Bildung und Funktion von Jasmonaten während Seneszenz-Prozessen in *Arabidopsis thaliana* 

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

> > Vorgelegt von

# Martin Alexander Seltmann

Geboren in Mönchengladbach



Würzburg 2010

Eingereicht am:	
-----------------	--

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:	Prof. Dr. Thomas Dandekar
1. Gutachter:	PD Dr. Susanne Berger
2. Gutachter:	PD Dr. Dirk Becker
Tag des Promotionskolloquiums:	
Doktorurkunde ausgehändigt am:	

Für meine Eltern

Die Wolke der Unwissenheit, wird für immer bei uns sein.

Abkürzungsverzeichnis Zusammenfassung 9 Summary 1			7 9 10
1	Einl	leitung	11
	1.1 1.1. 1.1. 1.1. 1.1.	<ul> <li>Die Seneszenz in Pflanzen</li> <li>Seneszenz auf zellulärer Ebene</li> <li>Initiierung der Blattseneszenz</li> <li>Phytohormone als Regulatoren in der Blattseneszenz</li> <li>Molekulare Regulation der Blattseneszenz</li> </ul>	12 12 14 16 18
	1.2 1.2. 1.2. 1.2.	<ul> <li>Lipoxygenasen in Pflanzen</li> <li>Reaktionsmechanismen zur Bildung von Oxylipinen</li> <li>Anschließende Reaktionsmechanismen zur Bildung weiterer Oxylipine</li> <li>Vorkommen und physiologische Bedeutung pflanzlicher Lipoxygenasen</li> </ul>	21 21 22 24
	1.3 1.3. 1.3. 1.3. 1.3. 1.3. 1.3.	<ul> <li>Jasmonate</li> <li>Zusammensetzung der plastidären Membranen</li> <li>Biosynthese der Jasmonate</li> <li>Arabidopside- membranveresterte Oxylipine</li> <li>Die Signaltransduktion der Jasmonate</li> <li>Funktionen der Jasmonate in Pflanzen</li> <li>Jasmonate in der Seneszenz</li> </ul>	26 26 28 30 31 32 33
	1.4	Zielsetzung	35
2	Erg	ebnisse	36
	2.1 [ v 2.1. 2.1.	Der Einfluss von induzierbarer RNA-Interferenz auf die Produktion von Jasmonaten während der Seneszenz von Arabidopsis-Blättern 1 Charakterisierung einer SAG13::AOS RNAi-Linie 2 Charakterisierung einer SAG13::LOX2 RNAi-Linie Die Vorcharakterisierung von konstitutiven 355::LOX2 RNAi Linien	36 36 38
4	2.2	<ol> <li>Phänotypischer Vergleich der 35S::LOX2 RNAi-Linien mit dem Wildtyp und der <i>dde2-2</i> Mutante</li> </ol>	40
2	2.3 ( 2.3. 2.3. 2.3. 2.3.	<ul> <li>Charakterisierung der Einflüsse von LOX2 und Jasmonaten auf</li> <li>Seneszenz-Prozesse in Arabidopsis-Blättern</li> <li>1 Charakterisierung der natürlichen Seneszenz</li> <li>2 Charakterisierung der dunkelinduzierten Seneszenz (DIS)</li> <li>3 Charakterisierung der osmotisch-induzierten Seneszenz</li> <li>4 Untersuchung der osmotisch-induzierten Seneszenz in der <i>coi1</i> Mutante</li> </ul>	45 45 53 62 74
3	Disl	kussion	76
	3.1 E r	Die seneszenzinduzierbare RNA-Interferenz hat Einfluss auf die jeweilige nRNA-Akkumulation, aber nicht auf Jasmonat-Produktion und Seneszenz	76
3	3.2	LOX2 ist an der entwicklungsabhängigen Produktion von Oxylipinen beteiligt	77

3.3 Die	LOX2 vermittelte Jasmonat-Akkumulation hat unterschiedliche Effekte	
auf	die natürliche und stressinduzierte Seneszenz	79
3.3.1	Jasmonate sind nicht essentiell für die naturliche Seneszenz-Progression	80
3.3.2	Die entwicklungsbedingte Jasmonat-Akkumulation ist nicht die Folge	00
2 2 2 2	einer stressbedingten JA-Kaskade	82
3.3.3	oine Ealge des plastidären Membranabhaus	02
334	Die osmotisch-induzierte Seneszenz ist ein stresshedingter Prozess	86 86
335	I OX2 ist durch die Produktion von Jasmonaten	00
01010	in die osmotisch-induzierte Seneszenz involviert	89
3.4 Ja	smonate und LOX2 in der Seneszenz von Arabidopsis thaliana	91
3.5 Au	Jsblick	93
4 Materi	alien	95
4 1 CH	nemikalien Enzyme	95
4.1 0	Snezielle Chemikalien	95
412	Antibiotika	95
4.1.3	Enzvme	95
4.1.4	Andere Reagenzien, Materialen und Kits	96
4.2 St	andardsubstanzen	96
4.3 La	Iborgeräte	96
4.4 Nä	ährmedien	97
4.5 Pu	uffer und Lösungen	98
16 Va	anvendete Organismen	00
4.0 %	Bakterienstämme	99
4.6.2	Pflanzen	99
47 0	a mide	00
4.7 Pl		99
4.8 Co	omputersoftware und Internetadressen	100
5 Metho	den	101
5.1 Mo	olekularbiologische Methoden	101
5.1.1	Polymerasekettenreaktion	101
5.1.2	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	102
5.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	102
5.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	103
5.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	103
5.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	103
5.1.7	Herstellung kompetenter Bakterien	104
5.1.8 E 1 0	Itansionnation von Bakterien	104
5.1.9 5.1.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus E coli	100
5 1 11	Herstellung von Glycerinkulturen	106
5.1.11	Quantifizierung von Nukleinsäuren	107
5.1.13	Sequenzierung von DNA-Sequenzen	107

5.1.14	Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial	107
5.1.15	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	107
5.1.16	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	107
5.1.17	DNase-Verdau und Fällung der RNA	108
5.1.18	cDNA Synthese	108
5.1.19	Quantitative RT-PCR	108
5.1.20	Southern-Hybridisierungen	110
5.2 Ar	beiten mit pflanzlichem Material	112
5.2.1	Erzeugung transgener Arabidopsis-Pflanzen	112
5.2.2	Kultivierung transgener Pflanzen	112
5.2.3	Anzucht der Versuchspflanzen	113
5.2.4	Behandlung der Versuchspflanzen	113
5.3 An	alytische Methoden	114
5.3.1	Extraktion von Chlorophyll	114
5.3.2	Extraktion und Analyse freier Säuren	114
5.3.3	Extraktion und Analyse von Membranlipiden	117
6 Literat	turverzeichnis	119
7 Anhan	Ig	135
Publikationen 146		
Danksagu	ng	147

# Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
AcN	Acetonitril
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
Bp	Basenpaare
cDNA	(k)complementare DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	2'- Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'- Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destiliertes H <sub>2</sub> O
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalaktosyl-Diacylglycerol
dGTP	2'- Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DIG	
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dnOPDA	dinor OPDA
dNTP	2'- Desoxy-Nukleosid-5'-Trinhosnhat
dTTP	2'- Desoxy-Thyminosid-5'-Trinhosnhat
	Ethylendiamintetraacetat
ESI	
EtOH	Ethanol
EG	Erischgewicht
	Hortz
112	
JA	Kalium Agatat
Nac kh	Kilehaaan
	Kiiobasen Linalaäura
	Lipoxygenase Multiple Klapierungestelle (angl.:multiple elening site)
	Mathedia ana at
MeJA	Methyljasmonat
MeOH	ivietnanoi
MGDG	
min	
MOPS	3-N-(Morpholino)propansultonsaure
MRM	Multiple Reaktionsuberwachung (engl.: <i>multiple reaction monitoring</i> )
MRNA	Boten (engl.:messenger) – Ribonukleinsaure
MS	Massenspektrometer
MS	Murashige & Skoog
NaAc	Natrium-Acetat
nd	nicht detektierbar
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
OPR	OPDA-Reduktase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl.: polyunsaturated fatty acids)
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit (engl.: <i>real time</i> )- PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur

S	Sekunde
SA	Salicylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR	Selektive Ionen-Aufzeichnung (engl.: selected ion recording)
SSC	Standard Natriumcitrat-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	über Nacht
UPLC	Ultrahochleistungschromatographie
	(engl.: ultrahigh-performance-liquid-chromatography)
UV	Ultra-Violett
WT	Wildtyp
хg	x-fache Erdbeschleunigung
α-ĽeA	α-Linolensäure

# Zusammenfassung

Jasmonsäure und verwandte Oxylipine wurden bisher als Substanzen, die an der Regulation von Initialisierung und Progression der Blattseneszenz beteiligt sein sollen, kontrovers diskutiert. Bisherige Studien haben sich dabei auf die exogene Applikation von Jasmonaten oder die Messung endogener Spiegel beschränkt. Um die Funktion von Jasmonaten in der Seneszenz-Regulation zu klären, wurden in dieser Arbeit die Profile freier und membranveresterter Oxylipine sowie die Auswirkungen verminderter Oxylipinbildung während der natürlichen Seneszenz und Seneszenz-ähnlicher Prozesse induziert durch Dunkel- und Sorbitol-Inkubation in Blättern von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Jasmonsäure sowie freie 12-Oxo-Phytodiensäure steigen während dieser drei Prozesse an, mit dem stärksten Anstieg von Jasmonsäure nach Dunkelinkubation. Eine deutliche Akkumulation membranveresterter Oxylipine (Arabidopside) konnte lediglich nach Flottierung auf Sorbitol festgestellt werden. Die Mengen an plastidären Mono- und Digalaktosyl-Diacylglycerolen verringerten sich jedoch während der Behandlungen bzw. im Verlauf der Alterung.

Zur Untersuchung möglicher Funktionen ansteigender Jasmonat-Konzentrationen wurden Lipoxygenase 2 RNAi-Pflanzen konstruiert, welche basal Jasmonsäure und 12-Oxo-Phytodiensäure produzieren können, jedoch keinen Anstieg während Seneszenz- bzw. Stress-Prozessen zeigen. Die Gehalte an Chlorophyll und Membranlipiden sowie die Genexpression entwicklungsspezifischer Seneszenzmarker waren während der natürlichen und der dunkelinduzierten Seneszenz in diesen Pflanzen nicht verändert. Dies legt nahe, dass diese Oxylipine im Verhältnis zu anderen endogenen Faktoren keine bzw. nur geringe Wirkungen auf die Seneszenz-Progression haben. Aus den gemachten Beobachtungen kann vielmehr geschlossen werden, dass bei diesen Prozessen die Akkumulation von Jasmonaten eher die Folge eines veränderten Lipid-Metabolismus als ein Auslöser der Seneszenz ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Lipoxygenase 2 RNAi-Linien eine verlangsamte Seneszenz nach Sorbitol-Behandlung. Ähnlich verhält sich die Allenoxid-Synthase Mutante dde2-2, die zwar 13-Lipoxygenase-Produkte aber keine Jasmonate bilden kann. Dies bedeutet, dass die Jasmonate und nicht andere 13-Lipoxygenase-Produkte für die Seneszenz-ähnlichen Symptome unter diesen Bedingungen verantwortlich sind. Dabei stellt die Sorbitol-induzierte Seneszenz einen Stress-Prozess dar, der sich in vielen Punkten von der natürlichen Seneszenz unterscheidet aber große Ähnlichkeiten zur Seneszenz-Induktion nach exogener Jasmonat-Applikation aufweist. Lipoxygenase 2 ist also durch die Bereitstellung von Oxylipinen weniger in Entwicklungs- als vielmehr in Stress-Prozesse involviert.

### Summary

Jasmonic acid and related oxylipins have been controversely discussed to be involved in regulating the initiation and progression of leaf senescence. Present studies mostly focus on exogenous application of jasmonates or measurements of endogenous levels. To this end we analysed profiles of free and esterified oxylipins during natural senescence and upon induction of senescence-like phenotypes by dark treatment and flotation on sorbitol in Arabidopsis thaliana. Jasmonic acid and free 12-oxo-phytodienoic acid increased during all three processes with the strongest increase of jasmonic acid after dark treatment. Arabidopside content did only increase considerably in response to sorbitol treatment. Monoand digalactosyldiacylglycerols decreased during these treatments and aging. Lipoxygenase 2 RNAi plants were generated which produce basal levels of jasmonic acid and 12-oxo-phytodienoic acid but do not exhibit accumulation during natural senescence or upon stress treatment. Chlorophyll loss, degradation of membrane lipids as well as expression of senescence markergenes during aging and upon dark incubation was not altered suggesting that these oxylipins are less or not involved in regulating these processes in comparison to other endogenous factors. From these observations it could be further concluded, that jasmonate accumulation in those processes is rather a result of altered lipid metabolism than a promoter of senescence.

In contrast, lipoxygenase 2 RNAi lines and the allene oxid synthase deficient mutant *dde2-2* were less sensitive to sorbitol treatment than the wild type. This indicates that jasmonates but not other 13-lipoxygenase products are responsible for senescence-like symptoms. Furthermore sorbitol-induced senescence represents a stress-related process, which is similar to senescence processes induced by exogenous jasmonate application but rather than to natural developmental processes. To this end lipoxygenase 2 is rather involved in stress-related processes by providing oxylipins than in developmental functions.

## 1 Einleitung

Schon seit der Entstehung des Lebens auf unserem Planeten gehört der Ablauf bestimmter Lebenszyklen einzelner Zellen und Organismen zu der Entwicklung des Lebens an sich. Dabei ist es für den Fortbestand des vielfältigen Lebens (Biodiversität) sowie dessen stetige evolutive Anpassung an sich ändernde Lebensbedingungen essentiell, dass den nachfolgenden Generationen die durchaus begrenzten Ressourcen an Lebensraum, Nährstoffen oder Energie zur Verfügung gestellt werden können. Aus diesen Gründen gehören neben der Reproduktion die Alterung und das Absterben von Zellen oder Organismen zu einer entscheidenden Phase des Lebenszyklus. Dabei ist die Alterung ein an sich konservierter Prozess, der bis heute für jedes Individuum unumgänglich ist.

Besonders für eukaryotischen Lebensformen ist bekannt, dass die Alterung ein auf genetischer Ebene basierender Prozess ist, der jedoch in seiner Ausprägung von einer Vielzahl endo- und exogener Faktoren beeinflusst wird. Diese Faktoren wirken sich direkt oder indirekt auf zellbiologische Prozesse aus, die zu einem dauerhaften Funktionsverlust von Zellen oder ganzen Geweben führen können. Man spricht dahingehend auch von altersbedingter Seneszenz, die in der Regel zum Zelltod führt. In eukaryotischen Systemen wie in Hefe-Pilzen, dem Nematoden Caenorhabditis elegans oder in Säugetieren konnten Studien zeigen, dass die genetische Regulation durch die Telomerenlänge bzw. die Telomeraseaktivität (Bodnar et al., 1998), die Dynamik der DNA-Reparatur und die transkriptionelle Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen durch Histon Acetylierung/Deacetylierung eine wichtige Rolle spielen. Neben diesen Funktionen sind wohl metabolische Faktoren wie Nährstoffzufuhr, die Insulin/IGF Hormon-Signaltransduktion und das Gleichgewicht zwischen Bildung bzw. Deaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der tierischen Seneszenz von großer Bedeutung (Jing et al., 2003).

Obwohl die Seneszenz an sich einen weitverbreiteten Prozess darstellt, unterscheiden sich Seneszenz-Auslösung und Regulation im Pflanzenreich von der in tierischen Systemen. Dies liegt wohl größtenteils in der photoautotrophen Lebensweise der Pflanzen begründet. Im Gegensatz zu heterotrophen Organismen, deren Quelle für metabolische Auslöser wie ROSund Energieproduktion hauptsächlich die Mitochondrien darstellen, finden diese Prozesse in Pflanzen in den Chlorplasten statt. Schließlich sind es auch diese Organellen, die mit als erstes von Seneszenz-Prozessen betroffen sind (Lim et al., 2007)

#### 1.1 Die Seneszenz in Pflanzen

Bei der pflanzlichen Seneszenz kann es sich um Prozesse auf Zell-, Gewebs-, Organ-, oder Organismusebene handeln, die zum Tod einzelner Zellen bis hin zum ganzen Organismus führen können. Letzteres trifft vor allem auf monokarpische Pflanzen zu, die durch ein einziges reproduktives Ereignis in ihrem Lebenszyklus charakterisiert sind. Dazu gehören auch bienne oder annuelle Pflanzen wie z. B. die Modellorganismen Soja (Glycine max), Weizen (Triticum aestivum), Reis (Oriza sativum) oder Ackerschmalwand (Arabidopsis thaliana). Da bei vielen Spezies im Rahmen einer korrelativen Kontrolle die Seneszenz der Blätter auf Organebene und die Seneszenz der ganzen Pflanze stark voneinander abhängig sind (Ben-Porath and Weinberg, 2005), wird beides oft fälschlicherweise gleichgesetzt. Neben der sichtbaren Seneszenz somatischer Organe wie der Blätter, kommt es in monokarpischen Pflanzen ebenso zum Wachstumsstop der Sprossapikalmeristeme sowie zur Unterdrückung von Knospenanlagen für weitere Sprosse (Bleecker and Patterson, 1997; Gan, 2003). Bei polykarpischen Pflanzen hingegen, wie etwa perenniellen Bäumen, zeigen sich Seneszenz-Symptome zum Ende jeder Reproduktions- bzw. Vegetationsperiode lediglich auf Organebene. Dieser Prozess ist nicht automatisch mit einem Wachstumsstop der Sprossapikalmeristeme oder dem Tod des Organismus verknüpft, sondern endet lediglich mit dem Abwurf der Blätter und Früchte (Munne-Bosch, 2008).

Die Seneszenz von Blättern in monokarpischen, als auch in polykarpischen Pflanzen resultiert dabei aus streng regulierten Veränderungen von Struktur, Metabolismus und Genexpression, wobei der assimilatorische Metabolismus der Photosynthese durch katabole Vorgänge ersetzt wird. Bei diesen Prozessen werden während der Seneszenz zelluläre Makromoleküle, die während der vegetativen Periode gebildet wurden, degradiert und Nährstoffe wie Stickstoff, Kohlenstoff und andere Mineralien in reproduktive Organe, wie Blüten, Samen oder Speicherorgane, transportiert (Himelblau and Amasino, 2001). So spielt die Regulation der Blattseneszenz eine wesentliche Rolle in der Reproduktion annueller Pflanzen bzw. in der Anpassung mehrjähriger Pflanzen und ermöglicht diesen so eine optimale *"fitness"* im Bezug auf die jeweiligen Umweltbedingungen.

#### 1.1.1 Seneszenz auf zellulärer Ebene

Aufgrund der Tatsache, dass die Blattseneszenz durch ein aktives genetisches Programm gesteuert wird, dieser Prozess teilweise eine Reaktion auf Umwelteinflüsse darstellt und so für die Pflanze einen Nutzen darstellt, werden die Folgen der natürlichen Seneszenz oftmals als programmierter Zelltod (*programmed cell death*- PCD) klassifiziert. PCD bezeichnet aktiv gesteuerte Prozesse, die zum Nutzen der Pflanze ein Absterben von Zellen oder Geweben herbeiführen (Gepstein, 2004; Lim et al., 2007). Beispiele für programmierten Zelltod in der Pflanzenentwicklung sind z. B. die Autolyse von Zellen während der Wurzel- oder

Pollenentwicklung sowie bei der Embryo- und Samenreifung (Gepstein, 2004). Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Ausbildung von PCD zur Abwehr kompatibler Pathogene im Rahmen der hypersensitiven Antwort (Morel and Dangl, 1999). Wie in Abbildung 1 dargestellt ist, ist die Seneszenz ein Prozess, der zum PCD führen kann. Dabei unterscheidet sich die Initialisierung des PCD durch Seneszenz vorwiegend von anderen PCD-Arten durch einen langsameren und geordneteren Ablauf. Dies ist offenbar der Tatsache zuzuschreiben, dass diese Art des PCD im Gegensatz zur Pathogenabwehr dem Recycling von Nährstoffen während der Reorganisationsphase dient. Dass Seneszenz ein Prozess ist, der nicht zwangsläufig zum Zelltod führen muss, zeigen Untersuchungen an Salicylsäure-defizienten Mutanten, bei denen zwar Seneszenz, aber nur vermindert nekrotischer Zelltod stattfindet (Morris et al., 2000). Weiter ist Seneszenz als temporär reversibel anzusehen. So konnte bei Untersuchungen an Soja (Glycine max) und Erbse (Pisum sativum) festgestellt werden, dass nach Entfernung der Blüten und Früchte eine Verzögerung der Seneszenz und nach Entfernung des Sprosses eine Wiederergrünung bestimmter Blätter stattfindet (Hayati et al., 1995; Miceli et al., 1995). Ein ähnliches Phänomen konnte auch für Arabidopsis-Pflanzen beschrieben werden, bei denen der Spross kontinuierlich entfernt wurde (Nooden and Penney, 2001).

So findet während der Seneszenz auf zellulärer Ebene ein zeitlich asynchroner Abbau statt. der zu Beginn die deutlichsten Veränderungen in den Chloroplasten aufweist. Andere Organellen wie Nukleus oder Mitochondrien bleiben zunächst intakt, um die nötige Steuerung bzw. Energieversorgung zu gewährleisten. Dahingehend ist bekannt, dass während der Seneszenz wesentliche Änderungen im Transkriptom stattfinden, die unmittelbar an der Regulation beteiligt sind (Buchanan-wollaston et al., 2005). Im Rahmen der Nährstoffmobilisierung findet zunächst eine Degeneration der Chloroplasten statt, was sich durch den Chlorophyllabbau und dem damit verbundenen Rückgang der Photosyntheseleistung äußert (Matile et al., 1996). In den Chloroplasten befinden sich bis zu 75 % der gesamten Blattproteine (Buchanan-Wollaston et al., 2003). Während der Seneszenz werden die plastidären Proteine. wie Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) und Chlorophyll-Bindeproteine (CAB), durch Peptidasen hydrolysiert und dadurch Aminosäuren mobilisiert (Guiamet et al., 2002; Hortensteiner and Feller, 2002; Liu et al., 2008; Martinez et al., 2008). Gleichzeitig findet durch Lipasen, Galaktosidasen und Acyltransferasen der hydrolytische Abbau plastidärer Membranen statt (Thompson et al., 1997; Thompson et al., 1998; Yang and Ohlrogge, 2009). Distinkte Membranfragmente bilden dabei mit freien Fettsäuren und Triacylglyceriden (TCA) die Plastoglobuli aus. Fettsäuren werden von dort nach weiterer Hydrolyse aus den Chloroplasten exportiert und in den Glyoxysomen zu Acetyl-CoA β-oxidiert (Kaup et al., 2002). Acetyl-CoA steht dann als Kohlenstoffguelle entweder direkt zur Energiegewinnung

13

#### Einleitung

oder zum Export in andere Pflanzenteile zur Verfügung (Thompson et al., 1997). Chloroplasten werden durch diese Prozesse zu sogenannten Gerontoplasten und die Blätter zeigen die typische Gelbfärbung. Degradationsprodukte werden dabei zunächst in die Vakuole transportiert (Parthier, 1988). Im weiteren Verlauf kommt es schließlich zur Initiierung des Zelltods und damit zum Abbau von Ribonukleinsäuren durch Nukleasen bzw. zur verminderten Transkription plastidärer und nukleärer RNAs (Taylor et al., 1993). Zur Aufrechterhaltung der Transkription bleibt die DNA zunächst erhalten. Mikronährstoffe wie Mo, Cr, S, Fe, Cu und Zn werden bis zu 50 %, Makronährstoffe wie Stickstoff, Phosphor und Kalium bis zu 80 % aus den seneszenten Blättern remobilisiert (Himelblau and Amasino, 2001). In *Arabidopsis* kommt es im letzten Stadium der Seneszenz zu Autophagie-ähnlichen Symptomen wie Kondensation des Chromatins, zur DNA-Fragmentierung und schließlich zum Kollaps der Vakuole (Pennell and Lamb, 1997; Ishida and Yoshimoto, 2008; Reape et al., 2008).

#### 1.1.2 Initiierung der Blattseneszenz

Eine zentrale aber auch weitgehend unbeantwortete Frage ist sicherlich, wie die Seneszenz mit den beschriebenen Symptomen initiiert wird. Offenbar ist die Seneszenz-Initiierung in monokarpischen Pflanzen eng an das entwicklungsabhängige Alter gekoppelt. Wie genau die Pflanze ihr Alter dabei bestimmt und daraufhin molekulare Mechanismen zur Seneszenz-Regulation einleitet ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Im Gegensatz zu tierischen Systemen haben Untersuchungen bisher noch keine Anhaltspunkte dafür erbracht, dass die Telomeren-Länge oder die Telomerase-Aktivität die Pflanzenalterung wesentlich beeinflussen (Riha et al., 1998; Gan, 2003). Wie in Kapitel 1.1.4 noch angesprochen werden soll, spielen möglicherweise epigenetische Veränderungen eine Rolle.

Es scheint jedoch sicher, dass die Regulation während der Initiationsphase durch multiple interne und externe Faktoren beeinflusst wird. So gibt es zahlreiche äußere Einflüsse, die zur endogenen Einleitung der Seneszenz führen können. Dazu zählen externe (Stress-) Faktoren wie Nährstoffmangel, Lichtbedingungen (Dunkelheit, Starklicht, UV-Licht etc.), Ozongehalt, Temperatur, Trockenheit, Salzgehalt usw., die den Verlauf der Seneszenz beeinflussen können. Dazu kommen diverse biotische Stressoren wie Herbivoren oder mikrobielle Pathogene. Im Extremfall können diese Faktoren eine vorzeitige Seneszenz und damit ein frühes Absterben der Pflanze verursachen (Lim et al., 2007).

Abgesehen von diesen äußeren Beeinflussungen, sind im Bezug auf die altersabhängige Seneszenz jedoch eher interne metabolische Veränderungen an der Initiierung beteiligt. Wie auch aus Untersuchungen an Hefe-Pilzen, Insekten und Säugetieren bekannt ist, ist die Regulation der Alterung über die Zufuhr von Nährstoffen möglich (Sohal and Weindruch, 1996; Longo and Fabrizio, 2002; Mair and Dillin, 2008).



#### Abbildung 1: Schematisches Modell zur Regulation der Blattseneszenz.

In Pflanzen scheint es ähnliche Prozesse zu geben, die über die Regulation der Energieproduktion bzw. des Zuckerhaushaltes eine Regulation der Seneszenz bewirken. Ein wichtiger Ansatz ist dabei offenbar die entwicklungsbedingte Photosyntheseaktivität. So zeigen die Blätter vieler annueller Pflanzen bereits nach Erreichen der maximalen Blattexpansion eine kontinuierliche Abnahme der Photosynthese (Hensel et al., 1993). Beispielsweise führt die Zufuhr erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zu Veränderungen in der Blattentwicklung bis hin zur beschleunigten Seneszenz (Miller et al., 1997; Ludewig and Sonnewald, 2000). In anderen Experimenten mit Rubisco *Antisense*-Pflanzen konnte durch verminderte Kohlenstoffassimilation in Tabak (*Nicotiana tabacum*) eine Verlängerung der Lebensspanne beobachtet werden (Miller et al., 2000). Ähnliche Mutanten plastidärer Gene in Erbse (*Pisum sativum*) oder in *Arabidopsis* wiesen nicht nur Beeinträchtigungen in der Biomasse- und Chlorophyllproduktion auf, sondern auch eine verlangsamte Seneszenz (Woo et al., 2002).

In diesem Zusammenhang wird auch eine Beteiligung von Zuckern an der Regulation der Photosynthese und damit der Seneszenz vermutet. Dahingehend gibt es verschiedene Studien, die sowohl ansteigende als auch sinkende Zuckerkonzentrationen in den Blättern mit der Seneszenz in Verbindung bringen (Wingler and Roitsch, 2008; Wingler et al., 2009).

Wie genau jedoch die Rolle von endogenen Zuckern im regulativen Seneszenz-Netzwerk zu beurteilen ist, wird zurzeit kontrovers diskutiert (van Doorn, 2008; Wingler et al., 2009).

Neben einer Regulation durch die Photosynthese bzw. der internen Verteilung von Zuckern scheint es eine Verbindung zwischen der Seneszenz und dem Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu geben. Bereits Harman postulierte dies 1956 mit seiner Theorie zur Alterung durch freie Radikale (Harman, 1956). In Pflanzen werden toxische ROS, wie z. B. Singulett-, oder Triplett- Sauerstoff, Superoxide und Stickoxide, durch den aeroben Stoffwechsel vor allem in den Chloroplasten, aber auch den Mitochondrien gebildet. Dabei sind einerseits einige ROS-Spezies extrem reaktiv und können viele biologische Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide oxidieren, andererseits stellen ROS Signalmoleküle dar, die wiederum die Expression bestimmter Gene beeinflussen (Apel and Hirt, 2004; Van Breusegem and Dat, 2006).

Dabei ist es schon länger bekannt, dass die ROS-Level in seneszenten Blättern ansteigen. Man nimmt zudem an, dass es durch die oxidative Degradierung von Chlorophyll und Membranen zu einer weiteren Bildung von zusätzlichen Sauerstoff-Radikalen während der Seneszenz kommt (Munné et al., 2002; Zimmermann and Zentgraf, 2005).

Weiter ist aus Untersuchungen an Mutanten mit gestörter Redox-Balance bekannt, das ROS sicher an der Ausbildung von PCD beteiligt sind. So wurde bei der Ascorbat-defizienten Mutante *vtc1* und an *cpr5* Mutanten, die konstitutive ROS-Signale aufweisen, eine beschleunigte Seneszenz festgestellt (Barth et al., 2004; Jing et al., 2008).

Zusammenfassend weisen also viele Studien darauf hin, dass die Seneszenz möglicherweise von metabolischen Faktoren wie der photosynthetischen Aktivität und damit einhergehend durch eine veränderte Redox-Balance initiiert wird.

Über die genauen Integrationsmechanismen der einzelnen Signale ist jedoch insgesamt erst wenig bekannt. Man nimmt jedoch an, dass sowohl die externen Faktoren als auch die Signale des metabolischen Status über das komplexe System der Phytohormone in Kombination mit anderen Signalmechanismen wie z. B. Transkriptionsfaktoren erkannt, übertragen und integriert werden.

#### 1.1.3 Phytohormone als Regulatoren in der Blattseneszenz

Offenbar ist dabei das Zusammenspiel verschiedener hormoneller Signale in vielen Seneszenz-Stadien essentiell, um während der Entwicklung die optimale Plastizität des Organismus im Bezug auf die äußeren Bedingungen zu gewährleisten.

Die Erforschung der Funktionen während der natürlichen Seneszenz wird jedoch gerade durch diese vielfältigen Interaktionen zwischen den einzelnen Phytohormon-Signalwegen, die Interaktion dieser Signalwege mit anderen endogenen Signalen (Redoxstatus, Metabolitstatus etc.) sowie die Involvierung all dieser Wechselwirkungen in zahlreiche andere Entwicklungs-Prozesse und/oder Antworten z. B. auf Pathogenbefall, Verwundung o.ä. wesentlich erschwert. Bislang wurde häufig versucht diese Funktionen über die Bestimmung des endogenen Gehaltes des jeweiligen Hormons in seneszenten Blättern oder durch applikative Untersuchungen zu charakterisieren. Heute bieten uns die molekularen Techniken zur Untersuchung von globalem Transkriptom und Proteasom sowie die Fähigkeit in Modellorganismen wie *Arabidopsis* genetische Mutanten herzustellen die Möglichkeit, genauere Einblicke in das regulative Seneszenz-Netzwerk zu erhalten.

Zu den klassischen Phytohormonen, bei denen eine Mitwirkung in der entwicklungsbedingten Seneszenz-Regulation bekannt und deren Signalwege relativ gut charakterisiert sind, gehören das gasförmige Ethylen und die Gruppe der Zytokinine. So konnten in vielen Pflanzenspezies erhöhte Ethylenspiegel in seneszenten Blättern festgestellt werden, was mit einer erhöhten Expression der Biosynthesegene einhergeht (van der Graaff et al., 2006). Zudem wurde in den Signaltransduktionsmutanten etr1, ein2 und ein3, die in der Erkennung und Signalweiterleitung von Ethylen gestört sind, eine Verzögerung der Blattseneszenz beobachtet (Lin et al., 2009). Aus Studien an onset of leaf death1 (old1) und old1/etr1 Mutanten hat man jedoch geschlossen, dass Ethylen alleine keine Induktion der Seneszenz auslösen kann. Vielmehr braucht es zudem altersabhängige Transkriptionsfaktoren wie OLD1, mit deren Hilfe das Ethylensignal je nach Alterungszustand der Pflanze in die Seneszenz-Progression integriert werden kann (Jing et al., 2002; Jing et al., 2005).

Die Gruppe der Zytokinine ist dagegen schon über Jahrzehnte für ihre seneszenzverzögernde Wirkung bekannt. Dies basiert einerseits auf der Beobachtung, dass der Zytokiningehalt während der Blattentwicklung abnimmt. Andererseits führten die exogene Applikation sowie eine endogene Erhöhung unter Kontrolle eines seneszenzassoziierten Promotors in Tabakpflanzen zur Seneszenz-Verzögerung (Gan and Amasino, 1995; McCabe et al., 2001). Durch molekulare Studien an einer Mutante für die Histidinkinase 3 (AHK3), wurde diese als Zytokinin-Rezeptorkinase identifiziert, die eine verzögerte Seneszenz durch verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ARR2 aufweist. eine Ein hypothetisches Modell geht davon aus, dass dieser Faktor im phosphorylierten Zustand die Expression von negativen Seneszenz-Regulatoren fördert und somit die Zytokinine via AHK3 und ARR2 indirekt auf die Blattalterung Einfluss nehmen (Kim et al., 2006).

Andere Phytohormone, wie Abscisinsäure, Salicylsäure, die Auxine, die Brassinosteroide und die Gibberelline, sind zumeist unter anderen Aspekten bekannt geworden. Erst in letzter Zeit wird deren Mitwirkung an Seneszenz-Prozessen unter bestimmten Bedingungen näher studiert. So gehen die Erkenntnisse, dass Abscisinsäure (ABA) seneszenzfördernd wirken soll, bisher weitgehend auf Studien mit exogener Applikation zurück. Weiter ist bekannt, dass die ABA-Konzentrationen in seneszenten Blättern und nach abiotischem Stress ansteigen (Gepstein and Thimann, 1980; Creelman, 1989; Hung and Kao, 2004). Es wird daher vermutet, dass ABA eher in stressbedingte Antworten als in die natürliche Entwicklung involviert ist (Lim et al., 2007).

Åhnlich unklar ist bisher die Bedeutung der Auxine. Diese sind im Wesentlichen in die morphologische Entwicklung des Habitus und die Ausbildung der Pflanzenorgane involviert. Ein interessantes Indiz für die Beteiligung an der Blattseneszenz liefern Mutanten im Auxin-Signalweg. So führen Mutationen im Gen für den *auxin response factor 2* (ARF2) zu verzögerter Seneszenz (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005). Es wird daher vermutet, dass ARF2 ein Regulator in der Auxin-Signaltransduktion darstellt, der bei Defekt eine erhöhte Auxin-Empfindlichkeit bewirkt und damit die Seneszenz beeinflusst (Lim et al., 2010). Es ist allerdings auch bekannt, dass solche Faktoren ebenso in eine Reihe von frühen Entwicklungsprozessen involviert sind. Daher können pleiotrophe Effekte, die sich auf die gesamte Blattentwicklung auswirken, nicht ausgeschlossen werden.

Eine deutlichere Rolle spielt offenbar die Salicylsäure (SA). So ist die fördernde Wirkung von SA auf Zelltodprozesse im Rahmen der hypersensitiven Antwort hinlänglich bekannt (Halim, 2006). Offenbar spielt SA aber auch eine Rolle in der altersabhängigen Seneszenz bzw. dem damit gekoppelten Zelltod. So sind die SA-Konzentration in seneszenten Blättern erhöht, was offenbar für die Aktivierung bestimmter Seneszenz-assoziierter Gene (SAG) notwendig ist. Zudem konnte in der *Arabidopsis pad4* Mutante, die in der SA-Signaltransduktion beeinträchtigt ist, zwar während der Seneszenz Chlorophyllabbau beobachtet werden, jedoch kam es in diesen Pflanzen zu einer Verminderung des finalen Zelltods (Morris et al., 2000). Offenbar ist SA also auch essentiell für den regulären Zelltod in der Blattseneszenz.

Wie diese Beispiele verdeutlichen, können also innerhalb der Pflanze bestimmte Reize während der Seneszenz zur Produktion und Translokation von Phytohormonen führen, die diese Signale durch molekulare Mechanismen z. B. auf die transkriptionelle Ebene weiterleiten.

#### 1.1.4 Molekulare Regulation der Blattseneszenz

Um sich ein grundlegenderes Bild über die molekularen Mechanismen während Seneszenz-Prozessen zu machen, wurden in den letzten Jahren viele biochemische und molekulare Studien durchgeführt. Diese haben belegt, dass Seneszenz ein aktiver Prozess ist, der Veränderungen auf transkriptioneller und translationaler Ebene zur Reorganisation des Metabolismus beinhaltet (siehe Abbildung 1). Besonders konnten mit Hilfe der Hybridisierungs- und Affymetrix-Chip-Technologie Vergleiche des Transkriptoms in *Arabidopsis* zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. Seneszenz-ähnlichen Prozessen durchgeführt werden (Weaver et al., 1998; Buchanan-Wollaston et al., 2003; Gepstein et al., 2003; Guo et al., 2004; Buchanan-wollaston et al., 2005; van der Graaff et al., 2006). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten sogenannte *senescence-downregulated* 

#### Einleitung

genes (SDGs) identifiziert werden, die während der Seneszenz herunter reguliert werden. Dazu gehören beispielsweise Gene für die Photosynthese. Es konnten aber auch hunderte von *senescence-associated genes* (SAGs), bzw. *senescence-enhanced genes* (SENs) identifiziert werden, die entweder erst während der Seneszenz aktiviert werden, oder deren Transkription bei Seneszenz-Prozessen lediglich erhöht wird. Tabelle 1 stellt die Unterteilung von SAGs nach Gepstein et al., 2004 in fünf funktionelle Gruppen dar:

Kategorie	Prozess	Beispielgene (Auswahl)
Makromolekül Degradierung	Abbau von Proteinen,	Cystein Proteasen, Ubiquitin-
	Nukleinsäuren, Lipiden und	verwandte Proteine, Nukleasen,
	Polysacchariden	Lipasen/Acylhydrolasen,
		Phospholipasen,
		Pektinesterasen,
		Polygalacturonasen
Nährstoff Recycling	Transport von Peptiden,	Oligopeptid-Transporter,
	Aminosäuren, Zuckern,	Ammonium-Transporter, Purin-
	Nukleotiden und Ionen	und Pyrimidin-Transporter,
		Glutamin-Synthasen, Zucker-
		Transporter, ABC-Transporter
Verteidigungs und	Abiotischer- und biotischer	Metallothionein, Glutathion S-
Schutzmechanismen	Stress	transferase, Glutathion-
		Peroxidase, Jasmonat-
		induzierbare Proteine
Transkriptionelle Regulation	Transkriptionsfaktoren	Zink-Finger Proteine, bZIP-
		Proteine, HMG-Box-Proteine,
		Transkriptionsfaktoren der
		WRKY, NAC, AP2, MYB, HB,
		TCP und GRAS Familie
Signaltransduktion	Proteine zur Phosphorylierung	Rezeptor-Kinasen,
	und Dephosphorylierung	Komponenten der MAP-Kinase
		Kaskaden, Phosphatasen,
		Calcium-abhängige
		Proteinkinasen, Cytoskelett-
		assoziierte Proteine

# Tabelle 1: Funktionale Kategorien der SAGs klassifiziert von Gepstein et al. 2004 nach den Ergebnissen von Guo et al., 2004

Wie diese Zusammenstellung zeigt, gehören neben funktionellen Genen, die für die direkte Ausprägung von Symptomen zuständig sind, auch regulative Elemente wie Rezeptorkinasen und Transkriptionsfaktoren zu den SAGs. Wie auch in Abbildung 1 angedeutet ist, lassen Arbeiten an Faktoren aus der NAC-, WRKY- und TCP Familie vermuten, dass die Integration von Signalen, die letztlich zur Aktivierung von funktionellen Enzymen z. B. zum Abbau von Makromolekülen und damit zu Seneszenz-Symptomen führen, auf Ebene eines komplexen Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren erfolgt (Balazadeh and Rian, 2008).

Wie komplex dieses Netzwerk sein kann, verdeutlichen aktuelle Studien zur WRKY53 Regulation. Bei den Proteinen der WRKY-Familie handelt es sich um Zink-Finger-Typ Transkriptionsfaktoren, von denen mehrere Mitglieder als SAGs identifiziert und charakterisiert wurden (Hinderhofer and Zentgraf, 2001; Robatzek and Somssich, 2001; Ulker et al., 2007). So konnten für WRKY53, einen frühen Seneszenz-Initiator, über 60 putative Zielgene identifiziert werden; unter anderem der spezifische Seneszenzmarker *SAG12* (Miao et al., 2004; Miao and Zentgraf, 2007).

Mit Hilfe von Hefe-Hybrid-Systemen wurde herausgefunden, dass WRKY53 einerseits auf Proteinebene durch Interaktion mit weiteren Faktoren reguliert wird. Andererseits werden die DNA-Bindeeigenschaften dieses Faktors auch durch Phosphorylierung der Kinase MEKK1 beeinflusst (Miao et al., 2007). Gleichzeitig interagiert WRKY53 mit der HECT3 Ubiquitin-Ligase UPL5, die die Aktivität des Transkriptionsfaktors durch Degradation reguliert. So wurde an UPL5 Mutanten u. a. eine beschleunigte Seneszenz festgestellt (Zentgraf et al., 2010). Für die verwandten Faktoren WRKY6 und WRKY70 konnte ebenfalls eine Induktion während der Seneszenz bzw. durch die Behandlung mit Phytohormonen gezeigt werden (Robatzek and Somssich, 2001; Ulker et al., 2007).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass das gesamte Spektrum von Transkription, Translation, post-translationalen Modifikationen bis hin zur Ubiquitinierung von Transkriptionsfaktoren zur Seneszenz-Regulation beiträgt.

Eine weitere Ebene stellt offenbar die post-transkriptionelle Regulation durch endogene MikroRNAs dar, die die Akkumulation bestimmter mRNA kontrollieren. So ist miR319 in *Arabidopsis* für die Regulation von Faktoren aus der TCP-Familie zuständig, die selber wiederum die Blattentwicklung und die Seneszenz beeinflussen (Schommer et al., 2008). Weiter gibt es deutliche Hinweise, dass die molekulare Seneszenz-Induktion schon auf epigenetischer Ebene mit Änderungen der Chromatinstruktur beginnt. So konnten seneszenzspezifische Änderungen in der Histon-Methylierung charakterisiert werden (Ay et al., 2009), die möglicherweise zur transkriptionellen Aktivierung von WRKY53 führen (Zentgraf et al., 2010). Weitere Studien haben aufgezeigt, dass ebenfalls die Acetylierung/Deacetylierung von Histonen einen Einfluss auf die Seneszenz haben kann. So zeigten RNA-Interferenz-Pflanzen der *Arabidopsis* Histon-Deacetylase HDA6 eine verzögerte Seneszenz (Wu et al., 2008).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass zur Regulation der Seneszenz ein breites und vielschichtiges Spektrum an Signalkomponenten aktiviert wird. Offenbar gibt es dabei verschiedene Ebenen, die einerseits über epigenetische Vorgänge und Änderungen im Metabolismus intern, und andererseits durch die Umweltbedingungen extern determiniert werden. Durch molekulare Netzwerke wie MAP-Kinase-Kaskaden, Transkriptionsfaktoren, MikroRNAs, Phytohormone usw. werden diese Parameter integriert, was letztendlich zur maximalen Plastizität und Effektivität während des Entwicklungsstadiums der Seneszenz führt.

20

#### 1.2 Lipoxygenasen in Pflanzen

Lipoxygenasen (LOX) sind ubiquitär verbreitete Dioxygenasen, die ein über Aminosäureseitenketten gebundenes Eisenatom enthalten. LOX stellen monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 98 -105 kDA dar, die sich in Substratspezifität, pH-Optimum, Molekulargewicht und Selektivität unterscheiden (Axelrod et al., 1981; Siedow, 1991; Liavonchanka and Feussner, 2006). Sie katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) mit einem cis, cis-1,4-Pentadiensystem und sind damit die Schlüsselenzyme der Oxylipin-Biosynthese. Während bei Pflanzen bisher nur relativ wenig über die Rolle der Oxylipine bekannt ist, sind in tierischen Systemen die Funktionen z. B. von Leukotrienen oder Lipoxinen bereits sehr genau aufgeklärt worden. Diese sind an Entzündungs- und Immunprozessen sowie an hypersensitiven Reaktionen beteiligt.

#### 1.2.1 Reaktionsmechanismen zur Bildung von Oxylipinen

Der erste Schritt der pflanzlichen Oxylipinsynthese ist die Bildung von Hydroperoxid-Derivaten aus PUFAs. Dies geschieht in Pflanzen entweder durch nicht-enzymatische Lipid-Peroxidation oder durch enzymatische Prozesse (Berger et al., 2001; Mueller, 2004). An der enzymatischen Bildung sind wie erwähnt non-häm Dioxygenasen (LOX) bzw. hämhaltige  $\alpha$  -Dioxygenasen ( $\alpha$ -DOX) beteiligt (Hamberg, 2002).

LOX sind dabei multifunktionelle Enzyme. Sie katalysieren mindestens drei verschiedene Reaktionen: a) Oxygenierung (Dioxygenierungsreaktion), b) sekundäre Umwandlung von Hydroxyfettsäuren (Hydroperoxidasereaktion) und c) Bildung von Epoxy-Leukotrienen (Leukotrien-Synthasereaktion); wobei in Pflanzen wohl nur die ersten beiden ein Rolle spielen (Liavonchanka and Feussner, 2006). Pflanzliche LOX oxygenieren in erster Linie  $\alpha$ -Linolen- (Octadecatriensäure;  $\alpha$ -LeA) und Linolsäure (Octadecadiensäure; LA) an den Positionen 9 (9-LOX) oder 13 (13-LOX) des Fettsäurerückgrades (Abbildung 2). Es bilden sich dadurch entsprechend 9- und 13-Hydroperoxy-Fettsäuren, wobei diese Hydroperoxide enzymatisch nur stereospezifisch in (*S*)-Konfiguration entstehen (Feussner and Wasternack, 2002).

Die eigentliche Fettsäureumsetzung verläuft über eine Radikalbildung durch Abspaltung eines Protons im Zentrum des 1,4-Pentadiensystems. Dies hat die Reduktion des Eisenatoms im aktiven Zentrum von der Oxidationsstufe Fe(III) nach Fe(II) zur Folge. Das Radikal wird in [+2]- oder [-2]-Richtung in Bezug auf die anfängliche Protonenabspaltung umgelagert. In einem zweiten Schritt erfolgen die Reaktion des Pentadienylradikals mit molekularem Sauerstoff und die Anlagerung eines Protons, wodurch das Hydroperoxid-Derivat entsteht. Parallel dazu verläuft die Reaktivierung des Eisenatoms in die Fe(III)-Form

durch stöchiometrische Mengen eines beliebigen Peroxides (Feussner and Kühn, 2000; Liavonchanka and Feussner, 2006; Andreou and Feussner, 2009).



Abbildung 2: Die primäre Lipoxygenase-Reaktion (nach Feussner und Wasternack, 2002): Regiospezifische Dioxygenierung von  $\alpha$ -Linolensäure an Position C13 oder C9 durch 13-LOX bzw. 9-LOX zu 13-HPOTE oder 9-HPOTE.

#### 1.2.2 Anschließende Reaktionsmechanismen zur Bildung weiterer Oxylipine

In Pflanzen führt die Oxygenierung von  $\alpha$ -LeA durch die LOX zu 9(*S*)- bzw. 13(*S*)-Hydroperoxy-Octadekatriensäure (9/13-HPOTE) (Abbildung 2), die Oxygenierung von LA entsprechend zu 9(*S*)- bzw 13(*S*)-Hydroperoxy-Octadekadiensäure (9/13-HPODE) und die Oxygenierung von 7(*Z*)-,10(*Z*)-,13(*Z*)-Hexadekatriensäure zu 11(*S*)-Hydroperoxy-7(*Z*), 9(*E*), 13(*Z*)- Hexadekatriensäure (11-HPHTE). Diese Hydroperoxid-Derivate der primären LOX-Reaktionen können schnell durch eine Vielzahl von Enzymreaktionen weiter umgesetzt werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, konkurrieren je nach Spezies bis zu sechs enzymatische Schritte um die gebildeten Hydroperoxide (Shah, 2005).

Ein wichtiger Zweig der Hydroperoxid-Metabolisierung führt in den sog. AOS-Weg, der durch das Cytochrom-P450-Enzym Allenoxid-Synthase (AOS) zur Synthese der Jasmonate führt und in Kapitel 1.3 detailliert beschrieben wird.

Weitere Möglichkeiten sind die Spaltung der Hydroperoxide in kurzkettige C6-Aldehyde und  $\omega$ -Oxofettsäuren durch Hydroperoxidlyasen (HPL). Daraus entstehen biologisch relevante Oxylipine wie Traumatin, 3(*Z*)-Hexanal bzw. 3(*Z*)-Hexenol oder die C9-Aldehyde 3(*Z*)-Nonenal und 3(*Z*), 6(*Z*)-Nonadiena (Matsui et al., 1997; Grechkin, 1998; Matsui, 2006).

Ein weiteres CYP-Enzym ist die Divinylethersynthase (DES), die die Bildung von Divinylethern aus Hydroperoxy-Fettsäuren katalysiert (Galliard and Phillips, 1972; Itoh and Howe, 2001). Dabei werden die 9-LOX Produkte zu Colnelsäure bzw. Colnelensäure, die 13-LOX Produkte zu Etherolsäure umgesetzt (Grechkin, 1998; Hamberg, 2000; Eschen-Lippold et al., 2007). Eine 9-/13-DES wurde kürzlich in *Allium sativum* beschrieben (Stumpe et al., 2008).

Im Peroxygenase (POX)-Weg wird die hydroperoxidabhängige Biosynthese von Hydroxy-, Epoxy- und Hydroxyepoxyfettsäuren katalysiert. Die Epoxygruppen können dabei anschließend durch Epoxidhydrolasen zu Hydroxygruppen hydrolysiert werden, so dass Mono-, Di- und Trihydroxy-Fettsäuren entstehen (Blée, 1998). POX gilt dabei als ein Schlüsselenzym bei der Synthese der Kutikula; vornehmlich bei den Pflanzen, die hierzu C18-Monomere verwenden z. B. *Zea mays* (Lequeu et al., 2003).



Abbildung 3: Enzymatischen Reaktionen, die zur Bildung von sekundären Oxylipinen bzw. von Jasmonaten führen. Erläuterungen siehe Text (bearbeitet nach Shah, 2005).

Neben den Reaktionen der Enzyme der CYP-Familie, können noch weitere Oxylipine durch weniger gut charakterisierte Schritte erfolgen. So können die 9/13-HPOTE bzw. 9/13-HPODE in 9/13-Ketodiene (9/13-KOT bzw. 9/13-KOD) durch die LOX-Hydroperoxidase-Reaktion formiert werden (Kühn et al., 1991). Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie in *Arabidopsis* nach Verwundung synthetisiert werden (Vollenweider et al., 2000) bzw. in der Wurzelentwicklung eine Signalrolle spielen (Vellosillo et al., 2007). Ähnliches konnte auch für Oxylipine gezeigt werden, die durch eine Hydroperoxy-Reduktase (HPR) weiter zu 9/13-HOTE bzw. 9/13-HODE reduziert werden. Diese Hydroxide konnten bereits durch Feussner und Mitarbeiter 2001 in Keimlingen festgestellt werden (Feussner et al., 2001). Ein weiterer enzymatischer Weg wird von der Epoxy-Alkohol-Synthase (EAS) katalysiert. Dabei werden ähnliche Oxylipine wie durch die POX produziert, die sich oft nur in ihrer Stereochemie unterscheiden (Hamberg, 1999).

#### 1.2.3 Vorkommen und physiologische Bedeutung pflanzlicher Lipoxygenasen

Bisher wurden pflanzliche Lipoxygenasen durch ihre Primärstruktur bzw. Lokalisation unterschieden. Zytosolische LOX wurden als Typ I klassifiziert, plastidäre LOX, die über eine N-terminale Transitpeptidsequenz für den Transport in die Chloroplasten verfügen, als Typ II angesehen. Mittlerweile geht man jedoch eher dazu über LOX anhand ihrer Regiospezifität zu unterscheiden. So ist bekannt, dass die nicht-plastidären LOX vom Typ I ausschließlich 9-LOX-Aktivität aufweisen, wohingegen bei den Enzymen vom Typ II bisher nur 13-LOX-Aktivitäten gefunden wurden (Shibata et al., 1994). Allerdings stellen einige extra-plastidäre LOX der Leguminosen sowie der Solanaceaen eine Ausnahme dar, bei denen eine duale 9-/13-LOX-Aktivität festgestellt wurde (Hughes et al., 2001). Neuere Sequenzanalysen haben dahingehend ergeben, dass die 13-LOX der Leguminosen eine eigene phylogenetische Gruppe darstellen (Andreou and Feussner, 2009).

Im Genom unserer Modellpflanze *Arabidopsis* wurden bis jetzt sechs LOX-Isoformen identifiziert. Die Charakterisierung der einzelnen Proteine hat gezeigt, dass AtLOX1 und AtLOX5 9-Lipoxygenaseaktivität besitzen. Für AtLOX2, AtLOX3, AtLOX4 und AtLOX6 konnte eine 13-Lipoxygenaseaktivität nachgewiesen werden, wobei diese Isoformen eher α-LeA als LA umsetzten. Dazu haben Sequenzanalysen ergeben, dass die 13-Lipoxygenasea ein N-terminales Translokationspeptid für einen Transport in die Chloroplasten aufweisen (Bell et al., 1995; Bannenberg et al., 2009). Diese Lokalisation wurde auch durch proteomische Analysen bestätigt (Peltier et al., 2004). Den beiden 9-LOX fehlt diese Sequenz, daher wird deren Lokalisation im Cytosol vermutet. Neben *Arabidopsis*, konnten in vielen weiteren Spezies sowohl 9- als auch 13-LOX charakterisiert werden, deren Funktionen bereits von einigen Autoren zusammengefasst wurden (Hildebrand, 1988; Siedow, 1991; Rosahl, 1996; Feussner and Wasternack, 2002; Howe and Schilmiller, 2002; Porta and Rocha-Sosa, 2002; Shah, 2005; Liavonchanka and Feussner, 2006; Baysal and Demirdöven, 2007; Andreou and Feussner, 2009). Dabei sind Lipoxygenasen einerseits in Reaktionen auf Stress, andererseits in Entwicklungsprozesse involviert.

#### 1.2.3.1 Pflanzliche Stressantwort

Bei der pflanzlichen Stressantwort kommt den Lipoxygenasen eine bedeutende Rolle zu. So wird die Genexpression vieler LOX durch biotischen oder abiotischen Stress induziert. Beispielsweise wurde für die *Arabidopsis LOX2* und die *LOXH3* aus Kartoffel eine deutliche Induktion der Genexpression nach Verwundung oder Pathogenbefall beobachtet. Dabei spielen in vielen Spezies vor allem 13-LOX bei der Bildung von Jasmonaten durch den AOS-Weg eine wesentliche Rolle bei Verteidigungsreaktionen, als Antwort auf Herbivorie, Verwundung oder Pathogenbefall (Bell et al., 1995; Royo et al., 1996; Saravitz and Siedow, 1996; Heitz et al., 1997; Porta et al., 1999; Royo et al., 1999; Spoel et al., 2003; Glauser et al., 2009). Neben den Jasmonaten sind aber auch andere Oxylipine in Reaktionen auf Stress

involviert. Beispielsweise sind die HPL-gebildeten C6-Aldehyde 3(*Z*)-Hexanal bzw. 3(*Z*)-Hexenol als flüchtige sog. *volatile-organic compounds* (VOCs), oder die C9-Aldehyde wie 3(*Z*)-Nonenal und 3(*Z*),6(*Z*)-Nonadienal (Grechkin, 1998) als Signalmoleküle an der Antwort auf Verwundung, Herbivorie und Pathogenbefall beteiligt (Bate and Rothstein, 1998; Vancanneyt et al., 2001; Matsui, 2006; Myung et al., 2006; Shiojiri et al., 2006; Mita et al., 2007). Weiter konnte beobachtet werden, dass die DES-Produkte Colnelsäure bzw. Colnelensäure in Tabak, Tomate und Kartoffel nach Pathogeninfektion akkumulieren und antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *Phytophtera infestans* und *Phytophtera parasitica* var. *Nicotianae (Ppn* 0) zeigen (Weber et al., 1999; Itoh and Howe, 2001; Gobel et al., 2003; Fammartino et al., 2007; Stumpe et al., 2008). Die nach Stresseinwirkung durch POX gebildeten Epoxide werden als toxische Verbindungen eingestuft, die u. a. aufgrund ihrer Reaktivitat mit Nukleinsäuren Mutationen auslösen können. Möglicherweise besitzen sie dadurch fungizide Eigenschaften (Hamberg, 1999; Blée, 2002; Newman et al., 2005).

#### 1.2.3.2 Wachstum und Entwicklung

intrazelluläre entwicklungsbedingte Die Lokalisation und das unterschiedliche Expressionsverhalten der bisher charakterisierten LOX, lassen verschiedenste Funktionen innerhalb der Pflanze vermuten. So konnten LOX in vielen Pflanzenorganen, wie Kotyledonen, Wurzeln, Blättern, Früchten und Blüten, nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Vorkommen der LOX innerhalb der Organe bzw. Zellen während verschiedener Entwicklungsstadien deutet darauf hin, dass die lokale und temporäre Bildung von Oxylipinen möglicherweise relevanten Einfluss auf den jeweiligen Entwicklungsvorgang hat. Neben der Regulation, die durch die gebildeten Jasmonate in der Entwicklung vermittelt wird (siehe Kapitel 1.3.5), gibt es eine Vielzahl von Berichten über die Funktionen weiterer Oxylipine. So wurden in einigen Spezies bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen vor allem in Keimlingen erhöhte LOX-Expressionen oder -Aktivitäten festgestellt (Siedow, 1991; Feussner and Wasternack, 2002; Porta and Rocha-Sosa, 2002). Offenbar stellt u. a. die Oxygenierung von Speicherlipiden durch LOX-Enzyme einen wichtigen Schritt in der Bereitstellung von Acetyl-CoA als Energielieferant während der Keimlingsentwicklung dar (Feussner et al., 1995; Feussner and Kuhn, 1995; Feussner et al., 1996; Feussner et al., 2001). Andere Untersuchungen an Arabidopsis-Keimlingen haben ergeben, dass neben den Jasmonaten auch 9-LOX-Produkte wichtige regulative Signalfunktion in der Ausbildung von Lateralwurzeln haben (Velosillo et al., 2007). Auch bei der Knollenbildung von Kartoffeln scheinen LOX durch die Bildung von Tuberonsäure indirekt involviert zu sein (Rosahl, 1996). So konnte die POTLX-1, eine Typ I LOX identifiziert werden, die ausschließlich in den Knollen und Wurzeln exprimiert wird. Ebenfalls scheinen LOX-Produkte in der Fruchtreife von klimakterischen Früchten eine Rolle zu spielen (Baysal and Demirdöven, 2007). Beispielsweise zeigte die Charakterisierung der TomLoxA-C eine Aktivität in reifenden Tomatenfrüchten, die u.a. durch Ethylen gefördert wird. Es wird ebenfalls vermutet, dass LOX durch die Bildung flüchtiger C6-Aldehyde am Reifungsprozess und an der Ausbildung des Geschmacks beteiligt sein könnten (Kausch and Handa, 1997; Griffiths et al., 2000; Zhang et al., 2006).

#### 1.3 Jasmonate

Die große Substanzklasse der Jasmonate mit ihrer Leitsubstanz Jasmonsäure (JA) und deren Metabolite stellt eine Untergruppe der Oxylipine dar, die aus dem Octadekanoid-Weg hervorgehen. Im Jahr 1962 wurde zunächst der Methylester der Jasmonsäure aus dem Öl der namensgebenden Pflanze Jasmonium grandiflorum isoliert (Demole et al., 1962). Erst fast 20 Jahre später entdeckte man physiologische Wirkungen von Methyljasmonat (MeJA) und der freien Jasmonsäure im Bezug auf eine Seneszenz-Förderung sowie eine Beeinträchtigung des Wurzelwachstums (Ueda and Kato, 1980; Dathe et al., 1981). Durch die Arbeiten von Vick und Zimmermann wurde darauf bis Mitte der 1980er Jahre der Biosyntheseweg größtenteils aufgeklärt (Vick and Zimmerman, 1984). Als Ausgangsverbindungen für die JA-Biosynthese gelten, wie bereits erläutert, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die zunächst durch Lipasen aus den Chloroplastenmembranen freigesetzt werden müssen.

#### 1.3.1 Zusammensetzung der plastidären Membranen

Die plastidären Membranen sind von essentieller Bedeutung für die Produktion von Oxylipinen bzw. Jasmonaten. Sie halten einerseits die zelluläre Kompartimentierung (Hüllmembranen) aufrecht und stellen die Funktionalität der Photosynthese sicher (Thylakoidmenbranen). Andererseits sorgt das umfangreiche Vorhandensein membrangebundener PUFAs für ein Reservoir an potentiellen Signalmolekülen, die über die Bildung von Oxylipinen bzw. Jasmonaten bereitgestellt werden können.

Im Vergleich zu anderen Organellen unterscheiden sich die Chloroplastenmembranen deutlich hinsichtlich ihrer Lipid-Komposition. Während andere Zellmembranen durch Phospholipide dominiert werden, bestehen die plastidären Membranen vorwiegend aus Glykoglycerolipiden, also ungeladenen Galaktolipiden und negativ geladenen Sulpholipiden (Joyard et al., 1998). Die dominierenden Galaktolipide werden von den Gruppen der Monogalaktosyl-Diacylglycerole (MGDG) und Digalaktosyl-Diacylglycerole (DGDG) vertreten. Zudem findet man noch die weniger abundante Gruppe der Sulfoquinivosyl-Diacylglycerole (SQDG) (Browse and Somerville, 1991; Jouhet et al., 2007). So beträgt der Anteil der Galaktolipide in den Chloroplasten etwa 70- 80 % (Douce and Joyard, 1990; Dormann et al., 1999). Wie Abbildung 4 darstellt, bestehen Glykoglycerolipide aus einem Glycerin-Grundgerüst an dem die zwei Hydroxylgruppen *sn-1* und *sn-2* mit unterschiedlichen C16-oder C18-Fettsäuren verestert sind.



Abbildung 4: Galaktolipide der Thylakoidmembranen. Bearbeitet nach Benning, 2009. Als Hauptbestandteile beinhalten die Thylakoidmembranen Di- und Monogalaktosyl-Diacylglycerole (DGDG/MGDG), sowie geringere Mengen Sulfoquinivosyl-Diacylglycerole (SQDG). Sie sind variierend mit den Fettsäuren C16:3 (R1), C18:3 (R2), C18:2 (R3), C18:1 (R4), C16:1(R5) oder C16:0 (R6) an Position sn1 und sn2 verestert.

Dieses Grundgerüst bindet in der *sn-3* Position an polare Kopfgruppen, die in erster Linie aus Mono- und Digalaktosylen mit je ein- bzw- zwei Galaktosemolekülen bestehen (Douce and Joyard, 1990). Die unterrepräsentierten Phospholipide sind dagegen lediglich in der äußeren Hüllmenbran aber nicht in den Thylakoidmembranen zu finden (Andersson et al., 2001). Abhängig von den verschiedenen Biosynthesewegen mit denen eine Pflanzenspezies die dominierenden Thylakoid-Lipide synthetisieren kann, wird ein Art-spezifisches Verhältnis der veresterten Fettsäuren festgelegt (Browse et al., 1989; Browse and Somerville, 1991). So werden Pflanzen in zwei Gruppen unterteilt: solche mit hohem C16-Anteil in *sn-2* Position (C16:3-Pflanzen), zu denen auch *Arabidopsis thaliana* gehört und solche, die ausschließlich C18-Lipide in *sn-2* Position beinhalten (C18:3-Pflanzen) (Heinz and Roughan, 1983). Je nach untersuchter Spezies kann der Anteil an PUFAs dabei bis zu 90% betragen (Benning, 2009). In *Arabidopsis* liegt der Anteil der dreifach ungesättigten Fettsäuren C18:3 (Oktadekatriensäure) und C16:3 (Hexadekatriensäure) innerhalb der MGDGs bei 90% und innerhalb der DGDGs bei etwa 74% (Dormann et al., 1999).

#### 1.3.2 Biosynthese der Jasmonate

Ein wichtiger Schritt zur Jasmonat-Biosynthese ist schließlich die Freisetzung der dreifach ungesättigten Fettsäuren aus den Membranen durch plastidäre Lipasen. So konnten in Arabidopsis, aber auch in anderen Spezies wie Tomate oder Kartoffel bisher zahlreiche Phospho- bzw. Galaktolipasen identifiziert werden, die an der Formation der Jasmonate beteiligt sind (Narvaez-Vasquez et al., 1999; Ishiguro et al., 2001; Yang et al., 2007; Hyun et al., 2008). Dabei erfolgt die Freisetzung je nach Stimulus vermutlich durch eine konzertierte Aktivität mehrerer Lipasen. Neueste Untersuchungen an Mehrfach-Mutanten plastidärer Lipasen, die kaum in der basalen und verwundungsinduzierten JA-Akkumulation beeinträchtigt waren, unterstützen die Theorie, dass an der JA-Bildung mehrere redundante Lipasen beteiligt sein müssen (Ellinger et al., 2010). Die weitere Synthese der Jasmonate beginnt, wie in Abbildung 5 dargestellt, mit der LOX-vermittelden Bildung von Oxylipinen (siehe Kapitel 1.2.1). Danach werden die gebildeten Hydroperoxide 13-HPOTE (bei C16:3-Pflanzen wie Arabidopsis findet zusätzlich die Bildung von 11-HPHTE statt) durch den AOSzunächst in das chemisch instabile Allenepoxid 12,13-(S)-Epoxy-9,11,15-Weg Octadekatriensäure (EOT) umgewandelt, das durch die Allenoxid-Cyclase (AOC) in das Cyclopentenon-Derivat 9(S), 13(S)-12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) umgesetzt wird. Die Umsetzung aus der C16-Fettsäure 11-HPHTE erfolgt entsprechend und führt zur Synthese von dinorOPDA (dnOPDA) (Gfeller et al., 2010). Mit diesen Produkten ist der Syntheseweg der Jasmonate innerhalb der Chloroplasten zunächst beendet. Der Exportmechanismus von OPDA/dnOPDA aus den Plastiden ist bisher noch ungeklärt. Es konnte jedoch in Arabidopsis der peroxisomale ABC-Transporter COMATOSE (CTS1), auch als PXA1/PED3 bekannt, identifiziert werden. Durch diesen können offenbar OPDA-Moleküle, aber auch freie Fettsäuren, zur weiteren β-Oxidation in die Peroxisomen transportiert werden (Theodoulou et al., 2005; Kunz et al., 2009). In diesen befindet sich ein komplexes Enzymnetzwerk, dass sowohl für die β-Oxidation von Fettsäuren als auch von OPDA/dnOPDA zuständig ist. Dort findet also anschließend eine Reduktion von OPDA zu 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure (OPC:8) durch OPDA-Reduktasen (OPR) statt (Browse, 2009; Wasternack and Kombrink, 2010). Von insgesamt sechs Isoformen der 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase, die in Arabidopsis identifiziert wurden, erwies sich bisher lediglich OPR3 in der Lage, das für die JA-Biosynthese relevante cis-(+)-Enantiomer der OPDA zu reduzieren (Schaller et al., 2000). Vor dem Prozess der eigentlichen  $\beta$ -Oxidation ist eine Aktivierung der Substrate durch Acyl-CoA-Ligasen notwendig. In Arabidopsis wurde die OPC:8:CoA Ligase OPCL1 identifiziert, deren Mutante verminderte JA-Spiegel aufweist (Koo et al., 2006).



Abbildung 5: Die Jasmonat-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* (modifiziert nach Böttcher und Pollmann, 2009). Erläuterungen siehe Text.

Aufgrund der verbliebenen JA-Produktion in der *opcl1* Mutante wird jedoch vermutet, dass weitere redundante CoA-Ligasen vorhanden sind. Die CoA-aktivierten Substrate werden im Folgenden durch drei enzymatisch katalysierte Schritte verkürzt. Dem ersten Enzym, der Acyl-CoA-Oxidase (ACX) schließt sich ein Multi-Enzymkomplex (*multi functional protein*, MFP) an, der eine CoA-Hydratase-, CoA-Dehydrogenase-, CoA-Epimerase- und CoA-Isomeraseaktivität beinhaltet (Browse, 2009). Die abschließende Verkürzung der Carboxylseitenkette geschieht mittels der 3-Keto-Acyl-CoA Thiolase 2 (KAT2) (Cruz Castillo et al., 2004; Delker et al., 2007). Nach drei Zyklen der  $\beta$ -Oxidation wird schließlich aus Jasmonyl-CoA mittels einer bisher unbekannten Thioesterase 3(*R*),7(*S*)-(+)7-*epi*-JA freigesetzt, die im dynamischen Gleichgewicht mit der isomeren 3(*R*),7(*R*)-(-)-JA steht (Sembdner and Parthier, 1993).

#### 1.3.3 Arabidopside- membranveresterte Oxylipine

Wie in Abbildung 5 angedeutet ist, kommt es in *Arabidopsis* nicht nur zur Bildung freier Oxylipine/Jasmonate. Es wurden Derivate der plastidären Mono- und Digalaktosyl-Diacylglycerole (MGDG/DGDG) identifiziert, bei denen an Stelle von Fettsäuren die Cyclopentenone OPDA oder dnOPDA an *sn1* und *sn2* Position und/oder an der Galaktose verestert sind. Da diese *cyclo*-Oxylipin-Galaktolipide (cGLs) bisher nur in Brassicaceaen wie *Arabidopsis* und *Camelina* nachgewiesen wurden, werden diese auch als Arabidopside bezeichnet.

Durch Variation der veresterten Oxylipine können mehrere Spezies unterschieden werden (Arabidopsid A, B, C, D, E und G), wobei vier auf MGDG und zwei auf DGDG basieren (Böttcher and Pollmann, 2009). Eine Übersicht der hier untersuchten Spezies ist in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6: Strukturformeln der Arabidopside A-G (modifiziert nach Böttcher und Pollmann, 2009).

Die genaue physiologische Funktion der Arabidopside ist bisher jedoch noch unklar. Studien zur Biosynthese haben ergeben, dass Stimuli wie Verwundung, die auch zur Freisetzung von OPDA führen, ebenfalls eine lokale Akkumulation von Arabidopsiden verursachen (Buseman et al., 2006; Koo et al., 2009). Weiter ist bekannt, dass Arabidopside nach der Erkennung von bakteriellen Effektorproteinen und während der hypersensitiven Antwort nach Pathogenbefall gebildet werden (Andersson et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007). Dabei ist für die Bildung der Arabidopside eine funktionierende JA-Signaltransduktion erforderlich, wie Experimente an *coi1* und *jar1* Mutanten gezeigt haben. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass, ähnlich wie freie OPDA, die Arabidopside E und G eine fungizide Wirkung auf das Wachstum nekrotropher Pilze wie *Botrytis cinerea* haben (Kourtchenko et al., 2007). Für Arabidopsid A wurde eine seneszenzfördernde Wirkung nach exogener Applikation auf Hafer-Blätter beschrieben (Hisamatsu et al., 2006).

Aufgrund der bisher gemachten Beobachtungen und der Tatsache, dass OPDA als ein eigenständiges Signalmolekül angesehen wird und zudem den Vorläufer zur JA-Synthese darstellt, geht man zurzeit davon aus, dass Arabidopside eine Art Oxylipin-Speicherform während Stressreaktionen darstellen, aus denen nach einiger Zeit freies OPDA hydrolysiert werden kann. Dabei ist noch unbekannt, ob die cGLs durch Veresterung von freien OPDA/dnOPDA-Molekülen gebildet werden, also über den Vick-Zimmermann Pfad (Vick and Zimmerman, 1984), oder über einen alternativen Weg, bei dem die Enzyme LOX2, AOS und AOC direkt membrangebundene PUFAs als Substrat umsetzen (vgl. Abbildung 5).

#### 1.3.4 Die Signaltransduktion der Jasmonate

Bereits vor einiger Zeit wurde eine Arabidopsis-Mutante identifiziert, die einen Defekt im Mediatorprotein COI1 enthält. Die Charakterisierung dieser coronatine-insensitive1 (coi1) Mutante hatte gezeigt, dass dieser Signalweg sowohl für die JA-vermittelten Antworten in der Pflanzenentwicklung, wie z. B. der Fertilität (Feys et al., 1994), als auch in der Reaktion auf nekrotrophe Pathogene und Herbivoren eine wichtige Rolle spielt (Penninckx et al., 1996; Thomma et al., 1998; Ellis and Turner, 2001; Ellis and Turner, 2002; Devoto et al., 2005). Mittlerweile hat man entdeckt, dass COI1 als F-Box Protein einen Teil des SCF-Komplexes darstellt, der als E<sub>3</sub> Ubiquitin- Ligase fungiert (Xie et al., 1998; Xu et al., 2002). Schließlich wurde die Familie der JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)- Repressorproteine als putatives Ziel des SCF<sup>COI</sup> Komplexes entdeckt. Weiter konnte *in vitro* eine direkte Interaktion zwischen JAZ und COI1 Proteinen gezeigt werden (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). Seit kurzem ist bekannt, dass nicht JA, MeJA oder OPDA selbst, sondern vielmehr JA-Aminosäure-Konjugate als molekulare Aktivatoren die JAZ-COI-Interaktion in der Signaltransduktion vermitteln (Katsir et al., 2008a; Katsir et al., 2008b; Melotto et al., 2008). Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, werden Metabolite wie Jasmonoyl-Isoleucin durch Adenylierung mittels des Enzyms JAR1 gebildet (Staswick and Tiryaki, 2004; Suza and Staswick, 2008).

Zusammenfassend funktioniert dieses autoregulatorische System dabei folgendermaßen: Bei basaler Jasmonat-Produktion (bzw. von Jasmonoyl-Isoleucin) reprimieren JAZ-Proteine die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die dadurch keine Transkription JA-responsiver Gene vermitteln können. Kommt es zur Produktion von Jasmonaten z. B. durch Stress, so vermittelt Jasmonoyl-Isoleucin die Bindung zwischen dem SCF<sup>COI</sup> Komplex und JAZ. Die Repressoren können dadurch ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert werden. Dadurch kommt es zur Aktivierung bzw. Freisetzung der Transkriptionsfaktor-Proteine wie z. B. MYC2, die dann wiederum sekundäre Gene aktivieren (Lorenzo et al., 2004; Chini et al., 2009). Durch diese Antwort kommt es unter anderem zur Expression von neuen JAZ-Repressoren, so dass die Jasmonat-Antwort autoregulatorisch auf einen gewissen Zeitraum begrenzt werden kann, bis das vorhandene Jasmonoyl-Isoleucin metabolisiert worden ist. Interessanterweise sind sich die Signalwege von Jasmonaten, Auxinen und Gibberellinen über das Prinzip der Signalerkennung bis hin zur proteasomalen Degradierung von Repressoren erstaunlich ähnlich. Anscheinend handelt es sich um ein im Pflanzenreich konserviertes System, dass sich im Laufe der Evolution zu verschiedenen Signalwegen entwickelt hat (Santner and Estelle, 2009).

Neben dem COI1-vermittelten Signalweg, über den ein Großteil der Jasmonat-Regulation stattfindet, gibt es in *Arabidopsis* viele Hinweise darauf, dass es weitere bisher unbekannte Mechanismen gibt. So zeigten etwa Verwundungs-Experimente an der *coi-1* Mutante, dass ein Teil der Jasmonat-Antworten nicht über diesen Weg vermittelt wird (Devoto et al., 2005). Zum anderen gibt es Studien zur Genexpression nach MeJA und OPDA-Behandlung, die eindeutig belegen, dass OPDA ein unterschiedliches Wirkspektrum der Genaktivierung im Gegensatz zu MeJA über einen COI1-unabhängigen Weg aufweist (Taki et al., 2005; Ribot et al., 2008). Ebenso ist bereits bekannt, dass elektrophile Cyclopentenone wie OPDA und Phytoprostane ein anderweitiges Wirkspektrum im Bezug auf Stimulus und Genexpression haben als Cyclopentanone wie JA (Stintzi et al., 2001; Almeras et al., 2003; Farmer et al., 2003).

#### 1.3.5 Funktionen der Jasmonate in Pflanzen

Es wurde bereits erwähnt, dass zu Beginn der 1980er Jahre die ersten Erkenntnisse zur physiologischen Bedeutung von Jasmonaten publiziert wurden (Ueda and Kato, 1980; Dathe et al., 1981). Seit dieser Zeit haben sich durch physiologische und auch molekulare Studien unzählige Funktionen in den Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress, im Pflanzenwachstum und in der Entwicklung ergeben. So sind Jasmonate essentielle Hormonkomponenten in der primären und sekundären Ausbildung von lokalen und systemischen Abwehrmechanismen auf molekularer Ebene. Die zahlreichen Erkenntnisse über diese Prozesse wurden bereits in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst,

auf die hier verwiesen werden soll (Wasternack, 2007; Jander and Howe, 2008; Browse, 2009; Wasternack and Kombrink, 2010). Neben diesen Verteidigungsmechanismen sind Jasmonate auch an wichtigen Entwicklungsvorgängen beteiligt.

Es ist bekannt, dass die JA-Biosynthese und die Signaltransduktion via COI1 für die Fertilität von Blüten essentiell sind (McConn and Browse, 1996; Hause et al., 2000; Stintzi and Browse, 2000; Li et al., 2004). Diese Effekte sind insbesondere aus Mutanten bekannt, die einen Defekt in der JA-Synthese haben wie z. B. *dad1, fad3-2fad7-2fad8, dde2-2, dde1, opr3* und *aim1*. Alle diese Linien sind männlich steril, was auf eine verzögerte Antheren- bzw. Filamententwicklung oder verminderte Antherenöffnung und Pollenreifung zurückzuführen ist. In den Biosynthesemutanten können diese Effekte aber durch Gabe vonα -LeA bzw. JA umgangen werden (Stintzi and Browse, 2000; Ishiguro et al., 2001; Turner et al., 2002; Delker et al., 2006). Interessant ist, dass Arabidopsis in Abwesenheit von JA männlich steril ist, Tomate hingegen weiblich steril.

In diesem Zusammenhang soll auch der Einfluss der Jasmonate auf den Wuchs der Pflanze erwähnt werden. So ist eines der ersten entdeckten Phänomene die Beeinflussung des Wurzelwachstums durch exogene JA-Applikation (Dathe et al., 1981; Staswick, 1992). Unter anderem wurden nach JA-Behandlung verminderter Wuchs in Reis- (*Oriza sativum*) und Weizenkeimlingen (*Triticum aestivum*) beobachtet (Dathe et al., 1981; Yamane et al., 1981). Desweiteren ist bekannt, dass JA-defiziente Arabidopsismutanten, wie etwa die AOS-Mutante *dde2-2* oder Pflanzen mit reduzierter Lipase-Expression, vergrößerte Blätter zeigen (von Malek et al., 2002; Hyun et al., 2008). Weiter gibt es zahlreiche Berichte über Funktionen in unterschiedlichsten Pflanzenspezies, die z.B. das Wachstum von Wurzelknollen durch Tuberonsäure bzw. 12-Hydroxy-JA in Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (Yoshihara et al., 1989), die Spiralisierung von Ranken an *Bryonia* durch MeJA (Falkenstein et al., 1991), die Formierung von Trichomen in Tomate (*Solanum esculentum*) durch JA (Li et al., 2004) oder die Funktion von Jasmonaten in der Stimulation der Nychinastie durch das glykosylierte Derivat 12-Hydroxy-JA-Gluc in *Albizzia* (Ueda and Nakamura, 2007) betreffen.

#### 1.3.6 Jasmonate in der Seneszenz

Im Wesentlichen beschränken sich die Hinweise, dass Jasmonate in Seneszenz-Prozesse involviert sind, einerseits auf die Beobachtungen nach exogener Applikation, andererseits auf molekulare Untersuchungen von Genen bzw. Proteinen, die eine Rolle in der Seneszenz spielen und die ebenfalls durch JA induziert werden können.

Eine der ersten beschriebenen biologischen Aktivitäten von Jasmonaten war der seneszenzfördernde Effekt, der nach der Behandlung von Hafer-Blättern (*Avena sativa*) mit MeJA beobachtet wurde (Ueda and Kato, 1980). Durch diese Art der Seneszenz-Induktion konnten in zahlreichen Studien an abgetrennten Gerste-Blättern (*Hordeum vulgare*) drastische Beeinträchtigungen der Photosynthese, wie Rückgang der photosynthetischen

#### Einleitung

Genexpression, Rubisco-Proteinen verstärkter Abbau von und Abnahme der Photosyntheseleistung, festgestellt werden (Weidhase et al., 1987b; Weidhase et al., 1987a; Parthier, 1990). Durch Versuche an Keimlingen und abgetrennten Blättern, die mit JA behandelt wurden, konnten He et al. zum ersten Mal eine seneszenzfördernde Wirkung an der Spezies Arabidopsis thaliana feststellen (He et al., 2002). So wiesen diese Pflanzenteile eine Verminderung der Photosynthese sowie die Aktivierung der seneszenzspezifischen SAG12-Expression auf. Durch entsprechende Experimente mit der coi1 Mutante wurde festgestellt, dass diese Reaktionen auf einen funktionellen JA-Signalweg angewiesen sind. Man schloss aus diesen Beobachtungen, dass die Jasmonate möglicherweise auch während der natürlichen Seneszenz-Progression eine seneszenzförderde Funktion haben. Diese Theorie wurde weiter dadurch unterstützt, dass ein endogener Anstieg der JA-Konzentrationen in seneszenten Blättern beobachtet wurde.

Auf molekularer Ebene wurde gleichzeitig eine Erhöhung der Genexpression einiger Oxylipin/Jasmonat-Biosynthesegene, wie *LOX1*, 3 und 4; *AOC1*, 2 und 3; *OPR1* und 3 sowie *PED1 (KAT2)*, im Verlauf der Seneszenz festgestellt (He et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse zur Expression der JA-Synthesegene wurden auch in Transkriptomstudien während der altersabhängigen Seneszenz festgestellt (van der Graaff et al., 2006). Weitere Arbeiten mit der *coi1* Mutante haben ergeben, dass 12 % der darin untersuchten SAGs, darunter Transkriptionsfaktoren der NAC-Familie und regulative Gene des Metabolismus, wie Pektinesterasen oder Polygalakturonasen, auf den JA-gesteuerten COI1-Signalweg während der Seneszenz angewiesen sind (Buchanan-wollaston et al., 2005).

Aus anderen Studien zu Seneszenz-Prozessen in Arabidopsis ist bekannt, dass einige SAGs wie z. B. *SEN1, 2, 3, 4* und *5; SAG14* und *SAG15* sowohl während der altersbedingten als auch durch Jasmonat-induzierbare Seneszenz aktiviert werden (Park et al., 1998; Schenk et al., 2005).

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 dargestellt wurde, konnten ebenfalls Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie als SAGs identifiziert werden. Darunter wurde der Faktor WRKY53 charakterisiert, der mittlerweile als einer der frühen Regulatoren der natürlichen Blattseneszenz gilt (Miao et al., 2004; Zentgraf et al., 2010). Durch Lokalisations- und Interaktionsstudien wurde festgestellt, dass WRKY53 und das Protein ESR/ESP in Interaktion für die Regulation der Seneszenz-Induktion mitverantwortlich sind. Offenbar wird die Expression dieser Faktoren während der Seneszenz durch das JA/SA Equilibrium antagonistisch gesteuert (Miao and Zentgraf, 2007). Ebenso wie für den Faktor ESR/ESP konnte für die Proteine WRKY6 und WRKY70 eine transkriptionelle Aktivierung während der natürlichen Seneszenz, als auch nach JA-Behandlung beobachtet werden (Robatzek and Somssich, 2001; Robatzek and Somssich, 2002; Ulker et al., 2007).

Offenbar gibt es in *Arabidopsis* also zahlreiche Gene, deren Aktivität und Funktion während der Seneszenz bzw. Seneszenz-ähnlicher Prozesse mit der Anwesenheit von Jasmonaten in Verbindung gebracht wird. Durch die komplexen endogenen Mechanismen, die zur Seneszenz-Regulation beitragen, ist es jedoch noch unklar, ob Jasmonate, abgesehen von der künstlichen Induktion, zur Expression dieser Gene während der natürlichen Entwicklung tatsächlich benötigt werden.

#### 1.4 Zielsetzung

Die Funktionen der Jasmonate werden seit vielen Jahren im Zusammenhang mit Stress- und Abwehrreaktionen untersucht. Dabei sind diese durch Interaktion mit anderen Signalwegen u. a. an der Ausbildung von Zelltod nach Pathogenbefall beteiligt. Weiter spielen Jasmonate in Entwicklungsprozessen, wie der Blütenentwicklung sowie dem Wurzel- und Blattwachstum, eine wichtige Rolle. Seit vielen Jahren wird zudem diskutiert, inwieweit Jasmonate als hormonelle Signalmoleküle Einfluss auf die Progression der pflanzlichen Blattseneszenz haben. Diese Vermutung basierte bisher im Wesentlichen auf Beobachtungen aus Studien mit exogen applizierten Jasmonaten (siehe Kapitel 1.3.6).

Ebenso wurde lange Zeit postuliert, dass Lipoxygenasen während Seneszenz-Prozessen entweder direkten Einfluss auf die Degradation von Membranlipiden haben, oder eben indirekt durch die Produktion von Signalmolekülen wie z.B. Jasmonaten oder ROS zur Förderung der Seneszenz beitragen (Thompson et al., 1987; Siedow, 1991; Feussner, 1997; Thompson et al., 1998).

Bei bisherigen Untersuchungen an JA/OPDA-defizienten Mutanten, bzw. Mutanten mit eingeschränkter JA-Signaltransduktion konnten keine Effekte auf die natürliche Seneszenz-Progression beobachten werden (Stintzi and Browse, 2000; He et al., 2002; Schommer et al., 2008). Wie allerdings schon erläutert wurde, hängt der Seneszenzverlauf der Blätter u. a. von der gesamtpflanzlichen Entwicklung ab. Da JA-defiziente Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp pleiotrophe Effekte wie Sterilität, verändertes Wachstum und Reproduktion aufweisen, sind diese möglicherweise für eine Untersuchung von entwicklungsabhängiger Seneszenz ungeeignet. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb transgene Arabidopsis thaliana Pflanzen hergestellt und untersucht werden, die zu Beginn der Pflanzenentwicklung normale Jasmonat-Konzentrationen aufweisen und sich dadurch im Bezug auf Wachstum und Reproduktion normal entwickeln können; jedoch während Seneszenz-Prozessen keine erhöhten Spiegel produzieren können. Dazu wurden AOS (At5g42650) und LOX2 (At3g45140) RNA-Interferenz-Linien konstruiert, bei denen die mRNA-Interferenz entwicklungs- und organspezifisch durch einen seneszenzassoziierten-Promotor oder konstitutiv gesteuert wird. Mit Hilfe dieser transgenen Linien sollte die Funktion von Jasmonaten bzw. der Enzyme AOS und LOX2 während der natürlichen Seneszenz und in Seneszenz-ähnlichen Prozessen untersucht werden.

## 2 Ergebnisse

# 2.1 Der Einfluss von induzierbarer RNA-Interferenz auf die Produktion von Jasmonaten während der Seneszenz von *Arabidopsis*-Blättern

Ausgehend von der Hypothese, dass die Spiegel freier Jasmonate während der natürlichen Seneszenz in den Blättern von Arabidopsis ansteigen und zudem eine seneszenzfördernde Signalwirkung haben, wurden transgene Linien hergestellt, die im Stadium der Seneszenz keinen Anstieg von Jasmonaten aufweisen sollten. Dazu wurde in dieser Arbeit die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) angewand, um die mRNA-Translation wichtiger Jasmonat-Biosynthese-Enzyme zu vermindern. Um jedoch die Biosynthese basaler Jasmonatmengen zu ermöglichen und damit die sonstige Entwicklung der Pflanzen nicht zu beeinträchtigen, sollte in diesen Linien die Expression des RNAi-Transgens unter der Kontrolle eines seneszenzinduzierbaren Promotors erfolgen. Für die Interferenz der mRNAs für LOX2 sowie AOS wurde der Promotor des Seneszenz-assoziierten Gens SAG13 (At2g29350) ausgewählt, da dieses Gen in einem relativ frühen Seneszenzstadium aktiviert wird (Lohman et al., 1994). Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Arabidopsis thaliana Pflanzen, wurden für die folgenden Experimente homozygote Einzelinsertionslinien verwendet (siehe Kapitel 5.2.2). Einige dieser Linien wurden hinsichtlich ihrer Genexpression, ihres Jasmonat- sowie Chlorophyllgehaltes in seneszenten Blättern vorcharakterisiert. Exemplarisch wird hier die Charakterisierung jeweils einer Linie vorgestellt.

#### 2.1.1 Charakterisierung einer SAG13::AOS RNAi-Linie

Zu diesem Zweck, wurden Proben der Linie SAG13::AOSi-1 (siehe Anhang, Abbildung S5) und des Wildtyps zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen geerntet und entsprechend untersucht. Die Pflanzen wurden dazu in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen angezogen (siehe Kapitel 5.2.3). Es wurden an den Versuchspflanzen im Alter von etwa 6 Wochen die Rosettenblätter 9-14 markiert, um in jedem Entwicklungsstadium die vergleichbaren Blätter zu untersuchen.

#### 2.1.1.1 Untersuchung der AOS-Expression

Zunächst wurde die AOS-Expression per qRT-PCR untersucht, um festzustellen wie erfolgreich die Reduktion der AOS-Expression durch RNA-Interferenz im Zeitverlauf war. Wie die Abbildung 7 zeigt, hat die Expression der AOS-mRNA im Wildtyp während der Blattalterung einen relativ konstanten Verlauf mit leichtem Trend zur Verminderung im Blattalter.


Abbildung 7: Relative AOS-Expression bezogen auf Actin2/8 der Blätter 9-14 des Wildtyps und der Linie SAG13::AOSi-1 für die Zeitpunkte 6, 8 und 10 Wochen. [n=3]

In der exemplarisch dargestellten Linie SAG13::AOSi-1 konnte während der ersten 8 Wochen im Vergleich zum Wildtyp keine verminderte Expression festgestellt werden. Erst nach 10 Wochen trat im Vergleich eine deutliche Reduktion der *AOS*-Transkripte um etwa 60 % auf. Weitere untersuchte Linien wiesen in Vorversuchen ähnliche Ergebnisse auf.



#### 2.1.1.2 Untersuchung der SAG13 – Expression

Abbildung 8: Relative SAG13-Expression bezogen auf Actin2/8 der Blätter 9-14 des Wildtyps und der Linie SAG13::AOSi-1 für die Zeitpunkte 6, 8 und 10 Wochen. [n=3]

Um festzustellen, ob die Reduktion der *AOS*-Transkripte tatsächlich durch eine mögliche Aktivierung des *SAG13*-Promotors ausgelöst worden sein könnte, wurde in den gleichen Proben die *SAG13*-Expression per qRT-PCR untersucht. Wie die Daten in Abbildung 8 zeigen, war die Expression sowohl im Wildtyp als auch in der RNAi-Linie bereits nach 6

Wochen leicht aktiviert. Nach 8 bzw. 10 Wochen konnte eine zusätzliche Induktion um etwa 70% beobachtet werden.

Zusätzlich kann die Expression von einigen SAGs auch als Indikator für den Seneszenzverlauf verwendet werden. Unter diesem Gesichtspunkt wurde im Vergleich kein wesentlicher Unterschied zwischen Wildtyp und der AOSi-Line festgestellt.

#### 2.1.1.3 Analyse der Jasmonate

Eigentliches Ziel der seneszenzspezifischen mRNA-Regulation sollte eine Modulation der freien Jasmonate JA und OPDA sein. So wurden diese Säuren aus dem Material der Blätter isoliert und mittels UPLC-MS/MS quantifiziert.

In Abbildung 9 sind die Konzentrationen an freier OPDA und JA im Wildtyp und der Linie SAG13::AOSi-1 im Zeitverlauf dargestellt. Übereinstimmend mit publizierten Beobachtungen, war im Wildtyp mit zunehmendem Alter ein natürlicher Anstieg zu beobachten. Die Konzentrationen nach 6 Wochen lagen für beide Substanzen bei einem Wert von etwa 10 ng g<sup>-1</sup> FG und wiesen damit für *Arabidopsis* typische Basalwerte auf. Nach 8 Wochen stiegen die OPDA-Mengen auf einen Wert um 120 ng g<sup>-1</sup> FG, die Jasmonsäuremengen auf etwa 200 ng g<sup>-1</sup> FG an. Nach 10 Wochen trat eine weitere Erhöhung der Spiegel auf 230 bzw. 280 ng g<sup>-1</sup> FG ein. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in der SAG13:AOSi-Linie keine Reduktion der Jasmonat-Spiegel festgestellt werden. Nach 10 Wochen wurden in diesem Experiment sogar insgesamt höhere Werte gemessen. Es war also trotz der verminderten *AOS*-Expression kein nennenswerter Einfluss auf die natürliche Akkumulation von Jasmonaten festzustellen.



Abbildung 9: JA- und OPDA-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linie SAG13::AOSi-1 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. [n=3]

#### 2.1.2 Charakterisierung einer SAG13::LOX2 RNAi-Linie

Aufgrund des Verhaltens der vorgestellten AOSi-Linien, wurden parallel SAG13::LOX2i Pflanzen etabliert. Anhand einer transkriptionellen Vorcharakterisierung wurden besonders geeignete Linien verwendet, um den möglichen Einfluss von JA und OPDA auf die Seneszenz im Entwicklungsverlauf der Pflanzen zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die 38 *LOX2*-Expression der Linien zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen untersucht. Dazu wurden die Blätter nach dem bereits beschriebenen Schema markiert. Anschließend wurden die Konzentrationen an freien Jasmonaten gemessen. Die Linie SAG13::LOX2i-6 (siehe Anhang, Abbildung S6) wurde zur genaueren kinetischen Untersuchung herangezogen, da sie in der Vorcharakterisierung die deutlichste Suppression der *LOX2*-Expression im Vergleich zur Kontrolle gezeigt hatte.

## 2.1.2.1 Untersuchung der LOX2-Expression

Zunächst wurde geprüft, ob eine Reduktion der *LOX2*-Expression im Entwicklungsverlauf bei der SAG13::LOX2i Linie stattfindet. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Blätter 9-14 isoliert, die mRNAs in cDNAs umgeschrieben und mittels qRT-PCR quantifiziert. Abbildung 10 zeigt die Expression von *LOX2* für die Zeitpunkte 6, 8 und 10 Wochen für den Wildtypen und die Linie SAG13::LOX2i-6.



Abbildung 10: Relative *LOX2*-Expression bezogen auf Actin2/8 der Blätter 9-14 des Wildtyps und der Linie SAG13::LOX2i-6 für die Zeitpunkte 6, 8 und 10 Wochen. [n=4]

Es konnte festgestellt werden, dass die relative *LOX2*-Expression im Verhältnis zu anderen Jasmonat-Biosyntheseenzymen im Wildtyp insgesamt deutlich stärker ist (vgl. Abbildung 7 *AOS*-Expression). So wurde nach 6 Wochen eine hohe Expression von etwa 80 x 10<sup>3</sup> Molekülen gemessen. Dazu ist bekannt, dass Lipoxygenasen zu den am häufigsten vorkommenden Pflanzenproteinen überhaupt gehören (Brash, 1999). Wie bereits in anderen Publikationen festgestellt wurde (He et al., 2002; van der Graaff et al., 2006), konnte hier im Wildtyp ein kontinuierlicher Rückgang der Expression im Verlauf der Blattalterung auf etwa 25% beabachtet werden. In der transgenen Linie mit seneszenzinduzierbarem RNAi für die *LOX2*-mRNA, konnte nach 6 Wochen noch eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expression feststestellt werden. Mit zunehmendem Alter fand jedoch eine Reduktion der

Transkriptmenge auf 25 % bei 8 Wochen bzw. 10 % bei 10 Wochen im Vergleich zum Wildtyp statt. Die parallele Untersuchung der *SAG13*-Expression zeigte einen vergleichbaren Anstieg während der Seneszenz wie bei den AOSi-Linien (Daten nicht dargestellt). Ebenso haben sich dabei keine Unterschiede zwischen Wildtyp und LOX2i-Linie ergeben.

#### 2.1.2.2 Analyse der Jasmonate

Da sich bei der *LOX2*-Expression der RNAi-Linie deutliche Unterschiede zum Wildtyp ergeben hatten, wurde nun der Gehalt freier Jasmonate untersucht. Dazu wurden die freien Säuren aus dem Pflanzenmaterial von Wildtyp und transgener Linie extrahiert. Anschließend wurden die Substanzen mittels UPLC-MS/MS quantifiziert.



Abbildung 11: JA- und OPDA-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linie SAG13::LOX2i-6 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. [n=4-6]

Abbildung 11 zeigt die Jasmonat-Konzentrationen der Blätter 9-14 des Wildtyps und der Linie SAG13::LOX2i-6 im Zeitverlauf. Ähnlich wie in Abbildung 9 zeigten sich auch in diesen Experimenten generell ansteigende Spiegel an freien Jasmonaten im Laufe der Blattalterung. Die im Wildtyp gemessenen Werte für OPDA (20 ng g<sup>-1</sup> FG) und JA (5 ng g<sup>-1</sup> FG) liegen im basalen Erwartungsbereich. Nach 8 bzw. 10 Wochen war im Wildtyp ein deutlicher Anstieg bei OPDA auf etwa 110 ng g<sup>-1</sup> FG, bei JA auf etwa 300 ng g<sup>-1</sup> FG zu messen. Die Werte lagen dabei insgesamt auf einem vergleichbaren Niveau wie bei den AOSi-Pflanzen (Abbildung 9). Erstaunlicherweise konnte für die transgene SAG13::LOX2i-6 Linie trotz verminderter *LOX2*-Transkriptspiegel keine deutliche Verringerung der Jasmonat-Konzentrationen beobachtet werden. Die JA-Mengen entsprachen im wesentlichen denen des Wildtyps, wobei in zwei Experimenten sogar erhöhte OPDA-Mengen nach 10 Wochen

#### 2.2 Die Vorcharakterisierung von konstitutiven 35S::LOX2 RNAi-Linien

Die Versuche mit RNAi-Linien, deren Interferenz durch einen seneszenzspezifischen Promotor gesteuert werden sollte, zeigten im basalen Entwicklungsverlauf zwar Effekte auf

die relative Transkriptmenge der jeweiligen mRNA, jedoch konnten mit diesem Ansatz keine deutlichen Effekte auf die Akkumulation von OPDA und JA während des Seneszenz-Prozesses beobachtet werden. Möglicherweise bedeutet dies, dass die temporäre Regulation der Transkriptmenge keinen Einfluss auf die tatsächliche Enzymproduktion hatte bzw. die vorhandenen Enzyme für den Anstieg der basalen Jasmonat-Spiegel funktionell ausreichend waren. Aus diesen Überlegungen heraus, und aufgrund der Tatsache, dass es für das Gen LOX2 bis dahin noch keine erhältliche knock-out Mutante gab, wurden konstitutive LOX2 RNAi-Linien konstruiert. In diesen Linien sollte die RNAi-Kassette durch den konstitutiv aktiven CaMV-35S-Promotor gesteuert und damit die LOX2-Enzymproduktion während der gesamten Entwicklung reduziert werden. Zur Herstellung dieser Linien wurde die RNAi-Kassette des Verktors pHAN35S::LOX2i (siehe Anhang) in den binären Vektor pART27 kloniert. Mit Hilfe der Agrobakterien-vermittelten Transformation wurde der Wildtyp A. thaliana Columbia 0 mit der entsprechenden T-DNA transformiert. Die selektierten transgenen Pflanzen wurden per PCR getestet und in der F2-Generation auf das Aufspaltungsverhältnis hin untersucht. Um homozygote Einzelinsertionslinien zu erhalten, wurden nur Linien weiterverwendet, die ein Aufspaltungsverhältnis von 3:1 aufwiesen (getestet durch X<sup>2</sup>-Test). In der F3-Generation wurden davon nur Linien weiterverwendet, die keine weitere Aufspaltung aufwiesen und damit als homozygot anzusehen waren.

Zur Identifizierung geeigneter Pflanzenlinien mit einem Maximum an funktioneller RNA-Interferenz, wurden zunächst einige 35S::LOX2i-Linien auf ihre Transkript- sowie Jasmonat-Level hin untersucht. Um festzustellen, ob diese Linien unter Stressbedingungen noch zu einem Anstieg der Expression sowie der Jasmonat-Mengen in der Lage sind, wurden diese lokal verwundet (Quetschung der Blattspreite) und nach einer Stunde untersucht.



Abbildung 12: JA- und OPDA-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] aus der Vorcharakterisierung der 35S::LOX2i-Linien. Dazu wurden Blättern von 6 Wochen alten Pflanzen basal (A) bzw. eine Stunde nach Verwundung geerntet (B) [n=3].

Es ist schon länger bekannt, dass es in Arabidopsis, z. B. nach Verwundung in Folge eines Rückkopplungs-Mechanismus, zu einer Induktion der *LOX2*-Expression und der Jasmonat-Produktion kommt (Bell et al., 1995; Kubigsteltig et al., 1999).

Wie die Vorcharakterisierung der Transkriptmengen mit Hilfe der qRT-PCR gezeigt hat, ist *LOX2* im Wildtyp an sich ein stark exprimiertes Gen. In den Linien 1, 2 und 9 kam es dabei zu einer drastischen Suppression auf etwa 10 % der basalen Wildtypexpression bzw. 15% nach Verwundung (siehe Anhang, Abbildung S1). Die Untersuchung auf die Jasmonate JA und OPDA zeigte korrespondierend eine basale Reduktion um etwa 50 %. In der Line 3 dagegen konnten ähnliche Spiegel wie im Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 12 A).

Nach Verwundung konnte im Wildtyp ein starker Anstieg in der JA-Akkumulation um das über 100-fache des basalen Wertes festgestellt werden (Abbildung 12 B). In diesem Fall stieg der OPDA-Gehalt um etwa das 20-fache an. Somit fand als Antwort auf die lokale Verwundung eine Verschiebung im relativen Verhältnis zugunsten der Jasmonsäure statt. In den konstitutiven LOX2i-Linien 1, 2 und 9 konnte hingegen nur ein geringer Anstieg auf etwa 10 % der Wildtypwerte gemessen werden. In der Linie 3 traten etwa 50 % der JA und OPDA Mengen im Vergleich zum Wildtyp auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach Verwundung in den 35S::LOX2i-Linien 1, 2 und 9 sowohl auf expressioneller- als auch auf metabolomischer Ebene eine Reduktion um etwa 90 % stattfand. Basal hingegen reichte die geringe *LOX2*-Expression in den RNAi-Pflanzen aus, um im Vergleich zum Wildtyp mindestens 50 % der Jasmonate zu synthetisieren. Für weitere Experimente wurden ausschließlich die Linien 2 und 9 weiterverwendet.

# 2.2.1 Phänotypischer Vergleich der 35S::LOX2 RNAi-Linien mit dem Wildtyp und der *dde2-2* Mutante

Aus früheren Publikationen ist bekannt, dass Jasmonate regulative Funktionen in der Entwicklung von *A. thaliana* erfüllen (siehe Kapitel 1.3.5). Jasmonate sind u. a. für die Regulation des Größen- und des Wurzelwachstums mitverantwortlich. Zudem sind *Arabidopsis*-Mutanten, die in der Jasmonsäure-Biosynthese (z. B. *dad1, fad3-2fad7-2fad8, dde2-2, dde1, opr3*) bzw. in der Signalerkennung (z. B. *coi1*) beeinträchtigt sind, männlich steril. Diese Sterilität basiert weitestgehend auf einer gestörten Antherenentwicklung bzw. – dehiszenz sowie auf verminderter Filamentelongation oder Pollenreifung (Wasternack, 2007). Zudem wird angenommen, dass Jasmonate eine Rolle bei der Frucht- bzw. Embryonalentwicklung spielen, da in Arabidopsisschoten erhöhte Spiegel festgestellt wurden (Vignutelli et al., 1998).

Um festzustellen, ob die beobachtete basale Verminderung der Jasmonat-Biosyntheseleistung in den 35S::LOX2i-Linien Auswirkungen auf den allgemeinen Habitus bzw. auf die Fertilität hat, wurden die Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp und der JA/OPDA-defizienten Mutante *dde2-2* (von Malek et al., 2002) angezogen und in verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet. Die *LOX2* RNAi-Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp unter den gewählten Anzuchtbedingungen keine makroskopisch erkennbaren Unterschiede im Habitus. In Abbildung 13 sind repräsentativ 6 Wochen alte Pflanzen dargestellt, wobei die RNAi-Linien nach 6 Wochen normalen Wuchs aufwiesen (C und D). Im Vergleich dazu wies die JA/OPDA-defiziente *dde2-2* Mutante zu Beginn der Entwicklung (4-6 Wochen) eine verstärkte Expansion der Blätter und besonders der Petiolen auf, was insgesamt zu einem größeren Volumen der Rosette führt (Abbildung 13 B). Mit zunehmendem Pflanzenalter glichen sich die Pflanzen jedoch im Allgemeinen an.



Abbildung 13: Repräsentativer Vergleich 6 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen, Wildtyp Columbia 0 (A), *dde2-2* (B), 35S::LOX2i-2 (C) und 35S::LOX2i-9 (D). Anzuchtbedingungen wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben.

Bei Beobachtung des Sprosswachstums bei älteren Pflanzen zeigten sich bei den RNAi-Linien ebenfalls keine Unterschiede zum Wildtyp. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnten in den *LOX2* RNAi-Linien (B und C) ein normales Sprosswachstum und auch eine wildtypische Schotenbildung beobachtet werden. Im Vergleich dazu, wies die JA/OPDAdefiziente Mutante (D) ein vergrößertes Sprosswachstum sowie einen höheren Grad der Sprossverzweigung auf. Wie bereits erwähnt wurde, ist diese Mutante männlich steril und zeigt dadurch eine größere Anzahl unbestäubter Blüten, aus denen keine samenhaltigen Schoten hervorgehen.



Abbildung 14: Repräsentativer Vergleich 12 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen, Wildtyp Columbia 0 (A), 35S::LOX2i-2 (B), 35S::LOX2i-9 (C) und *dde2-2* (D). Anzuchtbedingungen wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben.



Abbildung 15: Repräsentativer Vergleich von Blüten 12 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen, Wildtyp Columbia 0 (A), *dde2-2* (B), 35S::LOX2i-2 (C) und 35S::LOX2i-9 (D). Anzuchtbedingungen wie unter 5.2.3 beschrieben. Bei den Blüten wurden zur Aufnahme einige Petalen oder Sepalen entfernt. Die Bilder wurden unter einem Stereo-Binokular (Leica) mit 30-facher Vergrößerung aufgenommen.

In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich geprüft, ob die konstitutiven RNAi-Linien tatsächlich über fertile Blütenorgane verfügen. Dazu wurden Blüten der Linien geerntet und unter einem Stereo-Binokular betrachtet (Abbildung 15). Beim Wildtyp (A) konnten elongierte Filamente beobachtet werden, deren aufgesprungene Antheren bereits Pollen freigesetzt hatten. Diese waren u. a bereits am Karpell anhaftend. Gleiches zeigte sich für Blütenorgane mit freigesetzten Pollen beobachtet werden. Im Vergleich dazu ist die *dde2-2* Mutante abgebildet (B), deren Filamente sich verkürzt ausprägten. Durch das Fehlen von Jasmonsäure konnten hier desweiteren die Antheren nicht aufreißen, sodass keine Pollen freigesetzt wurden. Die

# 2.3 Charakterisierung der Einflüsse von LOX2 und Jasmonaten auf Seneszenz-Prozesse in *Arabidopsis*-Blättern

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde (siehe Kapitel 1.3.6), galt bisher als Hauptargument für eine Beteiligung an der Seneszenz-Progression der Anstieg freier Jasmonate in alternden Arabidopsis-Blättern, sowie eine starke Ausbildung von Seneszenz-Symptomen durch Applikation von exogenem MeJA (He et al., 2002).

Die Ergebnisse aus der Vorcharakterisierung der konstitutiven 35S::LOX2i-Linien haben gezeigt, dass diese Pflanzen durchaus in der Lage waren basale Jasmonat-Spiegel zu erzeugen, um bis dahin eine normale Entwicklung zu ermöglichen. Um die mögliche Rolle der Jasmonate auf Seneszenz-Prozesse untersuchen zu können, sollten die endogenen Spiegel während dieser Prozesse in den RNAi-Linien im Gegensatz zum Wildtyp stagnieren. Als Vergleich wurde stets die JA/OPDA-defiziente Mutante *dde2-2* parallel untersucht, um mögliche Effekte der Jasmonate von denen anderer 13-LOX-Produkte unterscheiden zu können. Zur Charakterisierung der transgenen Linien bezüglich des Vorkommens bzw. der Signalfunktion der endogenen Jasmonate, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Arten der Seneszenz-Induktion untersucht. Zunächst wurden die Pflanzen in ihrer natürlichen Entwicklung beobachtet und analysiert. Zusätzlich wurden zwei verbreitete Methoden zur künstlichen Induktion von Seneszenz-Symptomen untersucht, die Induktion durch Dunkelinkubation sowie durch osmotischen Stress.

## 2.3.1 Charakterisierung der natürlichen Seneszenz

Zur Untersuchung möglicher Signalfunktionen von Jasmonaten in der natürlichen Seneszenz-Progression wurden die Linien 35S::LOX2i-2, 35S::LOX2i-9 zusammen mit dem Wildtyp und der *dde2-2* Mutante unter gleichen Bedingungen angezogen und untersucht. Dazu wurden nach etwa 4-6 Wochen die Rosettenblätter 9-14 der Versuchspflanzen farbig markiert, um in jedem Alterungsstadium die vergleichbaren Blätter ernten zu können. Diese wurden dann nach 6, 8 und 10 Wochen geerntet. Dazu wurden pro Zeitpunkt und Linie

mindestens 3-4 biologische Replikate bestehend aus je 3-5 Pflanzen zusammengestellt. Dieses Pflanzenmaterial wurde dann per UPLC-MS/MS auf freie Säuren (u. a. Jasmonate) und membrangebundene cyclo-Oxylipine hin untersucht. Als Indikatoren für die Blattalterung und Seneszenz wurden der Gehalt an Chlorophyll und an plastidären Membranlipiden (Galaktolipide) bestimmt sowie mittels qRT-PCR die Expression bestimmter Markergene untersucht.

## 2.3.1.1 Untersuchung der LOX2 Genexpression

Aus dem gewonnenen Pflanzenmaterial wurden die Gesamt-RNAs isoliert, in cDNAs umgeschrieben und mittels qRT-PCR auf die *LOX2*-Expression untersucht (Abbildung 16). Vergleichbar mit den vorhergehenden Experimenten zeigte sich im Wildtyp ein kontinuierlicher Rückgang in der LOX2-Expression. Im Verlauf der Alterung sank die Expression auf etwa 25% im Vergleich zu 6 Wochen alten Blättern.



Abbildung 16: Relative *LOX2*-Expression bezogen auf Actin2/8 der Blätter 9-14 beim Wildtyp sowie den Linien 35S::LOX2i-2 und 9 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Zeitkinetiken [ $n \ge 4$ ].

Die transgenen *LOX2* RNAi-Linien wiesen dagegen während der gesamten Entwicklung durchgehend niedrige Transkriptmengen auf. Die *LOX2*-Expression konnte so durch die RNA-Interferenz zu allen getesteten Zeitpunkten um etwa 80-90 % im Vergleich zum Wildtyp gesenkt werden.

## 2.3.1.2 Analyse der Jasmonate

Aufgrund der Ergebnisse aus der Expressionsanalyse wurde nun getestet, ob diese Linien im Entwicklungsverlauf veränderte Jasmonat-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Dazu wurden die freien Säuren aus dem Pflanzenmaterial von Wildtyp und



300

250 200

150

100

50 0

6 Wochen 8 Wochen 10 Wochen

OPDA [ng g<sup>-1</sup>] FG

100

80

60

40

20

0

6 Wochen 8 Wochen 10 Wochen

transgenen Linien extrahiert. Anschließend wurden die Substanzen chromatografisch getrennt und anschließend massenspektrometrisch quantifiziert.

Abbildung 17: JA und OPDA-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und 9 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Zeitkinetiken [n=4-6].

Wie Abbildung 17 zeigt, wurde im Gegensatz zur LOX2-Expression für die Jasmonat-Konzentrationen im Wildtyp eine Zunahme im Laufe der Blattseneszenz festgestellt. Bei OPDA konnte eine Anstieg um etwa das 5-fache, bei JA konnte ein Anstieg bis um das 20fache der basalen Konzentrationen (im Vergleich zu 6 Wochen) festgestellt werden. In den LOX2 RNAi-Linien wurde dagegen kein seneszenzspezifischer Anstieg der Jasmonate gemessen. In diesen Linien traten durchweg basale Konzentrationen auf, wobei die JA-Konzentrationen nur etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Hier zeigten sich also ähnliche Werte wie bereits in der Vorcharakterisierung (Kapitel 2.2). In der Mutante dde2-2 konnten keine detektierbaren Jasmonat-Mengen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Darstellung in Abbildung 17 verzichtet.

## 2.3.1.3 Analyse der Galaktolipid-veresterten Oxylipine (Arabidopside)

Wie bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben wurde, kommen Oxylipine nicht nur in freier Form z.B. als Jasmonsäure oder OPDA vor, sondern können auch in Form von OPDA oder dnOPDA membrangebunden verestert an Galaktolipide vorliegen (Stelmach et al., 2001; Böttcher and Weiler, 2007; Böttcher and Pollmann, 2009). Bisher konnte in mehreren Studien eine Korrelation zwischen der Akkumulation freier und veresterter Oxylipine festgestellt werden (Andersson et al., 2006; Buseman et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007). Außerdem wurde für Arabidopsid A ein seneszenzfördernder Effekt beschrieben (Hisamatsu et al., 2006). Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, findet ein Anstieg freier Oxylipine in der Seneszenz statt. Um festzustellen, ob dieser Anstieg hier ebenfalls mit einer Arabidopsid-Akkumulation korreliert, ob dies LOX2-abhängig ist und einen Einfluss auf die

Entwicklung hat, wurden sechs bekannte Arabidopsid-Spezies im Entwicklungsverlauf guantifiziert.



Abbildung 18: Arabidopsid-Konzentrationen im Wildtyp während der Blattseneszenz [in µg g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Zeitkinetiken [n=4]

	WT			LOX2i-2		
[ng g <sup>-1</sup> FW]	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen
Arabidopsid A	2658 ± 1207	4900 ± 1553	1469 ± 578	3 ± 6,1	190 ± 323	115 ± 187
Arabidopsid B	759 ± 389	2290 ± 880	421 ± 107	nd	80,5 ± 136,5	71,6 ± 122
Arabidopsid C	91 ± 30	449 ± 174	207 ± 71	1,9 ± 3,7	11,2 ± 22,3	7,1 ± 14,1
Arabidopsid D	1027 ± 566	6177 ± 2549	2079 ± 646	nd	205 ± 357	220 ± 361
Arabidopsid E	58 ± 31	681 ± 127	382 ± 149	nd	21 ± 42	2 ±1,5
Arabidopsid G	nd	72 ± 9	46 ± 18	nd	nd	nd
		dde2			LOX2i-9	
[ng g <sup>-1</sup> FW]	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen
Arabidopsid A	nd	12,6 ± 25,2	nd	28,7 ± 35,5	115 ± 114	173 ± 273
Arabidopsid B	nd	$5,3 \pm 6,5$	nd	13,1 ± 17,5	61,2 ± 60,4	108 ± 181
Arabidopsid C	nd	nd	nd	10,9 ± 21,9	1,4 ± 2,7	14,8 ± 29,7
Arabidopsid D	11,4 ± 22,8	31,7 ± 21,3	nd	11,6 ± 14,8	122 ± 119	388 ± 601
Arabidopsid E	nd	nd	nd	nd	nd	9,4 ± 15,7
Arabidopsid G	nd	nd	nd	nd	nd	$0,5 \pm 0,1$

Tabelle 2: Arabidopside [in ng g<sup>-1</sup> FG  $\pm$  SD] während der Blattalterung in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die Wildtypwerte entsprechen denen in Abbildung 18. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Zeitkinetiken [n=4; nd=nicht detektierbar]

Wie die Analyse der Arabidopside im Wildtyp in Abbildung 18 zeigt, konnten nach 6 Wochen basale Spiegel von etwa 1-2  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG für Arabidopsid A, B und D festgestellt werden. Die weiteren Spezies konnten nur in geringeren Mengen festgestellt werden. Nach 8 Wochen wurde zumeist ein leichter Anstieg in den Blättern gemessen. Wie in der Abbildung dargestellt ist, kam es im Wildtyp zu einem etwa 2-fachen Anstieg (Arabidopsid A, B, C, E und G). Bei Arabidopsid D kam es zum Anstieg auf etwa 6  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG, was einem Anstieg um das 6-fache entspricht. Mit zunehmendem Alter (und Seneszenz) der Blätter trat schließlich

nach 10 Wochen wieder eine Verminderung der Arabidopsid-Spiegel bis auf das Niveau von 6 Wochen alten Pflanzen ein. In einigen Experimenten zeigten sich mit zunehmender Seneszenz deutlich verminderte Mengen an Arabidopsiden. In Tabelle 2 sind die Arabidopside im Vergleich zu den *LOX2* RNAi-Pflanzen und zur *dde2-2* Mutante dargestellt (**hier in ng g**<sup>-1</sup> **FG**). Es war festzustellen, dass in den LOX2i-Linien nur geringe Mengen an Arabidopsiden gebildet werden können. So wurden nach 8 bzw. 10 Wochen maximal 5- 10 % der Arabidopside im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Dennoch lies sich in diesen Linien ein leichter entwicklungsbedingter Anstieg nach 8 Wochen beobachten, wobei die großen Abweichungen zwischen den Einzelproben nur Vermutungen zulassen. Einige Spezies, wie Arabidopsid E und G, konnten in den Mutanten gar nicht detektiert werden. Bei der JA/OPDA-defizienten *dde2-2* Mutante konnten im Wesentlichen keine Arabidopside detektiert werden. In Einzelproben wurden geringste Mengen aufgefunden, wobei die Möglichkeit einer Verschleppung durch den Messprozess nicht auszuschließen ist.

## 2.3.1.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

In den vorhergehenden Abbildungen konnte also gezeigt werden, dass es im Vergleich zum Wildtyp in den *LOX2* RNAi Linien durch die verminderte *LOX2*-Expression zu keinem seneszenzspezifischem Anstieg der Jasmonate und der Arabidopside während der natürlichen Alterung kommt. Um zu prüfen, ob dieser Mangel zu einer Verzögerung der Seneszenz-Progression führt, wurden die Chlorophyllmengen im Pflanzenmaterial bestimmt.



Abbildung 19: Chlorophyll a+b [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und 9 und der Mutante *dde2-2* zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n≥8]

In weitestgehend allen Experimenten zeigten sich im Wildtyp nach 6 Wochen Chlorophyllmengen um 1000-1100  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG (Abbildung 19). Im Verlauf der Blattalterung bzw. mit Beginn der natürlichen Seneszenz sank der Gehalt nach 10 Wochen auf etwa 50 %

(500- 600  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG) ab. Interessanterweise zeigte sich in mehreren Experimenten, dass die transgenen *LOX2* RNAi-Linien eine Tendenz zu einem insgesamt höheren Chlorophyll-Gesamtgehalt aufwiesen. Jedoch konnte dahingehend kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp bzw. zur *dde2-2* Mutante festgestellt werden. Insgesamt wurde in den RNAi-Pflanzen der gleiche absolute Chlorophyll-Abbau wie im Wildtyp beobachtet. Auch die Jasmonat-defiziente AOS-Mutante *dde2-2* wies insgesamt keine signifikanten Unterschiede auf.

## 2.3.1.5 Analyse der plastidären Galaktolipide

Als weiterer Indikator für den Seneszenz-Grad wurde der Gehalt an Galaktolipiden quantifiziert. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, bilden diese komplexen Lipide mit etwa 75 % den Hauptbestandteil der Lipide in den Chloroplastenmembranen. Während der Seneszenz kommt es u. a. zur Degradation dieser Membranen und damit von Galaktolipiden (Yang and Ohlrogge, 2009).



Abbildung 20: Lipid-Muster der am häufigsten in *Arabidopsis* vorkommende Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps (A) sowie der Mutante *dde2-2* (B) und der Linien 35S::LOX2i-2 (C) und -9 (D) und zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n=3-6]

Um den Einfluss von Jasmonaten bzw. der Lipoxygenierung von Fettsäuren auf den Umsatz an plastidären Membranlipiden zu studieren, wurden aus dem Pflanzenmaterial erschöpfende Lipid-Rohextrakte gewonnen und die Lipide mittels UPLC-MS/MS quantifiziert. In Abbildung 20 wurden die vier Galaktolipidspezies im Zeitverlauf abgebildet, die in den *Arabidopsis*-Chloroplastenmembranen am häufigsten anzutreffen sind. Insgesamt wurden 16 Lipidspezies quantifiziert, von denen die meisten jedoch in Mengen von  $\leq$  50 µg g<sup>-1</sup> FG vorkamen (siehe Anhang, Abbildung S2).

Im Gegensatz zu den drastischen Änderungen im Chlorophyllgehalt, stellten sich die Galaktolipide als relativ stabil dar. Insgesamt zeigten die Di- und Monogalaktosyl-Diacylglycerole (DGDG, MGDG) eine unterschiedliches Verhalten während der Blattalterung. Im Wildtyp (A) aber auch in den Transgenen (B, C, D) trat ein leichter Rückgang der MGDG-Spezies 18:3-18:3 bzw. 18:3-16:3 auf. Hier konnte im Wildtyp ein Rückgang von je etwa 50-100  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG nach 10 Wochen festgestellt werden. In den Mutanten äußerte sich dieser Effekt teilweise sogar deutlicher mit bis zu 150  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG für MGDG-18:3-16:3. Der verzeichnete Rückgang der MGDG-Spezies wurde jedoch teilweise durch Bildung von DGDG-Spezies kompensiert. So ist deutlich zu erkennen, dass DGDG-18:3-18:3 sowie DGDG-18:3-18:2 zwischen 6 und 10 Wochen im Wildtyp (A) und in der LOX2i-2 Linie (C) stagnieren. Bei der Linie LOX2i-9 (D) sowie bei *dde2-2* (B) war sogar ein leichter Anstieg zu beobachten. Im direkten Vergleich zwischen Wildtyp, den *LOX2* RNAi-Linien sowie der *dde2-2* Mutante konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede im Umsatz der Membranlipide verzeichnet werden.

	WT	LOX2i-2	LOX2i-9	dde2
6 Wochen	1568,4 ± 322,5	1967,1 ± 274,3	1802,2 ± 83,3	1656,8 ± 136,4
8 Wochen	1696,5 ± 439,6	1664,4 ± 146,3	1677,4 ± 123,5	1565,8 ± 226,7
10 Wochen	1655,4 ± 215,2	1808,2 ± 284,6	1592,6 ± 140,4	1656,8 ± 257,6

Tabelle 3: Gesamt-Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG ± SD] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Kalkulation aufgrund 16 quantifizierter Lipid-Spezies. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n=3-6]

Dies wird auch deutlich, wenn man die berechneten Mengen an Gesamt-Galaktolipiden betrachtet. In Tabelle 3 wurden die Mengen der quantifizierten Lipid-Spezies addiert. Es hat sich gezeigt, dass trotz der einsetzenden Blattseneszenz die Menge an Galaktolipiden insgesamt in allen Pflanzenlinien zu den verschiedenen Zeitpunkten weitgehend konstant blieb.

## 2.3.1.6 Analyse der freien α-Linolensäure

Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, liegt α-Linolensäure (C18:3) vorwiegend verestertert in Form von Membranlipiden vor. Größtenteils ist sie in komplexen Lipiden wie Glykoglycerolipiden oder Phosphatidylcholinen verestert. Durch Neusynthese aber auch durch lipasevermittelte Abbauprozesse (Hydrolyse) kommt stetig ein gewisser Teil

in freier Form vor. Um zu prüfen, ob der beobachtete Lipid-Umbau innerhalb der Membranen oder die verminderte Lipoxygenierung in den RNAi-Linien einen Einfluss auf die Akkumulation freier α-LeA während der natürlichen Seneszenz hat, wurden die freien Säuren aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und anschließend per UPLC-MS/MS analysiert und quantifiziert.



Abbildung 21:  $\alpha$ -Linolensäure-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 sowie der Mutante *dde2-2* zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n≥6]

Dabei wird in Abbildung 21 deutlich, dass der Gehalt der freien Säure mit beginnenden Seneszenz deutlich anstieg. Während des Entwicklungsverlaufes konnten nach 6- 8 Wochen Mengen von etwa 400- 600 ng g<sup>-1</sup> FG festgestellt werden. Prinzipiell blieben die Spiegel dabei zunächst relativ konstant. Ebenfalls wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp und den Transgenen festgestellt. Mit beginnender Seneszenz der Blätter wurde im Wildtyp ein 6-facher Anstieg der freien Säure auf etwa 2300 ng g<sup>-1</sup> FG beobachtet. Interessanterweise stiegen die Spiegel bei den RNAi-Linien und der *dde2-2* Mutante nur um das 3-fache an, also lediglich auf etwa 60% (1400 ng g<sup>-1</sup> FG) des Wildtyplevels.

## 2.3.1.7 Untersuchung der Genexpression

Als molekulare Indikatoren für die Seneszenz-Progression können die mRNA-Level von SAGs herangezogen werden. Durch frühere Untersuchungen ist bekannt, dass die Cysteinprotease SAG12 (At5g45890), weitgehend nur durch entwicklungsspezifische Seneszenz aktiviert wird (Lohman et al., 1994; Weaver et al., 1998; Noh and Amasino, 1999). Die synthetisierten cDNAs wurden daraufhin mittels qRT-PCR auf die Menge der *SAG12*-Transkripte hin untersucht. Wie in Abbildung 22 A dargestellt wird, trat die *SAG12*-

Expression erst mit beginnender Seneszenz nach 10 Wochen auf. Bei früheren Zeitpunkten konnte keine Expression festgestellt werden.



Abbildung 22: Relative SAG12- (A) und CLH1-Expression (B) bezogen auf Actin2/8 der Blätter 9-14 beim Wildtyp sowie in den Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und dde2-2 zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n $\geq$ 4].

Zwischen dem Wildyp, den LOX2 RNAi-Linien und der *dde2-2* Mutante konnte nach 10 Wochen kein Unterschied in der *SAG12*-Expression festgestellt werden.

Als Beispiel für ein Gen, dass entwicklungsbedingt durch die basalen Jasmonat-Konzentrationen reguliert wird, wurden die cDNAs auf die relative Expression der Chlorophyllase1 (*CLH1*, At1g19640) hin untersucht (Abbildung 22 B). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Genexpression im Wildtyp mit normalen JA/OPDA-Konzentrationen in jungen Blättern am höchsten war. In den LOX2i-Linien mit verminderter Jasmonat-Produktion betrug die relative Expression von *CLH1* nur etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Verhältnis setzte sich auch in der weiteren Blattentwicklung (8-10 Wochen) fort. Ich der *dde2-2* Mutante konnte nur eine sehr geringe Expression gemessen werden. Diese lag bei 6 Wochen bei etwa 10% im Vergleich zum Wildtyp. In den folgenden Wochen sank diese Aktivität fast bis zur Nachweisgrenze ab.

## 2.3.2 Charakterisierung der dunkelinduzierten Seneszenz (DIS)

Wie die oben gemachten Beobachtungen zeigen, hat unter natürlichen Anzuchtbedingungen die im Wildtyp festgestelle Akkumulation von freien Jasmonaten keinen Einfluss auf den seneszenzspezifischen Chlorophyllabbau oder den Umbau plastidärer Galaktolipide.

Eine Möglichkeit seneszenzartige Symptome synchronisiert zu erzeugen und damit das mögliche Auftreten und die Funktion erhöhter Jasmonat-Spiegel zu studieren, ist die Inkubation abgetrennter Blätter im Dunkeln (Weaver and Amasino, 2001; van der Graaff et al., 2006). Es wurden sowohl der Wildtyp als auch die *LOX2* RNAi-Linien untersucht. Um

mögliche Effekte der freien Jasmonate von denen anderer 13-LOX-Produkte unterscheiden zu können, wurde ebenfalls die *dde2-2* Mutante in die Experimente mit einbezogen. Dazu wurden nach etwa 6-7 Wochen die ausgewachsenen Rosettenblätter der Pflanzen geerntet und für die Bestimmung der Ausgangswerte entweder sofort schockgefroren oder in Petrischalen mit feuchtem Papiergewebe für mehrere Tage in völliger Dunkelheit inkubiert. Die Ernte erfolgte nach 3 bzw. 7 Tagen. Dazu wurden pro Zeitpunkt und Linie mindestens 3-4 biologische Replikate aus je 3-5 Pflanzen bestehend hergestellt. Dieses Pflanzenmaterial wurde dann per UPLC-MS/MS auf freie Säuren (u. a. Jasmonate) und membrangebundene Oxylipine hin untersucht. Als Indikatoren für die eintretende Seneszenz wurden der Gehalt an Chlorophyll, an plastidären Membranlipiden (Galaktolipiden) bestimmt, sowie mittels qRT-PCR die Expression bestimmter Markergene untersucht.

#### 2.3.2.1 Untersuchung der LOX2 Genexpression

Zur Überprüfung der *LOX2*-Genexpression während der Dunkelinkubation wurden aus dem Pflanzenmaterial die Gesamt-RNAs isoliert. Die synthetisierten cDNAs wurden mit Hilfe der qRT-PCR auf *LOX2*-Transkripte hin untersucht. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, zeigte sich im Wildtyp bereits nach 3 Tagen eine drastische Reduktion um bis zu 80 %. Nach 7 Tagen konnte keine weitere Veränderung mehr festgestellt werden.



Abbildung 23: Relative *LOX2*-Expression bezogen auf Actin2/8 in adulten Blättern beim Wildtyp sowie in den Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 und 7 Tagen Dunkelinkubation. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten [ $n \ge 4$ ].

Die *LOX2* RNAi-Linien zeigten bereits zu Beginn des Experimentes eine um etwa 80 % verminderte Expression gegenüber dem Wildtyp, entsprechend den Ergebnissen aus anderen Experimenten. Durch die folgende Inkubation wurde in den Blättern der RNAi-Linien keine *LOX2*-Expression mehr detektiert. Interessanterweise konnte, wie auch hier

dargestellt, in verschiedenen Versuchen in der *dde2-2* Mutante eine konstitutiv verringerte *LOX2* mRNA-Expression festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp wies die Mutante etwa 50% der Transkriptmenge auf. Wie in den RNAi-Linien, führte die Inkubation nach 3 bzw. 7 Tagen ebenfalls zur vollständigen Stagnation der mRNA-Akkumulation.

## 2.3.2.2 Analyse der Jasmonate

Durch die Untersuchung der Genexpression haben sich während der Dunkelinkubation deutliche Unterschiede zwischen RNAi-Linien und Wildtyp gezeigt. Um zu prüfen, ob sich ein ähnliches Verhalten in den Konzentrationen freier Jasmonate wie unter natürlichen Bedingungen erkennen lässt, wurden die freien Säuren aus dem Pflanzenmaterial von Wildtyp und transgenen Linien extrahiert. Anschließend wurden die Substanzen chromatografisch getrennt und mittels MS/MS quantifiziert.



Abbildung 24: JA- und OPDA-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps und der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 bzw. 7 Tagen in ständiger Dunkelheit. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten [n=4-6].

Die Ergebnisse aus den Jasmonat-Analysen ergaben, dass in den untersuchten Wildtypblättern während der Dunkelinkubation größere Mengen an Jasmonsäure und OPDA akkumulieren (Abbildung 24). In den Kontrollblättern zu Beginn der Experimente konnten basale Spiegel von 5-10 ng g<sup>-1</sup> FG Jasmonsäure bzw. OPDA detektiert werden. Mit Zunahme der ersten Seneszenz-Symptome nach 3 Tagen erhöhten sich besonders die JA-Konzentrationen, wohingegen die Menge an gebildeter OPDA kaum zunahm. Nach 7 Tagen konnten JA-Konzentrationen von bis zu 4000 ng g<sup>-1</sup> FG gemessen werden; die Werte für OPDA erreichten ein Niveau von etwa 500 ng g<sup>-1</sup> FG. Im Vergleich dazu wurden in den *LOX2* RNAi-Linien keine erhöhten Jasmonat-Level festgestellt. Die Blätter dieser Pflanzen zeigten durchgehend niedrige Spiegel, die etwa den Kontrollwerten des Wildtyps entsprachen. Die Jasmonat-defiziente Mutante *dde2-2* wurde nicht abgebildet, da hier erwartungsgemäß keine Jasmonate detektiert werden konnten.

#### 2.3.2.3 Analyse der Galaktolipid-veresterten Oxylipine (Arabidopside)

Nachdem die Dunkelinkubation zumindest auf Oxylipin-Ebene eine Art Stress darstellt, war es interessant, ob nach dem gezeigten starken Jasmonatanstieg auch eine Akkumulation der gebundenen Oxylipine stattfand. Wie bereits im Kapitel 2.3.1 wurden auch nach der Dunkelinkubation Lipidextrakte aus dem Pflanzenmaterial hergestellt und die enthaltenen Arabidopside durch UPLC-MS/MS getrennt und quantifiziert.



Abbildung 25: Arabidopsid-Konzentrationen im Wildtyp [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] während der Dunkelinkubation zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 und 7 Tagen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten [n=4]

In Abbildung 25 sind die Arabidopsid-Spiegel im Wildtyp nach Dunkelinkubation gezeigt. Dabei lies sich ein ähnliches Muster wie in der natürlichen Entwicklung (Abbildung 18) feststellen. Während in den Kontrollpflanzen (6 Wochen alt) zu Beginn des Experimentes lediglich basale Spiegel von maximal 1  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG (Arabidopsid A) und weniger zu finden waren, konnte nach 3 Tagen ein leichter Anstieg festgestellt werden. Insbesondere stiegen die Spiegel von Arabidopsid A und D bis um das 4-fache an. Die anderen Spezies erreichten lediglich Werte von maximal 1  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG. Nach 7 Tagen sanken die Konzentrationen in etwa wieder auf die Ausgangswerte nach 6 Wochen (etwa 1  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG für Arabidopsid A, E bzw. 0,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG für Arabidopsid B, C, D und G).

In der Tabelle 4 sind die Arabidopside im Vergleich zu den *LOX2* RNAi-Pflanzen und zur *dde2-2* Mutante dargestellt (**hier in ng g<sup>-1</sup> FG**). Es zeigte sich, dass in den LOX2i Linien wie unter natürlichen Bedingungen nur geringe Mengen an Arabidopsiden gebildet werden können. So wurden nach 3 bzw. 7 Tagen nur geringfügige Spuren im Bereich der Nachweisgrenze quantifiziert. Arabidopsidspezies, die bereits im Wildtypen kaum detektiert werden konnten (Arabidopsid C und G), konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Bei der JA/OPDA-defizienten *dde2-2* Mutante wurden ebenfalls nur geringe Mengen detektiert. In

56

		WT			LOX2i-2	
[ng g⁻¹ FG]	0 Tage	3 Tage	7 Tage	0 Tage	3 Tage	7 Tage
Arabidopsid A	745 ± 730	4063 ± 1832	845 ± 485	$2,4 \pm 0,5$	15 ± 18	nd
Arabidopsid B	88 ± 51	756 ± 69	392 ± 261	15 ± 4,8	$3,3 \pm 4,6$	nd
Arabidopsid C	nd	469 ± 367	158 ± 62	nd	nd	nd
Arabidopsid D	154 ± 97	2284 ± 1137	341 ± 87	13,5 ± 5,5	1,4 ± 2,8	nd
Arabidopsid E	20 ± 8	547 ± 211	1340 ± 1125	nd	$3,9 \pm 7,8$	nd
Arabidopsid G	13 ± 7	298 ± 106	379 ± 340	nd	nd	nd
		dde2			LOX2i-9	
[ng g⁻¹ FG]	0 Tage	3 Tage	7 Tage	0 Tage	3 Tage	7 Tage
Arabidopsid A	8,8 ± 7,5	319 ± 336	35,3 ± 70,5	3,3 ± 1,5	129 ± 84	4,3 ± 8,7
Arabidopsid B	nd	77,7 ± 132,9	12,1 ± 24,1	5,3 ± 9,2	42 ± 44	$2,9 \pm 5,9$
Arabidopsid C	nd	2,7 ± 3,3	nd	nd	nd	nd
Arabidopsid D	nd	80,7 ± 126	9,7 ± 18,2	3,3 ± 5,7	102 ± 79	3,9 ± 7,8
Arabidonsid E	ام مر	nd	nd	nd	75 + 120	nd
	na	nu	na	nu	1,5 ± 12,5	nu

Einzelproben konnten geringe Mengen aufgefunden werden, wobei die Möglichkeit einer Verschleppung durch den Messprozess nicht auszuschließen ist.

Tabelle 4: Arabidopsid-Konzentrationen [in ng  $g^{-1}$  FG ± SD] während der Dunkelinkubation in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 und 7 Tagen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Wildtypwerte entsprechen dabei denen in Abbildung 25 [n=4; nd=nicht detektierbar]

## 2.3.2.4 Beschreibung der Seneszenz-Symptome

Wie in Abbildung 26 A zu sehen ist, wurden für die Experimente nur intakte, ausgewachsene und optisch nicht-seneszente Blätter etwa 6- 7 Wochen alter Pflanzen verwendet. Nach 3 Tagen waren die Blätter noch weitgehend grün, zeigten aber teils erste chlorosenartige Gelbfärbungen (B) aber keine Nekrosen oder Läsionen.



Abbildung 26: Repräsentativer Vergleich von *Arabidopsis*- Wildtyp Columbia 0 Blättern im unbehandelten Zustand (A), nach 3 Tagen (B) und 7 Tagen (C) Dunkelinkubation. Es sind jeweils die selben Blätter abgebildet. Die transgenen Linien zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp; daher wurde auf eine weitere Darstellung verzichtet.

Nach 7 Tagen waren die Blätter zumeist gleichmäßig ausgeblichen (C) aber strukturell intakt. Die Blätter von Wildtyppflanzen und den getesteten Mutanten zeigten makroskopisch gleichartige Symptome.

# 2.3.2.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Es sollte nun durch Bestimmung des Chlorophyllgehaltes genauer bestimmt werden, ob die stark ansteigenden JA/OPDA-Konzentrationen im Wildtyp im Vergleich zu den transgenen Linien einen seneszenzfördernden Effekt im DIS-System aufweisen. Die Abbildung 27 zeigt repräsentative Ergebnisse, die sich in verschiedenen Experimenten beobachten ließen. Die Blätter wiesen zu Beginn des Experimentes die üblichen Chlorophyllmengen von etwa 1000  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG auf. Innerhalb von 3 Tagen sank der Gehalt auf etwa 50-60 % der Ausgangswerte; nach 7 Tagen in Dunkelheit verblieben nur noch etwa 10 % des Chlorophylls in den Blättern.





Anhand der Chlorophyllwerte konnten in diesem Assay keine Unterschiede zwischen den LOX2 RNAi-Linien mit verminderten Jasmonat-Spiegeln, und dem Wildtyp mit starker Jasmonat-Akkumulation festgestellt werden. Ebenso zeigte die Jasmonat-defiziente *dde2-2* Mutante kein verändertes Verhalten gegenüber dem Wildtyp und den RNAi-Pflanzen.

# 2.3.2.6 Analyse der plastidären Galaktolipide

Es konnte im Kapitel 2.3.1 gezeigt werden, dass die Produktion von zusätzlicher JA und OPDA mit einem Umbau der plastidären Galaktolipide während der beginnenden natürlichen Seneszenz einhergeht. Um zu prüfen, ob unter den Bedingungen der beschleunigten induzierten Seneszenz generell ein verstärkter Umsatz oder Abbau von Membranlipiden stattfindet oder die verminderten Jasmonat-Konzentrationen in den Mutanten möglicherweise Einfluss auf den Abbau der Galaktolipide und so auf den Verlauf der Seneszenz haben, wurden aus dem Pflanzenmaterial Lipid-Rohextrakte hergestellt. Diese wurden per UPLC-MS/MS quantifiziert.



Abbildung 28: Lipid-Muster der am häufigsten in *Arabidopsis* vorkommende Galaktolipide [in  $\mu g g^{-1} FG$ ] in den Blättern des Wildtyps (A) sowie der Mutante *dde2-2* (B) und der Linien 35S::LOX2i-2 (C) und -9 (D). Die Proben wurden zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 und 7 Tagen Dunkelinkubation geerntet. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=4]

Die Quantifizierung der Membranlipide ergab, wie in Abbildung 28 dargestellt, einen starken Einfluss der Behandlung auf die Konstitution der Chloroplastenmembranen. Im Gegensatz zur beginnenden natürlichen Seneszenz konnte in den Blättern nach 7 Tagen ein drastischer Abbau bei den untersuchten Lipidspezies festgestellt werden. Interessanterweise war nach Beginn der Inkubation bei den Spezies MGDG-18:3-16:3, DGDG-18:3-18:3 und DGDG-18:3-18:2 zunächst tendenziell ein Anstieg bzw. eine Stagnation zu beobachten. Bei MGDG-18:3-18:3 begann der Abbau schon frühzeitig nach 3 Tagen. Nach 7 Tagen konnte bei MGDG-18:3-18:3 ein Abbau von bis zu 75 % beobachtet werden. Die anderen dargestellten Lipidspezies zeigten einen Rückgang von etwa 40- 50 % im Vergleich zum Kontrollwert. Korrespondierend zu den Chlorphylldaten konnten zwischen dem Wildtyp (A), den LOX2 RNAi Pflanzen (C und D) und der *dde2-2* Mutante (B) keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf ein verändertes Lipidmuster oder einer Wirkung der Jasmonate auf den Abbauvorgang beobachtet werden.

## 2.3.2.7 Analyse der freien α-Linolensäure

Im vorherigen Abschnitt konnte in den *LOX2* RNAi-Pflanzen kein Effekt verminderter Lipoxygenierung auf den Umsatz bzw. den Abbau von plastidären Galaktolipiden durch beschleunigte Seneszenz nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass bei Seneszenz-Prozessen eine erhöhte Hydrolyse von Membranlipiden stattfindet (Thompson et al., 1997; Yang and Ohlrogge, 2009). Um zu testen, ob es durch verminderte Lipoxygenierung zu einer Akkumulation des LOX2-Substrates  $\alpha$ -LeA anstelle der Bildung von Oxylipinen kommt, wurden die freien Säuren aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und anschließend per UPLC-MS/MS quantifiziert.



Abbildung 29: Akkumulation freier  $\alpha$ -Linolensäure [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 sowie der Mutante *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0Tage) und nach 3 bzw. 7 Tagen Dunkelinkubation. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=4]

Abbildung 29 stellt die kombinierten Ergebnisse der  $\alpha$ -LeA-Messungen aus zwei unabhängigen Experimenten dar. Durch die Dunkelinkubation der Blätter kam es beim Wildtyp zu keinem Anstieg von freier  $\alpha$ -LeA. Die Werte sanken tendenziell von etwa 1000 auf 800 ng g<sup>-1</sup> FG ab. Wie es schon für die natürliche Seneszenz-Entwicklung gezeigt wurde, unterschieden sich die Gehalte an freier Säure unter basalen Bedingungen nicht zwischen dem Wildtyp, den LOX2i Linien und der *dde2-2* Mutante (0Tage). Bedingt durch die Inkubation, konnten nach 3 bzw. 7 Tagen in der RNAi-Linie 2 erhöhte Werte von bis zu 5000 ng g<sup>-1</sup> FG gemessen werden. In der RNAi-Linie 9 wurden etwa 3800 bzw. 2500 ng g<sup>-1</sup> FG  $\alpha$ -LeA gemessen. Während der Behandlung konnte in der *AOS* Mutante *dde2-2*, die zwar Oktadekatriensäuren oxygenieren, aber nicht zu Jasmonaten weitermetabolisieren kann,

keine erhöhten Spiegel beobachtet. Es zeigten sich bei diesen Pflanzen ähnliche Werte wie in den Wildtypblättern.

# 2.3.2.8 Untersuchung der Oxylipinakkumulation in Kombination von Dunkelinkubation und Verwundung

Bisher wurde festgestellt, dass es während der Seneszenz-Induktion zur starken Akkumulation von freien Jasmonaten im Zusammenhang mit dem Abbau von Membranlipiden kommt. Im Gegensatz zu anderen stressinduzierten Prozessen z. B. nach Verwundung, korrelierte die Akkumulation von Arabidopsiden nicht mit der von freien Oxylipinen. Es wurde nun untersucht, inwieweit die Konstitution der Chloroplastenmembranen während der Dunkelinkubation Einfluss auf die weitere Freisetzung von Oxylipinen hat und ob es im Stadium der Seneszenz noch zu einer zusätzlichen Freisetzung von Jasmonaten aus den Membranen kommen kann. Zu diesem Zweck wurden zu Beginn des Experimentes an einem Teil der Versuchspflanzen die Blätter sofort geerntet, einem anderen Teil wurden mit der Pinzette Verwundungen an der Blattspreite zugefügt und diese Blätter nach einer Stunde geerntet. Die Blätter weiterer Pflanzen wurden wie bereits beschrieben dunkelinkubiert. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurden die Hälfte der inkubierten Blätter sofort geerntet, die andere Hälfte wie zuvor verwundet und nach einer Stunde geerntet.



Abbildung 30: JA- (A) und OPDA-Konzentrationen (B) [in ng g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 bzw. 7 Tagen in ständiger Dunkelheit (schwarze Balken). Die dunkelinkubierten Blätter wurden nach der jeweiligen Inkubationsdauer zusätzlich verwundet und nach einer Stunde geerntet (weiße Balken) [n=3].

Wie in Abbildung 30 dargestellt ist, konnte hier die bereits festgestellte starke Freisetzung von JA (A) und OPDA (B) nach Dunkelinkubation erneut gezeigt werden. Dabei wurde nach 3 Tagen ein moderater Anstieg auf 350 bzw. 130 ng g<sup>-1</sup> FG festgestellt. Nach weiteren 4 Tagen stiegen die Werte für JA auf bis zu 6000 ng g<sup>-1</sup> FG an, die Werte für OPDA lagen nach 7 Tagen bei etwa 900 ng g<sup>-1</sup> FG. Nachdem die Kontrollblätter (0 Tage) bzw. die bereits 3 Tage dunkelinkubierten Blätter zusätzlich verwundet wurden, zeigte sich ein Dunkelheit-unabhängiger deutlicher Anstieg freier Jasmonate. So konnten nach 0 bzw. 3 Tagen

ähnliche Konzentrationen für JA (4000 ng g<sup>-1</sup> FG) und für OPDA (2200 ng g<sup>-1</sup> FG) gemessen werden. Im Vergleich zu den jeweiligen nur verdunkelten Blättern waren die Blätter durch den Stimulus in der Lage, die 12- (JA) bzw. 17-fache (OPDA) Menge zusätzlich zu erzeugen. Mit fortschreitender Seneszenz und damit Abbau der Membranlipide konnte nach 7 Tagen kein deutlicher Unterschied mehr zwischen den verwundeten und unverwundeten Blättern festgestellt werden. Wie bereits in anderen Publikationen beschrieben wurde, ist nach Verwundung eine Arabidopsid-Akkumulation zu beobachten (Buseman et al., 2006). In Abbildung 31 ist das Vorkommen von Arabidopsiden während der Dunkelinkubation dargestellt. Die Werte für unverwundeten Blätter (A) zeigten dabei ein Verhalten, wie es schon zuvor nach Dunkelinkubation festgestellt wurde (vgl. Abbildung 25).



Abbildung 31: Arabidopsid-Konzentratiionen [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Wildtypblättern während der Dunkelinkubation unverwundet (A) und nach zusätzlicher Verwundung (B) zu Beginn des Experimentes (0 Tage) sowie nach 3 und 7 Tagen.[n=3]

In den Blättern ohne Verwundung (A) zeigten sich dabei nach 3 bzw. 7 Tagen nur geringfügige Variationen der Arabidopsidspiegel. Insgesamt blieben dabei die Level der einzelnen Spezies bei unter 5  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG. Nach zusätzlichem Verwundungsstimulus (B) akkumulierten in den Kontrollblättern (0 Tage) die Arabidopsid-Spezies A und D auf bis zu 60  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG. Für Arabidopsid B und E konnten Konzentrationen von etwa 25  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG gemessen werden; die weiteren Spezies lagen bei 10  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG und darunter. Nach 3 Tagen Inkubation und Verwundung konnte eine deutliche Reduktion in der Akkumulation beobachtet werden. Trotz ähnlicher Jasmonat-Produktion konnte nur noch ein Anstieg der Arabidopside von  $\leq$  50 % gegenüber des Kontrollzeitpunktes festgestellt werden. Lediglich die Arabidopside C und E wiesen keine veränderte Akkumulation auf. Nach 7 Tagen trat während der höchsten Jasmonat-Freisetzung trotz Verwundung keine weitere Produktion veresterter Oxylipine mehr ein.

#### 2.3.3 Charakterisierung der osmotisch-induzierten Seneszenz

In den bisherigen Systemen wurde trotz deutlicher Unterschiede in der Jasmonat-Produktion, zwischen den einzelnen Linien kein Einfluss auf die Progression des Seneszenz-Prozesses

festgestellt. Es ist bekannt, dass die Behandlung von Pflanzenteilen mit Sorbitol zum Anstieg endogener Jasmonate und ebenfalls zu Seneszenz-Symptomen führt (Lehmann et al., 1995). Man spricht hier von sogenannter chemisch- oder osmotisch-induzierter Seneszenz oder auch von "Jasmonat-induziertem, Seneszenz-assoziiertem Zelltod". Zur Charakterisierung dieser Vorgänge im Hinblick auf die Funktion von LOX2, wurden adulte Blätter etwa 6 Wochen alter Pflanzen auf 500 mM D-Sorbitol-Lösung sowie auf H<sub>2</sub>O als Kontrolle flottiert und nach 24 bzw. 48 Stunden geerntet. Anschliessend wurde das Pflanzenmaterial auf das Vorkommen von Oxylipinen sowie auf die bereits beschriebenen Seneszenz-Symptome hin untersucht. Im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen den durch Jasmonate verursachten Effekten und denen, die möglicherweise durch andere 13-LOX Produkte entstehen, wurde die JA-defiziente *dde2-2* Mutante parallel untersucht.

#### 2.3.3.1 Untersuchung der LOX2 Genexpression

Zu Beginn der Analysen wurde die *LOX2* mRNA-Expression im Wildtyp und in den transgenen Linien nach Sorbitolbehandlung untersucht (Abbildung 32). Es zeigte sich im Gegensatz zu anderen Seneszenz-Prozessen, dass die Expression im Wildtyp nach 24-stündiger Behandlung stark induziert wird.



Abbildung 32: Relative *LOX2*-Expression bezogen auf Actin2/8 der Blätter beim Wildtyp sowie den Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) sowie nach 24 und 48 Stunden Inkubation in 500 mM Sorbitollösung. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten.[n≥4-6]

Nach 24 Stunden konnte ein 4-facher Anstieg festgestellt werden, der nach 48 Stunden wieder um etwa 25 % absank. Im Gegensatz dazu wurde, korrespondierend zu den bisherigen Experimenten in den *LOX2* RNAi-Linien, eine basale Suppression um etwa 80 % im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Durch den osmotischen Stimulus konnte in den Blättern der RNAi-Linien auch keine weitere Induktion der Expression beobachtet werden.

Wie schon unter Kapitel 2.2.3 festgestellt wurde, verfügte die AOS-Mutante *dde2-2* ebenfalls über eine insgesamt verminderte *LOX2*-Expression. Nach 24 bzw. 48 Stunden Behandlung trat in den *dde2-2* Blättern lediglich eine etwa 2-fache *LOX2*-Induktion ein. Im Vergleich zum Wildtyp betrugen diese gemessenen Spiegel nur etwa 10-20 %.

## 2.3.3.2 Analyse der Jasmonate

In den Sorbitol- bzw. Wasser-behandelten Proben wurden nun die JA- und OPDA-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden die freien Säuren aus dem gefriergetrocknenten Pflanzenmaterial von Wildtyp und den transgenen Linien extrahiert. Anschließend wurden die Substanzen mittels UPLC -MS/MS quantifiziert.



Abbildung 33: JA- und OPDA-Konzentrationen [in ng  $g^{-1}$  FG] in den Blättern des Wildtyps und der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) sowie nach 24 und 48 Stunden in 500 mM Sorbitollösung (A, C) bzw. H<sub>2</sub>O (B, D). Um vergleichbare Konzentrationen zu erhalten, wurde zur Umrechnung von Trocken- in Frischgewicht experimentell ein Umrechnungsfaktor von 0,06 bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten [n=3-6]

Durch das Flottieren auf Sorbitol konnte im Wildtyp eine deutliche Induktion der Jasmonat-Biosynthese festgestellt werden (Abbildung 33 A, C). So erhöhte sich der JA-Spiegel nach 24 Stunden um etwa das 10-fache auf etwa 250 ng g<sup>-1</sup> FG (A); Bei OPDA fand ebenso eine Erhöhung um das 10-fache auf etwa 500 ng g<sup>-1</sup> FG statt (C). Diese Level blieben nach 48 Stunden relativ konstant. In den Wasserkontrollen konnte keine JA-Induktion festgestellt werden (Abbildung 33 B). Lediglich ein leichter Anstieg der OPDA-Level von 50 auf etwa 100 ng g<sup>-1</sup> FG nach 24 bzw. 48 Stunden konnte beobachtet werden (D). Die *LOX2* RNAi-Linien zeigten während der Behandlungen nur marginal veränderte Jasmonat-Spiegel. So blieben die Jasmonsäure-Konzentrationen im Wesentlichen im basalen Bereich  $\leq$  10 ng g<sup>-1</sup> FG. Dies lag sogar unterhalb der Kontrollwerte für den Wildtyp. Für OPDA konnte eine leichte Induktion der Konzentrationen in den transgenen Linien festgestellt werden. So stiegen die Level sowohl nach Sorbitol- (C) als auch bei H<sub>2</sub>O-Behandlung (D) von etwa 10 ng g<sup>-1</sup> FG um das 5- bis 8-fache an. Insgesamt wurde bei der H<sub>2</sub>O-Behandlung sowohl im Wildtyp als auch bei den RNAi-Linien nur eine leichte Induktion der OPDA-Spiegel beobachtet. Die Jasmonat-defiziente Mutante *dde2-2* wurde nicht abgebildet, da hier keine Jasmonate detektiert wurden.

#### 2.3.3.3 Analyse der Galaktolipid-veresterter Oxylipine (Arabidopside)

Es ist bekannt, dass als Stressantwort in Arabidopsis, z.B. nach Verwundung, neben einer Freisetzung freier Jasmonate eine Akkumulation von Galaktolipid-veresterten Oxylipinen stattfindet (siehe Abbildung 31). Wie bereits in den vorhergehenden Experimenten wurden auch nach der Sorbitol- bzw. H<sub>2</sub>O- Behandlung aus dem gefriergetrockneten Material Lipidextrakte hergestellt und die enthaltenen Arabidopside durch UPLC-MS/MS getrennt und quantifiziert.



Abbildung 34: Arabidopsid-Konzentrationen im Wildtyp während des Flottierens auf 500 mM Sorbitol (A) bzw.  $H_2O$  (B) [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) sowie nach 24 und 48 Stunden. Um vergleichbare Konzentrationen zu erhalten, wurde zur Umrechnung von Trocken- in Frischgewicht experimentell ein Umrechnungsfaktor von 0,06 bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Milttelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten [n=3-6].

Wie die Abbildung 34 A darstellt, fand nach 24 Stunden Behandlung mit 500 mM Sorbitollösung im Wildtyp eine deutliche Induktion der Arabidopsid-Akkumulation statt. Die Kontrollpflanzen zu Beginn des Experimentes enthielten deutlich weniger als  $1\mu g g^{-1} FG$  je Lipid-Spezies. Nach 24 Stunden erhöhten sich vor allem die Gehalte an Arabidopsid E und G. Bei den Arabidopsiden A, B und D trat eine Verdrei- bis Vervierfachung der Werte bis auf

Werte von 8  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG (Arabidopsid A) ein. Besonders stark stiegen Arabidopsid E auf 26  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG und Arabidopsid G auf 12  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG an. Bei Arabidopsid C konnte kein relevanter Anstieg beobachtet werden. Nach 48 Stunden trat keine zusätzliche Akkumulation auf, sondern die Konzentrationen sanken bei allen Spezies auf Mengen von unter 3  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG.

		WT			LOX2i-2	
[ng g <sup>-1</sup> FG]	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Arabidopsid A	3316 ± 5214	8154 ± 3,74	2704 ± 1204	29 ± 39	8 ± 13,9	nd
Arabidopsid B	434 ± 527	3965 ± 2130	924 ± 359	10 ± 13	12 ± 20	nd
Arabidopsid C	69 ± 103	591 ± 135	527 ± 384	nd	nd	nd
Arabidopsid D	554 ± 725	4633 ± 1325	2527 ± 1145	6,1 ± 10,6	14 ± 23	nd
Arabidopsid E	346 ± 223	26942 ± 12440	3236± 2365	nd	4,6 ± 7,9	nd
Arabidopsid G	87 ± 50	11835 ± 5486	1537 ± 1309	nd	2,2 ± 3,8	nd
		dde2			LOX2i-9	
[ng g <sup>-1</sup> FG]	0 h	dde2 24 h	48 h	0 h	LOX2i-9 24 h	48 h
[ng g <sup>-1</sup> FG] Arabidopsid A	0 h nd	dde2 24 h nd	48 h nd	0 h nd	LOX2i-9 24 h nd	48 h nd
[ng g <sup>-1</sup> FG] Arabidopsid A Arabidopsid B	0 h nd 1,3 ± 2,3	dde2 24 h nd nd	48 h nd nd	0 h nd 1,3 ± 2,3	LOX2i-9 24 h nd nd	48 h nd nd
[ng g <sup>-1</sup> FG] Arabidopsid A Arabidopsid B Arabidopsid C	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd	dde2 24 h nd nd nd	48 h nd nd nd	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd	LOX2i-9 24 h nd nd nd	48 h nd nd nd
[ng g <sup>-1</sup> FG] Arabidopsid A Arabidopsid B Arabidopsid C Arabidopsid D	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd nd	dde2 24 h nd nd nd nd	48 h nd nd nd nd	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd nd	LOX2i-9 24 h nd nd nd nd	48 h nd nd nd nd
[ng g <sup>-1</sup> FG] Arabidopsid A Arabidopsid B Arabidopsid C Arabidopsid D Arabidopsid E	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd nd nd	dde2 24 h nd nd nd nd nd	48 h nd nd nd nd nd	0 h nd 1,3 ± 2,3 nd nd nd	LOX2i-9 24 h nd nd nd nd nd	48 h nd nd nd nd nd

Tabelle 5: Arabidopsid-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG  $\pm$  SD] nach Flottierung auf 500 mM Sorbitol der Blätter des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) sowie nach 3 und 7 Tagen. Die Wildtypwerte entsprechen denen in Abbildung 34. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten [n=3-6; nd=nicht detektierbar]

	WT			LOX2i-2		
[ng g⁻¹ FG]	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Arabidopsid A	3316 ± 5214	7708 ± 3841	9428 ± 1918	29 ± 39	108 ± 185	2 ± 0,4
Arabidopsid B	434 ± 527	3666 ± 1066	5141 ± 1192	10 ± 13	49 ± 85	nd
Arabidopsid C	69 ± 103	130 ± 48	190 ± 14	nd	nd	nd
Arabidopsid D	554 ± 725	2075 ± 567	3630 ± 620	6,1 ± 10,6	23 ± 40	nd
Arabidopsid E	346 ± 223	236 ± 82	371 ± 221	nd	$3,2 \pm 5,5$	$0,4 \pm 0,6$
Arabidopsid G	87 ± 50	109 ± 28	89 ± 34	nd	0,9 ± 1,6	nd
		dde2			LOX2i-9	
[ng g <sup>-1</sup> FG]	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Arabidopsid A	nd	2,8 ± 0,5	3,6 ± 2,2	nd	$2,6 \pm 0,5$	2 ± 0,5
Arabidopsid B	1,3 ± 2,3	0,8 ± 1,4	nd	1,3 ± 2,3	0,8 ± 1,4	nd
Arabidopsid C	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arabidopsid D	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arabidopsid E	nd	nd	2 ± 2,9	nd	nd	nd
Arabidopsid G	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabelle 6: Arabidopsid-Konzentrationen [in ng g<sup>-1</sup> FG  $\pm$  SD] nach Flottierung auf H<sub>2</sub>O der Blätter des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) sowie nach 3 und 7 Tagen. Die Wildtypwerte entsprechen denen in Abbildung 34. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten [n=3-6; nd=nicht detektierbar]

Durch die gleiche Inkubation mit  $H_2O$  (Abbildung 34 B) konnte keine starke Akkumulation der Spezies E und G erreicht werden. Hier trat nach 24 bzw. 48 Stunden aber dennoch eine geringe Zunahme der Arabidopside A, B und D auf 8 bzw. 4 µg g<sup>-1</sup> FG ein. In den Tabellen 5 und 6 sind die Wildtypwerte im Vergleich zu den *LOX2* RNAi- Linien und der *dde2-2* Mutante nach Sorbitol- bzw. nach  $H_2O$ - Behandlung dargestellt. Es zeigte sich in den Experimenten, dass trotz osmotischer Induktion keine relevante Arabidopsid-Akkumulation in den transgenen Pflanzen stattgefunden hat. Die Quantifizierung der Arabidopside in den Mutanten erfolgte dabei bereits im Bereich des Detektionslimits.

# 2.3.3.4 Beschreibung der Seneszenz-Symptome

Durch das Flottieren der *Arabidopsis*-Blätter auf 500 mM Sorbitollösung konnten über 48 Stunden seneszenzartige Symptome induziert werden. Aufgrund der hyperosmotischen Lösung verloren die Blätter nach 24 Stunden Wasser, so dass die Festigkeit des Gewebens deutlich nachlies. Makroskopisch wiesen die eingelegten Blätter jedoch noch keine sichtbaren Farbveränderungen oder Läsionen auf. Aus diesem Grund konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine erkennbaren Unterschiede zwischen Wildtyp und den Mutanten festgestellt werden. Nach 48 Stunden wurde in den Wildtypblättern ein deutliches Ausbleichen beobachtet; die *LOX2* RNAi-Linien zeigten sich hingegen noch deutlich grüner (Abbildung 35 C, D). Die Blattintegrität der transgenen Linien war zudem noch deutlich stabiler als beim Wildtyp. Diese Unterschiede konnten in weiteren Experimenten auch noch nach 72 Stunden festgestellt werden (nicht dargestellt). Ein ähnlicher Effekt, der teilweise noch deutlicher ausgeprägt war, konnte bei der JA/OPDA-defizienten *dde2-2* Mutante festgestellt werden (Abbildung 35 B). Die Blätter dieser Pflanzen waren nach 48 Stunden ebenfalls deutlich grüner und stabiler als die Wildtypblätter. In den Kontrollen mit H<sub>2</sub>O traten nach 48 Stunden weder in den Mutanten noch im Wildtyp sichtbare Veränderungen auf.



Abbildung 35: Repräsentativer Vergleich von Arabidopsis-Blättern, die 48 Stunden auf 500 mM Sorbitollösung flottiert wurden; Wildtyp (A), *dde2-2* (B); 35S::LOX2i-2 (C) und 35S::LOX2i-9 (D). Die Bilder wurden mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen.

# 2.3.3.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Um den makroskopischen Zustand der Blätter genauer zu bestimmen, wurde aus dem gefriergetrockneten Blattmaterial das Chlorophyll extrahiert. Wie in Abbildung 36 A zu sehen ist, kam es im Wildtyp durch die Einwirkung der Sorbitollösung zu einem raschen Abbau des Chlorophylls.



Abbildung 36: Chlorophyll a+b Konzentrationen [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) und nach 24 bzw. 48 Stunden in 500 mM Sorbitollösung (A) und als Kontrolle in H<sub>2</sub>O (B). Um vergleichbare Konzentrationen zu erhalten, wurde zur Umrechnung von Trocken- in Frischgewicht experimentell ein Umrechnungsfaktor von 0,06 bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Sternchen repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen LOX2i-Linien, *dde2-2* und dem Wildtyp (One-way ANOVA, \*P >0,002, n=6).

Nach 24 Stunden konnten im Wildtyp nur noch knapp 50 % des Ausgangswertes festgestellt werden, nach 48 Stunden sogar nur etwa 12 %. In mehreren Experimenten wurde dabei beobachtet, dass in den Mutanten mit verminderter Jasmonat-Biosynthese dieser Abbau verlangsamt stattfand. So trat bei den *LOX2* RNAi-Linien sowie bei der *dde2-2* Mutante ebenfalls ein Abbau ein. Wie in Abbildung 36 A zu sehen ist, fand jedoch bereits nach 24 Stunden eine leichte Verzögerung der Bleichung ein. Zum Zeitpunkt 48 Stunden konnte der Unterschied zum Wildtyp signifikant nachgewiesen werden. Hier enthielten die LOX2i- Blätter noch etwa 20 %, die *dde2-2*-Blätter noch etwa 25 % der ursprünglichen Chlorophyllmenge. Somit bestätigten diese Analysen den visuellen Eindruck, dass in diesen Blättern eine Verzögerung der Symptome stattfand. In Abbildung 36 B sind die Chlorophyllmengen in den Blättern der H<sub>2</sub>O-Behandlungen dargestellt. Im Gegensatz zur Sorbitolbehandlung war in allen Pflanzelinien nur eine geringe, gleichmäßige Tendenz zum Chlorophyllabbau zu erkennen.

#### 2.3.3.6 Analyse der plastidären Galaktolipide

Als weiterer Parameter für die Seneszenz-Progression wurden die Konzentrationen der Galaktolipide aus den Chloroplastenmembranen untersucht. Dazu wurden die Membranlipide extrahiert und per UPLC-MS/MS quantifiziert. Es konnte beobachtet werden, dass es während der Flottierung auf Sorbitollösung, ähnlich wie in der dunkelinduzierten Seneszenz, zu einem drastischen Abbau von Galaktolipiden kommt.



Abbildung 37: Lipid-Muster der am häufigsten in Arabidopsis vorkommende Galaktolipide [in  $\mu g g^{-1} FG$ ] in den Blättern des Wildtyps nach Sorbitolbehandlung (A) sowie nach H<sub>2</sub>O-Behandlung (B). Die Proben wurden jeweils zu Beginn des Experimentes (0 h) sowie nach 24 h und 48 h Inkubation auf 500 mM Sorbitollösung bzw. H<sub>2</sub>O geerntet [0 h, 24 h, n=3; 48 h, n=6]. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=4].



Abbildung 38: Lipid-Muster der am häufigsten in Arabidopsis vorkommende Galaktolipide [in  $\mu g g^{-1} FG$ ] in den Blättern des Wildtyps, der Linien 35S::LOX2i-2, -9 und *dde2-2* nach 48 Stunden Sorbitolbehandlung (A) sowie nach H<sub>2</sub>O-Behandlung (B). Um vergleichbare Konzentrationen zu erhalten, wurde zur Umrechnung von Trocken- in Frischgewicht experimentell ein Umrechnungsfaktor von 0,06 bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Sternchen repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen LOX2i-Linien bzw. *dde2-2* und dem Wildtyp (One-way ANOVA, \*P >0,002, n=6).

Es war festzustellen, dass nach Sorbitolbehandlung bereits nach 24 Stunden ein Abbau der MGDG-Spezies von etwa 50 % zum Basiswert stattfand (Abbildung 37 A). Bei den DGDG-Spezies erfolgte der Lipid-Umsatz langsamer, es konnte nach 24 Stunden lediglich eine Abnahme von 20 % gegenüber dem Ausgangswert festgestellt werden. Nach 48 Stunden fand bei den MGDG-Spezies keine weitere Abnahme mehr statt, hingegen konnte bei den DGDG noch ein weiterer Rückgang auf letztlich etwa 50 % des Ausgangswertes gezeigt werden. Bei der Kontrollbehandlung mit H<sub>2</sub>O wurde keine Verminderung der Galaktolipide beobachtet (Abbildung 37 B). Im Falle von MGDG-18:3-16:3 wurde sogar eine leichte Zunahme festgestellt.

Im direkten Vergleich der transgenen Linien mit dem Wildtyp konnte nach Sorbitolbehandlung deutlich ein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 38 A). In allen vier hier dargestellten Lipid-Spezies wurde nach 48 Stunden ein signifikant höherer Gehalt in den *LOX2* RNAi-Linien festgestellt. So zeigten sich bei den MGDG-Sezies etwa 30 %, bei den DGDG etwa 20 % höhere Werte. Obwohl die *dde2-2* Mutante die höchsten Chlorophyllwerte aufwies, konnte für die MGDG kein Unterschied zum Wildtyp bestimmt werden. Es trat dafür jedoch eine deutliche Erhöhung bei den DGDG-Spezies gegenüber dem Wildtyp (40-50 %) und sogar ein deutlicher Unterschied zu den RNAi-Pflanzen (ca. 25 %) auf. Bei den Kontroll-Blättern (Abbildung 38 B) wurden entsprechend den Chlorophyllwerten bis auf geringfügige Varianzen keine Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien beobachtet.

500 mM Sorbitol	WT	LOX2i-2	LOX2i-9	dde2
0 h	1255,7 ± 245,0	949,0 ± 289,0	810,4 ± 68,4	726,0 ± 83,6
24 h	630,9 ± 105,9	668,0 ± 44,3	762,9 ± 100,5	718 ± 92,4
48 h	494,3 ± 44,4	689,8 ± 49,9	730,9 ± 64,8	786,6 ± 129,5
H2O				
0 h	1255,7 ± 245,0	949,0 ± 289,0	810 ± 68,4	726,0 ± 83,6
24 h	1364,9 ± 168,8	1446,7 ± 115,0	1434,6 ± 124,0	1448,0 ± 88,8
48 h	1503,0 ± 35,9	1444,1 ± 46,7	1405,8 ± 100,2	1329,1 ± 35,2

Tabelle 7: Gesamtheit der quantifizierten Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG ± SD] in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2* zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden. Die Behandlung erfolgte mit 500 mM Sorbitollösung bzw. H<sub>2</sub>O. Kalkulation aufgrund 16 quantifizierter Lipid-Spezies. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=3-6]

Betrachtet man die Gesamt-Galaktolipide in Tabelle 7, so wird deutlich, dass nach der Flottierung auf Sorbitol beim Wildtyp die stärkste Reduktion von 1255,7  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG auf 494,3  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG auftrat. Das entspricht etwa einem Rückgang von 60% zur Ausgangsmenge. Bei den *LOX2* RNAi-Pflanzen konnte hingegen nur ein Gesamt-Rückgang um 39 % bzw. 10 % beobachtet werden. Interessanterweise wies die *dde2-2* Mutante insgesamt niedrigere Spiegel auf, wobei sich der Gesamtgehalt im Experiment kaum verändert hat. In den Wasserkontrollen wurde im Gegensatz zu den Chlorophylldaten ein Anstieg der

quantifizierten Galaktolipide beobachtet. Diese stiegen im Wildtyp relativ um etwa 20 %, in den RNAi-Linien um etwa 50- 60 % und in den *dde2-2*-Blättern um bis zu 80 % an.

## 2.3.3.7 Untersuchung der Genexpression

Um festzustellen, ob die beobachtete Seneszenz-Verzögerung sich auch auf Ebene der Expression molekularer Markergene (SAGs) auswirkt, wurden die hergestellten cDNAs aus den vorgestellten Experimenten mittels qRT-PCR daraufhin untersucht. Zunächst wurde die Expression der Cysteinprotease SAG12 getestet. Im Falle der osmotisch-induzierten Seneszenz nach Sorbitol-Behandlung konnte jedoch im Vergleich zur natürlichen Seneszenz kaum *SAG12*-Expression induziert werden (Abbildung 39 A, B). Zum Vergleich wurde auch die Induktion nach Dunkelbehandlung untersucht. Hier ziegte sich aber ebenfalls nur eine geringfügige Steigerung der Genexpression (Abbildung 39 C).



Abbildung 39: Relative SAG12-Expression bezogen auf Actin2/8 nach Sorbitolbehandlung (A) in der natürlichen Blattseneszenz (B) und der dunkelinduzierten Seneszenz in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2*. Die cDNAs zur natürlichen bzw. dunkelinduzierten Seneszenz stammen aus den Experimenten unter 2.3.1 bzw. 2.3.2 [n≥4].

Da sich die *SAG12*-Expression offenbar nicht als Indikator für artifizielle Seneszenz-Systeme eignet, sondern wie erwähnt ein entwicklungsspezifischer Marker ist, wurde die Expression von Genen untersucht, die sowohl zu den Seneszenz-assoziierten Genen gehören, aber möglicherweise auch durch Stress induziert werden. Dazu wurden die Gene *SAG13* (At2g29350) und *SEN1* (At4g35770) ausgewählt. *SAG13* kodiert dabei für eine Alkohol-Dehydrogenase (Lohman et al., 1994), deren Expression in der frühen natürlichen Seneszenz stark ansteigt (siehe auch Abbildung 8). Die genaue Funktion des Seneszenz-assoziierten Proteins SEN1 ist dagegen noch unbekannt. Es wird jedoch sowohl bei Seneszenz-Prozessen als auch bei der Pathogenantwort aktiviert (Oh et al., 1996; Schenk et al., 2005).



Abbildung 40: Relative SAG13- (A), SEN1- (B) und CAB-Expression (C) bezogen auf Actin2/8 in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und 9 und der Mutante dde2-2 zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden. Die Behandlung erfolgte mit 500 mM Sorbitollösung. Die Daten stellen Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten dar [n≥4].

Die Abbildungen 40 A und B zeigen die relativen *SAG13*- und *SEN1*-Expressionen nach Sorbitolbehandlung. Es wird deutlich, dass die Expression der beiden Gene im Wildtyp deutlich durch die Behandlung induziert wurde. In den Blättern der Kontrollpflanzen (0 h) konnten für beide mRNA nur basale Spiegel festgestellt werden; nach 24 Stunden erfolgte bereits eine Induktion um das 50-fache (*SAG13*) bzw. das 20-fache (*SEN1*). Während im Wildtyp die *SAG13*-Expression auch nach 48 Stunden konstant blieb, so wurde sie bei *SEN1* um etwa 50 % reduziert. Im Vergleich dazu zeigten die Jasmonat-reduzierten RNAi-Linien sowie die *dde2-2* Mutante eine deutlich verminderte Induktion. Während die transgenen Linien basal eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expression aufwiesen, zeigten die *LOX2* RNAi-Linien nach 24 Stunden nur 50 % der Wildtypinduktion für *SAG13* und *SEN1*. Erst nach 48 Stunden wurde in diesen Blättern eine Angleichung an die Expressions-Level im Wildtyp festgestellt. In der *dde2-2* Mutante erfolgte die Induktion wesentlich langsamer. So erhöhte sich die Expression nach 24 Stunden nur auf etwa 35 % (*SAG13*) bzw. 10 % (*SEN1*) des Wildtyp-Levels. Im Gegensatz zu den RNAi-Pflanzen verblieben die Expressions-Level auch nach 48 Stunden nur bei lediglich 50% im Vergleich zum Wildtyp.

Es ist bekannt, dass nach stressinduzierter Seneszenz die Expression von Genen für die Photosynthese kurzfristig herabreguliert wird (Reinbothe et al., 1994). Um dies im Sorbitol-
System zu prüfen, wurde aus den gleichen cDNAs die Expression einer Untereinheit des Chlorophyll-a/b-bindenden Proteins (*CAB*; At3g27690) quantifiziert. Wie die Abbildung 40 C darstellt, ist *CAB* ein unter basalen Bedingungen in allen Linien stark exprimiertes Gen. Nach Sorbitolbehandlung konnte tatsächlich bereits nach 24 bzw. 48 Stunden keine Expression mehr gemessen werden.

Als ein Markergen für JA-vermittelte Stress-Prozesse, wurde die Expression des jasmonatresponsiven Gens *VSP1* (At5g24780) untersucht. Dieses wird u. a. durch exogene Applikation von MeJA induziert, aber nicht während der natürlichen Alterung (Berger et al., 1996; Matthes et al., 2008). Abbildung 41 zeigt die vergleichende Analyse der relativen *VSP1*-Expression in den drei untersuchten Seneszenz-Prozessen.



Abbildung 41: Relative VSP1-Expression bezogen auf Actin2/8 nach Sorbitolbehandlung (A) in der natürlichen Blattseneszenz (B) und der dunkelinduzierten Seneszenz (C) in den Blättern des Wildtyps sowie der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und der Mutante *dde2-2*. Die cDNAs zur natürlichen bzw. dunkelinduzierten Seneszenz stammen aus den Experimenten unter 2.3.1 bzw. 2.3.2 [n≥4]

In der natürlichen Blattseneszenz (Abbildung 41 B) konnte im Wildtyp während der gesamten Entwicklung lediglich eine niedrige Basalexpression festgestellt werden. Diese war in den *LOX2* RNAi-Linien vermindert und in der JA/OPDA-defizienten *dde2-2* Mutante teilweise nicht messbar. Ein ähnliches Bild zeichnete sich für die Induktion in Dunkelheit ab (Abbildung 41 C). Auch hier konnte in den Mutanten nur eine verminderte Basalexpression beobachtet werden. Wie hingegen in Abbildung 41 A zu sehen ist, wurde die *VSP1*-Expression durch die Flottierung auf Sorbitollösung stark induziert. Im Wildtyp fand nach 24 Stunden eine Induktion um den Faktor 13 statt. In den RNAi-Pflanzen mit verminderter Jasmonat-Synthese konnte zwar eine Induktion von *VSP1* beobachtet werden. Diese betrug jedoch nur 50 % gegenüber dem Wildtyp. In der *dde2-2* Mutante konnte keine relevate Expression nach 24 oder 48 Stunden nachgewiesen werden.

# 2.3.4 Untersuchung der osmotisch-induzierten Seneszenz in der *coi1* Mutante

Die bisher gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass die Induktion der Seneszenz-Symptome in den Blättern nach Sorbitolbehandlung jasmonatabhängig ist. Da die Untersuchungen bisher mit Biosynthesemutanten durchgeführt wurden, die weniger oder keine Jasmonate produzieren können, wurden nun Pflanzen untersucht, die in der Signaltransduktion der Jasmonate eingeschränkt sind. Dazu wurde die Mutante *coi1-16* (Feys et al., 1994) untersucht. Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, vermittelt Jasmonoyl-Isoleucin mit dem F-Box Protein COI1 die Ubiquitinierung von JAZ-Repressorproteinen, was zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, die letztlich für die weitere Jasmonat-vermittelte Genantwort zuständig sind. In der Mutante *coi1-16* ist das COI1 Protein unwirksam und die vorhandenen Jasmonate können nicht erkannt werden. Somit kann keine COI1-abhängige Signaltransduktion und damit keine Induktion der Jasmonat-Kaskade stattfinden.

# 2.3.4.1 Beschreibung der Seneszenz-Symptome

Wie bereits beschrieben, wurden die Blätter des Wildtyps Col gl sowie der Mutante *coi1-16* auf 500 mM Sorbitollösung sowie H<sub>2</sub>O als Kontrolle über 24 bzw. 48 Stunden flottiert. Nach 48 Stunden konnte in den Wildtypblättern ein deutliches Ausbleichen beobachtet werden; die *coi1*-Blätter zeigten sich hingegen noch deutlich grüner (Abbildung 42). Die Blattintegrität dieser Mutante war zudem noch deutlich stabiler als beim Wildtyp. In den Kontrollen mit H<sub>2</sub>O traten nach 48 Stunden weder in den Mutanten noch im Wildtyp sichtbare Veränderungen auf.



Abbildung 42: Repräsentativer Vergleich von Arabidopsis-Blättern nach 48 Stunden auf 500 mM Sorbitollösung; Wildtyp Col-gl (A) und *coi1-16* (B). Die Bilder wurden mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen.

# 2.3.4.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Um den makroskopischen Zustand der Blätter genauer zu bestimmen, wurde aus dem gefriergetrockneten Material das Chlorophyll extrahiert. Wie in Abbildung 43 A dargestellt ist, kam es wie in den Experimenten unter 2.3.3.5 durch die Einwirkung der Sorbitollösung zu einem raschen Abbau des Chlorophylls.



Abbildung 43: Clorophyll a+b Konzentration [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps sowie der Mutante *coi1-16* zu Beginn des Experimentes (0 Stunden) und nach 24 bzw. 48 Stunden auf 500 mM Sorbitollösung (A) und als Kontrolle auf H<sub>2</sub>O (B). Um vergleichbare Konzentrationen zu erhalten, wurde zur Umrechnung von Trocken- in Frischgewicht experimentell ein Umrechnungsfaktor von 0,06 bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen einen Mittelwert aus 9 (Sorbitol) bzw. 3 (H<sub>2</sub>O) Messungen. Die Sternchen repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen *coi1-16* und dem Wildtyp (One-way ANOVA, \*P >0,002, n=9).

Zu Beginn des Experimentes zeigten beide Linien einen Gesamtchlorophyllgehalt von etwa 1000  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG. Im Wildtyp nahm der Gehalt nach 24 Stunden bereits um über 50 % ab; nach 48 Stunden konnten in diesen Blättern nur noch 18 % der Ausgangsmenge gemessen werden, was etwa 180  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG entsprach. In der Mutante trat bereits nach 24 Stunden eine Verzögerung des Chlorophyllabbaus ein. In deren Blättern wurden zu diesem Zeitpunkt etwa 600  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG Chlorophyll, was über 60 % des Ausgangswertes entsprach, festgestellt. Nach 48 Stunden konnte in der *coi1-16* Mutante eine deutliche Seneszenz-Verzögerung beobachtet werden. Hier wiesen die Blätter noch etwa 300  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG auf (30 %).

Bei den Kontrollansätzen mit H<sub>2</sub>O (Abbildung 43 B) konnte, ähnlich wie in den vorherigen Experimenten gezeigt, ein leichter Rückgang des Chlorophyllgehaltes über 48 Stunden beobachtet werden. Dieser Rückgang fand jedoch in den untersuchten Linien gleichmäßig statt.

# 3 Diskussion

# 3.1 Die seneszenzinduzierbare RNA-Interferenz hat Einfluss auf die jeweilige mRNA-Akkumulation, aber nicht auf Jasmonat-Produktion und Seneszenz

Die Blatt- bzw. Entwicklungs-spezifische RNA-Interferenz (RNAi) für die Gene der JA-Biosynthese AOS, LOX2 und OPR3 sollte durch den seneszenzinduzierbaren SAG13-Promotor gesteuert werden. Durch Untersuchungen der Genexpression von SAG13 und der Akkumulation der Ziel-mRNAs, konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der SAG13-Expression während der beginnenden Seneszenz und der Suppression des jeweiligen Zielgens beobachtet werden. Dabei entsprach das hier festgestellte Expressionsmuster den bisher gemachten Beobachtungen an *Arabidopsis*, die dieses Gen als SAG identifiziert haben (Lohman et al., 1994; Weaver et al., 1998).

So konnte in den transgenen SAG13::AOSi- und SAG13::LOX2i-Linien eine Verminderung der jeweiligen mRNA-Expression in den Blättern älterer Pflanzen festgestellt werden, wobei während der frühen Entwicklung (6 Wochen) kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet wurde. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch in den Blättern von SAG13::OPR3i-Linien (Daten nicht dargestellt). Das bedeutet, dass auf transkriptioneller Ebene die entwicklungsabhängige Induktion des RNAi-Mechanismus durch den seneszenzassoziierten Promotor prinzipiell funktioniert hat.

Unter physiologischen Gesichtspunkten hatte die jeweilige mRNA-Suppression durch eine induzierbare RNA-Interferenz jedoch keinen Einfluss auf die tatsächlich produzierten JA/OPDA Mengen. Im Wildtyp zeigten sich nach 8 bis 10 Wochen an den Blättern deutliche Seneszenz-Symptome, die mit einem Anstieg der JA/OPDA-Konzentrationen einhergingen. Ein JA-Anstieg in Arabidopsis-Blättern wurde bereits in vorherigen Arbeiten festgestellt. So haben He et al., 2002 einen 4-fachen JA-Anstieg in seneszenten Blättern beobachtet. In dieser Arbeit konnte jedoch ein weit höherer Anstieg von Jasmonsäure um etwa das 50- bis 100-fache festgestellt werden. Trotz der RNAi-basierten Verminderung der Expression in den transgenen SAG13::AOSi- und SAG13::LOX2i-Linien, konnte in deren Blättern der entwicklungsbedingte Jasmonat-Anstieg weiterhin beobachtet werden. Darüberhinaus wurden in diesen Linien durch Analysen des Chlorophyllgehaltes und der Genexpression keine Veränderungen in der Seneszenz-Progression festgestellt (Daten nicht dargestellt). Diese Pflanzen eigneten sich also insgesamt nicht, um mögliche seneszenzfördernde Wirkungen der Jasmonate zu untersuchen.

Weiter kann daraus geschlossen werden, dass die Jasmonat-Produktion während der natürlichen Seneszenz offenbar nicht von der transkriptionellen Aktivität der Biosynthesegene *LOX2* und *AOS* abhängig ist. Wie in den Analysen der Genexpression

festgestellt wurde, ist die natürliche Expression dieser Gene gegen Ende der Blattalterung ohnehin eher als rückläufig bzw. stagnierend zu bezeichen. Dies belegen auch die anderer Untersuchungen, die für die Gene LOX2 und AOS Ergebnisse ein Expressionsmaximum in etwa 6 Wochen alten, nicht-seneszenten Blättern mit einem anschließenden Expressionsrückgang festgestellt haben (He et al., 2002; van der Graaff et al., 2006). Im Gegensatz zu Untersuchungen mit stressinduzierter Aktivierung der JA-Kaskade (Bell and Mullet, 1993; Bell et al., 1995; Kubigsteltig et al., 1999; von Malek et al., 2002; Spoel et al., 2003), korreliert also während der natürlichen Seneszenz die JA-Produktion nicht mit einer gesteigerten mRNA-Expression von LOX2 oder AOS. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass die Biosyntheseenzyme trotz entwicklungsbedingter Expressionsverminderung noch funktionell innerhalb der Chloroplasten vorliegen, und somit nicht limitierend auf die anstehende JA-Produktion wirken. So konnten beispielsweise trotz Rückgang des LOX-Proteingehaltes in seneszenten Arabidopsis-Blättern, ansteigende Konzentrationen an 13-LOX-Produkten festgestellt werden (Berger et al., 2001). Gestützt wird die Theorie der Enzymstabilität auch von Beobachtungen, die während der artifiziellen Seneszenz-Induktion durch Dunkelheit gemacht wurden. Hier wurde bereits nach 3 Tagen ein drastischer Rückgang der LOX2- (Abbildung 23) sowie der AOS-Expression festgestellt (siehe dazu auch van der Graaff et al., 2006). Dennoch konnten in diesen abgetrennten Blättern durch Dunkelinkubation bzw. durch zusätzliche Verwundung noch enorme Mengen JA/OPDA hergestellt werden. Wie die Untersuchungen der konstitutiven LOX2 RNAi-Linien zusätzlich gezeigt haben, ist eine hohe LOX2-Expression während der frühen Entwicklungsstadien offenbar für eine spätere Lipoxygenierung während der dunkelinduzierten bzw. natürlichen Seneszenz erforderlich. Diese Beobachtungen würde erklären, warum eine weitere RNAi-vermittelte Suppression während der natürlichen Alterung keinen weiteren Einfluss auf die JA/OPDA-Synthese hat. So kann man es physiologisch durchaus als sinnvoll betrachten, die energieaufwändige Transkription und Translation von hochexprimierten Genen wie LOX2 und AOS während der Seneszenz zu reduzieren, wenn einerseits die bereits produzierten Enzyme noch ausreichend funktionell zur Verfügung stehen, andererseits die freiwerdenden Ressourcen für die Expression von SAGs bzw. als Metabolite für die Translokation in andere Organe zur Verfügung gestellt werden können. Die natürliche Verminderung der Genexpression kann also eher als eine Folge der Restrukturierung des Blatt- bzw. Chloroplastenmetabolismus verstanden werden. Wie später noch besprochen werden soll, ist für die Jasmonat-Synthese unter diesen Bedingungen vermutlich eher die Substratverfügbarkeit der limitierende Faktor.

#### 3.2 LOX2 ist an der entwicklungsabhängigen Produktion von Oxylipinen beteiligt

Während der Blattentwicklung wiesen die transgenen 35S::LOX2i-Linien, die mit Hilfe eines konstitutiven RNAi-Mechanismus eine post-transkriptionelle Degradierung von *LOX2*-mRNAs

herbeiführen sollten, eine mRNA-Suppression von etwa 80-90% im Vergleich zum Wildtyp auf. Diese durchgehende Suppression während der Pflanzenentwicklung führte dabei offensichtlich zu einer verminderten Enzym-Synthese. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich dahingehend bei mehreren Untersuchungen in den LOX2i-Linien um etwa 50% reduzierte basale JA/OPDA-Spiegel. Wie bereits festgestellt wurde, kommt es in *Arabidopsis*-Blättern zum seneszenzbedingten Anstieg von Jasmonaten. Diese Akkumulation war durch die verminderte Enzym-Synthese in den LOX2i-Pflanzen ebenfalls inhibiert. LOX2 ist also offensichtlich an der Bereitstellung von freien Jasmonaten während der Blattentwicklung beteiligt.

Neben den freien Jasmonaten ist seit einigen Jahren die Existenz von membranveresterten Oxylipinen bekannt, bei denen die Pentenone OPDA bzw. dnOPDA verestert an plastidäre Galaktolipide vorliegen. Da diese bisher nur im Genus *Arabidopsis* aufgefunden wurden, werden diese auch als Arabidopside bezeichnet (Böttcher and Pollmann, 2009; Mosblech et al., 2009). Die Untersuchung des Wildtyps hatte ergeben, dass es während der *Arabidopsis*-Entwicklung zwar zu Schwankungen, aber nicht zu großen Arabidopsid-Akkumulationen innerhalb der Membranen kommt. Die hier gemachten Beobachtungen, dass sowohl in den LOX2i-Pflanzen als auch in den *dde2-2* Mutanten stark verminderte Arabidopsid-Spiegel vorlagen, weisen darauf hin, dass der Großteil der Arabidopside durch die Aktivitäten von LOX2 bzw. AOS gebildet wird.

Dabei ist bisher noch nicht abschließend geklärt, ob die Arabidopside durch Re-veresterung von freier OPDA bzw. dnOPDA oder durch die direkten enzymatischen Reaktionen von LOX2, AOS und AOC an den membrangebundenen Fettsäuren gebildet werden. Im direkten Vergleich zum Wildtyp wurden bei den LOX2i-Pflanzen etwa  $\geq$ 50 % freie OPDA gefunden, jedoch nur maximæl3,5% Arabidopside . Dieser drastische Unterschied lässt darauf schließen, dass unter basalen Bedingungen eine OPDA/dnOPDA Re-veresterung eher unwahrscheinlich ist und LOX2 neben der Umsetzung freier Fettsäuren, verstärkt an der Lipoxygenierung von membrangebundenen PUFAs beteiligt ist. In Untersuchungen der kürzlich etablierten *lox2-1* Mutante konnten unter basalen Bedingungen vergleichbare Ergebnisse festgestellt werden, woraufhin die Autoren ähnliche Schlüsse gezogen haben (Glauser et al., 2009).

Wie bekannt ist weisen Mutanten, die entweder keine JA/OPDA produzieren oder erkennen können, diverse Defekte im Blatt-, Wurzel- und Sprosswachstum sowie in der Fertilität der Blüten auf (siehe Kapitel 1.3). Es wurde auch bereits erwähnt, dass die LOX2i-Linien teilweise über reduzierte basale Jasmonat- und Arabidopsid-Spiegel verfügten. Der phänotypische Vergleich zwischen dem Wildtyp, den LOX2i-Pflanzen und der *dde2-2* Mutante hat jedoch gezeigt, dass die in den RNAi-Linien produzierten Jasmonat-Konzentrationen für eine wildtypische Ausprägung des Größenwachstums, des Habitus und

der Fertilität in der Entwicklung der Pflanze ausreichend sind. Aufgrund der Tatsache, dass Arabidopside während der Entwicklung im Wildtyp nur in geringen Mengen vorkommen und sich in den LOX2i-Pflanzen kaum Arabidopside feststellen ließen, kann davon ausgegangen werden, dass die veresterten Oxylipine in Entwicklungsprozessen wahrscheinlich keine Rolle spielen bzw. niedrige Konzentrationen ausreichend sind.

LOX2 sorgt also zumindestens teilweise für die Bereitstellung von Oxylipinen während der Entwicklung von Arabidopsis, wobei geringe Mengen für die normale Entwicklung ausreichend sind.

Ob die restlichen (funktionellen) JA/OPDA-Mengen dabei durch eine LOX2 Rest-Aktivität oder durch andere LOX-Isoformen gebildet werden, ist jedoch unklar. Die Isoformen LOX3, LOX4 und LOX6 sind zwar ebenso in den Chloroplasten lokalisiert (Bannenberg et al., 2009), werden im Vergleich zu LOX2 jedoch nur schwach exprimiert. Nach Untersuchungen an der lox2-1 Mutante, die basal gleiche Jasmonat-Konzentrationen wie der Wildtyp aufgewiesen hat, wurde spekuliert, dass die weiteren LOX-Isoformen möglicherweise an der Ausbildung basaler Oxylipine beteiligt sind (Glauser et al., 2009). Aufgrund der beobachteten Verminderung der basalen Jasmonat-Konzentrationen in den vorliegenden LOX2i-Linien, kann daran gezweifelt werden. Dabei ist nicht gänzlich auszuschließen, dass sich der Effekt der RNA-Interferenz auch auf die homologen LOX-mRNA auswirkt und dies zu "off-target" Suppressionen führt. Zu Testzwecken wurde deshalb das mRNA-Expressionsmuster des Gens LOX3, dessen Sequenz die größten Homologien zu LOX2 aufweist, sowie des Gens LOX1 basal und nach Verwundung bestimmt. Dabei konnten in den LOX2i-Pflanzen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Anhang, Abbildung S1). Im Gegensatz zur basalen JA/OPDA-Produktion, kann aber durch die Analyse der LOX2i-Pflanzen eine Rolle der anderen Arabidopsis 13-LOX Isoformen LOX3, LOX4 und LOX6 bei der Seneszenz ausgeschlossen werden. So hatten andere Untersuchungen zunächst ergeben, dass LOX3 und LOX4 während der Seneszenz verstärkt transkribiert werden (He et al., 2002). Durch die Auswertung der LOX2i-Linien konnte jedoch festgestellt werden, dass der Anstieg der Jasmonate während der Seneszenz lediglich auf die Aktivität von LOX2 zurückzuführen ist.

# 3.3 Die LOX2 vermittelte Jasmonat-Akkumulation hat unterschiedliche Effekte auf die natürliche und stressinduzierte Seneszenz

Die bisherigen Kenntnisse über die Rolle der Jasmonsäure und ihrer Derivate während der Seneszenz basieren im Wesentlichen auf den Beobachtungen, dass die Konzentrationen in seneszenten Blättern ansteigen und die exogene Applikation zur Induktion von Seneszenzähnlichen Symptomen sowie zur Expression von einigen SAGs führt. Ob die Jasmonate eine tatsächliche regulative Funktion bei der Progression der altersbedingten Seneszenz haben, wie etwa die Zytokinine oder Ethylen, war aber bisher unklar. Ein wesentliches Hindernis bei der Erforschung der natürlichen Funktion ist die Tatsache, dass JA-defiziente Mutanten pleiotrophe Effekte, sowohl auf die Habitus- und Blattentwicklung als auch auf die Reproduktion aufweisen. Es ist bekannt, dass in monokarpischen Pflanzen die Blattseneszenz unmittelbar mit der Seneszenz der Gesamtpflanze gekoppelt ist (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Daher war anzunehmen, dass ein Unterbleiben der Reproduktion in diesen Linien zu einer Verminderung der Pflanzen- und damit der Blattseneszenz führen könnte. Aus diesem Grund wurden Beobachtungen an diesen Pflanzen als nicht mit dem Wildtyp vergleichbar angesehen.

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt wurde, konnten für diese Arbeit Pflanzen entwickelt werden, die durch die Anwesenheit basaler Jasmonat-Spiegel in Ihrer normalen Entwicklung nicht durch solche Effekte beeinträchtigt sind, aber dennoch keine zusätzliche Jasmonat-Akkumulation in seneszenten Blättern aufweisen. Um festzustellen, ob diese Akkumulation fördernden Einfluss auf die Seneszenz der Blätter und damit auch auf die Entwicklung der Gesamtpflanze hat, wurden Pflanzen des Wildtyps, der LOX2i-Linien und der JA-defizienten Mutante *dde2-2* gemeinsam angezogen und im Entwicklungsverlauf definierte Rosettenblätter hinsichtlich verschiedener Seneszenz-Parameter untersucht.

#### 3.3.1 Jasmonate sind nicht essentiell für die natürliche Seneszenz-Progression

Die Charakterisierung der Seneszenz-Symptome sollte dabei in dieser Arbeit an möglichst entwicklungsnahen Parametern bestimmt werden. Ein wichtiges Indiz für die altersbedingte Seneszenz stellt dabei der Abbau des Chlorophylls dar. Um photooxidative Schädigungen durch Abbauprodukte während der Seneszenz zu vermeiden, ist der Chlorophyllabbau ein hochregulierter Prozess, der damit als zuverlässiger Faktor zur Bestimmung der Blattentwicklung geeignet ist (Ougham et al., 2008). So beginnt bereits nach der Expansion der Blattspreite ein kontinuierlicher Rückgang des Chlorophyllgehaltes, wie es auch hier nach 8 bzw. 10 Wochen festgestellt wurde.

Einen molekularen Marker für die natürliche Seneszenz-Progression stellt die Expression der Cysteinprotease SAG12 dar. Im Gegensatz zu anderen SAGs scheint dieses Gen besonders entwicklungsspezifisch zu sein, da z. B. keine Induktion durch Stress-Stimuli oder applizierte Hormone erfolgt, was sich auch in dieser Arbeit bestätigt hat (vgl. Abbildung 39). Daher wurde es schon in vielen Studien als Indikator verwendet (Lohman et al., 1994; Gan and Amasino, 1995; Weaver et al., 1998; Noh and Amasino, 1999; Weaver and Amasino, 2001).

Durch Beobachtung dieser Parameter, konnten unter natürlichen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Seneszenz-Progression zwischen dem Wildtyp mit erhöhter JA/OPDA-Akkumulation, und den LOX2i-Pflanzen mit stagnierenden JA/OPDA-Spiegeln festgestellt werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Pflanzen auch ohne die entwicklungsbedingte Jasmonat-Akkumulation in ihren Blättern in der Lage sind, Seneszenz-

Symptome auszubilden. Ein seneszenzfördernder Effekt erhöhter Jasmonat-Konzentrationen kann somit unter diesen Bedingungen nicht bestätigt werden.

Interessanterweise konnten auch an der untersuchten *dde2-2* Mutante, die weder OPDA noch JA bilden kann, keine Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Jasmonate auch nicht in geringen Mengen für den Ablauf der Seneszenz essentiell sind. Dies würde trotz der erwähnten Bedenken auch erklären, warum an anderen JA-defizienten Mutanten bisher keine Seneszenz-Verzögerungen festgestellt wurden (Vijayan et al., 1998; Schaller et al., 2000; Stintzi and Browse, 2000; von Malek et al., 2002). Ebenfalls wurden keine Auffälligkeiten bei der JA-insensitiven *coi1* Mutante beobachtet (He et al., 2002). In diesem Zusammenhang kann auch davon ausgegangen werden, dass in *Arabidopsis* die postulierte korrelative Kontrolle von Reproduktion und Blattseneszenz wahrscheinlich eher eine geringe Bedeutung hat.

Die gemachten Beobachtungen sprechen insgesamt eher dafür, dass die gebildeten 13-LOX Produkte unter den gewählten Bedingungen keine seneszenzfördernde Wirkung bei der entwicklungsabhängigen Alterung bzw. der Seneszenz-Progression haben.

Im Hinblick auf die anerkannten Funktionen anderer Phytohormone, wie etwa der Zytokinine, des Ethylens oder der Salicylsäure, lässt der Vergleich mit den hier untersuchten Jasmonaten vielmehr vermuten, dass die verschiedenen hormonellen Regulatoren quantitativ und qualitativ stark unterschiedlich im Seneszenz-Prozess mitwirken.

Dennoch wurde beispielsweise in Untersuchungen des Transkriptoms der JA-insensitiven *coi1* Mutante festgestellt, dass eine Reihe von SAGs ohne die Erkennung der Jasmonate nur vermindert exprimiert werden (Buchanan-wollaston et al., 2005). Beispielsweise werden offenbar Gene durch Jasmonate (in Interaktion mit Ethylen) reguliert, die beispielsweise eine Rolle in der Zellwand-Strukturierung, bei der Nukleinsäure-Degradierung oder in basalen Schutzmechanismen spielen.

Aufgrund der hier gemachten Beobachtungen kommt dahingehend in Betracht, dass z. B. in den LOX2i-Linien geringe Jasmonat-Konzentrationen zur Expression betreffender Gene ausreichen. Wie ja bereits festgestellt wurde, ermöglichen geringe Mengen eine normale Habitus- und Blütenentwicklung (vgl. Kapitel 3.2).

Dies wird durch die Untersuchung der Expression des Gens Chlorophyllase1 (*CLH1*) im Entwicklungsverlauf unterstützt. Dessen Funktion liegt nachweislich nicht im Chlorophyllabbau während der natürlichen Seneszenz (Schenk et al., 2007), sondern vielmehr in der ROS-Regulation nach Pathogenbefall (Kariola et al., 2005). So wurde hier festgestellt, dass *CHL1* zwar nicht als SAG bezeichnet werden kann, aber die *CLH1*-Expression während der Entwicklung stark vom Jasmonat-Signal abhängig ist (Abbildung 22). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass selbst geringe JA-Konzentrationen, wie in den LOX2i-Pflanzen vorhanden, noch bis zu 50% der Wildtyp-Expression auslösen können.

Interessant ist hier die gemachte Beobachtung, dass in diesem Beispiel keine *CHL1*-Expression in JA/OPDA-defizienten Pflanzen festgestellt werden konnte.

Soviel wir heute wissen, ist die Seneszenz ein sehr plastischer Prozess, der von endogenen (autonomen) Faktoren, wie dem Blattalter, dem Entwicklungs- und Energiestatus der Gesamtpflanze initiiert und beeinflusst wird (siehe Kapitel 1.1.2).

Wie auch der Vergleich mit den Ergebnissen aus der dunkelinduzierten Seneszenz nahelegt, kann für die Seneszenz ohne jegliche Jasmonate einerseits in Betracht gezogen werden, dass es Seneszenz-Mechanismen gibt, die weniger von der Jasmonat-Produktion, als vielmehr von anderen (internen) Faktoren geprägt werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Mechanismen zur Restrukturierung des Metabolismus oder zur Verteidigung bei der Entwicklung möglicherweise nur sekundär eine Rolle spielen und sich in der Seneszenz-Progression symptomatisch nur schwach bzw. gar nicht auswirken.

Wie die oben erwähnte Studie dahingehend vermuten lässt, kann die Expression von SAGs auch durch andere redundante oder synergistische Mechanismen übernommen werden. So werden viele der JA-vermittelten Gene auch durch den Salicylat- bzw. Ethylensignalweg beeinflusst (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Wie das Beispiel der WRKY-Transkriptionsfaktoren zeigt, können diese nicht nur durch Jasmonsäure, sondern auch durch viele andere Faktoren, wie ROS, epigenetische Veränderungen usw. reguliert werden (siehe Kapitel 1.1.4). Dahingehend konnten bei der Untersuchung der *WRKY53*- bzw. *ESP/ESR*-Expression keine Unterschiede zwischen den untersuchten Pflanzenlinien festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Wie die weitere Diskussion ergeben wird (siehe Kapitel 3.3.5), spielen Jasmonate aber möglicherweise unter anderen bzw. extremeren Bedingungen eine stärkere Rolle.

# 3.3.2 Die entwicklungsbedingte Jasmonat-Akkumulation ist nicht die Folge einer stressbedingten JA-Kaskade

Im Vergleich zwischen der natürlichen, der dunkelinduzierten und der osmotisch-induzierten Seneszenz zeigten sich deutliche Gemeinsamkeiten der ersten beiden Prozesse im Bezug auf die Produktion von Jasmonaten, Arabidopsiden und der Expression JA-responsiver Gene, aber deutliche Unterschiede zur osmotischen Induktion.

Die endogene Erhöhung der Jasmonate alleine führte in der natürlichen und in der dunkelinduzierten Seneszenz nicht zu einem stressbedingten Oxylipinmuster mit verstärkter Bildung von OPDA und Arabidopsiden, wie es z. B. nach Sorbitol-Behandlung, Verwundung oder Pathogenbefall auftritt (vgl. Abbildung 31 und 34)(Buseman et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007; Glauser et al., 2009; Ellinger et al., 2010). So konnte in den ersten beiden Systemen eine deutlich stärkere Bildung von Jasmonsäure im Gegensatz zu OPDA

festgestellt werden. Ebenfalls kam es während dieser Prozesse nicht zu einer transkriptionellen Aktivierung von *LOX2, AOS* und dem JA- responsiven Markergen *VSP1*.

Trotz der teilweise starken Akkumulation von Jasmonsäure, kommt es offenbar während der natürlichen und der dunkelinduzierten Seneszenz nicht zur Aktivierung einer positiven JA-Kaskade. Wie das Beispiel der *CLH1*-Regulation aus dem vorherigen Abschnitt gezeigt hat, kann es aber nicht so sein, dass JA von der Pflanze prinzipiell nicht erkannt wird. Es ist vielmehr zu vermuten, dass für die Aktivierung der positiven Jasmonat-Kaskade, und damit der Induktion der Arabidopsid-Akkumulation, der *LOX2/ VSP1*-Expression usw., zusätzliche Signale, wie chemische oder biologische Elicitoren; hydraulische oder elektrische Signale benötigt werden, die über bisher unbekannte Rezeptorsysteme erkannt werden (Koo et al., 2009).

Im Rückschluss bedeutet dies, dass unter diesen Bedingungen die Regulation der JAresponsiven Gene eher durch entwicklungsbedingte Mechanismen stattfindet. So ist aus molekularen Untersuchungen bekannt, dass Gene wie *LOX2* oder *OPR1*, die eben an der seneszenzspezifischen JA-Produktion beteiligt sein sollen, für die Antwort auf Entwicklungsund Stress-Prozesse jeweils unabhängige Promotor-Elemente enthalten (He and Gan, 2001; Schommer et al., 2008). So konnte in *Arabidopsis* eine Signalkaskade charakterisiert werden, die die *LOX2*-Expression in der Blattentwicklung Jasmonat-unabhängig über TCP-Transkriptionsfaktoren bzw. endogene MikroRNAs reguliert (Schommer et al., 2008). Ebenfalls ist für *VSP1* bekannt, dass die Induzierbarkeit durch Jasmonate vom Entwicklungsstand der Pflanze abhängig ist (Matthes et al., 2008). Interessanterweise konnte hier in verschiedenen Experimenten in der *dde2-2* Mutante eine konstitutiv verminderte *LOX2*-Expression festgestellt werden. Die entwicklungsbedingte *LOX2*-Regulation scheint also insgesamt trotzdem von einer gewissen JA-Produktion abhängig zu sein.

Zusammengefasst ist es für die natürlichen und die dunkelinduzierten Prozesse charakteristisch, dass der beobachtete Anstieg der freien Jasmonate aus einer basalen Aktivität heraus stattfindet. Dieser Prozess ist als entwicklungsabhängiger Mechanismus zu verstehen, der nicht aus den bekannten stressbedingten Begleiterscheinungen einer aktivierten JA-Kaskade resultiert. Es stellt sich aber daraufhin die Frage, welche Veränderung in den Blättern zum beobachteten Anstieg der Jasmonat-Konzentrationen in diesen Seneszenz-Systemen führen, wenn dies nicht durch die Expression der Biosynthesegene reguliert wird.

# 3.3.3 Die entwicklungsbedingte Jasmonat-Akkumulation ist wahrscheinlich eine Folge des plastidären Membranabbaus

Als eine der möglichen Ursachen für die Produktion freier Jasmonate durch LOX2 dient dabei wahrscheinlich der seneszenzspezifische Um- bzw. Abbau der plastidären

Membranlipide. Während der natürlichen Entwicklung in *Arabidopsis* kommt es zum Abbau von Galaktolipiden aus den Chloroplastenmenbranen (Thompson et al., 1998). Dabei konnte unter den hier gewählten Bedingungen weniger ein Abbau der Gesamtgalaktolipide, als mehr ein Umbau von MGDG zu DGDG beobachtet werden. Bei diesem Vorgang handelt es sich aber vermutlich um erste entwicklungsbedingte Schritte im Lipidumsatz, die in *Arabidopsis* vornehmlich MGDG betreffen und in späteren Stadien zum Abbau aller Glycerolipide führen (Thompson et al., 1998; Yang and Ohlrogge, 2009).

Es liegt also nahe, dass durch diese Prozesse die Substratverfügbarkeit in Form freigesetzter PUFAs für LOX2 erhöht wird, was in Folge zur Akkumulation freier Jasmonate führt. So konnten auch in der vorliegenden Arbeit ansteigende Konzentrationen freier  $\alpha$ -Linolensäure ( $\alpha$ -LeA) mit fortschreitender Seneszenz beobachtet werden, was mit Daten aus anderen Arbeiten übereinstimmt (Berger et al., 2001). Es ist weiter bekannt, dass in Plastoglobuli, die während der Seneszenz als Zwischenspeicher für freie Fettsäuren, Triacylglycerole (TAGs), Membranproteine etc. dienen (Steinmüller and Tevini, 1985), der Anteil an Linolsäure (LA) und  $\alpha$ -Linolensäure als Bestandteil der TAGs in seneszenten Blättern drastisch erhöht ist (Kaup et al., 2002).

Die Zusammenhänge zwischen Lipidabbau, α-LeA-Freisetzung und JA-Synthese konnten noch deutlicher im artifiziellen System der dunkelinduzierten Seneszenz beobachtet werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die relativ langsamen Vorgänge, die sich während der natürlichen Seneszenz in den Chloroplasten abspielen, innerhalb weniger Tage zu simulieren und im Blattgewebe zu synchronisieren. Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Methode der dunkelinduzierten Seneszenz sich nur eingeschränkt als Vergleich mit natürlichen Prozessen eignet, da die Initiation und Regulation auf teilweise unterschiedlichen physiologischen und molekularen Mechanismen beruht (vgl. *SAG12*-Expression, Abbildung 39).

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass es im Bezug auf physiologische Parameter, wie den Abbau der Galaktolipide und die Produktion der Jasmonate, wesentliche Übereinstimmungen zur natürlichen Entwicklung gibt (vergleiche auch Kapitel 3.3.2). So fand nach 7 Tagen Inkubation ein drastischer Abbau plastidärer Membranlipide statt. Unter diesen Bedingungen, die offenbar mit der Degradation der Chloroplasten in Verbindung stehen, konnte im Wildtyp eine damit verbundene starke Bildung von JA aber weniger von OPDA beobachtet werden.

Die starke Akkumulation von freier α-LeA während der Dunkelinkubation in den LOX2i-Linien, nicht aber im Wildtyp und der *dde2-2* Mutante verdeutlicht (vgl. Abbildung 29), dass Lipasen unter diesen Bedingungen zunächst für eine Freisetzung von Fettsäuren sorgen, die dann in den LOX-Weg einfließen. Durch Untersuchungen, die zur Identifizierung von Lipasen/Acyltransferasen geführt haben ist bekannt, dass diese maßgeblich an SeneszenzProzessen beteiligt sind. Mutationen dieser Enzyme bewirkten in einigen Fällen sogar eine Verzögerung von Seneszenz-Prozessen (Hong et al., 2000; Thompson and Taylor, 2000; Padham et al., 2007). Zudem haben Studien zur Genexpression während der Dunkelinkubation eine starke Aktivierung von Lipasen und β-Oxidationsenzymen festgestellt (Buchanan-wollaston et al., 2005). Offenbar ist also der Prozess, der in der Seneszenz zur Freisetzung von PUFAs führt, eher Lipase-dominiert. Zusammen mit den weiteren Beobachtungen, dass im natürlichen und dunkelinduziertem System zwischen den LOX2i-Pflanzen, dem Wildtyp und der *dde2-2* Mutante keine Unterschiede im Abbau von Galaktolipiden festgestellt werden konnten, weist dies darauf hin, dass diese Prozesse offenbar LOX2- bzw. Jasmonat-unabhängig stattfinden.

Dies lässt also darauf schließen, dass unter natürlichen und dunkelinduzierten Bedingungen die Lipase-vermittelte Freisetzung von PUFAs aus den plastidären Membranen eine Erhöhung der Substratkonzentration innerhalb der Chloroplasten bewirkt, was in Folge zur LOX2-vermittelten Bildung von Jasmonaten führt. Das Verhältnis zu Gunsten der Jasmonsäure resultiert dabei wahrscheinlich in beiden Prozessen aus einer Aktivierung der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation. Wie bereits erwähnt wurde, wird die Expression involvierter Gene unter Seneszenz-Bedingungen erhöht. Zudem zeigen Mutanten in $\beta$  -Oxidationsweg unter diesen Bedingungen eine verminderte JA-Produktion (Cruz Castillo et al., 2004; Castillo and Leon, 2008).

Wie bereits in Kapitel 3.2 diskutiert wurde, wird über eine Beteiligung der LOX2 an der Lipoxygenierung membranveresterter PUFAs spekuliert, aus denen dann sekundär OPDA/dnOPDA durch Lipasen freigesetzt wird. Offenbar ist LOX2 zwar prinzipiell an der Bildung von Arabidopsiden beteiligt, jedoch wurde in der natürlichen und dunkelinduzierten Seneszenz im Verhältnis zur produzierten JA/OPDA-Menge kaum zusätzliche Arabidopsid-Akkumulation festgestellt. Es also scheinbar dass LOX2 ist SO, unter entwicklungsabhängigen Bedingungen freigesetzte Fettsäuren als Substrat vorzieht bzw. das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des hydrolytischen Abbaus von Arabidopsiden liegt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse, bei denen dunkelinkubierte Blätter zusätzlich verwundet wurden. Aufgrund der Membrankonstitution konnten mit zunehmender Inkubationsdauer trotz gleicher Jasmonat-Produktion immer weniger Arabidopside akkumulieren (vgl. Abbildung 30 und 31).

Aufgrund dieser Beobachtungen, ist der Beitrag von LOX2 am alternativen Syntheseweg unter diesen eher Lipase-dominierten Bedingungen als gering einzustufen. Dafür sprechen auch Applikations-Experimente, bei denen *Arabidopsis*-Keimlinge mit 150  $\mu$ M D<sub>5</sub> $\alpha$ -LeA-Lösung behandelt wurden. Nach 24 Stunden basaler Inkubation wurde ein wesentlich höherer Markierungsgrad bei den freien Jasmonaten, als bei den membranveresterten Oxylipinen festgestellt (Daten nicht dargestellt).

85

entwicklungsbedingten Während Seneszenz-Prozessen findet also neben der Metabolisierung freier PUFAs bzw. TAGs zu Acetyl-CoA, eine konkurrierende Umsetzung in 13-LOX Produkte durch das Vorhandensein von LOX2-Enzymen statt. Dabei werden einerseits 13-Hydroperoxide gebildet, die dann über weitere enzymatische Schritte zu Signalmolekülen z. B. über den AOS-Weg zu Jasmonaten metabolisiert werden. Andererseits können im Falle einer übermäßigen Hydrolyse freier PUFAs bzw. Sättigung des β-Oxidations-Apparates die freien Fettsäuren durch die LOX2-Aktivität in ungefährliche JA-Derivate metabolisiert werden. So ist bekannt, dass freie PUFAs als Detergenzien schädigend auf die verbliebenen Membranen wirken (Barclay and McKersie, 1994). Eine aktuelle Studie an der ABC-Transporter-Mutante pxa1, die im peroxisomalen Fettsäureimport eingeschränkt ist, hat die toxischen Effekte akkumulierender Fettsäuren auf Membranen und den Photosyntheseapparat deutlich gemacht (Kunz et al., 2009).

#### 3.3.4 Die osmotisch-induzierte Seneszenz ist ein stressbedingter Prozess

Aus der bisherigen Diskussion ergibt sich der Schluss, dass Jasmonate in entwicklungsabhängigen Seneszenz-Prozessen im Gegensatz zu den endogenen Faktoren eher eine geringe Rolle spielen.

Es ist jedoch bekannt, dass exogener biotischer oder abiotischer Stress zur Förderung von frühzeitiger Seneszenz beitragen kann (siehe Kapitel 1.1.4). So können zahlreiche molekulare Regulationsmechanismen, die mit der Seneszenz in Zusammenhang stehen, auch durch Jasmonate in einer Stress-Reaktion z. B. bei einem drastischen Wechsel der Umweltbedingungen oder Befall durch Pathogene induziert werden (Hinderhofer and Zentgraf, 2001; Robatzek and Somssich, 2001; Miao and Zentgraf, 2007; Ulker et al., 2007; Zentgraf et al., 2010). Um die Zusammenhänge zwischen Stress und Seneszenz zu untersuchen, wurden *Arabidopsis*-Blätter über 48 Stunden auf hyperosmotischer 500 mM Sorbitol-Lösung flottiert. Durch diese Behandlung kam es zur Ausbildung Seneszenz-ähnlicher Symptome, wie einem starken Rückgang im Chlorophyllgehalt und an plastidären Galaktolipiden.

In der vorgestellten Analyse der Oxylipine konnten jedoch deutliche Unterschiede zwischen der entwicklungsbedingten und der durch Sorbitol induzierten Jasmonat-Akkumulation festgestellt werden. Während es bei der natürlichen und der dunkelinduzierten Seneszenz zur relativ langsamen Produktion über Tage oder Wochen von vorwiegend Jasmonsäure kam, erreichte die JA/OPDA-Synthese bereits nach 24 Stunden Sorbitol-Flottierung ihr Maximum. In ähnlichen Untersuchungen konnte bereits eine Induktion nach 6 Stunden festgestellt werden (Bohlmann et al., 1998). Im Gegensatz zu natürlichen Prozessen, bei denen nur ein vergleichsweise geringer Anstieg von freier und membrangebundener OPDA verzeichnet werden konnte, kam es hier zu einer verstärkten Akkumulation von OPDA bzw.

86

abgesehen, als Eigenschaft in Verbindung mit Stress-Stimuli wie Verwundung (Buseman et al., 2006; Glauser et al., 2009; Koo et al., 2009), der Erkennung pathogener Virulenzfaktoren und der hypersensitiven Antwort angesehen (Andersson et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007). Dabei entsprachen die hier nach 24 Stunden quantifizierten Mengen immerhin einem Drittel dessen, was nach Verwundung festgestellt wurde. So fand vor allem ein Anstieg der Arabidopside A, E und G statt; ein Muster, das der verwundungsinduzierten Akkumulation ähnlich ist (vgl. Abbildung 31).

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel diskutiert wurde, bevorzugt LOX2 im basalen Modus vermutlich freiwerdende Fettsäuren, die aus dem Abbau von Membranlipiden hervorgehen. Interessanterweise fand während der osmotischen Behandlung, trotz eines ebenfalls verstärkten Abbaus der Membranlipide, eine starke Arabidopsid-Akkumulation statt. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass LOX2 hier einer Stress-bedingten Aktivierung unterliegt, die zu einer verstärkten Lipoxygenierung von Membranlipiden führt. Offenbar resultiert diese starke Induktion der Oxylipinsynthese dabei aus einer Aktivierung der Jasmonat-Kaskade, wie es nach Stress-Stimuli bekannt ist.

Ein Indikator für eine stressbedingte Auslösung eines solchen Rückkopplungsmechanismus ist dabei die Induktion von JA-Biosynthesegenen wie beispielsweise *LOX2* (Kubigsteltig et al., 1999; Devoto et al., 2005; Wasternack, 2007). Ein weiteres Gen das in Zusammenhang mit Stress induziert wird und in vielen Studien als Jasmonat-Indikator eingesetzt wurde ist *VSP1* (Mason et al., 1993; Benedetti et al., 1995; Berger et al., 2002). Sowohl ein Vergleich der *VSP1*- als auch der *LOX2*-Expression hat hier ergeben, dass im Gegensatz zur natürlichen oder dunkelinduzierten Seneszenz, eine starke Induktion durch Sorbitol-Behandlung erfolgt ist.

Wie bereits erwähnt wurde, traten durch die hyperosmotische Behandlung nach 48 Stunden Seneszenz-ähnliche Symptome auf. Die Symptome entsprachen dabei den Beobachtungen,

wie sie seit Jahrzehnten mit der exogenen Applikation von MeJA in Zusammenhang gebracht werden. So wurde bereits in den 1980er Jahren in Untersuchungen von Blättern der monokotyledonen Spezies Hafer (*Avena sativa*) eine der ersten physiologischen Reaktionen der Jasmonate beobachtet, und zwar die Ausbildung von Seneszenz-ähnlichen Symptomen nach MeJA Behandlung (Ueda and Kato, 1980). In folgenden Studien wurde an Blättern verschiedener Spezies eine Stimulation des Chlorophyll- bzw. Thylakoidabbaus und ein Rückgang der Photosynthese bzw. der Proteinbiosynthese durch MeJA festgestellt (Ueda et al., 1981; Weidhase et al., 1987b; Weidhase et al., 1987a; Hung and Kao, 1996; Bachmann et al., 2005).

Vorhergehende Studien belegen dabei im Vergleich, dass auch die Symptome nach MeJA-Behandlung durch Aktivierung der Oxylipin- bzw. Jasmonat-Synthese im Rahmen einer JA-Kaskade verursacht werden. Die hier beschriebenen Beobachtungen aus *Arabidopsis*  werden dahingehend durch Studien an Gerste *(Horeum vulgarum)* unterstützt, bei denen identische Symptome im Vergleich von Sorbitol- und MeJA-Applikation festgestellt wurden (Lehmann et al., 1995; Kramell et al., 2000)

So wurde auch in früheren Untersuchungen zur Genexpression nach MeJA-Applikation vergleichbares wie nach Sorbitol-Behandlung festgestellt. In *Arabidopsis* und in anderen Spezies tritt beispielsweise eine starke Aktivierung von 13-Lipoxygenasen (Bell and Mullet, 1993; Bachmann et al., 2005) auf. Ebenso wird die *VSP*-Expression in *Arabidopsis*, aber auch in Soya durch MeJA induziert (Benedetti et al., 1995; Berger et al., 1995).

Als ein weiteres Symptom der MeJA-induzierten Seneszenz gilt die drastische Reduzierung der Expression von Photosynthesegenen wie *Rubisco* oder *CAB* (Reinbothe et al., 1993; Reinbothe et al., 1994). Um dies im Sorbitol-System zu testen, wurde in der vorliegenden Arbeit exemplarisch die Expression einer Untereinheit des Chlorophyll-a/b-bindenden Proteins (CAB) untersucht. Entsprechend den Ergebnissen aus den vorhergegangenen Studien konnte nach 24 und 48 Stunden Sorbitol-Behandlung keine *CAB*- Expression mehr detektiert werden.

Trotz der zahlreichen Übereinstimmungen auf Ebene der Oxylipinsynthese und der Genexpression, scheint es dennoch Unterschiede zwischen endogener Stimulation z. B. durch osmotischen Stress und exogener Applikation von Jasmonten zu geben. Es wurde bereits erwähnt, dass *SAG12* eines der seneszenzspezifischsten Indikatorgene ist. So konnte hier eine Induktion der Expression nach 10 Wochen in natürlich alternden Blättern festgestellt werden, jedoch nicht während anderer Stimuli wie der Flottierung auf Sorbitol. Umso erstaunlicher sind Berichte, die eine *SAG12*-Induktion nach Jasmonat-Behandlung festgestellt haben (He et al., 2002). Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass die exogene Applikation zu teils unterschiedlichen Expressionsmustern wie die endogene Stimulation führt. Entsprechende Hinweise gibt es aus Arbeiten an Gerste-Blättern, die im Vergleich der beiden Behandlungen Unterschiede in der Induktion JA-responsiver Gene gefunden haben (Lehmann et al., 1995; Kramell et al., 2000).

Es kann also aus den genannten Ergebnissen geschlossen werden, dass die Behandlung mit hyperosmotischer Sorbitollösung als exogener Elicitor, ähnlich wie die direkte Applikation von MeJA, die Expression JA-responsiver Gene und die endogene Jasmonat-Synthese im Rahmen einer positiven JA-Kaskade induziert. In der Folge kommt es dann zu den Seneszenz-Symptomen mit Wirkung auf die Expression von Photosynthesegenen sowie zu Chlorophyll- und Lipidabbau. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, hat dieser Prozess mit der endogenen Regulation während natürlicher Entwicklungsprozesse wenig gemeinsam. Im Gegensatz zur MeJA-Behandlung, die zur Induktion einer positiven Jasmonat-Kaskade durch eine direkte Induktion der JA- Biosyntheseenzyme führt (Kubigsteltig et al., 1999; Wasternack, 2007), ist der Mechanismus der osmotischen Induktion durch Sorbitol jedoch nicht bekannt.

# 3.3.5 LOX2 ist durch die Produktion von Jasmonaten in die osmotisch-induzierte Seneszenz involviert

In der vorliegenden Arbeit konnte, soweit bisher bekannt ist, zum ersten Mal gezeigt werden, dass Pflanzen mit JA/OPDA-Defizit eine verminderte Ausprägung der Seneszenz-Symptome und damit eine verringerte Anfälligkeit gegenüber osmotischem Stress aufweisen. Dabei kann durch die hier vorgelegten Ergebnisse eindeutig eine Beteiligung der endogenen Jasmonate, die durch den osmotischen Stress-Stimulus induziert werden, belegt werden. Durch die verminderte Oxylipin-Produktion in den *LOX2* RNAi-Linien, konnten im Vergleich zum Wildtyp nach 48 Stunden Sorbitol-Inkubation geringer ausgeprägte Stress-Symptome, wie verbleibende Festigkeit der Blätter, höherer Chlorophyllgehalt, höhere Konzentrationen an verbliebenen Galaktolipiden und geringere Genexpression bestimmter SAGs festgestellt werden.

Nach vergleichbaren Analysen an Gerste-Blättern, bei denen nach 24 Stunden Sorbitol-Behandlung ein drastischer Anstieg der LOX-Produkte 13-HPOTE/HOTE bzw. 13-HPODE/HODE beobachtet wurde, hat man eine mögliche Beteiligung von LOX-vermittelten Hydroperoxiden bei der Stressantwort diskutiert (Weichert et al., 2000; Bachmann et al., 2005). Wie jedoch hier im Vergleich mit den JA/OPDA-defizienten *dde2-2* Pflanzen festgestellt werden konnte, wiesen diese eine teils noch deutlichere Unempfindlichkeit auf, obwohl diese Mutante 13-Hydroperoxide via LOX2 synthetisieren kann.

Es kann also daraus geschlossen werden, dass die seneszenzauslösenden Effekte nicht auf eine Wirkung der 13-Hydroperoxide, sondern auf eine Funktion der Jasmonate zurückzuführen sind. Dies unterstützen auch die Ergebnisse aus der Untersuchung der JA-insensitiven *coi1-16* Mutante, die eine ähnliche Verzögerung der Seneszenz-Induktion wie LOX2i und *dde2-2* gezeigt hat (Abbildung 43). Durch die Unempfindlichkeit dieser Mutante gegenüber Jasmonaten, kann diese keinen JA-Rückkopplungsmechanismus ausbilden.

Entweder unterbleiben also die starken Symptome in der Mutante durch die ausbleibende Signaltransduktion zur Aktivierung untergeordneter seneszenzfördernder Gene, oder direkte toxische Effekte werden durch das Ausbleiben einer JA-Amplifikation vermieden. In welcher Weise es durch die Sorbitol-Behandlung zur Auslösung der Jasmonat-Produktion kommt bzw. die Jasmonate schließlich die Seneszenz-ähnlichen Symptome verursachen, kann aufgrund der Ergebnisse nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Es gibt jedoch zahlreiche Signalkomponenten, die Veränderungen im osmotischen Potential detektieren können. Dahingehend könnte die *LOX2*-Expression z. B. durch Einstrom von Ca<sup>2+</sup> Ionen (Bonaventure et al., 2007) oder ROS induziert werden. So kann etwa die Bildung von Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) unmittelbar zur Induktion der JA-Biosynthesegene *LOX2, AOS* 

und *OPR3* sowie zur Bildung von OPDA und JA führen (Danon et al., 2005). Es liegt deshalb der Verdacht nahe, dass daraus möglicherweise eine Jasmonat-Amplifikation hervorgeht, die weitere Zelltodprozesse z. B. durch die zusätzliche Produktion von ROS in Gang setzt. Es ist bekannt, dass ROS bzw. die dadurch entstehende Lipidperoxidation in Zelltodprozesse im Rahmen der hypersensitiven Antwort involviert sind (Mazel and Levine, 2001; Apel and Hirt, 2004; Danon et al., 2005; Montillet et al., 2005).

Die wesentlichen Orte der ROS-Produktion sind dabei die Chloroplasten, aber auch die Mitochondrien. So hat eine neuere Studie an *Arabidopsis*-Protoplasten bestätigt, dass die exogene Applikation von MeJA zur Dysfunktion von Mitochondrien und Chloroplasten und damit zur erheblichen ROS-Produktion und zum Zelltod führt (Zhang, 2008). In diesem Zusammenhang wurde bereits in anderen Publikationen festgestellt, dass der Einsatz von Jasmonaten auf *Arabidopsis*-Blättern zu photooxidativem Stress, zur Bildung von ROS und zur Aktivierung der antioxidativen Systeme führt (Jung, 2004). Zudem konnte während MeJA-induzierter Seneszenz eine starke Akkumulation von Malondialdehyd (MDA), einem Abbauprodukt nicht-enzymatisch gebildeter Hydroperoxide, festgestellt werden (Hung and Kao, 1998). Diese Lipidperoxidation findet u.a. dann statt, wenn ein gewisser Grad an ROS-Akkumulation überschritten wird (Van Breusegem and Dat, 2006). Möglicherweise hat diese ROS-vermittelte Lipidperoxidation zusätzlich einen fördernden Einfluss auf die Symptome, wie sie hier im Wildtyp festgestellt wurden.

Ein möglicher weiterer Indikator für den ROS-vermittelten Zelltod wurde hier in Form der SAGs SEN1 und SAG13 untersucht. Im üblichen Sinne wurden diese bisher als molekulare Marker für Seneszenz-Prozesse betrachtet (Lohman et al., 1994; Oh et al., 1996; Weaver et al., 1998). Im Vergleich zum Wildtyp wurden diese Gene in den Blättern mit reduzierter Jasmonat-Produktion vermindert exprimiert (Abbildung 40). Bei anderen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hat sich aber herausgestellt, dass die Expression dieser Gene prinzipiell nicht direkt JA-responsiv ist (Daten nicht dargestellt). Das bedeutet, die verminderte Expression ist vermutlich eher auf verzögerte Seneszenz- bzw. Zelltodprozesse zurückzuführen. So hat sich auch in anderen Studien herausgestellt, dass die Alkohol-Dehydrogenase SAG13 als Indikator für Zelltodprozesse unter ROS-Beteiligung eingestzt werden kann. Beispielsweise wird das Gen nach Ozon-Stress (Miller et al., 1999), nach UV-B-Stress (John et al., 2001) aber auch in Pflanzen mit erhöhter Zelltodrate (Brodersen et al., 2002) und in Mutanten mit konstitutiver ROS-Produktion und/oder beschleunigtem Zelltod induziert (Navabpour et al., 2003; Lin et al., 2007; Jing et al., 2008; Kim et al., 2008). Zudem traten in einer weiteren Arbeit zu der ähnlichen cpr5/hys Mutante erhöhte SEN1-Level auf (Schenk et al., 2005). Neben Einzelstudien hat auch die Auswertung von microarray-Daten eine Stimulation beider Gene nach osmotischem bzw. oxidativem Stress bestätigt (Zimmermann et al., 2004). Es kann daher vermutet werden, dass die hier festgestellte

Induktion von *SAG13* und *SEN1* mit stressbedingter Seneszenz bzw. Zelltod nach Sorbitol-Behandlung in Zusammenhang steht.

#### 3.4 Jasmonate und LOX2 in der Seneszenz von Arabidopsis thaliana

Heute ist allgemein anerkannt, dass die äußere Erscheinung einer Pflanze oder eines anderen Organismus mehr ist als nur das Ergebnis ihrer genetischen Veranlagung. Vielmehr liegt im Genom die Basis dessen, was in der Summe mit allen auftretenden Umweltbedingungen das Erscheinungsbild der Pflanze bzw. deren "fitness" determiniert. Dies kann als Ergebnis aus einem schier unüberschaubaren Netzwerk aus vielschichtigen Regulations- und Signalmechanismen angesehen werden. Eine Komponente, die über die Fähigkeit zur Signaltransduktion über die Grenzen von Zellen und Organen hinaus verfügt, sind die Phytohormone. Diese sind ebenso an der pflanzlichen Entwicklung sowie an Antworten auf Verteidigungs- oder Stress-Situationen beteiligt. Durch die Vielzahl hormonell aktiver Substanzen, die im pflanzlichen Sekundärmetabolismus erzeugt werden, haben sich Unterschiede aber auch Überschneidungen in den Wirkspektren entwickelt. Wie sich am Beispiel der Blattseneszenz verdeutlicht, gibt es Hormone wie das Ethylen und die Zytokinine, die sich offenbar zu wichtigen Initiatoren bzw. Inhibitoren entwickelt haben. Andere Substanzen scheinen eher untergeordnete Prozesse zu beeinflussen, die zwar im Sinne der optimalen "performance" für eine interne Modulation auf die vorliegenden Umweltbedingungen sorgen, aber letztlich bei der Entwicklung hin zur Beendigung des Lebenszyklus keine Rolle spielen.



Abbildung 44: Modell zur Rolle von LOX2 in verschiedenen Seneszenz-Prozessen

Dies führt in permanenter Interaktion mit anderen internen Faktoren, wie dem Pflanzenalter, der Reproduktion, dem Energie- oder dem Redoxstatus zu einer Plastizität, die es der Pflanze erlaubt, auch bei Ausbleiben eines Signals unter größtmöglicher Kompensation den Seneszenz-Prozess abzuschließen.

Seit Jahrzehnten wurde die Rolle der Jasmonsäure und ihrer Derivate in der Seneszenz kontrovers diskutiert. So trägt eine Publikation von Benno Parthier aus dem Jahr 1990 den Titel: "Jasmonate-Hormonelle Regulatoren oder Stress-Faktoren in der Blattseneszenz?" (Parthier, 1990), bezeichnend für das latente Missverständnis zwischen endogener Regulation und exogener Applikation.

Durch die Analyse der LOX2i-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die endogene Erhöhung der Jasmonat-Konzentrationen in den Blättern keinen wesentlichen Einfluss auf die natürliche Seneszenz-Progression hat. Jasmonsäure und seine Derivate können somit als Signalmoleküle charakterisiert werden, die wohl weniger bei der Initiierung sondern möglicherweise eher bei der internen Modulation der Seneszenz eine Rolle spielen. Wie in Abbildung 45 verdeutlicht wird, kann der natürliche Seneszenz-Prozess anscheinend *per se* mit minimaler bzw. ohne Beteiligung von Jasmonaten ablaufen. Möglicherweise bedeutet dies jedoch eine schlechtere *fitness* im Bezug auf während der Seneszenz auftretenden biotischen oder abiotischen Stress. Diese Aspekte wurden hier aber nicht näher untersucht.

Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, handelt es sich bei der LOX2 in *Arabidopsis* also um ein Enzym, dass weniger in Entwicklungsprozesse, als vielmehr an Stress-Reaktionen beteiligt ist. Im Gegensatz zu anderen Entwicklungsprozessen wie beispielsweise der Keimung, bei der es zur Aktivierung von LOX-Enzymen kommt, die dann eine Rolle bei der Metabolisierung von Speicherlipiden oder direkt als Speicherprotein spielen (Feussner et al., 2001; Porta and Rocha-Sosa, 2002; Andreou and Feussner, 2009), reicht offenbar eine niedrige LOX2-Genexpression aus, um eine basale Versorgung mit Jasmonaten bzw. Oxylipinen und damit eine normale Entwicklung der Pflanze zu gewährleisten. Im Falle der Blattseneszenz ist die JA/OPDA-Produktion zwar von einer gewissen Enzymproduktion während der Pflanzenentwicklung abhängig, es bleibt jedoch die Frage, warum LOX2 in den Blättern ein so hoch exprimiertes Gen ist.

Wie schon oft diskutiert wurde, liegt der Schwerpunkt der LOX2-Funktion offenbar eher in der kurzfristigen Bereitstellung von 13-Hydroperoxiden für die Produktion von Signalmolekülen wie Jasmonaten, Aldehyden usw. als Antwort auf Stress im Rahmen einer aktivierten JA-Kaskade (vergleiche Kapitel 1.2.3).

Durch die Untersuchung von osmotisch-induziertem Stress, konnte eine Beteiligung von LOX2 an kurzfristig ausgelösten Seneszenz-Symptomen gezeigt werden. Es wurde dabei deutlich, dass dieser Prozess stressassoziiert ist und sich deutlich von der entwicklungsbedingten Seneszenz-Regulation unterscheidet. Im direkten Vergleich der

Seneszenz-Modelle können die durch LOX2 gebildeten Jasmonate als Stress-Hormone bezeichnet werden, die zur nicht-entwicklungsbedingten Seneszenz führen können (Abbildung 45). Es liegt also auf der Hand, dass bisherige Untersuchungen, die auf der direkten Applikation von MeJA/JA oder Arabidopsiden beruhen, kaum Aussagen über JA-vermittelte Funktionen während natürlicher Entwicklungsprozesse zulassen, sondern eher Stress-Prozesse in Gang setzen.

Überträgt man dieses System auf die zelluläre Ebene eines alternden Blattes, so könnten solche Mechanismen dazu beitragen, durch JA-induzierten Zelltod die Ausbreitung eines abiotischen oder biotischen Stressors zu vermindern. Wie bekannt ist, sind die Jasmonate zusammen mit Salicylsäure und Ethylen an der Ausbildung von ROS-vermitteltem Zelltod zur Abwehr von diversen Pathogenen beteiligt (Reinbothe et al., 2009). Auf organismischer Ebene bedeutet dies, dass durch Jasmonat-vermittelten Zelltod (Seneszenz) möglicherweise andere Gewebe bzw. Organe geschützt werden und diese im Sinne der optimalen seneszenzbedingten Reorganisation zur optimalen "*fitness"* der Pflanze beitragen könnten.

#### 3.5 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen einmal mehr auf die Komplexität des Vorganges der Blattseneszenz und auf die Schwierigkeiten der Erforschung hin. Ein wesentlicher Schritt zur Vereinfachung der Beschreibung solch komplexer Vorgänge, wäre sicherlich die Determinierung einheitlicher physiologischer und molekularer Parameter, die eine Abgrenzung zwischen der Entwicklung, entwicklungsbegleitenden und stressbedingten Prozessen ermöglichen. Wie der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen durchgeführten Studien zeigt, ist die Erforschung durch artifizielle Systeme auf physiologischer Ebene nur teilweise vergleichbar. Die Beschreibung komplexer regulativer Zusammenhänge kann nur durch Studien unter kontrollierten Bedingungen in vivo erfolgen. Der Anstieg von endogenen Jasmonaten hat unter den gewählten Bedingungen während der Blattseneszenz keine seneszenzfördernden Effekte gezeigt. Das bedeutet jedoch nicht, dass Jasmonate per se keine Funktionen während dieses letzten Entwicklungsstadiums haben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass entweder durch geringe Jasmonat-Konzentrationen bzw. über deren Akkumulation Gene reguliert werden, die in seneszenzbegleitenden Prozessen eine Rolle spielen. Die hergestellten LOX2 RNAi-Pflanzen würden sich daher besonders eignen, um mögliche Änderungen im Expressionsmuster von JA-responsiven SAGs zu erfassen, die durch die sich ändernden Jasmonat-Konzentrationen moduliert werden. Vorstellbar wären hier Gene, die in die Translokation von Nähr- oder Signalstoffen bzw. in die Aufrechterhaltung basaler Verteidigungsmechanismen involviert sind. Anschließend könnten deren physiologische Funktionen in der Seneszenz charakterisiert werden. Dazu könnte es auch durchaus sinnvoll sein, die Pflanzen gezielt unterschiedlichen Umweltbedingungen auszusetzten.

Wie diese Spekulationen verdeutlichen, ist im Gegensatz zu den tierischen Oxylipinen im pflanzlichen System noch relativ wenig über deren regulatorischen Eigenschaften bekannt. Durch die hier gemachten Untersuchungen hat sich gezeigt, dass LOX2 an der Bereitstellung von Jasmonaten während Stress-Prozessen beteiligt ist. Es können jedoch über LOX2 eine Vielzahl weiterer Oxylipine gebildet werden. Möglicherweise lassen sich also durch Untersuchungen der hier vorgestellten RNAi-Pflanzen weitere endogene Funktionen in der Entwicklung, aber auch im Zusammenhang mit pflanzlichen Stress-Reaktionen charakterisieren, die durch 13-LOX Produkte vermittelt werden. Erste Experimente haben dahingehend gezeigt, dass enzymatisch gebildete 13-Hydroperoxide möglicherweise als Substrat für eine weitere ROS-vermittelte Peroxidation unter photoinhibitorischen Bedingungen dienen. Desweiteren konnte in Verwundungsexperimenten in den LOX2i-Linien eine Verminderung bei der Induktion der Autoluminiszenz festgestellt werden. Diese Autoluminiszenz dient als Indikatorsystem für oxidativen Stress bzw. Lipidperoxidation. Offenbar ist also LOX2 indirekt auch an der Akkumulation nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine beteiligt. So können mit Hilfe der LOX2 RNAi-Pflanzen Effekte, die durch 13-Hydroperoxide bzw. deren Metabolite reguliert werden, durch den Vergleich zu JAdefizienten Pflanzen, wie beispielsweise der dde2-2 Mutante, von den Jasmonat-vermittelten Signalen unterschieden werden. Andererseits könnten auf diesem Wege durch weitere metabolomische Charakterisierungen neue biologisch relevante Oxylipine identifiziert werden.

# 4 Materialien

# 4.1 Chemikalien, Enzyme

Die handelsüblichen Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der entsprechenden Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen).

# 4.1.1 Spezielle Chemikalien

2-Mercaptoethanol Agarose electrophoresis grade Bacto-Agar Bromphenolblau Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Diethylpyrocarbonat (DEPC) D-Sorbitol Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Gamborg B5-Vitamine Glycerin 98%, wasserfrei Glycogen Hefeextrakt Imidazol Murashige & Skoog (MS) Salze (Art. Nr.: MO254) Myo-Inositol N-Lauroylsarcosyl Silwet L-77 Natriumdodecylsulfat (SDS) Triton X-100 Tween 20

# 4.1.2 Antibiotika

Ampicillin Kanamycin Rifampycin

# 4.1.3 Enzyme

Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase (CIAP) Absolute QRT-PCR SYBR Green Mix DNAse I Amplification Grade Merk (Darmstadt) Lift Technologies (Paisley, Schottland) AppliChem (Darmstadt) Sigma (Deisenhofen) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) Duchefa (Haarlem, NL) AppliChem (Darmstadt) Fermentas ((St. Leon-Rot) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) Duchefa (Haarlem, NL) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) Lehle Seeds (Round Rock, USA) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt)

AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt) AppliChem (Darmstadt)

MBI Fermentas (St. Leon-Rot) Thermo Fischer (Hamburg) Invitrogen (Karlsruhe) M-MLV Reverse-Transkriptase *Pfu*-DNA-Polymerase Restriktionsenzyme RNAse H T4-DNA-Ligase *Taq*-DNA-Polymerase

# 4.1.4 Andere Reagenzien, Materialen und Kits

Acquity UPLC BEH C8 Säule Acquity UPLC BEH C18 Säule Anti-Digoxigenin-AP CDP-Star Chemoluminiszenz-Substrat Desoxynucleotide (dNTP) **DIG Blocking Reagent DIG Easy Hyb Granules** DNA-Leiter GeneRuler 1 kb DNA-Leiter GeneRuler 100 bp E.Z.N.A. Plant RNA Mini Kit Medical X-Ray films 100 NIF NucleoBond PC 100 (Plasmid Midi Kit) NucleoSpinR Extract II Nylonmembran PCR DIG Probe Synthesis Kit **QIAquick PCR Purification** X-Ray Entwickler XL 24 X-Ray Fixierer AL 4

# 4.2 Standardsubstanzen

<sup>18</sup>[O]<sub>2</sub> Oxo-Phytodiensäure

Dihydrojasmonsäure

Digalactosyl-Diacylglycerol (DGDG-18:0-18:0) Monogalactosyl-Diacylglycerol (MGDG-18:0-18:0) Margarinsäure (n-Heptadecansäure)

# 4.3 Laborgeräte

Agarose-Gel Dokumentation Analysenwaage

Autoklav

Promega (Mannheim) MBI Fermentas (St. Leon-Rot) MBI Fermentas (St. Leon-Rot) Invitrogen (Karlsruhe) MBI Fermentas (St. Leon-Rot) MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

Waters (Milford, MA, USA) Waters (Milford, MA, USA) Roche Diagnostics (Mannheim) Roche Diagnostics (Mannheim) MBI Fermentas (St. Leon-Roth) Roche Diagnostics (Mannheim) Roche Diagnostics (Mannheim) MBI Fermentas (St. Leon-Roth) MBI Fermentas (St. Leon-Roth) Omega Biotek (Norcross, USA) Fuji Photo Film (Tokyo, Japan) Macherey & Nagel (Düren) Macherey & Nagel (Düren) Roche Diagnostics (Mannheim) Roche Diagnostics (Mannheim) Qiagen (Hilden) Kodak (Stuttgart) Kodak (Stuttgart)

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg Matreya (Pleasant Gap, USA) Matreya (Pleasant Gap, USA) Fluka (Neu-Ulm)

Intas (Göttingen) BP211D und Laborwaage 1600, Sartorius (Göttingen) Systec 5075ELV, Tuttnauer (NY, USA)

Acquity<sup>™</sup> Ultra Performance LC, Flüssigkeitschromatografie: Ultra high – Performance - Liquid-Waters (Milford, MA, USA) Chromatography(UPLC) Gefriertrocknung Alpha 2-4, Christ (Osterode) Thermomixer compact. Heiz- und Schüttelblöcke Thermomixer 5436 Thermostat plus, Eppendorf (Hamburg) Hybridisierungsofen HL-2000HybriLinker, Peglab (Erlangen) Inkubator 28°C / 37°C Thermo Scientific Heraeus B6120 Klimaschrank AR-66L, Percival Scientific (USA) 5417R und 5804. Kühlzentrifugen Eppendorf (Hamburg) Massen-Spektrometer Quattro Premier XE triple-guadrupole mass spectrometer, Waters (Milford, MA, USA) Mikroskop Leica EZ4D Stereomikroskop, Leica Camera AG (Solms) PCR- Geräte Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler, Thermo Fischer (Hamburg); Mastercycler, Eppendorf (Hamburg) pH-Meter HI 9321 pH-Meter, Hanna Instruments (Kehl) Mastercycler ep realplex S, gRT-PCR-Geräte Eppendorf (Hamburg); Light Cycler, Roche Diagnostics (Mannheim) Querstromsterilbank Ceag Envirco (Dortmund) Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18; RVC2-25, Heraeus-Christ (Osterode) mit Membranvakuumpumpe MZ 2C, Vacuubrand (Wertheim) Schwingmühle MM 301, Retsch (Haan) GeneQuant II, Pharmacia Biotech; Spektralphotometer Nanodrop 1000, Thermo Scientific (Hamburg) Nährmedien 4.4 Agrobakterien-Testmedium 10 g Lactose, 1 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Agar LB-Medium 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl (pH 7,0); für Festmedium 15 g/l Bacto-Agar SOB-Medium 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl (pH 7.0) YEB-Medium 5 g Beefextrakt, 5 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 5 g Saccharose, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> (pH 7,2) MS-(Murashige & Skoog)-Medium 4.8 g/l MS-Salze (inkl. MES), 30 g/l Saccharose, 1 ml/l B5-Vitamine, 100mg/l Myo-Inositol, 1 ml/I B5-Vitamine (pH 5.7);

für Festmedium 9,2g/l Microagar

# 4.4.1.1 Antibiotika-Stocklösungen: Endkonzentrationen

Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml in Ethanol	50 µg/ml

Alle Medien wurden 30min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Komponenten, wie die verwendeten Antibiotika, wurden vor Zugabe sterilfiltriert und nach Abkühlung des Mediums zugegeben.

# 4.5 Puffer und Lösungen

Benedicts-Reagenz Blockierungslösung	173 g Na-Citrat + 100 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 700 ml H <sub>2</sub> O lösen, 17,2 g CuSO <sub>4</sub> in 200 ml H <sub>2</sub> O lösen; beide Lösungen ad 1 l 10 % Blocking Reagent in 100 mM
DIG Detektionspuffer (10x) DIG Waschpuffer (10x) DNA-Extraktionspuffer	Haleinsaure, 150 min NaCl; auf pH 7,5 in H <sub>2</sub> O- DEPC 1 M Tris/HCl, 1 M NaCl (pH 9,5) 10x Maleinsäurepuffer, 3% Tween 20 0,22 M Tris-HCl (pH 7,8), 22 mM EDTA, 0,8 M NaCl, 140 mM Mannitol,
H <sub>2</sub> O-DEPC Maleinsäurepuffer (10x) Plasmid-Mini-Preparation Lösung 1 Plasmid-Mini-Preparation Lösung 2	1% N-Lauryisarcosin, 8,0% CTAB $0,1\%$ DEPC $\rightarrow$ ü.N., RT $\rightarrow$ autoklavieren 1 M Maleinsäure (pH 7,5), 1,5 M NaCl 50mM Glukose, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 N NaOH, 1% SDS
Plasmid-Mini-Preparation Lösung 3	5 M KAc (pH 4,8)
RNA-Ladepuffer	76 μl 5x RNA-Laufpuffer, 126 μl 37% Formaldehyd, 378 μl Formamid, 76 μl 10x DNA-Ladepuffer, 5 μl Ethidiumbromid (5mg/ml)
RNA-Laufpuffer (5x)	200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, 0,1 % DEPC; auf pH 7,0
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat; auf pH 7,0
TAE-Puffer (50x)	40 mM Tris-Acetat,1 mM EDTA
TBE-Puffer (5x)	54 g Tris, 27,5 g H $_3$ BO $_3$ , 20 ml 0,5 M EDTA; auf pH 8,3
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4
TB-Puffer	55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, 10 mM PIPES, pH 6,7

# 4.6 Verwendete Organismen

# 4.6.1 Bakterienstämme

# Escherichia coli:

Für die Klonierungsarbeiten wurden die *E. coli* Stämme DH5α und TOP10 verwendet. Die Kultivierung erfolgte je nach Verwendung in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 37°C und 250 rpm oder auf LB-Festmedium bei 37°C im Inkubationsschrank.

# Agrobakterium tumefaciens:

Für die "*Floral dip*"-Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 (Strp<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>) verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder auf YEB-Agarplatten im Inkubator oder in YEB-Flüssigmedium im Wasserbadschüttler bei jeweils 28°C.

# 4.6.2 Pflanzen

# Arabidopsis thaliana(L.):

Folgende Wildtypen und transgene Linien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Col-0	Wildtyp "Columbia 0"
Col-gl	Wildtyp "Columbia glabrous"
SAG13::LOX2i	LOX2 RNAi (seneszenz-induziert)
SAG13::AOSi	AOS RNAi (seneszenz-induziert)
35S::LOX2i	LOX2 RNAi (konstitutiv)
dde2-2	AOS knock-out Mutante; Col-0 Hintergrund
	(von Malek et al., 2002)
coi1-16	COI1 knock-out Mutante; Col-gl Hintergrund
	(Feys et al., 1994)

# 4.7 Plasmide

# pGEM-T-easy (Promega, Mannheim)

Dieser linearisierte Klonierungsvektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er weist eine Größe von 3015 bp auf und trägt an den 3'-Enden jeweils einen Thymidin-Überhang zur Aufnahme von PCR-Produkten. Der Vektor enthält die T7 und SP6 RNA Polymerase Promotoren, welche eine *multiple-cloning-site* (MCS) flankieren und verfügt über das Gen für die Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

# pSTBlue-1 (Novagen, Madison, USA)

Dieser Vektor wurde ebenfalls zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er besitzt eine Größe von 3851 bp und enthält die T7 und SP6 RNA Polymerase Promotoren, welche eine MCS flankieren. Weiterhin trägt er die Gene für die Ampicillin- sowie die Kanamycin-Resistenz.

### pHANNIBAL (Wesley et al., 2001)

Sekundärer Klonierungs- und Expressionsvektor zur Klonierung von *"hairpin"* hpRNA-Interferenz-Konstrukten (5824 bp). Der Vektor besitzt einen konstitutiven CaMV35S-Promotor hinter dem ein artifizielles Intron von zwei MCS flankiert wird. Diese MCS dienen der Aufnahme von DNA-Fragmenten des Zielgens in *sense-* bzw. *antisense-* Orientierung. Die RNAi-Expressionskassette wird von einem Terminator abgeschlossen. Der Vektor verfügt weiterhin über eine Ampicillin-Resistenz sowie über *Notl-*Restiktionsschnittstellen, die eine Übertragung der gesamten RNAi-Kassette in einen binären Vektor erlauben (siehe Anhang).

### pART27 (Gleave, 1992)

Binärer Vektor zur Transformation von *A. tumefaciens* bzw. *A. thaliana*. Dieser Vektor mit einer Größe von 10,9 kb enthält neben einer Kanamycin-Resistenz die von *left-* und *right border* begrenzte T-DNA. Auf dieser befindet sich eine MCS u.a. zur Aufnahme der *NotI* RNAi-Kassette aus dem pHANNIBAL.

### 4.8 Computersoftware und Internetadressen

Microsoft Office 2007 CorelDraw X3 Version 13 Vector NTI Suite 6.0 Roche LightCycler ® Probe Design Software 2.0 Statsoft STATISTICA Waters Masslynx/Quanlynx

http://www.ncbi.nlm.nih.gov http://www.arabidopsis.org http://www.genevestigator.ethz.ch http://multalin.toulouse.inra.fr

# 5 Methoden

# 5.1 Molekularbiologische Methoden

### 5.1.1 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Als Matrize (Template) wurden je nach Aufgabenstellung sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA aus Arabidopsis thaliana eingesetzt. Durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide (Primer) war es möglich spezifische Restriktionsschnittstellen an die entstehenden PCR-Produkte anzufügen. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurden sowohl Taq- (Thermus aquaticus) als auch Pfu-DNA-Polymerase (Pyrococus furiosus) verwendet. Für Klonierungen wurden diese im Mix 10:1 (v/v) eingesetzt. Pfu-Polymerase verfügt gegenüber der Taq-Version über eine 3`-5`-Exonuklease-Aktivitat zur Korrektur falsch eingebauter Nukleotide.

10-100 ng
1 x
1.5 mM
0.2 mM
0.15 pmol
0.15 pmol
1-2 U
ad 25 µl

Programm	Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95	1
Denaturierung Anlagerung Elongation	45 s 45 s 45-60 s	95 40-60 72	35
Finale Elongation	10 min	95	1

Fragment	Primerkombination $5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ}$	Amplifikat (bp)
pHANintron	GATGTGTAAGACGAAGAAGATAAAAGTTG	548
	CCTTGTTTATTCATGTTCGACTAATTC	
SAG13intern	AGACCGATGGCCACTTAATTATTGG	je nach
	CAACTTTTATCTTCTTCGTCTTACACATC	Konstrukt
S35intern	TGAGACTTTTCAACAAAGGATAATTTCG	je nach
	CAACTTTTATCTTCTTCGTCTTACACATC	Konstrukt
npt2	CCCATGGTTGAACAAGATGGATTGACAGC	800
	GTCTAGATCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG	

Tabelle 9: Oligonukleotide zum Nachweis von RNAi-Konstrukten in transgenen Bakterien und Pflanzen

Fragment	Primerkombination	Amplifikat
	<b>5</b> ` → <b>3</b> `	(bp)
LOX2_RNAi	TCTAGACTCGAGAGTTTGAGCGCATTTACG	455
At3g45140	Xbal/Xhol	
	ATCGATGGTACCGAGAATATCATCTTGAGC	
	Clal/Kpnl	
AOS_RNAi	TCTAGACTCGAGCGGTTTACCAATCGTAGGACC	489
At5g42650	Xbal/Xhol	
	ATCGATGGTACCGTTCCGTCGCTGGAACC	
	Clal/Kpnl	
OPR3_RNAi	TCTAGACTCGAGGAATGCGATTCGAGCTGG	639
At2g06050	Xbal/Xhol	
	ATCGATGGTACCCCAACAACTGGATCTTGAG	
	Clal/Kpnl	
SAG13_Promotor	GTCGACACGGCTCATCTCTGGTCATTGC	1662
At2g29350	Sall/Mlul	
	CCCGGGCTCGAGCATTCCTTGTTAAATATC	
	Smal/Xhol	

Tabelle 10: Oligonukleotide zur Herstellung von PCR-Fragmenten für die Klonierung von RNAi-Konstrukten.Die Oligonukleotide enthielten jeweils am 5`-Ende die angegebenenRestriktionsschnittstellen.

### 5.1.2 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Bakterielle Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch meist palindromische DNA-Sequenzmotive von 4 bis 10 bp und können diese innerhalb des Erkennungsmotivs oder in einem Abstand von einigen Basenpaaren hydrolysieren. Die dabei entstehenden Schnittstellen können nach Spezifitat der Endonukleasen kohäsive oder glatte Enden aufweisen.

0.5-15 µg
1-2 U/µg
1/10 Vol.
ad 10-20 µl

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde für ein bis drei Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionansätze entweder sofort elektrophoretisch aufgetrennt oder zuvor einer Dephosphorylierungsreaktion unterzogen.

#### 5.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation linearisierter Vektor-DNA ohne den Einbau von DNA-Fragmenten bei Ligations-Reaktionen zu verhindern, wurden 5'-endständige Phosphatreste enzymatisch durch Einsatz der *Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase* (CIAP) entfernt. Die Restriktionsansätze wurden direkt nach der Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen mit 1 µl CIAP inkubiert. Dazu wurde die DNA zur Dephosphorylierung 15 min bei 37°C inkubiert und nach 15 min bei 65°C und erneuter Zugabe von 1 µl CIAP erneut 15 min bei 37°C belassen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die benötigten Fragmente aus dem Gel eluiert.

Reaktionsansatz	
DNA	0.5-15 µg
CIAP-Enzym	1+1µl
10 x Reaktionspuffer	1/10 Vol.
steriles H <sub>2</sub> O	ad 30-50 µl

### 5.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurden 0,7-2,5%ige ([w/v] in TAE-Puffer) Gele verwendet. Diese Gele wurden mit je 0,2 µg/µl Ethidiumbromid versetzt, um nach Abschluss der Elektrophorese die DNA-Banden unter UV-Licht (364 nm) zu lokalisieren. Zur Erhöhung der Dichte der Proben und zur Markierung der Lauffront, wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin) versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TAE-Puffer, in dem das mit DNA Proben beladene Gel bei einer Spannung von 80-120V für etwa 1-1,5 Stunden belassen wurde. Anschließend konnte die Auftrennung unter UV-Licht dokumentiert werden.

# 5.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden, wenn benötigt, die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) entsprechend der Anleitung des Herstellers aus der Gelmatrix isoliert.

# 5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet, welche die freien 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent verbindet. Dabei konnten sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpft werden. Die Menge an Insertions-DNA wurde bei einem gewünschten Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 mit der Formel:  $3 \times 50ng \times Länge Insert (bp) /Länge Vektor (bp)$  berechnet.

<u>Reaktionsansatz</u>	
linearisierte Vektor-DNA	50-200ng
T4 DNA-Ligase	1U/µg DÑA
10x Ligase-Puffer	1/10 Vol.
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation wurde entweder für 2 Stunden bei RT oder für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter *E.coli* Zellen verwendet.

### 5.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Um erfolgreich Klonierungs- und Expressionsplasmide in Bakterien einzuschleusen, mussten diese vorher chemisch kompetent gemacht werden.

# 5.1.7.1 Escherichia coli

Für die Klonierungsarbeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit *E. coli* Zellen vom Typ DH5α oder TOP10 verwendet. Zunächst wurde eine Bakterienkolonie in 25 ml LB-Medium angeimpft und in einem 250 ml Kolben 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Aus dieser Starterkultur wurden 4 ml Bakteriensuspension entnommen und damit 250 ml SOB-Medium inokuliert. Die Kultur wurde üN bei 18°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur nach Erreichen einer  $OD_{600} = 0,55$  für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 2500 x g, 10 min bei 4°C durch Zentrifugation geerntet. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Bakterien in 80 ml eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer erneut resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO wurden die Bakterien 10 min auf Eis belassen und schließlich in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

# 5.1.7.2 Agrobacterium tumefaciens

Zur Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien wurden zunächst Bakterien vom Stamm LB4404 in 3 ml YEB-Medium angeimpft und üN bei 28°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml YEB-Medium mit 1 ml der Übernachtkultur angeimpft und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Bakterien bei 4°C 20 min bei 5.000 rpm geerntet. Das Bakterien-Pellet wurde in 5 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert und erneut 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden nun in 10 ml kaltem YEB-Medium vorsichtig resuspendiert und mit 1,4 ml 87% Glycerin versetzt. Aliquots von je 200 µl Suspension wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 5.1.8 Transformation von Bakterien

#### 5.1.8.1 Escherichia coli

Ein 100 µl Aliguot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit mindestens 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 30 min auf Eis Die DNA die erfolgte inkubiert. Aufnahme der in Bakterienzellen durch Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 90 s. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien mit 900 µl LB-Medium versetzt und schüttelnd 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika zur Selektion ausplattiert und 12 - 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis, dass die Bakterien die Plasmide mit der gewünschten DNA-Sequenz aufgenommen haben, wurde anschließend ein PCR-basiertes "*colony-screening"* und eine Mini-Präparation der Plasmid-DNA mit anschließender Restriktion durchgeführt.

### 5.1.8.2 Agrobacterium tumefaciens

Kompetente Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1,5 µg aufgereinigter Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation vermischt und 5 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach 5 min bei 37°C Hitzeschock-behandelt. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurden 800 µl YEB-Medium zugegeben und die Bakterien für 3 Stunden bei 28°C leicht schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden die Agrobakterien auf YEB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert und für 2 – 3 Tage bei 28°C selektiert. Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation wurden ein PCR-basiertes *"colony-screening"*, sowie ein Agrobakterien-spezifischer Farbnachweis durchgeführt.

### 5.1.9 Identifizierung transformierter Bakterien

### 5.1.9.1 Colony-Screening von E. coli

Zur Untersuchung der auf den Selektionsplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 20  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O in einem Reaktionsgefäß resuspendiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l der Suspension direkt als Template in eine PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie das Programm entsprachen den Bedingungen unter Kapitel 5.1.1. Die verbliebenen Bakterien wurden zur Inokulation einer Flüssigkultur für weitere Untersuchungen verwendet.

# 5.1.9.2 Colony-Screening von Agrobacterium tumefaciens

Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Agrobakterien konnten diese nicht direkt für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Stattdessen wurden die zu testenden Einzelkolonien in 3 ml YEB-Medium üN bei 28°C angezogen. 500 µl der Bakteriensuspension wurden in Reaktionsgefäßen bei 7.500 rpm, 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet mit 500 µl H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Bakterien 10 min bei 95°C aufgeschlossen. Nach 5 min Abkühlung auf Eis wurde das Bakterienlysat bei 10.000 rpm, für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand anschließend in ein neues Gefäß überführt. 15 µl des klaren Bakterienlysats wurden dann direkt in eine PCR als Template eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie das Programm entsprachen den Bedingungen wie unter Kapitel 5.1.1.

Zusätzlich zur PCR-vermittelten Identifizierung transgener Agrobakterien, wurde noch ein spezifischer Farbnachweis durchgeführt. Dieser Nachweis stellt sicher, dass die vorhandenen Bakterienkolonien tatsächlich von Agrobakterien gebildet wurden. Hierzu wurden die durch PCR getesteten Kolonien auf Lactose-Agar Testplatten ausgestrichen und für 2 – 3 Tage bei 28°C inkubiert, bis starkes Bakterienwachstum sichtbar war. Anschließend wurden die Platten mit Benedicts-Reagenz überschichtet und für ca. 1 Stunde bei RT inkubiert. Durch Bildung einer orange-roten Färbung im Bereich der Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass es sich um Agrobakterien handelt. Nur diese können aus der Lactose in den Testplatten Ketolactose produzieren, die mit den Kupferionen aus dem Benedicts-Reagenz reagiert. Dabei entsteht Cu<sub>2</sub>O mit charakteristischer orange-roter Färbung. Andere Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder auch Hefen können keine Ketolactose bilden. Im Bereich dieser Organismen tritt daher kein Farbumschlag auf.

### 5.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

### 5.1.10.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Hierbei wurden zunächst 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtkultur 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung 1 (siehe unter Kapitel 4.5) resuspendiert. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l bsung 2 wurde vorsichtig gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 150  $\mu$ l Lösung 3 zugegeben. Nach ein er Inkubation für 5 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm, 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm, RT wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit 600  $\mu$ l Isopropanol in einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm, 4°C) pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 70% EtOH, wurde dieses getrocknet und in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 0,5  $\mu$ l RNase H (2 mg/ml) gelöst.

# 5.1.10.2 Plasmid-Midipräparation:

Die Präparation größerer Mengen qualitativ hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben des MIDI-Kits Nucleo-Bond®-PC 100 (Macherey & Nagel). Die Plasmid-DNA wurde standardmäßig mit einem Volumen von 50 µl von der Säule eluiert.

#### 5.1.11 Herstellung von Glycerinkulturen

Die vorübergehende Aufbewahrung von Bakterien erfolgte auf Agarplatten bei 4°C. Zur längerfristigen Konservierung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 150 µl einer Bakterienkultur mit 650 µl sterilem Glycerin versetzt, inüßsigem Stic kstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

# 5.1.12 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Gesamt-RNA wurde an einem Spektralphotometer durchgeführt.

# 5.1.13 Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA wurde am Lehrstuhl fur Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut (Würzburg) mit einem Li-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

Primer	Primersequenz 5` → 3`
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC
pHAN101	GAATTAGTCGAACATGAATAAACAAGG
pHAN201	CAACTTTTATCTTCTTCGTCTTACACATC

Tabelle9:OligonukleotidezurSequenzierungvonDNA-SequenzeninnerhalbvonKlonierungsvektoren.

### 5.1.14 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Für die DNA-Isolation zur Genotypisierung transgener Pflanzen wurden 100-150 mg Pflanzenmaterial in einem Schraubdeckelreaktionsgefäß in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und 1 min bei 20 Hz in der Kugelmühle pulverisiert. Anschließend wurden 750 µl DNA-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform zugegeben, die Probe homogenisiert und bei 65°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 7500 rpm, 10 min bei 4°C wurde der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Zur Pelettierung der DNA wurde die Probe bei 14.000 rpm, 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pelett 2 x mit 75% EtOH gewaschen (jeweils Zentrifugation 14.000 rpm, 1 min, 4°C). Die DNA wurde anschließend getrocknet und daraufhin in 20 µl ddH<sub>2</sub>O rückgelöst.

# 5.1.15 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung pflanzlicher RNA erfolgte aus 50-100 mg Frischmaterial bzw. aus 5-10 mg gefriergetrocknetem Material mit Hilfe des E.Z.N.A. Plant RNA Mini Kit (Omega Biotek). Die Extraktion aus Blattmaterial wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Standardprotokoll durchgeführt.

# 5.1.16 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurde eine elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA mit Hilfe eines denaturierenden Agarosegels durchgeführt. Für ein 1,2% iges Gel wurden 1,2 g Agarose in 62,5 ml sterilem  $H_2O$  durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 20 ml 5x RNA Laufpuffer und 17,5 ml 37 % Formaldehyd zugegeben. Nach dem Mischen wurde die Agaroselösung in einen Gelträger gegossen. Jeweils 3  $\mu$ l RNA wurden mit 10  $\mu$ l RNA-Ladepuffer (ad 20  $\mu$ l) versetzt, 10 min auf 65°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x RNA-Laufpuffer bei 80 V für 2 Stunden.

### 5.1.17 DNase-Verdau und Fällung der RNA

Um störende genomische DNA zu entfernen, wurde nach der RNA-Isolation eine DNase I Restriktion durchgeführt. Um die RNA anschließend in reinem Zustand, ohne die zum Verdau benötigten Komponenten zu erhalten, wurde diese ausgefällt und in DEPC-H<sub>2</sub>O rückgelöst. Dazu wurde zunächst 1 µg Gesamt-RNA in 8 µI DEPC-H<sub>2</sub>O in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I (1U/µl) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde anschließend 1 µl 25 mM EDTA zugegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Der abgestoppte DNase-Verdau wurde mit 9 µl DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Zur Fällung der RNA wurden 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 2,1 µl 5 M Ammoniumacetat und 25 µl Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht (mindestens jedoch zwei Stunden) bei -20°C gefällt.

### 5.1.18 cDNA Synthese

Die ausgefällte RNA wurde für 15 min bei 14.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 500  $\mu$ l EtOH (75%) durch kurzes Durchmischen und erneutes Zentrifugieren für 8 min bei 14000 rpm, 4°C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet bei RT getrocknet und anschließend auf Eis in 7  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. In einem PCR-Gefäß wurden 2  $\mu$ l 5x RT-Puffer mit 0,5  $\mu$ l dNTPs (10 mM) und 0,4  $\mu$ l Oligo-dT-5′-CDS-Primer (100  $\mu$ M) zusammengegeben, 6,7  $\mu$ l der gelösten RNA zugefügt und für 5 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden nachfolgend auf Eis abgekühlt, 0,4  $\mu$ l Reverse-Transkriptase zugegeben und 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Zur Denaturierung des Enzyms erfolgte anschließend eine 15 minütige Erhitzung auf 70°C. Die fertigen cDNAs wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit HPLC-H<sub>2</sub>O 1:20 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

# 5.1.19 Quantitative RT-PCR

Bei der quantitativen *Realtime*-PCR Technologie handelt es sich um eine hochsensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffes (*SYBR Green*), der während einer PCR-Reaktion in die entstehenden Amplifikate interkaliert, können anhand der aufgezeichneten Fluoreszenz-Kinetik Rückschlüsse auf die Menge der Ausgangs-DNA gezogen werden. Zusätzlich kann durch Schmelzpunkt-Analyse der Amplifikate die Spezifität der PCR-Reaktion überprüft
werden. In dieser Arbeit wurde diese Technik verwendet, um relative Unterschiede in der Expression bestimmter Gene aus verschiedenen cDNA-Proben zu untersuchen.

Zur Quantifizierung bestimmter Genprodukte wurden dazu 2 µl der verdünnten cDNA in einer 96-Loch PCR-Platte mit 10 µl ABsolute QRT-PCR SYBR Green Capillary Mix (Thermo Fischer) und 8 µl eines entsprechenden Primermix versetzt. Neben den cDNAs der zu untersuchenden Proben wurde als Negativkontrolle HPLC-H<sub>2</sub>O verwendet. Als Standardreihe zur Quantifizierung dienten 20, 2, 0,2 und 0,02 fg des jeweiligen PCR-Produktes in 2 µl HPLC-H<sub>2</sub>O. Als Bezugsgene für die Quantifizierung wurden die Gene Actin 2 und 8, für die je ein gemeinsamer forward und reverse Primer vorlag, verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich in Tabelle 13. Die gRT-PCR wurde in einem Eppendorf Realplex Mastercycler<sup>®</sup> nach dem in Tabelle 12 angegebenen PCR-Programm durchgeführt. Alle Arbeiten wurden mit sterilen sowie nicht-Nukleinsäure absorbierenden Kunststoffprodukten durchgeführt.

Reaktionsansatz

cDNA SYBR-Green\_Mix Primer 1 Primer 2

2μl (1:20; ± 50ng total RNA) 10 μl 8 μl (12/24 pmol) 8 μl (12/24 pmol)

Programm	Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung Anlagerung Elongation Messung	15 s 20 s 20 s 10 s	95 58 72 79	45
Finale Denaturierung	10 s	95	1
Kühlung	8	10	1

#### Tabelle 10: PCR-Programm der qRT-PCR im Eppendorf Realplex Mastercycler

Gen	Primersequenz forward (5`→3`)	Primersequenz reverse (5`→3`)	Amplifikat (bp)
Act2/8 At5g09810 At1g49240	GGTGATGGTGTGTCT	ACTGAGCACAATGTTAC	434
<b>AOS</b> At5g42650	CCATACATTTAGTCTACCAC	GCTAATCGGTTATGAACTTG	243
CAB At1g29910	GTCAAGTCTACTCCTCAGAG	GTAGTCAAGCCCTCCTTCTG	314
<b>CLH1</b> At1g19670	TAGCCCCACAGTTGTGCA	TTGATCCAGTCGCAGGAACT	260
LOX2 At3g45140	GTACGTCTGACGATACC	TCTGGCGACTCATAGAA	398

<b>SAG13</b> At2g29350	TGTCCTTGGTATATCACAACT	TTCATAGATTATGGATGCGG	414
<b>SAG12</b> At5g45890	GCTGTGACCCCTATCAAG	GATCCGTTAGTAGATTCGC	487
<b>SEN1</b> At4g35770	AACATGTGGATCTTTCAAGTGCC	GTCGTTGCTTTCCTCCATCG	96
<b>VSP1</b> At5g24780	ACAAAGAGGCATATTTTAC	GGTTCAATCCCGAGTTCAA	241

Tabelle 11 Oligonukleotide zur Amplifikation der in der qRT-PCR untersuchten cDNA

#### 5.1.20 Southern-Hybridisierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kopienzahl der übertragenen T-DNA-Sequenzen in einigen transgenen Linien mit Hilfe von Southern-Analysen überprüft. Für einen Southern-Blot wurden jeweils 15-20 µg genomischer DNA einer Pflanze mit durchschnittlich zwei verschiedenen Restriktionsenzymen in getrennten Reaktionsansätzen hydrolysiert. Dazu wurden die Restriktionsansätze mit je 1 µl der jeweiligen Enzyme bei deren optimaler Temperatur für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde der Vorgang unter weiterer Enzymzugabe wiederholt.

Reaktionsansatz

DNA	15-20 µg
10x Reaktionspuffer	1/10 Vol.
Enzym	(10 U/µl) 2µl
Steriles H <sub>2</sub> O	ad 30µl

Das entstandene Fragmentgemisch wurde auf einem 0,7%igen Agarosegel bei 25 V über 14 Stunden aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend zur Depurinierung 10 min in 0,25 N HCl geschwenkt, daraufhin mit H<sub>2</sub>O gespült und wiederum für 30 min in 0,6 M NaCl/0,5 M NaOH geschwenkt (Denaturierung). Im Anschluss folgten zur Neutralisierung 30 min in 0,5 M Tris/1,5 M NaCl Lösung (pH 7,5). Danach wurde die DNA aus dem Gel mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Gel in einer Glaswanne über eine Lage Whatman-Papier mit 20x SSC-Puffer in Kontakt gebracht und äquilibriert. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Papier gelegt und mit einer Nylonmembran belegt. Darauf folgten 3 weitere Blätter Whatman-Papier. Den Abschluss bildete eine ca. 10 cm hohe Schicht aus Zellstoff, die mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert wurde, um den Kapillarschluss sicherzustellen. Nach einer Transferzeit von 16 Stunden wurde die Membran für 2 min mit UV-Licht bestrahlt, was zur einer kovalenten Bindung der DNA auf der Membran führt.

## 5.1.20.1 Sondenherstellung

Zur Detektion der T-DNA-Insertionen in den RNAi-Linien wurden Digoxigenin (DIG) markierten Sonden mit denen unter Kapitel 5.1.1 genannten Oligonukleotiden für AOS bzw. LOX2 mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kits (Roche Diagnostics) hergestellt. Dazu wurde eine spezielle PCR durchgeführt, bei der im Nukleotid-Mix (2 mM) teilweise die dTTPs (1,3 mM) durch DIG-11 dUTPs (0,7 mM) ersetzt sind. Die PCR erfolgte nach Anweisungen des Herstellers:

Reaktionsansatz Template PCR Puffer + MgCl <sub>2</sub> PCR DIG Probe Synthesis Mix Primer 1 Primer 2 Enzym Mix Steriles H <sub>2</sub> O		25-50 ng genomische DNA 1 x 200 μM (dATP,dCTP,dGTP), 130 μM gTTP, 70 μM DIG dUTP 0.1 μmol 0.1 μmol 0,75 μl ad 50 μl			
	Programm		Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
	Initiale Denaturieru	ng	2 min	95	1
	Denaturierung Primerbindung Elongation		30 s 30 s 40 s	95 50-60 72	30
	Finale Elongation	า	7 min	72	1



Zur Kontrolle wurde ein entsprechender PCR-Ansatz mit dem Zusatz von unmarkierten dNTPs durchgeführt.

## 5.1.20.2 Hybridisierung und Detektion

Nach dem Nukleinsäuretransfer wurde die Membran zur Hybridisierung mit der Sonde in eine Inkubationsröhre überführt und im Hybridisierungsofen bei 42°C für 1 Stunde mit je 7-10 ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) rotierend vorhybridisiert. Anschliessend wurden 2-4 µl PCR-markierter DIG-Sonde in 100 µl DIG Easy Hyb bei 95°C für 5 min denaturiert, kurz auf Eis gestellt und dann zur vorhybridisierten Membran pipettiert. Die Hybridisierung wurde für 16 Stunden bei 42°C durchgeführt. Danach wurde die Membran 3x wenig stringent mit 2x SSC/0,1% SDS für je 15 min in einer Kunststoffschale sowie danach sehr stringent 3x 15 min im Inkubationsröhrchen bei 68°C im Hybridisierungsofen mit 0,5x SSC/0,1% SDS gewaschen. Es folgte eine Äquilibrierung mit DIG Waschpuffer für 5 min bei RT in einer Kunststoffschale. Zur Blockung nicht-hybridisierter Membranbereiche erfolgte anschließend eine Behandlung mit 10 ml DIG Blocking Reagent (Roche Diagnostics) für 1 Stunde bei RT. Zu diesem Ansatz wurde 1 µl Anti DIG-AP-Peroxidase Antikörper zugegeben und die Membran weitere 30 min unter Rotieren inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden 2x 15 min bei RT mit DIG-Waschpuffer entfernt. Zur Umpufferung für die Antikörperdetektion wurden weitere 5 min mit DIG-Detektionspuffer gespült. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper durch die Peroxidasereaktion wurde die Membran tropfenweise mit CDP-*Star* Chemoluminiszenzsubstrat versehen und in einer Kunststoff-Folie für mindestens 5 min inkubiert. Nach Abtropfen überschüssiger Substratlösung wurde die Membran für unterschiedliche Zeitspannen (1-30 min) in der Dunkelkammer auf Fuji Medical X-Ray Film exponiert. Dieser wurde anschliessend mit Entwickler (Kodak) entwickelt, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Fixierlösung (Kodak) fixiert.

#### 5.2 Arbeiten mit pflanzlichem Material

#### 5.2.1 Erzeugung transgener Arabidopsis-Pflanzen

*A. thaliana* Ökotyp Columbia-0 Pflanzen wurden nach dem Protokoll des *"Floral Dip"* transformiert (Clough and Bent, 1998). Hierzu wurden transgene Agrobakterien, welche das zu transformierende Plasmid enthielten, über Nacht in 200 ml YEB-Medium mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion bei 28°C angezogen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 7000 rpm und 4°C wurde das Bakterienpellet in einer 5%igen Saccharoselösung resuspendiert und eine OD<sub>600</sub> von 0,8 eingestellt. Nach Zugabe von 0,05% Silwet L-77 wurden die Blütenstände der Arabidopsis-Pflanzen nach dem Entfernen bereits entwickelter Schoten für 10 s in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend in Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen der Bakterien zu verhindern. Nach 24 Stunden wurden die Folien entfernt und die Pflanzen bis zur Samenproduktion weiter kultiviert. Nach Ernte der Samen erfolgte die Selektion auf transformierte Pflanzen mit Hilfe einer Antibiotika-Resistenz, die mit der gewünschten T-DNA transformiert wurde.

#### 5.2.2 Kultivierung transgener Pflanzen

Zur Selektion transgener Pflanzen bzw. zur sterilen Pflanzenanzucht wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Dazu wurden diese für 2 min mit 1 ml Ethanol (70%) inkubiert. Nach Entfernen des Alkohols wurden die Samen für 10 min in einer 1.5%igen (v/v) Natriumhypochlorid-Lösung, die mit 0.1% Tween 20 versetzt war, inkubiert. Um restliches Natriumhypochlorid zu entfernen, wurden die Samen viermal mit sterilem Wasser (1 ml) gewaschen und im Anschluss auf MS-Agarplatten mit Kanamycin (50 mg/l) bzw. in MS-Flüssigmedium ausgebracht. Nach der Lagerung der Agarplatten über Nacht bei 4°C, erfolgte die weitere Kultivierung unter Kurztagbedingungen (22°C). Putativ transgene Pflänzchen (T1-Generation) konnten nach zwei bis drei Wochen Wachstum selektiert, auf Erde pikiert und bis zur Samenproduktion kultiviert werden. Transgene Pflanzen der T2- oder T3-Generation wurden ebenfalls ca. zwei Wochen nach der Keimung auf Erde vereinzelt. Zur Selektion homozygoter Linien wurden in der T2-Generation die Aufspaltungsverhältnisse

mittels X<sup>2</sup>-Test bestimmt und zusätzlich genomische Insertions-Analysen per Southern-Hybridisierung durchgeführt (Kapitel 5.1.20). Die daraus hervorgegangenen Einzelinsertionslinien wurden weiter kultiviert und in der T3-Generation durch Antibiotika-Selektion auf Homozygotie getestet.

#### 5.2.3 Anzucht der Versuchspflanzen

Die verwendeten Pflanzen für die Sorbitolbehandlungen wurden in einem Klimaschrank (Percival) unter Kurztagbedingungen (22°C, 75% rel. Luftfeuchtigkeit, 9 Stunden Licht, 120 µmol phot. m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> Lichtintensität) angezogen. Für die Untersuchungen der natürlichen Alterung sowie für die Experimente zur dunkelinduzierten Seneszenz wurden die Pflanzen in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (22°C, 9 Stunden Licht, 80 µmol phot. m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> Lichtintensität) angezogen. Dabei erfolgte die Anzucht homozygoter Pflanzen direkt auf Anzuchterde wobei die Keimlinge nach 14 Tagen in 7 cm Kunststofftöpfe vereinzelt wurden. Die biologische Schädlingsbekämfpung erfolgte durch 14-tägliche Behandlung mit Nemathoden der Art *Steinermema feltiae*. Zur Untersuchung des Verlaufs der natürlichen Pflanzenalterung unter o.g. Bedingungen wurden die Rosettenblätter 9-15 beobachtet (Zählweise von Innen nach Aussen unter Nichtberücksichtigung der Kotolydonen). Dazu wurden die entsprechenden Blätter im Alter von ca. 6 Wochen mit Bindfäden markiert, zu den jeweiligen Zeitpunkten geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

## 5.2.4 Behandlung der Versuchspflanzen

## 5.2.4.1 Sorbitolbehandlung

Zur Induktion von osmotischem Stress wurden adulte Blätter 6-7 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen abgetrennt und auf 500 mM Sorbitollösung bzw. H<sub>2</sub>O flottiert. Dazu wurden die Blätter von mindestens zwei Pflanzen in transparenten Kunststoff-Schalen auf je 200 ml Lösung bei Dauerlicht (120 µmol phot. m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> Lichtintensität) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Für die Kontrollwerte (0 Stunden) wurden mindestens je 3x3 Pflanzen umgehend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bei Ernte der behandelten Blätter wurde die Lösung verworfen und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um überschüssiges Sorbitol zu entfernen. Die Blätter wurden danach umgehend in Probenröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Anschliessend wurde das Pflanzenmaterial für 24- 48 Stunden gefriergetrocknet und dann bei -20°C gelagert.

#### 5.2.4.2 Dunkelbehandlung

Zur Untersuchung von dunkelinduzierter Seneszenz wurden adulte Blätter 6-7 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen abgetrennt und in Petrischalen auf feuchtem Papiergewebe in völliger Dunkelheit bei RT inkubiert. Die Ernte erfolgte sofort (0 Stunden) bzw. nach 3 und 7 Tagen in Probenröhrchen in flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei - 80°C gelagert.

#### 5.3 Analytische Methoden

#### 5.3.1 Extraktion von Chlorophyll

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde mittels Aceton-Extraktion durchgeführt (Arnon, 1949). Dabei wurden 50 mg schockgefrorenes und gemörsertes Frischmaterial bzw. 5 mg gefriergetrocknetes Material mit 1 ml Aceton/H<sub>2</sub>O (80/20; v/v) versetzt und kräftig vermischt. Nach 3-6 Stunden Inkubation im Dunkeln bei 4°C wurden die Proben bei 5000 rpm, 3 min bei RT zentrifugiert. Vom Überstand wurden mit dem Aceton/H<sub>2</sub>O-Gemisch entsprechende Verdünnungen hergestellt, die im Spektralphotometer vermessen wurden. Die Analyse der Absorption erfolge bei den Wellenlängen 647 nm für Chlorophyll a und 664 nm für Chlorophyll b. Als Referenz wurde das Lösungsmittel verwendet. Zur Berechnung des Chlorophyllgehaltes wurden folgende Formeln verwendet:

Chl a 
$$\left[\frac{mg}{ml}\right] = (11,78 \ x \ E664 - 2,29 \ x \ E647) \ x \ Verdünnungsfaktor$$
  
Chl b  $\left[\frac{mg}{ml}\right] = (20,05 \ x \ E647 - 4,77 \ x \ E664) \ x \ Verdünnungsfaktor$ 

#### 5.3.2 Extraktion und Analyse freier Säuren

Zur Analyse freier Säuren (JA, OPDA sowie  $\alpha$ -LeA) wurde 200-400 mg schockgefrorenes und gemörsertes Frischmaterial bzw. 20-40 mg gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial in einem 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß abgewogen. Das Probenmaterial wurde mit 980 µl MeOH/1% Eisessig versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurden 158,5 ng Dihydrojasmonsäure (in MeOH; 15,8 ng/µl) sowie 100 ng n-Heptadecansäure (in AcN; 10 ng/µl) ad 1 ml als interne Standards zugefügt und die Proben anschliessend für 5 min bei 30 Hz in einer Schwingmühle homogenisiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm, RT, wurden 900 µl des Überstandes quantitativ in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in einem Rotationsvakuumkonzentrator bei 60°C zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 500 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 15 µl Eisessig auf pH 3 eingestellt. Um störende polare Substanzen aus der Probe zu entfernen, wurden diese dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden quantitativ abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und zur Trockene eingeengt. Zu dem erhaltenen Rückstand wurden als weiterer Standard 80 ng [<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-Oxo-Phytodiensäure (in AcN; 2 ng/µl) zugegeben und das Lösemittel in einem Rotationsvakuumkonzentrator erneut zur Trockene eingeengt. Bis zur Messung wurden die Proben mit 200 µl AcN versetzt, homogenisiert und bei -20°C gelagert. Für die Messung wurde das AcN im Rotationsvakuumkonzentrator bei 60°C zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 mM Ammoniumacetat/Acetonitril 1:2 (v/v) gelöst und für 15 min bei 14.000 rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Messung in HPLC-Probengefäße überführt.

## 5.3.2.1 Quantifizierung von JA und OPDA

Die Auftrennung und Quantifizierung von JA, DHJA, OPDA sowie [<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-OPDA erfolgte mittels einer Kombination aus UPLC und Triple-Quadrupol-MS. Zunächst wurde der erhaltene Extrakt über eine Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 Säule (30 mm x 2 mm, Partikelgröße 1,7 µm) sowie entsprechender Vorsäule und Partikelfilter mit dem in Tabelle 15 angegebenen Laufmittelgradienten aufgetrennt. Die Detektion der Analyten erfolgte dann durch ein Waters Micromass Quattro Premier Massenspektrometer, wobei die Ionen durch negative Elektrospray-Ionisation (ESI-) erzeugt wurden (Tabelle 16).

Zeit (min)	1mM wässriges Ammoniumacetat pH 6,6(%)	Acetonitril (%)	Flussrate (ml/min)
0,00	95	5	0,3
3,00	40	60	0,3
3,01	0	100	0,3
5,00	0	100	0,3
5,01	95	5	0,3
8,00	95	5	0,3

Tabelle 13: L	aufmittelgradient zur	Analyse von	JA und OPDA

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (I/h) N <sub>2</sub>	800
Konusgasfluss (I/h) - N <sub>2</sub>	100
Desolvatisierungstemperatur (°C)	400
Kollisionsgasfluss (I/min) Ar	0,3

Tabelle 14: MS-Parameter zur Detektion von JA und OPDA

Als Detektionsmethode wurde die selektive *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Methode verwendet. Bei dieser Methode wird im ersten Quadrupol des Tandem-MS ein Precursor-Ion anhand seines Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) isoliert, im zweiten Quadrupol durch die Kollision mit Argon fragmentiert und im dritten Quadrupol nur ein spezifisches Produkt-Ion selektiert. In Tabelle 17 sind die entsprechenden Masse/Ladungs-Verhältnisse sowie die Detektionsparameter aufgeführt.

Analyt	Precursor- Ion (m/z)	Produkt- Ion (m/z)	Dwelltime (s)	Konus- spannung(V)	Kollisions- energie(V)
Jasmonsäure	209,1	59	0,025	19	17
Dihydrojasmonsäure	211,1	59	0,025	19	17
OPDA	291,1	165	0,025	22	26
[ <sup>18</sup> O] <sub>2</sub> -OPDA	295,1	165	0,025	22	26

Tabelle 15: Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen von Jasmonsäure, Dihydrojasmonsäure, OPDA und [180]<sub>2</sub>-OPDA

#### 5.3.2.2 Quantifizierung von freier α-Linolensäure

Die Auftrennung und Quantifizierung von  $\alpha$ -LeA, D<sub>5</sub>  $\alpha$ -LeA und dem internen Standard n-Heptadecansäure (Margarinsäure) erfolgte mittels einer Kombination aus UPLC und Triple-Quadrupol-MS. Zunächst wurde der erhaltene Extrakt über eine Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 Säule (30 mm x 2 mm, Partikelgröße 1,7 µm) sowie entsprechender Vorsäule und Partikelfilter mit dem in Tabelle 18 angegebenen Laufmittelgradienten aufgetrennt.

Zeit (min)	1mM wässriges Ammoniumacetat pH 6,6 (%)	Acetonitril (%)	Flussrate (ml/min)
0,00	50	50	0,3
5,00	0	100	0,3
7,00	0	100	0,3
7,01	50	50	0,3
10,00	50	50	0,3

Tabelle 16: L	aufmittelgradient	zur Analyse von	α-Linolensäure
---------------	-------------------	-----------------	----------------

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3,5
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (I/h) N <sub>2</sub>	800
Konusgasfluss (I/h) - N <sub>2</sub>	50
Desolvatisierungstemperatur (°C)	400
MC Devenue tex sur Detektion yen er Linelene övre	

Tabelle 17: MS-Parameter zur Detektion von α-Linolensäure

Die Detektion von α-LeA und dem internen Standard n-Heptadecansäure erfolgte ebenfalls durch das Waters Micromass Quattro Premier Massenspektrometer, wobei die Ionen durch negative Elektrospray-Ionisation (ESI-) erzeugt wurden. Die MS Parameter sind in Tabelle 19 angegeben. Als Detektionsmethode wurde die *Selected Ion Recording* (SIR)-Methode gewählt. Bei dieser Methode werden die Ionen nicht Fragmentiert. Die Detektion der Fettsäuren erfolgte dann als Carboxylat-Anion mit folgenden MS-Parametern:

Analyt	Precursor- Ion (m/z)	Produkt- Ion (m/z)	Dwelltime (s)	Konus- spannung(V)	Kollisions- energie(V)
n-Hepta- decansäure	269	-	0,1	30	-
α- Linolensäure	277	-	0,1	30	-
D₅ α- Linolensäure	282	-	0,1	30	-

Tabelle 18: Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) zur α-Linolensäure-Detektion

#### 5.3.3 Extraktion und Analyse von Membranlipiden

Zur Analyse membrangebundener Galaktolipide und Arabidopside wurde 200-300 mg schockgefrorenes und gemörsertes Frischmaterial bzw. 20-30 mg gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial in einem 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß abgewogen. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit 1,5 ml auf 75°C vorgewärmten 2-Propanol versetzt, kurz durchmischt und 15 min zur Denaturierung von Lipasen bei 75°C inkubiert. Als interne Standards wurden nach der Inkubationszeit je 3 µg MGDG-18:0-18-0 und DGDG-18:0-18-0 (in Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 4:1:0,1 (v/v/v)) zugegeben und die Proben für 5 min im Ultraschallbad homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14.000 rpm, bei RT, wurde der Überstand der Probe in ein Reagenzglas überführt und das zurückgebliebene Pellet in 1,5 ml Chloroform/Isopropanol 1:3 (v/v) durch 5 min Inkubation im Ultraschallbad gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin 5 min bei 14.000 rpm, RT zentrifugiert und der Überstand mit dem Ersten im Reagenzglas vereinigt. Das Pellet wurde erneut für 5 min im Ultraschallbad in Chloroform/Methanol 1:3 (v/v) gelöst und ebenfalls 5 min bei 14.000 rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit den Vorherigen vereinigt und bei 60°C im Wasserbad unter N<sub>2</sub>-Strom zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde anschließend in 1 ml Methanol gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde nun in einem Rotationsvakuumkonzentrator bei 60°C zur Trockene eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 100 µl 1 mM methanolischem Ammoniumacetat gelöst, 10 min bei 14.000 rpm, RT zentrifugiert und der Überstand zu Messung in HPLC-Probengefäße überführt.

## 5.3.3.1 Quantifizierung von Membranlipiden

Die Auftrennung und Quantifizierung der Galaktolipide erfolgte mittels einer Kombination aus UPLC und Triple-Quadrupol-MS. Zunächst wurde der erhaltene Extrakt über eine Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C8 Säule (50 mm x 2 mm, Partikelgröße 1,7 µm) mit entsprechender Vorsäule und Partikelfilter mit dem in Tabelle 21 angegebenen Laufmittelgradienten aufgetrennt.

Zeit (min)	1mM wässriges Ammoniumacetat pH 6,6 (%)	wässriges1mM methanolischesoniumacetatAmmoniumacetat1 6,6 (%)(%)	
0,00	25	75	0,3
1,00	25	75	0,3
10,00	0	100	0,3
11,01	0	100	0,3
15,00	25	75	0,3

Tabelle 19: Laufmittelgradient zur Analyse von Galaktolipiden

Die Detektion der Galaktolipide erfolgte ebenfalls massenspektrometrisch, wobei die Ionen wie zuvor durch negative Elektrospray Ionisation (ESI-) erzeugt wurden. Als Detektionsmethode wurde wiederum die selektive *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Methode verwendet. Für die Ionisierung und Fragmentierung wurden für alle Verbindungen die in Tabelle 22 aufgeführten Detektionsparameter verwendet.

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3,11
Konusspannung (V)	40
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (I/h) N <sub>2</sub>	847
Konusgasfluss (I/h) - N <sub>2</sub>	47
Desolvatisierungstemperatur (°C)	450
Kollisionsgasfluss (I/min) Ar	0,3
Kollisionsenergie (eV)	30
Dwelltime (s)	0,025

Tabelle 20: MS-Parameter zur Detektion von Galaktolipiden

Die Masse/Ladungs-Verhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen zur Analyse von Arabidopsiden und Galaktolipiden sind im Anhang dargestellt.

# 6 Literaturverzeichnis

- Almeras E., Stolz S., Vollenweider S., Reymond P., Mene-Saffrane L., Farmer E.E. (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. Plant J 34:205-16.
- Andersson M.X., Kjellberg J.M., Sandelius A.S. (2001) Chloroplast Biogenesis. Regulation of Lipid Transport to the Thylakoid in Chloroplasts Isolated from Expanding and Fully Expanded Leaves of Pea. Plant Physiol 127:184-193.
- Andersson M.X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnstrom A., McPhail K.L., Gerwick W.H., Gobel C., Feussner I., Ellerstrom M. (2006) Oxylipin profiling of the hypersensitive response in Arabidopsis thaliana. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. J Biol Chem 281:31528-37.
- Andreou A., Feussner I. (2009) Lipoxygenases Structure and reaction mechanism. Phytochem 70: 1504-1510
- **Apel K., Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373-99.
- **Arnon D.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol 24:1-15.
- Axelrod B., Cheesbrough T.M., Laakso S. (1981) Lipoxygenase from soybeans. Meth Enzymol 71:441-451.
- Ay N., Irmler K., Fischer A., Uhlemann R., Reuter G., Humbeck K. (2009) Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Plant J 58:333-346.
- Bachmann A., Hause B., Maucher H., Garbe E., K.Vörös, Weichert H., Wasternack C., Feussner
  I. (2005) Jasmonate-Induced Lipid Peroxidation in Barley Leaves Initiated by Distinct 13-LOX
  Forms of Chloroplasts. J Biol Chem 383:1645-1657.
- Balazadeh S., Rian D.M. (2008) Transcription factors regulating leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Biol 10:63-75.
- Bannenberg G., Martínez M., Hamberg M., Castresana C. (2009) Diversity of the Enzymatic Activity in the Lipoxygenase Gene Family of Arabidopsis thaliana. Lipids 44:85-95.
- Barclay K.D., McKersie B.D. (1994) Peroxidation reactions in plant membranes: effects of free fatty acids. Lipids 29:877-882.
- Barth C., Moeder W., Klessig D.F., Conklin P.L. (2004) The Timing of Senescence and Response to Pathogens Is Altered in the Ascorbate-Deficient Arabidopsis Mutant vitamin c-1. Plant Physiol 134:1784-1792.
- Bate N., Rothstein S. (1998) C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. Plant J 16:561-569.
- **Baysal T., Demirdöven A.** (2007) Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. Enzyme Microb Technol 40:491-496.
- Bell E., Mullet J.E. (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. Plant Physiol 103:1133-1137.

- Bell E., Creelman R.A., Mullet J.E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. PNAS 92:8675-8679.
- **Ben-Porath I., Weinberg R.A.** (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol 37:961-76.
- Benedetti C.E., Xie D.X., Turner J.G. (1995) COI1-dependent expression of an arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. Plant Physiol 109:567-572.
- **Benning C.** (2009) Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells. Annnu Rev Cell Dev Biol 25:71-91.
- Berger S., Bell E., Mullet J.E. (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of atvsp in response to methyl jasmonate and wounding. Plant Physiol 111:525-531.
- **Berger S., Mitchell-Olds T., Stotz H.U.** (2002) Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 114:85-91.
- **Berger S., Bell E., Sadka A., Mullet J.E.** (1995) *Arabidopsis thaliana Atvsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. Plant Mol Bio 27:933-942.
- Berger S., Weichert H., Porzel A., Wasternack C., Kuhn H., Feussner I. (2001) Enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation in leaf development. Biochim Biophys Acta 1533:266-76.
- Blée E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. Prog Lipid Res 37:33-72.
- Blée E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci 7:315-322.
- Bleecker A.B., Patterson S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. Plant Cell 9:1169-79.
- Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 279:349-52.
- Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K. (1998) Wounding and chemicals induce expression of the Arabidopsis thaliana gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett 437:281-6.
- Bonaventure G., Gfeller A., Proebsting W., Hoertensteiner S., Chetelat A., Martinoia E., Farmer E.E. (2007) A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in Arabidopsis. Plant J 49:889-898.
- Böttcher C., Weiler E. (2007) cyclo -Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. Planta 226:629-637.
- Böttcher C., Pollmann S. (2009) Plant oxylipins: Plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. FEBS Journal 276:4693-4704.
- Brash A.R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. J Biol Chem 274:23679-82.
- Brodersen P., Petersen M., Pike H.M., Olszak B., Skov S., Ødum N., Jørgensen L.B., Brown R.E., Mundy J. (2002) Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. Genes Dev 16:490-502.

- **Browse J.** (2009) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. Annu Rev Plant Biol 60: 183-205
- **Browse J., Somerville C.** (1991) Glycerolipid Synthesis Biochemistry and Regulation. Annu Rev Plant Physiol 42:467-506.
- Browse J., Kunst L., Anderson S., Hugly S., Somerville C. (1989) A mutation of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. Plant Physiol 90:522-529.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. Plant Biotechnol J 1:3-22.
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals signi cant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence. in Arabidopsis. Plant J 42:567-585.
- 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., Welti R. (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. Plant Physiol 142:28-39.
- **Castillo M.C., Leon J.** (2008) Expression of the beta-oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. J Exp Bot 59:2171-9.
- Chini A., Boter M., Solano R. (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acidsignalling module. FEBS Journal 276:4682-4692.
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L., Solano R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. Nature 448:666-671
- **Clough S.J., Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16:735-43.
- **Creelman R.A.** (1989) Abscisic acid physiology and biosynthesis in higher plants. Plant Physiol 75:131-136.
- Cruz Castillo M., Martinez C., Buchala A., Metraux J.P., Leon J. (2004) Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. Plant Physiol 135:85-94.
- Danon A., Miersch O., Felix G., Camp R.G.L.o.d., Apel K. (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 41:68-80.
- Dathe W., Rönsch H., Preiss A., Schade W., Sembdner G., Schreiber K. (1981) Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. Planta 153:530-535.
- **Delker C., Zolman B.K., Miersch O., Wasternack C.** (2007) Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana requires peroxisomal beta-oxidation enzymes Additional proof by properties of pex6 and aim1. Phytochem 68:1642-50.
- Delker C., Stenzel I., Hause B., Miersch O., Feussner I., Wasternack C. (2006) Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana-enzymes, products, regulation. Plant Biol (Stuttg) 8:297-306.

- **Demole E., Lederer E., Mercier D.** (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. Helv Chim Acta 45:675-685.
- **Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H.S., Chilcott C., Zhu T., 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 Mol Biol 58:497-513.
- **Dormann P., Balbo I., Benning C.** (1999) Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. Science 284:2181-4.
- **Douce R., Joyard J.** (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. Annu Rev Cell Biol 6:173-216.
- Ellinger D., Stingl N.E., I K.I., Bals T., Juenger M., Pollmann S., Berger S., D S., Mueller M.J. (2010) DGL and DAD1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. Plant Physiol 153: 114-127
- Ellis C., Turner J. (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. Plant Cell 13:1025-1033.
- Ellis C., Turner J.G. (2002) A conditionally fertile coi1 allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. Planta 215:549-556.
- Ellis C.M., Nagpal P., Young J.C., Hagen G., Guilfoyle T.J., Reed J.W. (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. Development 132:4563-74.
- Eschen-Lippold L., Rothe G., Stumpe M., Gobel C., Feussner I., Rosahl S. (2007) Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. Phytochem 68:797-801.
- Falkenstein E., Groth B., Mithoefer A., Weiler E. (1991) Methyljasmonate and a-linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. Planta 185:316-322.
- Fammartino A., Cardinale F., Gobel C., Mene-Saffrane L., Fournier J., Feussner I., Esquerre-Tugaye M.-T. (2007) Characterization of a Divinyl Ether Biosynthetic Pathway Specifically Associated with Pathogenesis in Tobacco. Plant Physiol 143:378-388.
- Farmer E.E., Almeras E., Krishnamurthy V. (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Curr Opin Plant Biol 6:372-8.
- **Feussner I.** (1997) Are lipoxygenases implicated in the degradation of membrane constituents of chloroplasts during stress? Biol Chem 378:S163.
- Feussner I., Kuhn H. (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. FEBS Lett 367:12-4.
- Feussner I., Kühn H. (2000) Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. Enzymes in Lipid Modification:309-336.
- Feussner I., Wasternack C. (2002) The Lipoxygenase Pathway. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 53:275-297.
- Feussner I., Kuehn H., Wasternack C. (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. Trends Plant Sci 6:268-273.

- Feussner I., Hause B., Nellen A., Wasternack C., Kindl H. (1996) Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. Planta 198:288-293.
- Feussner I., Hause B., Kühn H., Nellen A., Kindl H., Wasternack C. (1995) Lipid body lipoxygenase specific properties of a membrane bound form during germination. Biol Chem 376:S51.
- Feys B.J.F., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G. (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistent to a bacterial pathogen. Plant Cell 6:751-759.
- Galliard T., Phillips D.R. (1972) The Enzymic Conversion of Linoleic Acid into 9-(Nona-1', 3'dienoxy)non-8-enoic Acid, a Novel Unsatured Ether Derivate Isolated from Homogenates of Solanum tuberosum Tubers. Biochem. J. 129:743-753.
- Gan S. (2003) Mitotic and Postmitotic Senescence in Plants. Science of Aging Knowledge Environment 38: 1-10
- **Gan S., Amasino R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science 270:1986-8.
- Gepstein S. (2004) Leaf senescence not just a 'wear and tear' phenomenon. Gen Biol 5:212.
- Gepstein S., Thimann K.V. (1980) Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence. Proc Natl Acad Sci USA 77:2050-2053.
- Gepstein S., Sabehi G., Carp M.J., Hajouj T., Nesher M.F., Yariv I., Dor C., Bassani M. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. Plant J 36:629-42.
- Gfeller A., Dubugnon L., Liechti R., Farmer E.E. (2010) Jasmonate biochemical pathway. Sci Signal 3:cm3.
- Glauser G., Dubugnon L., Mousavi S.A., Rudaz S., Wolfender J.L., Farmer E.E. (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded Arabidopsis. J Biol Chem.284: 34506-34513
- **Gleave A.P.** (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Mol Biol 20:1203-7.
- **Gobel C., Feussner I., Rosahl S.** (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. J Biol Chem 278:52834-40.
- **Grechkin A.** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Prog Lipid Res 37:317-352.
- Griffiths G., Leverentz M., Silkowski H., Gill N., Sanchez-Serrano J.J. (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. J Exp Bot 51:1363-70.
- Guiamet J.J., Tyystjarvi E., Tyystjarvi T., John I., Kairavuo M., Pichersky E., Nooden L.D. (2002) Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the 'stay-green' mutation cytG. Plant Physiol 115:468-478.
- **Guo Y., Cai Z., Gan S.** (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. Plant Cell Env 27:521-549.
- Halim V.V.A. (2006) The Role of Salicylic Acid and Octadecanoids for Pathogen Defense in Potato. Plant Pathol 8:307-313

**Hamberg M.** (1999) An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. Lipids 34:1131-1142.

- Hamberg M. (2000) New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. Lipids 35:353-363.
- Hamberg M. (2002) Biosynthesis of new divinyl ether oxylipins in Ranunculus plants. Lipids 37:427-433.
- Harman D. (1956) Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. J Gerontol 11:298-300.
- Hause B., Stenzel I., Miersch O., Maucher H., Kramell R., Ziegler J., Wasternack C. (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. Plant J 24:113-26.
- Hayati R., Egli D.B., Crafts-Brandner S.J. (1995) Carbon and Nitrogen Supply during Seed Filling and Leaf Senescence in Soybean. Crop Sci 35:1063-1069.
- He Y., Gan S. (2001) Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 47:595-605.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S. (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. Plant Physiol 128:876-84.
- Heinz E., Roughan P.G. (1983) Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. Plant Physiol. 72:273-279.
- Heitz T., Bergey D.R., Ryan C.A. (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Physiol 114:1085-1093.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993) Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in Arabidopsis. Plant Cell 5:553-564.
- Hildebrand D.F. (1988) Plant Lipoxygenases: Occurrence, Properties and Possible Functions. Curr Top Plant Biochem Physiol 7:201-219.
- **Himelblau E., Amasino R.M.** (2001) Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. Plant Physiol 158:1317-1323.
- **Hinderhofer K., Zentgraf U.** (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. Planta 213:469-473.
- Hisamatsu Y., Goto N., Hasegawa K., Shigemori H. (2006) Senescence-promoting effect of arabidopside A. Z Naturforsch C 61:363-6.
- Hong Y., Wang T.-W., Hudak K.A., Schade F., Froese C.D., Thompson J.E. (2000) An ethyleneinduced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. Proc Natl Acad Sci USA 97:8717-8722.
- Hortensteiner S., Feller U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. J Exp Bot 53:927-37.
- Howe G.A., Schilmiller A.L. (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. Curr Opin Plant Biol 5:230-6.
- Hughes R.K., West S.I., Hornostaj A.R., Lawson D.M., Fairhurst S.A., Sanchez R.O., Hough P., Robinson B.H., Casey R. (2001) Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. Biochem J 353:345-355.

- Hung K.T., Kao C.H. (1996) Promotive effect of jasmonates on the senescence of detached maize leaves. Plant Growth Regul 19:77-83.
- Hung K.T., Kao C.H. (1998) Involvement of lipid peroxidation in methyl jasmonate-promoted senescence in detached rice leaves. Plant Growth Regul 24:17-21.
- Hung K.T., Kao C.H. (2004) Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. Plant Physiol 161:1347-1357.
- Hyun Y., Choi S., Hwang H.J., Yu J., Nam S.J., Ko J., Park J.Y., Seo Y.S., Kim E.Y., Ryu S.B., Kim W.T., Lee Y.H., Kang H., Lee I. (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. Dev Cell 14:183-92.
- **Ishida H., Yoshimoto K.** (2008) Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. Autophagy 4:961-2.
- **Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K.** (2001) The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel Phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis.Plant Cell 13:2191-2209.
- Itoh A., Howe G.A. (2001) Molecular Cloning of a Divinyl Ether Synthase. J Biol Chem 276:3620-3627.
- Jander G., Howe G. (2008) Plant Interactions with Arthropod Herbivores: State of the Field. Plant Physiol 146:801-803.
- Jing H.-C., Hebeler R., Oeljeklaus S., Sitek B., Stühler K., Meyer H.E., Sturre M.J.G., Hille J., Warscheid B., Dijkwel P.P. (2008) Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in Arabidopsis cpr5/old1 mutants. Plant Biol 10:85-98.
- **Jing H.C., Hille J., Dijkwel P.P.** (2003) Aging in Plants: conserved strategies and novel pathways. Plant Biol 5:455-464.
- Jing H.C., Sturre M.J., Hille J., Dijkwel P.P. (2002) Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. Plant J 32:51-63.
- Jing H.C., Schippers J.H., Hille J., Dijkwel P.P. (2005) Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. J Exp Bot 56:2915-23.
- John C.F., Morris K., Jordan B.R., Thomas B., A-H-Mackerness S. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot. 52:1367-1373.
- Jouhet J., Marechal E., Block M.A. (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. Prog Lipid Res 46:37-55.
- Joyard J., Teyssier E., Miege C., Berny-Seigneurin D., Marechal E., Block M.A., Dorne A.-J., Rolland N., Ajlani G., Douce R. (1998) The Biochemical Machinery of Plastid Envelope Membranes. Plant Physiol 118:715-723.
- **Jung S.** (2004) Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Plant Physiol Biochem 42:225-231.
- Kariola T., Brader G., Li J., Palva E.T. (2005) Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. Plant Cell 17:282-294.
- Katsir L., Chung H.S., Koo A.J., Howe G.A. (2008a) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. Curr Opin Plant Biol 11:428-35.

- Katsir L., Schilmiller A.L., Staswick P.E., He S.Y., Howe G.A. (2008b) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proc Natl Acad Sci USA 105:7100-5.
- Kaup M.T., Froese C.D., Thompson J.E. (2002) A Role for Diacylglycerol Acyltransferase during Leaf Senescence 1. Society 129:1616-1626.
- Kausch K.D., Handa A.K. (1997) Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. Plant Physiol 113:1041-1050.
- Kim C.Y., Bove J., Assmann S.M. (2008) Overexpression of wound-responsive RNA-binding proteins induces leaf senescence and hypersensitive-like cell death. New Phytol 180:57-70.
- Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 103:814-9.
- Koo A.J., Chung H.S., Kobayashi Y., Howe G.A. (2006) Identification of a peroxisomal acylactivating enzyme involved in the biosynthesis of Jasmonic acid in Arabidopsis. J Biol Chem.281:33511-33520
- Koo A.J., Gao X., Daniel Jones A., Howe G.A. (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. Plant J.59:974-986
- Kourtchenko O., Andersson M.X., Hamberg M., Brunnstrom A., Gobel C., McPhail K.L., Gerwick W.H., Feussner I., Ellerstrom M. (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. Plant Physiol 145:1658-69.
- Kramell R., Miersch O., Atzorn R., Parthier B., Wasternack C. (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. Plant Physiol 123:177-88.
- **Kubigsteltig I., Laudert D., Weiler E.W.** (1999) Structure and regulation of the Arabidopsis thaliana allene oxide synthase gene. Planta 208:463-71.
- Kühn H., Eggert L., Zabolotsky O.A., Myagkova G.I., Schewe T. (1991) Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates. Biochem. 30:10269-10273.
- Kunz H.H., Scharnewski M., Feussner K., Feussner I., Flugge U.I., Fulda M., Gierth M. (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of Arabidopsis during extended darkness. Plant Cell 21:2733-49.
- Lehmann J., Atzorn R., Bruckner C., Reinbothe S., Leopold J., Wasternack C., Parthier B. (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. Planta 197:156-162.
- Lequeu J., Fauconnier M.L., Chammai A., Bronner R., Blee E. (2003) Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. Plant J 36:155-64.
- Li L., Zhao Y., McCaig B.C., Wingerd B.A., Wang J., Whalon M.E., Pichersky E., Howe G.A. (2004) The tomato homolog of coronatine-insensitive1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. Plant Cell 16:126-143.
- Liavonchanka A., Feussner I. (2006) Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. Journal of Plant Physiol 163:348-357.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007) Leaf senescence. Annu Rev Plant Biol 58:115-36.

- Lim P.O., Lee I.C., Kim J., Kim H.J., Ryu J.S., Woo H.R., Nam H.G. (2010) Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. J Exp Bot 61:1419-30.
- Lin Z., Zhong S., Grierson D. (2009) Recent advances in ethylene research. J Exp Bot 60:3311-36.
- Lin Z., Yin K., Wang X., Liu M., Chen Z., Gu H., Qu L.-J. (2007) Virus induced gene silencing of AtCDC5 results in accelerated cell death in Arabidopsis leaves. Plant Physiol Biochem 45:87-94.
- Liu J., Wu Y., Yang J., Liu Y., Shen F. (2008) Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. Plant Biol 51:11-19.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 92:322-328.
- Longo V.D., Fabrizio P. (2002) Visions & Reflections:Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? Cell Mol Life Sci 59:903-908.
- Lorenzo O., Chico J.M., Sanchez-Serrano J.J., Solano R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. Plant Cell 16:1938-50.
- Ludewig F., Sonnewald U. (2000) High CO2-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. FEBS Lett 479:19-24.
- Mair W., Dillin A. (2008) Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. Annu Rev Biochem 77:727-754.
- Martinez D.E., Costa M.L., Guiamet J.J. (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. Plant Biol 10:15-22.
- Mason H.S., DeWald D.B., Mullet J.E. (1993) Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promotor. Plant Cell 5:241-251.
- Matile P., Hortensteiner S., Thomas H., Krautler B. (1996) Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves. Plant Physiol. 112:1403-1409.
- Matsui K. (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Curr Opin Plant Biol 9:274-280.
- Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A. (1997) Biogeneration of green odor emitted by green leaves -On HPO lyase and relationship of LOX-HPO lyase activities to environmental stimuli. Physiol Biochem Mol Biol Plant Lipids:247-249.
- Matthes M., Pickett J., Napier J. (2008) Natural variation in responsiveness of Arabidopsis thaliana to methyl jasmonate is developmentally regulated. Planta 228:1021-1028.
- **Mazel A., Levine A.** (2001) Induction of cell death in arabidopsis by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. Free Radic Biol Med 30:98-106.
- McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J., Stoopen G.M., Davelaar E., van Rhijn J.H., Power J.B., Davey M.R. (2001) Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. Plant Physiol 127:505-16.
- McConn M., Browse J. (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an arabidopsis mutant. Plant Cell 8:403-416.

- Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H.S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P., Browse J., Howe G.A., He S.Y. (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucinedependent interactions with the COI1 F-box protein. Plant J 55:979-88.
- **Miao Y., Zentgraf U.** (2007) The Antagonist Function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in Leaf Senescence Is Modulated by the Jasmonic and Salicylic Acid Equilibrium. Plant Cell 4:1-12.
- Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. Plant Mol Biol 55:853-67.
- Miao Y., Laun T., Smykowski A., Zentgraf U. (2007) Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. Plant Mol Biol 65:63-76.
- Miceli F., Crafts-Brandner S.J., Egli D.B. (1995) Physical restriction of pod growth alters developement of soybean plants. Crop Sci Society 35:1080-1085
- Miller A., Schlagnhaufer C., Spalding M., Rodermel S. (2000) Carbohydrate regulation of leaf development: Prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco. Photosynth Res 63:1-8.
- Miller A., Tsai C.H., Hemphill D., Endres M., Rodermel S., Spalding M. (1997) Elevated CO2 Effects during Leaf Ontogeny (A New Perspective on Acclimation). Plant Physiol 115:1195-1200.
- Miller J.D., Arteca R.N., Pell E.J. (1999) Senescence-associated gene expression during ozoneinduced leaf senescence in Arabidopsis. Plant Physiol 120:1015-24.
- Mita G., Fasano P., De Domenico S., Perrone G., Epifani F., Iannacone R., Casey R., Santino A. (2007) 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/Aspergillus carbonarius interaction. J Exp Bot 58:1803-1811.
- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rusterucci C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.P., Battesti C., Inze D., Van Breusegem F., Triantaphylides C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H2O2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiol 138:1516-26.
- **Morel J., Dangl J.** (1999) Suppressors of the *Arabidopsis Isd5* cell death mutation identify genes involved in regulating disease resistance responses. Genetics 151:305-319.
- Morris K., MacKerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan-Wollaston V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. Plant J 23:677-85.
- **Mosblech A., Feussner I., Heilmann I.** (2009) Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. Plant Physiol Biochem 47:511-517.
- Mueller M.J. (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. Curr Opin Plant Biol 7:441-8.
- Mueller S., Hilbert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Mueller M.J., Berger S. (2008) General Detoxification and Stress Responses Are Mediated by Oxidized Lipids through TGA Transcription Factors in Arabidopsis. Plant Cell 20:768-85.
- Munne-Bosch S. (2008) Do perennials really senesce? Trends Plant Sci 13:216-20.
- Munné B., Munné-Bosch S., Alegre, Alegre L. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. Planta 214:608-615.
- Myung K., Hamilton-Kemp T.R., Archbold D.D. (2006) Biosynthesis of trans-2-hexenal in response to wounding in strawberry fruit. J Agric Food Chem 54:1442-8.

- Narvaez-Vasquez J., Florin-Christensen J., Ryan C. (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. Plant Cell 11:2249-2260.
- Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., S A.H.-M., Buchanan-Wollaston V. (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. J Exp Bot 54:2285-92.
- **Newman J.W., Morisseau C., Hammock B.D.** (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. Prog Lipid Res 44:1-51.
- Noh Y.S., Amasino R.M. (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescencespecific expression of SAG12. Plant Mol Biol 41:181-94.
- **Nooden L.D., Penney J.P.** (2001) Correlative controls of senescence and plant death in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). J Exp Bot 52:2151-9.
- **Oh S.A., Lee S.Y., Chung I.K., Lee C.-H., Nam H.G.** (1996) A senescence-associated gene of Arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. Plant Mol Biol 30:739-754.
- Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Lui A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G., Theologis A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell 17:444-63.
- Ougham H., Hörtensteiner S., Armstead I., Donnison I., King I., Thomas H., Mur L. (2008) The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence ". Plant Biol 10:4-14.
- Padham A.K., Hopkins M.T., Wang T.-W., McNamara L.M., Lo M., Richardson L.G.L., Smith M.D., Taylor C.A., Thompson J.E. (2007) Characterization of a Plastid Triacylglycerol Lipase from Arabidopsis. Plant Physiol 143:1372-1384.
- Park J.H., Oh S.A., Kim Y.H., Woo H.R., Nam H.G. (1998) Differential expression of senescenceassociated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. Plant Mol Biol 37:445-54.
- **Parthier B.** (1988) Gerontoplasts the yellow end in the ontogenesis of chloroplasts. Endocyto Cell Res 5:163-190.
- **Parthier B.** (1990) Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? Plant Growth Reg 9:57-63.
- Peltier J.B., Ytterberg A.J., Sun Q., van Wijk K.J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. J Biol Chem 279:49367-83.
- Pennell R.I., Lamb C. (1997) Programmed Cell Death in Plants. Plant Cell 9:1157-1168.
- Penninckx I.A., Eggermont K., Terras F.R., Thomma B.P., De Samblanx G.W., Buchala A., Metraux J.P., Manners J.M., Broekaert W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell 8:2309-23.
- **Porta H., Rocha-Sosa M.** (2002) Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. Plant Physiology 130:15-21.

- Porta H., Rueda-Benitez P., Campos F., Colmenero-Flores J.M., Colorado J.M., Carmona M.J., Covarrubias A.A., Rocha-Sosa M. (1999) Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (Phaseolus vulgaris L.) during development and under stress conditions. Plant Cell Physiol 40:850-8.
- Reape T.J., Molony E.M., McCabe P.F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. J. Exp. Bot. 59:435-444.
- Reinbothe C., Springer A., Samol I., Reinbothe S. (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. Febs J 276:4666-81.
- **Reinbothe S., Reinbothe C., Parthier B.** (1993) Methyl jasmonate represses translation initiation of a specific set of messenger RNAs in barley. Plant J 4:459-467.
- **Reinbothe S., Mollenhauer B., Reinbothe C.** (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. Plant Cell 6:1197-1209.
- **Ribot C., Zimmerli C., Farmer E.E., Reymond P., Poirier Y.** (2008) Induction of the Arabidopsis PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. Plant Physiol 147:696-706.
- **Riha K., Fajkus J., Siroky J., Vyskot B.** (1998) Developmental Control of Telomere Lengths and Telomerase Activity in Plants. Plant Cell 10:1691-1698.
- **Robatzek S., Somssich I.E.** (2001) A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. Plant J 28:123-33.
- **Robatzek S., Somssich I.E.** (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. Genes Dev 16:1139-49.
- **Rosahl S.** (1996) Lipoxygenases in plants their role in development and stress response. Naturforsch 51:123-138.
- Royo J., Vancanneyt G., Perez A.G., Sanz C., Stormann K., Rosahl S., Sanchez-Serrano J.J. (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. J Biol Chem 271:21012-9.
- Royo J., Leon J., Vancanneyt G., Albar J.P., Rosahl S., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J.J. (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. Proc Natl Acad Sci USA 96:1146-51.
- Santner A., Estelle M. (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. Nature 459:1071-1078.
- Saravitz D.M., Siedow J.N. (1996) The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. Plant Physiol 110:287-299.
- Schaller F., Biesgen C., Mussig C., Altmann T., Weiler E. (2000) 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. Planta 210:979-984.
- Schenk N., Schelbert S., Kanwischer M., Goldschmidt E.E., Do P., Ho S. (2007) The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in Arabidopsis thaliana. FEBS Letters 581:5517-5525.
- Schenk P.M., Kazan K., Rusu A.G., Manners J.M., Maclean D.J. (2005) The SEN1 gene of Arabidopsis is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. Plant Physiol and Biochem 43:997-1005.

- Schommer C., Palatnik J.F., Aggarwal P., Chetelat A., Cubas P., Farmer E.E., Nath U., Weigel D. (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. PLoS Biol 6:e230.
- Sembdner G., Parthier B. (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44:569-589.
- Shah J. (2005) Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance. Annu Rev Phytopathol 43:229-260.
- Shibata D., Slusarenko A., Casey R., Hildebrand D., Bell E. (1994) Lipoxygenases. Plant Mol Biol Rep 12:S41-S42.
- Shiojiri K., Ozawa R., Matsui K., Kishimoto K., Kugimiya S., Takabayashi J. (2006) Role of the Lipoxygenase/lyase Pathway of Host-food Plants in the Host Searching Behavior of Two Parasitoid Species, Cotesia glomerata and Cotesia plutellae. J Chem Ecol 32:969-979
- **Siedow J.N.** (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42:145-188.
- Sohal R.S., Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273:59-63.
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Metraux J.P., Brown R., Kazan K., Van Loon L.C., Dong X., Pieterse C.M. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 15:760-70.
- Staswick P.E. (1992) Jasmonate, Genes, and Fragrant Signals. Plant Physiol 99:804-807.
- Staswick P.E., Tiryaki I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. Plant Cell 16:2117-27.
- Steinmüller D., Tevini M. (1985) Composition and function of plastoglobuli. I. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplsts. Planta 163:201-207.
- Stelmach B.A., Muller A., Hennig P., Gebhardt S., Schubert-Zsilavecz M., Weiler E.W. (2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)monogalactosyl Diglyceride, from Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 276:12832-8.
- Stintzi A., Browse J. (2000) The arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 97:10625-30.
- Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J., Farmer E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. Proc Natl Acad Sci USA 98:12837-12842.
- Stumpe M., Carsjens J.-G., Gobel C., Feussner I. (2008) Divinyl ether synthesis in garlic bulbs. J Exp Bot 59:907-915.
- Suza W., Staswick P. (2008) The role of JAR1 in Jasmonoyl-I-isoleucine production during Arabidopsis wound response. Planta 227:1221-1232.
- 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., Ohta H. (2005) 12-oxophytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in woundinduced gene expression in *Arabidopsis*. Plant Physiol 139:1268-1283.
- Taylor C.B., Bariola P.A., delCardayre S.B., Raines R.T., Green P.J. (1993) RNS2: a senescenceassociated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5118-22.

- Theodoulou F.L., Job K., Slocombe S.P., Footitt S., Holdsworth M., Baker A., Larson T.R., Graham I.A. (2005) Jasmonic acid levels are reduced in comatose ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. Plant Physiol 137:835-840.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., Browse J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. Nature 448:661-665
- Thomma B., Eggermont K., Penninckx I., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defenseresponse pathways in arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 95:15107-11.
- Thompson J., Taylor C. (2000) References 1. Biochem: 775-777.
- **Thompson J.E., Legge R.L., Barber R.F.** (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol 105:317-344.
- Thompson J.E., Froese C.D., Hong Y., Hudak K.A., Smith M.D. (1997) Membrane deterioration during senescence. Canadian Journal of Botany Revue Canadianne de Botanique 75:867-879.
- Thompson J.E., Froese C.D., Madey E., Smith M.D., Yuwen H. (1998) Lipid metabolism during plant senescence. Prog Lipid Res 37:119-141.
- Turner J.G., Ellis C., Devoto A. (2002) The Jasmonate Signal Pathway. Plant Cell 14:S153-164.
- **Ueda J., Kato J.** (1980) Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (Artemisia absinthium L.). Plant Physiol 66:246-249.
- **Ueda J., Kato J., Yamane H., Takahashi N.** (1981) Inhibitory effect of methyl jasmonate and its related compounds on kinetin-induced retardation of oat leaf senescence. Phys Plant 52:305-309.
- **Ueda M., Nakamura Y.** (2007) Chemical Basis of Plant Leaf Movement. Plant Cell Physiol. 48:900-907.
- Ulker B., Shahid Mukhtar M., Somssich I.E. (2007) The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. Planta 226:125-37.
- Van Breusegem F., Dat J.F. (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. Plant Physiol 141:384-90.
- van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flugge U.I., Kunze R. (2006) Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. Plant Physiol 141:776-92.
- van Doorn W.G. (2008) Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? J. Exp. Bot. 59:1963-1972.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J.J. (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. Proc Natl Acad Sci USA 98:8139-44.
- Vellosillo T., Martinez M., Lopez M.A., Vicente J., Cascon T., Dolan L., Hamberg M., Castresana C. (2007) Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in Arabidopsis Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. Plant Cell 19:831-46.

- Vick B.A., Zimmerman D.C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. Plant Physiol 75:458-461.
- Vignutelli A., Wasternack C., Apel K., Bohlmann H. (1998) Systemic and local induction of an Arabidopsis thionin gene by wounding and pathogens. Plant J 14:285-95.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C.A., Cook R.J., Browse J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 95:7209-7214.
- Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chetelat A., Farmer E.E. (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. Plant J 24:467-76.
- von Malek B., van der Graaff E., Schneitz K., Keller B. (2002) The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Planta 216:187-192.
- **Wasternack C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Ann Bot 100:681-97.
- Wasternack C., Kombrink E. (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. ACS Chem Biol 5:63-77.
- Weaver L.M., Amasino R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. Plant Physiol 127:876-86.
- Weaver L.M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Mol Biol 37:455-469.
- Weber H., Chetelat A., Caldelari D., Farmer E.E. (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. Plant Cell 11:485-94.
- Weichert H., Kohlmann M., Wasternack C., Feussner I. (2000) Metabolic profiling of oxylipins upon sorbitol treatment in barley leaves. Biochem Soc Trans 28:861-2.
- Weidhase R.A., Lehmann J., Kramell H.-M., Sembdner G., Parthier B. (1987a) Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester and counteraction by cytokinin. Plant Physiol 69:161-166.
- Weidhase R.A., Kramell H.-M., Lehmann J., Liebisch H.W., Lerbs W., Parthier B. (1987b) Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. Plant Science 51:171-186.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J 27:581-90.
- **Wingler A., Roitsch T.** (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. Plant biol 10:50-62.
- Wingler A., Masclaux-Daubresse C., Fischer A.M. (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. J. Exp. Bot.:67:1-4.
- Woo H.R., Goh C.-H., Park J.-H., Serve B.T.d.I., Kim J.-H., Park Y.-I., Nam H.G. (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. Plant J 31:331-340.

- Wu K., Zhang L., Zhou C., Yu C.-W., Chaikam V. (2008) HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. J. Exp. Bot. 59:225-234.
- Xie D., Feys B., James S., Nieto-Rostro M., Turner J. (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science 280:1091-1094.
- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L., Ma H., Peng W., Huang D., Xie D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. Plant Cell 14:1919-35.
- Yamane H., Takagi H., Abe H., Yokota T., Takahashi N. (1981) Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. Plant Cell Physiol 22:689-697.
- Yang W., Devaiah S.P., Pan X., Isaac G., Welti R., Wang X. (2007) AtPLAI Is an Acyl Hydrolase Involved in Basal Jasmonic Acid Production and. J Biol Chem 282:18116-18128.
- Yang Z., Ohlrogge J.B. (2009) Turnover of fatty acids during natural senescence of Arabidopsis, Brachypodium and Switchgrass and in Arabidopsis beta-oxidation mutants. Plant Physiol 150:1981-1989.
- Yoshihara T., Omer E.A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., Koda Y. (1989) Structure of a tuberinducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). Agric Biol Chem 53:2835-2837.
- Zentgraf U., Laun T., Miao Y. (2010) The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. Europ J Cell Biol 89:133-137.
- Zhang B., Chen K., Bowen J., Allan A., Espley R., Karunairetnam S., Ferguson I. (2006) Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. J Exp Bot 57:3825-3836.
- Zhang L. (2008) Methyl Jasmonate Induces Production of Reactive Oxygen Species and Alterations in Mitochondrial Dynamics that Precede Photosynthetic Dysfunction and Subsequent Cell Death. Plant Cell 49:1092-1111.
- Zimmermann P., Zentgraf U. (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. Cell Mol Biol Lett 10:515-34.
- **Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W.** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol 136:2621–2632.

# 7 Anhang



Abbildung S1: Relative Expression von *LOX1* (A), *LOX2* (B) und *LOX3* (C) zur Vorcharakterisierung der 35S::LOX2i-Linien. Dazu wurden Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen basal bzw. eine Stunde nach Verwundung geerntet [n=1].



Abbildung S2: Muster der quantifizierten Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern 9-14 des Wildtyps sowie der Mutante *dde2-2* und der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 und zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Wochen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Zeitkinetiken [n=3-6]



Abbildung S3: Lipid-Muster der quantifizierten Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps sowie der Mutante *dde2-2* und der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 nach Sorbitolbehandlung. Die Proben wurden jeweils zu Beginn des Experimentes (0 h) sowie nach 24 h und 48 h Inkubation auf 500 mM Sorbitollösung geerntet [0 h, 24 h, n=3; 48 h, n=6]. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=4].



Abbildung S4: Lipid-Muster der quantifizierten Galaktolipide [in  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FG] in den Blättern des Wildtyps sowie der Mutante *dde2-2* und der Linien 35S::LOX2i-2 und -9 nach nach H<sub>2</sub>O-Behandlung. Die Proben wurden jeweils zu Beginn des Experimentes (0 h) sowie nach 24 h und 48 h Inkubation auf H<sub>2</sub>O geerntet [0 h, 24 h, n=3; 48 h, n=6]. Die dargestellten Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Experimenten. [n=4].



Abbildung S5: Southern Blot der SAG13::AOSi-Linien. Die Herstellung der Sonden gegen das AOS-RNAi-Fragment erfolgte mit den Primern aus Tabelle 9. Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte mit dem Enzym EcoRI.



Abbildung S6: Southern Blot der SAG13::LOX2i-Linien. Die Herstellung der Sonden gegen das LOX2-RNAi-Fragment erfolgte mit den Primern aus Tabelle 9. Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte mit dem Enzym EcoRI und BamHI.

#### 139

# **DNA-Sequenzen**

# AOS RNAi- Fragment

# Länge: 465(+24bp)

1	TCTAGACTCG	AGCGGTTTAC	CAATCGTAGG	ACCAATCAAA	GACCGTTGGG	ATTACTTTTA
61	CGACCAAGGA	GCTGAAGAGT	TCTTCAAATC	ACGAATCCGT	AAATACAACT	CCACGGTGTA
121	CAGAGTCAAC	ATGCCACCGG	GAGCTTTTAT	CGCCGAGAAT	CCACAAGTCG	TGGCTTTACT
181	CGACGGTAAA	AGCTTCCCGG	TTTTATTCGA	TGTCGATAAA	GTCGAAAAGA	AAGATCTTTT
241	CACCGGTACT	TACATGCCGT	CAACGGAACT	AACCGGAGGC	TACCGTATCC	TCTCGTACCT
301	CGATCCATCG	GAGCCTAAAC	ACGAAAAGCT	САААААТСТС	CTTTTCTTCC	TCCTCAAGTC
361	ATCTCGAAAC	CGGATCTTCC	CTGAGTTTCA	AGCTACTTAC	TCCGAGCTTT	TCGATTCTTT
421	GGAGAAAGAG	CTTTCCCTTA	AAGGGAAAGC	GGATTTCGGC	GGTTCCAGCG	ACGGAACGGT
481	ACCATCGAT					

## LOX2 RNAi-Fragment

# Länge: 431 (+24) bp:

1	TCTAGACTCG	AGAGTTTGAG	CGCATTTACG	ACTATGATGT	GTACAACGAT	GTTGGTGACC
61	CTGACAATGA	TCCTGAACTT	GCTCGTCCGG	TAATTGGAGG	CCTCACACAT	CCATATCCAA
121	GGCGTTGCAA	GACCGGTCGA	AAACCTTGTG	AGACTGACCC	CTCTTCAGAG	CAACGCTACG
181	GGGGAGAGTT	CTATGTACCA	AGAGACGAGG	AGTTCTCTAC	AGCCAAGGGC	ACTTCATTCA
241	CAGGCAAGGC	CGTACTGGCA	GCTCTTCCCT	CCATCTTCCC	TCAGATCGAG	TCTGTTCTAT
301	TGAGTCCCCA	AGAACCTTTT	CCACACTTCA	AGGCCATACA	AAATCTCTTT	GAAGAAGGCA
361	TTCAGCTTCC	CAAGGATGCT	GGCCTCTTAC	CTCTGCTCCC	CAGAATCATC	AAAGCTCTTG
421	GCGAA <u>GCTCA</u>	AGATGATATT	CTCGGTACCA	TCGAT		

#### SAG13 Promotor

# Länge: 1638 (+24) bp

1	GTCGACACGG	CTCATCTCTG	<u>GTCATTGC</u> TA	GTCACAGGTA	AAAGTAAAAA	TTGATCAAAG
61	ATAAAGAGTC	TTTCATGGTA	AAAATTCTCT	TGTAACTGGT	GGAGATAGTA	GATGTCAATT
121	CGTTTGCAAT	AACTTACATT	TGCAATAACA	TGTCAGCCAT	ATTTATTTAA	ATTTCCATGC
181	ATTTGATATT	ATTTTCTCTC	TAATACATAT	ATGATGTGTT	ACGGTCATTC	ТАААААТССА
241	GTTGACAGCA	TAATGAAGCT	GGTACACCAT	ACATGCACTT	GATTATATAT	GGATGTTACT
301	GCCATGATTG	ATGTTTTGAT	GGAATTAGTG	TTAAAGGATG	GACCCTCACT	AACGCGGTTG
361	GAAATTATGA	TCAAACTCTT	CAATGTCACT	TATCAAGAGA	GCTAATGACT	AGCACGTTTA
421	GTTGTTCTGT	TGTTTCTTAT	GGCTGCTTAA	TGTCTCCATC	AAATATTTAG	ACATTGTGGC
481	TAGTAAAATG	CCATCTACCT	ТААТССТАТА	TATAAGTATA	ACTAGATAAT	AATCCATATT
541	TTTGCTGGGT	TTAGTAGCTG	ATACGACGTT	TATGGTTGTT	ATTGAGTTTG	ААТАСААААТ
601	ATAGAGTATT	GTTGGAGTTA	TATTGATTTT	TGTTCATATT	AGTTAACAAA	ТААТААААА
661	ATTAAGAAAG	GTTTTTGAAA	ATGCATCTTC	TAGAATATAT	GTATATTCGA	AAAAGTCACA
721	TCTTTAATTG	ACATATGTTT	TGTTTGTTTG	TTTTTTTTAC	TGGCCACACA	AATTGACAAC
781	AATGGTCATG	CATGAAATGA	AATGTTTGTT	GTCAATTTTT	TTTACTAACT	TGTAATATCA
841	TTATGAAATG	AAATAGAAGG	TATATATTAC	AAAATATTAC	CTAAAAGTAG	AGCAATCTTA
901	GAAAAAAAAA	ААААААААА	AAAAAAAGAA	AAAGAAAAAG	AAACAAGATT	ACAATGCATT

961	TAAAAAGAGA	TGGAAAGAAT	CCGAGCTATC	GAATCCAAAG	AAGCATCAGC	TTCCTCCATC
1021	TGTTCTTGTA	TCGTCTACCA	GAGATGGTGT	TCCGGATCTC	TCGATCAATA	TTCTTAAAGA
1081	TGGTTGTTGG	AGGGATCCTT	TGGCTATTAT	GGAGAACATT	ATTCGTTTAT	CTCCAGATGT
1141	GATAGACAAA	GGGCTGTGTG	GCCTGTGAGA	CCGATGGCCA	CTTAATTATT	GGTTTTTTGT
1201	CAATGGTTGT	GTATGCATAG	AAATTCCCAC	AACCGTTTGT	GGCTTAACAC	AATTTACCAG
1261	GGGTTTAAGT	GGTTAAATTG	ATACATGTAG	ATCTAAAGTT	TTATGCTAAT	ATAAATTAGT
1321	TTTAATTATA	ΤΑΑΑΤΤΤΤΑΑ	CTACGCTCAT	GACACGTAAA	TGGTAGACCA	ATATGTGGTG
1381	CTCTATTAAC	TAAGGGGTCT	TCATTATTAA	TTCATAAAGA	CTTTCTTTAC	TATACAAGAC
1441	TTGTCAAAAG	GAAAAGTAGT	ATTTTCGTAC	TACGTCTACC	CCTCTCACGG	ATATGTGTGG
1501	TCGAGCAGTC	ATTATCATAA	TGTGGAATTT	TGAATTGAGC	GAGGTTTCAA	AGTTCAAAAC
1561	TATCACAACT	AGTCTTGATC	AATTCTATAT	AAGATCTGTG	ATCTTGGTTG	AAGAAAAGAA
1621	TCGTCGTAGG	TT <u>GATATTTA</u>	ACAAGGAATG	CTCGAGCCCG	GG	



Abbildung S7: Die per PCR amplifizierten RNAi-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-Teasy (Promega) ligiert (nicht dargestellt). Aus diesem wurden die jeweiligen Fragmente mit den Restriktionsenzymen Xbal/Clal bzw. Kpnl/Xhol nacheinander in gegenläufiger Orientierung in die entsprechende *multiple-cloning-site* des Zielvektors pHannibal ligiert. Es entstanden die Vektoren 35S::AOS bzw. 35S::LOX2::LOX2.



Abbildung S8: Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Xhol und Mlul wurde der Großteil des 35S-Promotors entfernt. Der via pGEM-Teasy klonierte SAG13 Promotor wurde auf gleichem Weg in die vorbereiteten RNAi-Vektoren eingefügt. Es entstanden die Vektoren SAG13::AOS::AOS bzw. SAG13::LOX2::LOX2.



Abbildung S9:Zur Pflanzentransformation wurden die fertigen RNAi-Kassetten aus den Vektoren SAG13::AOS::AOS, SAG13::LOX2::LOX2 und 35S::LOX2::LOX2 mit dem Enzym Notl ausgeschnitten und jeweils in den binären Vektor pART27 ligiert. Es entstanden die binären Vektoren SAG13::AOSi, SAG13::LOX2i sowie 35S::LOX2i.
Analyt	Precursor-lon (m/z)	Produkt-lon (m/z)
MGDG-18:0-18:0 (interner Standard)	785,5	283
DGDG-18:0-18:0 (interner Standard)	947,5	283
Arabidopsid A MGDG-dnOPDA-OPDA	773,5	263 291
Arabidopsid B MGDG-OPDA-OPDA	801,5	291
Arabidopsid C DGDG-dnOPDA-OPDA	935,5	263 291
Arabidopsid D DGDG-OPDA-OPDA	963,5	291
Arabidopsid E OPDA-MGDG-dnOPDA-OPDA	1047,5	263 291
Arabidopsid G OPDA-MGDG-OPDA-OPDA	1075,5	291
DGDG-18:3-16:0	913,0	277,0 255,0
DGDG-18:3-18:0	941,0	283,0
		277,0
DGDG-18:3-10:1	939,0	277,0
DGDG-18:3-16:1	911.0	277,0
2020 10.0 10.1	011,0	253,0
DGDG-18:3-18:3	935,0	277,0
DGDG-18:3-16:2	909,0	277,0
		251,0
DGDG-18:3-16:3	907,0	249,0
DCDC 19:2 19:2	937,0	279,0
DGDG-10.3-10.2		277,0
MGDG-18:3-16:0	751,0	277,0
		255,0
MGDG-18:3-16:1	749,0	253,0
MODO 40-2 40-2	775.0	279,0
WGDG-10.3-10.2	110,0	277,0
MGDG-18:3-16:2	747,0	277,0
		251,0
MGDG-18:3-16:3	745,0	249,0
MGDG-18:3-18:3	773,0	277
MODO 49-2 49-4	777 0	281,0
MGDG-18:3-18:1	777,0	277,0
MGDG-18:3-18:0	779,0	283,0
		277.0

Tabelle S1: Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) zur massenspektrometrischen Detektion von Galaktolipiden und Arabidopsiden

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Martin A. Seltmann, Nadja E. Stingl, Jens K. Lautenschlaeger, Markus Krischke, Martin J. Mueller and Susanne Berger,

Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*, Plant Physiology (2010) 152, 1-11

## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Februar 2010 am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller und Frau PD Dr. Susanne Berger dafür bedanken, dass sie mir dieses interessante Projekt im Rahmen des Graduiertenkollegs 1342 "Lipid Signalling" zur Verfügung stellen konnten. In diesem Sinne sei auch allen weiteren Organisatoren und Trägern des Graduiertenkollegs, besonders der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieses wissenschaftlichen Vorhabens gedankt.

Desweiteren danke ich dem Zweitgutachter Herrn PD Dr. Dirk Becker für die Begutachtung dieser Arbeit.

Im Besonderen möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Susanne Berger für die fachliche Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit, für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung einer Fachpublikation sowie für die Durchsicht und Begutachtung dieses Manuskriptes bedanken. Im Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie meinen Dank aussprechen, die für eine allzeit gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und denen ich insgesamt viel Unterstützung verdanke. Besonders möchte ich Herrn Dr. Markus Krischke für seine praktischen und theoretischen Bemühungen in der Analytik danken. An dieser Stelle sollen auch meine Kollegen Beate Stephan, Nadja Stingl, Maria Zöller, Simone Findling, Katharina Bonfig, Jörg Hirsche, und Markus Peer lobend erwähnt werden, die mir oft in praktischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso haben die Diplomanden Wiebke Hußels und Lens Lautenschläger sowie unzählige nicht genannte aber unvergessene Praktikanten wertvolle Beiträge zur Durchführung dieser Arbeit geleistet. Ihnen soll hier ebenfalls Dank ausgesprochen werden.

Ein persönliches Dankeschön gilt meiner lieben Frau Stephanie.

Ebenso danke ich meiner Mutter für die standhafte Unterstützung in schwierigen Zeiten und meinem Vater, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben konnte. Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

Martin Seltmann