT1G66800	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein		<b>0,14</b>	<b>0,35</b>	<b>0,4</b>			
AT5G49270	COBRA-like extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein family	COBL9, DER9, MRH4,	<b>0,14</b>	0,62	<b>0,23</b>		■	
AT3G50460	homolog of RPW8 2	HR2	<b>0,14</b>	<b>0,36</b>	<b>0,23</b>			
AT5G15890	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 21	TBL21	<b>0,14</b>	0,9	0,74			
AT1G29020	Calcium-binding EF-hand family protein		<b>0,14</b>	<b>0,22</b>	<b>0,18</b>	■		
AT5G10130	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein		<b>0,14</b>	0,32	0,43	■		
AT4G25250	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	PMEI4	<b>0,13</b>	0,46	0,68			
AT3G18200	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	UMAMIT4	<b>0,13</b>	0,55	<b>0,26</b>			
AT4G15390	HXXXD-type acyl-transferase family protein		<b>0,12</b>	<b>0,33</b>	<b>0,22</b>			
AT5G58750	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein		<b>0,12</b>	<b>0,38</b>	<b>0,35</b>			
AT3G14260	Protein of unknown function (DUF567)		<b>0,12</b>	0,68	<b>0,34</b>			
AT3G61400	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein		<b>0,12</b>	<b>0,16</b>	<b>0,21</b>			■
AT1G50060	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein		<b>0,12</b>	0,33	<b>0,14</b>	■		
AT5G26290	TRAF-like family protein		<b>0,12</b>	0,8	<b>0,48</b>			
AT1G44970	Peroxidase superfamily protein		<b>0,12</b>	1,25	1,04	■		■

Gen-Locus	Beschreibung	Gen-Name	SF FC	BITC FC	PGA <sub>1</sub> FC	extracellular region	root development	oxidation/reduction- process
AT5G60520	Late embryogenesis abundant (LEA) protein-related		<b>0,11</b>	<b>0,24</b>	0,52			
AT3G50640	Unknown protein		<b>0,11</b>	0,43	0,58			
AT5G46900	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein		<b>0,11</b>	<b>0,35</b>	<b>0,4</b>			
AT1G63450	root hair specific 8	RHS8, XUT1	<b>0,1</b>	0,61	<b>0,22</b>			
AT1G49860	glutathione S-transferase (class phi) 14	GSTF14	<b>0,1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,12</b>			
AT3G06460	GNS1/SUR4 membrane protein family		<b>0,1</b>	0,39	<b>0,16</b>			
AT5G19790	related to AP2 11	RAP2.11	<b>0,09</b>	0,75	<b>0,35</b>			
AT5G54040	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein		<b>0,09</b>	0,43	<b>0,27</b>			
AT3G03670	Peroxidase superfamily protein		<b>0,09</b>	<b>0,14</b>	<b>0,22</b>			
AT1G11655	unknown protein		<b>0,09</b>	0,31	0,63			
AT1G65670	cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 1	CYP702A1	<b>0,09</b>	<b>0,21</b>	<b>0,14</b>			
AT3G26610	Pectin lyase-like superfamily protein	PGX1	<b>0,08</b>	0,49	0,56			
AT5G38100	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein		<b>0,08</b>	<b>0,31</b>	<b>0,2</b>			
AT2G47540	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein		<b>0,08</b>	0,92	<b>0,49</b>			
AT5G46890	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein		<b>0,08</b>	<b>0,36</b>	0,56			
AT1G27140	glutathione S-transferase tau 14	GST13, GSTU14	<b>0,08</b>	<b>0,24</b>	<b>0,34</b>			
AT1G53130	Stigma-specific Stig1 family protein	GRI, GRIM REAPER	<b>0,08</b>	0,42	1,07			
AT3G20380	TRAF-like family protein		<b>0,08</b>	<b>0,21</b>	<b>0,21</b>			
AT2G23630	SKU5 similar 16	sks16	<b>0,07</b>	<b>0,22</b>	<b>0,16</b>			
AT4G37160	SKU5 similar 15	sks15	<b>0,07</b>	<b>0,21</b>	<b>0,1</b>			
AT4G15393	cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 5	CYP702A5	<b>0,07</b>	<b>0,26</b>	<b>0,1</b>			
AT4G00080	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	UNE11	<b>0,07</b>	<b>0,32</b>	0,46			
AT3G01260	Galactose mutarotase-like superfamily protein		<b>0,06</b>	<b>0,18</b>	<b>0,21</b>			
AT1G19900	glyoxal oxidase-related protein		<b>0,06</b>	<b>0,55</b>	<b>0,23</b>			
AT1G45015	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein		<b>0,05</b>	0,7	0,48			
AT2G39040	Peroxidase superfamily protein		<b>0,05</b>	<b>0,26</b>	<b>0,23</b>			
AT5G42590	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 16	CYP71A16	<b>0,05</b>	1,64	<b>0,4</b>			

### 3.2 Mögliche Mechanismen der RES-vermittelten Genregulation

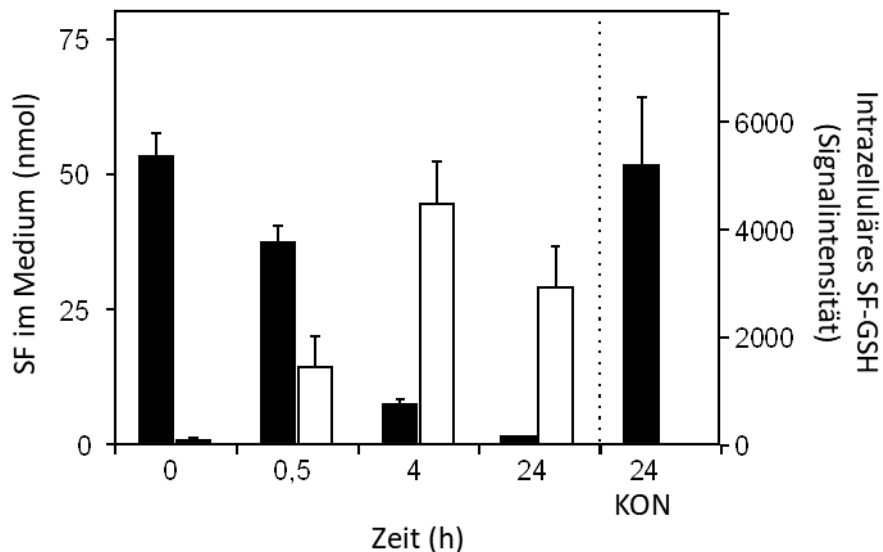
Wie bereits unter 1.3 beschrieben, werden zwei potentielle Mechanismen zur RES-vermittelten Genregulation diskutiert. In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese überprüft werden, welche eine Veränderung des zellulären Redox-Potentials beinhaltet. Dieser Mechanismus wird vor allem für die Wirkung von SF in der Literatur postuliert (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015).

#### 3.2.1 Zelluläre Aufnahme und metabolische Wirkung von SF

Zur Untersuchung der Aufnahme von SF in *Arabidopsis*-Keimlingen wurde im ersten Schritt zunächst die Stabilität von SF im Behandlungsmedium überprüft. Dazu inkubierten 100 µM SF als methanolische-Lösung für vier und 24 Stunden in der Behandlungslösung (500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %). Anschließend wurde das Medium mittels UPLC-TOF analysiert. Es zeigte sich, dass SF über die gesamte Dauer des Experiments stabil war und nicht abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker; ergeben ca. 100 mg Frischgewicht) angezogen und nach zehn Tagen mit 100 µM SF (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) für vier Stunden versetzt. Die Analyse der Kontroll-Keimlinge (ohne SF-Behandlung) zeigte einen äußerst geringen endogenen Gehalt an SF von 0,01 nmol absolut. Nach exogener Zugabe von SF zu *Arabidopsis*-Keimlingen wurden im Behandlungsmedium noch 2,6 % der verabreichten SF-Menge (50 nmol absolut) detektiert. Die quantitative Bestimmung des exogen zugesetzten SF in *Arabidopsis*-Keimlingen zeigte, nach Abzug der bereits endogen vorhandenen Menge an SF, einen Gehalt von 0,006 nmol absolut. Dies bedeutet, dass SF nahezu vollständig von den Keimlingen aufgenommen wurde. Da nahezu keine endogene Akkumulation von SF detektiert werden konnte, deutet dies auf eine sehr schnelle und fast vollständige (97 %) Verstoffwechslung von SF in den Zellen von *Arabidopsis*-Keimlingen hin.

Um die Aufnahme und dessen Rate von SF in die Keimlinge detaillierter zu charakterisieren, wurde eine Kinetik durchgeführt. Hierbei wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3% Zucker) angezogen und nach zehn Tagen mit 100 µM SF (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) unterschiedlich lange

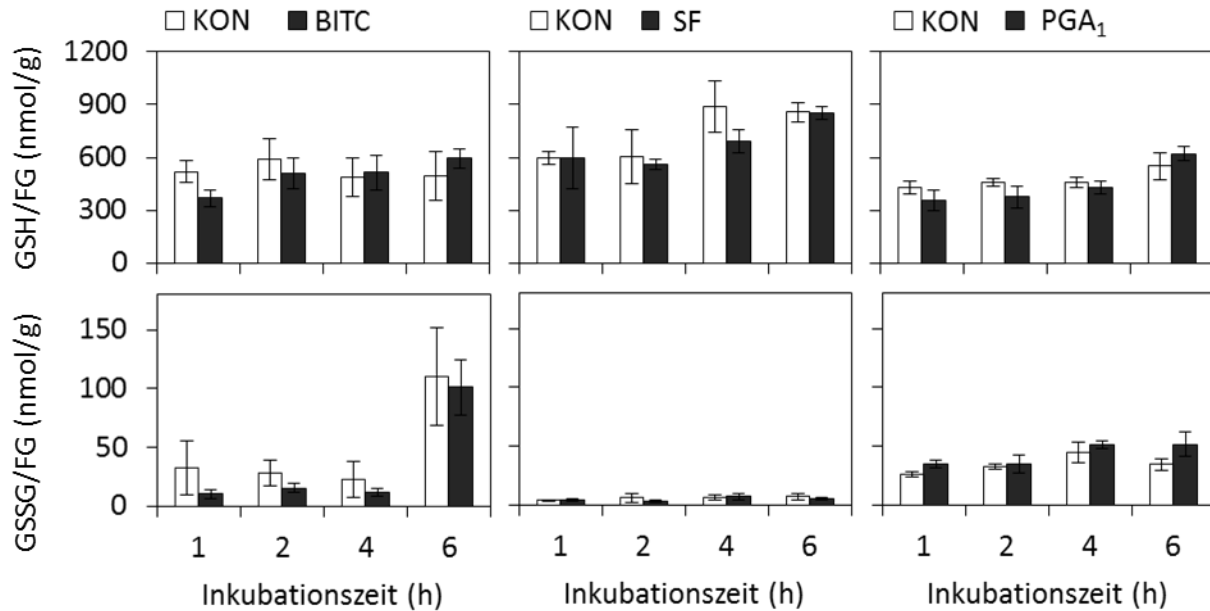
behandelt. Anschließend wurde der Gehalt an SF im Behandlungsmedium mittels UPLC-TOF analysiert. Abbildung 14 zeigt die zeitliche Abnahme von SF im Behandlungsmedium. Wie man erkennen kann, sind nach vier Stunden nur noch 15 % des zugegebenen SF-Gehalts im Medium detektierbar. Von den Pflanzen müssen also 85 % des zugegebenen SF aufgenommen worden sein. Es stellte sich in diesem Kontext die Frage, ob SF den Metabolismus der Pflanzen beeinflusst. Dabei konnte bei der ungerichteten Metabolom-Analyse das Konjugat von SF an Glutathion (GS-SF) als einer der Haupt-Metaboliten von SF nachgewiesen werden. Parallel zur Aufnahme von SF zeigte sich eine deutliche Akkumulation an GS-SF. Im Vergleich zu den basalen Werten stieg die relative Intensität von GS-SF nach vier Stunden Behandlung mit SF um das 121-Fache an. Nach 24 Stunden war der Wert auf das 78-Fache gesunken. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die absolute Menge an SF im Behandlungsvolumen wichtiger ist als die eingesetzte Konzentration.



**Abbildung 14:** SF Aufnahme und Metabolismus von SF in zehn Tage alten Col-0-Keimlingen. Die Keimlinge inkubierten unterschiedlich lange in 3 %-igen Zucker-MS-Medium, welchem 50 nmol SF zugesetzt war. Als Kontrolle (KON) wurde eine SF-Lösung, welche für 24 Stunden ohne Keimlinge inkubierte, verwendet. Anschließend wurden die Keimlinge in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde der Gehalt an SF im Medium (schwarze Balken) sowie die relative Intensität von SF-GSH in den Keimlingen (weiße Balken) analysiert (MW±SD, n=3).

### 3.2.2 Niedrige Konzentrationen an RES ändern das Redox-Potential nicht

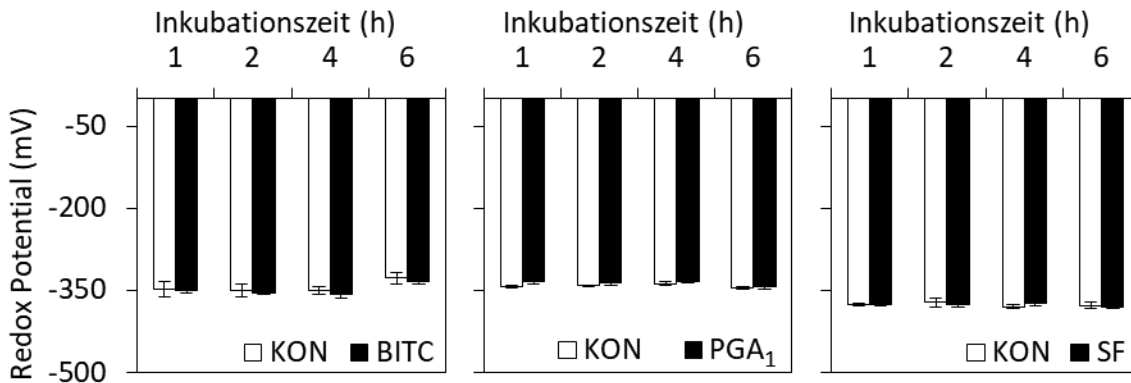
Andersson et al. (2015) konnten eine konzentrationsabhängige Depletion des Glutathion-Pools nach exogener Zugabe von SF zu *Arabidopsis*-Keimlingen sowie eine Änderung des Redox-Potentials zu positiveren Werten beobachten. In der vorliegenden Arbeit konnten nach exogener Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  SF eine Konjugation von SF an GSH detektiert werden (siehe 3.2.1). Um zu überprüfen, ob die unter 3.1 beobachtete Genregulation über eine Änderung des Redox-Potential vermittelt wird, wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500  $\mu\text{l}$  MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach zehn Tagen mit den gleichen Bedingungen behandelt wie in der Transkriptomanalyse. Zudem wurden zwei kürzere Zeitpunkte (ein und zwei Stunden) sowie ein längerer Zeitpunkt (sechs Stunden) getestet. Die Behandlung erfolgte in Kooperation mit Amelie Unzner sowie Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Bachelor- und Masterarbeit. Nach den in Abbildung 15 dargestellten Behandlungszeitpunkten wurde die Gesamtmenge an Glutathion extrahiert und mittels UPLC-TOF analysiert. Die Gehalte an reduziertem sowie oxidiertem Glutathion sind in Abbildung 15 zu sehen. Unter Kontrollbedingungen lag der basale GSH-Gehalt bei  $500 \pm 100$  nmol/g FG. Bei den getesteten RES kann man sehen, dass die Behandlung mit den gewählten Konzentrationen zu keiner Änderung des GSH-Gehalts im Vergleich zur Kontroll-Behandlung führte. Der GSH-Pool blieb sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit der RES relativ konstant (Unzner, 2017; Gerhards, 2017). Dies ist auch bei dem vier-Stunden-Wert zu beobachten, welcher dem Zeitpunkt der unter 3.1.3 beschriebenen Transkriptomanalyse entspricht. Gleiches gilt für den GSSG-Spiegel. Unter Kontrollbedingungen machte er maximal 10 % des GSH-Gehalts aus. Nach Zugabe der RES konnte ebenso keine Akkumulation von GSSG beobachtet werden (Gerhards, 2017; Unzner, 2017). Der sechs-Stunden-Wert von GSSG nach BITC-Behandlung liegt deutlich über dem in der Literatur publizierten Gehalt an GSSG im Vergleich zu GSH (Noctor et al., 2012), weshalb dieser Wert als Ausreißer zu betrachten ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gewählten Konzentrationen an RES weder zu einer Depletion des GSH-Pools noch zu einer Erhöhung des GSSG-Pools führen.



**Abbildung 15:** Endogener Gehalt an oxidiertem (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  BITC, 100  $\mu\text{M}$  SF und 75  $\mu\text{M}$   $\text{PGA}_1$ . Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker (KON) verwendet. Die Keimlinge inkubierten für 1, 2, 4 sowie 6 Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ,  $n=4$ ). Daten entnommen aus Gerhards, 2017; Unzner, 2017.

Da Andersson et al. (2015) 30 Minuten nach Infiltration von *Arabidopsis*-Blättern mit 100  $\mu\text{M}$  SF eine deutliche Erhöhung des Redox-Potentials beobachten konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit das Redox-Potential bestimmt. Dazu wurde dieses aus den gemessenen Glutathion-Gehalten mittels der unter 1.4 beschriebenen Nernst-Gleichung berechnet. Da wie oben beschrieben sowohl konstante GSH als auch GSSG Werte detektiert wurden, konnte nach RES-Gabe wie erwartet keine Änderung des Redox-Potentials verzeichnet werden (Abbildung 16). Unter Kontrollbedingungen schwankte das Redox-Potential bei allen Zeitpunkten gleich um  $-350$  mV. Die Zugabe der RES führte im Verlauf der Kinetik zu keiner signifikanten Änderung (Gerhards, 2017; Unzner, 2017).





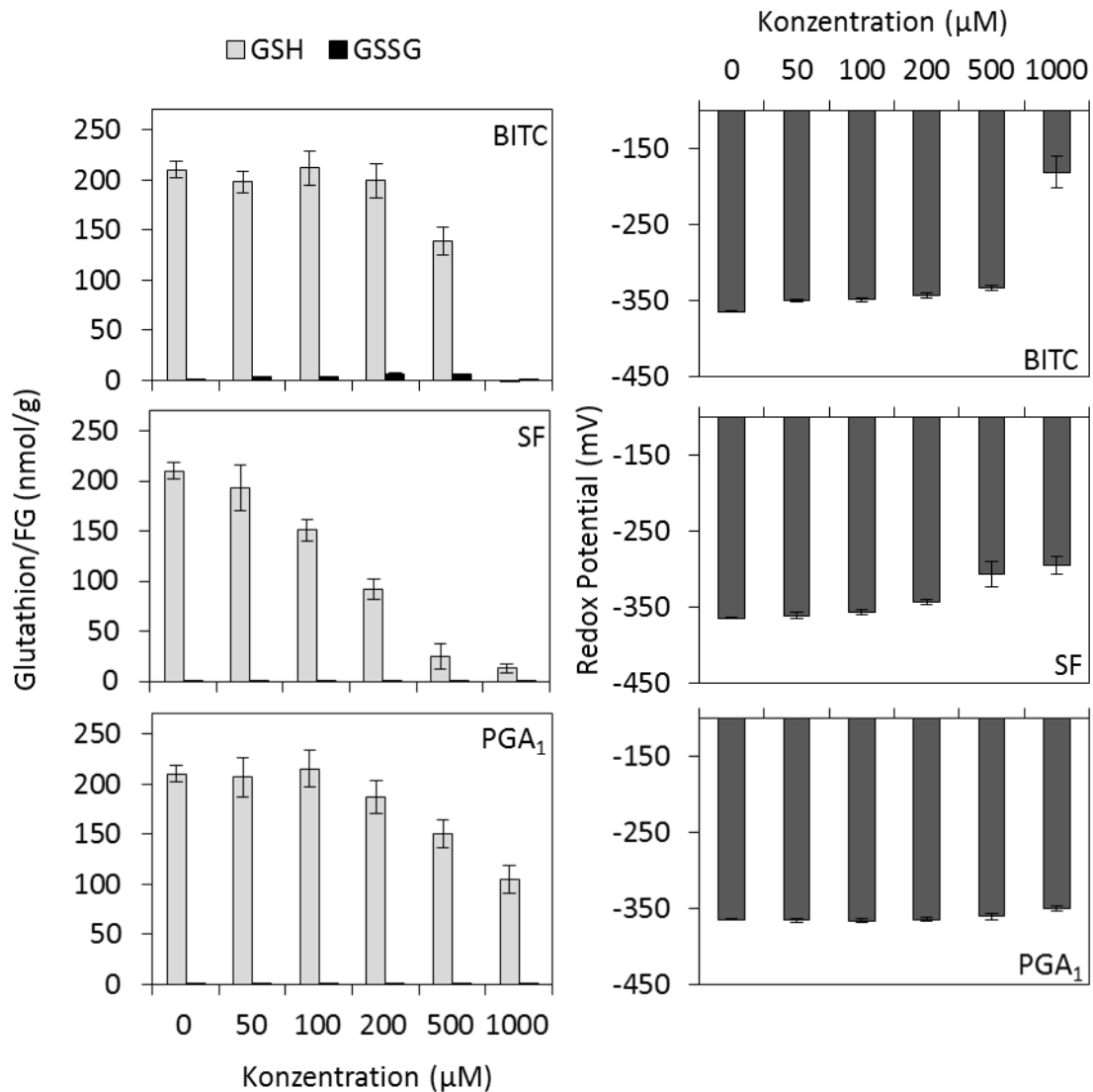
**Abbildung 16:** Das berechnete Redox-Potential von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit 100  $\mu$ M BITC, 100  $\mu$ M SF und 75  $\mu$ M PGA<sub>1</sub>. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker (KON) verwendet. Die Keimlinge inkubierten für 1, 2, 4 sowie 6 Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff gefroren (MW $\pm$ SD, n=4). Daten entnommen aus Gerhards, 2017; Unzner, 2017.

### 3.2.3 Konzentrationsabhängige Änderung des Redox-Potentials durch RES

Da eine Konzentration von 100  $\mu$ M der RES zu keiner Änderung im Gehalt an GSH und des Redox-Potentials führte, wurden nun in Kooperation mit Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit weitere Konzentrationen der RES untersucht. Für eine bessere Einordnung der Daten wurde dazu der gleiche Zeitpunkt (vier Stunden) wie in der Transkriptomanalyse gewählt. Dazu wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500  $\mu$ l MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach zehn Tagen mit verschiedenen Konzentrationen von SF, BITC und PGA<sub>1</sub> (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) für vier Stunden versetzt. Die Analyse der Glutathion-Gehalte und des Redox-Potentials sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei allen getesteten RES konnte eine konzentrationsabhängige Depletion der GSH-Konzentration verzeichnet werden. Hierbei zeigten sich jedoch Unterschiede bei der Wirkung der RES. Während 500  $\mu$ M der ITCs bereits einen deutlichen Effekt auf den GSH-Gehalt hatten, führte dieselbe Konzentration an PGA<sub>1</sub> hingegen nur zu einer leichten Erniedrigung. Nach Behandlung mit 500  $\mu$ M SF sank der Gehalt von 168 nmol/g FG auf 45 nmol/g FG. Die gleiche Konzentration an BITC bewirkte eine ähnlich starke Erniedrigung auf 68 nmol/g FG. PGA<sub>1</sub> hingegen bewirkte nicht mal eine Halbierung des GSH-

Gehalts. Die GSH-Konzentration sank auf das 0,6-Fache. Alle getesteten RES bewirkten nach Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Abfall der GSH-Menge im Vergleich zur Kontrollbedingung. Gleichzeitig stieg das berechneten Redox-Potential um 80 mV bei SF und um 150 mV bei BITC an. Bei  $\text{PGA}_1$  hatte diese Konzentration keinen Effekt auf das Redox-Potential. Die Gehalte an GSSG waren bei allen Behandlungen sehr niedrig (unter 1 % des GSH Gehaltes) und blieben über den gesamten Konzentrationsbereich konstant (Gerhards, 2017).

Insgesamt ist in Abbildung 17 zu erkennen, dass bei Konzentrationen, welche eine Genregulation bewirken, keine signifikanten Änderungen sowohl des GSH-Gehalts als auch des berechneten Redox-Potentials zu verzeichnen waren. Dies erfolgte erst substanzabhängig bei höheren Konzentrationen.



**Abbildung 17:** Endogener Gehalt an oxidiertem (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) sowie das berechnete Redox Potential von zehntägigen Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an BITC, SF sowie PGA<sub>1</sub>. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker verwendet. Die Keimlinge inkubierten für vier Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren (MW±SD, n=6). Daten entnommen aus Gerhards, 2017.

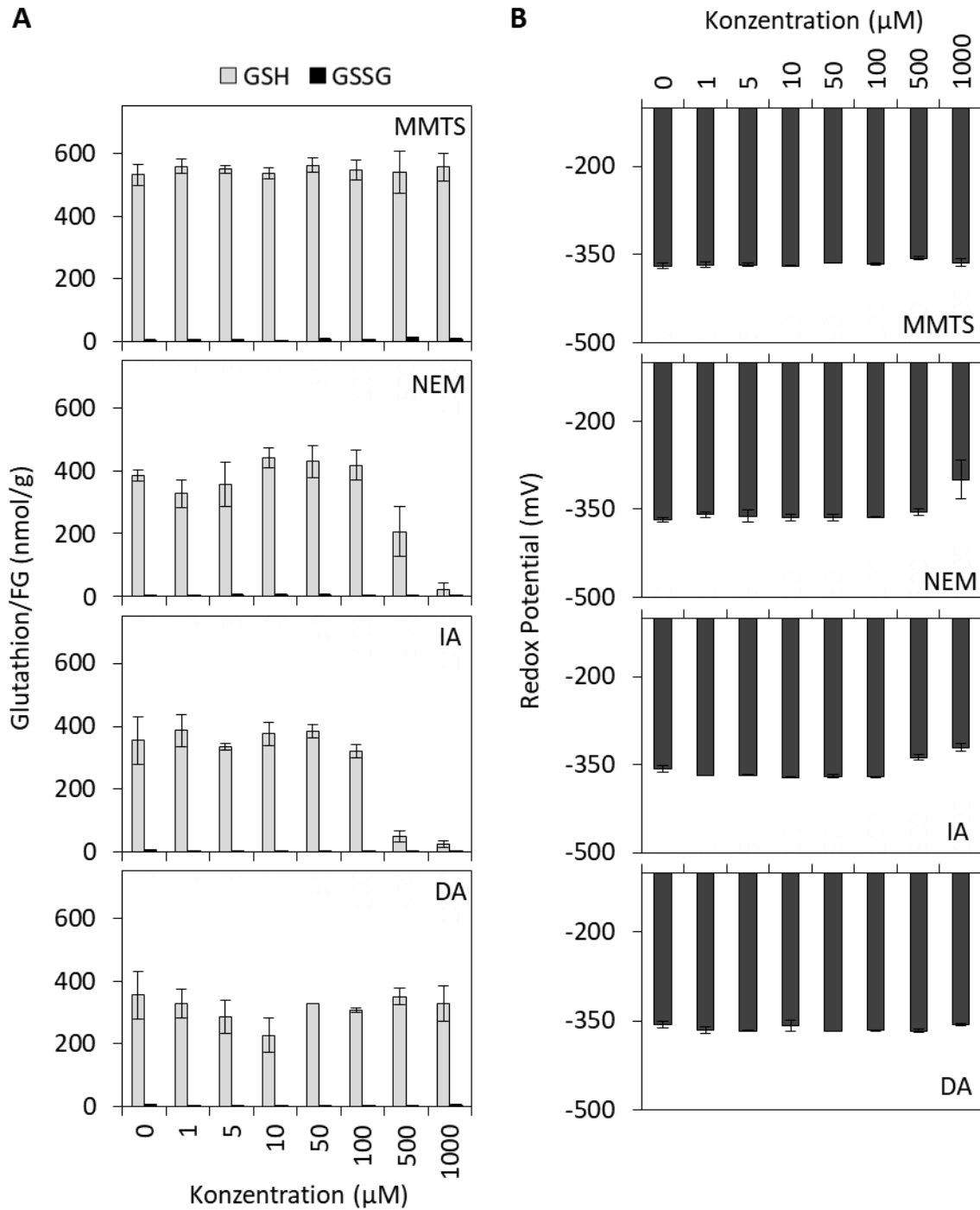
### 3.2.4 Konzentrationsabhängige Änderung des Redox-Potentials durch Thiol-Reagenzien

Die getesteten RES wiesen alle eine Thiol-Reaktivität auf und führten substanzabhängig zu einer Depletion des GSH-Pools (siehe Abbildung 17). Um zu überprüfen, ob die Depletion von der Thiol-Reaktivität abhängig ist, wurden weitere Thiol-modifizierende Substanzen getestet. Die gewählten Chemikalien können alle Cystein-Reste auf unterschiedliche Weisen blockieren. Das

Alken N-Ethylmaleimid (NEM) besitzt wie  $\text{PGA}_1$  einen Cyclopentenon-Ring mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe, welche über Michael-Addition kovalent mit Thiolen reagieren kann. Das RES Iodacetamid (IA) hingegen modifiziert kovalent das Thiolat-Anion über nukleophile Substitution ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ). Methyl-Methanethiosulfonat (MMTS) besitzt zwar keine reaktiven elektrophilen Eigenschaften, blockiert aber reversibel Cystein durch S-Thio-Methylierung und kann somit ebenfalls einen Einfluss auf das Redox-Potential nehmen. Im Vergleich dazu wurde das Oxidationsmittel Diamid (DA) ausgewählt, welches zur Glutathionylierung sowohl von Thiol-Gruppen in Proteinen als auch von GSH und somit zur Oxidation von GSH zu GSSG führt. Durch Oxidation von GSH zu GSSG nimmt es direkt Einfluss auf das zelluläre Redox-Gleichgewicht. Findling et al. (2018) testeten bereits diese Substanzen auf ihre biologische Aktivität im *GST6::Luc* System. Es zeigte sich, dass MMTS und IA die *GST6::Luc* Aktivität kaum bis gar nicht induzierten. NEM führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion und DA aktivierte den Promoter erst ab einer Konzentration von 2 mM (Findling et al., 2018).

In Kooperation mit Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500  $\mu\text{l}$  MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach zehn Tagen mit verschiedenen Konzentrationen der oben genannten Thiol-Reagenzien (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) für vier Stunden versetzt. Die Analyse der Glutathion-Gehalte sowie des Redox-Potentials sind in Abbildung 18 dargestellt. Wie man erkennen kann, führte sowohl MMTS als auch DA weder zu einer Erniedrigung des GSH-Gehaltes noch zu einer Änderung des Redox-Potentials. NEM bewirkte ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  eine Depletion des GSH-Gehaltes, welcher anschließend konzentrationsabhängig sank. Bei 1000  $\mu\text{M}$  NEM war der GSH-Spiegel bis auf 22 nmol/g FG gesunken. Ab dieser Konzentration konnte ebenfalls eine Änderung des Redox-Potentials zu deutlich positiveren Werten beobachtet werden: es stieg von  $-368$  mV auf  $-300$  mV. IA führte bereits bei 100  $\mu\text{M}$  zu einer leichten Änderung des GSH-Gehaltes. Ab 500  $\mu\text{M}$  betrug der GSH-Gehalt nur noch ein Siebtel des Basalwertes und bei 1000  $\mu\text{M}$  war der Gehalt auf das 13,8-Fache der Basalmenge gesunken. In gleicher Weise stieg der Wert des Redox-Potentials von  $-356$  mV auf  $-320$  mV (Gerhards, 2017). Wie erwartet, führte die Behandlung mit den Thiol-reaktiven

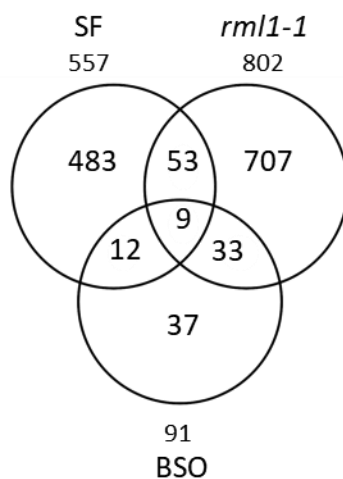
Substanzen IA und NEM zu einer Änderung des Redox-Potentials. Warum nach Zugabe von MMTS keine Änderung gemessen werden konnte, kann daran liegen, dass MMTS ebenfalls in der GSH-Extraktionsmethode verwendet wird. Findling et al. (2018) konnten im GST6::*Luc*-System zeigen, dass DA erst ab einer Konzentration von 2 mM biologisch aktiv ist. Daher könnten die in diesem Versuch verwendeten Konzentrationen zu gering gewesen sein.



**Abbildung 18:** Endogener Gehalt an reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) (A) und das berechnete Redox-Potential (B) von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit unterschiedlichen Thiolreagenzien (MMTS, NEM, IA sowie DA). Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 3 % Zucker verwendet. Die Keimlinge inkubierten für vier Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren (MW $\pm$ SD, n=3). Daten entnommen aus Gerhards, 2017.

### 3.2.5 SF- und BITC-induzierte Genregulierung ist keine Folge einer Senkung des GSH-Gehalts

In der Literatur sind zwei Transkriptomanalysen beschrieben, die eine GSH-abhängige Genregulierung zeigen: zum einen die Untersuchung der GSH-defiziten *root meristemless 1-1* (*rm1-1*) Mutante sowie zum anderen die Erniedrigung des GSH-Gehalts durch exogene Zugabe von BSO (Schnaubelt et al., 2015; Koprivova et al., 2010). In beiden Analysen wurde eine Vielzahl an Genen differentiell reguliert. Durch einen Vergleich der publizierten Daten mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse von SF sollten nun Gene identifiziert werden, welche als Marker Gene für niedrige GSH-Gehalte fungieren können. Es wurden nur Gene berücksichtigt, welche eine mindestens zweifache Induktion zeigten. Die durchgeführte VENN-Analyse ist in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigte sich nur eine sehr geringe Überlappung an gemeinsam regulierter Gene. Nur 13 % der SF-induzierten Gene sind ebenfalls in *rm1-1* sowie nach BSO-Behandlung erhöht. Die *rm1-1* Mutante sowie die BSO-Behandlung zeigten eine gemeinsame Induktion von 33 Genen, welche nicht durch SF reguliert wurde. In dieser Teilmenge befanden sich unter anderem eine Glucosyltransferase (UGT74E2) sowie ein cytosolisches Thioredoxin vom h-Typ (TH8), welche in Kooperation mit Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit anschließend auf ihre Expression nach exogener Gabe von SF und BITC analysiert wurden.

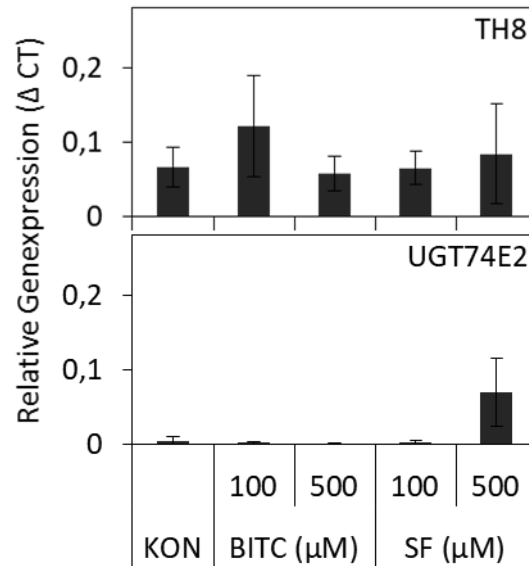


**Abbildung 19:** VENN-Diagramme zum Vergleich hochregulierter Gene. Der *in silico* Vergleich wurde mit eigenen Transkriptomdaten von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen, behandelt mit 100  $\mu$ M SF für vier Stunden, mit sieben Tagen alten *rm1-1* Mutanten (Schnaubelt et al.2015) sowie sechs Tage alten Col-0-Keimlinge nach Inkubation in 1,25 mM BSO (Koprivova et al. 2010) durchgeführt ( $f_c < 2$ ,  $p\text{Value} < 0,05$ ).

Zur Untersuchung dieser potentiellen Markergene wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach zehn Tagen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der beiden ITCs (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) für vier Stunden versetzt. Zum einen wurde eine Konzentration gewählt (siehe 3.2.3), welche keinen Einfluss auf den GSH-Gehalt hatte und zum anderen eine weitere Konzentration, welche zu einer deutlichen Reduktion des GSH-Gehalts sowie zu einer Änderung des Redox-Potentials führte. Nach RNA-Isolation wurde die Expression von *TH8* und *UGT74E2* mittels qPCR analysiert. In Abbildung 20 kann man deutlich erkennen, dass beide Gene durch exogene Gabe von 100 µM der ITC nicht induziert wurden. Die Transkriptmenge von *TH8* änderte sich auch nicht bei einer Konzentration von 500 µM BITC bzw. SF. Die Expression von *UGT74E2* hingegen zeigte eine deutliche Erhöhung nach Behandlung mit 500 µM SF, nicht jedoch bei derselben Menge an BITC (Gerhards, 2017). Dies steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass diese Gene hauptsächlich durch die Änderung des Redox-Potentials reguliert werden, da BITC bei dieser Konzentration nachweislich ebenfalls zu einem positiveren Redox-Potential führte. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich weder *TH8* noch *UGT74E2* als Markergene für einen auf chemischem Weg reduzierten GSH-Spiegel eignen.

Zusammenfassend mit den vorherigen Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Regulation der Genexpression nach Behandlung mit den beiden ITCs SF und BITC nicht von einem erniedrigten GSH-Gehalt abhängig ist. Möglicherweise spielt dieser Mechanismus erst bei ITC Konzentrationen eine Rolle, welche hoch genug sind für eine Depletion des GSH-Gehalts und eine Änderung des Redox-Potentials.





**Abbildung 20:** Genexpressionsanalyse von TH8 sowie UGT74E2 bezogen auf Actin2/8 mittels quantitativer *real-time* PCR von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit BITC und SF. Als Kontrolle (KON) wurde 1 %-iges MeOH in 3 %-igem Zucker-MS-Medium verwendet. Die Keimlinge inkubierten für vier Stunden in den entsprechenden Lösungen und wurden anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren (MW±SD, n=4). Daten entnommen aus Gerhards, 2017.

Die gewonnenen Daten widersprechen der Hypothese der RES-vermittelten Genregulation durch Depletion des GSH-Gehaltes und Senkung des Redox-Potentials. Jedoch ist anzumerken, dass die Daten vier Stunden nach RES-Gabe erhoben wurden. Die Daten können dadurch nicht widerspiegeln, ob eine Depletion von GSH durch 100 μM RES durch Neusynthese wieder kompensiert wurde. Die alternative Hypothese der kovalenten Modifikation von Zielproteinen als möglicher Mechanismus wird in der Diskussion unter Abschnitt 4.2 näher erläutert.

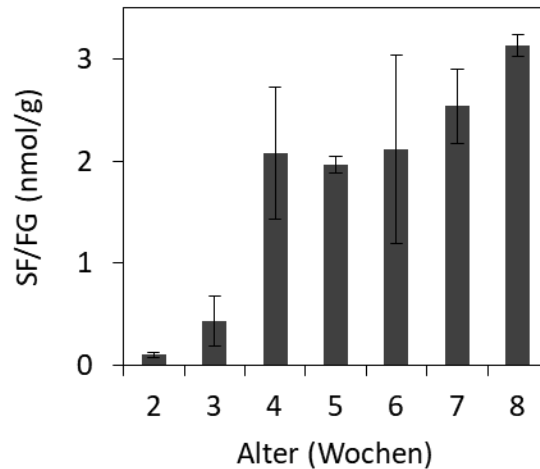
### 3.3 Physiologische Bedeutung von SF als Signalmolekül

Neben dem Erkennungs- und Signaltransduktionsmechanismus für RES ist auch die biologische Bedeutung von RES für die Vermittlung einer Stresstoleranz noch weitgehend unklar. Gründe hierfür sind zum einen, dass eine Vielzahl an strukturell verschiedenen RES in Pflanzen existiert und zum anderen, dass kein Sensor-Protein bekannt ist. Es stellt sich die Frage, ob nach Stress relevante RES-Konzentrationen erreicht werden können und inwieweit die RES-induzierte Genregulation zur Re-Programmierung der Genexpression nach Stress beiträgt.

SF eignet sich in der vorliegenden Arbeit als Model-RES, um die Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation zu untersuchen, da bei Stresseinwirkung ITCs in hohen Konzentrationen vorliegen (Andersson et. al., 2015). Zudem existieren unterschiedliche GS-Biosynthese Mutanten, welchen die Fähigkeit fehlt aliphatische ITCs zu generieren. Der *myb28myb29*-Mutante fehlen die Myeloblastosis-TF (MYB) MYB28 und MYB29. Sie kann somit keine aliphatischen GL und folglich SF synthetisieren (Beekwilder et al., 2008; Søndersby et al., 2010). Eine weitere Mutante, die *tgg1tgg2* Mutante, zeigt einen Defekt in den beiden Myrosinase-Genen. Ihr fehlt somit die Thioglykosidase-Aktivität um SF und andere GS Abbauprodukte herzustellen (Barth and Jander, 2006).

### **3.3.1 Charakterisierung der SF-Induktion durch Verwundung**

Zur Charakterisierung der SF-Induktion durch Verwundungsstress wurden zunächst in Kooperation mit Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit Basalwerte von SF in intakten Pflanzen bestimmt. Zudem wurde überprüft, ob der Gehalt an SF vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig ist. Dazu wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf Erde angezogen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die Analyse von zwei und drei Wochen alten Keimlingen erfolgte mit Keimlingen in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker). Die Extraktion von SF erfolgte wie unter 2.10.1.1 beschrieben. Die SF-Gehalte wurden anschließend mittels UPLC-MS/MS quantifiziert. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, liegt der basale Gehalt von SF in zwei bzw. drei Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlingen bei 0,1 bis 0,4 nmol/g FG. Ältere *Arabidopsis*-Pflanzen (vier bis acht Wochen alt) zeigten einen noch höheren endogenen Gehalt an SF von 2–3 nmol/g FG (Gerhards, 2015). Diese Ergebnisse überraschen, da laut der Hypothese der Senfölglykosid-Bombe eine Generierung von SF erst durch einen vorangegangenen Verlust der Zellintegrität möglich ist (Wittstock and Burow, 2010). Aufgrund mangelnder adäquater Kontrollen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Ernte oder Aufarbeitung der Proben eine Hydrolyse von Glucoraphanin und dementsprechend SF-Bildung stattfand.



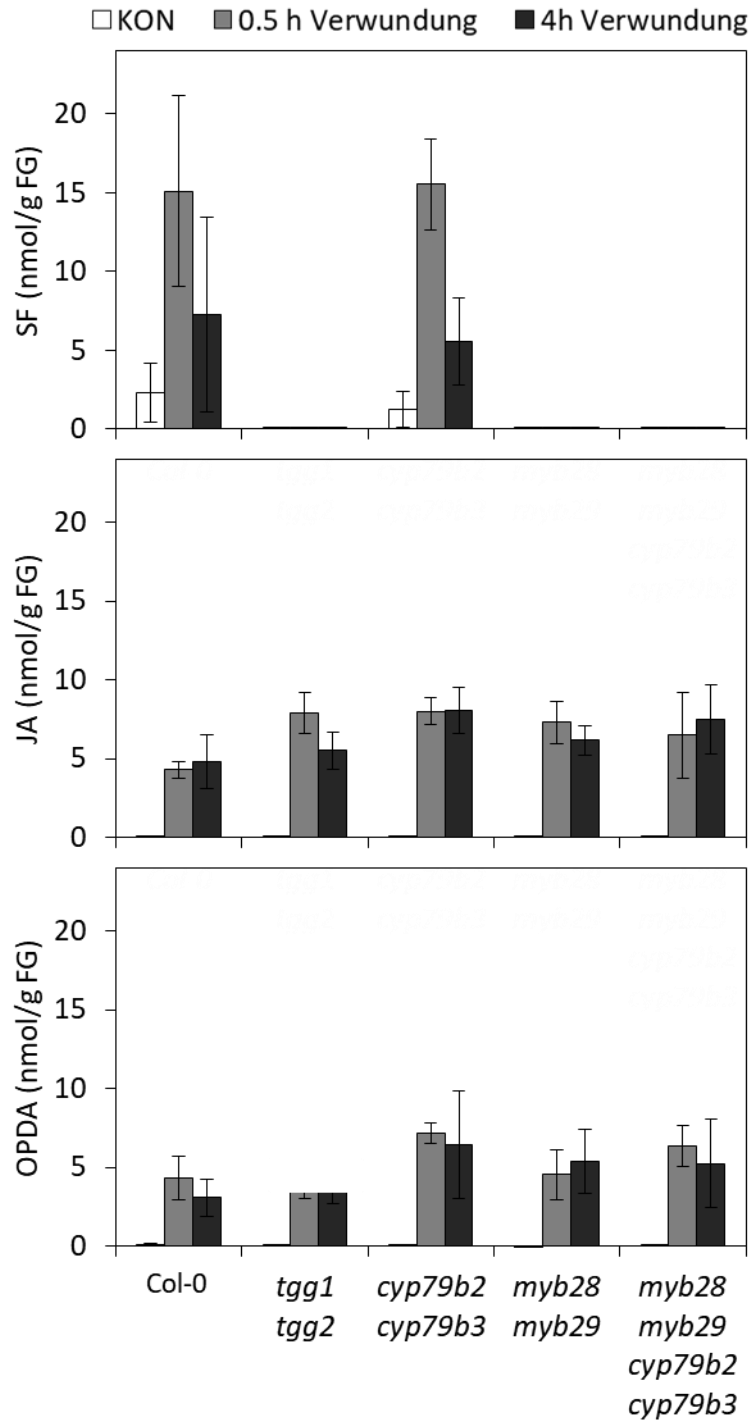
**Abbildung 21:** Basaler, endogener Gehalt an SF in Col-0-Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Zur Analyse der zwei sowie drei-Wochen alten Pflanzen wurde das Keimlingssystem verwendet, Pflanzen im Alter von vier bis acht Wochen wurden auf Erde angezogen (MW $\pm$ SD, n=3). Daten entnommen aus Gerhards, 2015.

Wie unter 1.1.4 beschrieben, führt eine Gewebeerstörung und ein Verlust der zellulären Integrität zur Bildung von SF. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Stress der Verwundung als Stressbedingung gewählt, um endogen eine deutliche Bildung von SF in *Arabidopsis* zu induzieren. Um den zeitlichen Verlauf der SF Generierung nach Verwundung zu charakterisieren, wurden die Rosettenblätter von sechs Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen wie unter 2.8.3 beschrieben einmal längs der Mittelrippe mittels einer Pinzette verwundet und zu zwei Zeitpunkten (0,5 und 4 Stunden) geerntet. Als Kontrolle wurden unverwundete Blätter geerntet. Neben Col-0 wurden zudem *myb28myb29* und *tgg1tgg2* Mutanten untersucht, welche in der Synthese von SF defizient ist. Zum Vergleich wurden weiterhin die *cyp79b2cyp79b3*-Mutante, welche keine indolischen GS produzieren kann, sowie die Quadrupel-Mutante *myb28myb29/cyp79b2cyp79b3*, welche weder aliphatische als auch indolische GS bilden kann, getestet. Weiterhin wurden zur Charakterisierung der Wundreaktion die Phytohormone JA und OPDA analysiert. Diese Jasmonate spielen eine bedeutende Rolle bei der pflanzlichen Abwehr von Herbivoren. Ihr Gehalt kann innerhalb von Sekunden nach Verwundung auf das 500-Fache des Basalwertes ansteigen (Buseman et al., 2006; Acosta and Farmer, 2010).

Die Analyse der Gehalte an SF sowie der Phytohormone JA und OPDA sind in Abbildung 22 dargestellt. Bereits 30 Minuten nach Verwundung war ein deutlicher Anstieg des SF Gehalts in Col-0 und *cyp79b2cyp79b3* auf jeweils 15 nmol/g FG zu verzeichnen. Das ist im Wildtyp eine Akkumulation um das 6-Fache des Basalwertes, in der Mutante sogar um das 12-Fache. In beiden Genotypen war der Gehalt an SF nach weiteren 3,5 Stunden wieder leicht gesunken. So betrug der SF Gehalt in Col-0 Pflanzen nach vier Stunden 7,2 nmol/g FG und in der *cyp79b2cyp79b3* Mutante 5,5 nmol/g FG. Da die gemessenen SF-Gehalte die Gehalte integriert über das gesamte Blatt widerspiegeln, SF aber am Ort der Verwundung gebildet wird, müssen dort lokal noch deutlich höhere SF-Konzentrationen nach Verwundung vorliegen. In den andern untersuchten Genotypen konnte wie erwartet sowohl basal als auch nach Verwundung kein SF detektiert werden.

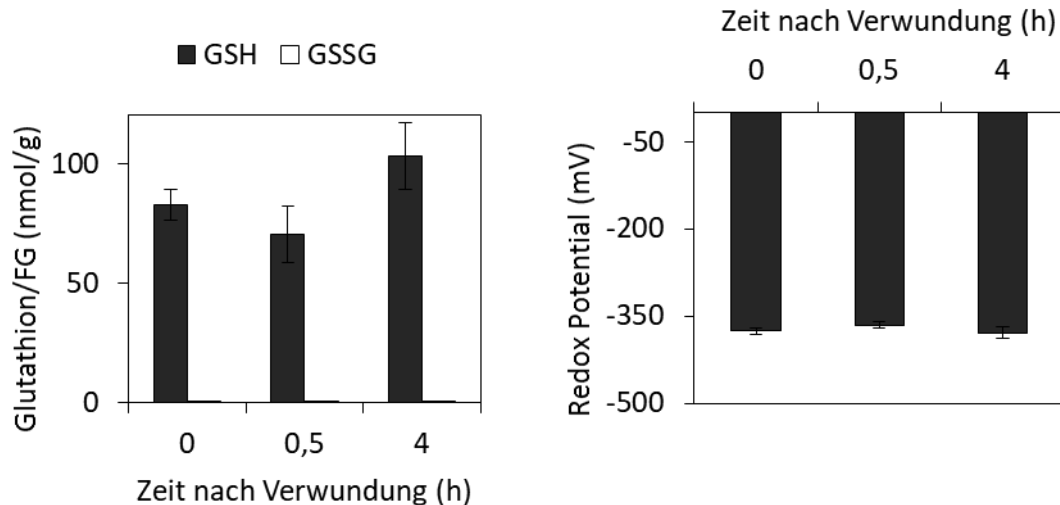
Die Analyse der Phytohormone zeigte in allen Genotypen wie erwartet eine deutliche Induktion der JA- und OPDA-Gehalte und blieb auch nach vier Stunden auf diesem hohen Niveau. Im Vergleich zum SF-Gehalt war die Menge der akkumulierten Phytohormone jedoch deutlich geringer, so erreichte JA Werte von 4–8 nmol/g FG und OPDA 3–7 nmol/g FG. Dies deutet darauf hin, dass in allen Genotypen eine Verwundungsreaktion von ähnlicher Stärke stattgefunden hat.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bereits 30 Minuten nach Verwundung der Gehalt an SF den 3-fachen Gehalt von OPDA erreichte. Dagegen wies OPDA nach vier Stunden immer noch erhöhte Werte auf, wohingegen SF in der gleichen Zeit wieder auf die Hälfte des induzierten Wertes gesunken war. Ziel dieses Experiments war, relevante SF-Konzentrationen zu erreichen, welche zur Genregulation führen können (50–100  $\mu$ M). In der vorliegenden Arbeit wurden maximal 15 nmol/g FG erreicht, was deutlich geringer ist, als die bei Andersson et al., (2015) gemessenen Werte von 180 nmol/g FG nach Pathogen-Infektion. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen sein, dass zum getesteten Zeitpunkt ein großer Teil des gebildeten SF bereits weiter verstoffwechselt worden ist. Zum anderen konnten in Kooperation mit Julian Gerhards in der von mir betreuten Masterarbeit SF-Werte von bis zu 50 nmol/g FG erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass abhängig von den Verwundungsbedingungen auch höhere SF-Werte erreicht werden können.



**Abbildung 22:** Endogene Gehalte an SF sowie JA und OPDA in sechs Wochen alten Col-0-Pflanzen sowie *tgg1tgg2*, *cyp79b2cyp79b3*, *myb28myb29* Mutanten und der Quadrupel-Mutante *myb28myb29-cyp79b2cyp79b3* nach Verwundung. Die Rosettenblätter wurden mit einer Pinzette verwundet und nach 30 Minuten bzw. vier Stunden in flüssigen Stickstoff eingefroren. Als Kontrolle (KON) wurden unverwundete Blätter analysiert (MW±SD, n=6).

Zusätzlich wurden in Col-0 Pflanzen die Auswirkungen des Stimulus Verwundung auf das Redox-Potential überprüft. Die Analyse der Glutathion-Gehalte und des daraus berechneten Redox-Potentials ist in Abbildung 23 dargestellt. Durch die Verwundung konnte keine Erniedrigung des GSH-Gehaltes beobachtet werden. Auch das berechnete Redox-Potential zeigte keine Änderung und blieb über den Zeitraum der Beobachtung hinweg konstant bei ca. – 370 mV.



**Abbildung 23:** Endogener Gehalt an reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) sowie das berechnete Redox-Potential von sechs Wochen alten Col-0-Pflanzen nach Verwundung. Die Rosettenblätter wurden mit einer Pinzette verwundet und nach 30 Minuten bzw. vier Stunden in flüssigen Stickstoff eingefroren. Als Null-Stunden-Zeitpunkt wurden unverwundete Blätter analysiert (MW±SD, n=6).

### 3.3.2 Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation

Die Behandlung von Keimlingen mit SF führte zu einer klaren Induktion von Genen, welche an Entgiftungsprozessen, bei Hitzestress und bei der generellen Antwort von *Arabidopsis* auf Stress beteiligt sind (siehe Tabelle 13). Daher wurde eine mögliche Beteiligung von induziertem SF an der Regulation RES-induzierbarer Gene nach Verwundung überprüft. Dazu wurden Genexpressionsanalysen an verwundeten Pflanzen (siehe 3.3.1) durchgeführt. Nach RNA-Isolierung und reverser Transkription in cDNA erfolgte die quantitative Analyse der Expression ausgewählter Markergene. In Abbildung 24 sind die Expressionsspiegel der Gene dargestellt. Die relative Expression von *HSFA2*, *HSP17.6II* und *HSP26-5* wurden 30 Minuten nach Verwundung

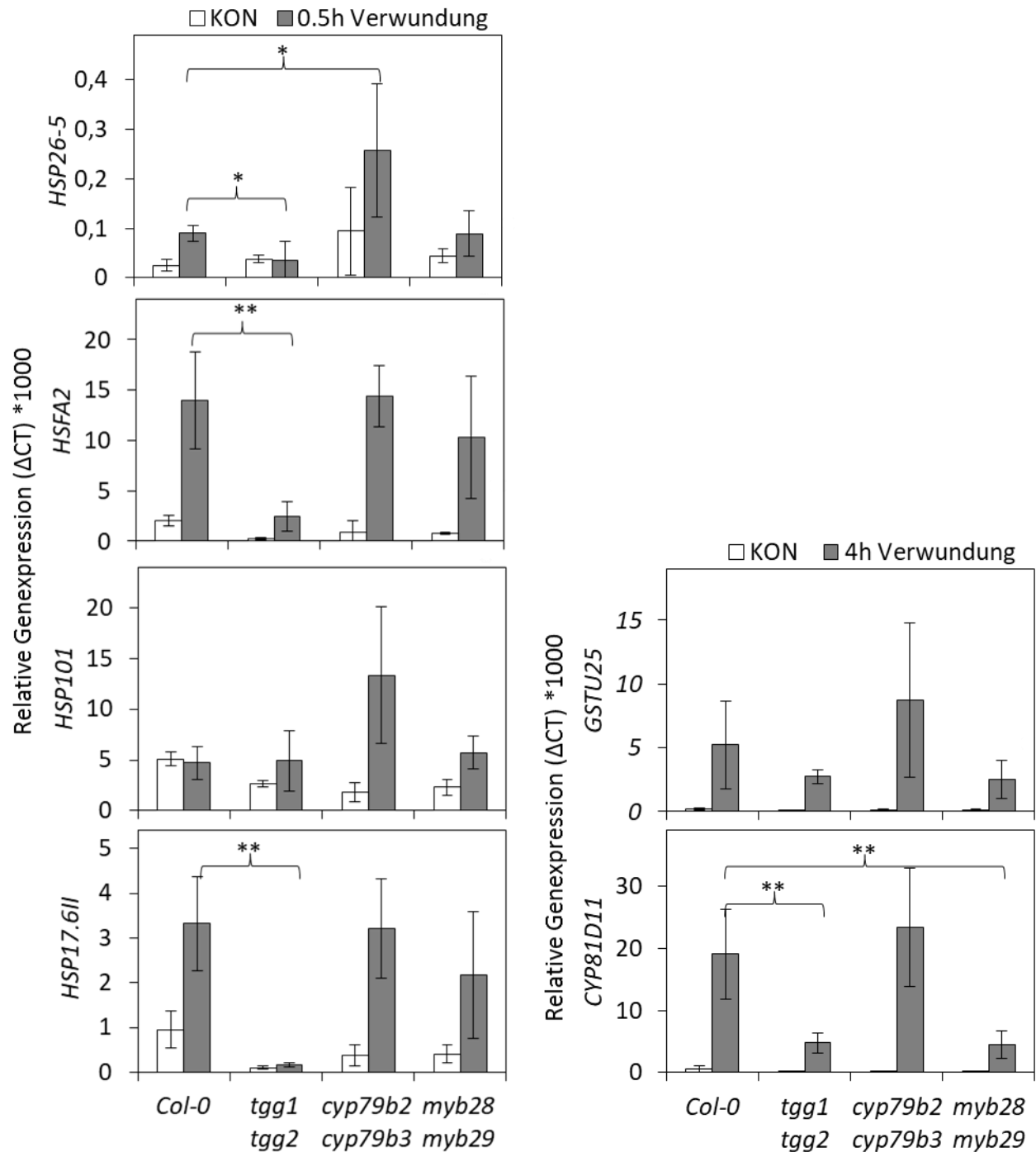
der Pflanzen bestimmt, da diese Gene eine schnelle und transiente Expression zeigen. *CYP81D11* sowie *GSTU25* wurden vier Stunden nach Verwundung analysiert.

Wie man erkennen kann, zeigte sich sowohl im Wildtyp als auch in der SF bildenden *cyp79b2cyp79b3* Mutante eine deutliche Akkumulation der *CYP81D11* Transkripte. In *tgg1tgg2* und *myb28myb29* hingegen ist eine sehr geringe Induktion zu erkennen. Ein ähnliches Muster mit jedoch geringerer Stärke zeigte sich ebenfalls bei *GSTU25*. Auch hier war nach Verwundung eine Akkumulation der *GSTU25*-Transkripte deutlich in Col-0 und in der *cyp79b2cyp79b3*-Mutante zu erkennen, jedoch unterschied sich die Induktion der Genexpression von Col-0 zu *tgg2tgg2* oder *myb28myb29* nicht signifikant.

Die Genexpression von *HSFA2*, *HSP26-5* sowie *HSP17.6II* wurde sowohl in Col-0 als auch in der *cyp79b2cyp79b3*-Mutante nach Verwundung deutlich induziert. In der Myrosinase-Mutante *tgg1tgg2* zeigte sich keine (*HSP26-5* und *HSP17.6II*) bzw. eine deutlich niedrigere (*HSFA2*) Induktion. Allerdings konnten für diese Gene in der *myb28myb29*-Mutante ebenfalls erhöhte Expressionslevel festgestellt werden. Da diese Mutante aufgrund fehlender aliphatischer GS ähnlich zur *tgg1tgg2* Mutante kein SF bilden kann, wurde erwartet, dass sich die differenzielle Regulation der Genexpression in den beiden Mutanten ähnlich verhält. Da die *myb28myb29* Mutante jedoch über eine intakte Myrosinase verfügt, können möglicherweise andere GS-Hydrolyse Produkte als SF bei der Genregulation eine Rolle spielen.

Die Genexpression von *HSP101* wurde durch Verwundung in Col-0-Pflanzen nicht induziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der SF-defiziten *tgg1tgg2*-Mutante die Induktion der Expression von *Cyp81D11*, *HSP17.7II*, *HSP26.5* sowie *HSFA2* durch Verwundung entweder deutlich erniedrigt ist bzw. überhaupt nicht stattfindet. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die durch Verwundung induzierten ITCs als Signal fungieren können, welches die Expression von einigen Genen in verwundeten Blättern regulieren.



**Abbildung 24:** Genexpressionsanalyse von *CYP81D11*, *HSP26-5*, *GSTU25*, *HSP101*, *HSFA2* sowie *HSP17.6II* bezogen auf Actin2/8 mittels quantitativer *real-time* PCR in sechs Wochen alten Col-0-Pflanzen sowie *tgg1/tgg2*-, *cyp79b2/cyp79b3*- und *myb28/myb29*-Mutanten nach Verwundung. Die Blätter wurden mit einer Pinzette verwundet und nach 30 Minuten (Hitze gene) bzw. vier Stunden (Detoxifizierungsgene) in flüssigen Stickstoff eingefroren. Als Kontrolle (KON) wurden unverwundete Blätter analysiert (MW±SD, n=6, T-Test unabhängiger Stichproben \*pValue<0,05; \*\*pValue<0,01).

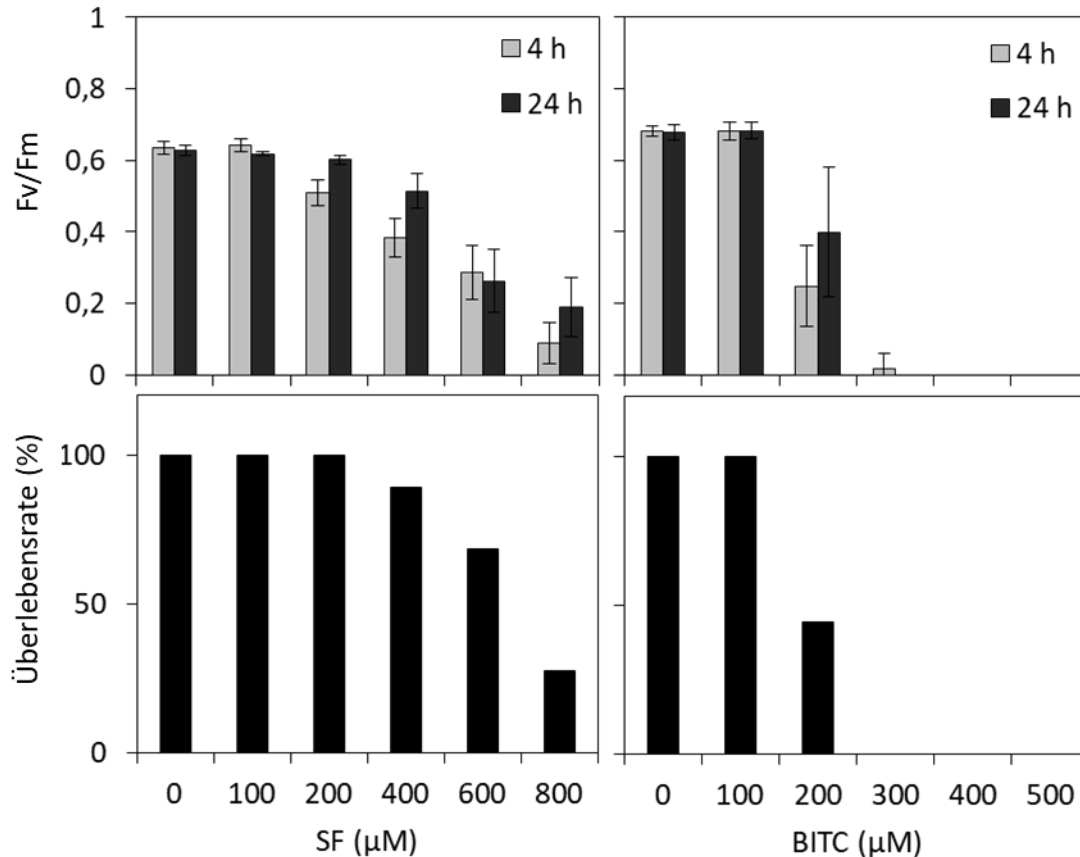


### 3.3.3 Bestimmung der Toxizität von SF und BITC

Untersuchungen zur biologischen Aktivität verschiedener RES-Oxylipine zeigten zytotoxische Effekte und eine hemmende Wirkung auf die Photosynthese (Mueller and Berger, 2009). Die Photosyntheseaktivität kann durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Parameter die maximale Quantenausbeute des PSII (Fv/Fm) betrachtet. Das Fv/Fm-Verhältnis stellt einen robusten Parameter zur Bestimmung der Fluoreszenz des PSII dar und fungiert als sensibler Indikator für die photosynthetische Effizienz der Pflanze (Björkman and Demmig, 1987; Krause and Weis, 1991). Noch bevor sichtbare Schäden an den Pflanzen erkennbar sind, liefert die Messung der Chlorophyllfluoreszenz Hinweise auf eine durch Stress ausgelöste Schädigung des PSII und somit auf toxische Effekte.

Zur Untersuchung der Toxizität der ITC SF und BITC wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge für zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der ITCs (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt. Der photosynthetische Parameter Fv/Fm wurde anschließend vier und 24 Stunden nach dem chemischen Stress bestimmt. Zudem wurde nach weiteren sieben Tagen die Überlebensrate der Keimlinge ausgezählt. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, liegt der Fv/Fm-Wert von nicht-gestressten Pflanzen bei ca. 0,65. Wie erwartet, wurde der Parameter Fv/Fm durch sub-toxische ITC-Konzentrationen von 100 µM nicht erniedrigt. Bei höheren Konzentrationen konnte sowohl für SF als auch für BITC eine konzentrationsabhängige Abnahme des Fv/Fm-Verhältnisses beobachtet werden. Hierbei wiesen die ITC deutliche Differenzen in ihrer Toxizität auf. Während der Parameter Fv/Fm nach Behandlung der Keimlinge mit 200 µM SF nach vier Stunden kaum erniedrigt wurde, führte dieselbe Konzentration an BITC zu einer drastischen Abnahme auf das 0,36. Ab einer Konzentration von 300 µM BITC sowie 800 µM SF lag die maximale Quantenausbeute des PSII unter der Detektionsgrenze. Eine erneute Messung des Parameters Fv/Fm nach 24 Stunden zeigte das gleiche Bild, wobei bei fast allen getesteten Konzentrationen ein leichter Anstieg der maximalen Quantenausbeute des PSII im Vergleich zum vier Stunden-Wert zu beobachten war. Die Überlebensrate, welche nach sieben Tagen bestimmt wurde, wies einen ähnlichen Verlauf wie

der Parameter  $F_v/F_m$  auf. Es bestätigt sich, dass die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  der ITCs für die Keimlinge nicht toxisch ist. Nach Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  BITC überlebten 44 % der Keimlinge. Ab einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  BITC waren die Blätter aller Keimlinge chlorotisch und es konnte kein Wachstum – also keine Ausbildung von grünen Folgeblättern – mehr festgestellt werden. Während die Behandlungen mit SF Konzentrationen von 100–600  $\mu\text{M}$  kaum bis leicht toxisch für die Keimlinge waren, zeigte bei einer Behandlung mit 800  $\mu\text{M}$  SF nur noch ein Drittel der Keimlinge ein Wachstum und konnte als lebend gezählt werden. Insgesamt ist in Abbildung 25 zu erkennen, dass bei beiden ITCs (SF sowie BITC) die Messung der Chlorophyllfluoreszenz und hierbei die Bestimmung der maximalen Quantenausbeute am PSII einen Hinweis auf die Überlebensrate liefert und beide ITCs diese konzentrationsabhängig beeinflussen.



**Abbildung 25:** Chlorophyll-Fluoreszenz sowie Überlebensrate von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen. Keimlinge wurden für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SF oder BITC mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Der Parameter Fv/Fm wurde vier sowie 24 Stunden nach der Behandlung bestimmt. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SE, n=8 für SF, n=24 für BITC). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>35 für SF, n>103 für BITC).

### 3.3.4 Chemisches Priming induziert Resistenz gegenüber BITC Intoxikation

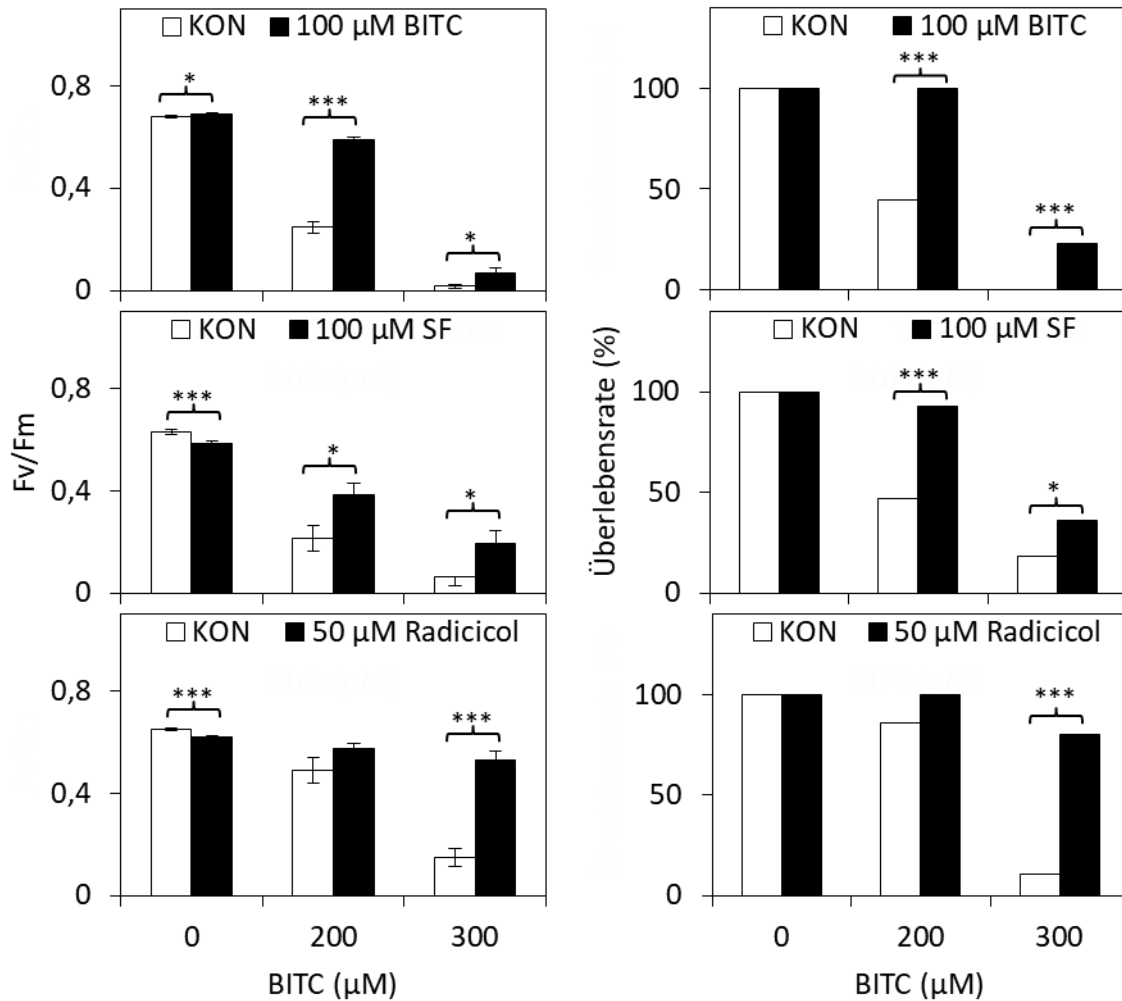
Eine Gewebeerstörung führt lokal zur Generierung hoher toxischer Konzentrationen von ITCs, welche in das umliegende gesunde Gewebe diffundieren und somit einen Konzentrationsgradienten um die Stelle der Verwundung aufbauen können. Es ist bekannt, dass RES zu einer Induktion von Abwehr- und Detoxifizierungsgenen führen (Mueller et al., 2008). Diese induzierte Erhöhung der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen durch unbedenkliche Substanzen wird im Pflanzenschutz in der Landwirtschaft als „Priming“ bezeichnet. Es stellt sich nun die Frage, ob die Geninduktion durch ITCs die Pflanze vor einer Selbstintoxikation schützen könnte.

Um dies zu testen, wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500  $\mu$ l MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach neun Tagen wurden die Keimlinge für 24 Stunden mit subtoxischen Konzentrationen der ITCs (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt. Anschließend wurden die Keimlinge mit toxischen Konzentrationen an BITC (200  $\mu$ M und 300  $\mu$ M), welche unter 3.3.3 bestimmt wurden, für zwei Stunden behandelt. Anschließend wurde der Parameter Fv/Fm sowie die Überlebensrate bestimmt. Neben SF und BITC wurden 50  $\mu$ M Radicicol, ein Inhibitor des Hitzeschock-Proteins 90 (HSP90), als „Priming-Substanz“ untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Radicicol zu einer Induktion von Genen der Hitzeschockantwort und einer erhöhten Thermotoleranz in *Arabidopsis thaliana* führt (Yamada et al., 2007).

In Abbildung 26 kann man sowohl bei der maximalen Quantenausbeute am PSII als auch bei der Überlebensrate einen signifikanten Unterschied zwischen RES-vorbehandelten- und Kontroll-Keimlingen erkennen. Während eine Behandlung mit 200  $\mu$ M BITC 40 % der Keimlinge überleben, verbesserte eine Vorbehandlung mit 100  $\mu$ M BITC sowie 100  $\mu$ M SF die Überlebensrate auf 100 %. Eine Vorbehandlung mit BITC konnte die Überlebensrate nach Behandlung mit der toxischen Dosis von 300  $\mu$ M BITC auf 22 % erhöhen. Die Vorinkubation mit SF führte bei der gleichen toxischen Behandlung mit BITC zu einer Erhöhung der Überlebensrate von 18 % auf 36 %. Dieser Effekt zeigte sich schon in der Bestimmung des Fv/Fm-Parameters vier Stunden nach dem chemischen Stress. Nach Gabe von 200  $\mu$ M BITC lag der Parameter Fv/Fm von vorbehandelten Keimlingen bei 85 % (BITC) bzw. 66 % (SF) im Vergleich zu 33 % der Kontrollbehandlung.

Ähnlich zur Vorbehandlung mit den ITCs verhielt sich das RES Radicicol, welches aufgrund seiner  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Carbonylgruppe starke elektrophile Aktivitäten besitzt. Eine Vorbehandlung der Keimlinge mit Radicicol erniedrigte den Parameter Fv/Fm nach 300  $\mu$ M BITC ebenso lediglich auf 85 %. Im Vergleich dazu führte die Kontrollbehandlung zu einer Senkung um 23 %. Die Überlebensrate war bei vorbehandelten Keimlingen im Vergleich zu Kontroll-Keimlingen ebenfalls signifikant erhöht (0,8-fach vs. 0,1-fach).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Keimlinge, welche zuvor mit niedrigen Konzentrationen der RES SF, BITC oder Radicicol behandelt wurden, sowohl eine höhere Überlebensrate als auch eine geringere Schädigung des PSII nach BITC-Behandlung aufweisen als nicht-vorbehandelte Keimlinge. Somit kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass ITCs und möglicherweise weitere Thiol-reaktive RES Pflanzen vor selbst-produzierten, toxischen ITC Konzentrationen, wie sie lokal bei Gewebszerstörungen vorkommen, schützen können.



**Abbildung 26:** Überlebensrate sowie Chlorophyll-Fluoreszenz von zehnteiligen Col-0-Keimlingen nach zweistündiger Behandlung mit BITC. Zuvor inkubierten die Keimlinge für 24 Stunden in Lösungsmittel-Kontrollen oder in 100 µM BITC, 100 µM SF oder 50 µM Radicolol. Als Kontrollbehandlung (KON) wurde 1 %-iges MeOH für BITC, 1 %-iges EtOH für SF oder 1,8 %-iges DMSO für Radicolol in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet. Nach 4 Stunden wurde der Parameter Fv/Fm in dunkeladaptierten Keimlingen bestimmt. (MW±SE, n=12, T-Test unabhängiger Stichproben \*pValue<0,05; \*\*pValue<0,01; \*\*\*pValue<0,005). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>53, T-Test unabhängiger Stichproben \*pValue<0,05; \*\*pValue<0,01; \*\*\*pValue<0,005).

### 3.3.5 *Arabidopsis* HSA1-TF sind wichtig bei der Vorbeugung vor einer Intoxikation mit BITC

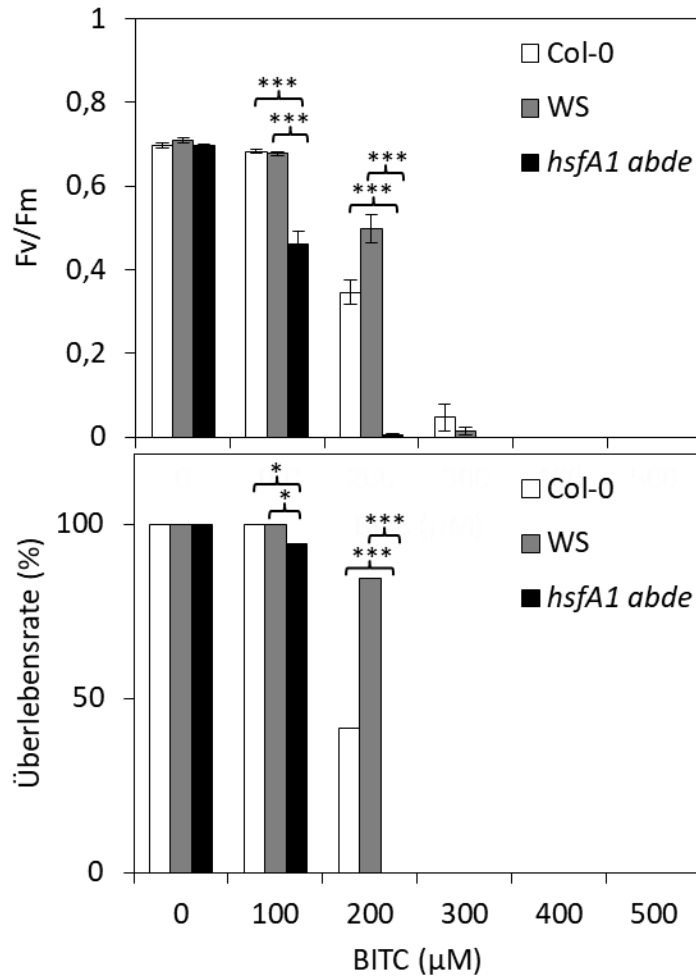
Die Transkriptom-Analyse von SF behandelten Keimlingen zeigte neben der Induktion von Genen, welche in Detoxifizierungsprozessen von Xenobiotika beteiligt sind, ebenfalls eine Vielzahl an Genen der Hitzeschockantwort (Englisch: heatshockresponse, HSR) (siehe 3.1.3). Die Induktion der HSR könnte ein weiterer Mechanismus sein, welcher Pflanzen vor Selbst-

Intoxikation schützen kann. Zur Untersuchung dieser Hypothese eignet sich die *hsfa1abde* Mutante, in welcher die vier Masterregulatoren der HSR, die Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren A1 (HSFA1) a, b, d und e, fehlen und so die Induktion 21 weiterer HSF und damit der meisten Hitzeschock-Genen beeinträchtigt ist (Yoshida et al., 2011; Liu and Charng, 2012). So wurde die Widerstandsfähigkeit von Wildtyp-Keimlingen (Col-0, WS) mit der *hsfa1abde* Mutante gegenüber toxischen BITC-Konzentrationen verglichen.

Dazu wurden Keimlinge (Wildtyp und *hsfa1abde*) in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge mit verschiedenen Konzentrationen von BITC (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) für zwei Stunden versetzt. Anschließend wurden vier Stunden nach der Behandlung der Parameter Fv/Fm sowie sieben Tage nach Behandlung die Überlebensrate bestimmt.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, zeigten Col-0 Keimlinge die gleiche Reaktion wie bereits unter 3.3.3 beschrieben. Die Gabe von 200 µM BITC reduzierte die Überlebensrate auf 41 %, nach Behandlung mit 300 µM BITC war kein Wachstum mehr festzustellen. Während in Wildtyp-Keimlingen (Col-0 und WS) die Behandlung mit 100 µM BITC keinen negativen Effekt hatte, war die *hsfa1abde* Mutante deutlich sensitiver gegenüber BITC. Hier war nach Behandlung mit 100 µM BITC der Parameter Fv/Fm bereits auf das 0,6-Fache gesunken. Die Überlebensrate war auf 94 % erniedrigt. Die Behandlung mit 200 µM BITC war für die *hsfa1abde*-Mutante bereits derartig toxisch, dass alle Keimlinge als „tot“ gezählt werden mussten.

Die Ergebnisse zeigten, dass die *hsfa1abde* Mutante deutlich sensitiver gegenüber BITC-Intoxikation ist als die Wildtypen. Dies lässt vermuten, dass die Induktion der HSR möglicherweise in *Arabidopsis*-Keimlingen eine Rolle spielt, um sich vor Selbst-Intoxikation durch hohe ITC-Konzentrationen zu schützen.



**Abbildung 27:** Chlorophyll-Fluoreszenz sowie Überlebensrate von zehn Tage alten Col-0, WS und *hsfa1abde*-Keimlingen. Die Keimlinge wurden für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BITC mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Der Parameter Fv/Fm wurde vier Stunden nach der Behandlung bestimmt. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SE, n=8, T.Test unabhängiger Stichproben \*pValue<0,05; \*\*pValue<0,01; \*\*\*pValue<0,005). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>55, T.Test unabhängiger Stichproben \*pValue<0,05; \*\*pValue<0,01; \*\*\*pValue<0,005).

### 3.3.6 Hitze Priming induziert keine Resistenz gegenüber BITC Intoxikation

In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass sich unter den am stärksten hochregulierten Genen durch RES viele HSPs befinden (siehe 3.1.3). Und zum anderen, dass das Fehlen einer Hitzeschockantwort in *hsfa1abde*-Keimlingen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber BITC-Intoxikation führt. Weiterhin ist für *Arabidopsis*-Keimlingen bereits bekannt, dass moderate Hitze (37 °C, eine Stunde) HSPs stärker induziert als 100 μM SF

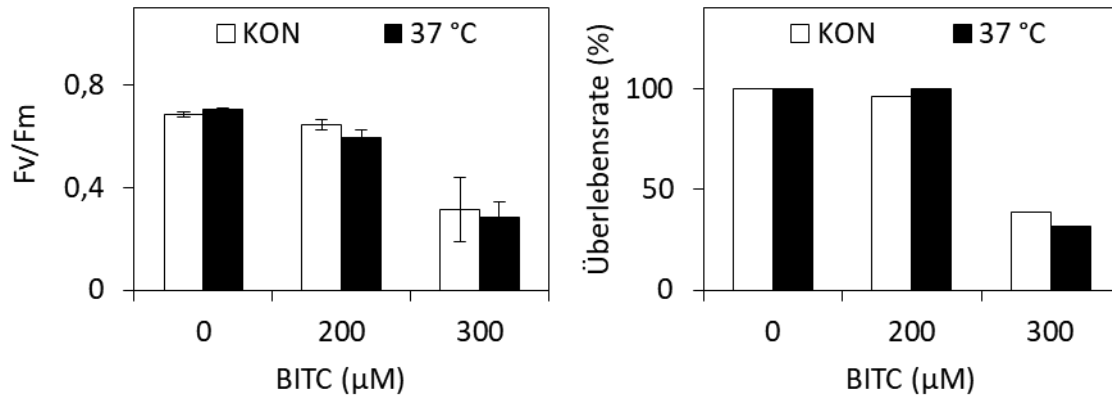


(Muench, 2016). Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Induktion von Hitzeschockgenen durch eine Vorbehandlung der Keimlinge mit moderater Hitze (37 °C) vor BITC-Intoxikation schützen kann.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein in der Literatur publiziertes Hitzeprotokoll zur kurzfristig erworbenen Thermotoleranz (englisch: short-time acquired thermotolerance, SAT) verwendet, bei welchem sich Keimlinge durch moderate Hitze (37 °C, zwei Stunden) akklimatisiert haben und so einen lethalen Hitzestress (45 °C) überleben konnten (Yeh et al., 2012). In Anlehnung an dieses Protokoll wurden in der vorliegenden Arbeit Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge für zwei Stunden in einem Wärmeschrank mit 37 °C Hitze-akklimatisiert. Anschließend inkubierten die Keimlinge zwei Stunden bei 22 °C, damit sich die Hitzeschockresponse aufbauen kann bevor sie dann für weitere zwei Stunden mit toxischen BITC-Konzentrationen (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %), welche unter 3.3.3 bestimmt wurden, behandelt wurden. Nach weiteren vier Stunden wurde der Parameter Fv/Fm bestimmt und nach sieben Tagen das Überleben ausgezählt. Als Kontrolle (KON) inkubierten Keimlinge durchgehend bei 22 °C.

Wie man in Abbildung 28 erkennen kann, zeigt sich zwischen den Kontroll-Keimlingen sowie den Hitze-behandelten Keimlingen kein signifikanter Unterschied. Die Vorbehandlung mit moderater Hitze konnte weder die maximale Quantenausbeute am PSII noch die Überlebensrate der Keimlinge nach toxischen BITC-Konzentrationen erhöhen.

Obwohl nach Muench 2016 die Induktion der Hitzeschockgene durch moderate Hitze deutlich stärker ist als durch 100 µM SF, konnte keine erhöhte Toleranz der Keimlinge gegenüber der BITC-Intoxikation festgestellt werden. Zusammen mit den Ergebnissen von 3.3.5 kann man vermuten, dass die Induktion der Hitzeschockgene durch *HSFA1* zwar wichtig, allerdings nicht ausreichend für eine erhöhte Resistenz gegenüber BITC-Intoxikation ist.



**Abbildung 28:** Überlebensrate sowie Chlorophyll-Fluoreszenz von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen nach zweistündiger Behandlung mit BITC. Zuvor wurden die Keimlinge zwei Stunden entweder mit 22 °C (KON) oder 37 °C behandelt. Nach weiteren zwei Stunden bei 22 °C wurden die Keimlinge für zwei Stunden mit den gezeigten BITC-Konzentrationen behandelt. Nach vier Stunden wurde der Parameter Fv/Fm in dunkeladaptierten Keimlingen bestimmt (MW±SE, n=6). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>52).

### 3.4 Metabolische Reaktion auf RES

#### 3.4.1 Toxische ITC-Konzentrationen führen zu einer spezifischen TAG-Akkumulation in *Arabidopsis*-Keimlingen

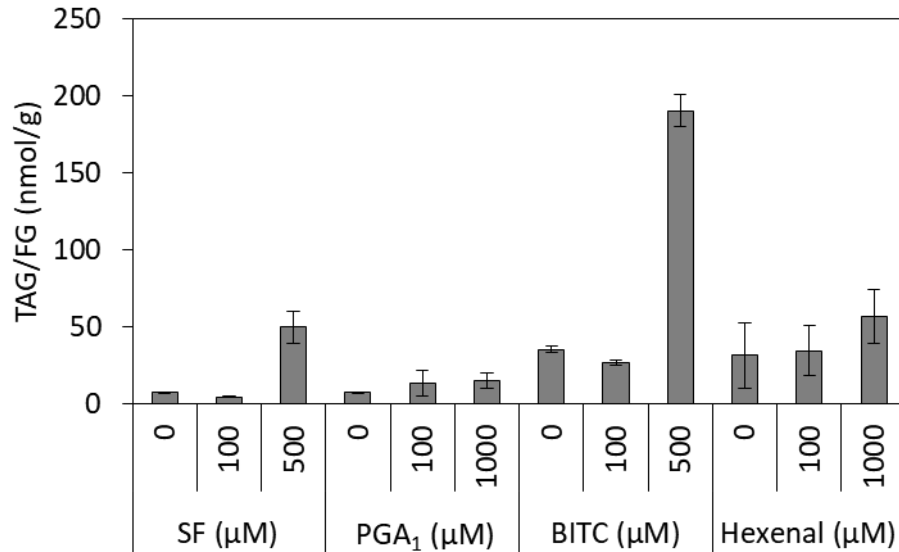
Wie unter 3.3.3 bestätigt, haben RES in toxischen Konzentrationen eine schädigende Wirkung auf das PSII, welches zu Teilen aus Galactolipiden besteht und für die Photosynthesereaktion von elementarer Bedeutung ist (Alméras et al., 2003; Berger et al., 2007; Li and Yu, 2018). TAG Akkumulation im vegetative Gewebe ist ein Phänomen, was bereits bei Hitzestress, Exposition gegenüber Ozon, Trockenstress und Stickstoff-Mangel beobachtet wurde (Sakaki et al., 1990; Gaude et al., 2007; Mueller et al., 2017) und möglicherweise Teil eines Membran-Lipid-Remodeling-Prozesses ist. Es stellt sich die Frage, ob eine Änderung des Lipidmetabolismus mit einer Akkumulation an TAGs ebenfalls eine mögliche Reaktion auf chemischen Stress in Form von toxischen RES-Konzentrationen sein könnte.

Zur Untersuchung der TAG-Spiegel wurden in Kooperation mit Julia Doller im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Im Alter

von zehn Tagen wurden die Keimlinge für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an RES (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Lipid-Extraktion, wie unter 2.10.1.3 beschrieben, wurden die TAGs mittels UPLC-TOF analysiert. Die in *Arabidopsis* nachgewiesenen Hauptverbindungen enthalten hauptsächlich drei C18 Fettsäuren (TAG54) oder zwei C18 und einer C16 Fettsäuren (TAG52) mit bis zu drei Doppelbindungen pro Acyl-Kette, also maximal neun Doppelbindungen pro TAG. Zur Quantifizierung aller TAG-Spezies wurde als IS TAG30:0 (Anzahl Kohlenstoffatome:Anzahl Doppelbindungen) verwendet. Da sich dieser allerdings deutlich in der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen zu den TAG-Spezies unterscheidet, war deshalb nur eine relative Quantifizierung möglich. Zur besseren Übersicht wurden alle gemessenen TAG54 sowie TAG52 unabhängig von der Anzahl an Doppelbindungen (1–9) aufsummiert und graphisch dargestellt. Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, konnte nach Behandlung mit sub-toxischen SF- und BITC-Konzentrationen (0–100 µM) keine Erhöhung der TAG-Gehalte festgestellt werden.

Dagegen führten die Behandlungen mit 500 µM BITC in *Arabidopsis*-Keimlingen zur stärksten Akkumulation der Haupt-TAG-Spezies auf 190 nmol/g FG. Dies ist eine Induktion um das 5,3-Fache im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Doller, 2018). Die Behandlung mit 500 µM SF zeigte ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Haupt-TAGs um das 6,9-Fache im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die Behandlungen mit den Oxylipinen PGA<sub>1</sub> und Hexenal zeigten bei den getesteten Konzentrationen (500 µM bzw. 1000 µM) keine signifikante Veränderung der TAG-Gehalte.

Zusammenfassend zeigte sich nach Behandlung der Keimlinge mit den ITCs SF und BITC eine konzentrationsabhängige Akkumulation der Haupt-TAGs. Dabei zeigten die beiden ITCs einen vergleichbaren Anstieg bei einer Konzentration von 500 µM. Nach der Behandlung hingegen mit den Oxylipinen PGA<sub>1</sub> sowie Hexenal konnte keine Änderung der TAG-Gehalte festgestellt werden.



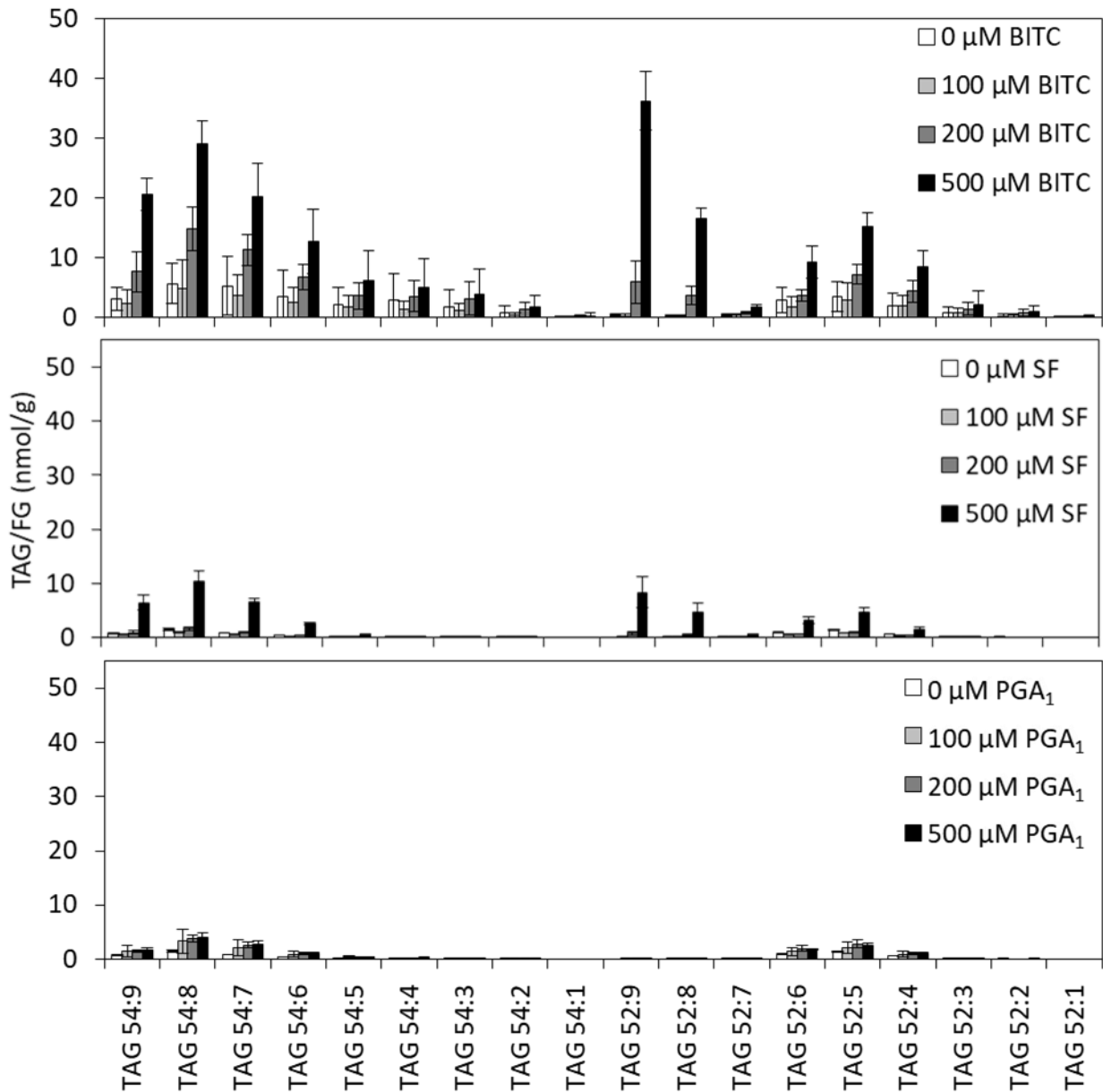
**Abbildung 29:** Summe der endogenen Gehalte der TAG-Spezies C54 und C52 in zehn Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen. Keimlinge wurden für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SF, PGA<sub>1</sub>, BITC (Doller, 2018) oder Hexenal mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SD, n=4). BITC-Daten entnommen aus Doller, 2018, (MW±SD, n=4).

Zur detaillierteren Charakterisierung der TAG-Akkumulation wurden weitere Konzentrationen von SF, PGA<sub>1</sub> sowie BITC getestet. Dazu wurden in Kooperation mit Julia Doller im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an RES (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Profil der einzelnen TAG-Spezies ist in Abbildung 30 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass sich die basalen Gehalte zwischen der Behandlung mit SF und PGA<sub>1</sub> mit der von BITC unterscheiden. Während die basalen Gehalte der Haupt-Spezies aufsummiert bereits bei 35 nmol/g FG lagen (Doller, 2018), war die Summe der Gehalte der TAG-Spezies bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messung sehr viel niedriger (7,2 nmol/g FG).

Nach Behandlung mit sub-toxischen BITC-Konzentrationen (0–200 µM; ermittelt unter 3.3.3) konnte keine bzw. nur eine leichte Erhöhung einiger TAGs beobachtet werden. 500 µM BITC

führte zu einer Akkumulation der meisten TAG-Spezies. Bei TAG52:9 war eine besonders starke Akkumulation festzustellen. Dabei konnte im Vergleich zum basalen Gehalt ein Anstieg um das 100-Fache auf 36,2 nmol/g FG gemessen werden. Am zweitstärksten war TAG52:8 mit einem Anstieg um das 36-Fache erhöht. Alle anderen C54- und C52 TAG-Spezies waren dazu im Vergleich nur gering erhöht. Sie zeigten eine Akkumulation im Schnitt um das 3,5-Fache im Vergleich zum basalen Wert (Doller, 2018). Nach der Behandlung mit 500 µM SF zeigten ebenfalls TAG52:9 und TAG52:8 den deutlichsten Anstieg. TAG52:8 zeigte eine Induktion um das 134-Fache im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Zudem konnte eine Akkumulation der TAG54-Spezies mit 6–9 Doppelbindungen um durchschnittlich das 7-Fache detektiert werden. Nach Behandlung mit den unterschiedlichen  $PGA_1$  Konzentrationen war zwar ein Anstieg sichtbar (maximal 3,5-fach), im Vergleich zu SF war dieser allerdings deutlich geringer.

Insgesamt kann man in Abbildung 30 erkennen, dass besonders die Behandlung mit 500 µM BITC und 500 µM SF zu einer deutlichen Akkumulation einiger TAG-Spezies führte. Hierbei waren besonders die TAG-Spezies mit mehrfach ungesättigten FS (52:9, 52:8, 54:9, 54:8) stark induziert. Es zeigte sich, dass die Akkumulation sowohl von der Konzentration als auch von der Art des RES abhängig ist.



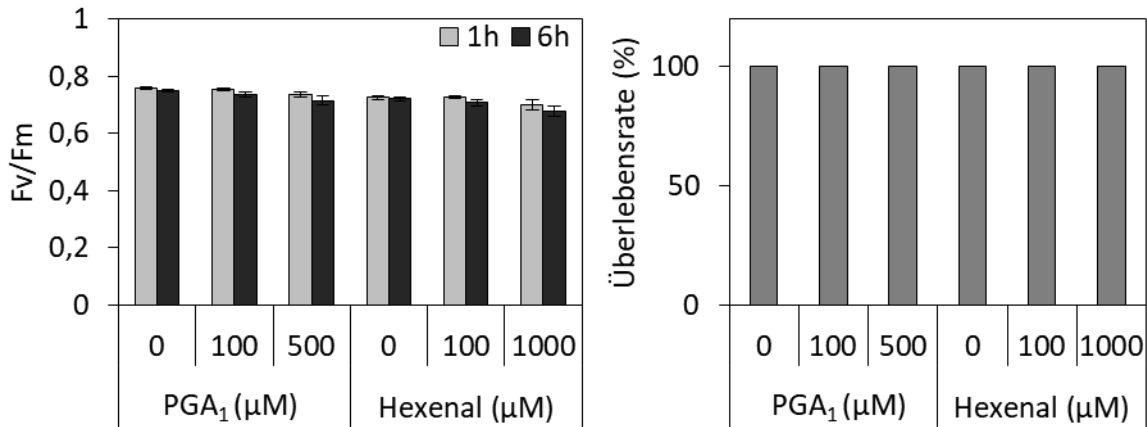
**Abbildung 30:** Endogene Gehalte der TAG-Spezies C54 und C52 in zehn Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen. Die Keimlinge wurden für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BITC, SF oder  $\text{PGA}_1$  mit einem Anteil von 1 % MeOH in 0 %-igem Zucker-MS-Medium behandelt. Für die Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in 0 %-igem Zucker-MS-Medium verwendet. Die Keimlinge wurden nach 6 Stunden geerntet (MW $\pm$ SD, n=4). BITC-Daten entnommen aus Doller, 2018, (MW $\pm$ SD, n=4).

Unter 3.3.3 konnte für die ITCs SF und BITC 500  $\mu\text{M}$  als toxische Konzentration ermittelt werden. In der Literatur konnte bei Hitzestress beschrieben werden, dass eine TAG-Akkumulation eine Folge eines Membran-Lipid-Remodeling-Prozesses ist (Mueller et al., 2017). Daher könnte im

vorherigen Experiment die für  $\text{PGA}_1$  und Hexenal getesteten Konzentrationen zu gering und folglich nicht toxisch gewesen sein. Um dies zu testen wurde die Toxizität der Oxylipine ebenfalls mit Hilfe des Fv/Fm-Parameters sowie durch Bestimmung der Überlebensrate überprüft. Dazu wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500  $\mu\text{l}$  MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{PGA}_1$  und Hexenal (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt und die Fv/Fm-Werte bestimmt. Nach weiteren sieben Tagen wurde das Überleben ausgezählt.

Wie Abbildung 31 zeigt, konnte weder eine Abnahme des Fv/Fm-Wertes noch der Überlebensrate bei den getesteten Konzentrationen beobachtet werden. Die verwendeten Konzentrationen der Oxylipine sind also für die *Arabidopsis*-Keimlinge nicht toxisch. Da keine Erniedrigung der maximalen Quantenausbeute am PSII beobachtet werden kann, kann zudem gefolgert werden, dass die Membran des PSII nicht beschädigt wurde.

Zusammen mit den Ergebnissen von SF und BITC könnte die TAG-Akkumulation eine Folge einer Intoxikation, welche einen Membranumbau induziert, sein. Um dies zu testen, müsste überprüft werden, ob höhere Konzentrationen von  $\text{PGA}_1$  und Hexenal zu einem Membranabbau führen. Anschließend müsste dann von den neu ermittelten Konzentrationen erneut der TAG-Gehalt analysiert werden. Allerdings würden diese Konzentrationen vermutlich deutlich außerhalb des physiologischen Bereichs für endogene RES liegen, weswegen zudem weitere unbekannte Faktoren eine Rolle spielen dürften.



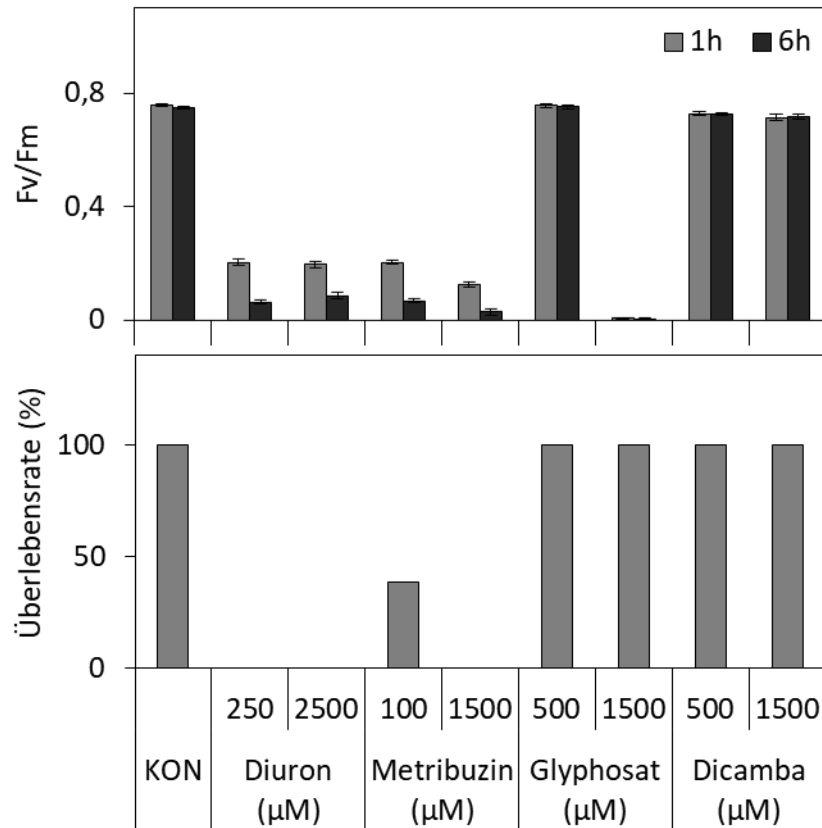
**Abbildung 31:** Chlorophyll-Fluoreszenz sowie Überlebensrate von zehn Tage alten Col-0-Keimlingen. Keimlinge wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an PGA<sub>1</sub> oder Hexenal mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Der Parameter Fv/Fm wurde eine sowie sechs Stunden nach der Behandlung bestimmt. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SE, n=8). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>35).

### 3.4.2 TAG-Akkumulation ist keine allgemeine Reaktion auf chemische Intoxikation und unabhängig von der Toxizität der Chemikalien

Zur Überprüfung, ob die beobachtete TAG-Akkumulation nach Behandlung mit toxischen ITC-Konzentrationen ein genereller Mechanismus für eine chemische Intoxikation ist, wurden weitere Chemikalien getestet. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit unter anderem Herbizide getestet, welche die Lichtreaktion der Pflanze beeinflussen. Die PSII-Herbizide Diuron (Wirkstoff DCMU) sowie Metribuzin wirken durch Inhibierung des Elektronentransfers vom primären Elektronenakzeptor, einem Chinon (Q<sub>B</sub>), zum Plastochinon-Pool (PQ) (Dayan et al., 2010), woraufhin dessen Redox-Status in einen stark oxidierten Zustand übergeht (Dayan et al., 2010; Pfalz et al., 2012). Als weiteres Herbizid wurden Glyphosat, welches die Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP) inhibiert und somit die Aminosäurebiosynthese beeinflusst (Amrhein et al., 1980) sowie das Auxin-Analogon Dicamba getestet. In Analogie zu 3.3.3 wurde zunächst die Toxizität der Herbizide ermittelt. Dazu wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge mit verschiedenen Konzentrationen der Herbizide (in Methanol/Wasser gelöst,



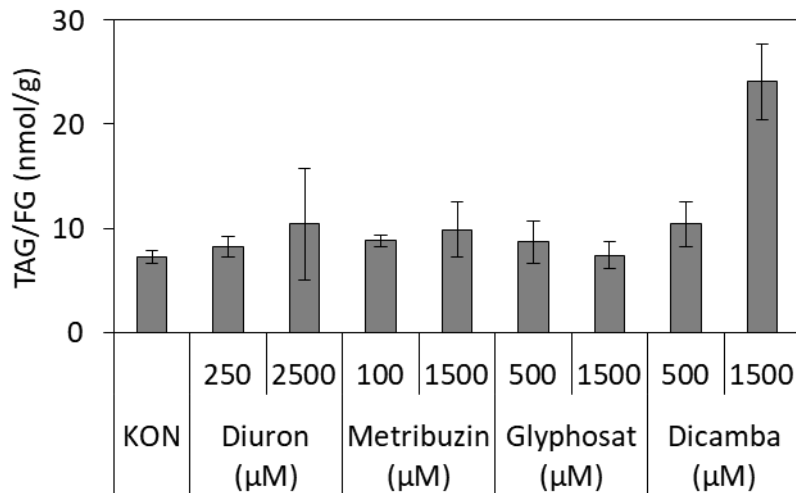
Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt. Anschließend wurde der Parameter  $F_v/F_m$  nach einer und nach sechs Stunden bestimmt sowie die Überlebensrate nach weiteren sieben Tagen ermittelt. Wie in Abbildung 32 dargestellt, senken die beiden PSII-Herbizide Diuron und Metribuzin rasch die maximale Quantenausbeute am PSII. 1500  $\mu\text{M}$  Glyphosat erniedrigte ebenfalls den Parameter  $F_v/F_m$ . Das Auxin-Analogon Dicamba senkte den Parameter  $F_v/F_m$  nicht. Diuron erwies sich bei den getesteten Konzentrationen als äußerst toxisch. Nach weiteren sieben Tagen nach der Behandlung lag die Überlebensrate sowohl für 250  $\mu\text{M}$  als auch 2500  $\mu\text{M}$  bei 0 %. 100  $\mu\text{M}$  Metribuzin senkte die Überlebensrate auf 38 %, nach der Behandlung mit 1500  $\mu\text{M}$  waren alle Keimlinge tot. Dem gegenüber hatten selbst die hohen Konzentrationen der Herbizide Glyphosat sowie Dicamba keinen Effekt auf die Überlebensrate. Sieben Tage nach der Behandlung waren alle Keimlinge noch am Leben und zeigten Wachstum. Zusammenfassend lassen sich die Herbizide unter den getesteten Bedingungen in drei Gruppen unterteilen: (i) Herbizide, welche die Photosynthese inhibieren und letal für Arabidopsis-Keimlinge sind (Diuron, Metribuzin), (ii) Herbizide, welche die Photosynthese der Keimlinge nicht beeinflussen aber dennoch letal sind (Glyphosat) und (iii) Herbizide, welche weder die Photosynthese noch die Überlebensrate beeinträchtigen (Dicamba).



**Abbildung 32:** Chlorophyll-Fluoreszenz sowie Überlebensrate von zehntägigen Col-0-Keimlingen. Keimlinge wurden mit unterschiedlichen Herbiziden mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Der Parameter Fv/Fm wurde eine sowie sechs Stunden nach der Behandlung gemessen. Als Kontrollbehandlung (KON) wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SE, n=8). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>35).

Die anschließende Analyse der Hauptverbindungen TAG54 und TAG52 ist in Abbildung 33 dargestellt. Hierfür wurden Keimlinge in Flüssigkultur (10 Keimlinge in 500 µl MS-Medium mit 3 % Zucker) angezogen und nach sieben Tagen auf zuckerfreies MS-Medium umgestellt. Im Alter von zehn Tagen wurden die Keimlinge für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Herbizide (in Methanol/Wasser gelöst, Endkonzentration Methanol im Medium: < 2 %) versetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Unter all den getesteten Behandlungen zeigt nur die Behandlung mit 1500 µM Dicamba einen sichtbaren Einfluss auf die TAG-Spiegel mit einer Induktion um das 3,3-Fache des basalen Gehalts. Bei den restlichen Behandlungen konnte keine Induktion der TAG-Akkumulation beobachtet werden. Allerdings ist anzumerken, dass es sich bei den Experimenten um Vorversuche handelt und die Ergebnisse

lediglich als Hinweise zu betrachten sind. Um eine valide Aussage treffen zu können, müssten diese wiederholt werden.



**Abbildung 33:** Summe der endogenen Gehalte der TAG-Spezies C54 und C52 in zehn Tage alten Col-0-Keimlingen. Keimlinge wurden für sechs Stunden mit Herbiziden in unterschiedlichen Konzentrationen mit einem Anteil von 1 % MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker behandelt. Als Kontrollbehandlung (KON) wurde 1 %-iges MeOH in MS-Medium mit 0 % Zucker verwendet (MW±SD, n=4).

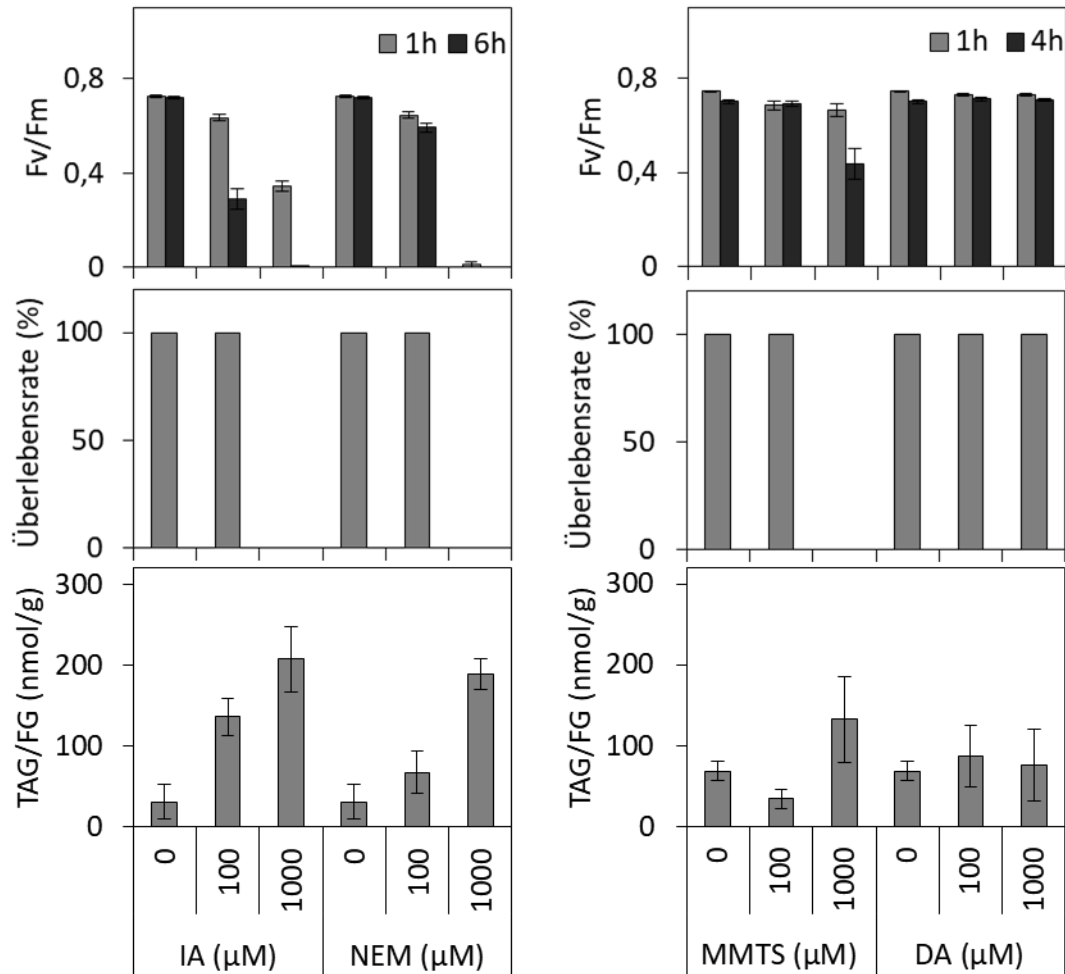
Neben den oben beschriebenen Herbiziden wurden als weiterer chemischer Stress verschiedene Thiol-Reagenzien getestet. Hierfür wurden die gleichen Verbindungen verwendet wie bereits unter 3.2.4 beschrieben. In zwei unabhängigen Experimenten wurde zunächst die Toxizität in *Arabidopsis*-Keimlingen mittels des Fv/Fm-Parameters nach einer und vier bzw. sechs Stunden bestimmt sowie die Überlebensrate nach weiteren sieben Tagen ermittelt. Wie in Abbildung 34 dargestellt, zeigte das RES IA eine deutliche Erniedrigung des Parameters Fv/Fm. Nach bereits einer Stunde war der Fv/Fm-Wert nach der Behandlung mit 100 μM IA auf das 0,87-Fache und mit 1000 μM IA auf das 0,47-Fache erniedrigt. Sechs Stunden nach Behandlung mit 1000 μM IA konnte keine Photosynthese-Effizienz mehr bestimmt werden. Im Vergleich zu IA zeigte NEM einen schnelleren Effekt. Die Behandlung mit 1000 μM NEM führte bereits nach einer Stunde zum kompletten Erliegen der Photosynthese. Die Behandlung mit MMTS senkte lediglich bei einer Konzentration von 1000 μM den Parameter Fv/Fm nach vier Stunden. Das Oxidationsmittel DA zeigte über den gemessenen Zeitraum keinen Einfluss auf die maximale Quantenausbeute. Die Bestimmung der Überlebensrate sieben Tagen nach der Behandlung

zeigte, dass die Behandlung mit IA, NEM sowie MMTS mit hohen Konzentrationen jeweils für die Keimlinge letal war. Bei DA hingegen hatte die Keimlinge selbst bei 1000  $\mu\text{M}$  eine Überlebensrate von 100 %. Die Analyse der TAG-Spezies zeigte, dass sowohl 100  $\mu\text{M}$  als auch 1000  $\mu\text{M}$  IA zu einer TAG-Akkumulation führten. So konnte ein Anstieg um das 4,3-Fache und um das 6,2-Fache detektiert werden. Die gleiche Induktion bewirkte die Behandlung mit 1000  $\mu\text{M}$  NEM, hier konnte ebenfalls eine Akkumulation um das 6-Fache detektiert werden. MMTS bewirkte bei 1000  $\mu\text{M}$  lediglich eine Verdopplung der TAG-Gehalte und die Behandlung mit DA führte zu keiner Änderung.

Zusammenfassend zeigten die Keimlinge auf die Thiol-Reagenzien IA und NEM eine ähnliche Reaktion wie auf die ITCs. Konzentrationen, welche die Photosynthese-Effizienz beeinträchtigten und zudem toxisch oder sogar letal waren, induzierten eine Akkumulation der Haupt-TAGs in gleicher Stärke (ungefähr 6-fach).

Generell konnte beobachtet werden, dass die basalen TAG-Gehalte sich von Experiment zu Experiment deutlich unterschieden. So konnten Werte von 7 nmol/g FG für die Kontroll-Behandlungen im Experiment mit SF, PGA und den Herbiziden oder auch 69 nmol/g FG für die Kontroll-Behandlungen im Experiment mit MMTS und DA detektiert werden. Dies zeigt einmal mehr, dass der Fokus der TAG-Analyse mehr auf den relativen Anstieg als auf den absoluten Wert gelegt werden sollte.

Betrachtet man die TAG-Analyse aller getesteten Chemikalien, erfolgt die TAG-Akkumulation nicht als genereller Mechanismus auf eine chemische Intoxikation. Die Hypothese, dass Photosynthese-Inhibition und Toxizität zu einer erhöhten TAG-Akkumulation führen, konnte nicht bestätigt werden.



**Abbildung 34:** Chlorophyll-Fluoreszenz, Überlebensrate sowie TAG-Gehalte von zehnteiligen Col-0-Keimlingen. Zur Bestimmung der Toxizität wurden Keimlinge mit unterschiedlichen Thiol-Reagenzien mit einem Anteil von 1 % MeOH in 0 %-igem Zucker-MS-Medium behandelt. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde eine sowie vier bzw. sechs Stunden nach der Behandlung gemessen. Als Kontrollbehandlung wurde 1 %-iges MeOH in 0 %-igem Zucker-MS-Medium verwendet. (MW±SE, n=12 für IA und NEM, n=10 für MMTS und DA). Die Überlebensrate wurde sieben Tagen nach der Behandlung mit Hilfe des  $\chi^2$  Test ausgewertet (n>30). Für die TAG-Analyse inkubierten die Keimlinge für sechs Stunden in der Behandlungslösung und wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren (MW±SD, n=3).

## 4. Diskussion

Für *Arabidopsis thaliana* wurden bereits eine Vielzahl an RES beschrieben, welche unter anderem sowohl durch enzymatische als auch nicht enzymatische Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen. Dazu zählen Lipide mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl-Verbindung wie OPDA, Malondialdehyd, Hexenal sowie einige Phytoprostane wie PPA<sub>1</sub> (Mueller and Berger, 2009). Eine weitere Gruppe bilden die GS-Hydrolyse-Produkte mit einer ITC-Verbindung. Unter basalen Bedingungen liegen RES in sehr geringen Konzentrationen in den Zellen vor, können jedoch nach bestimmten biotischen und abiotischen Stressen sehr rasch gebildet werden. Das ITC SF entsteht in *Arabidopsis* nach Gewebsverletzung, wobei lokal sehr hohe Konzentrationen (180 nmol/g FG) entstehen können (Andersson et al., 2015), die sich mit zunehmenden Abstand vom Ort des Schadens im Gewebe durch Diffusion verdünnen können. ITCs verfügen über ein reaktives elektrophiles Kohlenstoff-Atom, welches leicht mit Nukleophilen (Elektronen-Donoren) reagieren kann. Die in Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen enthaltenen Amino-, Thiol- oder Hydroxylgruppen können als solche Elektronen-Donoren fungieren (Hanschen et al., 2014).

### 4.1 Biologische Aktivität der ITCs SF und BITC sowie des Oxylipins PGA<sub>1</sub>

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die biologische Aktivität von SF ermittelt. Dabei wurde der Konzentrationsbereich von SF in *Arabidopsis*-Keimlingen bestimmt, welcher zur Aktivierung typischer Markergene von RES führt. Tatsächlich führten 100  $\mu$ M SF sowohl in der Analyse der GST6::*Luc*-Linie als auch in der Expressionsanalyse verschiedener Markergene zu einer Genaktivierung. Für alle getesteten Gene konnte eine deutliche Induktion der Genexpression beobachtet werden (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 12).

Die Ursache der Zytotoxizität sowie der biologischen Aktivität von strukturell unterschiedlichen RES wird in der Literatur mit der Fähigkeit der kovalenten Modifikation von Proteinen auf Grund der Elektrophilie diskutiert. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist allerdings noch nicht bekannt (Mueller and Berger, 2009). Es ist bekannt, dass strukturell verschiedene RES in niedrigen Konzentrationen (Substanz-abhängig 1–100  $\mu$ M) zu der Induktion eines ähnlichen Satzes von Genen führen (Vollenweider et al., 2000; Mueller and Berger, 2009). Allerdings ist dieser Satz bislang unzureichend definiert. Da die ITCs SF und BITC sowie das Oxylipin PGA<sub>1</sub> über

eine RES-Verbindung verfügen, liegt die Vermutung nahe, dass diese RES ein ähnliches Genexpressionsprofil in *Arabidopsis*-Keimlingen induzieren können. Weiterhin wird in der Literatur vermutet, dass dies über den gleichen Signaltransduktionsmechanismus verläuft (Mueller and Berger, 2009). Tatsächlich zeigte sich in der Transkriptomanalyse eine große Überlappung an induzierten Genen zwischen den RES: 84 % bzw. 81 % der BITC-responsiven Gene wurden ebenfalls durch SF bzw.  $\text{PGA}_1$  induziert. Mehr als die Hälfte aller SF und  $\text{PGA}_1$  induzierten Gene wurden durch beide RES reguliert (54 % der SF und 60 % der  $\text{PGA}_1$  induzierten Gene, Abbildung 11). Ein Vergleich mit der publizierten Transkriptomanalyse von AITC (9 Stunden, 0,05 M appliziert über Gasphase) (Kissen et al. 2016) zeigte, wie erwartet, ebenso eine große Übereinstimmung (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden 42 Gene gemeinsam durch die Behandlung mit SF, BITC,  $\text{PGA}_1$  sowie AITC induziert. Allerdings ist auffällig, dass nach Behandlung mit AITC deutlich mehr Gene (2325,  $F_c > 2$ ) induziert waren als nach SF Behandlung (557,  $F_c > 2$ ). Der Unterschied kann zum einen auf die unterschiedliche Behandlung (Art der Applikation, Dauer und Konzentration der Verbindungen) zurückgeführt werden. Zum anderen weisen die RES SF und AITC bis auf die ITC-Verbindung ( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ) strukturelle Unterschiede auf. Bei den Transkriptomanalysen konnten auch Gene identifiziert werden, welche ausschließlich nach Behandlung mit dem jeweiligem RES induziert wurden.

Insgesamt bestätigen diese Vergleiche, dass strukturell unterschiedene RES einen gemeinsamen Satz an Genen induzieren können. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Strukturähnlichkeit der RES bei der RES-vermittelten Genexpression eine bedeutende Rolle spielt (Alméras et al., 2003; Taki et al., 2005; Mueller et al., 2008). Im Jahr 2008 konnte ebenfalls eine große Überlappung der Genexpressionsprofile der beiden Cyclopentenone OPDA und  $\text{PPA}_1$  gezeigt werden (Mueller et al., 2008). 42 % der  $\text{PPA}_1$ -induzierten Gene wurde ebenfalls durch OPDA induziert und im Vergleich dazu wurden nur 3 % durch das Cyclopentanon JA, welches kein RES ist, induziert (Mueller et al., 2008). Allerdings zeigte sich auch stets eine Induktion von Genen, welche von den unterschiedlichen RES ausschließlich induziert wurden. Das deutet darauf hin, dass bei der Genregulation neben der Thiol-Reaktivität auch weitere strukturelle Eigenschaften der RES-Moleküle eine wesentliche Rolle spielen.

Für verschiedene RES-Oxylipine mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe sowie ITCs ist bekannt, dass sie Stressgene und Gene, die bei der Detoxifizierung beteiligt sind, induzieren können (Taki et al., 2005; Mueller et al., 2008; Hara et al., 2010; Hara et al., 2013; Farmer and Mueller, 2013; Kissen et al., 2016). Sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Zellen konnte gezeigt werden, dass Cyclopentenone HSPs, GSTs, Transkriptionsfaktoren und Kinasen regulieren können (Maynard et al., 2018). Es ist bereits bekannt, dass GSTs in Pflanzen als Reaktion auf eine Vielzahl von abiotischen und biotischen Stressoren sowie durch unterschiedliche Xenobiotika, ROS und RES induziert werden (Marrs, 1996; Chen et al., 1996; Loeffler et al., 2005). Ebenso konnte in diversen Tierstudien belegt werden, dass ITCs die GST-Expression induzieren (Dinkova-Kostova, 2013). Folglich sollten die ITCs SF und BITC auch in *Arabidopsis* eine Regulation von Stress- und Detoxifizierungsgenen bewirken. In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen Experimenten (GST6::*Luc* System, qPCR sowie Transkriptomanalyse) in *Arabidopsis*-Keimlingen nach Behandlung mit SF eine deutliche Induktion der GST6-Expression beobachtet werden. In den durchgeführten Transkriptomanalysen zeigte sich zusätzlich die Induktion von 9 weiteren GSTs (alle von der Tau-Familie). Weiterhin war auch nach Inkubation mit  $\text{PGA}_1$  eine deutliche GST6-Induktion (3,0-fach) zu beobachten. Die Untersuchung der GO-Terme machte ersichtlich, dass Kategorien wie „response to chemical stimulus“ und „response to stress“ in der vorliegenden Arbeit in allen SF-induzierten Genen überrepräsentiert waren. Die genauere Betrachtung der SF-induzierten Genfamilien zeigte GSTs, Cytochrom P450-Monooxygenasen, Glukosidasen und UDP-Glukosyltransferasen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein. Eine im Jahr 2016 durchgeführte Transkriptomanalyse von *Arabidopsis*-Pflanzen zeigte neuen Stunden nach exogener Gabe von AITC die Induktion von 17 GSTs (Kissen et al., 2016). AITC besitzt wie SF eine ITC-Verbindung und dessen Vorläufer-GS Sinigrin kommt ebenfalls in manchen *Arabidopsis*-Ökotypen vor (Kliebenstein, 2001). In einer umfangreichen Transkriptomanalyse konnten Øverby et al. (2015) drei Stunden nach Sprüh-Applikation von 0,05 M AITC eine 10-fache Induktion von *GSTF8* (GST6) beobachten. In einer anderen Studie konnte für niedrige Konzentrationen an Phenyl-ITC (PEITC, 1 mM, appliziert durch Spraytechnik als Wasseremulsion) eine Induktion verschiedener GSTs in fünf Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen festgestellt werden (Hara et al., 2010). BITC hingegen führte unter den in der vorliegenden Arbeit getesteten Bedingungen zu keiner GST-Induktion.



Bei Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von GSTs konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass GSTs die Konjugation von BITC an GSH katalysieren und somit zur Detoxifizierung von BITC beitragen (Wagner et al., 2002). Mueller et al. (2008) konnten die Oxylipine PPA<sub>1</sub> und OPDA als Substrate für GST6 nachweisen.

In verschiedenen Publikationen konnten zwei weitere RES-responsive Stressgene (*CYP81D11* sowie *TOLB*) mit noch unbekannt Funktionen identifiziert werden. So führt die Behandlung mit OPDA, PPA<sub>1</sub> sowie PGA<sub>1</sub> zur Induktion der beiden genannten Gene (Mueller et al., 2008; Findling et al., 2018). Für *CYP81D11* sind in der Literatur weitere Induktoren bekannt wie das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) (Fode et al., 2008) oder der Herbizid-Safener Benoxacor (Baerson et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit SF ebenfalls zu einer Induktion dieser Stressgene (Abbildung 10). In der Transkriptomanalyse war die Expression von *CYP81D11* nach SF-Behandlung um das 5,2-Fache, nach PGA<sub>1</sub> sogar um das 8,7-Fache induziert. Kissen et al. (2016) konnten nach exogener Gabe von AITC ebenfalls eine deutliche Induktion von *CYP81D11* (11,3-fach) zeigen. Auch die Expression von *TOLB* war deutlich erhöht (5,7-fach) (Kissen et al., 2016). Die zunächst beobachtete Induktion von *TOLB* um das 6,8-Fache nach Gabe von 100 µM SF in Abbildung 10 konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit allerdings nicht wiederholt werden. In der durchgeführten Transkriptomanalyse war lediglich eine Akkumulation der *TOLB*-Transkripte um das 2,2-Fache zu beobachten und in Abbildung 12 konnte überhaupt keine Induktion festgestellt werden. Obwohl innerhalb der vorliegenden Untersuchung auf stets gleiche Bedingungen sowohl bei der Anzucht als auch bei der Behandlung geachtet wurde, macht dieser Befund deutlich, dass biologische Proben stets gewissen Schwankungen unterliegen. Da in der vorliegenden Arbeit die Kultivierung und Behandlung der Keimlinge in Flüssigmedium erfolgte, spielen beispielsweise die Anzahl (meistens 8–10 Keimlinge pro Probe), das Gewicht der Keimlinge oder weitere äußere Faktoren wie Stärke der Lichtquelle und Abstand zwischen der Lichtquelle und Pflanzen eine nicht unerhebliche Rolle. Erschwerend dazu sind Pflanzen besonders im Keimlingsstatus sehr sensibel und reagieren auf veränderte Kulturbedingungen.

Ferner ist aus den Untersuchungen von Mueller et al. (2008) bekannt, dass eine exogene Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit 25 µM OPDA oder PPA<sub>1</sub> zu einem deutlich

reduzierten Wurzelwachstum führt. Zudem konnten die Autoren in einer Transkriptomanalyse nach Behandlung mit OPDA und PPA<sub>1</sub> einige reprimierte Gene Kategorien zuordnen, welche mit Zellwachstum und Zellzyklus assoziiert sind (Mueller et al., 2008). Um zu überprüfen, ob SF in *Arabidopsis*-Keimlingen ebenfalls zu einer Inhibierung des Zellwachstums führt, wurden zudem die reprimierten Gene der Transkriptomanalyse nach SF-Behandlung untersucht. Die Analyse zeigte auch in der vorliegenden Arbeit, dass Genen, welche bei der Wurzelentwicklung beteiligt sind, in *Arabidopsis*-Keimlingen nach Behandlung mit SF reprimiert sind.

### 4.2 RES-vermittelte Genregulation

Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass RES-Moleküle durch einen/mehre für alle RES-Moleküle ähnlichen/ähnliche Signalmechanismen und Signaltransduktionskomponenten erkannt werden (Mueller and Berger, 2009). Zur RES-vermittelten Genregulation werden hauptsächlich zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Einer davon ist eine Regulation von RES-induzierten Markergenen durch die Veränderung des zellulären Redox-Potentials als Folge kovalenter Modifikation von GSH durch RES. In der Literatur wird dieser Mechanismus für die Wirkung von SF postuliert (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015). Generell ist bekannt, dass sich Zellen vor Zytotoxizität durch die kovalente Konjugation von Xenobiotika und RES an GSH schützen können (Mueller and Berger, 2009; Nakamura et al., 2017). Die Konjugation an GSH verhindert zudem einen Ausstrom der RES aus der Zelle (Nakamura et al., 2017). In murinen Hepatomzellen konnte nach exogener Gabe von hohen Dosen an SF und BITC eine schnelle und deutliche Depletion des intrazellulären GSH-Pools festgestellt werden (Zhang, 2000). Andersson et al. (2015) konnten konzentrationsabhängig eine Senkung der GSH-Konzentration und gleichzeitig einen Anstieg des Redox-Potentials bei *Arabidopsis*-Pflanzen beobachten.

Zur Identifizierung des RES-Signaltransduktionsmechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, inwieweit SF das GSH/GSSG-Gleichgewicht sowie das Redox-Potential verändern kann, und ob gegebenenfalls diese Änderung mit der in Kapitel 3.1 beobachteten Geninduktion korreliert. Zunächst konnte vier Stunden nach exogener Applikation von SF zu *Arabidopsis*-Keimlingen endogen keine Akkumulation von SF beobachtet werden. Stattdessen konnte als einer der Haupt-Metaboliten von SF das Glutathion-Addukt detektiert werden

(Abbildung 14). Da auch im Behandlungszeitraum kein SF mehr im Medium nachgewiesen werden konnte, deutet dies auf eine Aufnahme und Verstoffwechslung von SF in den Keimlingen hin. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt vermutlich durch Diffusion (Zhang, 2012). Dueckershoff et al. (2008) konnten ebenso für PPA<sub>1</sub> und OPDA *in vivo* eine chemische sowie enzymatisch katalysierte Konjugation an GSH zeigen.

Die Untersuchung des Glutathiongehalts in *Arabidopsis*-Keimlingen nach Behandlung mit SF, BITC und PGA<sub>1</sub> zeigte, dass die für die Transkriptomanalyse gewählten Konzentrationen von 100 µM bzw. 75 µM zu keiner Veränderung des GSH-Pools führt (Abbildung 15). Weiterhin konnte keine Änderung des berechneten Redox-Potentials beobachtet werden (Abbildung 16). Andersson et al. (2015) konnten eine drastische Erniedrigung der GSH-Konzentration bereits ab 10 µM SF nachweisen, 100 µM SF führte zu einer fast vollständigen Depletion von GSH. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Konzentrationen zur Senkung des GSH-Gehalts könnte im Versuchsaufbau liegen. Andersson et al. (2015) applizierten SF mittels Vakuuminfiltration in Blattscheiben von 4–6 Wochen alten Pflanzen und bestimmten bereits 30 Minuten nach Applikation den GSH-Gehalt. In der vorliegenden Arbeit wurden zehn Tage alte Keimlinge verwendet, welche in Flüssigmedium kultiviert wurden und denen SF über das Behandlungsmedium zugegeben wurde. GSH wurde anschließend nach vier Stunden aus den Keimlingen extrahiert. SF muss im Flüssigmedium über Wurzeln und Spaltöffnungen zunächst in die Zellen der Keimlinge aufgenommen werden. Eine Vakuuminfiltration überwindet diese natürliche Barriere. SF kann dabei direkt in den Apoplasten injiziert werden und muss nur noch passiv in die Zellen diffundieren. Dies könnte erklären, warum im Keimlingssystem für eine drastische GSH-Depletion deutlich höhere Konzentrationen an SF benötigt wurden. In einer weiteren Publikation konnte ebenfalls eine konzentrations- und zudem zeitabhängige Depletion des GSH-Pools nach exogener Gabe eines weiteren ITCs beobachtet werden (Øverby et al., 2015). Hierbei führte die Behandlung mit 0,1 M AITC zu einer Erniedrigung des GSH-Pools auf 67 % der Kontrollbehandlung, 0,05 M sogar auf 9 %. Allerdings ist es schwierig, die absolute Menge von AITC abzuschätzen, welche die Keimlinge aufnahmen, da Øverby et al. (2015) elf Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge mit 0,1–1 mM AITC über die Gasphase (mittels eines

Filterpapiers getränkt mit 200  $\mu$ l AITC-Verdünnung) behandelten. Dies erschwert einen Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen.

Eine drastische Verschiebung des GSH/GSSG-Gleichgewichts sowie des Redox-Potentials konnte in der vorliegenden Arbeit für die RES SF, BITC und  $\text{PGA}_1$  sowie für weitere Thiol-reaktive Substanzen wie NEM und IA substanzabhängig erst bei höheren Konzentrationen ( $> 500 \mu\text{M}$ ) beobachtet werden (Abbildung 17, Abbildung 18). Dass von den getesteten Substanzen unterschiedliche Konzentrationen für eine Depletion des GSH-Gehalts benötigt worden sind, könnte zum einen mit der unterschiedlichen Lipophilie der getesteten Substanzen erklärt werden. BITC sollte beispielsweise aufgrund des Benzolrings deutlich membrangängiger sein als SF oder  $\text{PGA}_1$ . Zum anderen spielen Faktoren wie Reaktivität, Struktur der Seitenkette sowie die Geschwindigkeit der Verstoffwechslung in diesem Kontext eine Rolle.

Insgesamt konnte eine konzentrationsabhängige Depletion des GSH-Pools sowie eine Erhöhung des Redox-Potentials bei RES und einigen Thiol-reaktiven Substanzen beobachtet werden. Die in der Transkriptomanalyse verwendete Konzentration hingegen zeigte keinen Effekt. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete RES-vermittelte Geninduktion vermutlich nicht durch die Änderung des GSH-Gehalts und des Redox-Potentials erklärt werden kann.

In den Transkriptomanalyse von Schnaubelt et al. (2015) sowie Koprivova et al. (2010) konnten jeweils eine GSH-abhängige differentielle Regulierung einer Vielzahl an Genen in *Arabidopsis*-Keimlingen gezeigt werden. In beiden Analysen wurde *TH8* sowie *UGT74E2* als mögliche GSH-responsive-Gene identifiziert (Koprivova et al., 2010; Schnaubelt et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die publizierten GSH/GSSG-abhängigen Redox-Markergene bzw. das Transkriptom auch durch SF sowie BITC reguliert werden können. Dazu wurden *Arabidopsis*-Keimlinge mit unterschiedlichen Konzentrationen mit den RES behandelt. Bei niedrigen Konzentrationen ( $100 \mu\text{M}$ ) konnte weder eine Veränderung der GSH-Konzentrationen noch eine Induktion der ausgewählten Markergene beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen, welche eine Depletion des GSH-Gehalts sowie eine Änderung des Redox-Potentials bewirkten (Abbildung 17), konnte für die ausgewählten Gene jedoch auch keine eindeutige Regulation beobachtet werden, die eindeutig

auf den GSH-Gehalt zurückgeführt werden kann (Abbildung 20). Eine mögliche Erklärung zum einen wäre, dass zu geringe ITC-Konzentrationen verwendet wurden. Folglich wäre die Senkung des GSH-Spiegels sowie ein Zusammenbruch des Redox-Potentials nicht ausreichend für eine deutliche Induktion der Gene. Zum anderen könnte der Beobachtungszeitpunkt nach Behandlung mit RES zu spät gewesen sein. Möglicherweise führte 100  $\mu\text{M}$  der RES zu einer Depletion des GSH-Gehalts, welcher nach vier Stunden jedoch durch Neusynthese wieder kompensiert wurde.

In der Literatur konnte für das Gen, welches für die Ascorbatperoxidase (APX2) kodiert, sowie einige Gene, welche in ihrem Promoter das Hitzeschockelement (HSE) enthalten, gezeigt werden, dass deren Expression durch den Redox-Status des PQ-Pools in *Arabidopsis* kontrolliert werden kann (Pogson et al., 2008; Jung et al., 2013). PQ befindet sich in der Elektronentransportkette der Photosynthese zwischen PSII und PSI und fungiert als Akzeptor der Elektronen aus dem PSII. Das Herbizid Diuron (Wirkstoff DCMU) führt zu einem stark oxidierten PQ-Pool, das Herbizid Dibromthymochinon (DBMIB) blockiert den weiteren Elektronentransfer vom PQ-Pool zum Cytochrom-b6f-Komplex und führt somit zu einem reduzierten Status. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die RES-vermittelte Geninduktion von einer Änderung des Redox-Status des PQ-Pools abhängig ist. Dazu wurden die *Arabidopsis*-Keimlinge unter denselben Bedingungen wie in der Transkriptomanalyse behandelt. Anschließend wurde mittels Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung der Parameter qL bestimmt. Mit diesem kann der Anteil der offenen PSII-Zentren abgeschätzt werden und somit auf den Zustand des PQ-Pools geschlossen werden (Kramer et al., 2004). Die Analyse von qL nach Behandlung mit niedrigen RES-Konzentrationen zeigte keine Änderung im Vergleich zu Kontrollbedingungen (eigene Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Beteiligung des PQ-Pools an der Regulation der RES-vermittelten Geninduktion kann deshalb unter den getesteten Bedingungen ausgeschlossen werden.

Entsprechend einer weiteren Hypothese vermitteln RES ihre Wirkung durch kovalente Bindung an Zielproteine, die die Transkription beeinflussen (Farmer and Mueller, 2013). Dieser Mechanismus ist in Tieren sehr gut belegt. Durch Studien in tierischen Systemen ist bekannt, dass das RES  $\text{PGA}_1$  kovalent an Keap1 sowie an Thioredoxin-Reduktase binden kann (Cernuda-

Morollón et al., 2001; Moos et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass diese RES-Modifikation am Cystein von Keap1 erfolgt (Rudolph and Freeman, 2009). Der Cystein-Rest kann somit als „Sensor“ für Moleküle mit Thiol-Reaktivität fungieren. Bisher wurden solche Sensoren in Pflanzen noch nicht beschrieben, aber der Mechanismus der Thiol-Modifikation könnte in Pflanzen möglicherweise ebenfalls bei der RES-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sein. Die Reaktivität und Lipophilie der RES zusammen mit der Fähigkeit, passiv über Membranen zu diffundieren, sowie die Affinität und sterische Kompatibilität der RES zum Zielprotein bestimmen die Effizienz einer Thiol-Modifikation in der Zelle. Bei *Arabidopsis* konnte eine kovalente Bindung von PGA<sub>1</sub>-Biotin an den Transkriptionsfaktor TGA2 beobachtet werden. Die Modifikation erfolgte primär am einzigen Cystein-Rest (Findling et al., 2018). Dem Mechanismus der Modifikation von Zielproteinen stehen zwei Probleme gegenüber: Zum einen sind GSH und andere Proteine deutlich abundanter in den Zellen als mögliche Zielproteine, und zum anderen konnte gezeigt werden, dass GSH zum größten Teil nicht modifiziert wird. Findling et al. (2018) nannten drei Eigenschaften von Zielproteinen, damit eine Modifikation von Zielproteinen gegenüber einer wahllosen Modifikation von Thiol-Gruppen in Proteinen in den Zellen favorisiert wird. Erstens würden Proteine mit einer exponierten Cystein-Gruppe an deren Oberfläche leichter für RES zugänglich sein und dadurch eher zu einer schnelleren Modifikation durch RES führen als Cystein-Reste im Proteininneren. Zweitens beeinflusst die Mikroumgebung der Cystein-Gruppe die Reaktivität der Thiol-Gruppe. Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, weist das Thiolat-Anion gegenüber Thiol-Gruppen eine deutlich höhere Reaktivität auf. Dessen Bildung wird bevorzugt, wenn benachbarte Aminosäuren den pKs-Wert senken. Drittens spielt die Affinität der RES gegenüber bestimmter Zielproteine ebenfalls eine Rolle. So führen beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen zu einer Anreicherung der RES an der Proteinoberfläche (Findling et al., 2018).

Weiterhin unterteilten Findling et al. (2008) die Modifikation der Thiol-Gruppe an Zielproteinen in zwei geschwindigkeitsabhängige Schritte. Zunächst würde eine schnelle reversible Addukt-Bildung des RES mit dem Zielprotein erfolgen. Dabei würde es zu einer Anreicherung der RES an der Proteinoberfläche kommen. In einer zweiten, langsameren Reaktion würde anschließend die kovalente Addition erfolgen. Sowohl die nicht kovalente als auch die kovalente Bindung der

RES an ein Zielprotein kann eine Konformationsänderung des Proteins bewirken und somit zu einer Aktivierung oder Hemmung des Proteins führen (Findling et al., 2018).

#### 4.3 SF als Signal-Molekül

GS sind sehr stabile, nicht-reaktive Substanzen. Zusammen mit dem Enzym Myrosinase, von welchem sie räumlich getrennt sind, bilden sie ein Verteidigungssystem der Pflanze gegen Pathogene und Herbivore (Wittstock and Burow, 2010). Erst durch Verwundung oder Gewebeverletzung kann es zum Kontakt der GS mit der Myrosinase kommen, was zu einer lokalen Generierung von reaktiven ITCs führt. Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit bereits in nicht verwundeten *Arabidopsis*-Keimlingen (2–3 Wochen alt) und in den Blättern von *Arabidopsis*-Pflanzen (4–8 Wochen alt) das ITC SF gemessen werden (Abbildung 21). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch unter basalen Bedingungen zu einem geringen Teil eine Hydrolyse der GS stattfinden kann. Da allerdings diese Reaktion sehr schnell erfolgt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass SF während der Probenahme oder Extraktion gebildet wurde. GS dienen in Pflanzen aufgrund der zwei Schwefelatome als Schwefelspeicher (Wittstock and Burow, 2010). Ein kontrollierter Abbau der GS zur Freisetzung des Schwefels würde allerdings nicht zur Generierung toxischer Nebenprodukte wie ITCs führen. Daher eignet sich dieser Prozess vermutlich nicht als Erklärung für die basalen SF-Gehalte.

Andersson et al. (2015) beobachteten nach Infiltration von *Arabidopsis*-Blättern mit dem avirulenten Stamm *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 180 nmol/g FG an SF. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob nach Verwundungsstress relevante SF-Konzentrationen erreicht werden und inwieweit die SF-induzierte Genregulation zur Re-Programmierung der Genexpression nach Stress beiträgt. Der Nachweis über eine Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation wurde mit Hilfe von SF-Biosynthesemutanten geführt. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Verwundung sowohl im Wildtyp als auch in der *cyp79b2cyp79b3*-Mutante, die keine indolischen GS bilden kann, eine deutliche Akkumulation an SF beobachtet werden (Abbildung 22). In den anderen Genotypen (*tgg1tgg2*, *myb28myb29*, *myb29myb29cyp79b2cyp79b3*) konnte wie erwartet kein SF detektiert werden.

Da die Verwundung mittels einer Pinzette durchgeführt wurde, könnte der Grad der Verwundung unterschiedlich gewesen sein. Daher wurden als Kontrolle ebenfalls die wundresponsiven Phytohormone JA und OPDA analysiert. Dabei zeigte sich zwischen den getesteten Genotypen kein Unterschied (Abbildung 22). Dies bedeutet, dass bei allen Pflanzen ein vergleichbarer Verwundungsstress durchgeführt wurde. Die detektierten Oxylipin-Gehalte sind zudem mit Werten aus der Literatur vergleichbar. So wurden beispielsweise ca. 10 nmol/g FG JA nach Verwundung beschrieben (Acosta and Farmer, 2010). Stintzi et al. (2001) beobachteten drei Stunden nach Verwundung ein Maximum von OPDA und JA von ca. 6 nmol/g FG in *Arabidopsis*-Pflanzen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Verwundungsstress auch eine rasche Bildung von ROS beinhaltet (Orozco-Cárdenas et al., 2001; León et al., 2001) und somit zu einer Verschiebung des GSH-Redox-Potentials zu einem stärker oxidierten Zustand führt (Orozco-Cárdenas et al., 2001; Meyer and Hell, 2005). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Glutathion-Gehalt sowie das GSH-Redox-Potential im Wildtyp analysiert. Beides zeigte nach Verwundungsstress keine Änderung (Abbildung 23). Da die Bestimmung von GSH jedoch aus dem gesamten Blattmaterial erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass lokal eine Änderung des GSH-Gehalts sowie des Redox-Potentials erfolgte.

Im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Verwundungsstress konnte in der Literatur nach Pathogeninfektion in *Arabidopsis*-Blättern eine deutlich höhere SF-Konzentration bestimmt werden. Nach Infiltration mit dem avirulenten Stamm *P. syringae* pv tomato DC3000 wurden 180 nmol/g FG an SF detektiert (Andersson et al., 2015). Im Vergleich dazu akkumulierte SF nach Verwundungsstress in der vorliegenden Arbeit sowie der von mir betreuten Masterarbeit von Julian Gerhards auf maximal 15–50 nmol/g FG. Diese Unterschiede könnten zum einen an den unterschiedlichen Stressbedingungen und zum anderen am gewählten experimentellen Aufbau liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Blätter von sechs Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen mittels einer Pinzette längs der Mittelrippe verwundet. Anschließend wurde der SF-Gehalt in dem geernteten Blattmaterial bestimmt. Andersson et al. (2015) hingegen infiltrierten Blattscheiben von *Arabidopsis*-Blättern mit dem Pathogen und bestimmten anschließend SF in der Behandlungslösung. In der vorliegenden



Arbeit hingegen wurde das verwundete Blattmaterial erst nach den getesteten Zeitpunkten geerntet und anschließend SF analysiert. SF könnte im Zeitraum zwischen Verwundung und Analyse daher auch schon zu einem großen Teil an GSH konjugiert worden sein und nicht mehr frei in den Zellen vorliegen. In Kooperation mit Julian Gerhards im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit konnten beispielsweise bereits 5 Minuten nach Verwundung SF-Gehalte von ca. 40 nmol/g FG sowie nahezu dieselbe Menge an GS-SF-Addukten detektiert werden (Gerhards, 2015).

Wie bereits erwähnt, wurden die gemessenen SF-Gehalte über das gesamte Blatt ermittelt, womit die Konzentration lokal vermutlich deutlich höher ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in den direkt benachbarten Zellen zur Verwundungsstelle toxische SF-Konzentrationen erreicht wurden. Da SF die Fähigkeit hat, passiv über Membranen zu diffundieren, sollten in dem umliegenden Gewebe relevante SF-Konzentrationen für eine Genregulation erreicht worden sein. Die Beteiligung von SF an der stressinduzierten Genregulation wurde mittels Genexpressionsanalyse einiger Hitze-, Stress- und Detoxifizierungsgene nach Verwundung untersucht. Tatsächlich waren in *Arabidopsis*-Blättern einige Hitze- und Detoxifizierungsgene deutlich induziert (Abbildung 24). Besonders im Vergleich zwischen Wildtyp-Pflanzen und der *tgg1tgg2* Mutante zeigten sich einige Gene mit einer differenziellen Regulation. So war die Induktion von *HSFA2*, *HSP17.6II*, *GSTU25* und *CYP81D11* in der *tgg1tgg2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt bis gar nicht vorhanden. Beim Betrachten der *myb28myb29*-Mutante, die wie *tgg1tgg2* kein SF bilden kann, waren allerdings *HSFA2* sowie *HSP17.6II* nach Verwundung deutlich induziert. Obwohl beide Mutanten kein SF generieren können, wurden bei der Expressionsanalyse der getesteten Gene gegenteilige Ergebnisse sichtbar. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied kann bei näherer Betrachtung der SF-Biosynthese-Mutanten gefunden werden. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der *myb28myb29*-Mutante über den indolischen GS-Biosyntheseweg das Fehlen der aliphatischen GS kompensiert wird und bei Verwundungsstress beispielsweise andere reaktive Substanzen vergleichbar zu SF gebildet werden. Da TGG1 und TGG2 die einzigen in *Arabidopsis*-Blättern vorliegenden Myrosinasen sind – abgesehen von der atypischen Myrosinasen PEN2 für

indolische GS – ist die *tgg1tgg2*-Mutante deutlich spezifischer, was die Inhibierung der ITC-Synthese betrifft.

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse nach Behandlung mit SF zeigte *HSP101* eine deutliche Induktion (Abbildung 10, Tabelle 13). Folglich wurde erwartet, dass die Bildung hoher lokaler SF-Konzentrationen nach Verwundungsstress ebenfalls zu einer *HSP101* Induktion führt. Jedoch konnte nach Verwundung keine Akkumulation an *HSP101* Transkripten beobachtet werden (Abbildung 24). Dieses Ergebnis ist zur Literatur kongruent (Taki et al., 2005; Devoto et al., 2005; Muench, 2016). Möglicherweise sind die wund-induzierten SF-Konzentrationen für eine *HSP101*-Induktion nicht ausreichend.

Zusammenfassend konnten diese Ergebnisse Hinweise auf eine SF-vermittelte Genregulation nach Verwundung liefern. Für eine Bestätigung der Hypothese könnten weitere Gene, welche stärker nach exogener SF-Gabe induziert werden, ebenfalls nach Verwundungsstress in den SF-Mutanten *tgg1tgg2* und *myb28myb29* getestet werden. Da Hitzestressgene nach exogener Behandlung mit RES bereits zu den höchstinduzierten Genen zählen (Tabelle 13), wäre eine Induktion weitere Gene durch wund-induzierte RES womöglich kaum feststellbar. Zudem könnten die Gene, welche in den SF-Mutanten nach Verwundungsstress im Vergleich zum Wildtyp differenziell reguliert wurden, mit einem weiteren SF-induzierenden Stress wie beispielsweise einer Pathogen Infektion überprüft werden.

#### **4.4 RES als Schutz vor chemischer Intoxikation**

RES induzieren in niedrigen Konzentrationen (50–100  $\mu$ M) Gene, welche an Abwehrreaktionen und Detoxifizierungsprozessen beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob diese Geninduktion die Pflanzen vor Selbstintoxikation schützen kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Keimlinge, welche mit SF, BITC oder Radicol vorbehandelt wurden, sowohl höhere Überlebensraten als auch Fv/Fm-Werte nach BITC-Intoxikation im Vergleich zu Kontroll-Keimlingen hatten (Abbildung 26). Andersson et al. (2015) konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit SF vor dem virulenten Pilzisolat *Hyaloperonospora arabidopsidis* Hpa Cala2-Isolat schützt und dass dies möglicherweise auf eine Beteiligung von SF bei der Regulation von Abwehrgenen zurückzuführen ist (Andersson et al., 2015). Allerdings

kann bei deren Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von SF aufgrund einer möglichen Genregulation erfolgte oder dass SF einen direkten inhibierenden Effekt auf das *Hpa*-Isolat hatte (oder eine Kombination aus beidem). In der vorliegenden Arbeit zeigten die RES SF, BITC sowie Radicol Eigenschaften als Priming-Reagenzien. RES stellen eine vielversprechende Gruppe an Chemikalien mit protektiver Wirkung dar, welche sich als Priming-Reagenzien im Pflanzenschutz eignen könnten (Farmer and Mueller, 2013). In einer kürzlich erschienen Publikation konnte SF ebenfalls als Priming-Reagenz identifiziert werden (Schillheim et al., 2018). SF führte zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber dem Falschen Mehltau (*Hyaloperonospora arabidopsidis*). Weiterhin konnte ein direkter toxischer Effekt auf *H. arabidopsidis* beobachtet werden (Schillheim et al., 2018). SF stellt ein potentes Pflanzenschutzmittel dar, da es sowohl die Abwehrmechanismen in der Wirtspflanze induzieren kann, als auch direkt toxisch gegenüber Mikroorganismen ist. Generell wurden bereits einige sekundäre Pflanzenstoffe wie Salizylsäure (SA), SA-Analoga, JA, Systemin, Azelainsäure und Pipecolinsäure identifiziert, welche die pflanzliche Abwehrreaktion induzieren und somit die Pflanze resistenter gegenüber verschiedenen biotischen und abiotischen Stresstimuli machen können (Conrath et al., 2006; Conrath et al., 2015).

#### **4.5 Beteiligung der HSR bei chemischer Intoxikation**

HSPs haben bei Hitzestress protektive Eigenschaften für die Zellen, da sie als molekulare Chaperone bei der Faltung von denaturierten Proteinen helfen und zudem die Aggregation bereits denaturierter Proteine verhindern können. Andere HSPs wie Ubiquitin und bestimmte Proteasen können fremde Proteine zur Degradation markieren (Gurley, 2000). *HSP101* kodiert für ein molekulares Chaperon, welches sowohl bei der basalen Thermotoleranz als auch beim Aufbau einer erworbenen Thermotoleranz eine bedeutende Rolle in *Arabidopsis* spielt (Hong and Vierling, 2000). Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Gene der Hitzeschockantwort (HSF und HSP) neben Hitze auch durch verschiedene RES induziert werden können (Mueller et al., 2008; Muench, 2016; Kissen et al., 2016; Hara et al., 2013). Die Transkriptomanalyse von Kissen et al. (2016) zeigte eine Induktion zahlreicher HSFs und HSPs nach Behandlung mit AITC. Unter den induzierten Genen befand sich ebenfalls *HSP101*, dessen Expression im Vergleich zur MOCK-Kontrolle nach neun Stunden deutlich erhöht (60-fach) war.

Es konnte ebenfalls für die RES-Oxylipine PPA<sub>1</sub>, PGA<sub>1</sub> und OPDA eine Induktion von *HSP101* beobachtet werden (Mueller et al., 2008; Muench et al., 2016). Allerdings fällt dabei auf, dass die Induktion der HSPs durch verschiedene RES bei weitem nicht so stark wie durch Hitze ist (Muench, 2016). Tatsächlich konnte auch in der vorliegenden Arbeit nach Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit den RES SF, BITC und PGA<sub>1</sub> eine deutliche Induktion von *HSP101* beobachtet werden. Bei allen drei RES befand sich *HSP101* unter den 50 am höchsten induzierten Genen (Tabelle 13). Weiterhin bestätigte ein in der vorliegenden Arbeit durchgeführter Vergleich der Transkriptomdaten nach SF-Behandlung Transkriptomdaten von *Arabidopsis*-Keimlingen nach Hitzebehandlung (37 °C, eine Stunde) (Nguyen et al., 2015), dass ca. ein Drittel der insgesamt durch SF induzierten Gene ebenfalls durch Hitze induziert werden können (Abbildung 13). Bei Betrachtung der 50 am höchsten induzierten Gene ist fast die Hälfte der Gene hitzeresponsiv und können mit dem GO-Term „response to heat“ assoziiert werden. Bei Kissen et al. (2016) waren nach der exogenen Gabe von AITC ebenfalls GO-Kategorien überrepräsentiert wie „response to heat“ oder „response to thermal stress“ sowie Kategorien, welche mit der pflanzlichen Antwort auf Stress und Stimuli sowie Signaltransduktion assoziiert sind. Weiterhin wurde eine Induktion von Genen der Hitzeschockreaktion beobachtet. Von den 42 gemeinsam induzierten Genen durch SF, BITC, PGA<sub>1</sub> sowie AITC zeigten sich 28 Gene (67 %) als hitzeresponsiv.

Als mögliche Erklärung für diese starke Regulierung hitzeresponsiver Gene nach RES-Gabe vermuten Farmer und Müller (2013), dass besonders die Induktion der HSPs, welche als Chaperone fungieren, protektive Wirkungen für die Zellen nicht nur bei Hitzestress, sondern auch vor chemischer Intoxikation in Form von toxischen Lipid- bzw. RES-Konzentrationen haben können. ITCs können in die hydrophobe Bindetasche von teilweise entfalteten Proteinen gelangen und diese irreversibel durch kovalente Bindung an zugänglichen Thiol-Gruppen modifizieren. Chaperone können unter normalen Bedingungen diese hydrophoben Stellen schützen und somit eine Aggregation von Proteinen sowie eine Modifikation der Proteine durch ITCs verhindern. Unter Bedingungen mit hohen ITC-Konzentrationen bedarf es allerdings deutlich mehr Chaperone, um eine Modifikation und Aggregation der Proteine zu verhindern und somit die Zellintegrität zu bewahren. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet

werden, dass die *hsfa1abde*-Mutante, der die Masterregulatoren HSFA1 a,b,d und e der HSR fehlen und bei der entsprechend die Induktion 21 weiterer HSFs und damit der meisten HS-Genen beeinträchtigt ist (Yoshida et al., 2011; Liu and Charng, 2012), deutlich sensitiver gegenüber BITC-Intoxikation als die Wildtypen Col-0 und Ws ist (Abbildung 27). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Induktion einiger HSPs und hierbei insbesondere die Fähigkeit, Chaperone zu bilden, in *Arabidopsis* bei chemischer Intoxikation eine bedeutende Rolle spielen könnte. Eine Induktion der HSP-Expression durch moderate Hitze allein war allerdings unter den getesteten Bedingungen nicht ausreichend für einen Schutz gegenüber BITC-Intoxikation (Abbildung 28). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich unter den SF- bzw. RES-induzierten Genen weitere Gene befinden, welche in der Detoxifikation von Xenobiotika beteiligt sind. Es wäre daher interessant, diese Gene zu identifizieren. Dazu müsste eine Analyse der GO-Terme der Gene durchgeführt werden, welche exklusiv durch SF und nicht durch Hitze induziert werden.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob RES-induzierte Gene vor einem letalen Hitzestress ähnlich wie moderate Hitze schützen können. Hara et al. (2013) konnten beobachten, dass eine Vorbehandlung von Keimlingen mit verschiedenen ITCs (AITC, PEITC, Methyl-ITC) zu einer erhöhten Thermotoleranz führte. Bei Muench (2016) hingegen konnte eine chemisch induzierte Akklimatisierung von *Arabidopsis*-Keimlingen durch verschiedene RES wie  $PGA_1$ , OPDA oder Radicol, nicht vor Hitzestress schützen.

#### **4.6 Metabolische Reaktion von *Arabidopsis* bei chemischer Intoxikation**

Nach verschiedenen Stresssituationen wie Hitzestress, Exposition gegenüber Ozon, Trockenstress und Stickstoff-Mangel konnte eine TAG-Akkumulation beobachtet werden, welche Teil eines möglichen Membran-Lipid-Remodeling-Prozesses ist (Sakaki et al., 1990; Gaude et al., 2007; Mueller et al., 2015; Mueller et al., 2017). Vielen der aufgezählten abiotischen Stressoren gemeinsam ist eine Hemmung der Photosynthese. Die Stärke der TAG-Akkumulation wird unter anderem von Faktoren wie dem Fluss und der Verteilung von Energie aus der Photosynthese beeinflusst (Chapman and Ohlrogge, 2012). In einem Zustand der Energieverarmung durch reduzierte Photosyntheseleistung bei Hitze könnten Pflanzen möglicherweise durch den Abbau von TAGs mittels Lipasen Fettsäuren freisetzen und aus diesen

über  $\beta$ -Oxidation im Peroxisom Energie gewinnen (Eastmond, 2006; Graham, 2008; Theodoulou and Eastmond, 2012). Fan et al. (2014) konnten nachweisen, dass PDAT1 und die Lipase SUGAR-DEPENDENT1 (SDP1) in der Übertragung der Fettsäuren aus Membranlipiden über den TAG-Pool hin zur  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind. TAGs könnten so zum einen als Energielieferant fungieren, während die Photosynthese nach einem Hitzeschock eingeschränkt ist. Zum anderen stellen TAGs einen transienten Puffer vor überschüssigen freien Fettsäuren aus dem Abbau von Membranlipiden dar. In hohen Konzentrationen wirken freie Fettsäuren und andere Lipid-Intermediate toxisch auf Zellen und können zum Tod der Zelle führen. Untersuchungen in Hefen und tierischen Zellen weisen darauf hin, dass eine TAG-Akkumulation eine große Rolle beim Abfangen von freien Fettsäuren in Lipid-Tröpfchen spielt und so vor Lipotoxizität schützen kann (Zhang et al., 2003; Listenberger et al., 2003; Ducharme and Bickel, 2008; Kohlwein, 2010). Fan et al. (2013a) folgerten, dass auch in *Arabidopsis* eine intakte TAG Synthese Zellen vor einem Zelltod, welcher durch eine Überladung mit freien Fettsäuren induziert wurde, schützen können. Daher könnte es sein, dass verschiedene Stressoren eine Freisetzung von Fettsäuren im Zuge eines Membranumbaus induzieren können und diese Fettsäuren durch Einbau in TAGs detoxifiziert werden müssen.

Es stellte sich die Frage, ob eine Änderung des Lipidmetabolismus mit einer Akkumulation an TAGs ebenfalls bei chemischem Stress in Form von verschiedenen Substanzen wie RES, Thiolreagenzien oder Herbizide erfolgt. Zudem sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob eine mögliche TAG-Akkumulation mit einer Reduktion der Photosynthese-Effizienz sowie einer Erniedrigung der Überlebensrate korreliert. Tatsächlich konnte nach exogener Gabe von toxischen Konzentrationen von SF und BITC in *Arabidopsis*-Keimlingen zum einen eine deutliche Reduktion des Fv/Fm-Wertes sowie der Überlebensrate beobachtet werden (Abbildung 25). Zum anderen war eine deutliche Akkumulation der Hauptverbindungen TAG54 sowie TAG52 zu verzeichnen (Abbildung 29). Dabei zeigten sich insbesondere die TAG-Spezies mit mehrfach ungesättigten FS, wie 52:9, 52:8, 54:9, 54:8 als besonders erhöht (Abbildung 30). Müller et al. (2015) konnten bei der Analyse der TAG-Gehalte in zwei Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlingen nach Hitzestress (90 Minuten, 45 °C) ebenfalls eine deutliche Akkumulation der TAG54- sowie TAG52-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (9–6 Doppelbindungen)

detektieren. Die Behandlung mit  $\text{PGA}_1$  sowie Hexenal führte unter den getesteten Bedingungen allerdings zu keiner TAG-Akkumulation (Abbildung 29). Da jedoch weder die Überlebensrate noch der Parameter  $F_v/F_m$  erniedrigt waren (Abbildung 31), könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein, dass die applizierten Konzentrationen der beiden Oxylipine zu gering waren. Um eine mögliche Korrelation der TAG-Akkumulation mit der Überlebensrate und der Photosynthese-Aktivität zu überprüfen, müsste das Experiment mit höheren Konzentrationen wiederholt werden. Allerdings lägen diese Konzentrationen vermutlich nicht mehr im physiologischen Bereich. Die Untersuchung verschiedener Thiol-Reagenzien wie IA, NEM sowie MMTS führten konzentrationsabhängig zu einer Senkung des  $F_v/F_m$ -Wertes und der Überlebensrate und zu einer erhöhten TAG-Akkumulation (Abbildung 34). Das Oxidationsmittel DA hingegen zeigte unter den getesteten Bedingungen in den Keimlingen keinen Effekt. Das Herbizid Glyphosat, welches zwar zu einer Senkung des  $F_v/F_m$ -Wertes führte, aber für die Keimlinge unter den Testbedingungen nicht toxisch war, hatte ebenfalls keinen Effekt auf die TAG-Spiegel. Einzig hohe Konzentrationen des Auxin-Analogons Dicamba bewirkten eine TAG-Akkumulation. Allerdings wurde hier weder eine Erniedrigung der Photosynthese-Effizienz noch der Überlebensrate beobachtet. Zusammenfassend konnte eine Akkumulation der Haupt-TAG-Spezies nach exogener Gabe von 500  $\mu\text{M}$  SF (6,9-fach), 500  $\mu\text{M}$  BITC (5,3-fach), 1000  $\mu\text{M}$  IA (6,6-fach), 1000  $\mu\text{M}$  NEM (6-fach), 1500  $\mu\text{M}$  Dicamba (3,3-fach) sowie 1000  $\mu\text{M}$  MMTS (1,9-fach) in *Arabidopsis*-Keimlingen beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete TAG-Akkumulation bei chemischem Stress eine Folge einer reduzierten Photosyntheseleistung ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Herbizide getestet, welche auf unterschiedlicher Weise die Photosynthese inhibieren. Die Analyse der TAG-Gehalte nach Gabe zweier PSII-Inhibitoren (Diuron und Metribuzin), welche zu einer deutlichen Erniedrigung der Photosynthese-Effizienz sowie der Überlebensrate führte (Abbildung 32), zeigte jedoch keine Unterschiede (Abbildung 33).

Der vermutete Zusammenhang zwischen  $F_v/F_m$ -Werten, Überlebensrate und TAG-Akkumulation konnte nur bei SF, BITC, IA, NEM und MMTS nachgewiesen werden. Die vermutete Erklärung der TAG-Akkumulation nach chemischem Stress würde demnach nur für die Chemikalien gelten, die neben einer TAG-Akkumulation gleichzeitig eine Inhibierung der

Photosynthese zeigten. Die bisherigen Untersuchungen bestätigen jedenfalls nicht, dass es eine strikte Korrelation von chemisch-induzierter Hemmung der Photosynthese und der TAG-Akkumulation gibt.

Zusammenfassend induzieren hohe Konzentrationen an BITC sowie SF eine metabolische Antwort, bei welcher in *Arabidopsis*-Pflanzen ein Schutz gegen abiotischen Stress (Hitze) gezeigt werden konnte (Mueller et al., 2017). Es stellt sich anschließend die Frage nach der Bedeutung der TAG-Akkumulation nach chemischem Stress durch ITCs. Zudem wäre interessant, ob die beobachtete TAG-Akkumulation wichtig für die Resistenz gegen chemischen Stress ist. In Kooperation mit Julia Doller im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit zeigten sich Hinweise darauf, dass die Enzyme PDAT1 sowie SFR2 an der TAG-Akkumulation nach BITC-Intoxikation beteiligt sind (Doller, 2018).

Die Erforschung neuer Mechanismen, um Nutzpflanzen resistenter gegenüber Stress zu machen, ist in der heutigen Zeit hochaktuell. Es bleibt zu untersuchen, ob eine Erhöhung der TAG-Spiegel Pflanzen resistenter gegenüber chemischen Stress machen könnte.



## 5. Zusammenfassung

In Brassicaceae werden bei einer Gewebszerstörung unreaktive Glukosinolate durch das Enzym Myrosinase hydrolysiert. Es entstehen reaktive Substanzen wie Isothiocyanate (ITCs). Da diese Reaktion sehr schnell erfolgt wird sie auch als Senfö-Glukosid-Bombe bezeichnet. In *Arabidopsis thaliana* erfolgt nach Verwundung und Pathogeninfektion eine massive Akkumulation des ITCs Sulforaphan (SF), welches eine reaktive elektrophile Spezies (RES) darstellt. Zu der Gruppe der RES zählen auch einige Oxylipine mit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppen wie 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) oder Phytoprostan A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>). Die Fähigkeit der kovalenten Modifikation von Peptiden und Proteinen gilt als essentiell sowohl für die toxischen als auch die Gen-induzierenden Eigenschaften der RES. Neben ihrer Reaktivität spielt auch die Lipophilie eine Rolle für die Fähigkeit über Membranen zu diffundieren und unspezifisch an Proteine zu binden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen an *Arabidopsis*-Keimlingen mit sub-toxischen Konzentrationen von SF, Benzylisothiocyanat (BITC) und dem Oxylipin Prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>) zeigten, dass strukturell sehr verschiedene RES einen gemeinsamen Satz von 55 Genen induzieren. Unter diesen befanden sich verschiedene Hitzeschock-, Stressassoziierte- und Detoxifizierungsgene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung über eine Muster-spezifische Erkennung der RES erfolgt. Als einen möglichen Mechanismus der RES-vermittelten Geninduktion wird die Regulation durch die Veränderung des zellulären Redox-Potentials als Folge kovalenter Modifikation von GSH durch RES diskutiert. Die Untersuchung der GSH-Gehalte sowie des Redox-Potential nach Behandlung mit sub-toxischen RES-Konzentrationen in *Arabidopsis*-Keimlingen zeigte jedoch unter den getesteten Bedingungen keine Veränderung.

Neben dem Erkennungs- und Signaltransduktionsmechanismus ist auch die biologische Bedeutung von RES für die Vermittlung einer Stresstoleranz noch weitgehend unklar. Durch die Untersuchung der Genexpression in *Arabidopsis*-Pflanzen nach Verwundung konnte gezeigt werden, dass eine wundinduzierte Akkumulation von SF zur Induktion einiger Gene der Hitzeschockreaktion (HSR) im Wildtyp, jedoch nicht in der myrosinase-defiziten *tgg1tgg2*-Mutante führte. Auch in der Transkriptomanalyse war nach RES-Gabe ebenfalls eine starke Induktion hitze-responsiver Gene, deren Regulation über den Masterregulator dem Hitzeschock-

## Zusammenfassung

TF A1 vermittelt wird, zu beobachten. Besonders die Induktion der HSPs, welche als Chaperone fungieren und damit Thiolgruppen von Proteinen vor Modifikation schützen können, haben vermutlich bei chemischer Intoxikation protektive Eigenschaften für die Zellen. Tatsächlich zeigte sich unter den gewählten Bedingungen die *hsfa1a,b,d,e*-Mutante empfindlicher gegenüber ITCs als der Wildtyp. Die Fähigkeit, eine HSR ausbilden zu können, scheint in *Arabidopsis* bei chemischer Intoxikation eine bedeutende Rolle zu spielen. Eine Vorbehandlung mit RES wie SF, BITC oder dem HSP90-Inhibitor Radicol in *Arabidopsis*-Keimlingen konnte eine Schutzwirkung vor chemischer Intoxikation vermitteln. Dies erfolgte jedoch nicht nach Behandlung mit moderater Hitze (zwei Stunden, 37 °C). Somit scheint die HSR alleine nicht ausreichend für den Aufbau eines effektiven Schutzes vor BITC-Intoxikation zu sein.

Als metabolische Antwort von *Arabidopsis*-Keimlingen auf Intoxikation mit RES konnte eine konzentrationsabhängige Senkung der maximalen Quantenausbeute am Photosystem II (PSII), sowie gleichzeitig eine Akkumulation an TAG-Spezies beobachtet werden. Diese metabolische Reaktion ist in der Literatur bereits als Schutz gegen Hitzestress beschrieben. Die Bedeutung der TAG-Akkumulation nach chemischem ITC-Stress ist noch unklar.

## 6. Summary

In Brassicaceae, unreactive glucosinolates are hydrolyzed by the enzyme myrosinase during tissue destruction. Reactive substances such as isothiocyanates (ITCs) are formed. Since this reaction takes place very quickly, it is also called mustard oil bomb. In *Arabidopsis thaliana*, after wounding and pathogen infection, a massive accumulation of the ITC Sulforaphan (SF) occurs, which is a reactive electrophilic species (RES). The group of RES also includes some oxylipins with a  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group such as 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) or phytoprotane A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>). The ability to covalently modify peptides and proteins is considered essential for the toxic and gene inducing properties of RES. In addition to their reactivity, lipophilia also plays a role in the ability to diffuse across membranes and bind unspecifically to proteins.

The transcriptome analyses performed on *Arabidopsis*-seedlings with sub-toxic concentrations of SF, benzylisothiocyanate (BITC) and oxylipin prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>) showed that structurally very different RES induce a common set of 55 genes. Among the induced genes were several heat shock, stress associated and detoxification genes. These observations suggest that activation is via pattern-specific recognition of RES. As a possible mechanism of RES-mediated gene induction, regulation by alteration of the cellular redox potential as result of covalent modification of GSH by RES is discussed. However, the study of GSH levels and redox potential after treatment with sub-toxic RES concentrations in *Arabidopsis*-seedlings showed no change under the tested conditions.

In addition to the recognition and signal transduction mechanism for RES, the biological significance of RES for the mediation of stress tolerance is still largely unclear. By studying the gene expression of *Arabidopsis*-plants after wounding, it was shown that wound induced accumulation of SF led to the induction of some genes of heat shock response (HSR) in the wild type, but not in the myrosinase-deficient *tgg1tgg2*-mutant. Also in transcriptome analysis a strong induction of heat-responsive genes could be observed after RES administration, whose regulation is mediated by the master regulator of the heatshock-TF A1 (HSFA1). In particular, the induction of HSPs, which act as chaperones and can thus protect thiol groups of proteins from modification, presumably have protective properties for the cells during chemical

intoxication. In fact, under the conditions tested, the *hsfa1a,b,d,e*-mutants were more sensitive to ITCs than the wild type. The ability to form HSR seems to play an important role in chemical intoxication in *Arabidopsis*. Pretreatment with RES such as SF, BITC or the HSP90 inhibitor radicicol in *Arabidopsis*-seedlings could mediate a protective effect against chemical intoxication. However, this was not done after treatment with moderate heat (two hours, 37 °C). Thus, HSR alone does not seem to be sufficient to provide effective protection against BITC intoxication.

As a metabolic response of *Arabidopsis*-seedlings to intoxication with RES, a concentration-dependent reduction of the maximum quantum yield at the photosystem II (PSII), as well as an accumulation of TAG species could be observed. This metabolic reaction is already described in the literature as protection against heat stress. The significance of TAG accumulation after chemical stress in the form of ITC intoxication is still unclear.

## Literaturverzeichnis

- Acosta, I.F., and Farmer, E.E.** (2010). Jasmonates. *Arabidopsis Book* **8**.
- Agerbirk, N., and Olsen, C.E.** (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* **77**: 16–45.
- Alm eras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., M ene-Saffran e, L., and Farmer, E.E.** (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **34** (2): 205–216.
- Amrhein, N., Schab, J., and Steinr ucken, H.C.** (1980). The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften* **67** (7): 356–357.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunstr om, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., G obel, C., Feussner, I., and Ellerstr om, M.** (2006). Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *Journal of Biology Chemistry* **281** (42): 31528–31537.
- Andersson, M.X., Nilsson, A.K., Johansson, O.N., Bozta , G., Adolfsson, L.E., Pinosa, F., Petit, C.G., Aronsson, H., Mackey, D., T or, M., Hamberg, M., and Ellerstr om, M.** (2015). Involvement of the Electrophilic Isothiocyanate Sulforaphane in *Arabidopsis* Local Defense Responses1. *Plant Physiology* **167** (1): 251–261.
- Andreasson, E., Jorgensen, L.B., Hoglund, A.-S., Rask, L., and Meijer, J.** (2001). Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* **127** (4): 1750–1763.
- Ayers, P.W., Parr, R.G., and Pearson, R.G.** (2006). Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. *Journal of Chemical Physics* **124** (19): 194107.
- Baerson, S.R., S anchez-Moreiras, A., Pedrol-Bonjoch, N., Schulz, M., Kagan, I.A., Agarwal, A.K., Reigosa, M.J., and Duke, S.O.** (2005). Detoxification and transcriptome response in *Arabidopsis* seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *Journal of Biological Chemistry* **280** (23): 21867–21881.
- Ball, L., Accotto, G.-P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S., and Mullineaux, P.M.** (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16** (9): 2448–2462.

- Banaś, A., Dahlqvist, A., Ståhl, U., Lenman, M., and Stymne, S.** (2000). The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochemical Society Transactions* **28** (6): 703–705.
- Barth, C., and Jander, G.** (2006). Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant Journal* **46** (4): 549–562.
- Bednarek, P.** (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15** (4): 407–414.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., and Schulze-Lefert, P.** (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323** (5910): 101–106.
- Beekwilder, J., van Leeuwen, W., van Dam, N.M., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J.W., Schipper, B., Verbocht, H., Vos, R.C.H. de, Morandini, P., Aarts, M.G.M., and Bovy, A.** (2008). The Impact of the Absence of Aliphatic Glucosinolates on Insect Herbivory in Arabidopsis. *PloS One* **3** (4).
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*: 289–300.
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L., and Roitsch, T.** (2007). Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58** (4): 797–806.
- Bertl, E., Bartsch, H., and Gerhäuser, C.** (2006). Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Molecular Cancer Therapeutics* **5** (3): 575–585.
- Björkman, O., and Demmig, B.** (1987). Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170** (4): 489–504.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., and Douce, R.** (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach

- chloroplasts. II. Biochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry* **258** (21): 13281–13286.
- Bones, A.M., Hara, M., Rossiter, J.T., and Kissen, R.** (2015). Editorial: Physiology and Cellular Mechanisms of Isothiocyanates and Other Glucosinolate Degradation Products in Plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1105.
- Bones, A.M., and Rossiter, J.T.** (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* **67** (11): 1053–1067.
- Bones, A.M., Thangstad, O.P., Haugen, O.A., and Espevik, T.** (1991). Fate of Myrosin Cells: Characterization of Monoclonal Antibodies Against Myrosinase. *Journal of Experimental Botany* **42** (12): 1541–1550.
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., and Gershenzon, J.** (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62** (3): 471–481.
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., and Henrissat, B.** (2000). High Resolution X-ray Crystallography Shows That Ascorbate Is a Cofactor for Myrosinase and Substitutes for the Function of the Catalytic Base. *Journal of Biological Chemistry* **275** (50): 39385–39393.
- Burow, M., Markert, J., Gershenzon, J., and Wittstock, U.** (2006). Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates. *The FEBS journal* **273** (11): 2432–2446.
- Buseman, C.M., Tamura, P., Sparks, A.A., Baughman, E.J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M.R., Esch, S.W., Shah, J., Williams, T.D., and Welti, R.** (2006). Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **142** (1): 28–39.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., and Pérez-Sala, D.** (2001). 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *Journal of Biological Chemistry* **276** (38): 35530–35536.
- Chapman, K.D., and Ohlrogge, J.B.** (2012). Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry* **287** (4): 2288–2294.

- Chen, W., Chao, G., and Singh, K.B.** (1996). The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant Journal* **10** (6): 955–966.
- Clarke, D.B.** (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods* **2** (4): 310.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B.** (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** (10): 1062–1071.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., and Jaskiewicz, M.R.** (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 97–119.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., and Stymne, S.** (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (12): 6487–6492.
- Dayan, F.E., Duke, S.O., and Grossmann, K.** (2010). Herbicides as Probes in Plant Biology. *Weed Science* **58** (03): 340–350.
- Dennis, E.A., and Kennedy, E.P.** (1972). Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *Journal of Lipid Research* **13** (2): 263–267.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.-S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58** (4): 497–513.
- Diaz-Vivancos, P., Simone, A. de, Kiddle, G., and Foyer, C.H.** (2015). Glutathione--linking cell proliferation to oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **89**: 1154–1164.
- Dinkova-Kostova, A.T.** (2013). Chemoprotection against cancer by isothiocyanates: a focus on the animal models and the protective mechanisms. *Topics in Current Chemistry* **329**: 179–201.



- Doller, J.** (2018). Metabolische Abwehrreaktionen gegen chemischen Stress in *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg. Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie (unveröffentlicht).
- Ducharme, N.A., and Bickel, P.E.** (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149** (3): 942–949.
- Dueckershoff, K., Mueller, S., Mueller, M.J., and Reinders, J.** (2008). Impact of cyclopentenone-oxy lipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1784** (12): 1975–1985.
- Eastmond, P.J.** (2006). SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell* **18** (3): 665–675.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., and Talalay, P.** (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56** (1): 5–51.
- Fan, J., Yan, C., and Xu, C.** (2013a). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of *Arabidopsis*. *Plant journal for Cell and Molecular Biology* **76** (6): 930–942.
- Fan, J., Yan, C., Zhang, X., and Xu, C.** (2013b). Dual role for phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **25** (9): 3506–3518.
- Farmer, E.E., and Davoine, C.** (2007). Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology* **10** (4): 380–386.
- Farmer, E.E., and Mueller, M.J.** (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 429–450.
- Findling, S., Stotz, H.U., Zoeller, M., Krischke, M., Zander, M., Gatz, C., Berger, S., and Mueller, M.J.** (2018). TGA2 signaling in response to reactive electrophile species is not dependent on cysteine modification of TGA2. *PLoS One* **13** (4): e0195398.
- Fode, B., Siemsen, T., Thurow, C., Weigel, R., and Gatz, C.** (2008). The *Arabidopsis* GRAS Protein SCL14 Interacts with Class II TGA Transcription Factors and Is Essential for the Activation of Stress-Inducible Promoters. *Plant Cell* **20** (11): 3122–3135.

- Foyer, C.H., and Noctor, G.** (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155** (1): 2–18.
- Gaude, N., Brehelin, C., Tischendorf, G., Kessler, F., and Dormann, P.** (2007). Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **49** (4): 729–739.
- Gerhards, J.** (2015). Metabolismus und Funktion von Glucosinolaten in Pflanzen. Bachelorarbeit. Juliaus-Maximilians-Universität, Würzburg. Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie (unveröffentlicht).
- Gerhards, J.** (2017). Veränderung des GSH/GSSG-Redoxpotentials durch reaktive elektrophile Spezies („RES“): Bedeutung für die Signaltransduktion. Masterarbeit. Juliaus-Maximilians-Universität, Würzburg. Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie (unveröffentlicht).
- Graham, I.A.** (2008). Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 115–142.
- Gurley, W.B.** (2000). HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. *Plant Cell* **12** (4): 457–460.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303–333.
- Hanschen, F.S., Lamy, E., Schreiner, M., and Rohn, S.** (2014). Reaktivität und Stabilität von Glucosinolaten und ihren Abbauprodukten in Lebensmitteln. *Angewandte Chemie* **126** (43): 11614–11635.
- Hanschen, F.S., Pfitzmann, M., Witzel, K., Stützel, H., Schreiner, M., and Zrenner, R.** (2018). Differences in the enzymatic hydrolysis of glucosinolates increase the defense metabolite diversity in 19 *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Physiology and Biochemistry* **124**: 126–135.
- Hara, M., Harazaki, A., and Tabata, K.** (2013). Administration of isothiocyanates enhances heat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **69** (1): 71–77.
- Hara, M., Yatsuzuka, Y., Tabata, K., and Kuboi, T.** (2010). Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione S-transferase expression in *Arabidopsis* but act as herbicides at higher concentrations. *Journal of Plant Physiology* **167** (8): 643–649.

- Hong, S.-W., and Vierling, E.** (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (8): 4392–4397.
- Hossain, M.S., Ye, W., Hossain, M.A., Okuma, E., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I.C., and Murata, Y.** (2013). Glucosinolate degradation products, isothiocyanates, nitriles, and thiocyanates, induce stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated reactive oxygen species production in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77** (5): 977–983.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A.** (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research* **35**: W169-75.
- Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K.D., Irizarry, R.A., Lawrence, M., Love, M.I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleś, A.K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G.K., Tenenbaum, D., Waldron, L., and Morgan, M.** (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* **12** (2): 115–121.
- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thangstad, O.P., and Bones, A.M.** (2002). Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128** (4): 1180–1188.
- Jacobs, A.T., and Marnett, L.J.** (2010). Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Accounts of Chemical Research* **43** (5): 673–683.
- Jubany-Mari, T., Alegre-Batlle, L., Jiang, K., and Feldman, L.J.** (2010). Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of cytosol redox status in *Arabidopsis thaliana* water-stressed plants. *FEBS Letters* **584** (5): 889–897.
- Juge, N., Mithen, R.F., and Traka, M.** (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64** (9): 1105.
- Jung, H.-S., Crisp, P.A., Estavillo, G.M., Cole, B., Hong, F., Mockler, T.C., Pogson, B.J., and Chory, J.** (2013). Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of

- Arabidopsis to excess light. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110** (35): 14474–14479.
- Khokon, M.A.R., Jahan, M.S., Rahman, T., Hossain, M.A., Muroyama, D., Minami, I., Munemasa, S., Mori, I.C., Nakamura, Y., and Murata, Y.** (2011). Allyl isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **34** (11): 1900–1906.
- Kissen, R., Øverby, A., Winge, P., and Bones, A.M.** (2016). Allyl-isothiocyanate treatment induces a complex transcriptional reprogramming including heat stress, oxidative stress and plant defence responses in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **17**.
- Kissen, R., Rossiter, J.T., and Bones, A.M.** (2009). The ‘mustard oil bomb’: not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews* **8** (1): 69–86.
- Kliebenstein, D.J.** (2001). Genetic Control of Natural Variation in Arabidopsis Glucosinolate Accumulation. *Plant Physiology* **126** (2): 811–825.
- Kohlwein, S.D.** (2010). Triacylglycerol Homeostasis: Insights from Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **285** (21): 15663–15667.
- Koprivova, A., Mugford, S.T., and Kopriva, S.** (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Reports* **29** (10): 1157–1167.
- Koroleva, O.A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M.R., Tomos, A.D., and Hedrich, R.** (2000). Identification of a New Glucosinolate-Rich Cell Type in Arabidopsis Flower Stalk. *Plant Physiology* **124** (2): 599–608.
- Koroleva, O.A., Gibson, T.M., Cramer, R., and Stain, C.** (2010). Glucosinolate-accumulating S-cells in Arabidopsis leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. *The Plant journal for Cell and Molecular Biology* **64** (3): 456–469.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., and Edwards, G.E.** (2004). New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes. *Photosynthesis Research* **79** (2): 209.
- Krause, G.H., and Weis, E.** (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42** (1): 313–349.

- Lee, J.H., and Schöffl, F.** (1996). An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **252** (1-2): 11–19.
- León, J., Rojo, E., and Sánchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52** (354): 1–9.
- Li, H.-M., and Yu, C.-W.** (2018). Chloroplast Galactolipids: The Link Between Photosynthesis, Chloroplast Shape, Jasmonates, Phosphate Starvation and Freezing Tolerance. *Plant & Cell Physiology* **59** (6): 1128–1134.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., and Ohlrogge, J.** (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **11**: e0161.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., and Schulze-Lefert, P.** (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)* **310** (5751): 1180–1183.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., and Schaffer, J.E.** (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (6): 3077–3082.
- Liu, H.-c., and Charng, Y.-Y.** (2012). Acquired thermotolerance independent of heat shock factor A1 (HsfA1), the master regulator of the heat stress response. *Plant signaling & Behavior* **7** (5): 547–550.
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., Rad, U. von, Durner, J., and Mueller, M.J.** (2005). B1-Phytosteranes Trigger Plant Defense and Detoxification Responses. *Plant Physiology* **137** (1): 328–340.
- Marrs, K.A.** (1996). The Functions and Regulation of Glutathione-S-Transferases in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127–158.

- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis. *Plant Journal* **33** (3): 493–502.
- Maynard, D., Gröger, H., Dierks, T., and Dietz, K.-J.** (2018). The function of the oxylipin 12-oxophytodienoic acid (OPDA) in cell signaling, stress acclimation and development. *Journal of Experimental Botany* **69** (22): 5341-5354.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., and Hell, R.** (2007). Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant journal for Cell and Molecular Biology* **52** (5): 973–986.
- Meyer, A.J., and Hell, R.** (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research* **86** (3): 435–457.
- Moellering, E.R., Muthan, B., and Benning, C.** (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* **330** (6001): 226–228.
- Moos, P.J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E., and Fitzpatrick, F.A.** (2003). Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry* **278** (2): 745–750.
- Mueller, M.J., and Berger, S.** (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* **70** (13-14): 1511–1521.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S.** (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20** (3): 768–785.
- Mueller, S.P., Krause, D.M., Mueller, M.J., and Fekete, A.** (2015). Accumulation of extra-chloroplastic triacylglycerols in Arabidopsis seedlings during heat acclimation. *Journal of Experimental Botany* **66** (15): 4517–4526.
- Mueller, S.P., Unger, M., Guender, L., Fekete, A., and Mueller, M.J.** (2017). Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase-Mediated Triacylglycerol Synthesis Augments Basal Thermotolerance. *Plant Physiology* **175** (1): 486–497.

- Muench, M.** (2016). Funktionelle Untersuchungen zur Oxylipin-abhängigen Regulation von Hitzeschockproteinen in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg. Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie.
- Muench, M., Hsin, C.-H., Ferber, E., Berger, S., and Mueller, M.J.** (2016). Reactive electrophilic oxylipins trigger a heat stress-like response through HSFA1 transcription factors. *Journal of Experimental Botany* **67** (21): 6139–6148.
- Mullineaux, P.M., and Rausch, T.** (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research* **86** (3): 459–474.
- Myzak, M.C., and Dashwood, R.H.** (2006). Chemoprotection by sulforaphane: Keep one eye beyond Keap1. *Cancer Letters* **233** (2): 208–218.
- Nakamura, T., Abe-Kanoh, N., and Nakamura, Y.** (2017). Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **62** (1): 11–19.
- Nakano, R.T., Piślewska-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P.P., Miyahara, M., Kondo, M., Böttcher, C., Mori, M., Nishimura, M., Schulze-Lefert, P., Hara-Nishimura, I., and Bednarek, P.** (2017). PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **89** (2): 204–220.
- Nakano, R.T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2014). ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Nguyen, A.H., Matsui, A., Tanaka, M., Mizunashi, K., Nakaminami, K., Hayashi, M., Iida, K., Toyoda, T., van Nguyen, D., and Seki, M.** (2015). Loss of *Arabidopsis* 5'-3' Exoribonuclease AtXRN4 Function Enhances Heat Stress Tolerance of Plants Subjected to Severe Heat Stress. *Plant & Cell Physiology* **56** (9): 1762–1772.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., and Foyer, C.H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53** (372): 1283–1304.

- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35** (2): 454–484.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., and Foyer, C.H.** (2011). Glutathione. *Arabidopsis Book* **9**: e0142.
- Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, J., and Ryan, C.A.** (2001). Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **13** (1): 179–192.
- Ørverby, A., Stokland, R.A., Åsberg, S.E., Sporsheim, B., and Bones, A.M.** (2015). Allyl isothiocyanate depletes glutathione and upregulates expression of glutathione S-transferases in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Pfalz, J., Liebers, M., Hirth, M., Grübler, B., Holtzegel, U., Schröter, Y., Dietzel, L., and Pfannschmidt, T.** (2012). Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Frontiers in Plant Science* **3**: 257.
- Pogson, B.J., Woo, N.S., Förster, B., and Small, I.D.** (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science* **13** (11): 602–609.
- Potters, G., Horemans, N., and Jansen, M.A.K.** (2010). The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* **48** (5): 292–300.
- Queitsch, C.** (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12** (4): 479–492.
- Queval, G., and Foyer, C.H.** (2012). Redox regulation of photosynthetic gene expression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367** (1608): 3475–3485.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F.A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., van Breusegem, F., and Noctor, G.** (2007). Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **52** (4): 640–657.



- Queval, G., Jaillard, D., Zechmann, B., and Noctor, G.** (2011). Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, Cell & Environment* **34** (1): 21–32.
- Ramirez, C.N., Li, W., Zhang, C., Wu, R., Su, S., Wang, C., Gao, L., Yin, R., and Kong, A.-N.** (2017). In Vitro-In Vivo Dose Response of Ursolic Acid, Sulforaphane, PEITC, and Curcumin in Cancer Prevention. *AAPS Journal* **20** (1): 19.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., and Meijer, J.** (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* **42** (1): 93–113.
- Rudolph, T.K., and Freeman, B.A.** (2009). Transduction of Redox Signaling by Electrophile-Protein Reactions. *Science Signaling* **2** (90): re7.
- Sakaki, T., Saito, K., Kawaguchi, A., Kondo, N., and Yamada, M.** (1990). Conversion of Monogalactosyldiacylglycerols to Triacylglycerols in Ozone-Fumigated Spinach Leaves. *Plant Physiology* **94** (2): 766–772.
- Schafer, F.Q., and Buettner, G.R.** (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* **30** (11): 1191–1212.
- Schillheim, B., Jansen, I., Baum, S., Beesley, A., Bolm, C., and Conrath, U.** (2018). Sulforaphane Modifies Histone H3, Unpacks Chromatin, and Primes Defense. *Plant Physiology* **176** (3): 2395–2405.
- Schnaubelt, D., Queval, G., Dong, Y., Diaz-Vivancos, P., Makgopa, M.E., Howell, G., Simone, A. de, Bai, J., Hannah, M.A., and Foyer, C.H.** (2015). Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **38** (2): 266–279.
- Shirakawa, M., and Hara-Nishimura, I.** (2018). Specialized Vacuoles of Myrosin Cells: Chemical Defense Strategy in Brassicales Plants. *Plant & Cell Physiology* **59** (7): 1309–1316.
- Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., and Halkier, B.A.** (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* **15** (5): 283–290.

- Stamatakis, K., and Pérez-Sala, D.** (2006). Prostanoids with cyclopentenone structure as tools for the characterization of electrophilic lipid-protein interactomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1091**: 548–570.
- Stein, M., Dittgen, J., Sánchez-Rodríguez, C., Hou, B.-H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., and Somerville, S.** (2006). Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* **18** (3): 731–746.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (22): 12837–12842.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P.** (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (43): 15545–15550.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K.-I., Shibata, D., Kobayashi, Y., and Ohta, H.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139** (3): 1268–1283.
- Theodoulou, F.L., and Eastmond, P.J.** (2012). Seed storage oil catabolism: a story of give and take. *Current Opinion in Plant Biology* **15** (3): 322–328.
- Unzner, A.** (2017). *Metabolische Reaktion auf chemische Intoxikation in Pflanzen*. Bachelarbeit. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg. Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie (unveröffentlicht).
- Valgimigli, L., and Iori, R.** (2009). Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **50** (3): 222–237.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J., and Sung, Z.R.** (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway

- Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *Plant Cell* **12** (1): 97–110.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A., and Farmer, E.E.** (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **24** (4): 467–476.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., and Mauch, F.** (2002). Probing the Diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-Transferase Gene Family. *Plant molecular biology* **49** (5): 515–532.
- Wittstock, U., and Burow, M.** (2010). Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book* **8**: e0134.
- Wittstock, U., and Halkier, B.A.** (2000). Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the Conversion of L-Phenylalanine to Phenylacetaldoxime in the Biosynthesis of Benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry* **275** (19): 14659–14666.
- Xu, J., Carlsson, A.S., Francis, T., Zhang, M., Hoffman, T., Giblin, M.E., and Taylor, D.C.** (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on reacylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biology* **12**: 4.
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D., Winkel, B., Mohamed, A., Cheng, C.-L., Shih, M.-C., Poulton, J., and Esen, A.** (2004). Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Molecular Biology* **55** (3): 343–367.
- Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., and Nishimura, M.** (2007). Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **282** (52): 37794–37804.
- Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M., and Sugimoto, Y.** (2015). Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Scientific Reports* **5**: 8030.
- Yeh, C.-H., Kaplinsky, N.J., Hu, C., and Charng, Y.-Y.** (2012). Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science* **195**: 10–23.
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V.** (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* **49** (11): 2283–2301.

- Yi, X., Du, Z., and Su, Z.** (2013). PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. *Nucleic Acids Research* **41**: W98-103.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J.-M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöfl, F., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* **286** (5-6): 321–332.
- Zabala, M.d.T., Grant, M., Bones, A.M., Bennett, R., Lim, Y.S., Kissen, R., and Rossiter, J.T.** (2005). Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **66** (8): 859–867.
- Zhang, Q., Chieu, H.K., Low, C.P., Zhang, S., Heng, C.K., and Yang, H.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *Journal of Biological Chemistry* **278** (47): 47145–47155.
- Zhang, Y.** (2000). Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **21** (6): 1175–1182.
- Zhang, Y.** (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research* **555** (1-2): 173–190.
- Zhang, Y.** (2012). The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis* **33** (1): 2–9.

## **Danksagung**

Mein erster und größter Dank gilt Professor Dr. Martin J. Müller für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl die Dissertation anfertigen zu können sowie für die Überlassung dieses spannenden und vielseitigen Themas. Seine Unterstützung, Betreuung sowie die fachlichen Diskussionen haben diese Thesis sehr bereichert.

Dr. Rosalia Deeken danke ich für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Dr. Tobias Müller und Dr. Dr. Marcus Dittrich vom Lehrstuhl für Bioinformatik danke ich für die statistische Auswertung des Microarrays.

Dr. Markus Krischke und Dr. Agnes Fekete möchte ich für ihre fachkundliche Betreuung und Hilfe im Bereich Analytik und Dr. Susanne Berger für ihre Hilfestellung bei molekularbiologischen Fragestellungen danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Studenten, Julian Gerhards, Julia Doller, Amelie Unzner sowie Ann-Kathrin Schulz. Danke für die gute Zusammenarbeit und euer Engagement!

Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Robert Luxenhofer für die Hilfe bei der graphischen Bearbeitung, Dr. Gabriele Gresser sowie Dr. Lina Straus für das Korrektur lesen, Joachim Schramm für die Hilfe bei der Formatierung und meiner Familie für die Unterstützung danken.

## **Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Transkriptionelle, metabolische und physiologische Anpassung nach Selbstintoxikation mit reaktiven Sekundärstoffen: die Glukosinolat-Bombe in *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. Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

### **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled: „**Transcriptional, metabolic and physiological adaptation after self-intoxication with reactive secondary substances: the glucosinolate bomb in *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. Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Elena Ferber