

Regulation der Jasmonatbiosynthese durch Lipasen in
Arabidopsis thaliana

Dissertation zur Erlangung des
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

vorgelegt von

Nadja Stingl

aus

Würzburg



Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Kaiser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	13
I. Einleitung	15
1. Oxylipine	15
1.1. Jasmonat-Biosynthese	17
1.2. Signaltransduktion und physiologische Funktion von Jasmonaten	24
2. Membranlipide der Pflanzlichen Zelle	27
2.1 Arabidopside	29
3. Lipasen	30
4. Zielsetzung der Dissertation	33
II. Material und Methoden	35
1. Chemikalien, Enzyme	35
1.1 Spezielle Chemikalien	35
1.2 Antibiotika	35
1.3 Enzyme und Puffer	35
1.4 Andere Reagenzien, Materialien und Kits	36
1.5 Interne Standards für Analytik	36
1.6 Laborgeräte	36
2. Nährmedien	37
2.1 Bakterienmedien	37
2.2 Pflanzenanzuchtmedium	37
2.3 Antibiotika	37
2.4 Pufferlösungen	38
3. Pflanzenmaterial	39
3.1 Pflanzenanzucht	41

3.1.1 Pflanzenanzucht auf Erde	41
3.1.2 Pflanzenanzucht in und auf MS-Medium	41
4. Experimentelle Methoden an Pflanzenmaterial	42
4.1 Verwundung	42
4.2 Silbernitratzugabe	42
4.3 <i>Pseudomonas syringae</i> Infektion	42
4.3.1 Herstellung der Bakteriensuspension von <i>Pseudomonas syringae</i>	42
4.3.2 Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i>	43
4.4 Sorbitolflotierung	43
4.5 D ₅ -Markierung von Strukturlipiden und freien Lipiden	44
5. Bakterienstämme	44
6. Plasmide	45
7. Allgemeine molekularbiologische Methoden	45
7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
7.2 Agarose-Gelelektrophorese	46
7.4 Ligation von DNA-Fragmenten	46
7.5 Transformation von Bakterien	47
7.6 „Colony Screen“: Identifizierung transformierter Bakterien-Kolonien	47
7.7 Isolierung von Plasmid-DNA	48
7.8 Herstellung von Glycerolstocks	48
7.9 Quantifizierung von DNA bzw. RNA	48
7.10 Sequenzierung von DNA-Sequenzen	48
7.11 Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial	49
7.12 Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA	49
7.13 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR	49
8. Lipidextraktion aus Pflanzenmaterial	52

8.1 Extraktion nicht veresterter (freier) Lipide	52
8.2 Extraktion komplexer Lipide	52
9. Lipidanalytik mittels HPLC-Tandem MS	53
9.1 HPLC-Methoden	53
9.1.1 Freie Lipide	53
9.1.2. Komplexe Membranlipide	54
9.1.2.1 Galaktolipide	54
9.1.2.2 Phosphatidylcholine	54
9.2 MS-Methoden	55
9.2.1 Freie Lipide	55
9.2.2. Komplexe Membranlipide	56
9.2.2.1 Galaktolipide	56
9.2.2.2 Phosphatidylcholine	58
III. Ergebnisse	60
1. Quantitative und qualitative Bestimmung von Glycerolipiden in Rosetten-blättern von <i>A.thaliana</i>	60
1.1 Quantitative und qualitative Bestimmung von Monogalaktosyldiacylglycerolen (MGDG)	61
1.2 Quantitative und qualitative Bestimmung von Digalaktosyldiacylglycerolen (DGDG)	63
1.3 Quantitative und qualitative Bestimmung von Phosphatidylcholinen (PC)	65
2. Jasmonatinduktion	67
2.1 Jasmonatinduktion durch Verwundung	67
2.2 Jasmonatinduktion durch Infektion mit <i>P.syringae</i> DC3000	69
2.3 Jamonatinduktion durch Sorbitolflotierung	71
2.4 Jasmonatinduktion durch Applikation von Silbernitrat	73
3. Chloroplastidäre Lipasen	75
3.1 In-Silico-Analyse	75

3.2 Beteiligung von „DONGLE (DGL)“ und „Defective in Anther Dehiscence1 (DAD1)“ Lipasen an der JA-Biosynthese	76
3.2.1 Lipidomische Analyse von „DONGLE (DGL)“ und „Defective in Anther Dehiscence1 (DAD1)“ Lipasen	77
3.2.1.1 Analyse freier Oxylipine in <i>dgl-D</i> und <i>dgl-i</i> nach Verwundung	77
3.2.1.2 Analyse freier Oxylipine in <i>pla-la1 7-1</i> und <i>pla-la1 8-1</i> nach Verwundung	80
3.2.1.3 Lipidomische Analyse freier Oxylipine und Arabidopside in <i>dad1</i> nach Verwundung	83
3.2.1.4 Quantitative Genexpressionsanalyse von DGL und DAD1 nach Verwundung	86
3.3.1.5 Lipidomische Analyse von <i>pla-la1 7-1</i> , <i>pla-la1 8-1</i> und <i>dad1</i> nach <i>P. syringae</i> DC3000-Infektion	88
3.3 Analyse plastidär lokalisierter Lipasen	91
3.3.1 Molekularbiologische Analyse auf Homozygotie	91
3.3.2 Lipidomische Analyse nach Verwundung	94
3.3.3 Lipidomische Analyse nach <i>P. syringae</i> DC3000-Infektion	100
4. Aufklärung der Arabidopsid- und stressinduzierten JA-Biosynthese	102
IV. Diskussion	111
1. Analyse von Monogalaktosyldiacylglycerolen, Digalaktosyldiacylglycerolen und Phosphatidylcholinen in Rosettenblättern von <i>A. thaliana</i>	112
2. Lipidomische Analyse chloroplastidärer Lipasen	114
4. Arabidopsid-Synthese	120
V. Zusammenfassung	125
Summary	127
Literaturverzeichnis	129

Lebenslauf	137
Publikationen	138
Danksagung	139
Ehrenwörtliche Versicherung	140

Abkürzungen

ACP	engl.: Acyl Carrier Protein
BHT	Butylhydroxytoluene
bp	Basenpaare
Cfu	engl.: colony forming units für Kolonie bildende Einheit
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerol
dnOPDA	dinor 12-Oxophytodiensäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
IS	Interner Standard
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MeOH	Methanol
EdTA	Ethylendiamintetraessigsäure
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerol
MRM	engl.: Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
na	nicht analysiert
nd	nicht detektiert
Nos	<i>Arabidopsis thaliana</i> Nossen
OD	Optische Dichte
OPDA	12-Oxophytodiensäure
PC	Phosphatidylcholine
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction für Polymerase Kettenreaktion
rpm	engl.: rounds per minute für Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
STABW	Standardabweichung

TAE	Tris-Acetat-EdTA-Puffer
TG	Trockengewicht
TPP	Triphenylphosphin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UPLC	engl.: Ultra High Performance Liquid Chromatography für Ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ws	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wassilewskija

Abbildungsverzeichnis

- Abb. I.1:** Phytoprostan-Grundgerüst
- Abb. I.2:** Schema der Oxylin-Synthese
- Abb. I.3:** Strukturformel von 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), dinor-Oxo-Phytodiensäure (dnOPDA) und Jasmonsäure (JA)
- Abb. I.3:** Biosynthese und Metabolismus von Jasmonsäure
- Abb. I.4:** Cyclooxygenin-Biosynthese
- Abb. I. 5:** Schematische Darstellung der Regulation von Jasmonaten und durch Jasmonate gegenüber endogener und exogener Stimuli.
- Abb. I.6:** Membranlipidmuster (mol%) von *A. thaliana*
- Abb. I.7:** Arabidopside
- Abb. I.8:** Positionen der hydrolytischen Aktivität der Phospholipasen *PLA₁*, *PLA₂*, *PLC* sowie *PLD*.
- Abb. III.1:** Quantitative und qualitative Bestimmung von Monogalaktosyldiacylglycerolen.
- Abb. III.2:** Quantitative und qualitative Bestimmung von Digalaktosyldiacylglycerolen
- Abb. III.3:** Quantitative und qualitative Bestimmung von Phosphatidylcholinen
- Abb. III.4:** Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung
- Abb. III.5:** Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).
- Abb. III.6:** Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) während der Flotierung in einer 500mM Sorbitol Lösung.
- Abb. III.7 :** Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) nach Behandlung mit 1mM Silbernitrat.
- Abb. III.8:** Bestimmung von freier JA nach Verwundung (Hyun et al. 2008)
- Abb. III.9:** Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Überexpressionslinie *dgl-D*.
- Abb. III.10:** Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der DGL-RNAi-Linie *dgl-i*.

- Abb. III.11:** Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der PLA₁-Iα1-RNAi-Linien *pla-Iα1 7-1* und 8-1.
- Abb. III.12:** Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Knock-out-Mutante *dad1* (Ishiguro et al. 2001).
- Abb. III.12.1:** Bestimmung von Arabidopsiden und den abundantesten Galaktolipiden nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Knock-out-Mutante *dad1* (Ishiguro et al. 2001).
- Abb. III.13:** Genexpressionsanalyse von DGL und DAD1 mittels quantitativer Realtime PCR nach Verwundung.
- Abb. III.14:** Genexpressionsanalyse von DGL in Col-0 und *dgl-i* Pflanzen mittels quantitativer Realtime PCR nach Verwundung.
- Abb. III.15:** Bestimmung von freier OPDA und JA in Col-0, *dad1*, PLA₁-Iα1-RNAi-Linien *pla-Iα1 7-1* sowie 8-1 nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).
- Abb. III.16:** Schema der Primerbindungsstellen im Genom und der T-DNA-Insertion zum Homozygotienachweis von T-DNA-Insertionsmutanten des Nottingham Stockcenters.
- Abb. III.17:** Nachweis der Homozygotie am Beispiel der T-DNA-Insertionsmutante SAIL_716_F08 (At5g11650).
- Abb. III.18:** Vergleich der OPDA- Gehalte von Lipasemutanten nach Verwundung.
- Abb. III.19:** Vergleich der JA-Gehalte von Lipasemutanten nach Verwundung.
- Abb. III.20:** Bestimmung von freier dnOPDA, OPDA und JA nach Verwundung in Blättern von Wildtyp-Pflanzen, von Einzelmutanten der Lipasen PLA₁-Iγ1, PLA₁-Iγ2, PLA₁-Iγ3 und PLA₁-Iβ2 sowie der Vierfachmutante *c1x11*.
- Abb. III.21:** Vergleich der OPDA- und JA-Gehalte von Lipasemutanten nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).

- Abb. III.22:** Vergleich der mittleren prozentualen Markierungsgrade von JA, OPDA, Linolensäure (18:3), MGDG, DGDG und 18:3-18:3-PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen nach vierundzwanzig stündiger Inkubation mit D₅-Linolensäure (A) sowie eine Stunde nach Zugabe einer 1mM Silbernitrat-Lösung (B).
- Abb. III.23:** Vergleich der Markierungsgrade der einfach D₅-markierten MGDG-Lipide 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) sowie Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) mit den Markierungsgrade von D₅-markierter OPDA und JA nach 1h Inkubation mit Silbernitrat.
- Abb. III.24:** Gewinn-/Verlustrechnung nach Silbernitratzugabe in *A. thaliana*.
- Abb. III.25:** Arabidopsid- und stressinduzierten JA-Biosynthese

Tabellenverzeichnis

- Tab. II.1:** Puffer-Zusammensetzung
- Tab. II.2:** Verwendete Arabidopsis Linien
- Tab. II.3:** Verwendete Oligonukleotide zum T-DNA-Insertionsnachweis und entsprechende Annealingtemperaturen.
- Tab. II.5:** Primer zur Sequenzierung von DNA-Sequenzen innerhalb von Klonierungsvektoren.
- Tab. II.6:** Primer zur Expressionsanalyse mittels quantitativer Reverser-Transkriptase-PCR verwendet.
- Tab. II.8:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von freien Lipiden.
- Tab. II.9:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von Galaktolipiden
- Tab. II.10:** Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von Phosphatidylcholinen.
- Tab. II.11:** Geräteinstellungen zur analytischen Bestimmung freier Lipide
- Tab. II.12:** Spezifische Massenübergänge freier Lipide im negativen Elektrospray-Modus (ESI⁻).
- Tab. II.13:** Geräteinstellungen zur analytischen Bestimmung von Galaktolipiden
- Tab. II.14:** Spezifische Massenübergänge von Monogalaktosyldiacylglycerolen (MGDG) im negativen Elektrospray-Modus (ESI⁻).
- Tab. II.15:** Spezifische Massenübergänge von Digalaktosyldiacylglycerolen (DGDG) im negativen Elektrospray-Modus (ESI⁻).
- Tab. II.16:** Geräteinstellungen zur analytischen Bestimmung von Phosphatidylcholinen
- Tab. II.17:** Spezifische Massenübergänge von Phosphatidylcholinen (PC) im negativen Elektrospray-Modus (ESI⁻).
- Tab. III.1:** Ergebnis der Datenbankrecherche durch den Lehrstuhl Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.
- Tab. III.2:** Ergebnis der molekularbiologische Analyse auf Reinerbigkeit.

- Tab. III.3:** Tabellarische Darstellung der prozentualen Markierungsgrade der komplexen Lipide MGDG, DGDG und PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen nach vierundzwanzig stündiger Inkubation mit D₅-Linolensäure .
- Tab. III.4:** Tabellarische Darstellung der prozentualen Markierungsgrade der komplexen Lipide MGDG, DGDG und PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen 1 h nach Zugabe einer 1 mM Silbernitratlösung. (MW±SD, n=3)
- Tab. IV.1:** Beteiligung der getesteten Lipasen an der basalen, frühen wundinduzierten sowie durch *P. syringae* DC3000 induzierten JA-Biosynthese.

I. Einleitung

Als sessile Organismen sind Pflanzen einer Reihe von Stressfaktoren ausgesetzt. Diese Stress-vermittelnden Faktoren können biotischer oder abiotischer Herkunft sein.

Beispiele abiotischer Einflüsse aus der Umwelt sind Temperatur, Wasserverfügbarkeit, Mineralstoffangebot, Lichtquantität sowie –qualität. Aber auch Schwermetalle, Chemikalien und Luftschadstoffe zählen zu den abiotischen Stressfaktoren.

Im Gegensatz dazu sind biotische Stressfaktoren immer durch andere Individuen vermittelt. Hierzu zählen Herbivorie, Pathogenbefall aber auch symbiontische oder konkurrierende Lebensweisen (Nürnberger et al; 2001).

Um als sessiler Organismus überleben zu können, entwickelten Pflanzen im Laufe der Evolution Abwehrmechanismen. Man unterscheidet zwei Arten der Abwehr: konstitutive und induzierbare Abwehr.

Zu den konstitutiven Abwehrmechanismen zählen strukturelle Barrieren wie die Beschaffenheit der Zellwand (Blee 1998), welche durch Lignineinlagerung einen Angriff von Pathogenen oder Herbivoren erschwert. Aber auch lipophile Blattüberzüge oder die Speicherung von Sekundärstoffen wie zum Beispiel Phenolderivate, Saponine, cyanogene Glycoside oder Acetophenone können einen Angriff von Feinden abwehren.

Neben der konstitutiven Abwehr verfügen Pflanzen zusätzlich über eine lokal und systemisch induzierbare Abwehr. Bei Pathogenbefall oder Einwirkung von anderen Stressoren (z.B. Wassermangel) kann es zur Induktion von Abwehrstoffen und programmiertem Zelltod kommen. Eine der wichtigsten Gruppen an Signalstoffen sind Oxylipine.

1. Oxylipine

Oxylipine sind oxidierte Derivate von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Sowohl in Säugetieren als auch in Pflanzen werden Oxylipine als Reaktion auf spezifische Reize beziehungsweise Stressbedingungen gebildet. In Säugern ist die Hauptausgangssubstanz der Oxylipine die C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (Blee 2002, Morrow et al. 1990). Deren oxidierte Derivate, wie beispielsweise die Prostaglandine, sind an Entzündungs- sowie Infektionsreaktionen beteiligt. In pflanzlichen Organismen dienen als Substrate der Oxylipin-Synthese

hauptsächlich ungesättigte C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren. Diese Fettsäuren können auf enzymatischem sowie nicht-enzymatischem Weg zu Oxylipinen metabolisiert werden.

Die Synthese der nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine wird durch freie Radikale sowie durch Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: Reactive Oxygen Species, ROS) initiiert (Müller S. et al. 2008). Die bekannteste Gruppe der nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipine stellen die Phytoprostane, cyclische Pentanon- sowie Pentanonverbindungen, dar (Abbildung I.1) (Imbusch and Mueller 2000a).

Es konnte gezeigt werden, dass Verwundung (Imbusch and Mueller 2000b) sowie Pathogenbefall (Thoma et al. 2003) eine Akkumulation von Phytoprostanen in der pflanzlichen Zelle bewirkt. Grund hierfür ist die Bildung von ROS, welche nach diesen Stressstimuli im Rahmen des sogenannten „Oxidative Burst“ und als Folge eines gestörten Stoffwechsels akkumulieren (Cheong et al. 2002). Dies hat zur Folge, dass es zu einem radikalischen Angriff der ROS auf in Membranen veresterte Fettsäuren, allen voran α-Linolensäure, kommt.

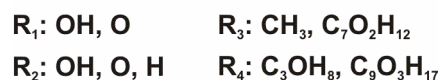
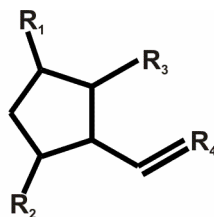


Abbildung I.1: Phytoprostan-Grundgerüst

Der Klasse der nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipine steht die Gruppe der enzymatisch gebildeten Oxylipine gegenüber. Zu diesen zählen Hydroperoxide, Aldehyde, Ketone, Alkohole, Epoxide, Divinylether, Ketole sowie Cyclopentenone (Abb. I.2) (Mosblech et al. 2008). Der initiale Schritt der Biosynthese verschiedener enzymatisch gebildeter Oxylipine ist meist die Oxygenierung einer mehrfach ungesättigten Fettsäure mittels einer Oxygenase (9- und 13-Lipoxygenasen (LOX), α-Dioxygenasen). Die gebildeten Peroxide stellen das Substrat für alle weiteren enzymatischen Schritte dar. (Feussner and Wasternack 2002). Eine zentrale Rolle innerhalb der pflanzlichen enzymatisch gebildeten

Oxylipine spielen die mittels des Allenoxid-Synthese-Wegs gebildeten Jasmonate. Diese Oxylipine regulieren als Signalstoffe eine Reihe von physiologischen sowie pathologischen Prozessen. Zu den Jasmonaten zählen das Pro-Phytohormon Jasmonsäure (JA) und deren Metabolite sowie alle biochemischen Vorstufen.

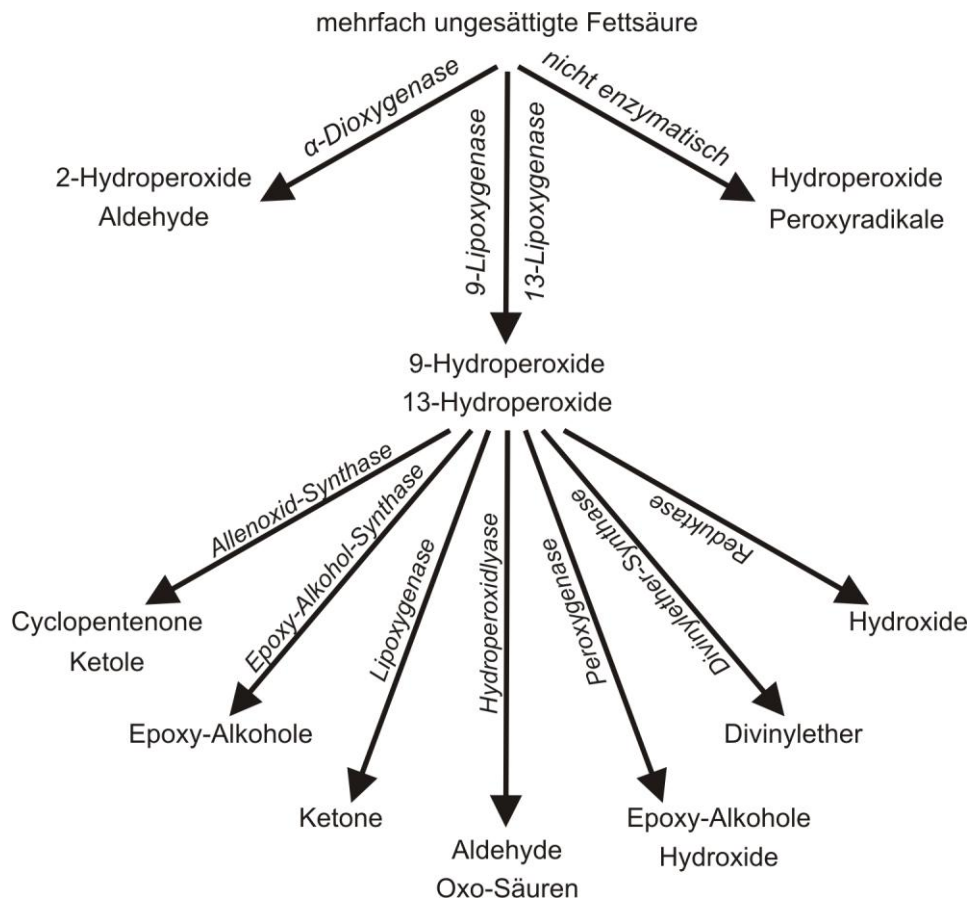


Abbildung 1.2: Schema der Oxylipin-Synthese (Darstellung entnommen aus „<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/eicplant/index.htm>“ und modifiziert.)

1.1. Jasmonat-Biosynthese

Die Biosynthese von JA (Abb. 1.3) ist bereits seit drei Jahrzehnten (Vick and Zimmerman 1984) bekannt und wurde nach den Entdeckern Brady A. Vick und Don C. Zimmerman „Vick-Zimmerman-Pathway“ benannt. Im Laufe dieser 30 Jahre konnten durch die Arbeit an den Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* sowie *Solanum lycopersicum* fast alle beteiligten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. So weiß man heute, dass sich die Synthese von Jasmonsäure und ihrer Derivate in der pflanzlichen Zelle in drei Kompartimenten

in folgender Reihenfolge vollzieht: Plastid, Peroxisom und Cytosol (Abb. I.4) (Gfeller et al. 2010).

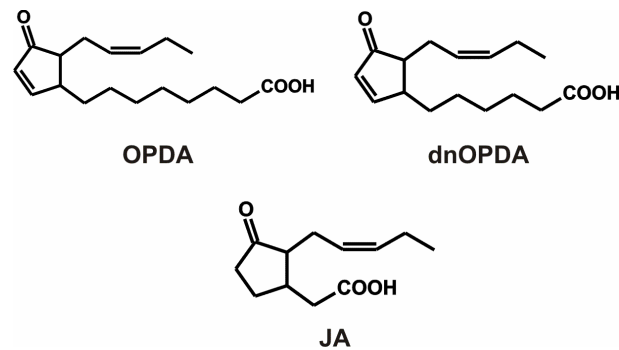


Abbildung I.3: Strukturformel von 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), dinor-12-Oxo-Phytodiensäure (dnOPDA) und Jasmonsäure (JA)

Der initiale Schritt der JA-Biosynthese ist die Freisetzung von α -Linolensäure (α -18:3) mittels einer Lipase aus der Chloroplastenmembran. Dies konnte für die Blüten von *A. thaliana* durch die Mutante *dad1*, welche in einer plastidär lokalisierten Phospholipase defizient ist, bewiesen werden (Ishiguro et al. 2001). Die Mutante *dad1* (engl.: defective in antheren dehiscence) zeichnet sich durch einen männlich sterilen Phänotyp aus, da bei diesen Pflanzen die Staubbeutel, die sogenannte Antheren, nicht aufplatzen können und somit bei den selbstbestäubenden *A. thaliana* Pflanzen keine Bestäubung bzw. Befruchtung stattfindet. Durch exogene Applikation von JA oder α -Linolensäure konnte jedoch dieser Defekt wieder komplementiert werden. Die Mutante *dad1* weist lediglich in den Blüten niedrigere JA-Konzentration (22% im Vergleich zum Wildtyp) auf, in den Blättern hingegen entspricht die Konzentration an JA jener des Wildtyps. Dies lässt darauf schließen, dass eine noch unbekannt Lipase die JA-Biosynthese in Blättern reguliert.

Im Chloroplasten frei vorliegende α -Linolensäure dient einer Lipoxygenase, der sogenannten 13-LOX, als Substrat (Vick and Zimmerman 1984). Hierbei kommt es zur Oxygenierung an Position 13 der Kohlenstoffkette. Aber auch eine dreifach ungesättigte C_{16} -Fettsäure (Roughanic Acid, 16:3) kann als Substrat der 13-LOX fungieren (Mosblech et al. 2008) und Ausgangssubstanz der Jasmonsäuresynthese sein (Feussner and Wasternack 2002, Gfeller et al. 2010). Ausgehend von der α -Linolensäure wird durch 13-LOX die 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT) gebildet (Delker et al. 2006). Mittels Wasserabspaltung

wandelt das ebenfalls chloroplastidär lokalisierte Enzym Allenoxid-Synthase (AOS) 13-HPOT zu dem instabilen Allenoxid 12,13-Epoxyoctadecatriensäure (12,13-EOT) um (Brash et al. 1988). Durch Untersuchungen an *A. thaliana*-Pflanzen, welche einen Defekt in dem AOS-codierenden Gen besitzen, konnte gezeigt werden, dass die AOS für die Jasmonsäuresynthese essentiell (von Malek et al. 2002) und in Chloroplasten lokalisiert ist (Laudert and Weiler 1998, Laudert et al. 2000, Laudert et al. 1996). AOS-defiziente Mutanten (*dde2-2*, engl.: delayed dehiscence) zeigen wie die Mutante *dad1*, einen männlich sterilen Phänotyp, welcher durch die Applikation von Jasmonaten aufgehoben werden kann. Dies beweist, dass die AOS essentiell für die JA-Biosynthese in bisher allen untersuchten Geweben ist.

Den letzten enzymatischen Schritt der JA-Biosynthese innerhalb des Chloroplasten stellt die unmittelbare Zyklisierung des instabilen 12,13-EOT zu 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) sowie des C₁₆-Homologs 10,11-Epoxyhexadecatriensäure (10,11-EHT) zu dinor-12-Oxo-Phytodiensäure (dnOPDA) mittels der Allenoxid-Cyclase (AOC) dar (Hamberg and Fahlstadius 1990, Laudert et al. 1996, Stenzel et al. 2003).

OPDA bzw. dnOPDA (Abb. I.3) gelangt anschließend auf noch unbekannte Weise aus dem Chloroplasten in das Cytosol und wird mittels des ABC-Transporters COMATOSE (CTS), der auch als PXA1 oder PED3 bekannt ist, in die Peroxisomen transferiert (Theodoulou et al. 2005). Jedoch sind Mutanten dieses Transporters nicht völlig JA-defizient, was mutmaßen lässt, dass andere noch unbekannte OPDA-Transferwege existieren. So wird vermutet, dass freie OPDA, ähnlich wie JA (Dathe et al. 1993), eine schwache Säure ist und abhängig von der sie umgebenden Protonenkonzentration als lipophile freie Säure oder als lipophobes Anion vorliegt. Im neutralen Milieu des Cytosols liegen demnach gleiche Mengen der lipophilen sowie lipophoben OPDA vor. Freie OPDA kann folglich die Peroxisomenmembran ungehindert passieren und wird im basischen Lumen des Peroxisoms deprotoniert, was einen Efflux aus dem Peroxisom schließlich verhindert. Innerhalb der Peroxisomen wird OPDA durch das Enzym OPDA-Reductase 3 (OPR3) am C8-Atom reduziert (Stintzi and Browse 2000, Vick and Zimmerman 1984). Untersuchungen an zwei Mutanten, welche beide einen Defekt in dem OPR3-codierenden Gen aufweisen, *opr3* und *dde1*, sind Jasmonsäure defizient und beweisen, dass es sich auch bei OPR3 um ein

essentielles Enzym der JA-Biosynthese handelt (Sanders et al. 2000, Stenzel et al. 2003, Stintzi and Browse 2000). Nach Reduktion von OPDA wird das gebildete Intermediat einer dreimaligen β -Oxidation unterzogen, welche durch drei Enzyme (Acyl-CoA Synthase, Acyl-CoA Oxidase, L-3-Ketoacyl-CoA Thiolase) katalysiert wird. Jede β -Oxidation verkürzt die Carboxyl-Seitenkette um je zwei Kohlenstoffatome (Adham et al. 2005, Delker et al. 2006, Richmond and Bleecker 1999). Produkt der Mehrfachoxidation ist (+)-7-*iso*-Jasmonsäure, welches zu dem stabileren (-)-Jasmonsäure isomerisieren kann (Vick and Zimmerman 1984).

Nach Bildung des Pro-Phytohormons JA wird dieses auf noch unbekanntem Weg aus dem Peroxisom exportiert und kann zu verschiedenen Derivaten im Cytosol metabolisiert werden (Delker et al. 2006, Gfeller et al. 2010, Glauser et al. 2008b, Wasternack 2007). Glykosylierung (Sembdner and Parthier 1993), Methylierung (Seo H. S. et al. 2001), Decarboxylierung (Koch et al. 1997) sowie die Konjugation mit Aminosäuren oder dem Ethylenvorläufer 1-Amino-Cyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) (Staswick and Tiryaki 2004) an der Carboxylgruppe von JA sind möglich. Darüber hinaus kann auch die Pentenylkette hydroxyliert und durch anschließende Glykosylierung und Sulfatisierung (Gidda et al. 2003) modifiziert werden. Durch Reduktion des Pentanonrings ist eine Transformation zur Curcubinsäure möglich (Sembdner and Parthier 1993).

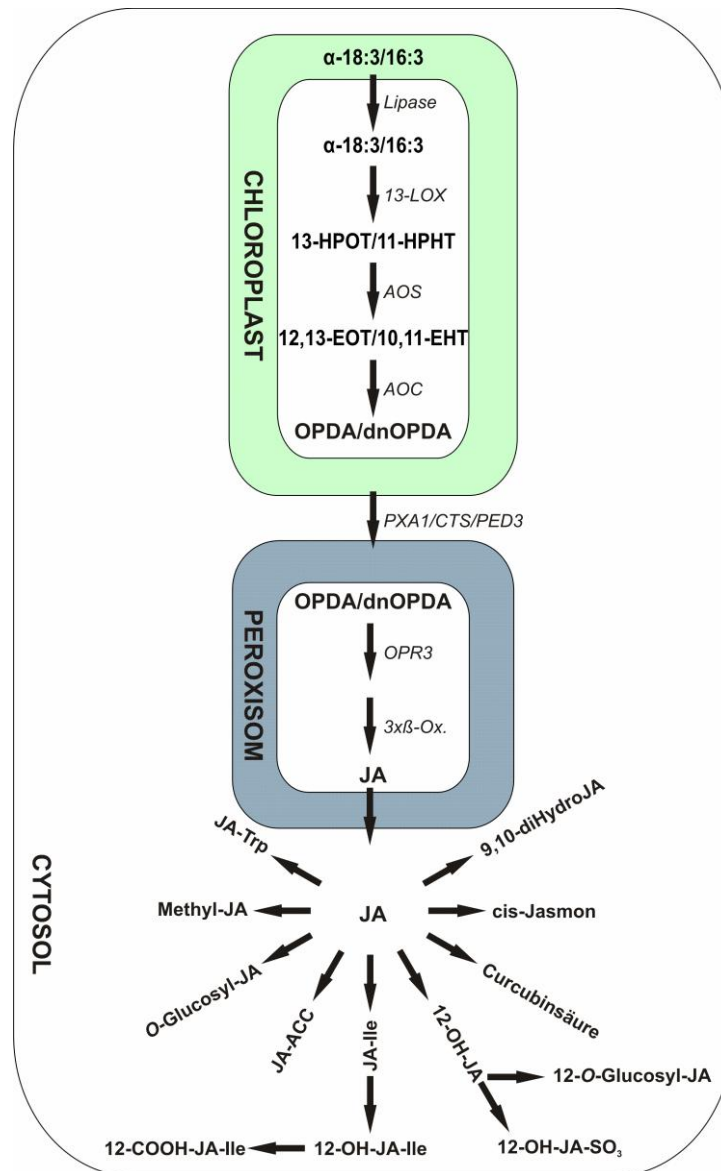


Abbildung I.3: Biosynthese und Metabolismus von Jasmonsäure

Neben in Chloroplasten frei vorliegender und in die JA-Synthese einfließender OPDA bzw. dnOPDA, wurden diese Oxylipine vor wenigen Jahren auch verestert in der Chloroplastenmembran gefunden (Stelmach et al. 2001). Man findet sie hier fast ausschließlich in den Galaktolipiden, der abundantesten Gruppe an komplexen Lipiden in der Plastidenmembran. Galaktolipide, welche OPDA bzw. dnOPDA enthalten, werden als Arabidopside (I.2.1) bezeichnet, da diese nur in *A. thaliana* und *A. arenosa* nachgewiesen werden konnten. Sie kommen vornehmlich in der Thylakoidmembran vor (Böttcher and Weiler 2007). Arabidopside wie auch OPDA und dnOPDA akkumulieren nach Verwundung oder Pathogeninfektion dramatisch in den Blättern von *A. thaliana* (Andersson et al. 2006, Buseman et al. 2006, Glauser et al. 2008a, Glauser et al. 2008b, Kourtchenko et al. 2007,

Stelmach et al. 2001). Jedoch liegen sowohl die induzierten als auch die basalen Spiegel der Arabidopside um das Hundert- bis Tausendfache über den Gehalten an OPDA und dnOPDA. Möglicherweise dienen diese Cyclooxylingalaktolipide als Speicher, um bei einem ersten oder auch erneuten Stressestimulus eine unmittelbare Verfügbarkeit von OPDA selber oder raschere JA-Generierung zu gewährleisten (Turner et al. 2002, Wasternack and Kombrink 2010). Hierzu ist die Existenz einer Lipase nötig, welche die Cyclooxylipine freisetzt.

Die Synthese membrangebundener OPDA bzw. dnOPDA (Arabidopside) ist theoretisch über zwei Wege möglich:

Der klassische „Vick-Zimmerman-Pathway“

Mittels einer Lipase aus Galaktolipiden freigesetzte α -18:3/16:3 wird nach dem klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ zu freier OPDA/dnOPDA synthetisiert. Anschließend könnte OPDA/dnOPDA an eine CoA-Ligase gebunden werden, um durch die Aktivität einer Transacylase schließlich in die Galaktolipide verestert zu werden (Abb. 1.4).

Der alternative Syntheseweg

Dem alternativen Syntheseweg zur Folge würden α -18:3/16:3 bereits in Galaktolipiden verestert als Substrat für die 13-LOX dienen. Die gebildeten Hydroperoxide würden dann durch die chloroplastidär lokalisierten Enzyme AOS (Fröhlich et al. 2001) und AOC (Schaller et al. 2008, Stenzel et al. 2003) ebenfalls membrangebunden zu OPDA/dnOPDA transformiert werden (Abb. 1.4). Präformierte OPDA/dnOPDA könnte durch eine Lipase in Freiheit gesetzt und zu JA umgewandelt werden.

Der klassische Vick-Zimmerman-Weg ist offensichtlich der Standardbiosyntheseweg für Jasmonate in allen Pflanzen und möglicherweise auch in Arabidopsis vorhanden. Einige Befunde sprechen dafür, dass in Arabidopsis eine *in-situ*-Synthese von OPDA/dnOPDA in Galaktolipiden via des alternativen Synthesewegs stattfindet.

Bereits unter basalen Bedingungen liegen Arabidopside in viel höheren Konzentrationen als freie OPDA/dnOPDA vor (Koo et al. 2009). Nach einem

Stressstimulus vergrößert sich diese Differenz zwischen freien und veresterten Oxylipinen dramatisch (Andersson et al. 2006, Buseman et al. 2006, Glauser et al. 2009, Kourtchenko et al. 2007, Stelmach et al. 2001). Da die Synthese von OPDA/dnOPDA gemäß dem klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ lediglich von der Substratverfügbarkeit (Laudert and Weiler 1998, Park et al. 2002) abhängig ist, wird in der Literatur membrangebundene α -18:3/16:3 als Substrat für die Synthese von membrangebundene OPDA/dnOPDA vermutet. Darüberhinaus liegen alle zur OPDA-Synthese notwendigen Enzyme (13-LOX, AOS und AOC) im Chloroplasten konstitutiv vor und sind an der inneren Plastidenmembran sowie der Thylakoidmembran (AOS) assoziiert (Böttcher and Pollmann 2009, Farmaki et al. 2007, Fröhlich et al. 2001). Dies ermöglicht einen direkten Kontakt zu Galaktolipiden, die sowohl in der äußeren als auch inneren Plastidenmembran wie auch in der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Böttcher and Pollmann 2009, Dörmann and Benning 2002). Ferner wurde für eine cytosolische Lipoxygenase 13-LOX mittels *in-vitro*-Versuchen gezeigt, dass diese direkt an Triacylglycerolen aktiv sein kann (Feussner et al. 2001).

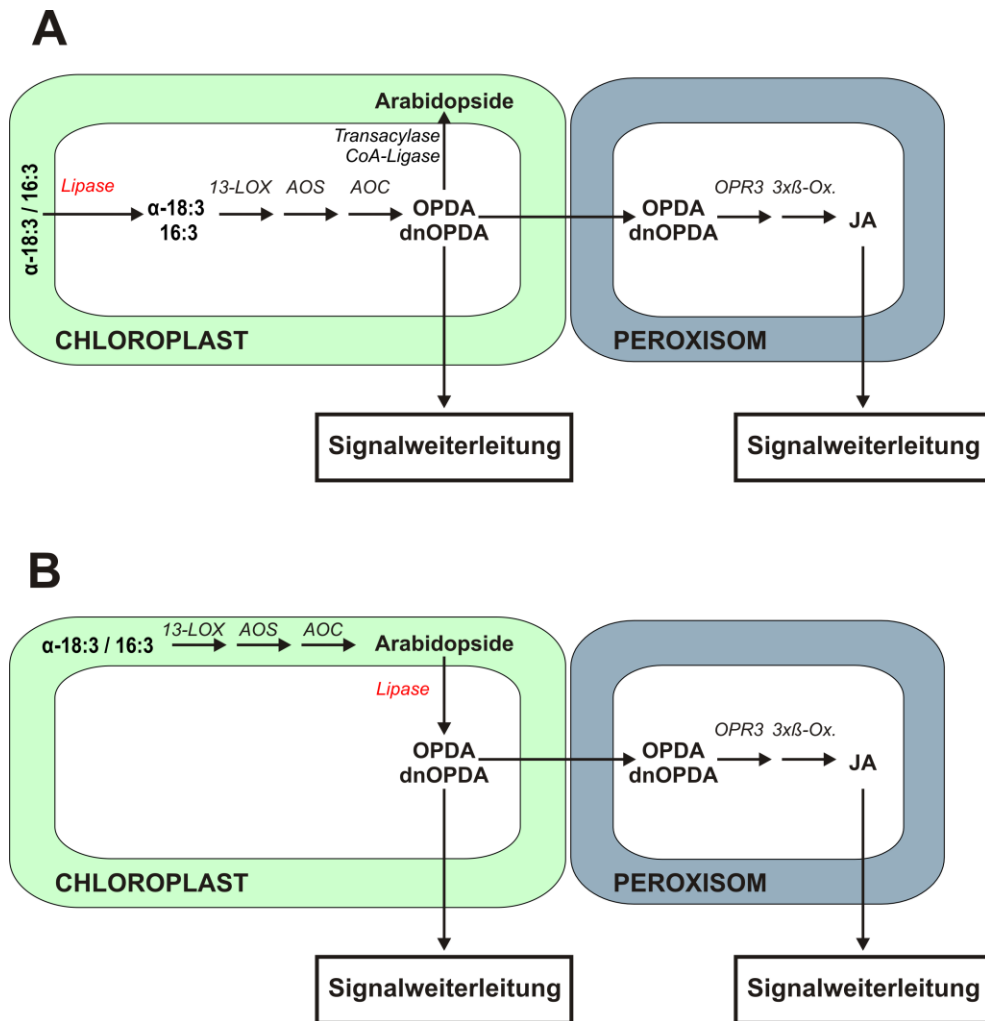


Abbildung 1.4: Arabidopsid-Biosynthese

Dargestellt ist die Biosynthese von OPDA und dnOPDA über den klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ (A) bei welchem die Synthese der Cyclooxylipe an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren beginnt. Freie OPDA und dnOPDA wird zur JA-Generierung aus dem Chloroplasten in das Peroxisom transportiert oder zur Bildung von Arabidopsiden in die Galaktolipide verestert. Die Biosynthese von OPDA und dnOPDA vollzieht sich im alternativen Syntheseweg (B) in den Galaktolipiden und OPDA wird erst nach einem Stresstimulus aus selbigen freigesetzt. Unabhängig über welchen Weg OPDA und dnOPDA gebildet werden, die Aktivität einer Lipase ist immer von essentieller Bedeutung.

1.2. Signaltransduktion und physiologische Funktion von Jasmonaten

Jasmonsäure und ihre Derivate spielen in Pflanzen eine regulatorische Rolle (Memelink 2009). Durch Repression sowie Expression bestimmter Gene koordinieren Jasmonate nicht nur die pflanzliche Antwort auf biotische und abiotische Umweltreize, sondern sind auch vielen Entwicklungsprozessen beteiligt (Abb. 1.5) (Balbi and Devoto 2008, Turner et al. 2002). Durch Untersuchungen an diversen Arabidopsis-Mutanten konnte die Signalweiterleitung von Jasmonaten teilweise geklärt werden. So konnte durch

Arbeiten an der Mutante *coi1* (*Coronatine insensitive 1*) gezeigt werden, dass das Protein COI1 eine regulatorische Funktion in der JA-vermittelten Antwort auf entwicklungsspezifische Prozesse, Herbivorie sowie Befall durch necrotrophe Pathogene besitzt (Devoto et al. 2005, Devoto et al. 2002, Ellis et al. 2002a, Feys et al. 1994, Thomma et al. 1998). Das Gen *Coi1* codiert ein F-Box-Protein, das zusammen mit den Proteinen S-Phase Kinase-Associated Protein 1 (SKP1), Cullin (CUL1) und Rbx1 (Ringbox-Protein) den SCF^{COI1}-Komplex bildet, welcher die Funktion einer E3-Typ-Ligase besitzt (Dai et al. 2002, Devoto et al. 2002, Wasternack and Kombrink 2010, Xie et al. 1998, Xu et al. 2002). Dieser SCF-Komplex bindet bei erhöhten Konzentrationen an JA-Ile (durch Reiz induziert) ein JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-Repressorprotein (Chung et al. 2008, Thines et al. 2007), welches anschließend ubiquitiniert und mittels des 26S-Proteasom abgebaut wird. Dies hat zur Folge, dass Transkriptionsfaktoren wie bspw. JIN1/MYC2 aktiviert werden und ihrerseits die Aktivierung sekundärer Gene verursachen (Dombrecht et al. 2007, Lorenzo et al. 2004). Durch erneute Expression von JAZ-Repressorproteinen ist die JA-vermittelte Reizantwort autoregulativ und somit bei abfallender JA-Ile-Konzentration auf eine konkrete Zeitspanne begrenzt (Wasternack and Xie 2010). Zusätzlich zu der JA-vermittelten Signalkaskade über COI1 müssen jedoch noch bis jetzt unbekannte Wege der Signalübermittlung existieren. Durch Genexpressionstudien nach Behandlung mit OPDA und MeJA konnte gezeigt werden, dass OPDA mittels eines COI1-unabhängigen Wegs zu Aktivierung anderer Gene als MeJA führt (Taki et al. 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass elektrophile Cyclopentenone wie die nicht-enzymatisch gebildeten Phytoprostane oder OPDA eine andere Wirkung auf der Ebene der Genexpression besitzen als Cyclopentanone wie bspw. JA (Farmer et al. 2003, Müller S. et al. 2008, Stintzi et al. 2001).

Jasmonate sind für eine ganze Reihe von physiologischen Prozessen in Pflanzen verantwortlich. So steuert JA die Fruchtreifung (Creelman and Mullet 1995) und die Reproduktion, was mittels diverser Mutanten, welche entweder defizient bezüglich der Signalweiterleitung oder der JA-Biosynthese waren, durch sterile Phänotypen eindrücklich bewiesen wurde (Feys et al. 1994, Ishiguro et al. 2001, McConn and Browse 1996, Sanders et al. 2000, Stintzi and Browse 2000, von Malek et al. 2002). Darüberhinaus konnte auch gezeigt werden, dass exogen

applizierte Jasmonate einen Einfluss auf das Wurzelwachstum besitzen, da die Applikation von Methyljasmonat eine Hemmung in der Wurzelentwicklung hervorruft (Staswick et al. 1992), die Jasmonat-Mutanten wiesen jedoch keine Störung bezüglich des Wurzelwachstums auf. Ferner wird die Rankenbewegung (Devoto and Turner 2003) sowie die Bildung von Trichomen in *Arabidopsis* durch Jasmonate gesteuert (Wasternack and Kombrink 2010).

Neben einer regulatorischen Funktion bezüglich der Entwicklung spielen Jasmonate auch eine tragende Rolle bei der pflanzlichen Antwort auf Umweltreize. So konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Jasmonaten und die Expression von Jasmonat induzierten Proteinen durch abiotische Umweltfaktoren, wie osmotischer Stress durch Zugabe von Sorbitol oder Silbernitrat, induziert werden (Kramell et al. 2000, Lehmann et al. 1995). Aber auch Verwundung, sei es mechanischer oder biotischer also herbivorer Natur, führen zu einer dramatischen Akkumulation von Jasmonaten (Bohlmann et al. 1998, Glauser et al. 2008b, Glauser et al. 2009, Zhang and Turner 2008). Durch Verwundung verursachte hohe JA-Gehalte führen in *A. thaliana* zum Wachstum kleinerer Blätter auf Grund eines hemmenden Effektes in Bezug auf die mitotische Teilung der Blattzellen (Zhang and Turner 2008) sowie zu vermehrtem Trichomenwuchs (Wasternack 2007). Desweiteren wird durch die erhöhten Jasmonatspiegel beispielweise auch die Genexpression von Proteinaseinhibitoren (PIN`s) oder von Defensinen induziert, welche die pflanzliche Abwehr stärken (Bohlmann et al. 1998, Conconi et al. 1996, Farmer and Ryan 1992, McConn et al. 1997, Parchmann et al. 1997, Thomma and Broekaert 1998).

Neben herbivorer Verwundung stellt die Infektion mit Pathogenen einen weiteren Umweltreiz biotischer Herkunft dar. Pflanzen reagieren auf eine Pathogeninfektion unter anderem mit der Generierung von Jasmonaten und daraus resultierender veränderter Genexpression (Gundlach et al. 1992, Thaler et al. 2004, Thomma et al. 1998). Untersuchungen an Mutanten, die Jasmonsäure entweder nicht generieren oder in der JA-vermittelten Signalübertragung defekt sind, haben gezeigt, dass Jasmonate eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen (Stintzi et al. 2001, Thomma et al. 1998). Mutanten, die zwar JA produzieren aber nicht perzipieren konnten, zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den Pilzen *Alternaria brassicicola* sowie *Botrytis cinerea* (McConn et al. 1997). Weitere Beispiele der Jasmonat gesteuerten Pathogenabwehr sind die Inhibierung der

Sporenkeimung und des Mycelienwachstums von *Phytophthora infestans* (Cohen et al. 1993) sowie die Hemmung der Appressoriendifferenzierung von *Erysiphe graminis* (Schweizer et al. 1993).

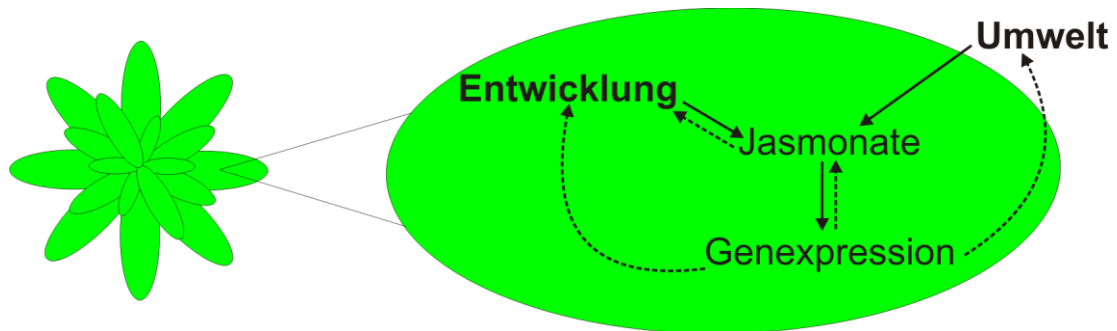


Abbildung I. 5: Schematische Darstellung der Regulation von Jasmonaten und durch Jasmonate gegenüber endogener und exogener Stimuli.

2. Membranlipide der Pflanzlichen Zelle

Die Fettsäuren α -18:3 und 16:3 stellen das Ausgangssubstrat der Jasmonatbiosynthese dar. Dies konnte durch die JA-defiziente Arabidopsis-Mutante *fad-triple* (*fad3-2/fad7-2/fad8*), welche defizient in den Fettsäuredesaturasen FAD3, FAD7 und FAD8 ist, eindrücklich bewiesen werden. *Fad-triple*-Pflanzen sind nicht in der Lage dreifach ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren und weisen einen männlich sterilen Phänotyp auf. Durch exogene Applikation von JA oder Linolensäure kann dieser jedoch komplementiert werden. α -18:3 sowie 16:3 liegen nicht als freie Fettsäuren vor, sondern als Bestandteil von Membranlipiden (Bonaventure et al. 2003, Browse J. et al. 1993, Kobayashi et al. 2009). Membranlipide von *A. thaliana* bestehen aus zwei Hauptgruppen von Glycerolipiden: Phospholipide und Galaktolipide. Bei beiden Lipidgruppen sind Fettsäuren an die sn_1 - und sn_2 -Position des Glycerols gebunden. Die sn_3 -Position ist bei Phospholipiden mit Phosphorsäure verestert, welche verschiedene Kopfgruppen (wie Cholin, Ethanolamin, Inositol oder ein weiteres Glycerolgerüst) gebunden haben kann. Galaktolipide weisen, wie der Name schon sagt, glykosidisch gebundene Galaktose-Einheiten an sn_3 -Position auf. Man unterscheidet zwischen Lipiden, welche ein Galaktose-Molekül gebunden haben (Monogalaktosyldiacylglycerole: MGDG) und jenen, die ein Digalaktose-Molekül in sn_3 -Position gebunden haben (Digalaktosyldiacylglycerole: DGDG) (Frentzen and Heinz 1983).

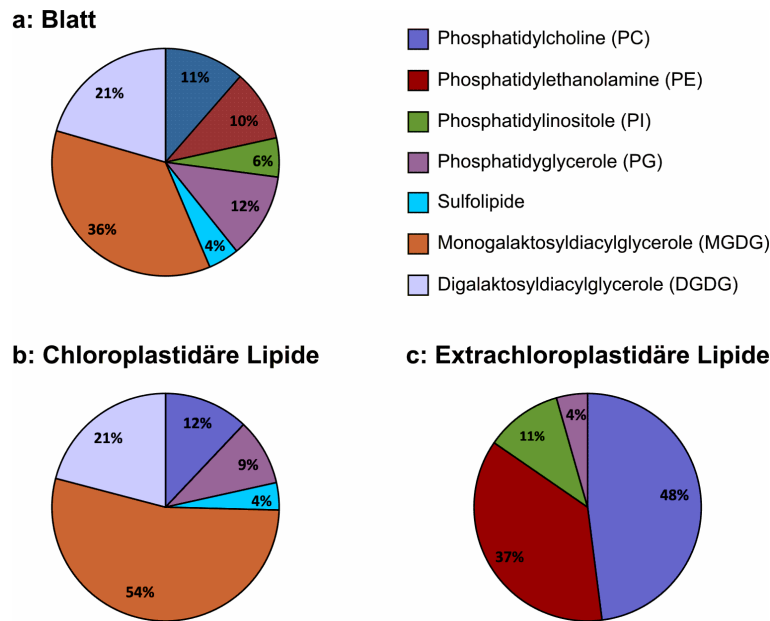


Abbildung I.6: Membranlipidmuster (mol%) von *A.thaliana*

Alle dargestellten Gehalte (mol%) wurden der Literatur entnommen (Bonaventure et al. 2003, Browse J.A. and Somerville 1994). a: Gesamtmembranlipidmuster (mol%) im Blatt, b: Chloroplastidäres Membranlipidmuster (mol%) und c: Extrachloroplastidäres Membran-lipidmuster (mol%).

Galaktolipide stellen den Hauptanteil plastidärer Membranlipide dar (Abb. I.6) (Bonaventure et al. 2003, Browse J. et al. 1986, Browse J.A. and Somerville 1994), wohingegen Phospholipide nur mit einem Anteil von 19% in der Chloroplastenmembran vorliegen. Chloroplastidäre Phospholipide sind Phosphatidyllcholine (PC) und Phosphatidylglycerole (PG) (Heinz 1977). In extraplastidären Membranen sind hingegen keine Galaktolipide zu finden, hier liegen nur die Phospholipide PC, PG, PE und PI vor, wobei PC mit fast 50% den Hauptanteil aufweist. Ausschließlich bei Phosphatmangel kommt es zu einer Translokation von DGDG in andere Zellkompartimente zur Kompensation der Phospholipiddifferenz (Härtel et al. 2000).

Ein weiterer Unterschied zwischen Galaktolipiden und Phospholipiden ist die Fettsäurezusammensetzung in sn₁- und sn₂-Position. Phospholipide haben fast ausschließlich C₁₈-Fettsäuren in beiden Positionen gebunden, wohingegen Galaktolipide auch C₁₆-Fettsäuren in sn₂-Position vorliegen haben können. Dieser Unterschied der beiden Lipidgruppen ist durch unterschiedliche Lokalisation der Syntheseorte begründet. Phospholipide werden im Endoplasmatischen Reticulum (ER) generiert, um anschließend in die äußere Chloroplastenmembran

transportiert zu werden. Dort kommt es entweder zum Umbau zu MGDG (Ohnishi and Yamada 1982) oder zum Einbau in die Chloroplastenmembran (Ohlrogge and Browse 1995, Ohnishi and Yamada 1982). Die im ER produzierten Phospholipide (vornehmlich PC) können über verschiedene Wege zu den Chloroplasten transportiert werden: Spontane Diffusion von hydrophilem Lyso-PC durch das Zytosol, Vesikeltransport oder durch direkten Übertritt aus dem ER in den Chloroplasten hervorgerufen durch Assoziation der ER-Membran an die Chloroplastenmembran (Kelly and Dörmann 2004).

Die Synthese von Galaktolipiden hingegen vollzieht sich ausnahmslos im Chloroplasten. Syntheseort der MGDG ist die innere Chloroplastenhüllmembran, wohingegen die Synthese der DGDG in der äußeren Chloroplastenhüllmembran stattfindet (Andersson et al. 2001, Benning 2004, Dörmann and Benning 2002). Beide Galaktolipide werden anschließend in die Thylakoide transferiert (Frentzen and Heinz 1983). Wie erwähnt, können Galaktolipide C₁₆-Fettsäuren in sn₂-Position vorliegen haben. Grund hierfür ist der Ort ihrer Biosynthese, der Chloroplast. Es konnte gezeigt werden, dass das Glycerolipidmuster der prokaryotischen Cyanobakterien dem des Chloroplasten entspricht (Heinz 1977, Murata and Nishida 1987). Glycerolipide, die sowohl in sn₁- als auch in sn₂-Position C₁₈-Fettsäuren vorliegen haben, entstehen demnach über den eukaryotischen Syntheseweg im ER, wohingegen Glycerolipide, die in sn₂-Position C₁₆-Fettsäuren gebunden haben, über den prokaryotischen Syntheseweg im Chloroplasten gebildet werden (Browse J. et al. 1986).

2.1 Arabidopside

A.thaliana und *A.arenosa* besitzen als bisher einzig bekannte Spezies in Galaktolipiden veresterte Cyclooxylipine (Böttcher and Weiler 2007, Mosblech et al. 2008). Sechs verschiedene Arabidopside sind bekannt, welche sowohl in sn₁- als auch in sn₂-Position Cyclooxylipine gebunden haben (Abb. I.7). Man unterscheidet zwischen Arabidopsiden, die der Lipidklasse der MGDG angehören (Arabidopsid A, B, E sowie G) und jenen, die zu den DGDG zählen (Arabidopsid C und D). Innerhalb dieser Lipidklassen unterscheidet man zwei weitere Untergruppen. So existieren Arabidopside, welche an sn₂-Position dnOPDA, den C₁₆-Metaboliten der Jasmonatbiosynthese, inkorporiert haben (Arabidopsid A, E sowie C) und somit von chloroplastidären Vorläufermolekülen abstammen. Dem

gegenüber stehen jene Arabidopside, die dem eukaryotischen Syntheseweg entsprechend in sn₂-Position OPDA, den C₁₈-Metaboliten der Jasmonatbiosynthese, gebunden haben (Arabidopsid B, G sowie D). Desweiteren besitzen die MGDG-Arabidopside E und G jeweils am C6-Atoms des Galaktoserings OPDA gebunden (Andersson et al. 2006, Buseman et al. 2006, Hisamatsu et al. 2005, Kourtchenko et al. 2007, Stelmach et al. 2001).

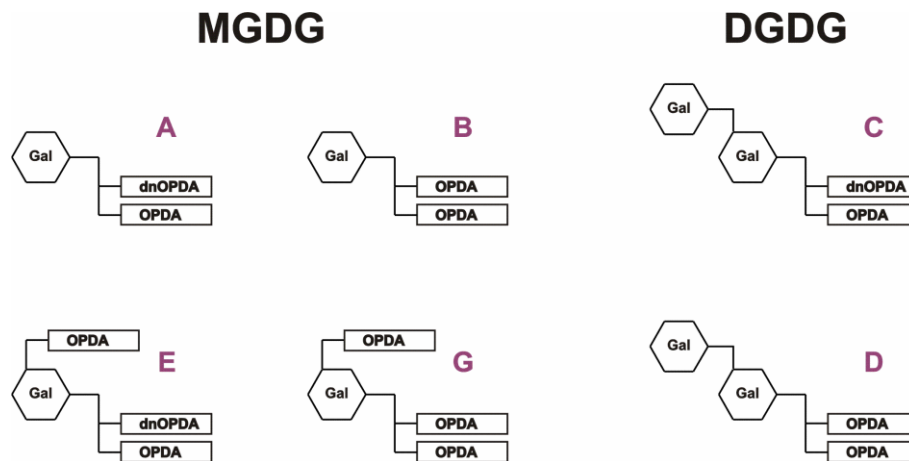


Abbildung I.7: Arabidopside

Dargestellt sind Arabidopside, die der Lipidklasse der Monogalaktosydiacylglycerolen angehören (Arabidopsid A, B, E und G) sowie Arabidopside, die der Lipidklasse der Digalaktosydiacylglycerolen angehören (Arabidopsid C und D).

3. Lipasen

Die JA-Synthese sowohl unter basalen als auch durch Stressstimuli induzierten Bedingungen wird vermutlich ausschließlich durch die hydrolytische Aktivität einer Lipase reguliert, da alle anderen Biosynthese-Enzyme konstitutiv vorliegen (Wasternack and Kombrink 2010). Unabhängig davon ob die OPDA-Synthese über den klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ oder alternativ *in situ* in Galaktolipiden verläuft, die Freisetzung membrangebundener Substrate ist stets von essentieller Bedeutung. Da tierische Prostaglandine die strukturellen Analoga zu enzymatisch gebildeten Phytooxylipinen darstellen und die Prostaglandinbiosynthese über die Aktivität einer Phospholipase A (PLA) (Sigal 1991) initiiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass in der pflanzlichen Zelle ebenfalls eine Phospholipase (PL) für die Substratfreisetzung der Jasmonatbiosynthese verantwortlich ist (Müller M. 1997, Wasternack 2007).

Nach EC-Klassifikation gehören Phospholipasen (PL) zur Gruppe der Hydrolasen (EC 3.1.). Durch PL-Aktivität werden Phospholipide in eine freie Fettsäure und eine Alkoholeinheit, ein sogenanntes Lysophospholipid, gespalten. Je nach Position der hydrolytischen Aktivität der Phospholipasen werden diese in vier verschiedene Klassen (PLA_1 , PLA_2 , PLC sowie PLD) eingeordnet (Abb. I.8) (Meijer and Munnik 2003, Wang X. 2004).

Anhand von Vergleichen der Aminosäuresequenzen, der präferierten Substrate sowie der strukturellen Position, aus welcher die Fettsäure abgespalten wird, werden *A. thaliana*-PLA in vier Untergruppen eingeordnet (Ryu 2004). Bevorzugte Phospholipidsubstrate von PLA_1 sind Phosphatidylcholine und -ethanolamine. Aus ihnen setzt PLA_1 Fettsäuren aus der sn_1 -Position frei. Andere PLA_1 präferieren Phosphatidsäure (PA) als Substrat, diese Enzyme werden daher als PA-PLA bezeichnet werden. Desweiteren sind Patatin like-PLA (PAT-PLA) bekannte, welche charakterisiert sind durch eine sn_1/sn_2 -Substratspezifität sowie durch eine Homologie zu tierischen Ca^{2+} -unabhängigen PLA_2 . Die vierte Untergruppe sind sekretorische Phospholipasen ($sPLA_2$), die bevorzugt Fettsäuren aus der sn_2 -Position spalten.

Substrate der dritten Klasse der Phospholipasen, PLC, sind Phosphatidylinositole. Sie werden in Phosphatidylinositol und Diacylglycerol gespalten. Phospholipasen D (PLD) spalten wie PLA bevorzugt Phosphatidylcholine. Bei dieser Enzymaktivität entstehen als Produkte Cholin und Phosphatidsäure (Laxalt and Munnik 2002, Munnik and Musgrave 2001).

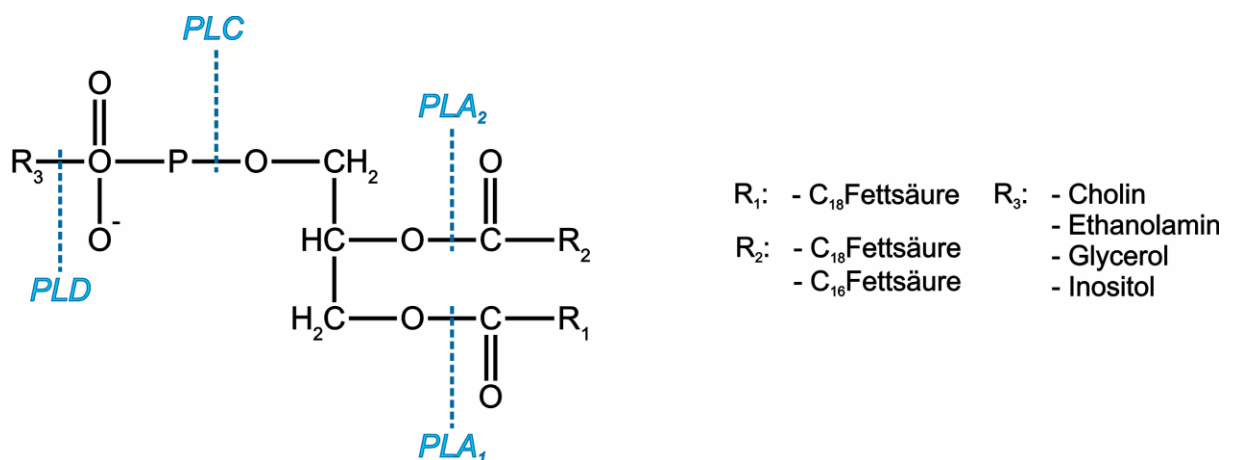


Abbildung I.8: Positionen der hydrolytischen Aktivität der Phospholipasen PLA_1 , PLA_2 , PLC sowie PLD. Abbildung modifiziert nach Literatur (Meijer and Munnik 2003).

Im Jahr 2001 konnte eine PLA in *A. thaliana* identifiziert werden, welche für die Jamsäurebiosynthese in Blüten essentiell ist. Es handelt sich hierbei um eine plastidäre PLA₁, die Phosphatidylcholine als Substrat bevorzugt, jedoch auch geringe hydrolytische Aktivität an MGDG zeigt. Die *dad1*-Mutante weist, wie in I.1.2.1 bereits beschrieben, einen männlich sterilen Phänotyp auf, der auf eine Störung der Antherenöffnung zurückzuführen ist (Ishiguro et al. 2001). Durch exogene Applikation von JA oder Linolensäure auf die Blüten lässt sich der Defekt komplementieren, womit die Autoren zeigen konnten, dass DAD1 für die Freisetzung von α -Linolensäure in den Blüten verantwortlich ist. Durch Analyse der Gehalte an freier JA wurde gezeigt, dass *dad1*-Pflanzen in den Blüten stark reduzierte JA-Gehalte besitzen, jedoch in Blättern sowohl basal als auch wundinduziert mit dem Wildtyp vergleichbare JA-Gehalte aufweisen (Ishiguro et al. 2001) und somit eine andere noch unbekannte Lipase für die JA-Synthese in den Blättern *A. thaliana* verantwortlich sein muss. Auch die Beteiligung cytosolischer PL an der JA-Biosynthese in *A. thaliana* wurde in der Literatur beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass PLD α -RNAi-Mutanten unter basalen Bedingungen mit dem Wildtyp vergleichbare und nach Verwundung 50% geringere JA-Konzentrationen als der Wildtyp aufwiesen (Wang C. et al. 2000). Desweiteren wurde eine cytosolische PAT-PLA₁ identifiziert, welche an der JA-Biosynthese unter basalen Bedingungen beteiligt sein soll, jedoch nach Verwundung sowie Pathogeninfektion keinen Einfluss auf die Synthese von Jasmonaten hat (Yang et al. 2007). In Anbetracht dessen, dass alle Biosynthese-Enzyme konstitutiv plastidär vorliegen (Böttcher and Pollmann 2009, Farmaki et al. 2007, Fröhlich et al. 2001), die Jasmonat-Synthese nach einem Stressesstimulus innerhalb von Sekunden initiiert wird (Glauser et al. 2008b, Glauser et al. 2009) und die JA-Synthese in Blüten von der plastidären Lipase DAD1 reguliert wird (Ishiguro et al. 2001), lassen eher einen pleiotropen Effekt der cytosolischen PL PLD α sowie PAT-PLA₁ auf die JA-Biosynthese in Blättern von *A. thaliana* vermuten. Vorallem auch die Lokalisation der Arabidopside, welche in der Literatur als Substratspeicher der JA-Synthese vermutet werden (Böttcher and Weiler 2007, Kourtchenko et al. 2007, Wasternack and Kombrink 2010), in der inneren Hüllmembran sowie der Thylakoidmembran lässt die Aktivität einer noch unbekanntenen plastidären Lipase vermuten. Diese Lipase müsste eine sn₁/sn₂-Substratspezifität aufweisen, da neben α -18:3 und OPDA sowohl die über den

prokaryotischen Fettsäuresyntheseweg gebildete, und somit in sn₂-Position veresterte, Fettsäure 16:3 als auch deren Derivat dnOPDA als Substrat der JA-Biosynthese dienen können (Weber et al. 1997). Ferner könnten jedoch auch mehrerer Lipasen mit sn₁- oder sn₂-Spezifität in redundanter Weise die JA-Synthese regulieren.

Die Identifizierung des initialen lipolytischen Enzyms der Jasmonatbiosynthese in den Blättern von *A. thaliana* würde nicht nur das Wissen über die Regulation der JA-Synthese vervollständigen, sondern würde auch der Aufklärung der Synthese und Funktion der ausschließlich in *A. thaliana* und *A. arenosa* repräsentierten Arabidopsiden dienen.

4. Zielsetzung der Dissertation

Sowohl innerhalb des klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch in dem in der Literatur postulierten Alternativen Syntheseweg sind Lipasen von essentieller Bedeutung. Sie regulieren durch die Freisetzung von 16:3/α-18:3 bzw. dnOPDA/OPDA aus Galaktolipiden der Chloroplastenmembran die JA-Biosynthese sowohl unter basalen als auch unter stressinduzierten Bedingungen. Während die für die JA-Biosynthese in Blüten eine in *A.thaliana* verantwortliche Lipase (DAD1) bereits identifiziert wurde, ist die Identität der initialen Lipase/Lipasen in Blättern noch nicht geklärt. Darüber hinaus besteht ebenfalls Unklarheit über die Biosynthese und Speicherfunktion der Arabidopside. Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit waren deshalb:

1. Identifizierung der Lipase bzw. Lipasen, welche für die Regulation der JA-Biosynthese in Blättern von *A. thaliana* sowohl unter basalen als auch stressinduzierten Bedingungen verantwortlich ist bzw. sind.

Mit Hilfe des Lehrstuhls für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg sollte in den Datenbanken Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>), PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), String (<http://www.string.embl.de/>), PPDB (<http://ppdb.tc.cornell.edu/introduction.aspx>) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) nach plastidären Lipasen recherchiert werden. Einzelmutanten der ausgewählten putativen plastidären Lipasen sollten anschließend auf ihre Gehalte an JA sowie OPDA sowohl unter basalen als auch stressinduzierten Bedingungen untersucht werden.

2. Aufklärung der Biosynthese und Speicherfunktion von Arabidopsiden.

Mittels der identifizierten initialen Lipase der JA-Biosynthese sollte die Synthese der Arabidopside untersucht werden. Hierzu sollte eine Analyse der Arabidopsid-Konzentrationen sowohl unter basalen als auch stressinduzierten Bedingungen in Blättern der entsprechenden Einzelmutante erfolgen. Zusätzlich sollten D₅-Markierungsversuche durchgeführt werden, um durch anschließende massenspektrometrische Analyse der unmarkierten und D₅-markierten Galaktolipide sowie freien Oxylipine die Arabidopsid-Synthese nachzuvollziehen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien, Enzyme

Soweit nicht unter II.1.1. aufgelistet, wurden alle Chemikalien in der entsprechenden Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen).

1.1 Spezielle Chemikalien

Agarose LOW EEQ	AppliChem (Darmstadt)
Bacto-Agar	AppliChem (Darmstadt)
Butylhydroxytoluol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cetyltrimethylammoniumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem (Darmstadt)
Gamborg B5-Vitamine	Duchefa (Haarlem, NL)
Glycerin 98%, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
17,17,18,18,18-D ₅ -Linolensäure Ethylester	Cambridge Isotope Laboratories
β-Mercaptoethanol	Merk (Darmstadt)
Murashige & Skoog (MS) Salze (Art. Nr.:MO254)	Duchefa (Haarlem, NL)
myo-Inositol	AppliChem (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosyl	AppliChem (Darmstadt)
Triphenylphosphin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
QIAzol	Qiagen (Hilden)

1.2 Antibiotika

Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Rifampycin	AppliChem (Darmstadt)
Tetracyclin	AppliChem (Darmstadt)

1.3 Enzyme und Puffer

DNAse I Amplification Grade	Invitrogen (Karlsruhe)
M-MLV Reverse-Transcriptase	Promega (Mannheim)

SYBR Green Mix	Thermo (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase MBI	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-DNA-Polymerase MBI	Fermentas (St. Leon-Rot)

1.4 Andere Reagenzien, Materialien und Kits

Desoxynucleotide MBI	Fermentas (St. Leon-Roth)
DNA-Leiter 1kb MBI	Fermentas (St. Leon-Roth)
pGEMR-T-easy Vektor	Promega (Mannheim)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy-Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)

1.5 Interne Standards für Analytik

[¹⁸ O] ₂ -Linolensäure	Lehrstuhl für Pharmazeutische
[¹⁸ O] ₂ -OPDA	Biologie der
[¹⁸ O] ₂ -Jasmonsäure	Universität Würzburg
18:0-18:0-DGDG	Matreya LLC
(1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Digalaktosyl)	(Pleasant Gap, USA)
18:0-18:0-MGDG	Matreya LLC
(1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Monogalaktosyl)	(Pleasant Gap, USA)
17:0-17:0-PC	Avanti Polar Lipids
(1,2-diheptadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphocholine)	(Alabaster, USA)

1.6 Laborgeräte

Agarose-Gel Dokumentation	Intas (Göttingen)
Eppendorf Kühlzentrifugen 5417R und 5804	Eppendorf (Hamburg)
Klimaschrank AR66L	Percival (USA)
PCR Express	Therma Hybaid (Ulm)
Realplex	Eppendorf (Hamburg)
Roche Light Cycler	Roche Diagnostics (Mannheim)
Schüttler	GFL (Burgwedel)
Schwingmühle MM201	Retsch (Haan)
Spektrophotometer Nanodrop 1000	Thermo Scientific
Spektrophotometer Ultraspec 100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)

Thermocycler

Eppendorf (Hamburg)

2. Nährmedien

2.1 Bakterienmedien

KB-Medium (Kings-Brown-Medium): 40 g/l Proteose Peptone 3
20 g/l Glycerin
10 ml/l MgSO₄ (10%, [m/v])
10 ml/l K₂HPO₄ (10%, [m/v])
für Festmedium: 15 g/l Agar-Agar

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
pH 7,0
für Festmedium: 15 g/l Agar-Agar

2.2 Pflanzenanzuchtmedium

MS-Medium (Murashige-Skoog-Medium): 4,8 g/l MS-Salze (incl. MES)
30 g/l Saccharose
0,1 g/l myo-Inositol
1 ml/l B5-Vitamine
pH 5,7 +/- 0,3
für Festmedium: 8 g/l Agar-Agar

2.3 Antibiotika

Antibiotika-Stocklösungen:	eingesetzte Endkonzentrationen
Ampicillin 100 mg/ml	100 µg/ml
Rifampicin 50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin 30 mg/ml	30 µg/ml

Alle verwendeten Medien wurden bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Medienzusätze, welche nicht autoklaviert werden konnten, wie die aufgeführten Antibiotika, wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

2.4 Pufferlösungen

Die in Tabelle II.1 gelisteten Pufferlösungen wurden (regulär) in zehnfacher Konzentration (10x) angefertigt und autoklaviert (30 min, 121°C, 2 bar) bzw. sterilfiltriert. Die Einstellung der jeweiligen pH-Werte erfolgte entweder mit HCl oder NaOH.

Tabelle II.1: Puffer-Zusammensetzung

Puffer	Bestandteile (1x)	pH
FA	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA 1 M NaOH	7,0
TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	7,4

3. Pflanzenmaterial

Für alle durchgeführten Experimente wurden *Arabidopsis thaliana* Samen verwendet. Bezeichnung, Genlocus, Ökotyp sowie Bezugsquelle sind in Tabelle II.2. zu entnehmen.

Tabelle II.2: Verwendete *Arabidopsis*-Linien

Genlocus	Ökotyp	Beschreibung	Linie	Bezugsquelle
At1g05800	Col-0	RNA-i	<i>dgl-i</i>	Hyun et al., 2008
	Col-0	Überexpression	<i>dgl-D</i>	Hyun et al., 2008
	Col-0	RNA-i	<i>pla-la1</i> 7-1 <i>pla-la1</i> 8-1	Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum
At1g06800	NOS	T-DNA-Insertion	RATM12_1251_1	Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum
At1g13610	Col-0	T-DNA-Insertion	SAIL_897_D11	NASC, Nottingham
At1g18360	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_072002c	NASC, Nottingham
At1g20130	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_023029	NASC, Nottingham
At1g33270	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_139011C	NASC, Nottingham
At1g51440	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_004710	Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum
At1g54570	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_076354c	NASC, Nottingham
At1g73480	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_095195c	NASC, Nottingham
At2g30550	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_003105	NASC, Nottingham
At2g31690	Col-0	RNA-i		Padham et al., 2007
At2g44810	Col-0	T-DNA-Insertion	<i>dad1</i>	Ishiguro et al., 2001
At3g14075	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_014323	NASC, Nottingham
At3g26820	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_139280	NASC, Nottingham
At3g61680	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_147687c	NASC, Nottingham
At4g16820	Col-0	T-DNA-Insertion	SM_3_20786	Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum

At5g11650	Col-0	T-DNA-Insertion	SAIL_716_F08	NASC, Nottingham
At5g14890	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_079693	NASC, Nottingham
At5g23530	Col-0	T-DNA-Insertion	SAIL_4_H02	NASC, Nottingham
At5g43860	Col-0	T-DNA-Insertion	SAIL_646_E09	NASC, Nottingham

<u>Vierfachmutante:</u>			<i>c1x11</i>	Lehrstuhl für
At1g06800	NOS	T-DNA-Insertion	RATM_12_1251_1	Pflanzenphysiologie
At1g51440	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_004710	der Ruhr-Universität
At2g30550	Col-0	T-DNA-Insertion	SALK_001305	Bochum
At4g16820	Col-0	T-DNA-Insertion	SM_3_20786	

Tabelle II.3: Verwendete Oligonukleotide zum T-DNA-Insertionsnachweis und entsprechende Annealingtemperaturen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Annealingtemperatur °C
SAIL_897_D11	CTCAATGTCAATCTCATGGGG TCACCACATCGTCATCTGTTC	50,2-62
SALK-072002c	CTCTTGGTTCGTGAATAGCGAG GATGTTTGAGCTCAATTTTCGC	56,2
SALK_023029	ACACCCTAACGGTAACGTTCC TTCAAGGGACTCGATGAACTC	49,8-65
SALK_139011C	TTTAGCAGGATCTTCTGCTGG TCAAGTGCCCAATTC AATAGC	52,2-56,1
SALK_076354c	GCGACTAGTGAATTA ACTGCG TTTCCCATTCACTTCATTTGC	54,3
SALK-095195c	ATATGGGGTTACCAAATCCG ATTCGATTTCGCGTAATTTGTG	49,8-58,3
SALK_003105	GGTTTAAGAAACGGCGAGTTC GCTGGAGA ACTATGGATGACG	44,9-65,1
SALK_014323	CTACTCTACCCTCCTCCACCG GACTTGGGAATTAGCCGACTC	57,1-66,6
SALK_139280	ATGCATTGTTTCGACCTCAGAC TACTGAATGGAATATTCGCG	50-65
SALK_147687c	TTATTACCGGAGCGACAACAC	54,3

	TCCAATAACGGTTAAGCAACG	
SAIL_716_F08	CCAATGCTTACAAATTCCCAG AAAATCCCCCTGAAGACACAC	52,2-57,4
SALK_079693	CTTTGGTACCACCATGAATGG TTGTCACACAAGAAGCATTGC	52,2-59,9
SAIL_4_H02	ACGCAAACACAAACAAAAAGG GAACGCTGATCTCTCGAGATG	49,8-65
SAIL_646_E09	GAGGGTGGAGAGAATTTGAGG GTCGCCTTAAAGAAATTTGGG	55,9-65,6
SALK (LBb1)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	60-62
SALK (LBa1)	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	60-62
SAIL (LB1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	60-62
SAIL (LB2)	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	60-62

3.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzenanzucht erfolgte bei 22°C Tages- und 16°C Nacht-Temperatur in Klimaschränken der Firma Percival. Die Beleuchtungszeit betrug neun Stunden bei einer Belichtungsstärke von 120 µE.

3.1.1 Pflanzenanzucht auf Erde

Für Verwundungs-, *P.syringae*-Infektions- sowie Sorbitol-Flotierungsexperimente wurden Pflanzen verwendet, welche auf Standard-Anzuchterde ausgesät und pikiert waren. Während des Wachstums wurden die Pflanzen regelmäßig im Abstand von 14 Tagen mit Nematoden der Spezies *Steinernema feltiae* zur biologischen Schädlingsbekämpfung behandelt.

3.1.2 Pflanzenanzucht in und auf MS-Medium

Markierungsexperimente und Silbernitrat (AgNO_3^-)-Experimente wurden ausschließlich an Pflanzen durchgeführt, die in MS-Medium steril kultiviert wurden. Zur Oberflächensterilisation der Samen wurden diese für zwei Minuten mit 700 µl Ethanol (70%) inkubiert. Nach Entfernung des Alkohols wurden die Samen für zehn Minuten in einer 1.5%igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung, die mit 0.1% Tween 20 versetzt war, inkubiert. Um restliches Natriumhypochlorit zu entfernen, wurden die

Samen viermal mit sterilem Wasser (700 µl) gewaschen und im Anschluss auf MS-Agarplatten bzw. in MS-Flüssigmedium kultiviert.

4. Experimentelle Methoden an Pflanzenmaterial

4.1 Verwundung

Alle Verwundungsexperimente erfolgten ausschließlich mit sechs Wochen alten Pflanzen. Es wurden nur wohl entwickelte, nicht nekrotische Rosettenblätter verwendet. Die Verwundung wurde mittels einer Pinzette an 6 -9 Blättern pro Pflanze durchgeführt. An jedem zu verwundenden Blatt wurden jeweils über 30% der Blattspreite verwundet, ohne jedoch die Mittelrippe zu verletzen. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die verwundeten Blätter vollständig geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

4.2 Silbernitratzugabe

Zur Behandlung mit Silbernitrat (AgNO_3) wurden 10 Tage alte in Flüssigmedium angezogene Pflanzen verwendet. Hierzu wurde 24 h vor der Zugabe von Silbernitrat das MS-Medium gegen steriles Wasser ersetzt. Die Endkonzentration an Silbernitrat betrug 1mM. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die Pflanzen aus der Silbernitratlösung entnommen und in sterilem Wasser dreimal vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde das anhaftende Wasser sorgsam durch Abtupfen entfernt und die Pflanzen in flüssigem Stickstoff gefroren. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Kontrollen wurden entsprechend dem Protokoll behandelt, jedoch wurde anstatt Silbernitrat steriles Wasser zugegeben.

4.3 *Pseudomonas syringae* Infektion

Alle Infektionsexperimente erfolgten ausschließlich mit sechs Wochen alten Pflanzen. Hierzu wurden nur wohl entwickelte Rosettenblätter verwendet.

4.3.1 Herstellung der Bakteriensuspension von *Pseudomonas syringae*

Für die Herstellung der zur Infiltration verwendeten Bakterien-Suspension wurden jeweils 50 ml KB-Medium in sterile Erlenmeyerkolben überführt. Das Medium für den avirulenten *Pst*-Stamm wurde mit den Antibiotika Rifampicin (50 µl) und Tetracyclin

(100 µl) versetzt. Es wurden 3 ml KB-Medium mit dem avirulenten *Pst*-Stamm inokuliert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 50 ml KB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 600 bei 28°C für 2 bis 3 Stunden inkubiert. Die Bakterien, die sich nun am Beginn der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden durch Zentrifugation bei 3000x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde 3x mit jeweils 10 ml einer MgCl₂-Lösung (10 mM) gewaschen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 10 mM MgCl₂ bis zu einer OD von 0.2 resuspendiert. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von 10⁸ Kolonien-bildenden Einheiten pro ml Suspension.

4.3.2 Infiltration von *Pseudomonas syringae*

Die Infiltration erfolgte auf der Blattunterseite von jeweils 6 - 9 Blättern durch die Stomata mittels einer 1 ml Tuberkulin-Spritze. Parallel dazu wurden als Kontrollen *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden ausschließlich die infiltrierten Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

4.4 Sorbitolflotierung

Alle Flotierungsexperimente erfolgten ausschließlich mit sechs Wochen alten Pflanzen. Hierzu wurden nur wohl entwickelte Rosettenblätter verwendet. Die Flotierung erfolgte in einer 500 mM Sorbitollösung, welche zuvor autoklaviert wurde. Kontrollproben wurden in autoklaviertem Millipore-Wasser durchgeführt. Jeweils 6–9 Blätter einer Pflanze wurden in der Mitte des Blattstengels abgeschnitten und in die Flotierungslösung gelegt. Es wurde hierbei stets darauf geachtet, dass die Schnittseite sich in der Flüssigkeit befand um etwaige Austrocknung zu verhindern. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die Blätter aus der Lösung entnommen und in sterilem Wasser vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde das anhaftende Wasser sorgsam durch Abtupfen entfernt und die Blätter in flüssigem Stickstoff gefroren. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Als Nullpunkt-Kontrollen wurden jeweils 6 – 9 Blätter einer Pflanze abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

4.5 D₅-Markierung von Strukturlipiden und freien Lipiden

Alle Markierungsexperimente wurden mit 10 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps Col-0, welche in Flüssigmedium kultiviert wurden, durchgeführt. Als Anzuchtsbehältnis wurden sterile 24-Lochplatten verwendet. In jedem Loch befand sich 1ml flüssiges MS-Medium. Es wurden jeweils 3-6 sterilisierte Samen in jedem Loch ausgesät und 2 Tage unter Lichtausschluss bei 4°C stratifiziert. 7 Tage nach der Aussaat erfolgte ein Mediumswechsel. 8 Tage nach dem Stratifikationsende erfolgte ein Austausch des MS-Medium gegen steriles Wasser sowie die Zugabe von D₅-Linolensäure-Ethylester. Die Endkonzentration des deuterierten Linolensäure-Ethylesters betrug 150 µM. Als Inkubationszeit für den Einbau der markierten Linolensäure in die Pflanzenmatrix wurde 24 h gewählt. Nach dieser Zeit wurde durch die Zugabe einer Silbernitrat-Lösung die Produktion von Jasmonsäure induziert (siehe Material und Methoden 4.2). Nach gegebenen Zeitpunkten wurden die Pflanzen aus der Silbernitratlösung entnommen und in sterilem Wasser dreimal vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde das anhaftende Wasser sorgsam durch Abtupfen entfernt und die Pflanzen in flüssigem Stickstoff gefroren. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Kontrollen wurden entsprechend dem Protokoll behandelt, jedoch wurde anstatt Silbernitrat steriles Wasser zugegeben.

5. Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)

Für die Klonierungsarbeiten wurden *E.coli* TOP10 verwendet. Die Kultivierung der Bakterien wurde in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 37°C und 250 rpm bzw. auf LB-Festmedium bei 37°C im Inkubationsschrank durchgeführt

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

Der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) wurde zur Infiltration von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Die *Pst*-Kulturen wurden in KB-Flüssigmedium bei 28°C und 250 rpm kultiviert. Der verwendete Bakterienstamm wurde von Brian Staskawicz (Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

6. Plasmide

pGEM-T-easy (Promega, Mannheim)

Bei dem pGEM-T-easy-Vektor handelt es sich um einen linearisierter Klonierungsvektor. Dieser Vektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er besitzt eine Größe von 3015 bp. An den 3`-Enden trägt er jeweils einen Thymidin-Überhang. Diese Thymidin-Überhänge sind mit den von der *Taq*-Polymerase erzeugten Adenin-Überhängen kompatibel.

7. Allgemeine molekularbiologische Methoden

7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR mittels der Methode nach Mullis und Faloona (Mullis and Faloona 1987) durchgeführt. Als Matrize (Template) diente sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana*. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurde *Taq*-(*Thermus aquaticus*) - DNA-Polymerase verwendet.

Ansatz mit *Taq*-Polymerase (V=20µl)

Template	10-100 ng
Taq-Puffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
d`NTP`s	0,2 mM
Primer 1	0,15 pmol
Primer 2	0,15 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	5 min	94°	
<hr/>			
Denaturierung	45 s	94°C	
Annealing	45 s	50-60°C	35 Zyklen
Polymerisation	45 s	72°C	
<hr/>			
Finale Polymerisation	10 min	72°C	

7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der mittels PCR erhaltenen DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Regulär wurden 0,8%ige ([w/v] in TAE-Puffer) Gele verwendet. Zur Lokalisation der DNA-Banden unter UV-Licht wurden die Gele mit je 0,2 µg/µl Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin) versetzt, um die Dichte der Proben zu erhöhen sowie zur Markierung der Lauffront. Als Puffer für die elektrophoretische Auftrennung diente ein 1x TAE-Puffer (4 mM Tris-Base; 0,1% (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA). In diesem Puffer wurde das mit DNA-Proben beladene Gel bei einer Spannung von 80-120 V für etwa 1-1,5 Stunden belassen. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation der Auftrennung unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 364nm.

7.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von isolierten DNA-Fragmenten in pGEM-T-easy-Vektor erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym verbindet die freien 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent. (Hierbei kann es sowohl zur Verknüpfung von kohäsiven als auch von glatten Enden kommen.)

Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA:	0,2 µg
T4 DNA-Ligase	1 U/µg DNA
10x Ligase-Puffer	2 µl
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Das Endreaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ligationsansatz zur Transformation kompetenter *E.coli*-TOP10 Zellen verwendet.

7.5 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurde ein 50 µl-Aliquot kompetenter *E.coli*-TOP10 Zellen auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden die aufgetauten Bakterien mit dem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Mittels Hitzeschock bei 42°C für 70 s erfolgte die Aufnahme der Plasmide. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis abgekühlt und 500 µl LB-Medium zugegeben. Eine darauffolgende Inkubation für 1,5 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 300 rpm diente zur Regeneration der Zellen. Die Zellsuspension wurden anschließend auf Selektionsfestmedien ausplattiert und für 12-16 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert.

7.6 „Colony Screen“: Identifizierung transformierter Bakterien-Kolonien

Um die gewünschte Transformation der Bakterien zu überprüfen wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien, die auf den Selektionsfestmedien innerhalb von 12-16 Stunden gewachsen waren, in je 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Ein 10 µl-Aliquot jeder resuspendierten Kolonie diente für die nachfolgende PCR als Matrize. Die verwendeten Primerpaare wurden in Abhängigkeit des zu untersuchenden Konstrukts gewählt. Die verbleibenden 15 µl der Bakteriensuspension konnten nach der Identifizierung eines positiven Klons direkt zum Animpfen auf Selektionsfestmedium verwendet werden.

Reaktionsansatz:

Template	10 µl Bakteriensuspension
Taq-Puffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
Primer 1	0,15 pmol
Primer 2	0,15 pmol
Taq-Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	5 min	95°	
<hr/>			
Denaturierung	1 min	94°C	
Annealing	45 s	50-60°C	35 Zyklen
Polymerisation	45 s-2 min	72°C	
<hr/>			
Finale Polymerisation	10 min	72°C	

7.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen. Die Aufarbeitung wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll für Tischzentrifugen durchgeführt.

7.8 Herstellung von Glycerolstocks

Um Bakterien längerfristig aufzubewahren wurden Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurden 400 µl einer frischen Bakterienkultur mit 300 µl einer 50%igen sterilen Glycerinlösung gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

7.9 Quantifizierung von DNA bzw. RNA

Die Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm. Hierbei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm 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 in einer 1:100 Verdünnung an einem Spektralphotometer durchgeführt.

7.10 Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) am Lehrstuhl für Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut (Würzburg) mit einem LI-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

Tabelle II.5: Primer zur Sequenzierung von DNA-Sequenzen innerhalb von Klonierungsvektoren.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')
M13 for	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 rev	AAC AGC TAT GAC CAT G

7.11 Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte ausschließlich mit *RNeasy-Plant Mini Kit* (Qiagen). Es wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

7.12 Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende 1%ige (m/v in 1x FA-Puffer, 2% Formaldehyd) Agarosegele verwendet. Alle Geräte, die mit den RNA-Proben in Berührung kamen, mussten vor Gebrauch von RNase - Kontaminationen befreit werden. Dies erfolgte durch ein mehrstündiges Einlegen der Geräte in eine 3%ige H₂O₂-Lösung. Jeweils 8 µg Gesamt-RNA wurden mit 1/4 Volumen 5x RNA-Probenpuffer (40% (v/v) 10x FA-Puffer; 30,8% (v/v) Formamid; 20% (v/v) Glycerin; 7,2% (v/v) Formaldehyd; 0,8% (v/v) EDTA; 0,16% (v/v) Bromphenolblau-Lösung) versetzt, für 10 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für ca. 1-1,5 Stunden in 1x FA-Laufpuffer (20 mM MOPS; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA).

7.13 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR

Die quantitative RT-PCR ermöglicht sowohl die Detektion als auch die quantitative Darstellung der Kinetik und des Ergebnisses einer PCR-Reaktion. Desweiteren können durch eine Schmelzpunkt-Analyse spezifische PCR-Produkte von unspezifischen Amplifikaten verifiziert werden. Durch die spezifische Interkalierung des Fluoreszenz-Farbstoffes „SYBR Green“ in die während einer PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA, ist eine Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge möglich, da die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR

proportional zur DNA-Konzentration zunimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Gene At2g44810 und At1g5800 mit Hilfe des LightCyclers (Roche) und Realplex (Eppendorf) untersucht. Der Einsatz von cDNA als Matrize ermöglichte es hierbei durch den Verlauf der PCR-Reaktion auf die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkriptes in einer zu untersuchenden Gewebeprobe zu schließen. Die Aufreinigung der RNA von *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem Plant RNeasy Extraction Kit. In den RNA-Proben verbleibende DNA wurde mit „*DNase I Amplification Grade*“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verdaut. Zur Synthese der Einzelstrang cDNA „*M-MLV Reverse-Transcriptase*“ (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die erhaltene cDNA wurde in 20-facher Verdünnung für die quantitative PCR eingesetzt. (Die quantitative PCR wurde mit dem Light Cycler (Roche) bzw. Realplex (Eppendorf) mit dem SYBR Green Mix (Thermo) durchgeführt.)

Reaktionsansatz:

Template c`DNA	2 µl (1:20 Verdünnung)
SYBR-Green Mix	10 µl
Primer 1	10 mmol
Primer 2	10 mmol
Light Cycler H ₂ O	ad 20 µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	15 min	95°	
<hr/>			
Denaturierung	1s	94°C	
Annealing	7 s	50-60°C	45 Zyklen
Polymerisation	19 s	72°C	
Finale Polymeristaion	5 s	79°C	
<hr/>			
Denaturierung des Amplifikats	15 min	75-95°C	

Tabelle II.6: Primer zur Expressionsanalyse mittels quantitativer Reverser-Transkriptase-PCR.

Größe (bp)	Primerkombination 5'→3'
DAD1 At2g44810 (344 bp)	ATGGTTACCGTAATATCT CACAAACCCGTCTACCAA
DGL1 At1g05800 (484 bp)	TTACGACATAGCGGAAC GTAGATATGCCGCATT
Actin2/8	GGTGATGGTGTGTCT ACTGAGCACAATGTTAC

Da die absolute Molekülanzahl an eingesetzter cDNA nicht genau bestimmt werden konnte, diente ein Abgleich mit der vorhandenen cDNA-Anzahl eines konstitutiv exprimierten Gens (Actin 2/8) für die relative Quantifizierung. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Quantifizierungen wurden auf 10000 Actin cDNA Moleküle normalisiert, welche mit in Tab. II.6 beschriebenen Actin2/8 Primern amplifiziert wurden (Szyroki et al. 2001). Jedes Transkript wurde durch individuelle Standards quantifiziert. Mit Hilfe von Standards (10, 1, 0.1 und 0.01 fg Amplifikat/ μ l), die als Proben eingesetzt wurden, konnte eine Kalibriergerade für alle zu untersuchenden cDNAs erzeugt werden. Die individuellen Standards wurden vor Verwendung in den Klonierungsvektor pGEM[®]-Teasy (siehe Material und Methoden 7.4) subkloniert und in *E.coli* TOP10 transformiert (siehe Material und Methoden 7.5). Das erhaltene Plasmid konnte abschließend durch Sequenzierung (siehe Material und Methoden 7.10) überprüft werden.

8. Lipidextraktion aus Pflanzenmaterial

8.1 Extraktion nicht veresterter (freier) Lipide

Zur Extraktion von freien Lipiden wurden zwischen 100 und 200 mg gefrorenes und gemörsertes Pflanzenmaterial mit 1 ml MeOH/Eisessig (99:1;v:v) versetzt. Mittels einer Kugelmühle wurden die Proben anschließend für 3 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden durch einen zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und RT die Proben pelletiert. Anschließend wurden 900 μl Überstand entnommen und bei 60°C im Rotationsvakuumkonzentrator zur Trockne eingengt. Zu den trockenen Proben wurden als Interne Standards je 80 ng [^{18}O]₂-Linolensäure, 80 ng [^{18}O]₂-OPDA sowie 40 ng [^{18}O]₂-Jasmonsäure zu pipettiert und wiederum zur Trockne eingengt.

Die Herstellung der verwendeten [^{18}O]₂-Standards erfolgte im Rahmen meiner Diplomarbeit, welche dieser Dissertation vorausgegangen ist. Mittels einem sauer katalysierten (im Falle von Linolensäure und von Jasmonsäure) sowie einem enzymatischen Markierungsverfahrens (im Falle von OPDA) wurden jeweils spezifisch beide ^{16}O -Atome der Carboxylgruppen gegen ^{18}O -Atome ersetzt (Müller M. J. et al. 2006). Die Bestimmung des Markierungsgrades sowie die quantitative Bestimmung der Standards wurden mittels GC-MS durchgeführt.

Abschließend wurden die Proben in 30 μl Acetonitril/1 mM Ammonium Acetat (1:1;v:v) gelöst und bis zur Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-Tandem MS) bei -80°C aufbewahrt.

8.2 Extraktion komplexer Lipide

Zur Extraktion von komplexen Membranlipiden wurden zwischen 200 und 400 mg gefrorenes und gemörsertes Pflanzenmaterial mit 1,5 ml 80°C heißem Isopropanol versetzt und je 5 mg TPP sowie 1,5mg BHT als Antioxidantien als auch je 4 μg 18:0-18:0-MGDG, 4 μg 18:0-18:0-DGDG sowie 3 μg 17:0-17:0-PC als Interne Standards zugegeben. Nach einem 20 minütigen Inkubationsschritt bei 80°C im Wasserbad wurden die Proben 10 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die verbleibenden Pellets wurden in 1,5 ml Isopropanol/Chloroform (2:1;v:v) erneut extrahiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei RT und 14000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und die verbleibenden

Pellets wurden in 1,5 ml MeOH/Chloroform (1:2;v:v) erneut extrahiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei RT und 14000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und mit den Überständen der beiden vorangegangenen Extraktionsschritten vereinigt. Das Protokoll wurde solange wiederholt, bis das Probenmaterial farblos war. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockne eingeeengt und in 100 µl MeOH mit 1 mM Ammoniumacetat gelöst. Bis zur Analyse der Proben mittels HPLC-Tandem MS wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

9. Lipidanalytik mittels HPLC-Tandem MS

9.1 HPLC-Methoden

Für die chromatographische Auftrennung aller Proben wurde ein Ultra High Performance Liquid Chromatograph Acquity UPLC™ der Firma Waters verwendet. Die Anlage bestand aus einem Acquity UPLC Binärem Hochdruck-Gradientenmanagement System, einem Acquity UPLC Probenmanager sowie einem Acquity UPLC Säulenofen. Im Folgenden sind die Lösemittelgradienten für die Analytik der untersuchten Lipidspezies tabellarisch beschrieben.

9.1.1 Freie Lipide

Die chromatographische Auftrennung der freien Lipide erfolgte mittels der UPLC-Säule Aquity UPLC™ BEH C18 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 30 mm). Zum Schutz der Säule wurde ein 0,2 µm-Partikelfilter und eine VanGuard™ BEH C18 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) verwendet. In Tabelle II.8 ist der zur chromatographischen Trennung von freien Lipiden verwendete Lösemittelgradient dargestellt.

Tabelle II.8: Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von freien Lipiden. Lösemittel A: H₂O (1mM NH₄CH₃COOH, pH 6,6), Lösemittel B: Acetonitril.

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	0,3	95	5
3	0,3	40	60
3,01	0,3	0	100
5	0,3	0	100
5,01	0,3	95	5
8	0,3	95	5

9.1.2. Komplexe Membranlipide

9.1.2.1 Galaktolipide

Die chromatographische Auftrennung der Galaktolipide erfolgte mittels der UPLC-Säule Aquity UPLC™ BEH C8 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm). Zum Schutz der Säule wurde ein 0,2 µm-Partikelfilter und eine VanGuard™ BEH C8 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) verwendet. In Tabelle II.9 ist der zur chromatographischen Trennung von Galaktolipiden verwendete Lösemittelgradient dargestellt.

Tabelle II.9: Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von Galaktolipiden. Lösemittel A: H₂O (1mM NH₄CH₃COOH, pH 6,6), Lösemittel B: MeOH (1mM NH₄CH₃COOH).

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	0,3	25	75
1	0,3	25	75
10	0,3	0	100
11	0,3	0	100
11,01	0,3	25	75
15	0,3	25	75

9.1.2.2 Phosphatidylcholine

Die chromatographische Auftrennung der Phosphatidylcholine erfolgte mittels der UPLC-Säule Aquity UPLC™ BEH C18 (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm). Zum Schutz der Säule wurde ein 0,2 µm-Partikelfilter und eine VanGuard™ BEH C18 Säule (Partikelgröße: 1,7 µm, Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 5 mm) verwendet. In Tabelle II.10 ist der zur chromatographischen Trennung von Phosphatidylcholinen verwendete Lösemittelgradient dargestellt.

Tabelle II.10: Lösemittelgradient zur chromatographischen Trennung von Phosphatidylcholinen. Lösemittel A: H₂O (1mM NH₄CH₃COOH), Lösemittel B: MeOH (1mM NH₄CH₃COOH).

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	0,2	5	95
10	0,2	0	100
12	0,2	0	100
12,01	0,2	5	95
15	0,2	5	95

9.2 MS-Methoden

Zur massenspektrometrischen Analyse aller Proben wurde ein Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer von Waters verwendet, welches an die Aquity UPLC™ gekoppelt war. Die Ionisierung der Analyten erfolgte durch negative Elektrospray-Ionisation (ESI⁻). Zur Detektion wurde der Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus verwendet. Mittels dieses MRM-Modus kommt es zur Isolierung eines Moleküliions anhand seines Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) im ersten Quadrupol des Tandem-MS. Anschließend werden im zweiten Quadrupol (Kollisionszelle) durch die Kollision mit Argon Fragmentationen generiert (Collision induced dissociation, CID), welche im dritten Quadrupol spezifisch selektiert werden. Im Folgenden sind die Geräteparameter sowie die spezifischen Massenübergänge der einzelnen Analyten tabellarisch aufgeführt.

Die Auflösung des Massenspektrometers war regulär auf 0,6-0,7 Dalton bei halbmaximaler Peakbreite eingestellt. Als Desolvatisierungs- und Konusgas wurde Stickstoff verwendet.

9.2.1 Freie Lipide

Tabelle II.11: Geräteeinstellungen zur Bestimmung freier Lipide

Kapillarspannung [kV]	3
Konusspannung [V]	20
Extraktor [V]	5
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatisierungstemperatur [°C]	400
Konusgasfluss [l/h]	50
Desolvatisierungsgasfluss [l/h]	800
Kollisionsgasfluss [ml/min]	0,27

Tabelle II.12: Spezifische Massenübergänge (m/z) freier Lipide im negativen Elektrospray-Ionisations-Modus (ESI⁻) mit verwendeten Kollisionsenergien.

Bezeichnung	m/z Moleküliion	m/z Fragmention	Kollisionsenergie [V]
JA	209	59	17
[¹⁸ O] ₂ -JA	213	63	17
OPDA	291	165	26
[¹⁸ O] ₂ -OPDA	295	165	26
dnOPDA	263	165	16

9.2.2. Komplexe Membranlipide

9.2.2.1 Galaktolipide

Tabelle II.13: Geräteeinstellungen zur Bestimmung von Galaktolipiden

Kapillarspannung [kV]	2,23
Konusspannung [V]	40
Extraktor [V]	3
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatisierungstemperatur [°C]	450
Konusgasfluss [l/h]	50
Desolvatisierungsgasfluss [l/h]	850
Kollisionsgasfluss [ml/min]	0,3

Tabelle II.14: Spezifische Massenübergänge (m/z) von Monogalaktosyldiacylglycerolen (MGDG) im negativen Elektrospray-Ionisations-Modus (ESI) mit verwendeten Kollisionsenergien.

Galaktose-modifikation	Fettsäure	m/z	Fettsäure	m/z	Bezeichnung	m/z	Kollisionsenergie [V]
-	C18:0	283	C18:0	283	18:0-18:0 (IS)	785,5	26
-	C18:1	281	C18:0	283	18:0-18:1	783,5	26
-	C18:2	279	C18:0	283	18:0-18:2	781,5	26
-	C18:3	277	C18:0	283	18:0-18:3	779,5	26
-	OPDA	291	C18:0	283	18:0-OPDA	793,5	26
-	C18:1	281	C18:1	281	18:1-18:1	781,5	26
-	C18:2	279	C18:1	281	18:1-18:2	779,5	26
-	C18:3	277	C18:1	281	18:1-18:3	777,5	26
-	OPDA	291	C18:1	281	18:1-OPDA	791,5	26
-	C18:2	279	C18:2	279	18:2-18:2	777,5	26
-	C18:3	277	C18:2	279	18:2-18:3	775,5	26
-	OPDA	291	C18:2	279	18:2-OPDA	789,5	26
-	C18:3	277	C18:3	277	18:3-18:3	773,5	26
-	OPDA	291	C18:3	277	18:3-OPDA	787,5	26
-	OPDA	291	OPDA	291	Arabidopsid B	801,5	26
OPDA	OPDA	291	OPDA	291	Arabidopsid G	1076,5	26
-	C18:0	283	C16:0	255	16:0-18:0	757,5	26
-	C18:1	281	C16:0	255	16:0-18:1	755,5	26
-	C18:2	279	C16:0	255	16:0-18:2	753,5	26
-	C18:3	277	C16:0	255	16:0-18:3	751,5	26
-	OPDA	291	C16:0	255	16:0-OPDA	765,5	26
-	C18:0	283	C16:1	253	16:1-18:0	755,5	26
-	C18:1	281	C16:1	253	16:1-18:1	753,5	26

-	C18:2	279	C16:1	253	16:1-18:2	751,5	26
-	C18:3	277	C16:1	253	16:1-18:3	749,5	26
-	OPDA	291	C16:1	253	16:1-OPDA	763,5	26
-	C18:0	283	C16:2	251	16:2-18:0	753,5	26
-	C18:1	281	C16:2	251	16:2-18:1	751,5	26
-	C18:2	279	C16:2	251	16:2-18:2	749,5	26
-	C18:3	277	C16:2	251	16:2-18:3	747,5	26
-	OPDA	291	C16:2	251	16:2-OPDA	761,5	26
-	C18:0	283	C16:3	249	16:3-18:0	751,5	26
-	C18:1	281	C16:3	249	16:3-18:1	749,5	26
-	C18:2	279	C16:3	249	16:3-18:2	747,5	26
-	C18:3	277	C16:3	249	16:3-18:3	745,5	26
-	OPDA	291	C16:3	249	16:3-OPDA	759,5	26
-	C18:0	283	dnOPDA	263	dnOPDA-18:0	765,5	26
-	C18:1	281	dnOPDA	263	dnOPDA-18:1	763,5	26
-	C18:2	279	dnOPDA	263	dnOPDA-18:2	761,5	26
-	C18:3	277	dnOPDA	263	dnOPDA-18:3	759,5	26
-	OPDA	291	dnOPDA	263	Arabidopsid A	773,5	26
OPDA	OPDA	291	dnOPDA	263	Arabidopsid E	1048,5	26
-	C18:0	283	C18:0	283	MGDG-IS	785,5	26

Tabelle II.15: Spezifische Massenübergänge (m/z) von Digalaktosyldiacylglycerolen (DGDG) im negativen Elektrospray-Ionisations-Modus (ESI) mit verwendeten Kollisionsenergien.

Galaktose-modifikation	Fettsäure	m/z	Fettsäure	m/z	Bezeichnung	m/z	Kollisionsenergie [V]
-	C18:0	283	C18:0	283	18:0-18:0 (IS)	947,5	26
-	C18:1	281	C18:0	283	18:0-18:1	945,5	26
-	C18:2	279	C18:0	283	18:0-18:2	943,5	26
-	C18:3	277	C18:0	283	18:0-18:3	941,5	26
-	OPDA	291	C18:0	283	18:0-OPDA	955,5	26
-	C18:1	281	C18:1	281	18:1-18:1	943,5	26
-	C18:2	279	C18:1	281	18:1-18:2	941,5	26
-	C18:3	277	C18:1	281	18:1-18:3	939,5	26
-	OPDA	291	C18:1	281	18:1-OPDA	953,5	26
-	C18:2	279	C18:2	279	18:2-18:2	939,5	26
-	C18:3	277	C18:2	279	18:2-18:3	937,5	26
-	OPDA	291	C18:2	279	18:2-OPDA	951,5	26
-	C18:3	277	C18:3	277	18:3-18:3	935,5	26
-	OPDA	291	C18:3	277	18:3-OPDA	949,5	26
-	OPDA	291	OPDA	291	Arabidopsid D	963,5	26
-	C18:0	283	C16:0	255	16:0-18:0	919,5	26
-	C18:1	281	C16:0	255	16:0-18:1	917,5	26
-	C18:2	279	C16:0	255	16:0-18:2	915,5	26
-	C18:3	277	C16:0	255	16:0-18:3	913,5	26

-	OPDA	291	C16:0	255	16:0-OPDA	927,5	26
-	C18:0	283	C16:1	253	16:1-18:0	917,5	26
-	C18:1	281	C16:1	253	16:1-18:1	915,5	26
-	C18:2	279	C16:1	253	16:1-18:2	913,5	26
-	C18:3	277	C16:1	253	16:1-18:3	911,5	26
-	OPDA	291	C16:1	253	16:1-OPDA	925,5	26
-	C18:0	283	C16:2	251	16:2-18:0	915,5	26
-	C18:1	281	C16:2	251	16:2-18:1	913,5	26
-	C18:2	279	C16:2	251	16:2-18:2	911,5	26
-	C18:3	277	C16:2	251	16:2-18:3	909,5	26
-	OPDA	291	C16:2	251	16:2-OPDA	923,5	26
-	C18:0	283	C16:3	249	16:3-18:0	913,5	26
-	C18:1	281	C16:3	249	16:3-18:1	911,5	26
-	C18:2	279	C16:3	249	16:3-18:2	909,5	26
-	C18:3	277	C16:3	249	16:3-18:3	907,5	26
-	OPDA	291	C16:3	249	16:3-OPDA	921,5	26
-	C18:0	283	dnOPDA	263	dnOPDA-18:0	927,5	26
-	C18:1	281	dnOPDA	263	dnOPDA-18:1	925,5	26
-	C18:2	279	dnOPDA	263	dnOPDA-18:2	923,5	26
-	C18:3	277	dnOPDA	263	dnOPDA-18:3	921,5	26
-	OPDA	291	dnOPDA	263	Arabidopsid C	935,5	26
-	C18:0	283	C18:0	283	DGDG-IS	947,5	26

9.2.2.2 Phosphatidylcholine

Tabelle II.16: Geräteeinstellungen zur Bestimmung von Phosphatidylcholinen

Kapillarspannung [kV]	3,5
Konusspannung [V]	40
Extraktor [V]	3
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatisierungstemperatur [°C]	450
Konusgasfluss [l/h]	50
Desolvatisierungsgasfluss [l/h]	800
Kollisionsgasfluss [ml/min]	0,3

Tabelle II.17: Spezifische Massenübergänge (m/z) der Acetatadukte von Phosphatidylcholinen (PC) im negativen Elektrospray-Ionisations-Modus (ESI) mit verwendeten Kollisionsenergien.

Fettsäure	m/z	Fettsäure	m/z	Bezeichnung	m/z	Kollisionsenergie [V]
C18:0	283	C16:0	255	16:0-18:0	820,5	26
C18:1	281	C16:0	255	16:0-18:1	818,5	26
C18:2	279	C16:0	255	16:0-18:2	816,5	26
C18:3	277	C16:0	255	16:0-18:3	814,5	26
C18:0	283	C16:1	253	16:1-18:0	818,5	26
C18:1	281	C16:1	253	16:1-18:1	816,5	26
C18:2	279	C16:1	253	16:1-18:2	814,5	26
C18:3	277	C16:1	253	16:1-18:3	812,5	26
C18:0	283	C16:2	251	16:2-18:0	816,5	26
C18:1	281	C16:2	251	16:2-18:1	814,5	26
C18:2	279	C16:2	251	16:2-18:2	812,5	26
C18:3	277	C16:2	251	16:2-18:3	810,5	26
C18:0	283	C16:3	249	16:3-18:0	814,5	26
C18:1	281	C16:3	249	16:3-18:1	812,5	26
C18:2	279	C16:3	249	16:3-18:2	810,5	26
C18:3	277	C16:3	249	16:3-18:3	808,5	26
C18:0	283	C18:0	283	18:0-18:0	848,5	26
C18:1	281	C18:0	283	18:0-18:1	846,5	26
C18:2	279	C18:0	283	18:0-18:2	844,5	26
C18:3	277	C18:0	283	18:0-18:3	842,5	26
C18:1	281	C18:1	281	18:1-18:1	844,5	26
C18:2	279	C18:1	281	18:1-18:2	842,5	26
C18:3	277	C18:1	281	18:1-18:3	840,5	26
C18:2	279	C18:2	279	18:2-18:2	840,5	26
C18:3	277	C18:2	279	18:2-18:3	838,5	26
C18:3	277	C18:3	277	18:3-18:3	836,5	26
C17:0	269	C17:0	269	PC-IS	820,5	26

III. Ergebnisse

Jasmonsäure ist ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Phytohormon, welches im Chloroplasten und Peroxisom als Antwort auf einen Stresstimulus *de novo* synthetisiert wird. Das Oxylin JA leitet sich aus den dreifach ungesättigten Fettsäuren Linolensäure (18:3) und „Roughanic acid“ (16:3), welche verestert in den Galaktolipiden der Plastidenmembran vorliegen, ab. Gemäß dem klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ ist der initiale Schritt der JA-Biosynthese die Freisetzung von 18:3 bzw. 16:3 aus den Galaktolipiden mittels einer Lipase. Die freien Fettsäuren werden anschließend durch drei konstitutiv vorliegende Enzym zu OPDA (Metabolit aus 18:3) bzw. dnOPDA (Metabolit aus 16:3) synthetisiert. Darauf folgend werden diese JA-Vorläufersubstanzen aus den Chloroplasten in die Peroxisome transportiert und dort durch Reduktion sowie β -Oxidation zu Jasmonsäure umgewandelt. Im Bezug auf die Biosynthese von JA besitzt *A.thaliana* eine bemerkenswerte Besonderheit. Neben freier OPDA und dnOPDA weist *A.thaliana* hohe Gehalte dieser beiden Oxyline verestert in Galaktolipiden auf. Es ist davon auszugehen, dass in Arabidopsis ein alternativer oder zusätzlicher Biosyntheseweg existiert, welcher charakterisiert ist durch die Synthese von OPDA und dnOPDA in den Galaktolipiden der Chloroplastenmembran. Diese, in der Literatur als Arabidopside bezeichneten Galaktolipide könnten als Speicher fungieren, welcher eine schnelle Freisetzung der Zwischenprodukte der JA-Biosynthese nach einem Stresstimulus erlaubt.

Sowohl im klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch im postulierten alternativen Syntheseweg ist die Aktivität einer Lipase essentiell für die Synthese von JA.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch lipidomische Analyse von ausgewählten plastidären Lipase-Einzelmutanten das initiale lipolytische Enzym der JA-Biosynthese zu identifizieren sowie dessen Substratspezifität *in vivo* zu klären.

1. Quantitative und qualitative Bestimmung von Glycerolipiden in Rosettenblättern von *A.thaliana*

Sowohl gemäß dem klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch gemäß dem in der Literatur postulierten alternativen Syntheseweg dienen Galaktolipide als Substrat der JA-Biosynthese initierenden Lipase. Jedoch unterscheiden sich diese Synthesewege in der Substratspezifität. Im klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“

dienen membrangebundene α -18:3 sowie 16:3, im alternativen Syntheseweg Arabidopside als Lipasen-Substrat. Um den in der Literatur postulierten alternativen Syntheseweg zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit das basale Lipidmuster von Mono- und Digalaktosyldiacylglycerolen in Rosettenblättern von sechs Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen bestimmt. Wäre eine spezifische chloroplastidär lokalisierte Lipase für die Freisetzung von OPDA bzw. dnOPDA aus Galaktolipiden verantwortlich, müsste eine Knockout-Mutante dieser Lipase im Vergleich zum Wildtyp charakterisiert sein durch JA-Defizienz und Akkumulation von Arabidopsiden. Darüberhinaus wurde eine quantitative sowie qualitative Analyse der abundantesten plastidären und extraplastidären Phospholipide, den Phosphatidylcholinen, durchgeführt, da im Verlauf dieser Arbeit eine Beteiligung der plastidären PLA₁ DAD1 (Ishiguro et al. 2001) bei der wundinduzierten JA-Biosynthese in den Blättern von *A. thaliana* publiziert wurde (Hyun et al. 2008) und deren präferiertes Substrat Phosphatidylcholine sind.

Im Folgenden wird die Abkürzungskonvention x-y-MGDG/DGDG/PC verwendet, in welcher die erstgenannte Fettsäure x in sn₁-Position und die zweitgenannte Fettsäure y in sn₂-Position vorliegt.

1.1 Quantitative und qualitative Bestimmung von Monogalaktosyldiacylglycerolen (MGDG)

Zur Analyse der in *A. thaliana* präsenten MGDG wurde zunächst eine Matrix aller theoretisch möglich existierenden Fettsäure-Kombinationen in sn₁- und sn₂-Position des Glycerolgerüsts erstellt. Bei Erstellung der Matrix wurden folgende Fettsäuren berücksichtigt: 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2 und 18:3. Darüber hinaus wurden dnOPDA und OPDA ebenfalls zur Erstellung der Matrix verwendet. Unter Verwendung des käuflich erworbenen 18:0-18:0-MGDG wurden die Geräteeinstellungen des Massenspektrometers (MS) ermittelt, welche zu einer exakten Fragmentierung der intakten Fettsäurereste aus sn₁- und sn₂-Position führen (Tab. II.13 und 14). Auf Grund des Masse/Ladung-Verhältnis und den ermittelten MS-Einstellungen konnte für jedes putative MGDG eine Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Analyse durchgeführt werden. Mittels des MRM-Modus konnte jedes putative MGDG-Molekölion anhand seines Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) im ersten Quadrupol des Tandem-MS isoliert werden, um im zweiten Quadrupol durch die Kollision mit Argon in seine spezifischen Fettsäureionen aus sn₁- und sn₂-Position

zu fragmentieren. Durch die spezifische Selektion im dritten Quadrupol konnte jedem MGDG-Molekülion (Precursor) die entsprechenden Fragmentationen (den Acylresten in sn₁ und sn₂) zugeordnet werden. Die Signale beider Fragmentationen wurden zusammen integriert. Bei der Analyse der MGDG zeigte sich, dass 18:0-18:0-MGDG in Blättern von *A. thaliana* endogen nicht vorkommt und wurde deshalb als Interner Standard für alle weiteren MGDG-Analysen verwendet. Da keines der in *A. thaliana* vorkommenden MGDG käuflich erworben werden und somit für keines der analysierten MGDG ein Response-Faktor des Internen Standards ermittelt werden konnte, wurde dieser stets gleich 1 gesetzt. Ferner zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der optimalen Detektion der Precursoren sowie deren Fragmentationen Fettsäurereste aus sn₁-Position besser fragmentieren als aus sn₂-Position. Da jedoch der Interne Standard sowohl in sn₁-Position als auch in sn₂-Position 18:0 als Fettsäurerest aufweist und somit das Detektionssignal aus beiden sn-Positionen in die Integration einfließt, erfolgte die Berechnung der endogenen Konzentrationen der einzelnen MGDG-Spezies durch die Formel:

$$K_A = \left(\frac{M_{IS} \times (F_{A_{sn1}} + F_{A_{sn2}})}{F_{IS}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ [mg]}}{\text{Einwaage [mg]}} \right)$$

F_{A_{sn1}}: Fläche Analyt sn1-Position

M_{IS}: Menge Interner Standard

F_{A_{sn2}}: Fläche Analyt sn2-Position

K_A: Endogene Konzentration Analyt

F_{IS}: Fläche Interner Standard

Wie in Abbildung III.1 zu sehen, wurden die basalen Gehalte aller theoretisch möglichen Standard-MGDG, die in sn₁- und sn₂-Position des Glycerolgerüsts nicht-oxidierte Fettsäuren verestert haben, sowie die Gehalte an MGDG, die Cyclooxylipine in einer oder beiden Positionen gebunden haben, analysiert. Das abundanteste der gemessenen Monogalaktosyldiacylglycerolen waren die Lipidspezies, welche in sn₁-Position Linolensäure (18:3) und in sn₂-Position „Roughanic acid“ (16:3) verestert besitzt. Der prozentuale Anteil dieses Lipids im Bezug auf alle gemessenen MGDG lag bei 45,8%. Das zweit abundanteste MGDG (35,6%) hat in beiden Positionen Linolensäure gebunden. Mit 18:3-16:2-MGDG, welches mit 5,1% das dritt abundanteste MGDG darstellt, besteht über 85% des MGDG-Profils aus 18:3-16:3-MGDG, 18:3-18:3-MGDG und 18:3-16:2-MGDG. Die verbleibenden 15% aller gemessenen MGDG besitzen als Hauptvertreter 26,3% an

18:2-16:3-MGDG und 18,8% an 18:3-18:2-MGDG/18:2-18:3-MGDG. Alle anderen MGDG-Spezies stellen einzeln nur ungefähr 1% der Gesamtheit aller MGDG dar. Nicht detektiert werden konnten die Spezies, die in einer oder beiden sn-Positionen keine oder nur einfachgesättigte Fettsäuren beinhalten. Die Analyse der MGDG, die Cyclooxylipine aufweisen, zeigte, dass diese spezielle Gruppe mit 0,5% nur einen Bruchteil der MGDG darstellt. Die dargestellte Lipidanalyse der Monogalaktosyldiacylglycerole entspricht bereits publizierten Daten (Devaiah et al. 2006). Das in Abb. III.1 gezeigte MGDG-Profil konnte in allen während dieser Arbeit durchgeführten Messungen wieder reproduziert werden.

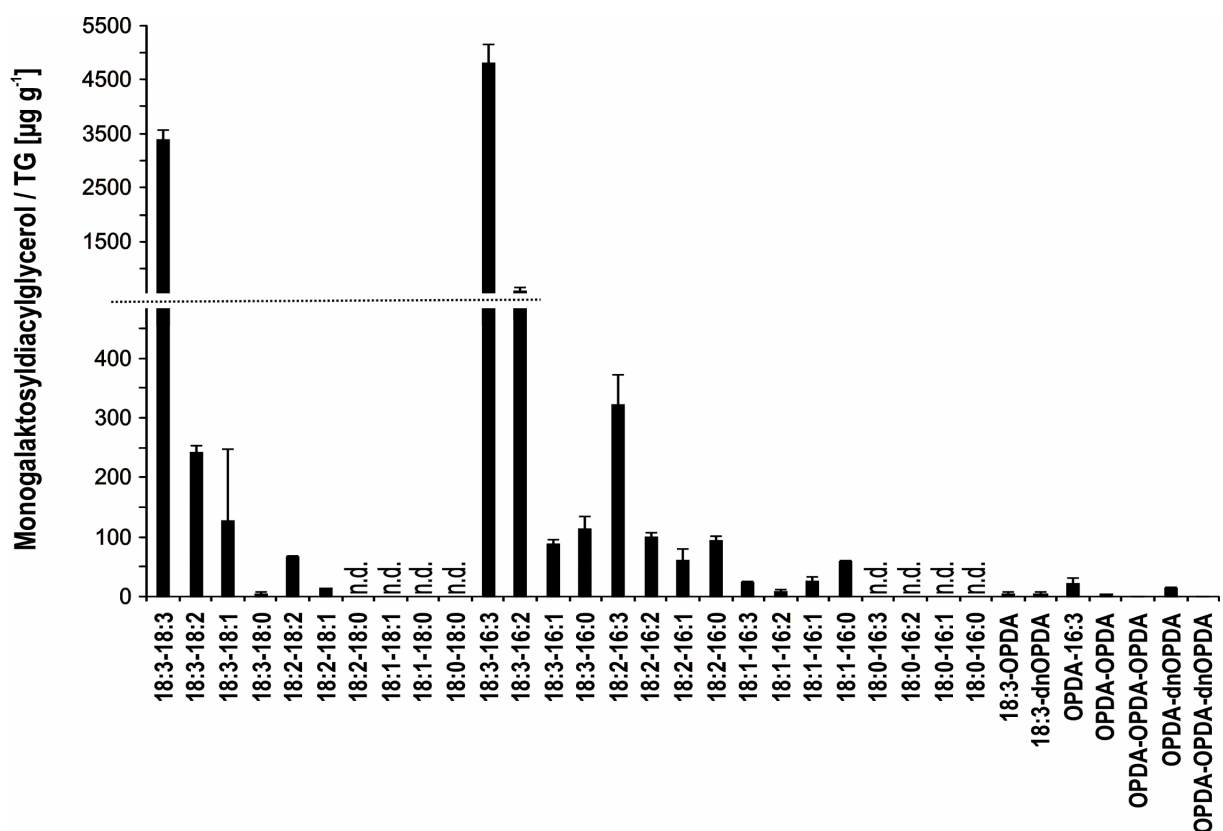


Abbildung III.1: Quantitative Bestimmung von Monogalaktosyldiacylglycerolen.

Dargestellt sind die basalen Gehalte an MGDG mit offenkettigen Fettsäuren in sn₁- und sn₂-Position sowie MGDG, die OPDA oder dnOPDA verestert vorliegen haben, als auch die Arabidopside A (dnOPDA-OPDA), B (OPDA-OPDA), E (OPDA-dnOPDA-OPDA) und G (OPDA-OPDA-OPDA) in Rosettenblättern von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen. MGDG-Spezies, die nicht detektiert werden konnten wurden mit „n.d.“ gekennzeichnet. (MW±SD, n=3)

1.2 Quantitative und qualitative Bestimmung von Digalaktosyldiacylglycerolen (DGDG)

Zur Bestimmung des Lipidprofils der Digalaktosyldiacylglycerole wurde ebenfalls in analoger Weise zur Analyse der MGDG zunächst eine Matrix aller theoretisch möglich existierenden Fettsäure-Kombinationen in sn₁- und sn₂-Position des

Glycerolgerüsts erstellt. Bei Erstellung der Matrix wurden folgende Fettsäuren berücksichtigt: 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2 und 18:3. Darüber hinaus wurden dnOPDA und OPDA ebenfalls zur Erstellung der Matrix verwendet. Die Ermittlung der optimalen MS-Geräteeinstellungen (Tab.II.15 und 16) erfolgte in analoger Weise zu III.1.1 mit 18:0-18:0-DGDG als Referenzsubstanz. Bei der Analyse der DGDG zeigte sich, dass 18:0-18:0-DGDG in Blättern von *A. thaliana* endogen nicht vorkommt und wurde deshalb als Interner Standard für alle weiteren DGDG-Analysen verwendet. Da keines der in *A. thaliana* vorkommenden DGDG käuflich erworben werden und somit für keines der analysierten DGDG ein Response-Faktor des Internen Standards ermittelt werden konnte, wurde dieser stets gleich 1 gesetzt. Ferner zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der optimalen Detektion der Precursoren sowie deren Fragmentationen Fettsäurereste aus sn₁-Position besser fragmentieren als aus sn₂-Position. Da jedoch der Interne Standard sowohl in sn₁-Position als auch in sn₂-Position 18:0 als Fettsäurerest aufweist und somit das Detektionssignal aus beiden sn-Positionen in die chromatographische Integration einfließt, erfolgte die Berechnung der endogenen Konzentrationen der einzelnen DGDG-Spezies analog zur Berechnung der MGDG-Gehalte gemäß der in III.1.1 aufgeführten Formel.

An Hand der ermittelten Geräteparameter konnten die basalen Gehalte aller theoretisch möglichen Standard-DGDG, die in sn₁- und sn₂-Position des Glycerolgerüsts nicht-oxidierte Fettsäuren verestert haben, sowie die Gehalte an DGDG, die Cyclooxylipine in einer oder beiden Positionen gebunden haben, im MRM-Modus analysiert werden. Die DGDG-Spezies mit dem höchsten basalen Gehalt war jene, welche sowohl in sn₁-Position als auch in sn₂-Position Linolensäure verestert besitzt (Abb.III.2). Der prozentuale Anteil dieses Lipids im Bezug auf alle gemessenen DGDG lag bei 58,8%. Die nächst abundantesten DGDG-Spezies sind 18:3-18:2-DGDG/18:2-18:3-DGDG (9%), 18:3-16:3-DGDG (8,4%) und 18:3-16:0-DGDG (16,8%). Somit stellen diese Vertreter der Digalaktosyldiacylglycerole zusammen mit 18:3-18:3-DGDG 93% des DGDG-Profiles dar. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur (Devaiah et al. 2006, Welti et al. 2002). Wie in Abb.III.2 gezeigt, sind die verbleibenden 13% der gemessenen und detektierten DGDG fast alle charakterisiert durch den Besitz von Linolensäure oder Linolsäure. Mit mehr als einem Drittel Anteil ist Hauptvertreter dieser Gruppe ein DGDG, das sowohl in sn₁-Position als auch in sn₂-Position Linolsäure verestert besitzt. Alle

anderen DGDG-Spezies stellen einzeln nur ungefähr 1% der Gesamtheit aller DGDG dar. Nicht detektiert werden konnten die Spezies, die in einer oder beiden sn-Positionen keine oder nur einfachgesättigte Fettsäuren beinhalten. Wie bei den MGDG bereits gezeigt, weist auch die Gruppe der DGDG, die Cyclooxylipine verestert vorliegen haben, nur einen sehr geringen Anteil von 0,53% an allen detektierten DGDG auf. Das in Abb.III.2 gezeigte DGDG-Profil konnte in allen während dieser Arbeit durchgeführten Messungen wieder reproduziert werden.

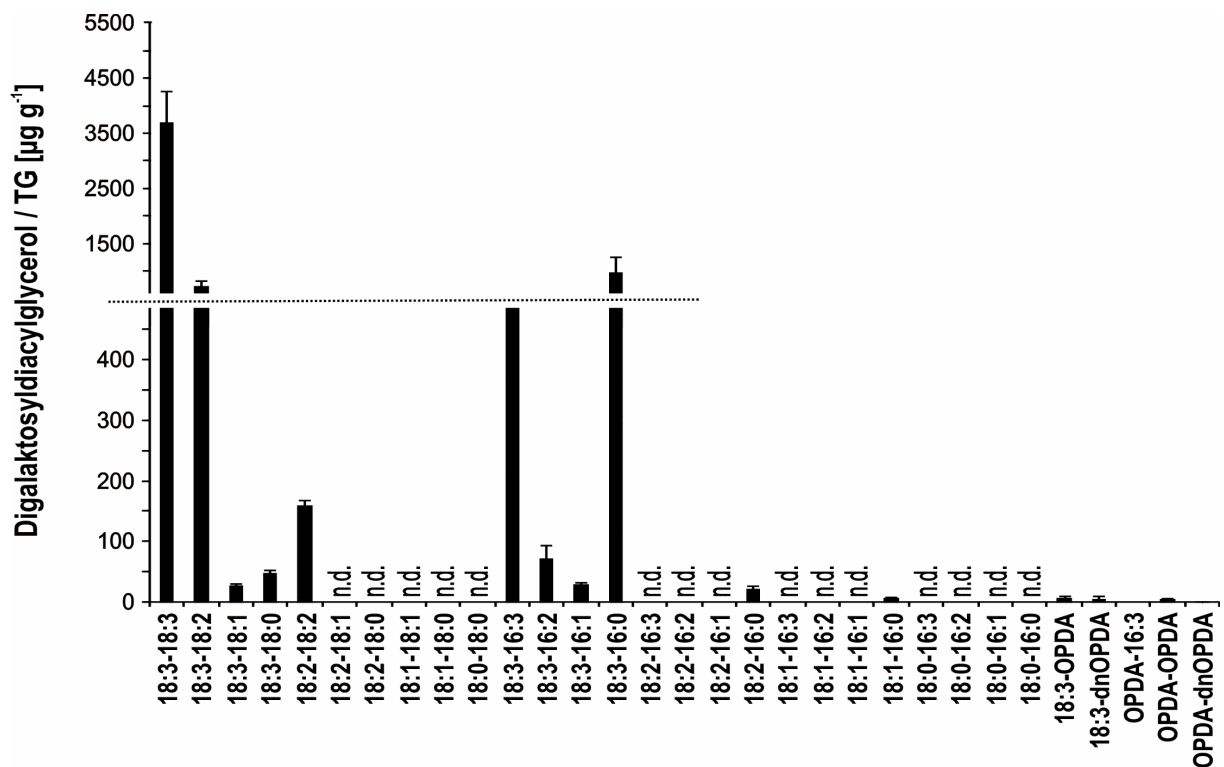


Abbildung III.2: Quantitative Bestimmung von Digalaktosyldiacylglycerolen.

Dargestellt sind die basalen Gehalte an DGDG mit offenkettigen Fettsäuren in sn₁- und sn₂-Position sowie DGDG, die OPDA oder dnOPDA verestert vorliegen haben, als auch die Arabidopside C (dnOPDA-OPDA) und D (OPDA-OPDA) in Rosettenblättern von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen. DGDG-Spezies, die nicht detektiert werden konnten wurden mit „n.d.“ gekennzeichnet. (MW±SD, n=3)

1.3 Quantitative und qualitative Bestimmung von Phosphatidylcholinen (PC)

Zur Analyse der in *A. thaliana* präsenten Phosphatidylcholine wurde analog zur Analyse von MGDG zunächst eine Matrix aller theoretisch möglich existierenden Fettsäure-Kombinationen in sn₁- und sn₂-Position des Glycerolgerüsts erstellt. Bei Erstellung der Matrix wurden folgende Fettsäuren berücksichtigt: 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2 und 18:3. Unter Verwendung des käuflich erworbenen 17:0-

17:0-PC wurden die Geräteeinstellungen des Massenspektrometers (MS) ermittelt, welche zu einer exakten Fragmentierung der intakten Fettsäurereste aus sn₁- und sn₂-Position führen (Tab. II.17 und 18). Darüber hinaus zeigte sich bei der Analyse der PC, dass 17:0-17:0-PC in *A. thaliana* endogen nicht vorkommt und wurde deshalb als Interner Standard für alle weiteren PC-Analysen verwendet. Da keines der in *A. thaliana* vorkommenden PC käuflich erworben werden und somit für keines der analysierten PC ein Response-Faktor des Internen Standards ermittelt werden konnte, wurde dieser stets gleich 1 gesetzt. Ferner zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der optimalen Detektion der Precursoren sowie deren Fragmentationen Fettsäurereste aus sn₁-Position besser fragmentieren als aus sn₂-Position. Da jedoch der Interne Standard sowohl in sn₁-Position als auch in sn₂-Position 17:0 als Fettsäurerest aufweist und somit das Detektionssignal aus beiden sn-Positionen in die chromatographische Integration einfließt, erfolgte die Berechnung der endogenen Konzentrationen der einzelnen PC-Spezies analog zur Berechnung der MGDG-Gehalte gemäß der in III.1.1 aufgeführten Formel.

Zur Bestimmung des Lipidprofils der Phosphatidylcholine wurden die basalen Gehalte aller theoretisch möglichen Standard-PC, die in sn₁- und sn₂-Position des Glycerolgerüsts nicht-oxidierte Fettsäuren verestert haben, in Rosettenblättern von sechs Wochen alten Arabidopsis Pflanzen analysiert. Wie in Abb.III.3 zu sehen ist, sind die abundantesten Lipide im PC-Profil 18:3-16:0-PC, 18:2-16:0-PC, 18:3-18:3-PC und 18:3-18:2-PC/18:2-18:3-PC. Zusammen stellen diese Phosphatidylcholine 79% der Gesamtheit an gemessenen und detektierten PC dar. Die verbleibenden 21% sind zu zwei Drittel durch 18:3-18:0-PC/18:0-18:3-PC, 18:2-18:0-PC/18:0-18:2-PC, 18:2-18:1-PC/18:1-18:2-PC sowie 18:1-16:0-PC vertreten. Alle anderen in Abb.III.3 dargestellten PC-Gehalte lagen bei 1%. Nicht detektiert werden konnten vornehmlich PC, welche in sn₁-Position eine einfach ungesättigte oder gesättigte C₁₈-Fettsäure und in sn₂-Position eine C₁₆-Fettsäure verestert haben. Das erhaltene Lipidprofil der gemessenen PC entsprach der Literatur (Devaiah et al. 2006). Das in Abb.III.3 gezeigte PC-Profil konnte in allen während dieser Arbeit durchgeführten Messungen wieder reproduziert werden.

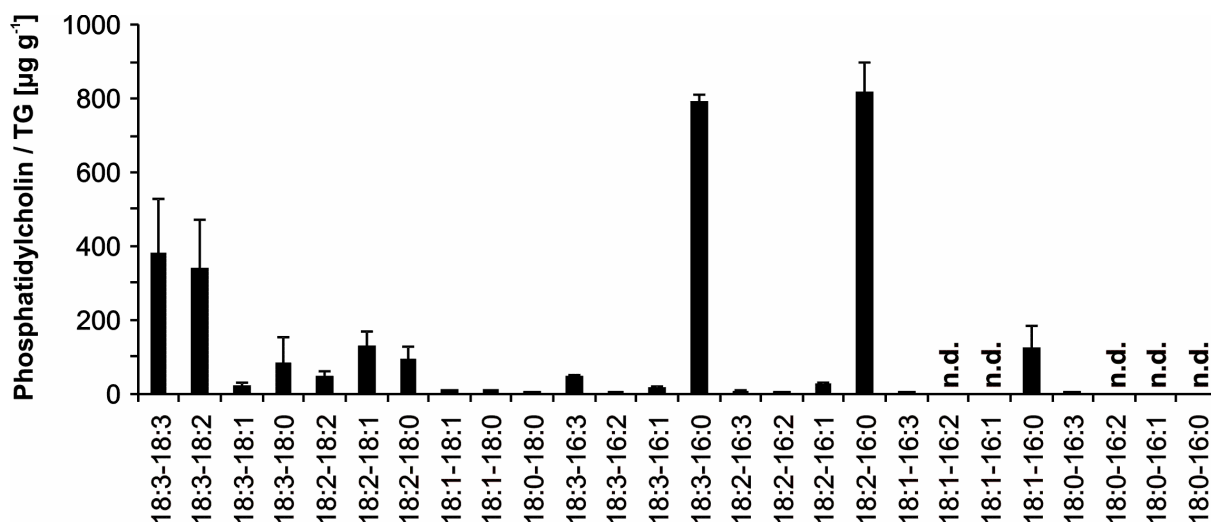


Abbildung III.3: Quantitative Bestimmung von Phosphatidylcholinen.

Dargestellt sind die basalen Gehalte an PC in Rosettenblättern von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen. PC-Spezies, die nicht detektiert werden konnten wurden mit „n.d.“ gekennzeichnet. (MW±SD, n=3)

2. Jasmonatinduktion

Um die JA-Biosynthese initierende Lipase zu identifizieren sollte ein quantitatives Lipidprofil von MGDG, DGDG, Arabidopsiden sowie Jasmonaten in den chloroplastären Lipase-Einzelmutanten durchgeführt werden. Die gesuchte Mutante sollte durch JA-Defizienz sowohl unter basalen Bedingungen sowie nach einem Stressstimulus gekennzeichnet sein. Um eine schnelle sowie aussagekräftige Methode zur Analyse der Lipasemutanten verwenden zu können, wurden zu Beginn dieser Arbeit unterschiedliche Stressstimuli an Rosettenblättern von *A. thaliana* Col-0 getestet und die endogenen Jasmonatgehalte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung bestimmt. Es sollte eine Stressbedingung gefunden werden, welche zum kürzesten Zeitpunkt nach Behandlung zu einer dramatischen sowie eindeutig von basalen Bedingungen unterscheidbaren Konzentrationserhöhung von JA führt.

2.1 Jasmonatinduktion durch Verwundung

Um den zeitlichen Verlauf der Jasmonatbiosynthese nach Verwundung zu untersuchen, wurden Wildtyp-Pflanzen wie in II.4.1 beschrieben verwundet und geerntet. Die Analyse des gewonnenen Pflanzenmaterials bezüglich der Gehalte an dnOPDA, OPDA und JA ist in Abb.III.4 zu sehen. Bereits 10 min nach Verwundung war ein dramatischer Anstieg aller drei Oxylipine zu verzeichnen. Der Gehalt an freier JA stieg im Vergleich zum Zeitpunkt 0 min um das Zweiundzwanzigfache an (Abb.III.4.C), die Jasmonsäurevorstufen dnOPDA und OPDA stiegen um das

Fünfhundertfünfzig- bzw. Hundertfünfzigfache an (Abb.III.4. A und B). 30 min nach Verwundung waren die Mengen aller drei Substanzen um ungefähr das Doppelte der 10 min-Werte angestiegen. So lag in dem eine halbe Stunde nach Verwundung geernteten Blattmaterial 6 µg/g TG freie JA vor. Die Gehalte an freier dnOPDA und OPDA betragen 10,1 µg/g TG bzw. 23,3 µg/g TG. Wie im weiteren Verlauf der Kinetiken zu sehen, hat dnOPDA (Abb.III.1.4. A) nach 30 min fast sein Maximum erreicht und steigt bis zu 240 min nach Verwundung nur noch um 2,2 µg an. Das absolute Maximum der Akkumulation an freier OPDA (Abb. III.1.4. B) hingegen liegt mit einem Gehalt von 32,5 µg/g TG bei 240 min. Dies bedeutet, dass in dem Zeitraum zwischen 30 min und 4 Stunden nach Verwundung mehr als 9 µg/g TG freie OPDA generiert wurde. Im Gegensatz zu dnOPDA und OPDA erreichte die JA-Produktion 3 Stunden nach Verwundung ihr Maximum mit 15,4 µg/g TG und zeigte 4 Stunden nach Verwundung eine rückläufige Tendenz mit 11,8 µg/g TG. Insgesamt ist in Abb.III.1.4 zu erkennen, dass die Konzentrationen an dnOPDA, OPDA und JA in verwundeten Blättern bis zu 30 min nach Verwundung dramatisch akkumulieren und anschließend stagnieren (dnOPDA, OPDA) bzw. langsamer ansteigen (JA).

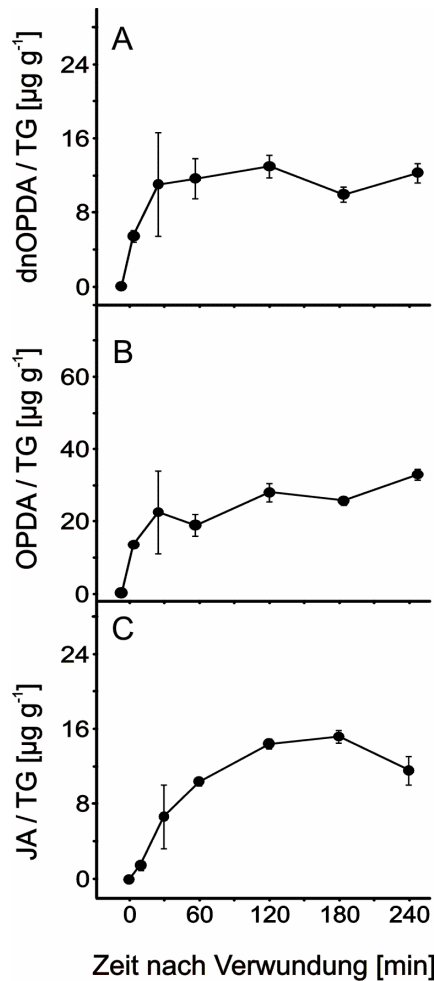


Abbildung III.4: Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung. Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180min sowie 240 min geerntet. (MW±SD, n=3)

2.2 Jasmonatinduktion durch Infektion mit *P.syringae* DC3000

Da Jasmonate nicht nur nach Verwundung, sondern auch nach Infektion mit dem avirulenten Pathogen *P. syringae* stark ansteigen (Grun et al. 2007), wurden Col-0 Pflanzen wie in II.4.3 beschrieben mit *P.syringae* DC3000 infiziert und geerntet. Die Analyse des gewonnenen Pflanzenmaterials bezüglich der Gehalte an OPDA und JA ist in Abb.III.5 zu sehen. Bereits zwei Stunden nach Infektion akkumulierte freier OPDA (Abb.III.5.A) und JA (Abb.III.5.B) in den infiltrierten Blättern stark. Der JA-Vorläufer OPDA wies einen Anstieg auf 17,8 µg/g TG auf, dies entspricht circa dem Einunddreißigfachen des basalen Gehaltes an freier OPDA. Die Analyse der JA-Mengen stellte eine Zweiundfünfzigfache Anreicherung mit 9,1 µg/g TG dar. Wie in Abb.III.5.B klar zu erkennen ist, ist das Maximum der Jasmonsäureakkumulation nach Infektion mit *P.syringae* in den Arabidopsisblättern vier Stunden nach Infiltration

erreicht. Mit 63,3 µg/g TG entspricht der Gehalt an freier JA dem Dreihundertzweiundfünfzigfachen Wert der basalen Jasmonsäurekonzentration. Das Oxylin OPDA (Abb.III.5.A) hingegen akkumuliert zwar auch mit 165 µg/g TG um fast das Dreihundertfache, hat jedoch noch nicht den Maximalwert der Infektionskinetik erreicht. Acht Stunden nach Infektion zeigt sich ein schwacher Abfall des JA-Gehalts, welcher zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von 58,7 µg/g TG in den Blättern aufweist. Zu diesem Zeitpunkt wurden ebenfalls Blattproben analysiert, welche zur Kontrolle mit MgCl₂ infiltriert worden waren. Erkennbar ist, dass es in diesem Pflanzenmaterial nicht zu einer Induktion der Oxyline OPDA und JA gekommen ist. Dies zeigt, dass die dramatische Anreicherung beider Substanzen in infiziertem Blattgewebe durch die Infektion mit dem avirulenten *Pseudomonas*stamm verursacht wurde. Die bereits erwähnte Abnahme der JA-Konzentration ist nach vierundzwanzig sowie achtundvierzig Stunden deutlich in der Kinetik (Abb.III.5.B) zu erkennen. Der OPDA-Gehalt hingegen stieg auch 24 h nach Infektion noch stetig an und erreichte am zweiten Tag nach der *P.syringae*-Infiltration das Maximum mit 368 µg/g TG, dies entsprach dem Sechshundertdreizehnfachen Wert der basalen Konzentration zum Zeitpunkt null Stunden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl OPDA als auch JA bereits zwei Stunden nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 in den Blättern massiv akkumulieren. Die höchste OPDA-Konzentration wurde allerdings erst nach 48 h detektiert, wohingegen die Gehalte an freier JA zu diesem Zeitpunkt bereits wieder abnahmen. Trotzdem lagen die detektierten JA- und OPDA-Spiegel in infizierten Blättern zu jedem untersuchten Zeitpunkt nach der Infektion deutlich über jenen der Kontrollpflanzen.

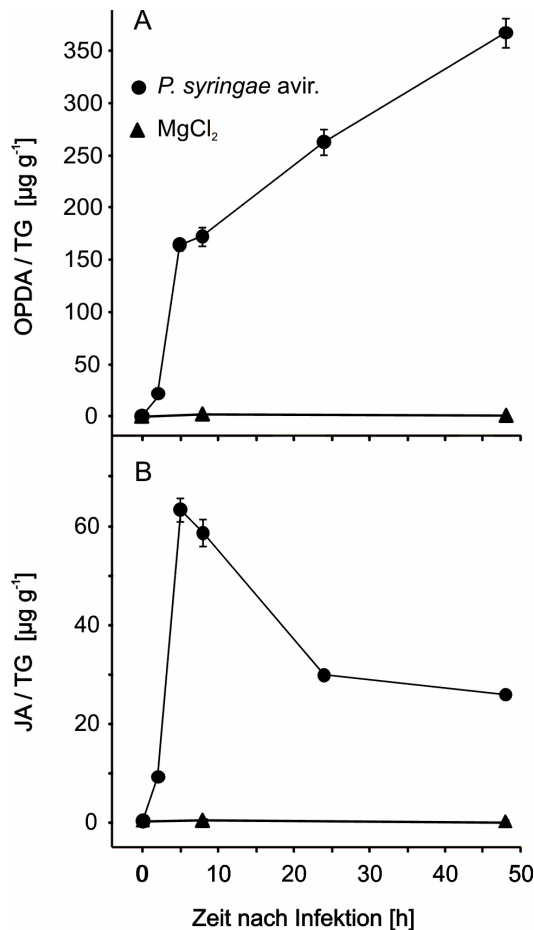


Abbildung III.5: Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen, wie in II.4.3 beschrieben, mit *P.syringae* DC3000 und MgCl_2 infiltriert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 24 h sowie 48 h nach Infiltration wurde das behandelte Blattmaterial geerntet. Datenpunkte, die aus infiziertem Blattmaterial generiert wurden, sind durch „●“ gekennzeichnet. Datenpunkte, die die Oxylipingehalte in Kontrollproben darstellen sind durch „▲“ gekennzeichnet. (MW \pm SD, n=3)

2.3 Jamonatinduktion durch Sorbitolflotierung

Die Induktion der JA-Biosynthese durch Flotierung in einem hyperosmotischen Medium wurde bereits vor einigen Jahren für Gerstenblätter in der Literatur beschrieben (Lehmann et al. 1995, Weichert et al. 2000). Um aufzuklären, ob dieser Stressesstimulus ein geeignetes Testsystem zur Untersuchung chloroplastidärer Lipasemutanten ist, wurden Blätter von den Arabidopsis Wildtyppflanzen Col-0 wie in II.4.4 beschrieben in einer hyperosmotischen wässrigen Sorbitollösung flotiert und zu den in Abb.III.6 dargestellten Zeitpunkten geerntet. Die Analyse der freien Oxylipine OPDA und JA ist im zeitlichen Verlauf in Abb.III.6 gezeigt. Freie JA wies in den ersten drei Stunden der Flotierung keine dramatischen Anstiege in den flotierten Blättern auf (Abb.III.6.B). Lediglich vierundzwanzig Stunden nach Flotierungsbeginn

stiegen die endogenen Jasmonsäuregehalte um das Sechsfache an. Achtundvierzig Stunden später war die Jasmonsäurekonzentration in den flotierten Blättern wieder auf dem Ausgangsniveau von 0,1 $\mu\text{g/g}$ TG. OPDA hingegen akkumulierte mit 7,7 $\mu\text{g/g}$ TG um das Dreifache nach einer Stunde Flotierung, um anschließend drei Stunden nach Flotierungsbeginn unter die basale Konzentration von 2,4 $\mu\text{g/g}$ TG zu fallen (Abb.III.6.A). Bei der Analyse der OPDA-Gehalte zeigte sich analog zu den JA-Spiegeln eine maximale OPDA-Konzentration mit 11,6 $\mu\text{g/g}$ TG zum Zeitpunkt 24 h und ein darauffolgender Abfall zum Zeitpunkt 72 h unter die basale OPDA-Konzentration.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch die Flotierung in einer 500mM wässrigen Sorbitollösung keine vergleichbaren dramatischen Akkumulationen an freien Oxylipinen zu beobachten waren wie bei Verwundung und *P. syringae*-Infektion.

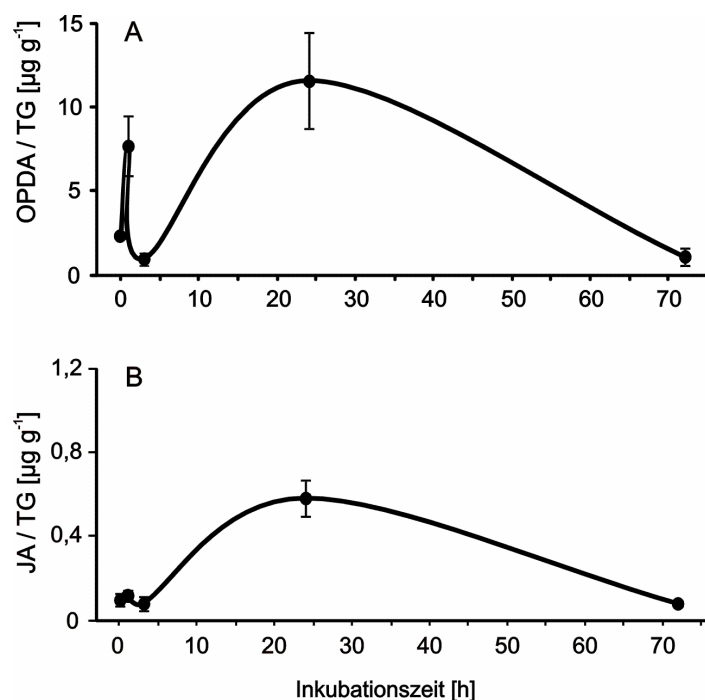


Abbildung III.6 : Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) während der Flotierung in einer 500mM Sorbitol Lösung.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen, wie in II.4.4 beschrieben, in einer 500mM Sorbitol-Lösung flotiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 3 h, 24 h und 72 h wurde das flotierte Blattmaterial geerntet. (MW \pm SD, n=3)

2.4 Jasmonatinduktion durch Applikation von Silbernitrat

Wie 1998 publiziert, soll die Behandlung von Arabidopsis-Pflanzen mit 1 mM Silbernitrat zur Induktion der JA-Biosynthese führen (Bohlmann et al. 1998). Wie in II.4.2 beschrieben wurden Col-0 Keimlinge mit Silbernitrat behandelt und zu den in Abb.III.7 dargestellten Zeitpunkten geerntet. Durch die Zugabe von Silbernitrat kam es bereits nach 30 min zur Akkumulation von JA um das Zweiundzwanzigfache der basalen Konzentration (Abb.III.7.B). Die maximale JA-Menge mit 5 µg/g TG wurde 60 min nach Silbernitratzugabe erreicht. Anschließend fielen die JA-Spiegel der behandelten Keimlinge ab und betragen zum Zeitpunkt 180 min nur noch den zwölffachen Wert des basalen JA-Gehaltes. Der zeitliche Verlauf der Konzentration an freier OPDA nach Silbernitratzugabe wies erst 120 min nach Behandlung ein geringfügiges Maximum mit 14,9 µg/g TG auf (Abb.III.7.A). Dies entsprach einer Zunahme um ein Drittel der basalen OPDA-Konzentration. Ebenso wie bei JA, zeigte sich die OPDA-Akkumulation rückläufig zum Zeitpunkt 180 min nach Silbernitratzugabe und lag sogar unterhalb der analysierten basalen OPDA-Konzentration.

Festzuhalten ist, dass die Zugabe von 1 mM Silbernitrat in Arabidopsis-Keimlingen des Ökotyps Col-0 zwar zu einer starken Zunahme an freier JA 1 h nach Behandlung führte, jedoch keine dramatische Anreicherung an OPDA zu beobachten war.

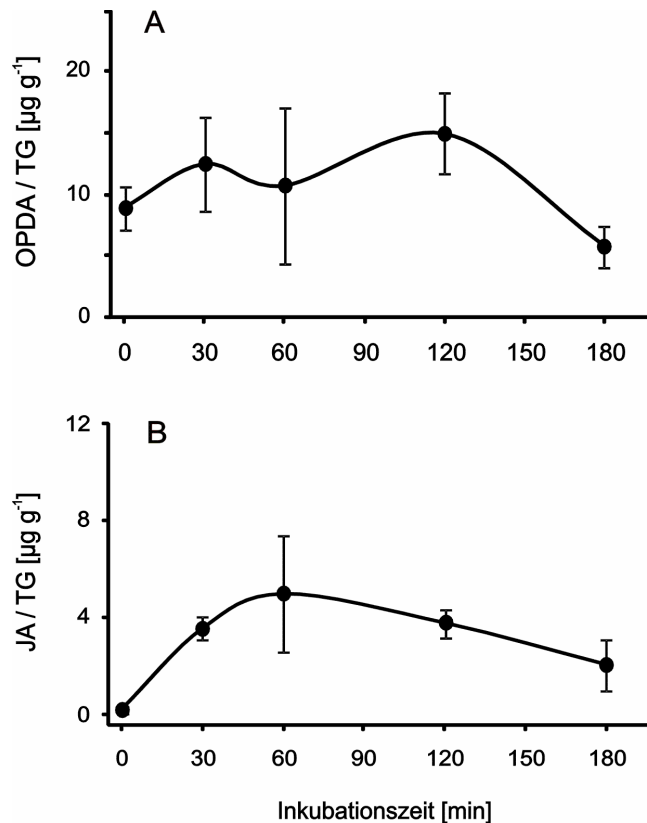


Abbildung III.7 : Bestimmung von freier OPDA (A) und JA (B) nach Behandlung mit 1mM Silbernitrat. Es wurden zehn Tage alte Col-0 Keimlinge, wie in II.4.2 beschrieben, in einer 1 mM Silbernitrat-Lösung inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180min wurden je dreimal drei Keimlinge geerntet. (MW±SD, n=3)

Nach der Auswertung aller Jasmonat-Induktionsexperimente wurde als schnelle und aussagekräftige Methode für die Untersuchung der plastidären Lipasemutanten der Stresstimulus Verwundung gewählt. Es zeigte sich, dass nach Verwundung die drei Oxylipine JA, OPDA sowie dnOPDA bereits 30 min nach Verwundung dramatisch akkumulierten und sich somit definitiv von basalen Konzentrationen unterschieden. Desweiteren wurde die Infektion mit *P. syringae* als zusätzlicher Stresstimulus gewählt, da sich hierbei ebenfalls eine starke und definitive Konzentrationserhöhung von OPDA und JA zeigte. Als Zeitpunkte aller weiteren Untersuchungen wurden für die Verwundung alle Blattproben zu 0 min und 30 min geerntet, und für die *P. syringae*-Infektion 0 h sowie 10 h als Erntezeitpunkte bestimmt.

3. Chloroplastidäre Lipasen

3.1 In-Silico-Analyse

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg wurde eine bioinformatische Recherche nach Lipasen bzw. lipolytischen Enzymen durchgeführt, welche einerseits durch Sequenzhomologien zu α/β -Hydrolasen, Serin-Lipasen sowie GDSL-Lipasen, und andererseits durch die Lokalisation im Chloroplasten charakterisiert sind. Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Dipl. Biol. Alexander Schmid konnten hierbei 21 Lipasen identifiziert werden. Sieben dieser lipolytischen Enzyme gehören zu den PLA der Klasse I. Neben der bereits identifizierten DAD1-Lipase handelte es sich um sechs weitere DAD1-ähnlichen Lipasen (Ishiguro et al. 2001, Ryu 2004). Aus Tabelle III.1 sind alle bioinformatisch identifizierten Lipasen und deren Genannotationen zu entnehmen.

Tabelle III.1: Ergebnis der Datenbankrecherche durch den Lehrstuhl Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

Dargestellt sind die durch Sequenzanalyse mittels Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>), PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), String (<http://www.string.embl.de/>), PPDB (<http://ppdb.tc.cornell.edu/introduction.aspx>) sowie TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) identifizierten Lipasen, deren vorausgesagte Lokalisation in der pflanzlichen Zelle.

Genlocus	Lokalisation	Benennung nach Ryu 2004
At1g05800	Lumen	AtPLA ₁ -I α 1 (DGL)
At1g06800	Stroma	AtPLA ₁ -I γ 1
At1g13610	Stroma	
At1g18360	Stroma	
At1g20130	Stroma	
At1g29120	Stroma	
At1g33270	Lumen	
At1g51440	Stroma	AtPLA ₁ -I γ 3
At1g54570	Stroma	
At1g73480	Transmembran	
At2g30550	Stroma	AtPLA ₁ -I γ 2
At2g31690	Lumen	AtPLA ₁ -I α 2
At2g44810	Chloroplast	AtPLA ₁ -I β 1 (DAD1)
At3g14075	Stroma	
At3g26820	Chloroplast	
At3g61680	Stroma	
At4g16820	Stroma	AtPLA ₁ -I β 2
At5g11650	Transmembran	
At5g14890	Stroma	
At5g23530	Stroma	
At5g43860	Stroma	

3.2 Beteiligung von „DONGLE (DGL)“ und „Defective in Anther Dehiscence1 (DAD1)“ Lipasen an der JA-Biosynthese

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit erschien eine Publikation über die Identifizierung einer Lipase, welche plastidär lokalisiert sein sollte und deren RNAi-Mutante unter basalen Bedingungen keine Jasmonsäure in den Blättern aufwies (Hyun et al. 2008). Ferner wurde beschrieben, dass die Überexpressionsmutanten dieser Lipase drastische erhöhte basale JA-Spiegel besitzen und durch Zwergenwuchs sowie runde Blätter gekennzeichnet sind. Aufgrund dieses Phänotyps wurde diese Lipase DONGLE (DGL) benannt, da dies in der koreanischen Sprache rund bzw. rundlich bedeutet. DGL sollte, nach Angaben der Autoren, zusammen mit DAD1 für die JA-Synthese in den Blättern von *A. thaliana* nach Verwundung verantwortlich sein. Durch Analyse der Jasmonsäuregehalte in den Blättern der Mutanten *dgl-i* und *dad1* nach Verwundung konnte Hyun et al. (2008) zeigen, dass das Enzym DGL für die Generierung sowohl basaler als auch früh wundinduzierter JA essentiell ist und DAD1 die JA-Biosynthese ab dem Zeitpunkt 1 Stunde nach Verwundung reguliert (Abb.III.8). Darüberhinaus konnte mittels in vitro-Versuche gezeigt werden, dass es sich bei DGL um eine Galaktolipase handelt, die wie DAD1 sn_1 -Spezifität besitzt.

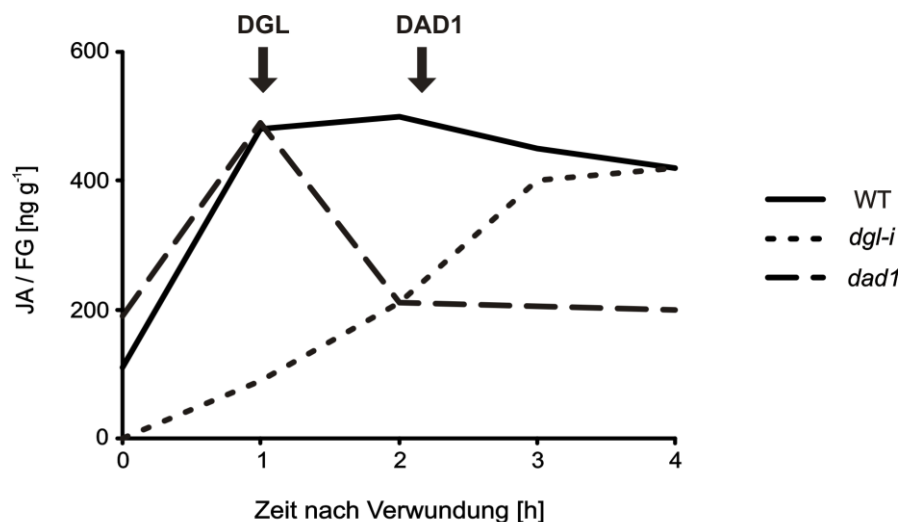


Abbildung III.8: Bestimmung von freier JA nach Verwundung (Hyun et al. 2008).

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der JA-Konzentration in den Blättern von Col-0 (WT), *dgl*-RNAi-Mutanten (*dgl-i*) sowie *dad1*-Mutanten (*dad1*).

Die von Hyun et al. (2008) beschriebene spezifische lipolytische Aktivität von DGL und DAD1 an der sn_1 -Position eines Glycerolipids und die Tatsache, dass dnOPDA

ebenfalls ein JA-Vorläufer ist und auf Grund des prokaryotischen Lipidsyntheseweges immer in sn₂-Position verestert ist, ließen Zweifel an der essentiellen Rolle von DGL als initialem Schlüsselenzym der JA-Biosynthese aufkommen. Aus diesem Grund wurde das Saatgut der publizierten RNAi- sowie Überexpressions-Mutanten von DGL angefordert, um die veröffentlichten Daten zu reproduzieren und durch Analyse der Arabidopside Aufschluss sowohl über deren Biosynthese als auch deren Funktion zu erlangen.

3.2.1 Analyse von „DONGLE (DGL)“ und „Defective in Anther Dehiscence1 (DAD1)“ Lipasen

3.2.1.1 Analyse freier Oxylipine in *dgl-D* und *dgl-i* nach Verwundung

Da von Hyun et al. (2008) beschrieben wurde, dass Überexpressionsmutanten der Lipase PLA₁-l α 1/DGL (At1g05800) basal drastisch erhöhte JA-Konzentrationen in den Blättern aufweisen, sowie die RNAi-Mutanten basal keine JA in den Blättern generieren, wurden Verwundungsexperimente dieser Mutanten durchgeführt, um die publizierten Daten zu überprüfen.

Die Analyse freier Oxylipine in *dgl-D*, der Überexpressionslinie von DGL, ist in Abb.III.9 dargestellt. Es zeigte sich bereits bei der Analyse der basalen Blattproben von Col-0 und *dgl-D*, dass die JA-Gehalte in den Überexpressionsmutanten fast achtzehnfach höher waren als in den zeitgleich verwundeten und analysierten Wildtyp-Pflanzen (Abb.III.9.C). Auch der beschriebene Phänotyp dieser Mutanten konnte reproduziert werden (Abb.III.9.D). Es ist anzunehmen, dass der erhaltene Zwergenwuchs auf die im Vergleich zum WT dramatisch erhöhte JA-Konzentration zurückzuführen ist, da JA einen hemmenden Effekt auf die Mitose aufweist (Zhang and Turner 2008). Zwei Stunden nach Verwundung erreichte die JA-Konzentration der *dgl-D*-Mutanten ihr Maximum mit 58,7 μ g/g TG. Dies entspricht dem sechsfachen Wert der JA-Konzentration in den Blättern der Wildtyp-Pflanzen zu dem entsprechenden Zeitpunkt. Die Kinetik der OPDA-Konzentration in den Blättern von Col-0 und *dgl-D* nach Verwundung wies nahezu identische Kurvenverläufe wie bei JA auf (Abb.III.9.B). Auch hier war nach zwei Stunden eine extreme Akkumulation von OPDA in den Blättern der *dgl-D*-Mutanten zu verzeichnen, welche dem sechsfachen Wert der OPDA-Konzentration in den Blättern der Wildtyp-Pflanzen entsprach. Die Analyse der Konzentration an dnOPDA, dem C₁₆-Analogon von OPDA, zeigte

ebenfalls einen Anstieg nach Verwundung, welcher sich jedoch nicht vom Wildtyp unterschied (Abb.III.9.A). Dies entspricht der von Hyun et al. (2008) publizierte sn_1 -

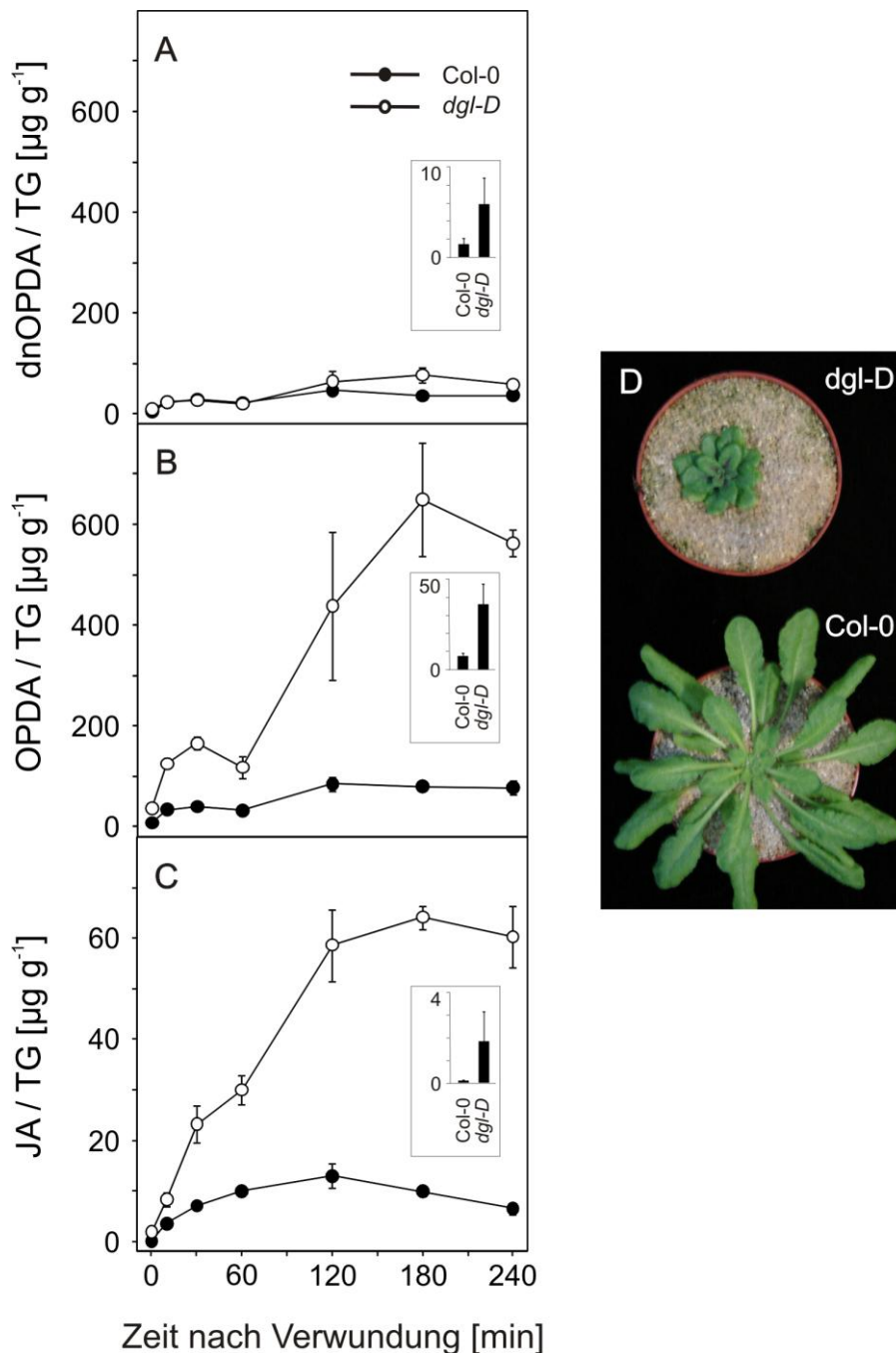


Abbildung III.9: Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Überexpressionslinie *dgl-D*.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 und *dgl-D* Pflanzen (D), wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180min sowie 240 min geerntet. (MW \pm SD, n=3)

Substratspezifität von DGL, welche eine Hydrolyse von dnOPDA und 16:3 aus Galaktolipiden nicht katalysieren kann. Somit kann DGL nicht an der Biosynthese von

dnOPDA beteiligt sein. Da JA ebenfalls aus dnOPDA gebildet werden kann, sollte die JA-Synthese in DGL-knock-out-Mutanten nicht völlig ausgeschaltet sein. Zur Abklärung dieser Hypothese wurde neben der Überexpressionsmutante *dgl-D* auch die RNAi-Mutante *dgl-i* bei den Autoren angefordert und untersucht.

Die Analyse der Gehalte an freien Oxylipinen in den Blättern von *dgl-i* Pflanzen bis zu einer Stunde nach Verwundung ist in Abb.III.10 dargestellt. Die von Hyun et al. (2008) publizierte JA-Defizienz in unverwundeten Blättern der *dgl-i* Mutante und drastisch erniedrigten JA-Konzentrationen in der frühen Verwundungsphase bis zu einer Stunde nach Behandlung (Abb.III.8) konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Die basalen JA-Konzentrationen (Abb.III.10) lagen in den Wildtyp-Pflanzen bei $0,22 \pm 0,02 \mu\text{g/g TG}$ und bei den *dgl-i* Pflanzen bei $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g/g TG}$. Dies bedeutet, dass DGL-RNAi-Mutanten basal circa 65% des Wildtyp-Gehaltes an freier JA in den Blättern aufwiesen. Diese Differenz ist auch bei JA-Konzentrationen in gleichaltrigen Wildtyp-Individuen keine Seltenheit und somit nicht signifikant. Eine halbe Stunde nach Verwundung zeigte die Analyse, dass in beiden getesteten Pflanzenlinien (WT und *dgl-i*) nahezu identische Gehalte an freier JA zu finden waren. Blätter der Mutante *dgl-i* wiesen 91% des Wildtyp-Spiegels an freier JA auf. Auch zu den Zeitpunkten 30 min sowie 60 min nach Verwundung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht die von Hyun et al. (2008) publizierte über 80%ige Reduktion an freier JA in den Blättern von *dgl-i* im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Auch die Gehalte an freier OPDA (Abb.III.10.B) sowie dnOPDA (Abb.III.10.A), welches beide Vorstufen von JA sind, wiesen in der *dgl-i*-Linie und Col-0 vergleichbare Gehalte auf. Zehn bzw. dreißig Minuten nach Verwundung lagen die Konzentrationen von OPDA und dnOPDA sogar über jenen der Wildtyp-Pflanzen. Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Konzentrationen an freier OPDA, dnOPDA und JA in Blättern der Mutante *dgl-i* stehen im klaren Widerspruch zu den publizierten Daten. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weiler/Kubigsteltig des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum war es in der vorliegenden Arbeit möglich, zwei weitere unabhängige DGL-RNAi-Linien (*pla-la1* 7-1 und *pla-la1* 8-1) auf ihre Gehalte an freien Oxylipinen zu untersuchen. Diese RNAi-Linien wurden im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Dipl. Biol. Dorothea Ellinger angefertigt und für meine Analysen zur Verfügung gestellt.

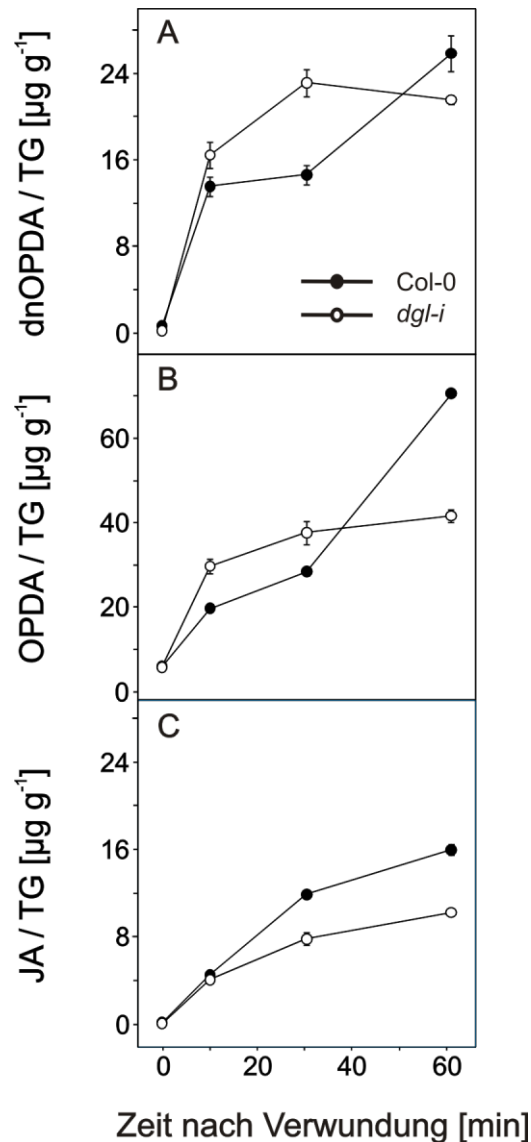


Abbildung III.10: Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der DGL-RNAi-Linie *dgl-i*.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 und *dgl-i* Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min sowie 60 min. (MW \pm SD, n=3)

3.2.1.2 Analyse freier Oxylipine in *pla-la1 7-1* und *pla-la1 8-1* nach Verwundung

Die von Frau Dr. Dipl. Biol. Ellinger zur Verfügung gestellten unabhängigen RNAi-Linien *pla-la1 7-1* und *8-1* wurden mittels Vakuum-Transformation eines Plasmids des AGRİKOLA Konsortiums (Hilson et al. 2004), welches ein genspezifisches RNAi-Konstrukt zur Hemmung des DGL-Transkription aufwies, hergestellt. Als genetischer Hintergrund wurde der Arabidopsis-Ökotyp Col-0 verwendet. Die Analyse der RNAi-Linien *pla-la1 7-1* und *8-1* mittels semiquantitativer Reverser-Transkriptase-PCR zeigte keine *pla-la1* Expression. Darüberhinaus konnte bei der Genexpressionsanalyse der anderen *pla-I* Gene in der RNAi-Linien *pla-la1 8-1*

gezeigt werden, dass der RNAi-Effekt eine spezifische Hemmung auf die DGL-Expression aufweist, da die Transkriptmengen aller anderen *pla-I* Gene nicht reduziert waren (Ellinger et al. 2010). Mittels abschließender quantitativer Reverser-Transkriptase-PCR wurden 24% bzw. 20% der DGL-Transkriptmenge in der RNAi-Linie *pla-la1* 8-1 bzw. in der von Hyun et al. (2008) erhaltenen RNAi-Linie *dgl-i* detektiert, was einen direkten Vergleich der beiden Linien erlaubte.

Wie in Abb.III.11 zu erkennen ist, wiesen auch die Blätter der beiden unabhängigen RNAi-Linien *pla-la1* 7-1 und 8-1 keine dramatischen Differenzen in den Konzentrationen der freien Oxylipine OPDA (Abb.III.11.B), dnOPDA (Abb.III.11.A) und JA (Abb.III.11.C) sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Verwundung im Vergleich zum Wildtyp auf. Der detektierte hundertfache Anstieg der JA-Konzentration (13,59 µg/g TG) eine Stunde nach Verwundung in den Blättern der *pla-la1*-Linien entsprach jener der Wildtyp-Pflanzen. Auch bei der Analyse der beiden Oxylipine OPDA und dnOPDA konnte in der vorliegenden Arbeit keine dramatische Differenz zwischen Col-0 und den *pla-la1*-Linien gezeigt werden. Lediglich eine Stunde nach Verwundung konnten um 35% bzw. 45% reduzierte Wildtypgehalte an dnOPDA und OPDA in den *pla-la1*-Blättern gemessen werden. Diese Differenz kann jedoch in manchen Fällen auch in gleichaltrigen Wildtyp-Individuen detektiert werden und ist somit nicht signifikant.

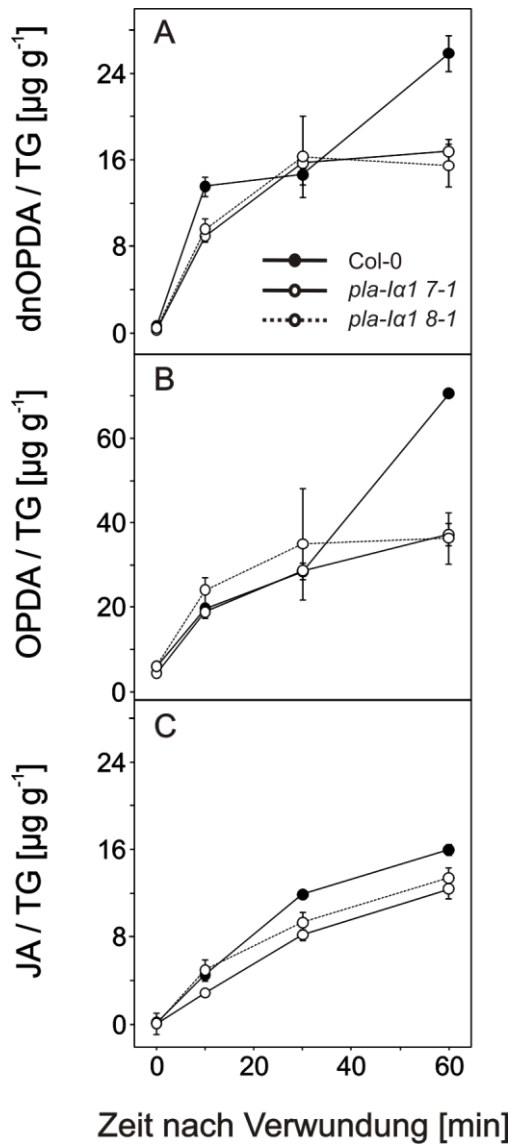


Abbildung III.11: Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der PLA₁-l α 1-RNAi-Linien *pla-la1 7-1* und *8-1*. Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen, *pla-la1 7-1* und *pla-la1 8-1* Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min sowie 60 min geerntet. (MW \pm SD, n=3)

Die in dieser Arbeit untersuchten unabhängigen DGL-RNAi-Linien *dgl-i*, *pla-la1 7-1* und *pla-la1 8-1* wiesen keine dramatischen Differenzen in den Blattgehalten der freien Oxylipine OPDA, dnOPDA sowie JA bis zu einer Stunde nach Verwundung auf und stehen somit im Widerspruch zu der von Hyun et al. (2008) postulierten essentiellen Rolle von DGL (At1g05800) als initiales Schlüsselenzym der basalen sowie frühen wundinduzierten JA-Biosynthese in den Blättern von *A. thaliana*.

3.2.1.3 Lipidomische Analyse freier Oxylipine und Arabidopside in *dad1* nach Verwundung

Da bei Hyun et al. (2008) beschrieben wurde, dass die Lipasen DGL und DAD1 (At2g44810) die JA-Synthese während einer Verwundungsantwort in den Blättern von *A. thaliana* zeitlich regulieren und DAD1 für die Aufrechterhaltung der JA-Konzentration in der späten Verwundungsphase nach einer Stunde verantwortlich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Gehalte der freien Oxylipine sowohl unter basalen Bedingungen als auch in der frühen sowie späten Verwundungsphase analysiert. Wie in Abb.III.12.C zu sehen, entsprach der zeitliche Verlauf der JA-Konzentrationen in der *dad1*-Mutante der von Hyun et al. (2008) publizierten Kinetik (Abb.III.8). In den ersten 60 Minuten nach Verwundung wiesen die *dad1*-Pflanzen mit Abweichungen von 1-5% wildtypidentische JA-Gehalte auf. Nach vier Stunden konnte nur noch eine JA-Akkumulation von 36% des Wildtypgehaltes in den DAD1-Knock-out-Mutanten verzeichnet werden. Dieses Ergebnis entsprach der in Hyun et al. 2008 postulierten Rolle von DAD1 in der späten Verwundungsphase. Die ebenfalls analysierten Konzentrationen an dnOPDA (Abb.III.12.A) sowie OPDA (Abb.III.12.B) in *dad1* zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie JA. So entsprachen in der frühen Verwundungsphase die OPDA- und dnOPDA-Konzentrationen in etwa jenen von Col-0. Ab einer Stunde nach Verwundung waren jedoch deutlich erniedrigte Spiegel beider Oxylipine zu verzeichnen. Nach vier Stunden konnte nur noch eine Konzentration von 11,05 µg/g TG an OPDA und von 4,01 µg/g TG an dnOPDA detektiert werden. Dies entsprach 34% bzw. 33% der Wildtypkonzentrationen an OPDA bzw. dnOPDA. Die in Abb.III.12.A dargestellte niedrige Konzentration an freier dnOPDA zu späten Verwundungszeitpunkten war auf Grund der bereits publizierten sn_1 -Spezifität der DAD1-Lipase (Hyun et al. 2008, Ishiguro et al. 2001) überraschend. Aufgrund der sn_1 Substratspezifität kann DAD1, ebenso wie DGL, nicht direkt an der Freisetzung von 16:3 oder dnOPDA aus Galaktolipiden verantwortlich sein. Die knock-out bzw. RNAi Mutanten sollten sich deshalb bezüglich der Akkumulation von dnOPDA wie Wildtyppflanzen verhalten. Aus diesem Grund ist DAD1 möglicherweise nicht direkt in der JA-Biosynthese involviert sondern moduliert die JA-Biosynthese indirekt.

Um die Substratspezifität von DAD1 *in vivo* zu untersuchen, wurden die Gehalte aller Galaktolipide einschließlich der Arabidopside in Col-0 Pflanzen und *dad1*-Mutanten sowohl unter basalen Bedingungen als auch zwei Stunden nach Verwundung

analysiert. Der Erntezeitpunkt zwei Stunden nach Verwundung wurde ausgewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt dramatisch niedrigere Gehalte an freien Oxylipinen (Abb.III.12) in den *dad1*-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigten. Bezüglich der Konzentrationen an Galaktolipiden, die nicht-oxidierte Fettsäuren gebunden haben, konnte keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und *dad1*-Mutanten sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Verwundung festgestellt werden (Abb.III.12.C und D). Die Analyse der Arabidopside jedoch zeigte Differenzen zwischen Col-0 und *dad1*.

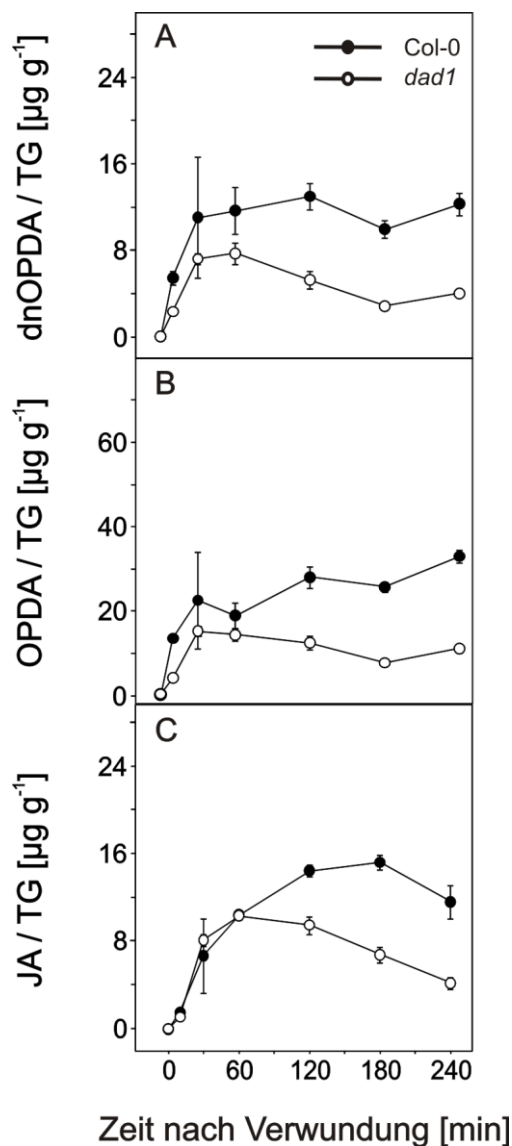


Abbildung III.12: Bestimmung von freier dnOPDA (A), OPDA (B) und JA (C) nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Knock-out-Mutante *dad1* (Ishiguro et al. 2001).

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen und *dad1* Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min sowie 240 min geerntet. (MW \pm SD, n=3)

Wie in Abb.III.12.1.A zu sehen ist, wiesen die Gehalte einiger Arabidopside in Blättern von *dad1* bereits unter basalen Bedingungen deutliche Unterschiede zum Wildtyp auf. So konnte in unverwundeten *dad1*-Blättern ein siebenfacher Gehalt an 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG sowie ein fünffacher Gehalt an OPDA-dnOPDA-MGDG im Gegensatz zu Col-0 detektiert werden. Die Analyse der komplexen Galaktolipide in den *dad1*-Mutanten zwei Stunden nach Verwundung zeigte, dass die Gehalte der Lipide 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG, OPDA-16:3-MGDG, OPDA-OPDA-MGDG, OPDA-dnOPDA-MGDG, OPDA-16:3-DGDG sowie OPDA-OPDA-DGDG im Vergleich zum Wildtyp zwischen fünf- und neunfach erhöht waren.

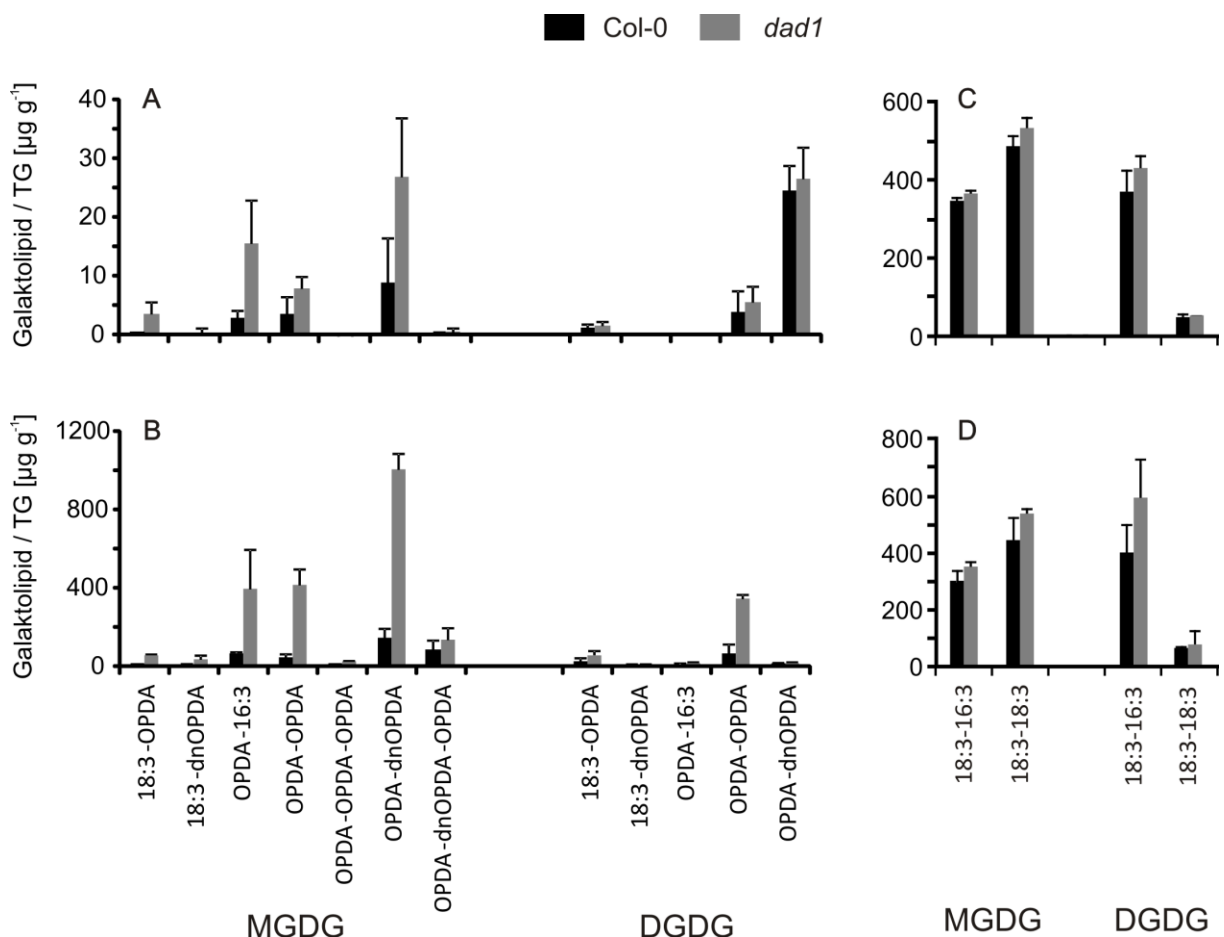


Abbildung III.12.1: Bestimmung von Arabidopsiden und den abundantesten Galaktolipiden nach Verwundung in Blättern von Col-0 und der Knock-out-Mutante *dad1* (Ishiguro et al. 2001). Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen und *dad1* Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0min (A, C) und 120min (B, D) geerntet. (MW±SD, n=3)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Pflanzen, welche DAD1 defizient waren, im Vergleich zum Wildtyp zu späten Verwundungszeitpunkten (ab zwei Stunden nach Verwundung) dramatisch niedrigere Konzentrationen an den freien Oxylipinen dnOPDA, OPDA sowie JA in den verwundeten Blättern aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Hyun et al. (2008) beschriebenen Daten überein. Jedoch war erniedrigte dnOPDA-Gehalte im Vergleich zum Wildtyp nicht erwartet worden, da laut Literatur DAD1 eine sn_1 -Spezifität aufweist (Hyun et al. 2008, Ishiguro et al. 2001, Seo Y. S. et al. 2009) und dnOPDA ein C_{16} -Fettsäure-Metabolit ist, welcher seinen Ursprung in prokaryotisch synthetisierten Fettsäuren hat und damit nur in sn_2 -Position vorliegen kann. Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DAD1 möglicherweise lipolytische Aktivität gegenüber Galaktolipiden besitzt, die die Oxylipine dnOPDA und OPDA verestert vorliegen haben. Die analysierten Knock-out-Mutanten *dad1* wiesen zwei Stunden nach Verwundung dramatische Anreicherungen an verschiedenen Arabidopsiden im Gegensatz zum Wildtyp auf. Möglicherweise dienen, wie in der Literatur vermutet, Arabidopside als Speicher der Oxylipine dnOPDA sowie OPDA, welche nach Verwundung mittels DAD1 möglicherweise freigesetzt werden.

3.2.1.4 Quantitative Genexpressionsanalyse von DGL und DAD1 nach Verwundung

Um die Expression der DGL- und DAD1-codierenden Gene At1g05800 bzw. At2g44810 während der Verwundungsantwort in Blättern zu untersuchen, wurden sechs Wochen alte Col-0 Pflanzen verwundet und zu verschiedenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet. Nach RNA-Isolierung und reverser Transkription in cDNA erfolgte die quantitative Analyse der DGL- sowie DAD1-Expression mittels PCR. In Abb.III.13 sind die Expressionslevel beider Gene dargestellt. Die durchgeführte quantitative RT-PCR zeigte, dass die relative Expression beider Lipasegene in den Blättern von *A. thaliana* nahe der Detektionsgrenze lag, sowohl unter basalen als auch unter wundinduzierten Bedingungen. Beide Gene werden in Blättern praktisch nicht exprimiert, was insbesondere im Vergleich mit der Expression anderer JA-Biosynthesegene deutlich wird. So konnten in nicht verwundeten Col-0-Blättern lediglich 0,174 DGL-Transkripte pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte und 0,423 DAD1-Transkripte pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte detektiert werden. Eine Stunde nach Verwundung erfolgte ein Anstieg in den Transkriptmengen beider Gene. Die

quantitative Analyse ergab, dass eine Stunde nach Verwundung 5,2 DGL-Transkripte pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte und 554 DAD1-Transkripte pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte in den Blättern vorlag. Die Akkumulation der DGL- und DAD1-Transkripte sechzig Minuten nach Verwundung entsprach zwar qualitativ dem zeitlichen Verlauf der von Hyun et al. (2008) publizierten Genexpressionsanalyse, jedoch war die Genexpression beider Gene in den Blättern von *A. thaliana* sehr gering. Auf Grund dessen wurde eine vergleichende Analyse der DGL-Expression in Col-0 und *dgl-i*-Blättern nach Verwundung durchgeführt (Abb.III.14)

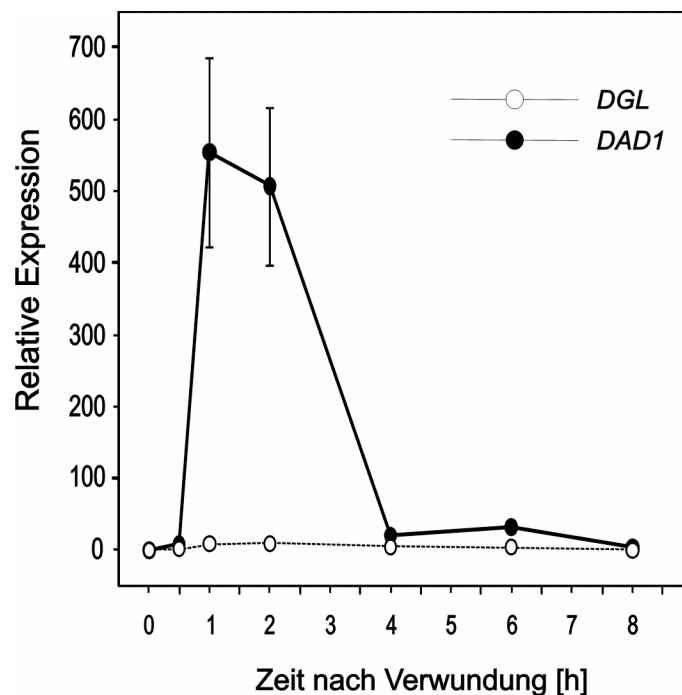


Abbildung III.13: Genexpressionsanalyse von DGL und DAD1 mittels quantitativer Realtime PCR nach Verwundung.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen, wie in II.4.1 und II.7.14 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h sowie 8h geerntet. Dargestellt ist die relative Expression pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte. (MW \pm SD, n=3)

Es zeigte sich hierbei, dass die *dgl-i*-Linie basal eine DGL-Transkriptmenge von 0,33 Transkripten pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte aufwies, was einer über 20 fachen Reduktion gegenüber der Wildtypexpression entsprach. Diese erniedrigte Expression von DGL in den Blättern von *dgl-i* wurde während der gesamten frühen Verwundungsphase detektiert. Dies Ergebnis entsprach der von Hyun et al. (2008) publizierten Expressionsanalyse, wenngleich in dieser Arbeit detektierten Transkriptmengen in den Wildtyp-Pflanzen um ein Vielfaches geringer waren. Die

sehr geringen DGL-Transkriptmengen sind möglicherweise auf Unterschiede in den Anzuchtsbedingungen der Pflanzen zurückzuführen. Da bei beiden quantitativen Expressionsanalysen (Abb.III.13 und Abb.III.14) sowohl in den Wasserkontrollen keine DGL-Transkripte gemessen werden konnten als auch die Schmelzkurvenanalyse keine Auffälligkeiten aufwies, ist von einer exakten Bestimmung der DGL-Transkriptmengen auszugehen. Die sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Verwundung detektierte niedrige DGL-Expression in Wildtyp-Pflanzen lassen somit keine Beteiligung von DGL an der JA-Biosynthese unter basalen Bedingungen und nach Verwundung vermuten. Vorallem im Vergleich mit den Expressionsdaten der Lipase DAD1 (Abb.III.13), für welche eine Beteiligung an der JA-Synthese nach Verwundung zeigt werden konnte (Abb.III.12.C), ist eine Beteiligung von DGL an der JA-Biosynthese sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Verwundung auszuschließen.

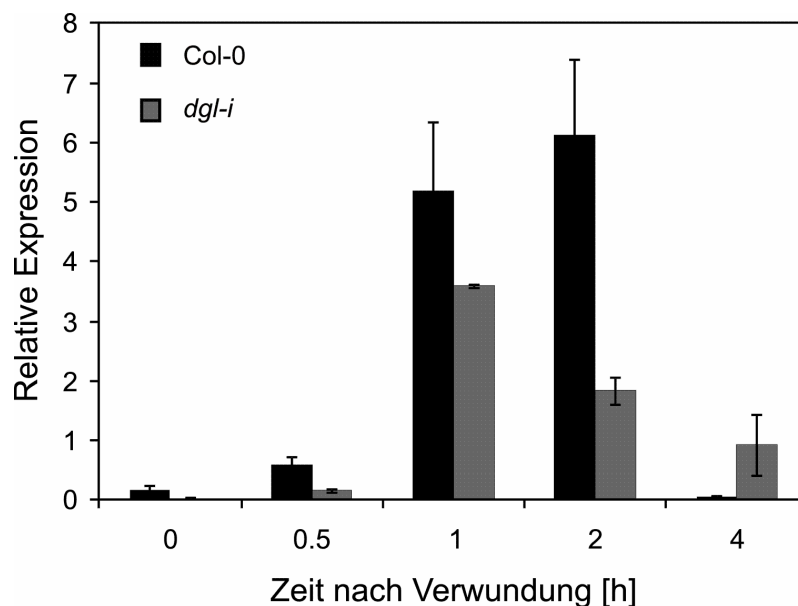


Abbildung III.14: Genexpressionsanalyse von DGL in Col-0 und *dgl-i* Pflanzen mittels quantitativer Realtime PCR nach Verwundung. Die absolut gemessenen Transkriptmengen sind zu jedem Zeitpunkt äusserst gering.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0 und *dgl-i* Pflanzen, wie in II.4.1 und II.7.14 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 h, 0.5h, 1h, 2h sowie 4h geerntet. Dargestellt ist die relative Expression pro 10^5 Actin 2/8 Transkripte. (MW \pm SD, n=3)

3.3.1.5 Lipidomische Analyse von *pla-la1* 7-1, *pla-la1* 8-1 und *dad1* nach *P. syringae* DC3000-Infektion

Verwundung mittels einer Pinzette führt zu starker Blatt- und somit auch Zellverletzung, was einen unspezifischen hydrolytischen Abbau von komplexen

Strukturlipiden zur Folge haben kann. Dadurch könnte möglicherweise ein Substrat-Enzym-Kontakt entstehen, der eine Freisetzung von Fettsäuren aus zerstörten Organellen begünstigt, welcher bei intakter Zellarchitektur bzw. Kompartimentierung nicht möglich gewesen wäre. Folglich könnten freigesetzte extraplastidäre Fettsäuren als Substratquelle der JA-Biosynthese dienen. Um die JA Biosynthese in Blättern mit intakter Zellstruktur zu untersuchen, wurden Blätter von PLA_1 - $la1$ -RNAi-Linien sowie $dad1$ -Mutanten nach einer *P. syringae* DC3000-Infektion in Bezug auf ihre Gehalte an freien Oxylipinen mit dem Wildtyp Col-0 verglichen.

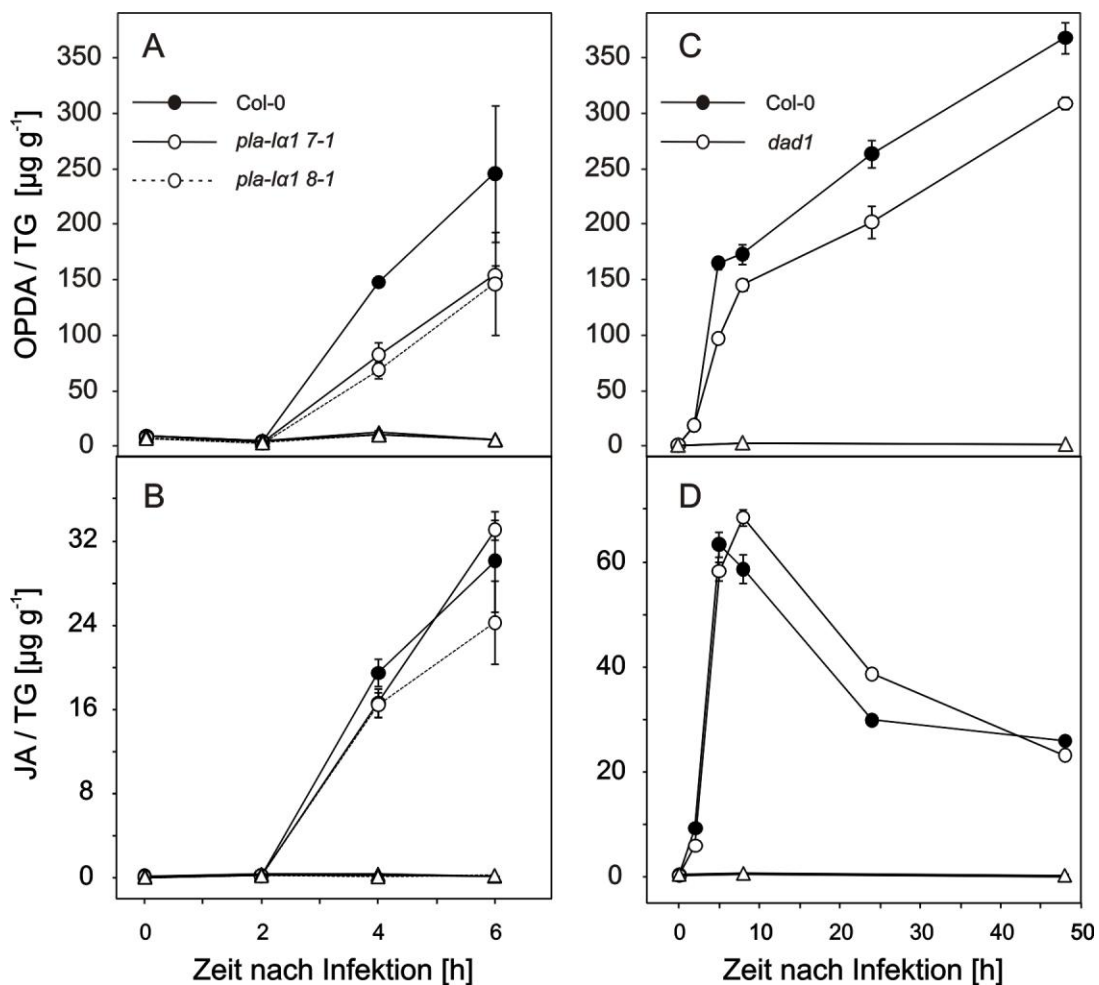


Abbildung III.15: Bestimmung von freier OPDA und JA in Col-0, $dad1$, PLA_1 - $la1$ -RNAi-Linien $pla-la1$ 7-1 sowie 8-1 nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0, $dad1$, $pla-la1$ 7-1 sowie $pla-la1$ 8-1 Pflanzen, wie in II.4.3 beschrieben, mit *P.syringae* DC3000 und $MgCl_2$ infiltriert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 24 h sowie 48 h nach Infiltration wurde das behandelte Blattmaterial geerntet. Datenpunkte, die aus infiziertem Blattmaterial generiert wurden, sind durch Kreise gekennzeichnet. Datenpunkte, die die Oxylipingehalte in Kontrollproben darstellen sind durch Dreiecke gekennzeichnet. (MW \pm SD, n=3)

Die Analyse der freien JA-Gehalte in den Blättern von *pla-la1* 7-1 sowie von *pla-la1* 8-1 nach Infektion zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu den zeitabhängigen JA-Konzentrationen nach Infektion in Col-0 Blättern (Abb.III.15.B). Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Behandlung mit *P. syringae* DC3000 konnten mit dem Wildtyp vergleichbare JA-Konzentration detektiert werden. Die Untersuchung der OPDA-Gehalte beider DGL-RNAi-Linien im Vergleich zu Col-0 zeigte ebenfalls keine Reduktion, sowohl unter basalen Bedingungen als auch zwei Stunden nach Behandlung (Abb.III.15.A). Zu den Zeitpunkten vier und sechs Stunden nach Infiltration von *P. syringae* DC3000 wiesen beide Linien um 44% bzw. 37% niedrigere Gehalte an freier OPDA im Vergleich zum Wildtyp auf. Derartige Konzentrationsunterschiede sind jedoch auch bei Wildtyp-Pflanzen als individuelle Varianz bekannt und somit nicht signifikant.

Wie in Abb.III.15.D ersichtlich, wiesen die *dad1*-Mutante ebenso wie die DGL-RNAi-Linien über den gesamten Zeitraum der *P. syringae* DC3000-Kinetik einen nahezu mit dem Wildtyp identischen Konzentrationsverlauf an freier JA auf. Gleiches galt für die OPDA-Konzentrationen (Abb.III.15.C). Unter basalen Bedingungen und zwei Stunden nach Behandlung wiesen die *dad1*-Pflanzen mit dem Wildtyp vergleichbare OPDA-Mengen auf. Lediglich fünf Stunden nach Infektion konnte um 41% niedrigere Gehalte an freier OPDA im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Zu den späteren Zeitpunkten der Infektionskinetik wiesen die *dad1*-Mutanten bereits wieder durchschnittlich 84% der wildtypischen OPDA-Konzentration auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit kein dramatischer Effekte auf die Akkumulationen von dnOPDA, OPDA und JA nach Verwundung sowie Pathogeninfektion mit *P. syringae* DC3000 (*avrRpm1*) in den drei unabhängigen RNAi-Linien *dgl-i*, *pla-la1* 7-1 sowie *pla-la1* 8-1 detektiert werden konnten. Gleiches gilt für den Gendefekt in dem für DAD1 codierenden Gen At2g44810 nach Pathogeninfiltration. Dies steht in klarem Widerspruch zu dem von Hyun et al. (2008) veröffentlichten Postulat, dass ausschließlich DGL und DAD1 für die JA-Biosynthese in Blättern von *A. thaliana* verantwortlich sind. Die von Hyun et al. 2008 postulierte DAD1-Beteiligung an der JA-Biosynthese innerhalb der späten Verwundungsphase in den Blättern von *A. thaliana* hingegen konnte bestätigt werden.

Da weder für DGL noch DAD1 eine essentielle Funktion innerhalb der JA-Biosynthese in Blättern von *A. thaliana* gezeigt werden konnte, wurde eine vergleichende Oxylipin-Analyse weiterer plastidär lokalisierter Lipase-Einzelmutanten unter basalen Bedingungen sowie nach Verwundung und Pathogeninfektion durchgeführt.

3.3 Analyse weiterer plastidär lokalisierter Lipasen

Wie bereits in der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit unter I.4.1 beschrieben, sollten Einzelmутanten von 21 putativ im Chloroplasten lokalisierte Lipasen bzgl. ihrer Gehalte an den freien Oxylipinen OPDA und JA in Blättern unter basalen Bedingungen sowie nach Verwundung untersucht werden, um durch vergleichende Analyse mit Wildtyp-Pflanzen das initiale lipolytische Enzym der JA-Biosynthese zu identifizieren. Hierfür wurden T-DNA-Insertionsmutanten des Nottingham Stockcenters verwendet. Die bestellten Mutanten wurden in segregierendem Zustand geliefert. Nach der ersten Aussaat wurden mittels molekularbiologischer Analyse die homozygoten Individuen selektiert und deren Nachkommenschaft für die Analyse von OPDA und JA genutzt. Auch die zur Oxylipin-Analyse verwendeten Nachkommen von homozygoten Elternpflanzen wurden stets erneut auf Reinerbigkeit geprüft.

3.3.1 Molekularbiologische Analyse auf Homozygotie

Die molekularbiologische Analyse auf Reinerbigkeit der bestellten T-DNA-Insertionsmutanten erfolgte unter Zuhilfenahme von Primern der jeweiligen Insertionslinien sowie einem sogenannten Insertionsprimer (Insert.P). Die Sequenzen der Primer konnten unter dem Internet-Link „<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>“ ermittelt werden und die Oligonukleotide bei „www.tib-molbiol.de“ bestellt werden.

Zu Beginn wurden die erhaltenen Primerpaare (LP und RP) der jeweiligen Mutanten mittels PCR, welche einen Gradienten der Annealingtemperatur von 50°C bis 65°C beinhaltet, auf die optimale Anlagerungstemperatur überprüft. Hierzu wurde DNA von Col-0 Pflanzen verwendet. Die erhaltenen Amplifikate der intakten Lipase codierenden Gene betragen zwischen 1000 und 1100 Basen-paaren. Die optimalen Annealingtemperaturen der jeweiligen T-DNA-Insertionslinien-Primer sind Tabelle II.3 zu entnehmen.

Zur Analyse auf Homozygotie bzgl. einer T-DNA-Insertion wurden zwei PCR-Ansätze mit der isolierten DNA der Insertionslinien sowie von Col-0 als Kontrolle durchgeführt. Die erste Reaktion erfolgte unter Verwendung der Primer LP und RP der zu untersuchenden Insertionslinie. *A.thaliana* Col-0 Proben, welche als Kontrolle eingesetzt wurden, da diese Pflanzen keine T-DNA-Insertion im Genom inkorporiert haben, ergaben stets ein Amplifikat von 1000 bis 1100 bp. Heterozygote Individuen, welche nur in einem Allel des entsprechenden Lipase-Gens die T-DNA-Insertion trugen, wiesen ebenfalls ein entsprechendes Amplifikat auf. Bei homozygoten Pflanzen führte die PCR zu keinem Amplifikat, da das zu amplifizierende Genomstück, welches zusätzlich die T-DNA-Insertion beinhaltete, unter den verwendeten PCR-Bedingungen auf Grund seiner Größe nicht amplifizierbar war. Mit diesen putativ homozygoten Pflanzen wurde eine weitere PCR durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide waren der RP-Primer des zu untersuchenden Lipasegens sowie der Insertionsprimer, welcher an der T-DNA-Insertion bindet. Bei homozygoten Individuen wurde ein Produkt von circa 400 bp amplifiziert. Die DNA der Kontrollpflanzen ergab folglich auf Grund der fehlenden Insertion niemals ein Amplifikat. Die Annealingtemperatur der Primerkombination RP-Primer und Insertionsprimer lag stets zwischen 60°C und 62°C. In Abb.III 16 sind die Primerbindungsstellen der Primer LP und RP im Genom sowie des Insertionsprimers (Insert.P) innerhalb der T-DNA-Insertion schematisch dargestellt. Ein Beispiel der gelelektrophoretischen Dokumentation des Homozygotienachweises ist in Abb.III.17 gezeigt.

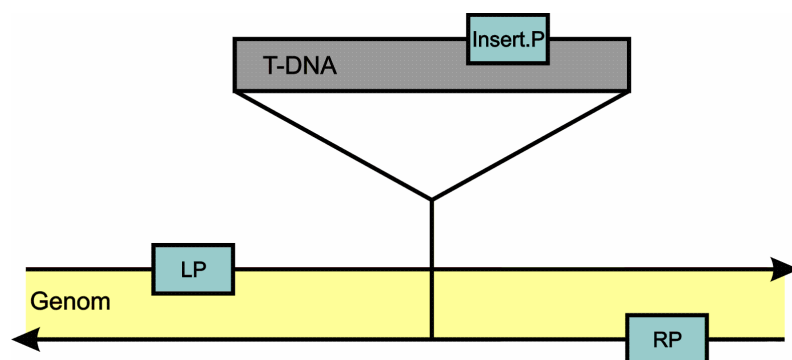


Abbildung III.16: Schema der Primerbindungsstellen im Genom und der T-DNA-Insertion zum Homozygotienachweis von T-DNA-Insertionsmutanten des Nottingham Stockcenters. Gezeigt sind Antisense- und Senseprimerbindungsstellen (LP und RP) zum Nachweis eines Wildtypgens sowie die Bindungsstelle des Insertionsprimer (Insert.P) zum Nachweis einer T-DNA-Insertion in einem Gen. Darstellung aus <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> entnommen und modifiziert.

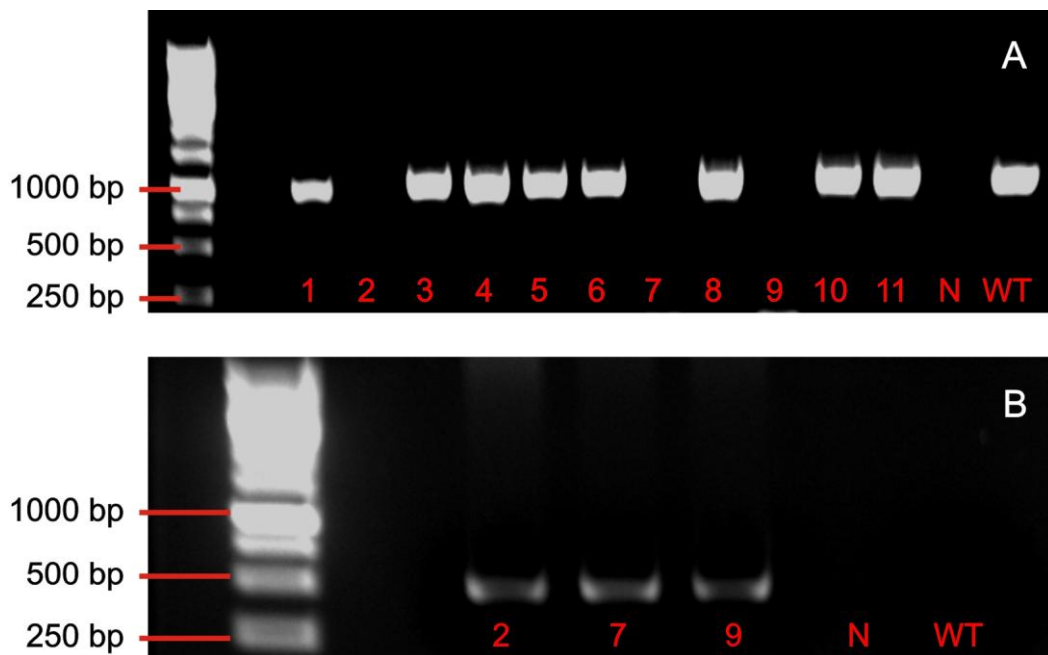


Abbildung III.17: Nachweis der Homozygotie am Beispiel der T-DNA-Insertionsmutante SAIL_716_F08 (At5g11650).

Dargestellt ist die Geldokumentation der Überprüfung auf Homozygotie bzgl. der T-DNA-Insertion mittels der Primer LP und RP (A). Pflanze 2, 7, 9 und die Negativkontrolle ergaben kein Amplifikat. Durch PCR-Analyse unter Verwendung der Primerkombination RP und Insertionsprimer konnte für alle drei Pflanzen die T-DNA-Insertion homozygot nachgewiesen werden (B). (N=Negativkontrolle, WT=Wildtyp)

Durch die beschriebene molekularbiologische Analyse auf Reinerbigkeit konnten 13 putative chloroplastidär lokalisierte Lipasemutanten selektiert werden, welche homozygot bzgl. der T-DNA-Insertion im entsprechenden Gen sind. Die Genloci dieser homozygoten Mutanten sind in Tab.III.2 aufgelistet. Bei drei der verbleibenden acht putativen Lipasen konnte kein Saatgut der SAIL- bzw. SALK-Linien erhalten werden (At1g29120) oder es konnten keine homozygoten Individuen generiert werden (At1g20130, At5g23530). Mutanten für die bereits publizierten Lipasen At2g31690 (Padham et al. 2007) und At2g44810 (Ishiguro et al. 2001) konnten von den Autoren erhalten werden. Die Untersuchung von Einzelmutanten der Lipase codierenden Gene At1g06800, At1g05800 sowie At4g16820 wurde durch Kooperation mit Frau Dr. Dipl. Biol. Dorothea Ellinger der Arbeitsgruppe Weiler/Kubigsteltig des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum ermöglicht.

Tabelle III.2: Ergebnis der molekularbiologische Analyse auf Reinerbigkeit.

Aufgelistet sind die Genloci der Lipase codierenden Gene, welche als homozygote T-DNA-Insertionsmutanten in der vorliegenden Arbeit selektiert werden konnten und zur vergleichenden Analyse der Oxylipine OPDA sowie JA verwendet wurden.

<u>Genlocus</u>	<u>Benennung nach Ryu 2004</u>
-----------------	--------------------------------

At1g13610	
At1g18360	
At1g33270	
At1g51440	<i>AtPLA₁-ly3</i>
At1g54570	
At1g73480	
At2g30550	<i>AtPLA₁-ly2</i>
At3g14075	
At3g26820	
At3g61680	
At5g11650	
At5g14890	
At5g43860	

3.3.2 Lipidomische Analyse nach Verwundung

Wie bereits in 3.3.1 erwähnt, konnten nur 18 der 21 durch In-Silico-Analyse identifizierten putativen chloroplastidären Lipasen zur Bestimmung der OPDA- sowie JA-Gehalte in Blättern unter basalen Bedingungen und nach Verwundung untersucht werden. Alle 18 Lipasemutanten zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Auch die Blütenbildung und Samengenerierung wies bei 17 Mutanten keinen Unterschied zu Wildtyp-Pflanzen auf. Lediglich die Mutante des lipolytische Enzym *AtPLA₁-β1* (At2g44810), welches bereits als DAD1 publiziert wurde, zeigte den beschriebenen männlichen-sterilen Phänotyp.

Die prozentualen Gehalte an freier OPDA und JA in den verschiedenen Lipasemutanten und der Vierfachmutante *c1x11 (pla-β2/pla-ly1/pla-ly2/pla-ly3*, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Dipl. Biol. Dorothea Ellinger) im Vergleich zum Wildtyp Col-0 sind in Abb.III.18 bzw. Abb.III.19 dargestellt. Die basalen Konzentrationen von OPDA in Blättern von sechs Wochen alten Col-0 Pflanzen lag bei 5,9 µg/g TG (100%). Eine halbe Stunde nach Verwundung konnte ein durchschnittlicher Anstieg der OPDA-Konzentration auf einen Wert von 28,5 µg/g TG (100%) in den verwundeten Blättern detektiert werden. Wie in Abb.III.18.A zu erkennen ist, variierten die Gehalte der freien OPDA unter basalen Bedingungen von 6% des Wildtypgehaltes (At3g14075) bis 117,2% des Wildtypgehaltes (At1g33270) in den getesteten Lipasemutanten stark. Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied

zum Wildtyp nur bei den Mutanten *pla-ly3* (At1g51440) und *c1x11* mit einem p-Wert von 0,01 festgestellt werden. Die Analyse der OPDA-Konzentrationen 30 min nach Verwundung (Abb.III.18.B) zeigte ebenfalls eine weite Streuung (40-225%) der prozentualen OPDA-Gehalte im Vergleich zu Col-0. Die geringste und mit einem p-Wert von 0,01 signifikanteste OPDA-Akkumulation mit 39,7% des Wildtypgehaltes wies die Mutante *pla-ly1* (At1g06800) auf. Die Vierfachmutante *c1x11* zeigte mit 47,7% im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls einen signifikant niedrigeren OPDA-Gehalt ($p=0,05$).

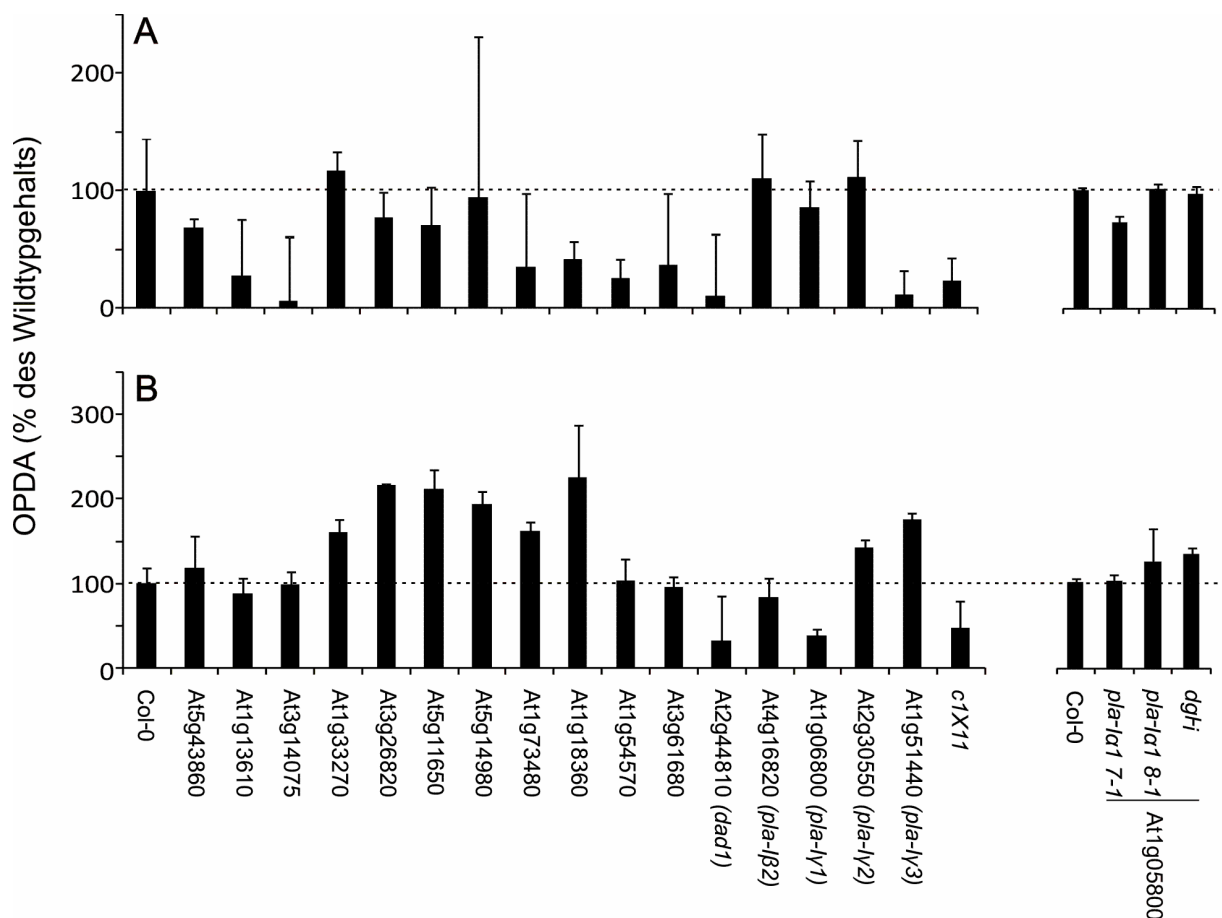


Abbildung III.18: Vergleich der OPDA- Gehalte von Lipasemutanten nach Verwundung.

Dargestellt sind die relativen OPDA-Gehalte in Rosettenblättern von Col-0, putativ chloroplastidär lokalisierten Lipasemutanten und einer Vierfachmutante unter basalen Bedingungen (A) und 30 min nach Verwundung (B). (MW±SD, n=3)

Die Analyse der prozentualen Mengen an freier JA in den Blättern der sechs Wochen alten Lipasemutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 unter basalen Bedingungen (Abb.III.19.A) und 30 min nach Verwundung (Abb.III.19.B) zeigte (wie die OPDA-Gehalte) eine weite Streuung. Die geringsten basalen JA-Gehalte konnten in der Mutante *dad1* (At2g44810) mit 22% des Wildtypgehaltes detektiert werden. Der

höchste gemessene basale JA-Wert im Vergleich zu Col-0 lag bei 220% (At1g13610). Eine halbe Stunde nach Verwundung wiesen alle getesteten Mutanten eine JA-Akkumulation auf, wobei die Lipasemutanten *pla-β2* und *pla-γ1* eine geringere JA-Akkumulation (31% bzw. 42%) im Vergleich zum Wildtyp zeigten. PLA₁-β2 (At4g16820) und PLA₁-γ1 (At1g06800) gehören der 2004 von Ryu auf Grund von starken Sequenzhomologien zusammengefassten Klasse der PLA₁-Lipasen an. Neben PLA₁-β2 und PLA₁-γ1 zählen zu dieser Klasse noch PLA₁-α1 (At1g05800, DONGLE), PLA₁-α2 (At2g31690, Triacylglycerollipase (Padham et al. 2007)), PLA₁-β1 (At2g44810, DAD1), PLA₁-γ2 (At2g30550) und PLA₁-γ3 (At1g51440).

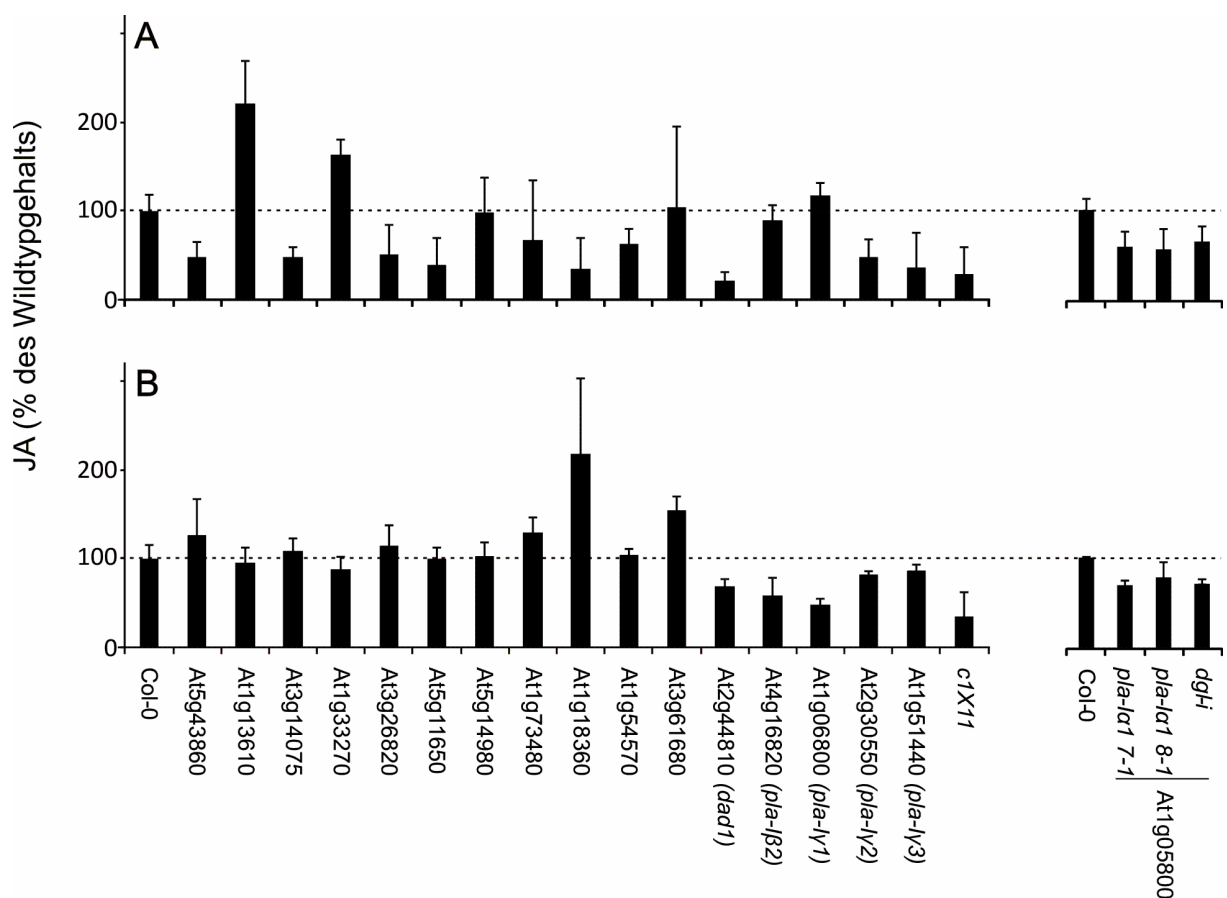


Abbildung III.19: Vergleich der JA-Gehalte von Lipasemutanten nach Verwundung.

Dargestellt sind die relativen JA-Gehalte in Rosettenblättern von Col-0, putativ chloroplastidär lokalisierten Lipasemutanten und einer Vierfachmutante unter basalen Bedingungen (A) und 30 min nach Verwundung (B). (MW±SD, n=3)

Wie in Abb.III.19 zu sehen, wiesen die Mutanten der Lipasen PLA₁-γ2 und PLA₁-γ3 nach Wundinduktion dem Wildtyp ähnliche JA-Gehalte auf, unter basalen Bedingungen jedoch konnte eine niedrigere endogene JA-Konzentration in beiden Mutanten detektiert werden.

Für das lipolytische Enzym DAD1 (At2g44810) wurde bereits gezeigt, dass dieses Lipase eine Rolle in der Aufrechterhaltung der JA-Spiegel in verwundeten Blättern in der späten Phase der Wundantwort zukommt (Hyun et al. 2008). Ferner konnte durch die Analyse der Jasmonsäuregehalte der Mutanten *dgl-i-*, *pla-la1 7-1* und *pla-la1 8-1* in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung von DONGLE (PLA₁-Ia1, At1g05800) als initiales lipolytisches Enzym der JA-Biosynthese ausgeschlossen werden. Die Auswertung der JA-Analyse aller verwendeten Einzelmutanten zeigte, dass keine der getesteten Lipasen eine vollständige JA-Defizienz aufwies. Deshalb wurden die PLA₁-I-Lipasenmutanten, welche niedrigere JA-Spiegel unter basalen Bedingungen (*pla-ly2* und *pla-ly3*) oder 30 min nach Verwundung (*pla-lβ2* und *pla-ly1*) im Vergleich zu Col-0 aufwiesen, über den zeitlichen Verlauf der frühen Wundantwort (0 min bis 60 min) bzgl. der Gehalte an freier dnOPDA, OPDA und JA erneut untersucht. Zusätzlich wurde eine Vierfachmutante, welche durch Mehrfachkreuzung der Mutanten *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3* und *pla-lβ2* von Frau Dr. Dipl. Biol. Dorothea Ellinger am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum generiert wurde, ebenfalls über den zeitlichen Verlauf der frühen Wundantwort analysiert, um eine mögliche redundante Funktion der PLA₁-I-Lipasen aufzuklären.

In Abb.III.20 ist der zeitliche Verlauf an freier dnOPDA, OPDA sowie JA sowohl in den Einzelmutanten *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3* und *pla-lβ2* als auch in der Vierfachmutante *c1x11* in der frühen Wundantwort zwischen 0 min und 60 min nach Blattverwundung dargestellt. Als Kontroll-Pflanzen dienten *A. thaliana* Ökotyp Col-0 sowie Nossen (Nos), da die Lipasemutante *pla-ly1* als genetischen Hintergrund den Ökotyp Nos besitzt. Zur vergleichenden Analyse von *c1x11* jedoch wurden als Referenz Col-0 Pflanzen gewählt, da diese Mutante durch mehrfache Kreuzung der Einzelmutanten entstanden ist und dem zur Folge der dominierende genetische Hintergrund von *c1x11* der Ökotyp Col-0 ist. Die Untersuchungen der Gehalte an freier dnOPDA in den Blättern von *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-lβ2* (Abb.III.20.A), *pla-ly1* (Abb.III.20.D) sowie von *c1x11* (Abb.III.20.G) zeigten, dass alle Mutanten außer *pla-ly1* unter basalen Bedingungen niedrigere dnOPDA-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. So enthielten die Blätter von *pla-ly2* und *pla-lβ2* mit 0,3 µg/g TG basal nur 50% des Wildtypgehaltes an freier dnOPDA, *pla-ly3* wies sogar nur 16,7% des Wildtypgehaltes auf. In den Blättern der Vierfachmutante *c1x11* konnte mit 0,2 µg/g TG nur 33% der wildtypischen dnOPDA-Konzentration detektiert

werden. Die Analyse der dnOPDA-Akkumulationen in den Blättern der Mutanten 10 min nach Verwundung zeigte bei den Mutantenlinien *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3* und *pla-lβ2* keine signifikant niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen. Lediglich die analysierten Blätter von *c1x11* wiesen nur 64%ige dnOPDA-Konzentration des Wildtyps auf. Eine halbe Stunde nach Verwundung akkumulierten die verwundeten Blätter von *pla-lβ2* mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an dnOPDA, die Linien *pla-ly2* und *pla-lβ2* wiesen sogar 141% bzw. 174% des Wildtypgehaltes an freier dnOPDA in verwundeten Blättern auf. Signifikant geringere Gehalte konnte jedoch in Blättern der Mutanten *pla-ly1* und *c1x11* festgestellt werden. Mit 5,7 µg/g TG bzw. 7,5 µg/g TG akkumulierten *pla-ly1* und *c1x11* in verwundetem Blattgewebe nur noch 28% bzw. 51% der Wildtyp-Konzentration an freier dnOPDA. Wie in Abb.III.20. A, D und G ersichtlich, wiesen eine Stunde nach Verwundung lediglich die Blätter der Mutanten *pla-lβ2* und *c1x11* mit 49% bzw. 60% deutlich geringere dnOPDA-Mengen auf.

Die Ergebnisse der Analyse an freier OPDA unter basalen Bedingungen und nach Verwundung in den Blättern der Linien *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-lβ2* sowie *c1x11* sind in Abb.III.20. B, E und H dargestellt. Unter basalen Bedingungen konnten im Blattgewebe von *pla-ly3* und *c1x11* drastisch erniedrigte OPDA-Gehalte mit 12% bzw. 23% der wildtypischen Konzentration nachgewiesen werden. Die Mutanten *pla-ly1*, *pla-ly2* und *pla-lβ2* hingegen unterschieden sich in den analysierten Mengen an freier OPDA unter basalen Bedingungen jedoch nicht vom Wildtyp. Erst 30 min nach Verwundung wurden in verletztem Blattgewebe der Mutanten *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-ly1* sowie *c1x11* deutliche Unterschiede in der OPDA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp detektiert. So zeigten *pla-ly2* und *pla-ly3* eine gesteigerte Akkumulation an OPDA, *pla-ly1* sowie *c1x11* hingegen wiesen lediglich noch 25% bzw. 47% der Wildtyp-Konzentration an OPDA auf. Eine Stunde nach Verwundung konnte bei allen analysierten Lipasemutanten eine geringere OPDA-Freisetzung in den verletzten Blättern im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen gemessen werden, jedoch zeigten nur die Mutanten *pla-lβ2* und *c1x11* signifikant niedrigere Konzentrationen von jeweils 56%.

Die erneute Analyse der JA-Gehalte unter basalen Bedingungen und nach Verwundung in den Blättern der Linien *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-lβ2* sowie *c1x11* sind in Abb.III.20. C, F und I dargestellt. Wie schon bei dem Vergleich der JA-Konzentration aller Einzelmutanten (Abb.III.19) zeigte sich auch bei diesem Versuch,

dass die Mutantenlinien *pla-ly2*, *pla-ly3* sowie *c1x11* basal signifikant geringere JA-Mengen generieren als Col-0. So wiesen *pla-ly2* 45%, *pla-ly3* 36% und *c1x11* 27% der JA-Konzentration des Wildtyps in unverwundeten Blättern auf. Nach Verwundung konnte eine offensichtlich niedrigere JA-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp erst nach 30 min in den verletzten Blättern von *pla-lβ2*, *pla-ly1* sowie *c1x11* detektiert werden. Die prozentuale JA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp betrug in der Einzelmutante *pla-lβ2* 41%, in *pla-ly1* 52% und in der Vierfachmutante *c1x11* 65%. Eine Stunde nach Verwundung konnte in den getesteten Mutanten wieder mit dem Wildtyp vergleichbare JA-Gehalte detektiert werden.

Alle als signifikant bezeichneten niedrigen Gehalte an freien Oxlipinen in den analysierten Mutanten *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-lβ2* sowie *c1x11* wurden mit einem p-Wert von 0,05 bzw. 0,01 bewiesen.

Durch die Analyse der Mutanten *pla-ly1*, *pla-ly2*, *pla-ly3*, *pla-lβ2* sowie *c1x11* bzgl. der Gehalte an den freien Oxylipine dnOPDA, OPDA und JA im zeitlichen Verlauf der frühen Wundantwort in verletzten Blättern konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Vierfachmutante *c1x11* charakterisiert ist durch niedrigere Mengen an dnOPDA, OPDA sowie JA im Vergleich zum Wildtyp sowohl unter basalen als auch wundinduzierten Bedingungen. Der deutlich ähnliche Verlauf der dnOPDA-, OPDA- als auch JA-Kinetiken von *c1x11* mit jenen der Mutante *pla-ly1* jedoch lässt daraufschiessen, dass die Lipase PLA-ly1 an der JA-Biosynthese während der frühen Wundantwort beteiligt ist. Somit ist keine der analysierten putativ chloroplastidär lokalisierten Lipasen essentiell für die JA-Biosynthese unter basalen sowie wundinduzierten Bedingungen. Die Analyse der PLA₁-I-Vierfachmutante gab auf Grund der reduzierten dnOPDA-, OPDA- und JA-Gehalte einen Hinweis auf die redundante Wirkungsweise von Lipasen bzgl. der Jasmonat-Biosynthese.

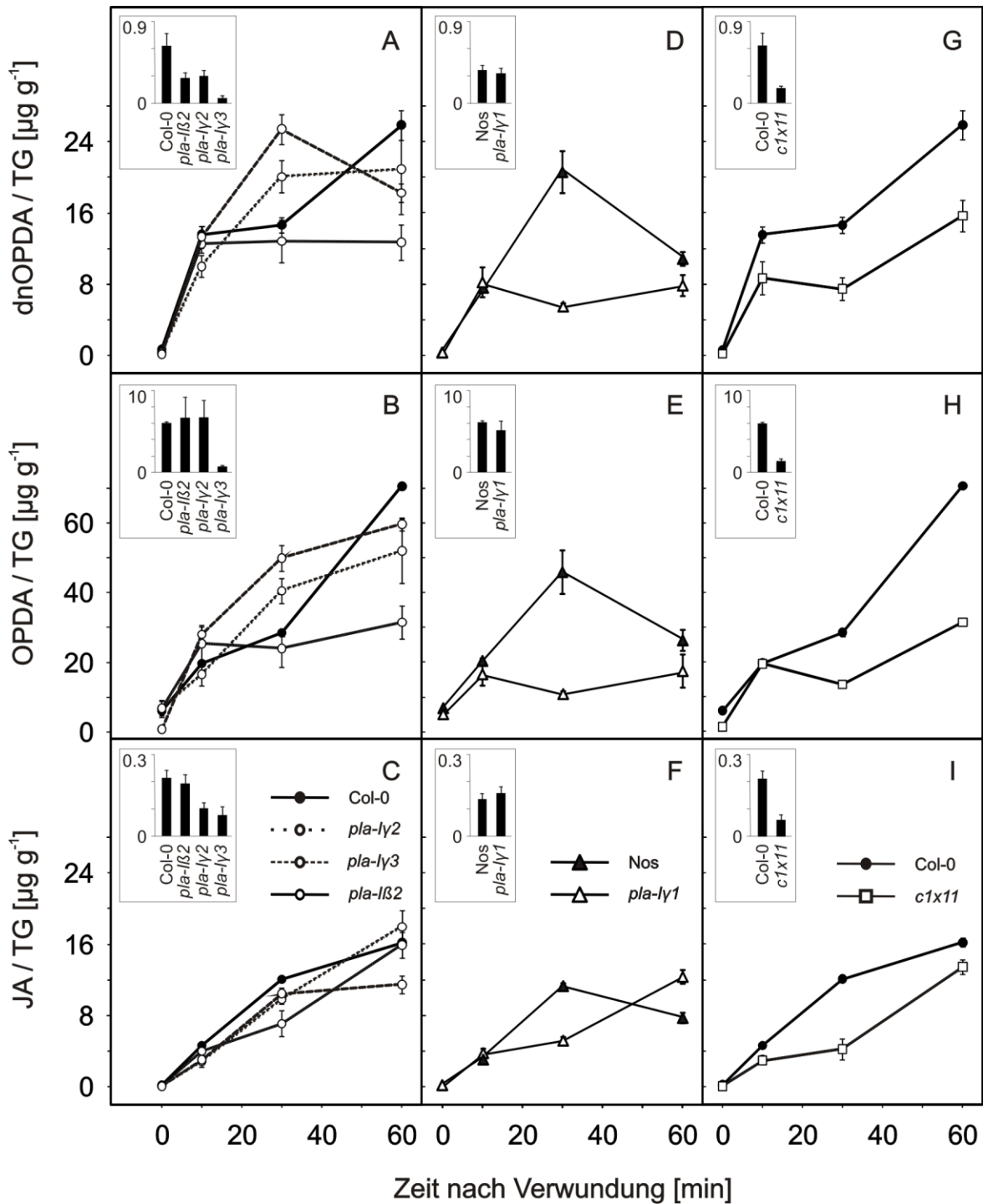


Abbildung III.20: Bestimmung von freier dnOPDA, OPDA und JA nach Verwundung in Blättern von Wildtyp-Pflanzen, von Einzelmutanten der Lipasen $PLA_1-l\gamma_1$, $PLA_1-l\gamma_2$, $PLA_1-l\gamma_3$ und $PLA_1-l\beta_2$ sowie der Vierfachmutante *c1x11*.

Es wurden Rosettenblätter von sechs Wochen alten Col-0-, Nos-, *pla-lγ1*-, *pla-lγ2*-, *pla-lγ3*-, *pla-lβ2*- sowie *c1x11*-Pflanzen, wie in II.4.1 beschrieben, verwundet und zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 30 min sowie 60 min geerntet. (MW±SD, n=3)

3.3.3 Lipidomische Analyse nach *P. syringae* DC3000-Infektion

Wie bereits in III.3.3.1.5 erwähnt, verursacht die Verwundung von Blättern mittels einer Pinzette massive Gewebeschädigungen, welche einen unspezifischen Abbau

von Strukturlipiden durch extraplastidäre Lipasen zur Folge haben könnte. Dies wäre für die Identifizierung der initialen Lipase der JA-Biosynthese nach einem Stressstimulus kontraproduktiv. Deshalb wurden 11 der in III.3.1 aufgeführten Lipasen sowie die Vierfachmutante *c1x11* mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*) infiziert und nach 10 Stunden die Gehalte an freier OPDA sowie JA analysiert. In Abb.III.21.A und B sind die prozentualen Gehalte an freier OPDA bzw. JA in den getesteten Einzelmutanten dargestellt. Die zur Kontrolle mit MgCl₂ behandelten Pflanzen wiesen ähnliche Gehalte an OPDA und JA wie unter III.3.3.2 in Abb.III.18.A bzw. Abb.III.19.A gezeigt.

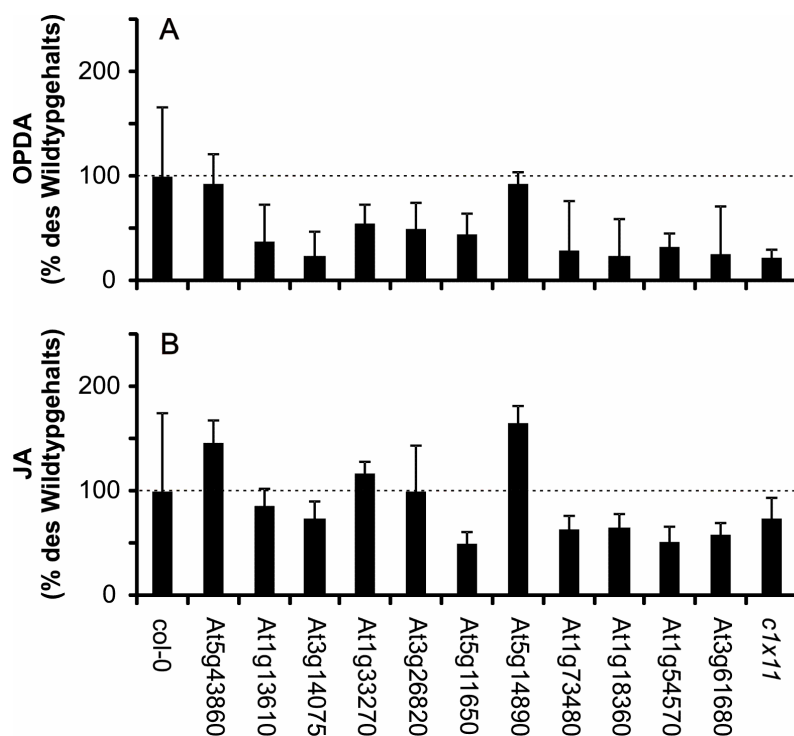


Abbildung III.21: Vergleich der OPDA- und JA-Gehalte von Lipasemutanten nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (*avrRpm1*).

Dargestellt sind die relativen OPDA-Gehalte (A) sowie JA-Gehalte (B) in Rosettenblättern von Col-0, putativ chloroplastidär lokalisierten Lipasemutanten und der Vierfachmutante *c1x11* 10 h nach Infiltration mit *P.syringae* DC3000. (MW±SD, n=3)

Bei zehn der getesteten Lipasemutanten konnten 10 Stunden nach Infiltration mit *P.syringae* DC3000 niedrigere Mengen an freier OPDA im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb.III.21.A), jedoch konnte nur im Fall der Vierfachmutante *c1x11* eine signifikante Reduktion mit einem p-Wert von 0,05 verzeichnet werden. Die analysierten Blätter von *c1x11* akkumulierten nach Infektion lediglich 22% des wildtypischen OPDA-Gehaltes. Die Untersuchungen der Einzelmutanten sowie der

Vierfachmutante bzgl. der Konzentrationen an freier JA nach Infektion mit *P.syringae* DC3000 (Abb.III.21.B) zeigte bei allen untersuchten Mutanten eine Akkumulation von JA. Bei keiner der getesteten Linien konnte eine statistisch signifikante niedrigere Konzentration an JA im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bis auf *c1x11* keine der analysierten Lipasemutanten eine signifikant niedrigere OPDA- bzw. JA-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp 10 Stunden nach *P.syringae*-Infektionen aufwies. Die detektierten signifikant niedrigeren OPDA-Gehalte in der Vierfachmutante im Vergleich zum Wildtyp und die gleichzeitige mit dem Wildtyp vergleichbare, auf Grund von fehlender Signifikanz, akkumulierte JA-Menge sind mit den unter III.3.3.2 beschriebenen und in Abb.III.20.H und I dargestellten OPDA- bzw. JA-Gehalten der Vierfachmutante eine Stunde nach Verwundung vergleichbar. Die niedrigen Konzentrationen an freier OPDA können auch hier als Hinweis auf eine redundante Funktion von Lipasen gesehen werden.

4. Aufklärung der Arabidopsid- und stressinduzierten JA-Biosynthese

Seit fast zehn Jahren ist die Existenz von Arabidopsiden bekannt (Stelmach et al. 2001). Der Syntheseweg dieser komplexen Glycerolipide ist jedoch noch nicht geklärt. Theoretisch können Arabidopside sowohl über den klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch den in der Literatur diskutierten alternativen Syntheseweg entstehen. Desweiteren ist die Funktion dieser speziellen Galaktolipide ebenfalls nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Arabidopside die schnelle Verfügbarkeit der JA-Vorläufer dnOPDA und OPDA in Folge eines Stresses stimulieren gewährleisten.

Um die Synthese der Arabidopside und deren mögliche Funktion als Reservoir für eine rasche Bereitstellung der Cyclooxyline (OPDA und dnOPDA) zur stressinduzierten JA-Synthese zu klären, wurden Col-0 Keimlinge wie in II.4.5 beschrieben mit D₅-Linolensäure-Ethylester behandelt. Ziel dieser Behandlung war es eine stabile D₅-Markierung komplexer Membranlipide zu erzielen und durch anschließende Applikation von Silbernitrat die Jasmonat-Synthese zu induzieren. Mittels Analyse der Markierungsgrade komplexer Lipide und freier Oxyline (OPDA/JA) vor und nach Zugabe von Silbernitrat sollte sowohl die Synthese der Arabidopside sowie deren mögliche Speicherfunktion geklärt werden.

Als lipophile Substanz mit einem logP-Wert von 6,6 ist D₅-Linolensäure-Ethylester membrangängig und konnte somit in die pflanzlichen Zellen aufgenommen werden. Durch die Aktivität von cytosolischen Esterasen wurde D₅-Linolensäure-Ethylester zu D₅-Linolensäure hydrolysiert, was die Bindung der freien Isotopen-markierten Linolensäure an CoA und somit den Einbau von D₅-Linolensäure in komplexe Membranlipide über den eukaryotischen Fettsäure-Syntheseweg im Endoplasmatischen Reticulum ermöglichte (Browse J. et al. 1986, Ohlrogge and Browse 1995). Aufgrund der Positionen der Isotopenmarkierung an C17 und C18 der Kohlenstoffkette konnte die Erhaltung der D₅-Markierung während der endogenen Synthese von Linolensäure zu OPDA bzw. JA gewährleistet werden, da diese Kohlenstoffatome nicht einer biosynthetischen Umstrukturierung unterliegen.

Da erwartet wurde, dass 24 h nach Beginn der Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester die Isotopen-markierte Linolensäure bereits in die Lipidpools eingebaut war, wurden die Spiegel an PC, MGDG, DGDG, OPDA und JA sowie deren Markierungsgrade zu diesem Zeitpunkt bestimmt (Tab.III.3). Dann folgte die Behandlung der Keimlinge mit einer Silbernitrat-Lösung (II.4.2), um eine stressinduzierte JA-Synthese auszulösen. Eine Stunde nach Zugabe des Silbernitrats wurde das Pflanzenmaterial geerntet und die Größen der Lipidpools (PC, MGDG, DGDG, OPDA und JA) sowie deren Markierungsgrade (Tab.III.4) bestimmt, da durch Vorversuche eine maximale JA-Akkumulation zu diesem Zeitpunkt gezeigt werden konnte (III.2.4). Um eine rasche Veränderung der Poolgrößen sowie der Markierung während der Zugabe der Silbernitratlösung auszuschließen, wurde den Keimlingen als Kontrolle 24 h nach der Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester statt Silbernitrat-Lösung Wasser appliziert und nach einer Stunde das Pflanzenmaterial geerntet. Die vergleichende Analyse der lediglich mit D₅-Linolensäure-Ethylester inkubierten sowie der mit D₅-Linolensäure-Ethylester inkubierten und anschließend mit Wasser behandelten Pflanzen zeigte, dass durch Zugabe von Wasser weder eine Veränderung der Lipidpoolgrößen noch der Markierung ausgelöst wird und somit eine stabile Lipidmarkierung erzielt werden konnte. Nach vierundzwanzig stündiger Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester entstand ein Pool von endogener markierter OPDA (96,9 ng/g TG, 6,9 % ± 0,1 markiert) und JA (1,5 ng/g TG, 7,2 % ± 2,1 markiert). Die durchschnittliche Isotopenmarkierung der komplexen Lipide (Abb.III.22.A) betrug für MGDG 3,5 % ± 0,7, für DGDG 0,9 % ± 0,2 und für PC 17,3 % ± 1,8.

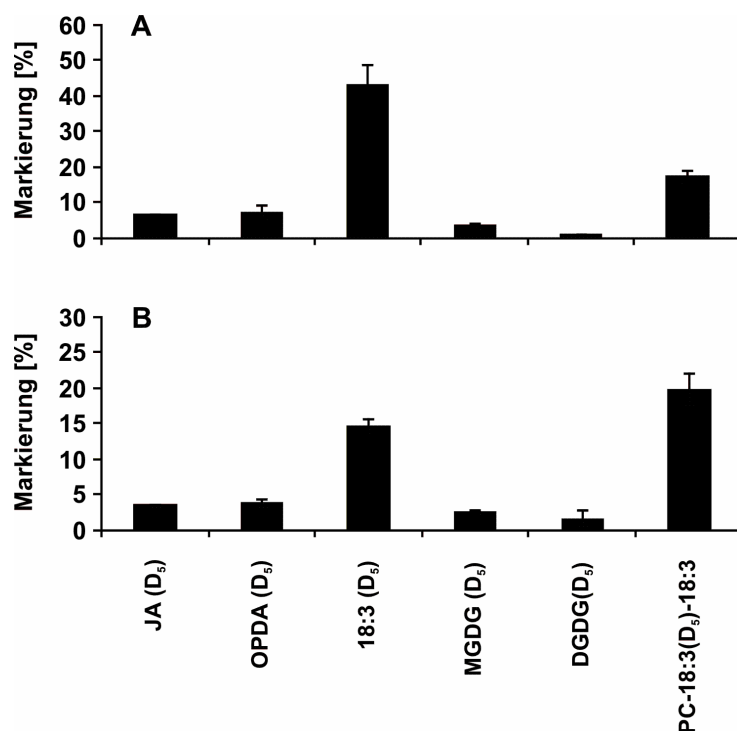


Abbildung III.22: Vergleich der mittleren prozentualen Markierungsgrade von JA, OPDA, Linolensäure (18:3), MGDG, DGDG und 18:3-18:3-PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen nach vierundzwanzig stündiger Inkubation mit D₅-Linolensäure (A) sowie eine Stunde nach Zugabe einer 1mM Silbernitrat-Lösung (B). (MW±SD, n=3)

Tabelle III.3: Tabellarische Darstellung der prozentualen Markierungsgrade der komplexen Lipide MGDG, DGDG und PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen nach vierundzwanzig stündiger Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester. (MW±SD, n=3)

Lipidkomposition sn ₁ -sn ₂ [Gal-Modifikation]	MGDG		DGDG		PC	
	MW [%]	STABW	MW [%]	STABW	MW [%]	STABW
18:3(D ₅)-18:3, 18:3-18:3(D ₅)	6,1	0,4	1,9	0,3	17,3	1,8
18:3(D ₅)-18:3(D ₅)	0,6	0,1	0,2	0,0	2,4	0,9
18:3(D ₅)-18:2, 18:2-18:3(D ₅)	4,9	0,2	0,7	0,0	8,4	3,5
18:3(D ₅)-18:1, 18:1-18:3(D ₅)	n.d	n.d	2,0	1,0	0,0	0,0
18:3(D ₅)-18:0, 18:0-18:3(D ₅)	n.d	n.d	1,3	0,3	21,8	6,9
18:3(D ₅)-16:3	0,1	0,0	0,9	0,2	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:2	0,6	0,1	0,3	0,1	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:1	10,2	1,1	1,3	0,1	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:0	3,6	0,4	1,5	0,7	n.d	n.d
18:3(D ₅)-OPDA, OPDA-18:3(D ₅)	3,2	0,1	0,8	0,2	n.a.	n.a.
18:3-OPDA(D ₅), OPDA(D ₅)-18:3	2,2	0,3	0,8	0,1	n.a.	n.a.
18:3(D ₅)-OPDA(D ₅), OPDA(D ₅)-18:3(D ₅)	0,5	0,1	0,1	0,0	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-16:3	0,1	0,0	n.d	n.d	n.a.	n.a.
18:3(D ₅)-dnOPDA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA, OPDA-OPDA(D ₅)	8,2	1,1	1,6	0,5	n.a.	n.a.

OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅)	0,3	<i>0,0</i>	0,1	<i>0,0</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-OPDA [OPDA] OPDA-OPDA(D ₅) [OPDA]	7,8	<i>3,5</i>	n.a.	<i>n.a.</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅) [OPDA]	8,7	<i>3,4</i>	n.a.	<i>n.a.</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅) [OPDA(D ₅)]	n.d	<i>n.d</i>	n.a.	<i>n.a.</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-dnOPDA	0,1	<i>0,0</i>	0,4	<i>0,3</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-dnOPDA [OPDA]	1,0	<i>0,5</i>	n.a.	<i>n.a.</i>	n.a.	<i>n.a.</i>
OPDA(D ₅)-dnOPDA [OPDA(D ₅)]	4,3	<i>1,8</i>	n.a.	<i>n.a.</i>	n.a.	<i>n.a.</i>

Diese prozentuale Abstufung der erzielten Markierung war begründet durch den Einbau der freien D₅-Linolensäure in die komplexen Lipide via des eukaryotischen Lipidsyntheseweges: D₅-Linolensäure wird an CoA gebunden und die anschließende Konjugation an Acetyl-Carrier-Protein (ACP) ermöglicht den Eintritt in die eukaryotische Lipidsynthese am Endoplasmatischen Reticulum (Ohlrogge and Browse 1995). Darauf folgend wird D₅-Linolenat aus D₅-Linolensäure-ACP mittels einer Acyltransferase an Glycerol-3-Phosphat verestert. Durch Aktivität der Glycerophosphattransacylase wird D₅-Glycerol-3-Phosphat zu D₅-Phosphatidsäure (PA) umgewandelt, aus welcher durch Dephosphorylierung D₅-1,2-Diacyl-Glycerol entsteht. Mittels 1,2-Diacyl-Glycerol-Phosphocholin-Transferase wird aus D₅-1,2-Diacyl-Glycerol D₅-PC gebildet. Die gebildeten D₅-PC können anschließend sowohl in den Aufbau extraplastidärer Membranen fließen als auch in den Chloroplasten transportiert werden, um entweder in die Plastidenmembran eingebaut zu werden oder der Galaktolipid-Synthese zu dienen. Im Plastiden werden aus PC MGDG synthetisiert, welche sowohl dem Aufbau der Plastidenmembranen dienen als auch der Synthese von DGDG. Die Isotopenmarkierung durchläuft somit verschiedene Stufen der Lipidsynthese von PC über MGDG zu DGDG, und wird prozentual bei jedem Metabolit geringer, da zum Zeitpunkt 0 (Beginn der Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester) alle Lipide unmarkiert vorliegen. Diese Pools an unmarkierten Lipiden werden durch die neu gebildeten markierten Lipide „verdünnt“, die Markierungsgrade nehmen daher innerhalb eines Biosyntheseweges zum Endprodukt hin ab. Die Vorstufen weisen zwangsläufig einen höheren Markierungsgrad auf als deren Metabolite, die durch die bereits vorhandenen unmarkierten Metabolitpools verdünnt werden. Wenn die endogenen Metabolitpools im Vergleich zu den neusynthetisierten, markierten Metabolitmengen sehr klein sind, nähern sich die Markierungsgrade von Vorstufe und Metabolit aneinander an.

Die Analyse des prozentualen Markierungsgrades der einzelnen MGDG sowie DGDG (Tab. III.3) zeigte, dass innerhalb der beiden Galaktolipidgruppen vor allem jene Lipidspezies eine höhere Markierung aufwies, welche sowohl an sn₁- und sn₂-Position C₁₈-Fettsäuren oder deren Oxylinmetabolit OPDA verestert enthielten. Galaktolipide mit C₁₆-Fettsäuren oder deren Oxylinmetabolit dnOPDA an sn₂-Position hingegen wiesen entweder nur ein äußerst geringe prozentuale Isotopenmarkierung auf oder es konnten keine entsprechenden markierten Lipidspezies detektiert werden, da diese Galaktolipide ausschließlich über den plastidär lokalisierten prokaryotischen Lipidsyntheseweg gebildet werden.

Da lediglich die komplexen Lipide MGDG eine mit OPDA und JA vergleichbare Markierung zum Zeitpunkt 0 aufwies, wurde vermutet, dass Lipidspezies dieser Galaktolipidgruppe Ausgangssubstanzen der stressinduzierten JA-Synthese sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden 1 h nach Behandlung mit Silbernitrat die endogenen Mengen an markierten und unmarkierten MGDG, DGDG, PC, freie Linolensäure sowie der Oxyline OPDA und JA bestimmt. Die Zugabe von Silbernitrat führte zur Akkumulation von markierter sowie unmarkierter OPDA und JA. Von dem neu entstandenen Pool an OPDA und JA wurde die zum Zeitpunkt 0 vorhandene Menge an markierter und unmarkierter OPDA/JA abgezogen, um die Menge und den Markierungsgrad der neu gebildeten OPDA sowie JA zu bestimmen. Während der einstündigen Silbernitratbehandlung sind 1 µg/g TG OPDA (Markierung: 3,9 % ± 0,5) und 0,3 µg/g TG JA (3,5 % ± 0,2) gebildet worden. Der so bestimmte Markierungsgrad sollte mit dem Markierungsgrad der direkten Vorstufe zum Zeitpunkt 0 (24 h nach Applikation des D₅-Linolensäure-Ethylester, vor Zugabe des Silbernitrats) übereinstimmen. Es zeigte sich, dass die einfachmarkierten Lipide von 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) sowie Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) mit Markierungen von 5,7 % ± 0,6, 3,7 % ± 0,1, 5,8 % ± 0,3 sowie 7,2 % ± 1 die höchsten Markierungsgrade innerhalb aller gemessenen D₅-markierten MGDG-Spezies aufwies (Tab.III.4). Da

Tabelle III.4: Tabellarische Darstellung der prozentualen Markierungsgrade der komplexen Lipide MGDG, DGDG und PC in 10 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen 1 h nach Zugabe einer 1 mM Silbernitratlösung. (MW \pm SD, n=3)

Lipidkomposition sn ₁ -sn ₂ [Gal-Modifikation]	MGDG		DGDG		PC	
	MW [%]	STABW	MW [%]	STABW	MW [%]	STABW
18:3(D ₅)-18:3, 18:3-18:3(D ₅)	5,7	0,6	5,3	5,6	19,7	2,3
18:3(D ₅)-18:3(D ₅)	0,5	0,1	0,5	0,5	2,1	1,1
18:3(D ₅)-18:2, 18:2-18:3(D ₅)	4,6	0,5	1,3	1,3	9,9	1,5
18:3(D ₅)-18:1, 18:1-18:3(D ₅)	n.d	n.d	3,2	1,3	7,0	2,9
18:3(D ₅)-18:0, 18:0-18:3(D ₅)	n.d	n.d	3,5	3,4	4,8	1,9
18:3(D ₅)-16:3	0,2	0,0	1,4	1,4	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:2	0,5	0,1	0,7	0,7	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:1	9,9	0,2	2,3	1,7	n.d	n.d
18:3(D ₅)-16:0	3,5	0,9	2,9	2,6	n.d	n.d
18:3(D ₅)-OPDA, OPDA-18:3(D ₅)	3,8	0,2	1,1	0,0	n.a.	n.a.
18:3-OPDA(D ₅), OPDA(D ₅)-18:3	1,6	0,2	0,9	0,1	n.a.	n.a.
18:3(D ₅)-OPDA(D ₅), OPDA(D ₅)-18:3(D ₅)	0,3	0,1	0,1	0,0	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-16:3	0,1	0,0	0,2	0,1	n.a.	n.a.
18:3(D ₅)-dnOPDA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA, OPDA-OPDA(D ₅)	5,8	0,3	1,9	0,1	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅)	0,3	0,0	0,1	0,0	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA [OPDA] OPDA-OPDA(D ₅) [OPDA]	7,2	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅) [OPDA]	1,6	0,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-OPDA(D ₅) [OPDA(D ₅)]	n.d	n.d	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-dnOPDA	0,1	0,0	0,1	0,0	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-dnOPDA [OPDA]	1,0	0,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
OPDA(D ₅)-dnOPDA [OPDA(D ₅)]	0,8	0,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

bei den einfach markierten MGDG-Spezies die Wahrscheinlichkeit für die Markierung der Acylkette in sn₁- und sn₂-Position jeweils 50 % beträgt, ist der Markierungsgrad von 18:3-18:3-MGDG 2,9 % \pm 0,6. Der Markierungsgrad von OPDA in sn₁- und sn₂-Position in Arabidopsis B (OPDA-OPDA-MGDG) beträgt 2,9 % \pm 0,3 und von Arabidopsis G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) 3,6 % \pm 1. Damit liegen die Markierungsgrade von 18:3-18:3-MGDG und der Arabidopside bei 3 %, was kompatibel mit der direkten Oxidation von 18:3-18:3-MGDG zu den entsprechenden Arabidopsiden (alternativer Syntheseweg) wäre. Darüber hinaus liegt auch der Markierungsgrad von freier OPDA in derselben Größenordnung von 3 %, was kompatibel mit der Freisetzung von OPDA aus Arabidopsiden wäre. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von freier OPDA aus 18:3 („Vick-Zimmerman“-Pathway)

unwahrscheinlich, da freie 18:3 einen Markierungsgrad von über 40 % aufwies und der Metabolit von circa 3 %. Die in Abb.III.23 gezeigten Galaktolipide wiesen zum Zeitpunkt 0 die größten Übereinstimmungen (82-100%) der gemessenen Markierungsgrade mit jenen der durch Zugabe von Silbernitrat neu gebildeten OPDA und JA auf. Desweiteren zeigte der Vergleich der Markierungsgrade von PC, DGDG sowie freier Linolensäure zum Zeitpunkt 0 mit den Markierungsgraden der durch Behandlung mit Silbernitrat neu gebildeten OPDA und JA keine Übereinstimmung (Abb.III.22). Sowohl freie Linolensäure als auch die detektierten PC-Spezies wiesen elffach bzw. drei- bis fünffach höhere Markierungsgrade, die detektierten DGDG-Spezies bis zu vierfach geringere Markierungsgrade als der Pool an neugebildeter OPDA und JA auf.

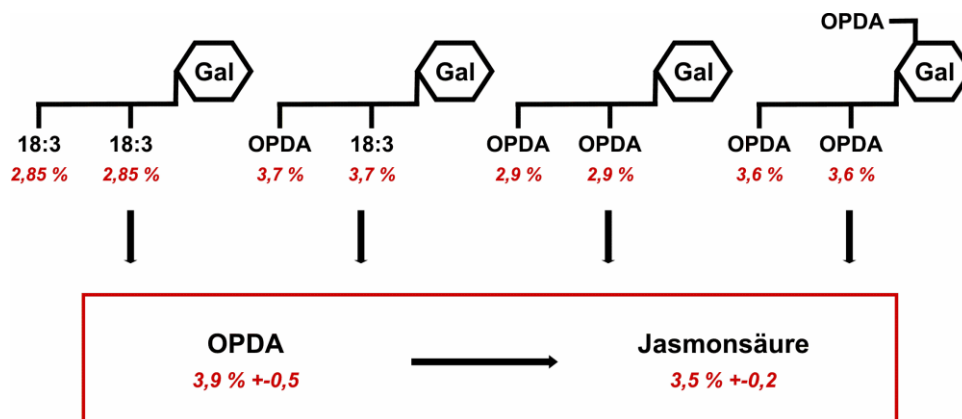


Abbildung III.23: Vergleich der Markierungsgrade der einfach D_5 -markierten MGDG-Lipide 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsisid B (OPDA-OPDA-MGDG) sowie Arabidopsisid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) mit den Markierungsgraden von D_5 -markierter OPDA und JA nach 1h Inkubation mit Silbernitrat (II.4.5). (MW \pm SD, n=3)

Die hohe Übereinstimmung der Markierungsgrade der in Abb.III.23 dargestellten MGDG-Spezies zum Zeitpunkt 0 mit jenen der neu synthetisierten OPDA/JA nach Silbernitratbehandlung führten in der vorliegenden Arbeit zur Annahme, dass die durch die Silbernitratzugabe induzierte Akkumulation von JA und OPDA ihren Ursprung in den chloroplastidären Lipiden 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, OPDA-OPDA-MGDG und OPDA-OPDA-MGDG-OPDA hatte. Dieser Annahme zur Folge wurden die Gehaltsänderungen der einfachmarkierten Lipide 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, OPDA-OPDA-MGDG und OPDA-OPDA-MGDG-OPDA während der Behandlung mit Silbernitrat berechnet und unter Einbezug der Mengen an markierter OPDA/JA nach Zugabe von Silbernitrat eine Gewinn-/Verlustrechnung erstellt (Abb.III.24). Demnach führte die Behandlung mit 1mM Silbernitrat-Lösung zu

einer Abnahme der einfachmarkierten 18:3-18:3-MGDG sowie 18:3-OPDA-MGDG von 37 $\mu\text{g/g}$ TG bzw. 1,6 $\mu\text{g/g}$ TG in den untersuchten *A. thaliana* Pflanzen. Gleichzeitig wurden einfach D₅-markiertes Arabidopsid B (33 $\mu\text{g/g}$ TG), G (1,9 $\mu\text{g/g}$ TG) sowie D₅-markierte OPDA (1 $\mu\text{g/g}$ TG) und JA (0,3 $\mu\text{g/g}$ TG.) neu gebildet.

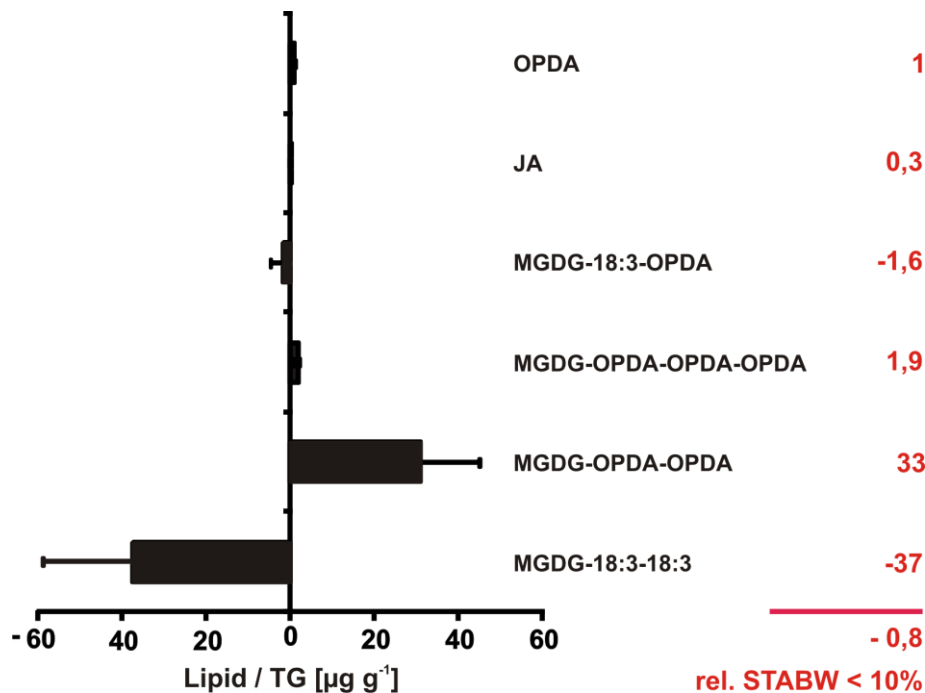


Abbildung III.24: Gewinn-/Verlustrechnung nach Silbernitratzugabe in *A. thaliana*.

Dargestellt sind die Gehaltsänderungen von 18:3-18:3-MGDG und 18:3-OPDA-MGDG zu Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG), Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA), OPDA und JA nach 1h Inkubation mit Silbernitrat (II.4.5). (MW \pm SD, n=3)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Vergleich der Markierungsgrade der komplexen Lipide MGDG, DGDG sowie PC zum Zeitpunkt 0 mit den Markierungen von neugebildeter OPDA und JA nach Silbernitratbehandlung eindeutig zeigte, dass die nach einem toxischen Stress wie bspw. durch Silbernitrat akkumulierten freien Oxylipine OPDA und JA aus den chloroplastidären MGDG-Lipiden generiert werden. Unter der Annahme, dass es in den untersuchten Pflanzen keine unterschiedlich markierten 18:3-Pools gab, ist eine Freisetzung von OPDA und JA aus chloroplastidären DGDG oder extraplastidären PC ist auf Grund der zu niedrigen bzw. zu hohen Markierung der DGDG und von 18:3-18:3-PC auszuschließen. Dies gilt auch für die theoretisch mögliche Synthese von OPDA bzw. JA ausgehend von freier Linolensäure, da der Markierungsgrad von freier Linolensäure ebenfalls weit

über jenem von OPDA und JA lag. Mittels der Analyse der Gehaltsänderungen von einfach D₅-markiertem 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B, G sowie D₅-markierter OPDA und JA konnte gezeigt werden, dass die mittels Silbernitrat induzierte Generierung von OPDA und JA durch die Freisetzung aus den in Abb.III.24 gezeigten MGDG-Spezies verläuft. Ferner konnte auf Grund der Markierungsgrade sowie den detektierten Gehaltsänderungen der einfach D₅-markierten MGDG-Lipiden gezeigt werden, dass zumindest Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) und Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) aus 18:3-18:3-MGDG generiert werden. Dies bedeutet, dass durch die in dieser Arbeit erzielten Daten gezeigt werden konnte, dass die Synthese von OPDA zumindest nach der Behandlung mit Silbernitrat direkt in den MGDG-Lipiden der Chloroplastenmembran über den in Abb.I.4 dargestellten „Alternative Pathway“ abläuft.

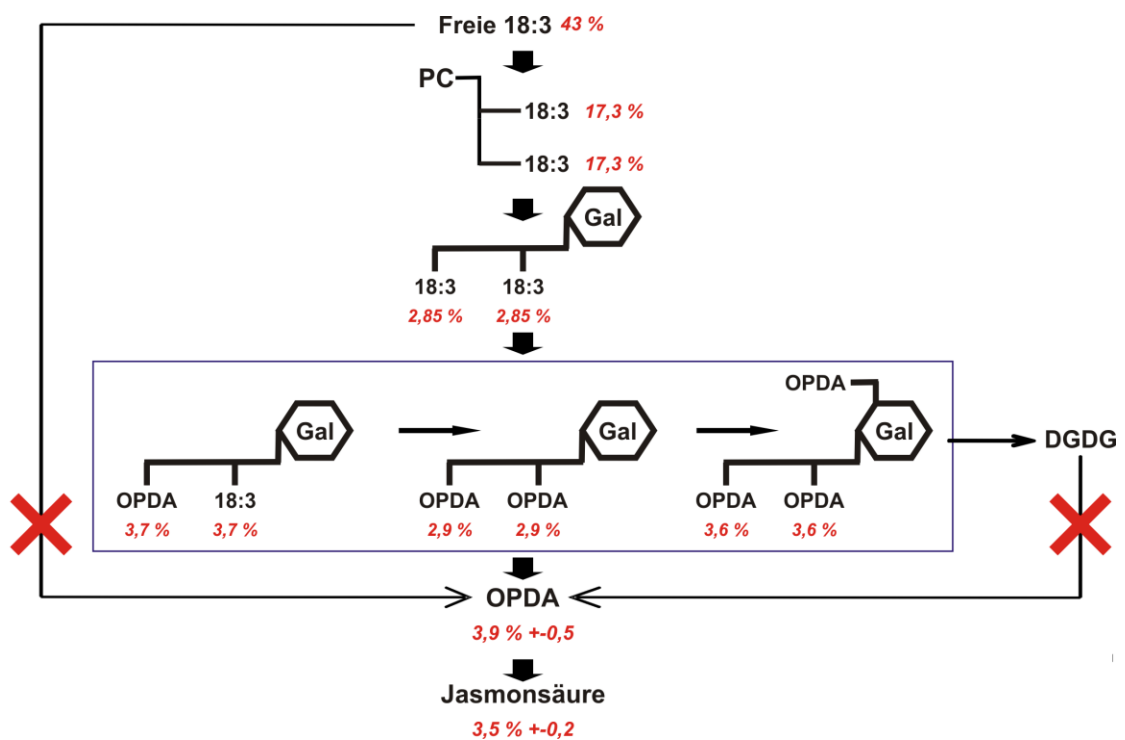


Abbildung III.25: Arabidopsid- und stressinduzierten JA-Biosynthese

Dargestellt ist die durch D₅-Markierung gezeigte Synthese der Arabidopside B und G sowie der durch Zugabe von Silbernitrat induzierten Synthese von JA in *A. thaliana*. Anhand der Markierungsgrade (rote Schrift) lässt sich ein eindeutiger Verlauf der Biosynthese von 18:3-18:3-MGDG über 18:3-OPDA-MGDG zu Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) sowie Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) nachvollziehen. Die durch Silbernitratzugabe ausgelöste Synthese von OPDA und JA kann auf Grund der hohen Markierungsgrade von freier Linolensäure und 18:3-18:3-PC sowie der deutlich geringeren Markierung der DGDG ihren Ursprung nur in 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B und Arabidopsid G haben. (MW±SD, n=3)

IV. Diskussion

Jasmonsäure und ihre Derivate sind von elementarer Bedeutung bei der Entwicklung und Abwehr von Pflanzen. JA-Defizienz führt, um nur einige Beispiele zu nennen, zu Sterilität und erhöhter Suszeptibilität gegenüber Pathogenen (Feys et al. 1994, McConn and Browse 1996, Sanders et al. 2000, Stintzi and Browse 2000, von Malek et al. 2002). Bis dato war die vorherrschende Vorstellung über die Biosynthese von JA der klassische Vick-Zimmerman-Pathway (Vick and Zimmerman 1984). Durch eine einzelne unbekannte Lipase wird dem zur Folge α -18:3 sowie 16:3 aus der Chloroplastenmembran freigesetzt und zu JA synthetisiert. In den letzten zehn Jahren wurden jedoch die Intermediate der JA-Biosynthese OPDA (ausgehend von α -18:3) und dnOPDA (ausgehend von 16:3) verestert in Galaktolipiden (Arabidopsiden) entdeckt. Synthese und Funktion dieser komplexen Lipide waren ungeklärt. Ein alternativer Syntheseweg, welcher sich analog zum klassischen Vick-Zimmerman-Pathway an membranständiger α -18:3 bzw. 16:3 vollzieht, wird in der Literatur postuliert. Es wird vermutet, dass OPDA sowie dnOPDA mittels einer unbekanntenen Lipase freigesetzt werden und der Weitersynthese zu JA dienen. Sowohl im klassischen Vick-Zimmerman-Pathway als auch im postulierten alternativen Syntheseweg spielen Lipasen eine essentielle Rolle bei der JA-Produktion.

Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren die Identifizierung des JA-Synthese initiiierenden Enzyms (Lipase) in Blättern von *A. thaliana* sowie die Aufklärung der Arabidopsid-Synthese. Es wurden mittels bioinformatischer Recherche plastidäre Lipasen ausgewählt und deren Rolle in der JA-Biosynthese untersucht. Ferner sollte ein schnelles und reproduzierbares Aufbereitungsverfahren zur Analyse von komplexen Membranlipiden erarbeitet werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde von Hyun et al. (2008) beschrieben, dass die plastidär lokalisierten Lipasen DGL und DAD1 die JA-Synthese in den Blättern zeitlich getrennt nach einem Verwundungstimulus regulieren. Laut der Autoren würde DGL die JA-Biosynthese unter basalen Bedingungen sowie zu frühen Verwundungszeitpunkten regulieren und DAD1 würde zur Aufrechterhaltung der JA-Konzentrationen zu späten Verwundungszeitpunkten dienen. Ferner wurde publiziert, dass DGL eine Galaktolipase und DAD1 eine Phospholipase ist. Beide Lipasen wiesen in vitro eine sn_1 -Spezifität auf. Eine essentielle Beteiligung von DAD1 an der JA-Biosynthese wurde 2001 bereits von Ishiguro et al. beschrieben. Jedoch bezieht

sich diese essentielle Beteiligung bei der Regulation der JA-Produktion lediglich auf die Blüten von *A. thaliana*. DAD1-defiziente Mutanten wiesen nur noch 22% der JA-Konzentration in Blüten im Vergleich zum Wildtyp auf und waren durch männliche Sterilität charakterisiert.

1. Analyse von Monogalaktosyldiacylglycerolen, Digalaktosyldiacylglycerolen und Phosphatidylcholinen in Rosettenblättern von *A. thaliana*

Sowohl im alternativen Syntheseweg als auch im klassischen Vick-Zimmerman-Pathway ist der initiale Schritt der Biosynthese von JA die Freisetzung von oxidierten bzw. nicht oxidierten Fettsäuren aus der Chloroplastenmembran mittels einer Lipase. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine rasche Aufarbeitungs- und Analysemethode zur Bestimmung von komplexen chloroplastidären Lipiden entwickelt, um sowohl die Substratspezifität der gesuchten Lipase in vivo als auch die Arabidopsid-Synthese zu klären. Mit der in II.8.2 beschriebenen Extraktionsmethode war es möglich, innerhalb von weniger als zwei Stunden die Lipidkompositionen der Chloroplasten-spezifischen Galaktolipide (MGDG und DGDG) sowie der Phosphatidylcholine (PC), welche die abundantesten Phospholipide im Chloroplasten darstellen, mittels LC-MS/MS (II.9.1.2 und II.9.2.2) zu bestimmen.

Der Vergleich der in Abb.III.1, Abb.III.2 und Abb.III.3 gezeigten Lipidzusammensetzungen der komplexen Lipidgruppen MGDG, DGDG und PC mit der in der Literatur (Devaiah et al. 2006, Welti et al. 2002) beschriebenen Lipidkompositionen in Blättern von *A. thaliana* Ökotyp Col-0 wies eine gute Übereinstimmung auf. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem entwickelten Extraktionsverfahren für komplexe Lipide alle Lipidspezies der MGDG, DGDG und PC bestimmt werden, welche in der führenden Publikation von Devaiah et al. 2006 analysiert wurden. Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit analysierten absoluten Gehalte der Membranlipide MGDG, DGDG und PC mit denen von Devaiah et al. 2006 publizierten Daten war nicht möglich, da die Autoren alle Angaben in mol%, bezogen auf alle von ihnen gemessenen Glycerolipide, darstellten. Der Vergleich mit der von Welti et al. (2002) beschriebenen quantitativen Analyse der einzelnen Lipidspezies zeigte, dass mit dem in II.8.2 aufgeführten Extraktionsverfahren lediglich 25% der Konzentrationen der einzelnen Lipidspezies detektiert werden konnte. Ein Grund hierfür könnten unterschiedliche Aufzuchtbedingungen der in Welti et al. (2002) verwendeten

Pflanzen sein. So wurden im Gegensatz zu den in dieser Arbeit analysierten Pflanzen, die von Welti et al. (2002) untersuchten Individuen unter Langtagbedingungen angezogen und erst im Alter von 8 Wochen untersucht. Diese um drei Stunden zusätzliche Belichtung der von Welti et al. (2002) analysierten Pflanzen sowie deren Alter könnten zu einer Vergrößerung des Gesamtlipidgehaltes der Plastiden geführt haben (Härtel et al. 1997, Kelly and Dörmann 2004). Die wesentlichsten Unterschiede liegen jedoch in der Bestimmung des Trockengewichts und der massenspektrometrischen Analyse. In der vorliegenden Arbeit wurde für jede analysierte Probe zusätzlich aus dem gleichen Pflanzenmaterial separat das Trockengewicht bestimmt. Welti et al. (2002) hingegen verwenden zur Bestimmung des Trockengewicht bereits einer Lipidextraktion unterzogenes Blattmaterial. Dabei werden neben Lipiden auch wasserlösliche Blattbestandteile vor der Bestimmung des Trockengewichts entfernt, was zu zu niedrigen Trockengewichten bzw. zu stark erhöhten Lipidkonzentrationen (bezogen auf das so bestimmte Trockengewicht) führt. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu der von Welti et al. (2002) publizierten Lipidanalyse liegt jedoch in der chromatographischen und massenspektrometrischen Analyse der Lipide. In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipidproben zuerst mittels UPLC chromatographisch aufgetrennt und anschließend mittels MRM-Modus massenspektrometrisch analysiert. Dies bedeutet, dass die analysierten Lipidspezies sowohl durch ihre Retentionszeit als auch durch ihre spezifischen Fragmentationen eindeutig identifiziert werden konnten. Bei Welti et al. (2002) hingegen wurden die zu analysierenden Lipidproben nicht chromatographisch getrennt, sondern mittels Direktinfusion in das Massenspektrometer eingebracht, um mittels Fullscan analysiert zu werden. Bei dem Tandem-MS-Modus des Fullscans werden Moleküle nicht fragmentiert und ausschließlich durch ihr m/z -Verhältnis identifiziert. Dies hat zur Folge, dass auch andere Moleküle mit demselben m/z -Verhältnis in die Identifizierung und vor allem Quantifizierung einfließen. Somit sollten die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Lipidkonzentrationen realistischer sein.

2. Lipidomische Analyse chloroplastidärer Lipasen

Während einer akuten Wund- bzw. Stressantwort stellt die sofortige Bereitstellung von freien Fettsäuren und Oxo-Phytodiensäuren (OPDA und dnOPDA) durch Lipasen den initialen Schritt der JA-Biosynthese dar. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Identität dieser Lipasen geklärt werden.

Mehrere Hinweise liessen vermuten, dass die gesuchten Lipasen im Chloroplasten lokalisiert sein müssen. Erstens sind die Enzyme 13-LOX, AOS sowie AOC alle im Chloroplasten lokalisiert (Delker et al. 2006, Laudert and Weiler 1998, Laudert et al. 2000, Laudert et al. 1996, Mosblech et al. 2008, Vick and Zimmerman 1984, von Malek et al. 2002). Desweiteren sind die Galaktolipide, welche als Substratquelle der JA-Synthese angesehen werden, in der Thylakoidmembran sowie der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert. Drittens wurde für die Lipase DAD1, welche für die JA-Synthese in Blüten verantwortlich ist, die Lokalisation in Plastiden gezeigt (Ishiguro et al. 2001). Deshalb wurden mittels bioinformatischer Analyse nach Enzymen mit plastidärer Lokalisation sowie lipolytischer Aktivität recherchiert und 21 putative chloroplastidäre Lipasen gefunden. Zwei dieser Lipasen waren DGL und DAD1, welche von Hyun et al. (2008) als essentiell für die Synthese von JA in den Blättern von *A. thaliana* nach Verwundung beschrieben wurden. Nach Hyun et al. (2008) würde die Generierung von freier JA nach einem Verwundungsreiz in der frühen Phase der Verwundung (0min-60min) durch DGL und in der späteren Verwundungsphase (60min-240min) durch DAD1 vermittelt werden. Auch in Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde eine Lipase identifiziert, welche direkt oder indirekt die JA-Synthese zu frühen Zeitpunkten nach Verwundung reguliert (Kallenbach et al. 2010). Diese als GLA1-I bezeichnete plastidäre Lipase weist eine 46%ige bzw. 37%ige Sequenzhomologie zu DAD1 bzw. DGL auf sowie sn₁-Substratspezifität gegenüber PC und MGDG. Die Knockout-Mutante *gla1* akkumulierte nach Verwundung 75% weniger JA als der Wildtyp. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die von Hyun et al. (2008) publizierten Daten überprüft, um anschließend die Synthese und mögliche Funktion der Arabidopside als Substratquelle der JA-Akkumulation nach Verwundung zu klären. Würde die als JA-defizient beschriebene Mutante *dgl-i* basal sowie eine halbe Stunde nach Verwundung über wildtypische Konzentrationen an Arabidopsiden verfügen, wäre dies ein Beweis für Arabidopsid-Synthese in der Chloroplastenmembran sowie für die Funktion der Arabidopside als Substratquelle der JA-Biosynthese.

Erstaunlicherweise wies die von Hyun et al. (2008) als JA-defizient publizierte Mutante *dgl-i* als auch zwei weitere unabhängige *dgl*-RNAi-Linien (*pla-la1* 7-1 und 8-1) bei der Analyse der freien Oxylipine sowohl unter basalen Bedingungen als auch zu frühen Verwundungszeitpunkten in der vorliegenden Arbeit keine starken Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf. Zwei mögliche Gründe könnten die

Ursache für dieses Ergebnis sein. Die basale JA-Konzentration in *A. thaliana* kann einer starken individuellen Variabilität unterliegen. In der Literatur sind basale JA-Gehalte zu finden, welche zwischen Konzentrationen unter dem Limit der Detektionsgrenze (Glauser et al. 2009), ca. 100 pg/g Frischgewicht, und 100 ng/g Frischgewicht variieren. Ursachen dieser individuellen Variabilität sind sicherlich in unterschiedlichen Anzuchtsbedingungen und einem daraus resultierenden unterschiedlichen physiologischen sowie entwicklungsspezifischen Zustand der Pflanzen zu finden. Ein weiterer Grund der mit dem Wildtyp vergleichbaren Akkumulation an freien Oxylipinen in der Mutante *dgl-i* ist möglicherweise in den unterschiedlichen Verwundungsprotokollen zu suchen. Durch persönliche Korrespondenz mit dem Erstautor konnte in Erfahrung gebracht werden, dass die in Hyun et al. (2008) veröffentlichten Oxylipin-Konzentrationen in verwundeten Blättern detektiert wurden, welche nur leicht und nicht visuell sichtbar mittels einer Pinzette verwundet wurden. Im Gegensatz dazu führte in der vorliegenden Arbeit die Behandlung mittels Pinzette stets auch zu einer visuell sichtbaren Verwundung. Dieser Unterschied im Verwundungsprotokoll führte sicherlich zu unterschiedlichen Effekten in der Genexpression sowie in der Akkumulation der freien Oxylipine. Wenn DGL, wie von Hyun et al. (2008) publiziert, das einzige initiale Enzym der JA-Biosynthese unter basalen Bedingungen und zu frühen Verwundungszeitpunkten wäre, müssten die drei unabhängigen RNAi-Linien (*dgl-i*, *pla-la1* 7-1 und 8-1) trotzdem zumindest unter basalen Bedingungen JA-defizient sein. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit alle drei RNAi-Linien mit dem Wildtyp vergleichbare Oxylipin-Konzentrationen unter basalen Bedingungen sowie zu frühen Verwundungszeitpunkten aufwiesen, kann die von Hyun et al. (2008) beschriebene Funktion von DGL innerhalb der JA-Synthese eindeutig widerlegt werden. Darüberhinaus konnte durch Lokalisationsstudien von Frau Ellinger des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum eine eindeutige Lokalisation von DGL an cytosolisch lokalisierten Lipidkörpern gezeigt werden (Ellinger et al. 2010) und somit auch die von Hyun et al. (2008) publizierte plastidäre Lokalisation von DGL widerlegt werden. Jedoch konnten die publizierten dramatischen Akkumulationen an OPDA und JA im Vergleich zum Wildtyp sowie der Zwergenwuchs der DGL-Überexpressionsmutante *dgl-D* reproduziert werden. Dies ist jedoch vermutlich als ein pleiotroper bzw. unspezifischer Effekt der Mutation auf die JA-Biosynthese. Ein publiziertes Beispiel für einen pleiotropen Effekt einer Mutation auf die Synthese von

JA ist die Mutante *cev1*, welche defizient bezüglich der Cellulose-Synthase CeSA 3 ist. Die Mutante *cev1* weist ebenfalls eine im Vergleich zum Wildtyp dramatisch erhöhte JA-Konzentration sowie Zwergenwuchs auf, jedoch konnte eine direkte Beteiligung von CeSA 3 an der JA-Biosynthese nicht gezeigt werden (Ellis and Turner 2001, Ellis et al. 2002b).

Ebenfalls konnte in der vorliegenden Arbeit die von Hyun et al. (2008) beschriebene Beteiligung der Lipase DAD1 an der JA-Biosynthese zu späten Verwundungszeitpunkten in den Blättern von *A. thaliana* bestätigt werden. Da DAD1 trotz der ursprünglichen Klassifizierung als PLA auch eine breite Galaktolipid-Substratspezifität aufweist (Ishiguro et al. 2001, Seo Y. S. et al. 2009), wurden die Gehalte der Galaktolipide unter basalen Bedingungen und zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Verwundung in Blättern von *dad1* und Col-0 analysiert (Abb.III.12.1). Es zeigte sich, dass die Gehalte der Galaktolipide, die nicht oxidierte Fettsäuren gebunden haben, in beiden Arabidopsis-Linien sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Verwundung identisch waren. Jedoch konnten in den Konzentrationen der Arabidopside sowie Galaktolipide, welche ein OPDA-Molekül gebunden hatten, bereits unter basalen Bedingungen Unterschiede verzeichnet werden. Zwei Stunden nach Verwundung akkumulierten die komplexen Lipide (Abkürzungskonvention: x-y-MGDG/DGDG; Acylrest x liegt in sn₁-Position und Acylrest y liegt in sn₂-Position vor) 18:3-16:3-MGDG, 18:3-18:3-MGDG, 18:3-16:3-DGDG sowie 18:3-18:3-DGDG in *dad1*-Mutanten wie im Wildtyp. Die Gehalte der komplexen Lipide 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG, OPDA-16:3-MGDG, OPDA-OPDA-MGDG (Arabidopsid B), OPDA-dnOPDA-MGDG (Arabidopsid A), OPDA-16:3-DGDG und OPDA-OPDA-DGDG (Arabidopsid D) hingegen akkumulierten in verwundeten Blättern der Mutante *dad1* im Vergleich zum Wildtyp um das Fünf- bis Neunfache. Diese Daten sowie die um 70% geringeren Gehalte an den freien Oxylipinen OPDA und JA im Vergleich zum Wildtyp in der späten Wundantwort lassen vermuten, dass DAD1 in Blättern von *A. thaliana* für die Freisetzung von OPDA aus Arabidopsiden nach Verwundung verantwortlich sein könnte. Wäre das Substrat von DAD1 für die JA-Synthese während der späten Wundantwort aus Galaktolipiden freigesetzte α -Linolensäure, müsste dies in *dad1*-Pflanzen zu einer massiven Akkumulation der abundantesten Galaktolipide von *A. thaliana* 18:3-16:3-MGDG, 18:3-18:3-MGDG, 18:3-16:3-DGDG sowie 18:3-18:3-DGDG führen. Trotzdem müssen zusätzlich zu DAD1 noch weitere Lipasen an der Regulation der JA-Synthese in Blättern von *A. thaliana* beteiligt sein.

DAD1 weist eine sn₁-Substratspezifität auf (Ishiguro et al. 2001, Ryu 2004, Seo Y. S. et al. 2009) und hydrolysiert deshalb ausschließlich Fettsäuren sowie Fettsäurederivate (OPDA) aus sn₁-Position eines Glycerolipids. Jedoch können ebenso die sn₂-spezifischen Lipide 16:3 sowie dnOPDA als Substrate der JA-Biosynthese dienen (Weber et al. 1997). Darüberhinaus zeigten die analysierten *dad1*-Pflanzen keine vollständige Defizienz an OPDA. Dies bedeutet, dass entweder weitere sn₁- sowie sn₂-spezifische oder sn₁/sn₂-unspezifische Lipasen die JA-Synthese in Blättern von *A. thaliana* regulieren. Um diese Lipasen zu identifizieren, wurden T-DNA-Insertionsmutanten von 16 weiteren putativ im Chloroplasten lokalisierten Lipasen auf ihre Gehalte an freier OPDA und JA in den Blättern unter basalen Bedingungen sowie nach Verwundung untersucht. Drei der durch bioinformatische Recherche ausgewählten Lipasen konnten nicht analysiert werden, da entweder kein Saatgut erhältlich war oder keine homozygoten Individuen generiert werden konnten. Keine der untersuchten Lipasemutanten wies einen kompletten OPDA- und JA-Verlust unter basalen Bedingungen sowie 30min nach Verwundung auf (Abb.III.19). Es zeigten sich jedoch innerhalb der PLA₁-I-Familie bei den Lipasen PLA₁-Iβ2 (At4g16820), PLA₁-Iγ1 (At1g06800), PLA₁-Iγ2 (At2g30550) und PLA₁-Iγ3 (At1g51440) statistisch signifikant niedrigere JA-Konzentrationen sowohl unter basalen Bedingungen (*pla-ly2* und *pla-ly3*) als auch 30 min nach Verwundung (*pla-ly2* und *pla-ly1*) im Vergleich zum Wildtyp. Um eine mögliche redundante Funktion dieser Lipasen zu untersuchen, wurde die Vierfachmutante *c1x11*, welche in jedem der vier Lipasen codierenden Gene eine T-DNA-Insertion besaß und auf Grund dessen keine Transkription der vier Lipasegene aufwies (Ellinger et al. 2010), auf die Gehalte an freier dnOPDA, OPDA sowie JA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung (0 min, 10 min, 30min und 60 min) analysiert. Zusätzlich wurde eine Analyse der vier Einzelmutanten durchgeführt (Abb.III.20). Die Konzentrationen der freien Oxylipine in analysierten Blättern der Mutante *c1x11* wiesen unter basalen Bedingungen sowie nach 30 min bzw. 60 min nach Verwundung signifikant reduzierte Werte im Gegensatz zum Wildtyp auf. Jedoch konnte auch durch die gleichzeitige Defizienz von vier Lipasen kein kompletter Verlust der JA-Akkumulation erreicht werden. Vielmehr zeigte sich durch die Analyse der Einzelmutanten (*pla-ly2*, *pla-ly1*, *pla-ly2* und *pla-ly3*), dass lediglich der Verlust der Lipasen PLA₁-Iγ3 (At1g51440) und PLA₁-Iγ1 (At1g06800) für die niedrigen Gehalte an freien Oxylipinen der Vierfachmutante ursächlich ist. Die Konzentrationen der freien Oxylipine

dnOPDA, OPDA sowie JA in der Einzelmutante *pla-ly3* entsprachen unter basalen Bedingungen und 10 min nach Verwundung jenen der Vierfachmutante *c1x11*. Eine halbe Stunde bzw. 60 min nach Verwundung hingegen waren die Konzentrationen der freien Oxylipine in der Mutante *c1x11* mit jenen der Einzelmutante *pla-ly1* vergleichbar. So lassen die erhaltenen Daten vermuten, dass die im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedrigeren Gehalte an freien Oxylipinen der Vierfachmutante unter basalen Bedingungen durch den Verlust der Lipase PLA₁-ly3 (At1g51440) hervorgerufen wurden, und der Verlust der Lipase PLA₁-ly1 (At1g06800) eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringere Akkumulation an dnOPDA, OPDA sowie JA verursacht hatte. Trotz der in der Literatur beschriebenen sn₁-Spezifität (Ryu 2004, Seo Y. S. et al. 2009) führten die Einzelmutationen der Gene At1g51440 und At1g06800, ähnlich wie bei der Mutante *dad1*, zu niedrigeren Konzentrationen des Oxylipins dnOPDA im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt vermuten, dass die Proteine PLA₁-ly3 und PLA₁-ly1 entweder keine sn₁/sn₂-Spezifität besitzen oder aber lediglich indirekt die Hydrolyse von Galaktolipiden stimulieren ohne die Hydrolyse selbst zu katalysieren. Da die Analyse der Mutanten *dad1* (PLA₁-lβ2), *pla-ly3* und *pla-ly1* eine Beteiligung dieser Enzyme an der JA-Synthese zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass der gleichzeitige Verlust aller DAD1-ähnlicher Lipasen (PLA₁-lα1, PLA₁-lα2, PLA₁-lβ1, PLA₁-lβ2, PLA₁-ly1, PLA₁-ly2 und PLA₁-ly3) zu einer vollständigen JA-Defizienz führen könnte. Jedoch zeigte die auf der internationalen Veranstaltung „20th International Conference on Plant Growth Substances 2010“ vorgestellte Arbeit von Masaoka et al., dass der gleichzeitige Verlust der Lipasen PLA₁-lα1 (At1g05800), PLA₁-lβ1 (At2g44810), PLA₁-lβ2 (At4g16820), PLA₁-ly1 (At1g06800), PLA₁-ly2 (At2g30550) und PLA₁-ly3 (At1g51440) ebenfalls nicht zu einer vollständigen Ausschaltung JA-Biosynthese in verwundeten Blättern führt. Das analysierte Blattgewebe dieser Sechsfachmutante wies eine Stunde nach Verwundung noch 43% des Wildtypgehaltes an freier JA auf. Diese Daten bestätigen die Annahme, dass zusätzlich sn₂-unspezifische Lipasen oder sn₁/sn₂-unspezifische Lipasen die JA-Synthese in redundanter Weise regulieren, da alle untersuchten Lipasen der Sechsfachmutante als sn₁-spezifisch beschrieben sind (Ryu 2004, Seo Y. S. et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit wäre die Beteiligung einer oder mehrerer unbekannter extraplastidärer Lipase bzw. Lipasen, welche nach Verwundung aktiviert werden und unspezifisch Fettsäuren sowie Oxylipine aus nicht-intakten Chloroplasten stammenden Phospholipiden oder Galaktolipiden freisetzen. So wurde

in der Literatur bereits eine cytosolisch lokalisierte Lipase beschrieben, deren Verlust eine 50%ige Reduktion an freier JA und freier Linolensäure unter basalen Bedingungen verursacht (Yang et al. 2007).

Die Analyse der Lipasemutanten bzgl. einer Beteiligung an der OPDA- und JA-Akkumulation nach einer Infektion mit dem avirulenten Bakterienstamm *P. syringae* DC3000 zeigte, dass keine der analysierten Einzelmutanten signifikant niedrigere Gehalte an den freien Oxylipinen OPDA und JA im Vergleich zum Wildtyp aufwies und somit keines der untersuchten Proteine eine essentielle Funktion innerhalb der Oxylipin-Biosynthese nach einer Infektion mit *P. syringae* DC3000 besitzt. Möglicherweise wird auch die Oxylipin-Synthese nach einer Infektion mit *P. syringae* DC3000 durch die Redundanz von mehreren plastidären Lipasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten reguliert, da lediglich in der Vierfachmutante *c1x11* signifikant niedrigere OPDA-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp und mit dem Wildtyp vergleichbare Gehalte an JA detektiert werden konnten.

Auf Grund der in dieser Arbeit erhaltenen Daten ist eine essentielle Funktion nur einer einzigen der untersuchten chloroplastidären Lipasen zur Freisetzung von dreifach ungesättigten Fettsäuren und Oxylipinen aus der Chloroplastenmembran unter basalen Bedingungen sowie nach Verwundung oder Infektion mit *P. syringae* DC3000 nicht zu vermuten. Nach jetzigem Erkenntnisstand müssten entweder mehrere plastidäre sn_1 -spezifische und sn_2 -spezifische Lipasen redundant an der Regulation der JA-Biosynthese beteiligt sein oder aber die Beteiligung einer oder mehrerer extraplastidärer Lipasen stellen eine Notwendigkeit in der endogenen JA-Biosynthese, wie die Arbeit von Yang et al. 2007 vermuten lässt. Nichts desto trotz müsste die Funktion der drei verbleibenden putativ chloroplastidären Lipasen At1g20130, At1g29120 sowie At5g23530 innerhalb der JA-Generierung in den Blättern von *A. thaliana* noch geklärt werden, da auch eine essentielle Beteiligung einer bis dato noch nicht identifizierten sn_1/sn_2 -unspezifische Lipase bzgl. JA-Synthese nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle IV.1: Beteiligung der getesteten Lipasen an der basalen, frühen wundinduzierten sowie durch *P. syringae* DC3000 induzierten JA-Biosynthese.

Genlocus	JA-defizient	Benennung nach Ryu 2004
At1g05800 (DGL)	nein	AtPLA ₁ -I α 1
At1g06800	nein	AtPLA ₁ -I γ 1
At1g13610	nein	
At1g18360	nein	
At1g20130	unbekannt	
At1g29120	unbekannt	
At1g33270	nein	
At1g51440	nein	AtPLA ₁ -I γ 3
At1g54570	nein	
At1g73480	nein	
At2g30550	nein	AtPLA ₁ -I γ 2
At2g31690	nein	AtPLA ₁ -I α 2
At2g44810 (DAD1)	nein	AtPLA ₁ -I β 1
At3g14075	nein	
At3g26820	nein	
At3g61680	nein	
At4g16820	nein	AtPLA ₁ -I β 2
At5g11650	nein	
At5g14890	nein	
At5g23530	unbekannt	
At5g43860	nein	

3. Arabidopsid-Synthese

In Galaktolipiden veresterte OPDA und dnOPDA kommen ausschließlich in der Familie Brassicaceae und hier vornehmlich in der Art *A. thaliana* vor (Böttcher and Weiler 2007). Sowohl die Funktion als auch die Synthese der Arabidopside (Abb.I.7.) (Andersson et al. 2006, Buseman et al. 2006, Hisamatsu et al. 2003, Hisamatsu et al. 2005, Kourtchenko et al. 2007) sind unklar. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Vertreter der Arabidopside nach Verwundung und Pathogeninfektion dramatisch akkumulieren (Andersson et al. 2006, Kourtchenko et al. 2007). Exogen applizierte Arabidopside bewirken Wachstumshemmung und beschleunigen die Seneszenz. Darüberhinaus wirken sie antimikrobiell. Ob diese Wirkungen eine Bedeutung *in vivo* haben ist jedoch unklar (Hisamatsu et al. 2006, Kourtchenko et al. 2007, Nakajyo et al. 2006). Darüberhinaus scheinen Arabidopside einen Speicher für OPDA bzw. dnOPDA darzustellen. Es wird vermutet, dass nach einem erneuten Stressestimulus OPDA und dnOPDA nicht *de novo* gebildet werden, sondern mittels einer Lipase freigesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass die cytosolische Patatin-Lipase PLA-I (At1g61850) (Ryu 2004) *in vitro* bevorzugt Arabidopside hydrolysiert. Ob die cytosolisch lokalisierte Patatin-Lipase *in vivo* Plastid-lokalisierte

Arabidopside als Substrate annehmen kann ist jedoch unklar. Verlustmutanten dieser Lipase wiesen erniedrigte basale JA-Spiegel auf. Nach Infektion mit *B.cinerea* konnte eine erhöhte Suszeptibilität in diesen Mutanten verzeichnet werden, die jedoch einherging mit wildtypähnlichen JA-Konzentrationen (Yang et al. 2007). Es wird vermutet, dass aus Arabidopsiden freigesetzte OPDA/dnOPDA und frei vorliegende, über den regulären „Vick-Zimmerman“-Syntheseweg gebildete OPDA/dnOPDA und daraus resultierende Metabolite, möglicherweise unterschiedliche Funktionen bei verschiedenen Stresstimuli zukommen (Böttcher and Pollmann 2009). Ob in Arabidopsiden gebundene OPDA/dnOPDA nach einem Stresstimulus wirklich freigesetzt wird und wie die Synthese dieser in Galaktolipiden veresterten OPDA/dnOPDA in *A. thaliana* abläuft, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Es wurden 10 Tage alte Col-0-Pflanzen mit D₅-Linolensäure-Ethylester behandelt. Der Ester wurde rasch aufgenommen, intrazellulär hydrolysiert und in Membranlipide eingebaut. Dabei wurden 24 h nach Applikation des D₅-Linolensäure-Ethylester ein hoher Einbau in freier Linolensäure (43 %) und Phosphatidylcholine (vorallem PC-18:3-18:3, 17,3 % und PC-18:3-18:0, 21,8 %) festgestellt. Entsprechend dem eukaryotischen Lipidsyntheseweg wird D₅-Linolensäure an CoA gebunden, um dann mittels Bindung an ACP am Endoplasmatischen Reticulum in die Lipidsynthese einzufliessen (Ohlrogge and Browse 1995). Durch Aktivität einer Acyltransferase wird D₅-Linolenat aus D₅-Linolensäure-ACP an Glycerol-3-Phosphat verestert. Dieses D₅-Glycerol-3-Phosphat wird mittels Glycerophosphatransacylase zu D₅-Phosphatidsäure (PA) umgewandelt. Durch anschließende Dephosphorylierung entsteht D₅-1,2-Diacyl-Glycerol, aus welchem durch die Aktivität von 1,2-Diacyl-Glycerol-Phosphocholin-Transferase D₅-PC gebildet werden. Anschließend werden D₅-PC in Plastiden transportiert und mittels Monogalaktosyldiacylglycerol-Synthase (Keegstra and Cline 1982) zu MGDG synthetisiert. MGDG können dann durch Übertragung einer Galaktose mittels Digalaktosyldiacylglycerol-Synthase (Heemskerk et al. 1990) zu DGDG umgewandelt werden. Entsprechend diesem Biosyntheseweg nimmt der Markierungsgrad ab, da neu synthetisierte Lipidspezies durch die jeweiligen endogenen Pools von unmarkierten Lipidspezies verdünnt werden. Kein bzw. nur ein geringer Einbau wurde in Lipidspezies festgestellt, deren Diacyl-Glycerol-Komponente ausschließlich in Plastiden über den prokaryotischen Biosyntheseweg gebildet werden wie bspw. 18:3-16:3-MGDG. Durch die Behandlung mit Silbernitrat wurde eine *de-novo*-

Synthese von OPDA und JA induziert. Eine Stunde nach der Silbernitratinduktion wurde der Markierungsgrad putativer Vorläuferlipide mit der Markierung der Produkte (OPDA/JA) verglichen. Dabei wurde erwartet, dass Vorstufe und Produkt einen ähnlichen Markierungsgrad aufweisen, wobei die endogenen Poolgrößen der Vorstufe/Produkte vor und nach der Behandlung mit berücksichtigt wurden. Es zeigte sich, dass nach der Behandlung mit Silbernitrat die D₅-Markierungsgrade der neu gebildeten Oxylipine OPDA und JA jenen von einfach markiertem 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG, Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) und Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) zum Zeitpunkt 0 (24 h nach Inkubation mit D₅-Linolensäure-Ethylester, vor Zugabe von Silbernitrat) entsprachen. Dabei ist zu beachten, dass MGDG-Spezies mit gleichen Fettsäure- bzw. Oxylipinresten in sn₁- und sn₂-Position die Markierung sowohl in sn₁ als auch in sn₂ enthalten können. Im Gegensatz dazu wiesen frei vorliegende Linolensäure sowie Phosphatidylcholine deutlich höhere D₅-Markierung auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Lipide keine unmittelbaren bzw. direkten Vorstufen von OPDA darstellen. Die Ursache des hohen D₅-Markierungsverhältnis an freier Linolensäure ist durch nicht eingebaute cytosolisch vorliegende D₅-Linolensäure zu erklären. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Pools von z.B. Linolensäure in den Blättern gibt, die unterschiedlich stark markiert sind. Bei der Analyse würden dann die Markierungsgrade der Pools gemeinsam integriert. Daher kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Linolensäure in dem untersuchten Modellsystem doch eine direkte Vorstufe von OPDA darstellt. Die plausibelste Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse ist, dass 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG, Arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) und Arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) nahe Vorstufen oder Metabolite von freier OPDA sind, die ihrerseits Vorstufe von JA ist. Neben der Analyse der Markierung wurde auch die absolute Veränderung der Lipidspezies, d.h. der Poolgrößen, nach der Silbernitratbehandlung untersucht. Dabei wurde gefunden, dass durch die Behandlung mit Silbernitrat 1 µg/g TG D₅-OPDA, 0,3 µg/g TG D₅-JA, 33 µg/g TG einfach D₅-markiertes Arabidopsid B sowie 1,9 µg/g TG einfach D₅-markiertes Arabidopsid G neu gebildet wurden. Gleichzeitig führte die Applikation von 1mM Silbernitrat-Lösung in dem untersuchten Pflanzenmaterial zu einer Abnahme von 37 µg/g TG des einfachmarkierten 18:3-18:3-MGDG sowie einer Abnahme von 1,6 µg/g TG des einfachmarkierten 18:3-OPDA-MGDG (Abb.III.25).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass die Synthese in Galaktolipiden veresterter OPDA nicht über die Veresterung von freier OPDA stattfindet, sondern die Enzyme 13-LOX, AOS sowie AOC *in-situ* Linolensäure in MGDG zu OPDA synthetisieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass aus 18:3-18:3-MGDG die Lipide 18:3-OPDA-MGDG/OPDA-18:3-MGDG, Arabidopsid B und Arabidopsid G gebildet werden, welche als Quelle der nach Silbernitratzugabe akkumulierten OPDA und JA zu sehen sind. Auch in der Literatur beschriebene Arbeiten unterstützen dies. So wurde nach Verwundung ebenfalls ein Anstieg von Arabidopsid B und eine gleichzeitige Abnahme von 18:3-OPDA-MGDG sowie 18:3-18:3-MGDG beschrieben (Böttcher and Pollmann 2009, Buseman et al. 2006). Darüberhinaus liegen alle zur OPDA-Synthese notwendigen Enzyme (13-LOX, AOS und AOC) im Chloroplasten konstitutiv vor und sind an der inneren Plastidenmembran sowie der Thylakoidmembran (AOS) assoziiert (Böttcher and Pollmann 2009, Farmaki et al. 2007, Fröhlich et al. 2001). Dies ermöglicht einen direkten Kontakt zu Galaktolipiden, die sowohl in der äußeren als auch inneren Plastidenmembran wie auch in der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Böttcher and Pollmann 2009, Dörmann and Benning 2002). Darüberhinaus wurde für die Lipoxygenase 13-LOX mittels *in-vitro*-Versuchen gezeigt, dass diese direkt an komplexen Lipiden aktiv sein kann (Feussner et al. 2001). Ferner scheint die Generierung von Arabidopsiden mittels Veresterung von freier OPDA fraglich, da die basalen Konzentrationen der Arabidopside jene an freier Linolensäure sowie OPDA teilweise um das Hundertfache übersteigen (Andersson et al. 2006, Buseman et al. 2006, Hisamatsu et al. 2003, Hisamatsu et al. 2005, Kourtchenko et al. 2007, Stelmach et al. 2001, Yang et al. 2007). Auch nach einem Stressstimulus wie Verwundung und Pathogeninfektion ist dies der Fall, bei dem dramatische Anstiege der Arabidopsidspiegel beobachtet werden (Glauser et al. 2008b). Die Enzyme 13-LOX, AOS und AOC (Laudert and Weiler 1998, Park et al. 2002) sowie membrangebundene Linolensäure sind konstitutiv vorhanden, so dass davon auszugehen ist, dass die Biosynthese der Arabidopside durch posttranslationale Aktivierung dieser Enzyme reguliert wird. Die erhaltenen Befunde sind kompatibel mit der Hypothese, dass 18:3-18:3-MGDG und 18:3-16:3-MGDG die Substrate der Biosynthese membrangebundener OPDA und dnOPDA sind. Da die Arabidopsidgehalte bei vielen Stressreaktionen nur transient ansteigen (Buseman et

al. 2006), d.h. in der späten Phase der Stressreaktion wieder abnehmen, werden Arabidopside vermutlich abgebaut und OPDA/dnOPDA durch Hydrolyse freigesetzt. Da Arabidopside jedoch nur in der Familie *Brassicaceae* und hier nur in den Arten *A. thaliana* und *A. arenosa* vorkommen (Böttcher and Weiler 2007, Böttcher and Pollmann 2009) sowie darüber hinaus einen hemmenden Effekt auf das Wurzelwachstum anderer Arten der *Brassicaceae* (Hisamatsu et al. 2005) besitzen, lassen die OPDA/JA-Bildung in Arabidopsis allein über die *in-situ*-Synthese in Galaktolipiden ausschliessen. Vielmehr lässt dies vermuten, dass die *in-situ*-Synthese von OPDA in *A. thaliana* und *A. arenosa* zusätzlich zu der OPDA-Bildung über den klassischen „Vick-Zimmerman“-Syntheseweg existiert. Dies konnte durch Arbeiten an Mutanten, welche bezüglich der Lipoxygenase 2 (LOX2) defizient sind eindrücklich bewiesen werden (Glauser et al. 2009, Seltmann et al. 2010). LOX2-Mutanten können keine Arabidopside bilden, doch sind diese Pflanzen zur Akkumulation von OPDA und JA ähnlich wie der Wildtyp befähigt (Glauser et al. 2009). Dies zeigt, dass der „Vick-Zimmerman“-Syntheseweg in allen Pflanzen einschliesslich Arabidopsis vorkommt.

V. Zusammenfassung

Lipasen regulieren die Biosynthese von Jasmonaten, die eine elementare Signalfunktion bei der Entwicklung von Pflanzen und der Abwehr von Pathogenen haben. Entsprechend dem klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ dienen die aus Galaktolipiden freigesetzten Fettsäuren α -18:3 und 16:3 als Substrate der Jasmonsäure (JA)-Synthese. In den letzten zehn Jahren wurden jedoch die Intermediate der JA-Biosynthese 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA, ausgehend von α -18:3) und Dinor-12-Oxo-Phytodiensäure (dnOPDA, ausgehend von 16:3) verestert in Galaktolipiden der Art *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen. Die Biosynthese und die mögliche Speicherfunktion dieser komplexen, als Arabidopside bezeichneten, Lipide war jedoch noch unklar. In der Literatur wird ein alternativer Syntheseweg postuliert, in dem analog zum klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ die Biosynthese von verestertem OPDA/dnOPDA ausgehend von verestertem α -18:3/16:3 vollständig in Galaktolipiden der Plastidenmembran stattfindet. Nach Freisetzung von OPDA/dnOPDA durch eine Lipase könnten OPDA/dnOPDA dann als Intermediate in die JA-Biosynthese einfließen. Sowohl im klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch im postulierten alternativen Syntheseweg ist die Aktivität von Lipasen von essentieller Bedeutung für die JA-Biosynthese. Für zwei plastidäre sn₁-spezifische Acyl-Hydrolasen, DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 (DAD1) und DONGLE (DGL), wurde eine zentrale Funktion innerhalb der Jasmonat-Biosynthese in Blättern von *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Dem zufolge ist DGL für die basalen und die frühen wundinduzierten JA-Gehalte und DAD1 für die Aufrechterhaltung der erhöhten JA-Konzentrationen in der späteren Verwundungsantwort verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wiesen drei unabhängige DGL-RNAi-Linien sowie DAD1-Knock-out-Mutanten sowohl unter basalen Bedingungen als auch zu frühen Zeitpunkten nach Verwundung sowie nach Infektion mit dem Bakterienstamm *P. syringae* DC3000 (*avrRPM1*) mit dem Wildtyp vergleichbare Konzentrationen an OPDA/JA auf. Dies steht im klaren Widerspruch zu den publizierten Daten. Die Beteiligung von DAD1 an der OPDA/JA-Biosynthese zu späten Zeitpunkten nach Verwundung konnte jedoch bestätigt werden. Ferner konnte eine dramatische Überakkumulation von Arabidopsiden in DAD1-defizienten Mutanten nach Verwundung nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung von DAD1 bei der Freisetzung von membrangebundener OPDA/dnOPDA hinweist. Die Analyse der Einzelmutanten 16 weiterer plastidärer Lipasen unter basalen Bedingungen, nach Verwundung sowie

nach Infektion mit *P. syringae* DC3000 (*avrRPM1*) zeigte, dass keine der analysierten Mutanten eine essentielle Rolle in der JA-Biosynthese spielt. Jedoch wiesen Mutanten der sn_1 -spezifischen Lipasen *AtPLA₁-ly1* (At1g06800) signifikant niedrigere Konzentrationen an dnOPDA, OPDA und JA nach Verwundung auf, was eine indirekte Beteiligung an der JA-Biosynthese vermuten lässt. Blattgewebe einer Quadrupel-Mutanten, welche defizient in vier DAD1-ähnlichen Lipasen (*AtPLA₁-lβ2*, *AtPLA₁-ly1*, *AtPLA₁-ly2*, *AtPLA₁-ly3*) ist, wies nach Verwundung mit der *AtPLA₁-ly1*-Mutante vergleichbar niedrige Gehalte an dnOPDA, OPDA sowie JA auf. Da stets in sn_2 -Position vorliegende 16:3/dnOPDA ebenfalls Substrat der JA-Biosynthese sein kann, müssen zusätzlich zu DAD1 und *AtPLA₁-ly1* noch weitere nicht identifizierte sn_1 - und sn_2 -spezifische Acyl-Hydrolasen an der JA-Biosynthese nach Verwundung und Pathogeninfektion beteiligt sein. Dies bedeutet, dass entgegen der in der Literatur vertretenen Meinung, nicht eine sondern mehrere Lipasen in redundanter Weise die Biosynthese von Jasmonaten regulieren.

Zur Aufklärung der Biosynthese und möglichen Speicherfunktion der ausschließlich in Arabidopsis vorkommenden Arabidopside wurden *A. thaliana* Keimlinge mit D₅-Linolensäure-Ethylester inkubiert, um eine D₅-Markierung der komplexen Lipide zu erzielen. Durch einen anschließenden Stresstimulus mittels Zugabe von Silbernitrat wurde die Jasmonat-Synthese induziert. Die vergleichende Analyse der Markierungsgrade der komplexen Membranlipide MGDG, DGDG, PC sowie der freien OPDA und JA vor und nach Zugabe des Silbernitrats zeigte, eine hohe Übereinstimmung der Markierungsgrade der komplexen Membranlipide 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B (MGDG-OPDA-OPDA) und Arabidopsid G (OPDA-MGDG-OPDA-OPDA) vor der Silbernitratbehandlung mit denjenigen der durch Silbernitratbehandlung neu gebildeten OPDA/JA. Dagegen wird die hochmarkierte freie Linolensäure nicht direkt zu freier OPDA umgesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B und Arabidopsid G direkte Vorstufen von freier OPDA sein können. Damit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass nach Silbernitratstress die Spiegel der Vorstufe 18:3-18:3-MGDG abnehmen und zeitgleich die entsprechenden unmittelbaren Metabolite 18:3-OPDA-MGDG, Arabidopsid B und Arabidopsid G akkumulieren. Die Arabidopsidsynthese findet daher entsprechend dem alternativen Biosyntheseweg in Galaktolipiden *in-situ* statt. Für die Akkumulation von Arabidopsiden ist eine 13-Lipoxygenase (LOX2) essentiell. 13-Lipoxygenase 2

(LOX2) defiziente *A. thaliana* Pflanzen können daher keine Arabidopside bilden. Da diese Mutanten aber dennoch in der Lage sind, OPDA und JA nach Stresseinwirkung zu synthetisieren ist die Biosynthese von dnOPDA, OPDA und JA entsprechend dem Vick-Zimmerman-Pathway“ ebenfalls möglich. Somit wird dnOPDA/OPDA in *A. thaliana* sowohl über den klassischen „Vick-Zimmerman-Pathway“ als auch über den alternativen Syntheseweg gebildet.

Summary

Lipases regulate the biosynthesis of jasmonates. Jasmonates have an essential role in the development and defense of plants. According to the classical „Vick-Zimmerman-Pathway“ α -18:3/16:3 released by hydrolases out of galactolipids serve as substrate for the biosynthesis of jasmonic acid. In the last ten years also the metabolites of the biosynthesis of jasmonic acid OPDA (derived from α -18:3) and dnOPDA (derived from 16:3) were found to be esterified in galactolipids of *Arabidopsis*. The synthesis and function of these complex lipids, named arabidopsides, is yet not known. An alternative Pathway is postulated in the literature. According to this the synthesis of dnOPDA/OPDA takes place in galactolipids. Free dnOPDA/OPDA released by hydrolases may then serve as substrates for the biosynthesis of jasmonic acid. In the classical „Vick-Zimmerman-Pathway“ as well as in the alternative Pathway the activity of lipases have an essential impact on the biosynthesis of jasmonates. Two plastidic acyl-hydrolases with sn_1 -substrate specificity, DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 (DAD1) and DONGLE (DGL), were published to have an essential role in the biosynthesis of jasmonates in leaves of *Arabidopsis thaliana*. DGL should be responsible for the formation of jasmonic acid under basal conditions and at early timepoints after wounding, DAD1 should maintain the elevated concentrations of jasmonic acid at later timepoints after wounding.

In this work the involvement of DAD1 in the biosynthesis of OPDA/JA at later timepoints after wounding was confirmed. However, no differences could be detected in three independent DGL-RNAi-lines and DAD1-knock-out-mutants in comparison to the wild type under basal conditions and at early timepoints after wounding which is contradictory to the published data. In addition, in these mutants wild type oxylipin levels were found after infection with an avirulent bacterial strain of *Pseudomonas syringae*. Furthermore DAD1-deficient mutants displayed dramatic accumulation of arabidopsides at later timepoints after wounding. Therefore it is suspected that DAD1 is responsible for the release of OPDA esterified in galactolipids. The analysis of single mutants of 16 additional lipases localised in plastids showed no strong differences in comparison to the wildtype under basal conditions, after wounding as well as after infection with *P. syringae*. Hence, none of the tested lipases plays an essential role in the biosynthesis of jasmonates. However mutants of the sn_1 -specific acyl-hydrolase *AtPLA₁-ly1* (At1g06800) showed significant lower concentrations of dnOPDA, OPDA and JA after wounding in comparison to the wildtype. This indicates

an involvement of *AtPLA₁-ly1* in the biosynthesis of jasmonates. A quadruple mutant defective in four DAD1-like lipases (*AtPLA₁-lβ2*, *AtPLA₁-ly1*, *AtPLA₁-ly2*, *AtPLA₁-ly3*) displayed jasmonate levels similar to the mutant line of *AtPLA₁-ly1* after wounding. The lipids 16:3/dnOPDA are always esterified in sn₂ position of glycerolipids. Furthermore 16:3/dnOPDA may also serve as substrates for the biosynthesis of jasmonic acid. The results suggest that, in addition to DAD1 and *AtPLA₁-ly1*, still unidentified enzymes with sn₁- and sn₂-hydrolase activity are involved in wound- and pathogen-induced jasmonate formation, indicating functional redundancy within the lipase family.

To clarify the biosynthesis and storage function of arabidopsides, seedlings of *A.thaliana* were incubated with D₅-linolenic acid ethyl ester to produce labelling of complex membrane lipids. Subsequent application of silver nitrate induced the biosynthesis of jasmonates. The analysis of the complex lipids MGDG, DGDG, PC as well as OPDA/JA before and after treatment with silver nitrate showed a high consistency of labelling of the complex lipids 18:3-18:3-MGDG, 18:3-OPDA-MGDG, arabidopsid B (OPDA-OPDA-MGDG) as well as arabidopsid G (OPDA-OPDA-MGDG-OPDA) before application of silver nitrate with labelling of the newly synthesised OPDA/JA induced by treatment with silver nitrate. The results suggest, that MGDG-18:3-18:3, 18:3-OPDA-MGDG, arabidopsid B and arabidopsid G are precursors or metabolites of free OPDA, which is a precursor of JA. Furthermore, simultaneous decrease of 18:3-18:3-MGDG and concomitant increase of arabidopsid B and arabidopsid G after application of silver nitrate could be shown. This suggests synthesis of OPDA/dnOPDA *in-situ* via the alternative pathway. However, mutants of 13-lipoxygenase 2 (LOX2) possess no esterified dnOPDA/OPDA, but display wildtype-like concentrations of dnOPDA, OPDA and JA. Hence, in *A. thaliana* the formation of dnOPDA/OPDA takes place via the classical „Vick-Zimmerman-Pathway“ as well as via the alternative pathway.

Literaturverzeichnis

Adham A. R., Zolman B. K., Millius A., Bartel B. 2005. Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *The Plant Journal* (41): 859-874.

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 Physiology* (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. Oxylin profiling of the hypersensitive response in Arabidopsis thaliana. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *The Journal of Biological Chemistry* (281): 31528-31537.

Balbi V., Devoto A. 2008. Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist* (177): 301-318.

Benning C. 2004. Genetic mutant screening by direct metabolite analysis. *Analytical Biochemistry* (332): 1-9.

Blee E. 1998. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* (37): 33-72.

—. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* (7): 315-322.

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 Letters* (437): 281-286.

Bonaventure G., Salas J. J., Pollard M. R., Ohlrogge J. B. 2003. Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant Cell* (15): 1020-1033.

Böttcher C., Weiler E. W. 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., Baertschi S. W., Ingram C. D., Harris T. M. 1988. Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (85): 3382-3386.

Browse J., Warwick N., Somerville C. R., Slack C. R. 1986. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* (235): 25-31.

Browse J., McConn M., James D., Jr., Miquel M. 1993. Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* (268): 16345-16351.

Browse J. A., Somerville C. R. 1994. Glycerolipids. In Meyerowitz, E.M. & Somerville, S.R. eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 881-912.

Buseman C. M., et al. 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* (142): 28-39.

Cheong Y. H., Chang H. S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (129): 661-677.

Chung H. S., Koo A. J., Gao X., Jayanty S., Thines B., Jones A. D., Howe G. A. 2008. Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* (146): 952-964.

Cohen Y., Gisi U., Niderman T. 1993. Local and Systemic Protection against *Phytophthora-Infestans* Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl-Ester. *Phytopathology* (83): 1054-1062.

Conconi A., Miquel M., Browse J. A., Ryan C. A. 1996. Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Plant Physiology* (111): 797-803.

Creelman R. A., Mullet J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (92): 4114-4119.

Dai L., Xu L., Huang D., Li X., Luo K., Guan C. 2002. ASK1 physically interacts with COI1 and is required for male fertility in *Arabidopsis*. *Science in China Series C: Life Sciences* (45): 631-636.

Dathe W., Kramell H. M., Daeter W., Kramell R., Slovik S., Hartung W. 1993. Uptake of Jasmonic Acid and Related-Compounds by Mesophyll Protoplasts of the Barley Leaf. *Journal of Plant Growth Regulation* (12): 133-140.

Delker C., Stenzel I., Hause B., Miersch O., Feussner I., Wasternack C. 2006. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*--enzymes, products, regulation. *Plant Biology* (8): 297-306.

Devaiah S. P., Roth M. R., Baughman E., Li M., Tamura P., Jeannotte R., Welti R., Wang X. 2006. Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase Dalpha1 knockout mutant. *Phytochemistry* (67): 1907-1924.

Devoto A., Turner J. G. 2003. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* (92): 329-337.

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 Molecular Biology* (58): 497-513.

Devoto A., Nieto-Rostro M., Xie D., Ellis C., Harmston R., Patrick E., Davis J., Sherratt L., Coleman M., Turner J. G. 2002. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* (32): 457-466.

Dombrecht B., et al. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* (19): 2225-2245.

Dörmann P., Benning C. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* (7): 112-118.

Ellinger D., Stingl N., Kubigsteltig, II, Bals T., Juenger M., Pollmann S., Berger S., Schuenemann D., Mueller M. J. 2010. DONGLE and DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiology* (153): 114-127.

Ellis C., Turner J. G. 2001. The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* (13): 1025-1033.

Ellis C., Karafyllidis I., Turner J. G. 2002a. Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant Microbe Interaction* (15): 1025-1030.

Ellis C., Karafyllidis I., Wasternack C., Turner J. G. 2002b. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* (14): 1557-1566.

Farmaki T., Sanmartin M., Jimenez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., Leon J., Sanchez-Serrano J. J. 2007. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* (58): 555-568.

Farmer E. E., Ryan C. A. 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *The Plant Cell* (4): 129-134.

Farmer E. E., Almeras E., Krishnamurthy V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* (6): 372-378.

Feussner I., Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* (53): 275-297.

Feussner I., Kuhn H., Wasternack C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in Plant Science* (6): 268-273.

Feys B., Benedetti C. E., Penfold C. N., Turner J. G. 1994. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant Cell* (6): 751-759.

Frentzen M., Heinz E. 1983. Membranlipid-Biosynthese in Chloroplasten. *Biologie in unserer Zeit* (6): 178-187.

Fröhlich J. E., Itoh A., Howe G. A. 2001. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* (125): 306-317.

Gfeller A., Dubugnon L., Liechti R., Farmer E. E. 2010. Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling* (3): cm3.

Gidda K., Miersch O., Schmidt J., Wasternack C., Varin L. 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* (278): 17895–17900.

Glauser G., Grata E., Rudaz S., Wolfender J. L. 2008a. High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (22): 3154-3160.

Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E., Wolfender J. L. 2008b. Spatial and temporal dynamics of Jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *The Journal of Biological Chemistry* (283):16400-16407.

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*. *The Journal of Biological Chemistry* (284): 34506-34513.

Grun C., Berger S., Matthes D., Müller M. J. 2007. Early accumulation of non-enzymatically synthesized oxylipins in *Arabidopsis* after infection with *P. syringae*. *Functional Plant Biology* (34): 65-71.

Gundlach H., Muller M. J., Kutchan T. M., Zenk M. H. 1992. Jasmonic Acid Is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant-Cell Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (89): 2389-2393.

Hamberg M., Fahlstadius P. 1990. Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (276): 518-526.

Härtel H., Dormann P., Benning C. 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (97): 10649-10654.

Härtel H., Lokstein H., Dormann P., Grimm B., Benning C. 1997. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* (115): 1175-1184.

Heemskerk J. W., Storz T., Schmidt R. R., Heinz E. 1990. Biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol in plastids from 16:3 and 18:3 plants. *Plant Physiology* (93): 1286-1294.

Heinz E. 1977. Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (Springer-Verlag, Berlin): 102-120.

Hilson P., et al. 2004. Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: Transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Research* (14): 2176-2189.

Hisamatsu Y., Goto K., Hasegawa H., Shigemori H. 2003. Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letters* (44): 5553-5556.

Hisamatsu Y., Goto N., Hasegawa K., Shigemori H. 2006. Senescence-promoting effect of arabidopside A. *Zeitung für Naturforschung [C]* (61): 363-366.

Hisamatsu Y., Goto N., Sekiguchi M., Hasegawa K., Shigemori H. 2005. Oxylipins arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Natural Products* (68): 600-603.

Hyun Y., et al. 2008. Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Developmental Cell* (14): 183-192.

Imbusch R., Mueller M. J. 2000a. Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radical Biology & Medicine* (28): 720-726.

—. 2000b. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F(1) (phytoprostanes F(1)) in plants. *Plant Physiology* (124): 1293-1304.

Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. 2001. The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE 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*. *The Plant Cell* (13): 2191-2209.

Kallenbach M., Alagna F., Baldwin I. T., Bonaventure G. 2010. *Nicotiana attenuata* SIPK, WIPK, NPR1, and Fatty Acid-Amino Acid Conjugates Participate in the Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis by Affecting Early Enzymatic Steps in the Pathway. *Plant Physiology* (152): 96-106.

Keegstra K., Cline K. 1982. Evidence that Envelope and Thylakoid Membranes from Pea Chloroplasts Lack Glycoproteins. *Plant Physiology* (70): 232-237.

Kelly A. A., Dörmann P. 2004. Green light for galactolipid trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* (7): 262-269.

Kobayashi K., Nakamura Y., Ohta H. 2009. Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* (47): 518-525.

Koch T., Bandemer K., Boland W. 1997. Biosynthesis of cis-jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helvetica Chimica Acta* (80): 838–850.

Koo A. J. K., Gao X., Jones A. D., Howe G. A. 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *The Plant Journal* (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 Physiology* (145): 1658-1669.

Kramell R., Miersch O., Atzorn R., Parthier B., Wasternack C. 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* (123): 177-188.

Laudert D., Weiler E. W. 1998. Allene oxide synthase: a major control point in Arabidopsis thaliana octadecanoid signalling. *The Plant Journal* (15): 675-684.

Laudert D., Schaller F., Weiler E. W. 2000. Transgenic Nicotiana tabacum and Arabidopsis thaliana plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* (211): 163-165.

Laudert D., Pfannschmidt U., Lottspeich F., Hollander-Czytko H., Weiler E. W. 1996. Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology* (31): 323-335.

Laxalt A. M., Munnik T. 2002. Phospholipid signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* (5): 332-338.

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.

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. *The Plant Cell* (16): 1938-1950.

McConn M., Browse J. 1996. The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *The Plant Cell* (8): 403-416.

McConn M., Creelman R. A., Bell E., Mullet J. E., Browse J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (94): 5473-5477.

Meijer H. J., Munnik T. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* (54): 265-306.

Memelink J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* (70): 1560-1570.

Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J., 2nd. 1990. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (87): 9383-9387.

Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. 2008. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* (47):511-517.

Müller M. 1997. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* (100): 653-663.

Müller M. J., Mene-Saffrane L., Grun C., Karg K., Farmer E. E. 2006. Oxylipin analysis methods. *The Plant Journal* (45): 472-489.

Müller S., Hilbert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Mueller M. J., Berger S. 2008. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* (20): 768-785.

Mullis K. B., Faloona F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* (155): 335-350.

Munnik T., Musgrave A. 2001. Phospholipid signaling in plants: holding on to phospholipase D. *Science Signaling* (2001): pe42.

Murata N., Nishida I. 1987. Lipids of blue-green algae (cyanobacteria). *The Biochemistry of Plants* (9): 315-347.

Nakajyo H., Hisamatsu Y., Sekiguchi M., Goto N., Hasegawa K., Shigemori H. 2006. Arabidopside F, a new oxylipin from Arabidopsis thaliana. *Heterocycles* (69): 295-+.

Ohlrogge J., Browse J. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* (7): 957-970.

Ohnishi J. I., Yamada M. 1982. Glycerolipid Synthesis in Avena Leaves during Greening of Etiolated Seedlings-ii - Synthesis of Alpha-Linolenoyl-Monogalactosyl Diacylglycerol from Liposomal Linoleoyl-Phosphatidylcholine

by Avena Plastids in the Presence of Phosphatidylcholine-Exchange Protein. *Plant and Cell Physiology* (23): 767-773.

Padham A. K., Hopkins M. T., Wang T. W., McNamara L. M., Lo M., Richardson L. G., Smith M. D., Taylor C. A., Thompson J. E. 2007. Characterization of a plastid triacylglycerol lipase from Arabidopsis. *Plant Physiology* (143): 1372-1384.

Parchmann S., Gundlach H., Müller M. J. 1997. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* (115): 1057-1064.

Park J. H., Halitschke R., Kim H. B., Baldwin I. T., Feldmann K. A., Feyereisen R. 2002. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* (31): 1-12.

Richmond T. A., Bleecker A. B. 1999. A defect in beta-oxidation causes abnormal inflorescence development in Arabidopsis. *The Plant Cell* (11): 1911-1924.

Ryu S. B. 2004. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science* (9): 229-235.

Sanders P. M., Lee P. Y., Biesgen C., Boone J. D., Beals T. P., Weiler E. W., Goldberg R. B. 2000. The arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* (12): 1041-1061.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (74): 5463-5467.

Schaller F., Zerbe P., Reinbothe S., Reinbothe C., Hofmann E., Pollmann S. 2008. The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*: localization and cyclization. *FEBS Journal* (275): 2428-2441.

Schweizer P., Gees R., Mosinger E. 1993. Effect of Jasmonic Acid on the Interaction of Barley (*Hordeum-Vulgare* L) with the Powdery Mildew *Erysiphe-graminis* F Sp *Hordei*. *Plant Physiology* (102): 503-511.

Seltmann M. A., Stingl N. E., Lautenschlaeger J. K., Krischke M., Mueller M. J., Berger S. 2010. Differential Impact of Lipxygenase 2 and Jasmonates on Natural and Stress-Induced Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (152): 1940-1950.

Sembdner G., Parthier B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (44): 569–589.

Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., Lee Y. W., Hwang I., Lee J. S., Choi Y. D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (98): 4788-4793.

Seo Y. S., Kim E. Y., Kim J. H., Kim W. T. 2009. Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* (583): 2301-2307.

Sigal E. 1991. The Molecular-Biology of Mammalian Arachidonic-Acid Metabolism. *American Journal of Physiology* (260): L13-L28.

Staswick P. E., Tiriyaki I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* (16): 2117-2127.

Staswick P. E., Su W., Howell S. H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana*

mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (89): 6837-6840.

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*. *The Journal of Biological Chemistry* (276): 12832-12838.

Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I., Wasternack C. 2003. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* (51): 895-911.

Stintzi A., Browse J. 2000. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (97): 10625-10630.

Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J., Farmer E. E. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (98): 12837-12842.

Szyroki A., et al. 2001. KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (98): 2917-2921.

Taki N., et al. 2005. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (139): 1268-1283.

Thaler J. S., Owen B., Higgins V. J. 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* (135): 530-538.

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 Physiology* (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.

Thoma I., Loeffler C., Sinha A. K., Gupta M., Krischke M., Steffan B., Roitsch T., Mueller M. J. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal* (34): 363-375.

Thomma B. P. H. J., Broekaert W. F. 1998. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* (36): 533-537.

Thomma B. P. H. J., Eggermont K., Penninckx I. A. M. A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (95): 15107-15111.

Turner J. G., Ellis C., Devoto A. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* (14 Suppl): S153-164.

Vick B. A., Zimmerman D. C. 1984. Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiology* (75): 458-461.

von Malek B., van der Graaff E., Schneitz K., Keller B. 2002. The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene

encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* (216): 187-192.

Wang C., Zien C. A., Afithile M., Welti R., Hildebrand D. F., Wang X. 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in arabidopsis. *The Plant Cell* (12): 2237-2246.

Wang X. 2004. Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* (7): 329-336.

Wasternack C. 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* (100):681-697.

Wasternack C., Xie D. 2010. The genuine ligand of a jasmonic acid receptor: Improved analysis of jasmonates is now required. *Plant Signaling & Behaviour* (5):337-340.

Wasternack C., Kombrink E. 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* (5): 63-77.

Weber H., Vick B. A., Farmer E. E. 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (94): 10473-10478.

Weichert H., Kohlmann M., Wasternack C., Feussner I. 2000. Metabolic profiling of oxylipins upon sorbitol treatment in barley leaves. *Biochemical Society Transactions* (28): 861-862.

Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H. E., Rajashekar C. B., Williams T. D., Wang X. 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* (277): 31994-32002.

Xie D. X., Feys B. F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J. G. 1998. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* (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. *The Plant Cell* (14): 1919-1935.

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 Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *The Journal of Biological Chemistry* (282): 18116-18128.

Zhang Y., Turner J. G. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *Public Library of Science One* (3): e3699.

Lebenslauf

Name: Nadja Stingl
Geboren am: 11.05.1980
Geboren in: Würzburg

Schulausbildung

09/86-07/90 Gustav-Walle-Grundschule in Würzburg

09/90-06/99 Siebold-Gymnasium in Würzburg, abgeschlossen mit der
Allgemeinen Hochschulreife.

Akademische Ausbildung

10/99-08/01 Studium der Rechtswissenschaften an der Julius-Maximilians-
Universität in Würzburg

10/01-08/06 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität in
Würzburg, abgeschlossen als Diplom Biologin.
Diplomarbeit mit dem Thema „Herstellung von ¹⁸O-markierten
Standardverbindungen und Etablierung eines Aufarbeitungs-
Verfahrens zur Analyse von Phytohormonen in *Arabidopsis
thaliana* mittels GC-MS“ am Lehrstuhl für Pharmazeutische
Biologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. M. J. Müller und
Dr. G. Gresser.

09/06-06/10 Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl
für Pharmazeutische Biologie.
Die Promotion erfolgt im Rahmen des Sonderforschungsbereich-
es 567 Teilprojekt A2 sowie des Graduiertenkollegs 1342 Lipid
Signalling

Seit 08/10 Clinical Research Associate bei der Firma SOMNOmedics
GmbH in Randersacker

Publikationen

Efetova M, Zeier J, Riederer M, Lee CW, Stingl N, Mueller M, Hartung W, Hedrich R, Deeken R., A central role of abscisic acid in drought stress protection of Agrobacterium-induced tumors on Arabidopsis. *Plant Physiology* **145(3)**: 853-862 (2007).

Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S., Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152(4)**: 1940-1950 (2010).

***Ellinger D, *Stingl N, Kubigsteltig II, Bals T, Juenger M, Pollmann S, Berger S, Schuenemann D, Mueller MJ.**, DONGLE and DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiology* **153(1)**:114-127 (2010).

*Equally contributing first author

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. M. J. Müller für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas. Sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine Unterstützung und Betreuung werden mir noch lange in Erinnerung bleiben und ein Vorbild sein.

Ein herzlichen Dank möchte ich Frau PD Dr. S. Berger aussprechen, die mich in molekularbiologischen Fragen stets unterstützt und betreut hat.

Herrn Dr. Markus Krischke danke ich für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung im Bereich der Analytik.

Herrn Prof. Dr. W. Kaiser danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie. Gerne erinnere ich mich an die harmonische Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich Maria Zöller, Beate Stephan, Stefan Müller, Markus Peer, Martin Seltsmann, Barbara Dierich, Simone Findling und Dr. Gabriele Gresser danken. Meiner Diplomantin Gitte Barknowitz möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Sonderforschungsbereich 567 der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Graduiertenkolleg 1342 „Lipid signalling“.

Mein innigster Dank gilt meinem Freund Markus Sinn. Seine Gelassenheit, Geduld und stetige Bereitschaft mich in manch schwieriger Situation zu unterstützen, trugen in großem Maße zur Erstellung dieser Arbeit bei. DANKE 🐾.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich besonders danken, da sie mich in meiner Entscheidung zu promovieren stets unterstützten – finanziell wie moralisch. Insbesondere der Leitspruch meines Vaters und Großvaters „Lehrjahre sind keine Herrenjahre“ trieb mich im positiven Sinne immer wieder an.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Nadja Stingl