

Funktionelle Untersuchungen zur Oxylin-abhängigen
Regulation von Hitzeschockproteinen
in *Arabidopsis thaliana*



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Miriam Münch

geboren in

Bad Dürkheim

Würzburg 2016

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Oxylipine und ihre Biosynthese	1
1.2	RES-Oxylipine bilden eine Untergruppe der Oxylipine	6
1.2.1	RES-Oxylipine als Signalmoleküle: physiologische Wirkung und Funktion..	9
1.2.2	Die Signaltransduktion der RES-Oxylipine	12
1.3	Pflanzliche Reaktionen auf Hitzestress: Hitzeschockantwort und Thermotoleranz	15
1.3.1	Die Hitzeschockproteine: hoch konservierte Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.3.2	Hitzestress: Perzeption und Signaltransduktion in <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
1.3.3	Chemische Induktoren einer Hitzeschock-ähnlichen Reaktion.....	22
1.4	Zielsetzung	25
2	Material und Methode	27
2.1	Chemikalien, Lösungen und andere Reagenzien.....	27
2.2	Enzyme, Puffer und Kits	28
2.3	Antikörper und verwendetes Material für die Proteinbiochemie	28
2.4	Primer für die realtime PCR.....	29
2.5	Geräte	29
2.6	Pflanzenmaterial	31
2.7	Anzucht und Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.7.1	Pflanzenanzucht auf Erde.....	32
2.7.2	Pflanzenanzucht in und auf MS-Medium	32
2.8	Sterilisation der Samen	33
2.9	Pflanzenphysiologische Methoden und Behandlungen der Pflanzen	34
2.9.1	Hitzebehandlung und Behandlung mit RES-Oxylipinen und anderen Substanzen	34
2.9.2	Verwundung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34

2.9.3	Behandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit PEG6000 und Sorbitol als osmotischer Stressor.....	35
2.9.4	Bestimmung der Überlebensrate von <i>Arabidopsis thaliana</i> (chemisch induzierte Thermotoleranz)	35
2.9.5	Thermotoleranz-Assays mit <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0- und <i>dde2</i> -Keimlingen.....	36
2.10	Molekularbiologische Methoden	37
2.10.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial.....	37
2.10.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	37
2.10.3	DNase-Verdau und Fällung der RNA.....	37
2.10.4	Synthese der cDNA	37
2.10.5	Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels realtime PCR.....	38
2.11	Proteinbiochemische Methoden	39
2.11.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	39
2.11.2	Konzentrationsbestimmung des Proteinextrakts	39
2.11.3	Dot Blot und Immunodetektion mittels ChemiDoc™ MP.....	39
2.12	Analytische Methoden.....	40
2.12.1	Extraktion von Phytohormonen.....	40
2.12.2	Bestimmung und Quantifizierung von Phytohormonen	41
2.12.3	Extraktion von Raffinose	43
2.12.4	Bestimmung und Quantifizierung von Raffinose	43
2.13	<i>In-silico</i> -Analyse zweier verschiedener Microarray-Daten.....	45
2.14	Statistische Auswertung	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Charakterisierung der RES-Oxylipin-induzierten Genexpression von Hitzeschockgenen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.1.1	Vergleich zwischen RES-Oxylipin- und Hitze-induzierten Transkriptom <i>in silico</i>	46

3.1.2	Vergleich der Induktion durch RES-Oxylipine bzw. Hitze von vier repräsentativen Hitzeschockgenen <i>in vivo</i>	50
3.2	Identifizierung von Signaltransduktionskomponenten der RES-Oxylipine.....	53
3.2.1	Der putative OPDA-Rezeptor CYP20-3 und sein Interaktionspartner SAT1	53
3.2.2	Die Masterregulatoren der HSR: HSFA1 a,b,d und e	55
3.2.3	HSFA1-abhängige Akkumulation von Raffinose während Hitze	57
3.3	Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen RES-Oxylipinen und der Induktion von Hitzeschockgenen	59
3.3.1	Screening strukturell verschiedener RES hinsichtlich ihrer Hitzeschockgen-Induktion.....	59
3.3.2	Untersuchung eines möglichen additiven Effekts von RES-Oxylipinen und Hitze auf die Expression von Hitzeschockgenen.....	67
3.4	Untersuchung einer möglichen Korrelation der endogenen Oxylipin-Akkumulation während verschiedenen Stress-Behandlungen mit der Genexpression von Hitzeschockgenen	68
3.4.1	Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach Hitzestress in <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
3.4.2	Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach Verwundung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
3.4.3	Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach osmotischen Stress in <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.5	Funktionelle Untersuchung der biologischen Relevanz von RES-Oxylipinen in der Thermotoleranz von <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
3.5.1	Können RES-Oxylipine eine chemisch induzierte Thermotoleranz vermitteln?	79
3.5.2	Thermotoleranz-Assays mit Wildtyp und Jasmonat-defizienten <i>dde2</i> -Keimlingen.....	81
4	Diskussion.....	84
5	Zusammenfassung.....	97

6	Summary.....	100
7	Literaturverzeichnis.....	103
8	Anhang	116

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
bspw.	beispielsweise
BT	engl.: basal thermotolerance (basale Thermotoleranz)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA)
CEL	Celastrol
COI1	Coronatin Insensitiv 1
Col-0	Columbia 0 (<i>Arabidopsis thaliana</i> -Ökotyp)
COX	Cyclooxygenase
CT-Wert	engl.: cycle threshold-Wert
CYP20-3	Cyclophilin 20-3
DBMIB	Dibromthymochinon
<i>dde2</i>	engl.: <i>delayed dehiscence 2</i> (-Mutante)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Divinylether-Synthase
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Dioxygenase
E	Einstein
EGTA	Ethylenbisoxoethylennitilotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-	negative Elektrospray-Ionisation
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
GDA	Geldanamycin
GLV	engl.: green leaf volatiles (Grüne Blattduftstoffe)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HNE	Hydroxynonenal
HO·	Hydroxyl-Radikal
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HSE	Hitzeschock-Element
HSF	engl.: heat shock factor (Hitzeschock-Transkriptionsfaktor)
HSP	engl.: heat shock protein (Hitzeschockprotein)
HSR	engl.: heat shock response (Hitzeschockantwort)
Hz	Hertz
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
LOX	Lipoxygenase
M	molar
MeJA	Methyljasmonat
MDA	Malondialdehyd
min	Minute

M-MLV	engl.: Moloney Murine Leukemia Virus (murines Leukämievirus)
MRM	engl.: Multiple Reaction Monitoring
mRNA	engl.: messenger RNA
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
MVK	Methylvinylketon
MW	Mittelwert
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
<i>opr3</i>	engl.: <i>opda-reductase 3</i> (-Mutante)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PG	Prostaglandine
PP	Phytprostane
PS II	Photosystem II
RAD	Radicicol
RES	engl.: reactive electrophile species (reaktive elektrophile Spezies)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	engl: reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
rtPCR	engl.: realtime PCR (Echtzeit-PCR)
PUFA	engl.: polyunsaturated fatty acids (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
SA	Salicylsäure
SAT	eng.: short-term acquired thermotolerance (kurzzeitig erworbene Thermotoleranz)
SAT1	Serin-Acetyltransferase 1
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sHSP	engl: small heat shock proteins (kleine Hitzeschockproteine)
sog.	sogenannte/r
TAGs	Triacylglycerole
UPR	engl.: unfolded protein response (Antwort auf ungefaltete Proteine)
VSP	engl.: Vegetative Storage Protein
WS	Wassilewskija (<i>Arabidopsis thaliana</i> -Ökotyp)

1 Einleitung

1.1 Oxylipine und ihre Biosynthese

Zu der Klasse der Oxylipine zählen alle Verbindungen, die durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (sog. PUFAs) entstanden sind (Mosblech et al., 2009). Oxylipine sind ubiquitär sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich zu finden; ihr Vorkommen wurde beispielsweise für viele Gymnio- und Angiospermen, Algen, Moose, Pilze, Säugetiere und Invertebraten wie Insekten und Korallen bestätigt (Gerwick, 1993; Ponce de Leon et al., 2015; Brodhun and Feussner, 2011; Harizi et al., 2008; Stanley, 2006; Pohl and Kock, 2014). Interessanterweise weisen Oxylipine aus tierischen und pflanzlichen Organismen nicht nur Ähnlichkeit in ihrer Funktion, sondern vor allem auch in ihrer Biosynthese und damit auch in ihrer Struktur auf (Blee, 2002). Die Oxidation der PUFAs kann enzymatisch, aber auch nicht enzymatisch erfolgen. Hierbei entstehen Hydroperoxyfettsäuren, welche durch eine Reihe von unterschiedlichen Stoffwechselwegen in eine Vielzahl von Oxylipinen konvertiert werden. Die nicht enzymatische Oxidation, auch Autoxidation genannt, geschieht insbesondere in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl.: reactive oxygen species) und tritt deshalb vermehrt unter oxidativen Stress auf (Thoma et al., 2003; Imbusch and Mueller, 2000; Roberts and Morrow, 2002).

Typisches Ausgangssubstrat für Oxylipine in Säugern ist vor allem die vierfach ungesättigte C20-Fettsäure Arachidonsäure (C20:4) (Blee, 2002). Cyclooxygenasen (COX) katalysieren dabei die erste Reaktion in der Biosynthese der cyclischen Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane. Andere initiale Enzyme, wie die Lipoxygenasen (LOX), sind auch zuständig für die Bildung von Hydroperoxyfettsäuren, allerdings nicht-cyclische, welche in weiteren katalytischen Schritten unter anderem in Leukotriene und Lipoxine umgewandelt werden (Dennis and Norris, 2015). Nicht enzymatisch können zum Beispiel aus der Radikal-katalysierten Autoxidation von Arachidonsäure Isoprostane entstehen, welche strukturell stark den Prostaglandinen ähneln, aber sich durch Stereochemie und Seitenketten unterscheiden (Morrow et al., 1990).

In Pflanzen hingegen werden hauptsächlich die C16-Fettsäure Hexadecatriensäure (C16:3) oder die C18-Fettsäuren Linolensäure (C18:3) und Linolsäure (C18:2) oxidiert (Mueller and Berger, 2009). Diese drei mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind zugleich die quantitativ Bedeutsamsten in *Arabidopsis thaliana*: fast die Hälfte (48 %) aller Fettsäuren besteht aus Linolensäure, außerdem sind Linolsäure (13,7 %) und Hexadecatriensäure (12,3 %) stark vertreten (Qi et al., 2004). Diese Verteilung spiegelt sich ebenfalls in anderen

1 Einleitung

Pflanzenspezies, wie z.B. in der Tomate (*Solanum lycopersicum*), wieder: Hier bildet die Linolensäure (41,5 %) zusammen mit der Linolsäure (19,9 %) den Großteil aller Fettsäuren (Conconi et al., 1996).

Eine Übersicht über die verschiedenen enzymatischen und nicht enzymatischen Synthesewege der Oxylipine in Pflanzen gibt die Abbildung 1.1 (verändert nach Mosblech et al., 2009).

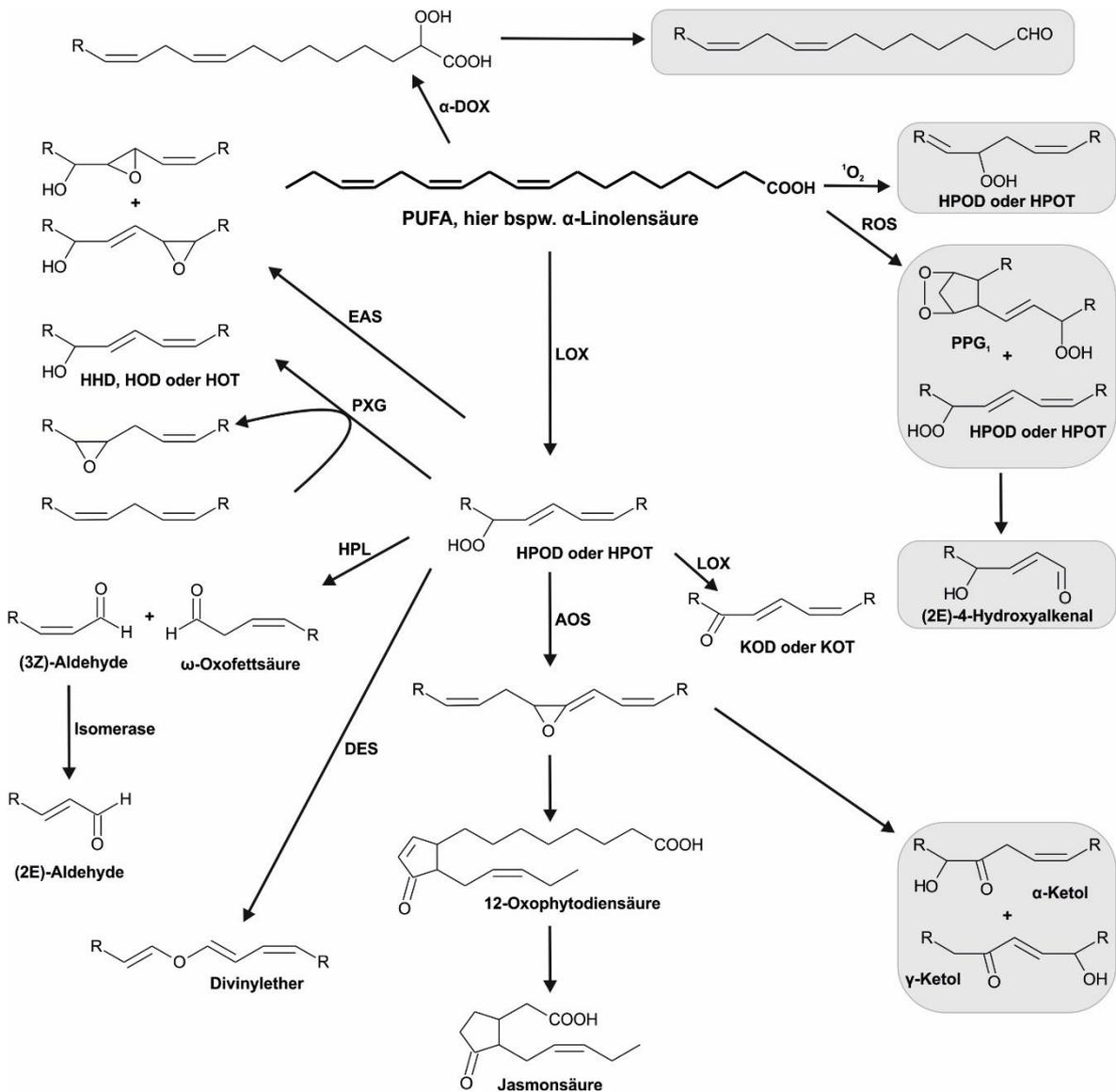


Abbildung 1.1: Übersicht über die pflanzliche Oxylipin-Biosynthese (verändert nach Mosblech et al., 2009). Die Ausgangssubstrate C16:3, C18:2 und C18:3 (hier C18:3 abgebildet) werden enzymatisch durch eine der beiden Initialenzyme LOX oder DOX in Hydroperoxyfettsäuren umgewandelt. Diese Produkte werden durch eine Reihe von weiteren Enzymen in verschiedene Oxylipine umgesetzt. Aber auch nicht enzymatisch (grau hinterlegt) entstehen durch ROS diverse Oxylipine.

Der Initialschritt der enzymatischen Bildung von Oxylipinen in *Arabidopsis thaliana*, das Einfügen molekularen Sauerstoffs, erfolgt durch eine der folgenden Dioxygenasen: durch

1 Einleitung

häm-haltige α -Dioxygenasen (DOX) oder durch häm-freie Lipoxygenasen (LOX). Hierbei entstehen Hydroperoxyfettsäuren, die an charakteristischen Positionen oxidiert sind. Wird eine C18-Fettsäure wie Linolensäure oxidiert, entstehen 2(R)-Hydroperoxyfettsäuren, wenn die Oxidation mit Hilfe von α -DOX katalysiert wird. Durch die Katalyse mittels LOX entstehen 9(S)-, oder 13(S)-Hydroperoxyfettsäuren, je nachdem ob 9-Lipoxygenasen oder 13-Lipoxygenasen für die Einführung des Sauerstoffs verantwortlich sind. So entsteht die 13-Hydroperoxy-Oktadekatriensäure (13-HPOT) durch die Oxidation von Linolensäure mittels einer 13-LOX, während die 13-Hydroperoxy-Oktadekadiensäure (13-HPOD) durch die Oxidation von Linolensäure (auch über 13-LOX) entsteht. Durch 9-LOXen und durch die DOX entstehen die isomeren Verbindungen 9-HPOT/HPOD bzw. 2-HPOT/HPOD (Hamberg et al., 1999; Feussner and Wasternack, 2002).

Die durch DOX entstandenen 2(R)-Hydroperoxyfettsäuren sind chemisch instabil und werden deshalb mittels α -Oxidation in 2(R)-Hydroxyfettsäuren und in kettenverkürzte Aldehyde abgebaut (Hamberg et al., 1999; Hamberg et al., 2005).

Die durch Lipoxygenasen gebildeten Hydroperoxyfettsäuren (9-HPOT/HPOD und 13-HPOT/HPOD) können hingegen durch sieben verschiedene, alternativ ablaufende Synthesewege (siehe Abbildung 1.1) weiter konvertiert werden (Blee, 2002; Feussner and Wasternack, 2002). Beispielsweise gehören drei Enzyme der CYP74-Familie der P450 Monooxygenasen an: die Allenoxid-Synthase (AOS, CYP74A), die Hydroperoxid-Lyasen (HPL, CYP74B (13-HPL) und CYP74C (9-HPL)) sowie die Divinylether-Synthase (DES, CYP74D) (Blee, 2002). Die DES ist für die Bildung von Divinylethern (Itoh and Howe, 2001) zuständig, allerdings existiert dieses Enzym nicht in *Arabidopsis thaliana*, es ist nur in vereinzelt Pflanzenspezies wie z.B. in *Solanum tuberosum* oder *Solanum lycopersicum* präsent (Galliard and Phillips, 1972; Itoh and Howe, 2001). Außerdem existiert in *A. thaliana* jeweils nur ein Gen für die AOS und ein Gen für die HPL (eine 13-HPL) (Laudert et al., 1996; Matsui et al., 1999; Kandzia et al., 2003). Interessanterweise weist der *A. thaliana*-Ökotyp Columbia Col-0 eine natürliche Mutation im HPL-Gen auf, eine 10-Nucleotid-lange Deletion im ersten Exon, weswegen dieser Ökotyp kein funktionsfähiges HPL-Protein besitzt (Duan et al., 2005).

Beide Enzyme, die AOS und die HPL spielen allerdings eine Schlüsselrolle im Oxylipin-Biosyntheseweg. Durch die AOS entstehen Jasmonate, durch die HPL sog. Grüne Blattduftstoffe (engl.: green leaf volatiles, GLVs) sowie Traumatin. Diese Substanzen weisen alle eine große physiologische Bedeutung in der Abwehr von abiotischem und biotischem Stress auf (siehe auch Abschnitt 1.2.1).

1 Einleitung

Der Mechanismus der 13-HPL lässt sich wie folgt zusammenfassen (Blee, 1998): die 13-HPL spaltet die Bindung zwischen zwei Sauerstoffatomen in der funktionellen Gruppe von 13-Hydroperoxyfettsäuren und bildet somit ein Epoxid-Radikal oder -Kation. Dieses wird durch weitere Umlagerungen sowie der Addition von Wasser zu einem chemisch instabilen Halbacetal (Grechkin and Hamberg, 2004), welches direkt in ein Alkenal sowie der korrespondierenden ω -Oxofettsäure zerfällt. Im Falle von Linolensäure als Ausgangssubstrat der Peroxidation würde (aus 13-HPOT) mittels der 13-HPL das Aldehyd (Z)-3-Hexenal und die ω -Oxofettsäure (9Z)-12-Oxododecensäure entstehen. Letztere Substanz dient als Ausgangsprodukt für Traumatin und Traumatinsäure (ul Hassan et al., 2015). Aus dem (Z)-3-Hexenal kann zum Beispiel durch Isomerisierung (E)-2-Hexenal entstehen (Noordermeer et al., 2001).

Eine andere Verzweigung der Synthesewege läuft über das Enzym AOS. Wird als Substrat 13-HPOT bereitgestellt, katalysiert dieses die Umwandlung in eine chemisch instabile 12,13-Epoxy-Oktadecatriensäure (Allenoxid). Dieses Allenoxid ist Substrat für die Allenoxid-Cyclase (AOC), welche durch Zyklisierung das Allenoxid in das Cyclopentenon-Derivat (+)-12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) umsetzt (Stumpe et al., 2006; Wasternack, 2007; Blee, 1998). Das C16-Homolog, ausgehend aus der Hexadecatriensäure, ist dinor-OPDA (Weber et al., 1997). Es ist, wie auch OPDA, zum einen biologisch aktiv, und kann zum anderen zu Jasmonsäure (JA) umgewandelt werden (Gfeller et al., 2010; Acosta and Farmer, 2010).

Die darauffolgende Reaktion, die Reduktion des Cyclopentenonrings (am C8), wird in *A. thaliana* durch die OPDA-Reduktase (OPR3) katalysiert und lässt ein Cyclopentanon entstehen. Dieses Intermediat wird dreimal β -oxidiert, wodurch eine Seitenketten-Verkürzung eintritt. Es entsteht (+)-7-iso-Jasmonsäure, was zum größten Teil zur stabileren (-)-7-Jasmonsäure epimerisiert wird (Wasternack, 2007; Blee, 1998). Die so entstandene Jasmonsäure kann in Aminosäure-Konjugate überführt werden, wobei vor allem die Konjugation mit Leucin und Isoleucin zu biologisch sehr aktiven Stoffen führt. Auch die Methylierung der JA am C1 ist für ein biologisch aktives Molekül verantwortlich (Kramell et al., 1997; Creelman and Mullet, 1997).

Das instabile Substrat der AOS kann allerdings auch nicht-enzymatisch hydrolysiert werden. In diesem Fall entstehen α -Hydroxyketone, γ -Hydroxyketone und ein racemisches OPDA-Gemisch (Stumpe et al., 2006) (Wasternack, 2007; Blee, 1998).

Die durch Lipoxygenasen gebildeten Hydroperoxyfettsäuren (9-HPOT/HPOD und 13-HPOT/HPOD) können mittels verschiedener Enzyme weiter konvertiert werden. Neben

1 Einleitung

der DES, HPL und der AOS existieren noch die HPR (Hydroperoxy-Reduktase), die EAS (Epoxy-Alkohol-Synthase), die PXG (Peroxygenase) und die bekannte LOX. Letzteres Enzym akzeptiert auch Hydroperoxyfettsäuren als Substrat und wandelt diese in Ketodiene und Ketotriene um (9-KOT/KOD oder 13-KOT/KOD) (Blee, 2002; Wasternack, 2007). Durch die HPR werden Hydroxyfettsäuren, also 9-HOTE/HODE bzw. 13-HOTE/HODE, gebildet (Feussner et al., 2001; Wasternack, 2007) und durch die PXG entstehen Epoxy-Alkohole, welche in Hydroxy-, Epoxy- und Hydroxyepoxyfettsäuren umgewandelt werden (Blee, 1998). Die EAS überführt ebenso die Hydroperoxyfettsäuren in Epoxy-Alkohole und in Trihydroxyfettsäuren (Hamberg et al., 1999; Wasternack, 2007).

Die nicht enzymatische Oxidation (Autoxidation) von mehrfach ungesättigten Fettsäuren erfolgt in Anwesenheit von ROS, wobei die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) oder durch freie Hydroxyl-Radikale (HO^\cdot) verläuft. So kann das elektrophile $^1\text{O}_2$, welches ein Nebenprodukt der Photosynthese (genauer gesagt des Photosystem II) ist, direkt mit einer Doppelbindung der PUFA reagieren und somit Hydroperoxyfettsäuren generieren. Der Reaktionsmechanismus der freien Radikale hingegen ist ein anderer: hier wird eine Kettenreaktion in Gang gesetzt, bei der reaktive Fettsäureradikale entstehen, die darauffolgend mit anderen PUFAs reagieren. Auch durch diesen Vorgang entstehen Hydroperoxyfettsäuren. Diese radikalische Kettenreaktion führt beispielsweise zur Bildung von Phytoprostanen (Mueller et al., 2006; Farmer and Mueller, 2013).

Im Gegensatz zu den tierischen Organismen, die aus der Arachidonsäure ($\text{C}_{20:4}$) enzymatisch Prostaglandine sowie nicht enzymatisch Isoprostane bilden können, weisen Blütenpflanzen keine Arachidonsäure auf. Dennoch generieren sie, wie *A. thaliana*, aus Linolensäure ($\text{C}_{18:3}$) nicht enzymatische Isoprostane, die für eine bessere Unterscheidung zunächst dinor-Isoprostane genannt wurden (Parchmann and Mueller, 1998; Mueller, 1998). Zur Vermeidung von Verwechslungen wurden sie im Jahr 2000 in Phytoprostane umbenannt (Imbusch and Mueller, 2000). Auf die Erläuterung des Biosynthesewegs wird aus Platzgründen in dieser Arbeit verzichtet, ist jedoch in vielen Publikationen nachzulesen (Mueller, 1998; Thoma et al., 2004; Mueller, 2004).

Neben den Phytoprostanen existieren weitere Produkte der nicht enzymatischen Lipid-Peroxidation wie beispielsweise Malondialdehyd (MDA) oder 4-Hydroxynonenal (HNE). All diese Produkte können als Marker für oxidativen Stress angesehen werden (Pratico et al., 2001).

1.2 RES-Oxylipine bilden eine Untergruppe der Oxylipine

Die Lipid-Peroxidation von PUFAs kann enzymatisch oder auch nicht enzymatisch erfolgen. Konsequenz aus dieser Oxidation ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Oxylipinen. Die Vielfalt der Oxidationsprodukte vergrößert sich zudem durch mögliche Modifikationen wie Veresterungen oder Konjugationen mit Aminosäuren oder Sulfaten, um nur einige Beispiele zu nennen (Mosblech et al., 2009). Dennoch kann eine Klassifizierung, zum Beispiel nach ihren chemischen und strukturellen Gemeinsamkeiten, vorgenommen werden. So sind viele Oxylipine elektrophil und folglich chemisch sehr reaktiv. Diese sogenannten RES-Oxylipine (RES: reactive electrophile species) werden anhand des Vorhandenseins einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe definiert (Mueller and Berger, 2009). So gilt das wahrscheinlich bekannteste Oxylipin, die Jasmonsäure, nicht als RES-Oxylipin (non-RES-Oxylipin), während das Vorläuferoxylipin OPDA sowie einige Phytoprostane, eine α,β -ungesättigten Carbonylgruppe aufweisen und somit als RES-Oxylipine klassifiziert werden können. Ebenso weist das RES-Oxylipin Prostaglandin A₁ (PGA₁) tierischen Ursprungs eine ähnliche Struktur zu dem pflanzlichen Phytoprostan A₁ (PPA₁) auf (siehe Abbildung 1.2). Im Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie (Universität Würzburg) wurde PGA₁, welches käuflich zu erwerben ist, ausgiebig getestet (Diplomarbeit von Maria Simone Zöller, 2008) und wird seitdem häufig als Analogon für das RES-Oxylipin PPA₁ benutzt.

1 Einleitung

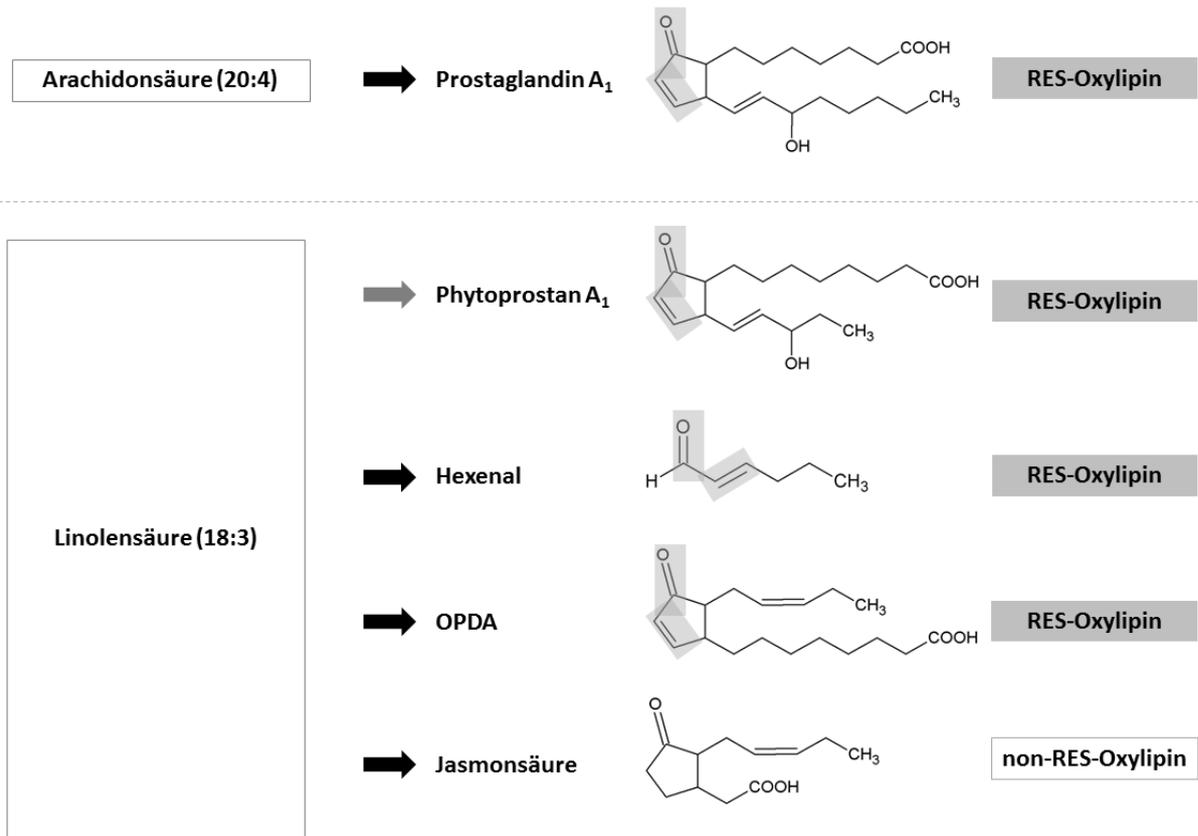


Abbildung 1.2: Strukturformeln verschiedener RES-Oxylipine und des non-RES-Oxylipins Jasmonsäure. Über das tierische Ausgangssubstrat Arachidonsäure entsteht beispielsweise Prostaglandin A₁, während in Pflanzen die Linolensäure als Ausgangssubstrat für die abgebildeten Oxylipine dient. RES-Oxylipine können sowohl auf enzymatischem (schwarze Pfeile) als auch auf nicht enzymatischem Wege (grauer Pfeil) gebildet werden. Die für RES-Oxylipine charakteristische α,β -ungesättigte Carbonylgruppe ist grau hinterlegt.

RES-Oxylipine sind, wie bereits dargestellt, chemisch sehr reaktiv. Durch die Anwesenheit einer sterisch frei zugänglichen α,β -ungesättigten Carbonylgruppe ist die Substanz elektrophil und reagiert bevorzugt mit nukleophilen Substanzen. Diese Reaktion verläuft nach dem sog. „HSAB“-Prinzip. Hierbei bildet „HSAB“ ein Akronym für „Hard and Soft Acids and Bases“ (deutsch: harte und weiche Säuren und Basen). Dieses Konzept besagt, dass weiche elektrophile Substanzen auch weiche nukleophile Substanzen bevorzugen und harte Elektrophile harte Nukleophile präferieren. Als „weich“ wird eine Substanz definiert, die eine geringe Elektronennegativität aufweist und einen eher großen Atomradius besitzt. Für „harte“ Moleküle gilt: je höher die Elektronennegativität, je niedriger die Polarisierbarkeit und je kleiner der Atomradius, desto „härter“ ist das Molekül (Pearson, 1963; Ayers et al., 2006). RES-Oxylipine mit einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe gelten hierbei als weiche Elektrophile. Ihr bevorzugter Reaktionspartner, ein weiches Nukleophil, ist beispielsweise die Thiolgruppe von Cysteinen in Proteinen oder das cysteinhaltige

1 Einleitung

Tripeptid Glutathion (Mueller and Berger, 2009). Aminogruppen z.B. von Histidin oder Lysin, genauer gesagt der Imidazolring bzw. die ϵ -Aminogruppe, sind ebenfalls nukleophile Reaktionspartner (z.B. von HNE). Sie gelten jedoch als härter im Vergleich zu RES-Oxylipinen und reagieren somit mit einer um mehrere Größenordnungen kleineren Reaktionsgeschwindigkeit mit diesen (Petersen and Doorn, 2004; Doorn and Petersen, 2002). Einige Desoxyribonukleotide wie Guanosin dienen auch als nukleophile Reaktionspartner, zumindest mit einigen kurzen RES-Oxylipinen wie Malondialdehyd (Blair, 2008). Jedoch ist auch dieses Nukleophil härter als die RES-Oxylipine und somit ist die Reaktion wenig favorisiert und sehr langsam (Mueller and Berger, 2009). Durch die hohe Konzentration an zellulärem Glutathion *in vivo* (bis zu 5 mM), welches, wie oben aufgeführt, als bevorzugter Reaktionspartner gilt, wird die DNA in den meisten Fällen zusätzlich vor Modifikationen durch RES-Oxylipine geschützt (Falletti and Douki, 2008). Diese kovalenten Modifikationen durch RES-Oxylipine entstehen durch die sogenannte Michael-Addition, welche nach Arthur Michael benannt wurde. Die Michael-Addition kann, im Gegensatz zur Schiff'schen Base, nur durch die Anwesenheit der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe, also der konjugierten Doppelbindung an der Carbonylgruppe, entstehen. Dabei wird das β -C-Atom (Michael-Akzeptor) durch seine Elektrophilie anfällig für einen nukleophilen Angriff, in den meisten Fällen durch ein thiolhaltiges Protein, durch den Michael-Donator (siehe Abbildung 1.3). Es entsteht ein kovalentes Michael-Addukt (Tokoroyama, 2010). Während die nicht-enzymatische als auch die enzymatische Konjugation von RES-Oxylipinen an GSH reversibel ist, ist die kovalente Bindung von RES-Oxylipinen an Cystein-Resten in Proteinen unter physiologischen Bedingungen nahezu irreversibel (Dueckershoff et al., 2008; Stamatakis and Pérez-Sala, 2006; Mueller and Berger, 2009).

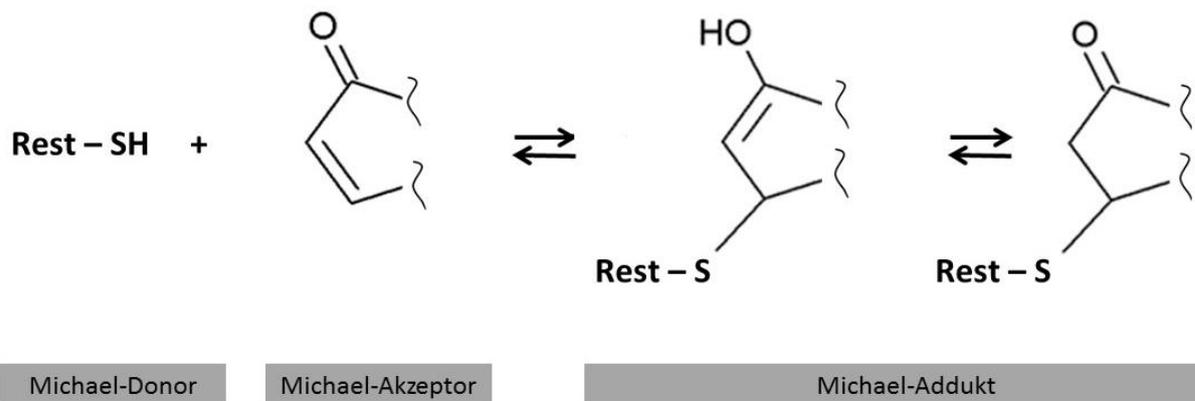


Abbildung 1.3: Darstellung der Michael-Addition am Beispiel eines RES-Oxylipins mit Cyclopentenonring

1 Einleitung

Mittels der Michael-Addition können also verschiedenste thiolhaltige Proteine durch RES-Oxylipine modifiziert werden. Dies geschieht allerdings keinesfalls zufällig: die RES-Oxylipine modifizieren Proteine selektiv. So zeigte beispielsweise eine Studie an humanen HEK-293-Zellen, dass lediglich 29 Proteine durch 15-Deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) modifiziert werden (Levonen et al., 2004). Wie diese Selektivität hervorgerufen wird, ist noch unklar, Mueller et al. (2009) postulieren beispielsweise, dass die Lipophilie hierbei eine große Rolle als physikochemischer Parameter spielt. Diese ermöglicht es dem RES-Oxylipin an hydrophobe Bindetaschen und aktive Zentren von Proteinen zu gelangen. Außerdem ist auch der pK_s-Wert des Cystein-Restes von Bedeutung: Das Thiolat-Anion (R-S⁻) reagiert sehr viel schneller mit RES-Oxylipinen als das Thiol (R-SH). Der pK_s-Wert jedoch wird durch die Mikroumgebung des Proteins bestimmt (Mueller and Berger, 2009). Beispiele für modifizierte Proteine sind häufig in der Literatur zu finden (z.B. Higdon et al., 2012; Mueller and Berger 2009).

Die Selektivität der Proteinmodifikationen durch verschiedene RES-Oxylipine könnte die Basis dafür sein, dass verschiedene RES-Oxylipine eine spezifische Funktion als Signalmoleküle haben könnten. Tatsächlich zeigt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als ein anerkanntes Signalmolekül vergleichbare Reaktivität mit Thiolgruppen, unterscheidet sich aber von den RES-Oxylipinen vermutlich durch unterschiedliche Affinität zu möglichen Zielproteinen (Mueller and Berger, 2009).

1.2.1 RES-Oxylipine als Signalmoleküle: physiologische Wirkung und Funktion

Nicht nur ihre Selektivität zeichnen RES-Oxylipine als potentielle Signalmoleküle aus. Sie sind verantwortlich für die Induktion einer Reihe von Genen, weshalb für RES-Oxylipine eine Reihe von physiologischen Funktionen postuliert wird. Farmer und Davoine postulierten im Jahre 2007, dass der Grund für ihre biologische Aktivität in ihrer Reaktivität, besser gesagt in der Anwesenheit der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe, liegt (Farmer and Davoine, 2007).

Im Allgemeinen werden RES-Oxylipine, wenn in höheren Konzentrationen vorliegend, als zytotoxisch und mutagen eingestuft. So wurde für verschiedene tierische Systeme publiziert, dass beispielsweise HNE Apoptose und Nekrose verursacht (Li et al., 1996; West and Marnett, 2006). Auch für Pflanzen konnte die schädigende Wirkung, z.B. von HNE oder MDA, gezeigt werden (Yamauchi et al., 2008; Winger et al., 2007; Mano, 2012). Hierbei zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Elektrophilie und Zytotoxizität (Chan et al., 2008; Lin et al., 2005; Haynes et al., 2000). Das RES-Oxylipin HNE weist durch seine γ -Hydroxygruppe eine höhere Reaktivität als beispielsweise RES-Oxylipine mit einem

1 Einleitung

Cyclopentenonring wie OPDA auf. Dies könnte bedeuten, dass OPDA spezifischere und erst in höheren Konzentrationen toxische Eigenschaften aufweist. So zeigte Alméras und Kollegen, dass eine Infiltration von 20 nmol OPDA zu Schädigungen im Photosystem II (PS II) führen kann (Almeras et al., 2003). Diese Konzentration ist jedoch um das ca. 50fache höher als eine endogene Konzentration, wie sie bspw. nach Verwundung auftritt (Berechnungsgrundlage ist hier die OPDA-Konzentration nach Verwundung, wie sie im Rahmen vorliegender Arbeit gemessen wurde, sowie die Annahme, dass bei einer Infiltration 1 g *Arabidopsis* infiltriert wird).

Allerdings sind nicht alle Effekte von RES-Oxylipinen nachteilig oder schädlich. Ihre Wirkung ist vor allem konzentrationsabhängig (Vollenweider et al., 2000). So sind sie starke Induktoren einer Reihe von Genen, die beispielsweise wichtig für die Verteidigung gegen biotischen aber auch für den Schutz vor abiotischem Stress wichtig sind. Dies konnte unter anderem schon für GLVs wie (E)-2-Hexenal gezeigt werden (Bate and Rothstein, 1998; Kishimoto et al., 2005), aber auch für OPDA (Stintzi et al., 2001; Taki et al., 2005), PPA₁ (Thoma et al., 2003; Mueller et al., 2008), MDA (Weber et al., 2004) sowie Butenon (auch Methylvinylketon genannt, MVK) (Almeras et al., 2003). Gemeinsamkeiten in der Geninduktion durch RES-Oxylipine beschreiben außerdem Farmer und Mueller (Farmer and Mueller, 2013). Sie postulieren, dass vor allem zwei Kategorien von Genen stark hochreguliert werden: Gene, die bei der Detoxifizierung beteiligt sind sowie sogenannten Hitzestressgene. So fallen 17 % aller durch PPA₁ hochregulierten Gene in die funktionelle Kategorie „Detoxifizierung“ wie beispielsweise Glutathion S-Transferasen oder Cytochrom P450-Enzyme (Mueller et al., 2008). Auffallend ist, dass sechs der zehn am stärksten induzierten Gene durch PPA₁ Hitzeschockproteine (HSP) sind (siehe Tabelle 1.1) (ausgehend von den publizierten Daten von Mueller et al., 2008).

Tabelle 1.1: Auflistung aller Hitzeschockproteine, die zu den zehn am stärksten induzierten Genen durch PPA₁ gehören

ATG-Nummer	Gen-Name
AT1G52560	HSP20-like Protein, HSP26.5
AT1G16030	HSP70B
AT5G12030	HSP17.6A
AT1G53540	HSP20-like chaperone
AT1G74310	HSP101
AT1G59860/AT1G07400 *	HSP20-like chaperone

(*an dieser Stelle ist eine genauere Interpretation der Microarray-Daten nicht möglich: die cDNA hybridisierte hier mit einer Sequenz, welche nicht spezifisch für eines der beiden genannten Gene ist. Dies bedeutet, die exogene Zugabe von PPA₁ führt zur Induktion von mindestens einem der genannten Gene, eventuell auch von beiden Genen)

Außerdem konnten Taki und Kollegen durch die Mutante *opr3*, welche durch den Defekt im *OPR3*-Gen OPDA nicht in JA konvertieren kann, zeigen, dass 157 der durch OPDA-induzierten Gene nicht durch JA reguliert werden, darunter einige Hitzeschock- sowie Detoxifizierungs-Gene (Taki et al., 2005). Auch das RES-Oxylin (E)-2-Hexenal zeigt ein starkes Potential um Hitzeschockgene zu induzieren: 21 der 100 am stärksten induzierten Gene kodieren für Hitzeschockproteine (HSP) (Yamauchi et al., 2015). In Säugern konnte zusätzlich zur Induktion von Hitzeschockgenen durch HNE (West and Marnett, 2005) auch eine Modifikation von HSP90 und HSP70, sowohl in Ratten als auch in menschlichen Kolonkarzinomzellen, gezeigt werden (Carbone et al., 2004; Carbone et al., 2005; Vila et al., 2008; Jacobs and Marnett, 2010), was zu einer Hitzeschockantwort führt (Higdon et al., 2012). Auch die Induktion von HSP durch Cyclopentenon-Prostaglandine in humanen Zellkulturen ist bereits seit zwanzig Jahren bekannt (Rossi et al., 1996).

In der Literatur sind häufig Beispiele für Modifikationen von Proteinen durch RES-Oxyline zu finden (z.B. Higdon et al., 2012; Mueller and Berger 2009). Diese Modifikationen werden als ein Schlüsselmechanismus in der Signaltransduktion von RES-Oxylinen diskutiert (Mueller and Berger, 2009). Auch weitere Wirkungsmechanismen werden diskutiert (siehe auch Abschnitt 1.2.2 und Abschnitt 4), wie bspw. eine Änderung des zellulären Redoxpotentials durch den Verbrauch von Glutathion – die spekulierte Wirkweise für das RES Sulforaphan (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015).

Eine weitere biologische Aktivität der RES-Oxyline besteht zum Beispiel in einer antimikrobiellen Aktivität. Die exogene Zugabe von OPDA [100 µM] fiel als besonders

1 Einleitung

wirksam gegen Pilze und Oomyceten auf (Prost et al., 2005). Auch elektrophile Aldehyde wie (E)-2-Hexenal zeigen, exogen appliziert, antibakterielle Wirksamkeit. Wichtig hierfür ist vor allem die Anwesenheit einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe (Trombetta et al., 2002). Gegen Pilze sind GLVs ebenfalls effektiv: Die Überexpression von *HPL* in *A. thaliana* bewirkt eine höhere Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*, was ein Hinweis auf die Funktion der GLSVs darstellen kann (Shiojiri et al., 2006).

Trotz der Unterschiede in der chemischen Struktur und der daraus resultierenden Reaktivität finden sich auch Gemeinsamkeiten in der biologischen Wirkung von RES-Oxylipinen und dem non-RES-Oxylin JA. So inhibieren unter anderem die RES-Oxylipine (E)-2-Hexenal, OPDA, PPA₁ sowie 9-HOTE das Wurzelwachstum vergleichbar wie JA (Mirabella et al., 2008; Mueller et al., 2008; Vellosillo et al., 2007; Staswick et al., 1992; Ellis et al., 2002). Die RES-Cyclopentenone OPDA und PPA₁ inhibieren des Weiteren auch die Mitose, wie auch das non-RES-Cyclopentanon JA (Mueller et al., 2008; Swiatek et al., 2002).

1.2.2 Die Signaltransduktion der RES-Oxylipine

Über die Signaltransduktion der RES-Oxylipine ist bisher wenig bekannt. Mittels der Mutante *opr3*, welche OPDA nicht in JA konvertieren und somit endogen keine JA synthetisieren kann, konnten Unterschiede in der Geninduktion von OPDA und JA nach exogener Zugabe festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass 157 der durch OPDA induzierbaren Gene nicht durch JA reguliert werden. Diese 157 Gene erwiesen sich zudem durch die Mutante *coi1* als COI1-unabhängig (Taki et al., 2005).

Das F-Box Protein COI1 (Coronatin insensitiv 1) gilt als Rezeptor für JA-Isoleucin (JA-Ile) und ist somit an der JA-Signaltransduktion beteiligt (Yan et al., 2009). Im Gegensatz zur RES-Oxylin Signaltransduktion sind über die des non-RES-Oxylipins JA mehr Details bekannt. Auf Nennung dieser Details wird jedoch in dieser Arbeit aus Platzgründen verzichtet, nachzulesen sind diese in ausführlichen Reviews (Wasternack and Hause, 2013; Kazan and Manners, 2012; Acosta and Farmer, 2010). Vor allem der Transkriptionsfaktor JIN1 (MYC2-Transkriptionsfaktor), aber auch Transkriptionsfaktoren wie ERF1, ORA59 sowie andere MYC-Transkriptionsfaktoren (MYC3, MYC4), sind an der Signaltransduktion beteiligt (Lorenzo and Solano, 2005; Pre et al., 2008; Fernandez-Calvo et al., 2011).

Um die Signaltransduktion der RES-Oxylipine weiter aufzuklären, wurde die Promotorregion aller durch PPA₁ induzierten Gene auf spezifische Bindemotive untersucht. Ungefähr die Hälfte der durch PPA₁ induzierbaren Gene weist in ihrem Promotor ein TGA-Motiv (TGACG) auf. Dieses befindet sich immer innerhalb der ersten 500 bp oberhalb („upstream“) des Startcodons und stellt eine putative Bindestelle für

1 Einleitung

TGA-Transkriptionsfaktoren dar. Zudem zeigten Versuche mit der Mutante *tga2-5-6*, dass die OPDA-Induktion von 30 % der OPDA-responsiven Gene abhängig von TGA-Transkriptionsfaktoren ist, im Falle von PPA₁ sind es 60 % aller PPA₁-responsiven Gene, welche TGA-abhängig sind (Mueller et al., 2008).

Somit scheint klar, dass die Wirkungen der RES-Oxylipine und non-RES-Oxylipine durch verschiedene Signaltransduktionswege reguliert werden. Allerdings sind diese zwei genannten Signalwege nicht in jedem Fall klar trennbar. Es ist unklar, ob TGA-Transkriptionsfaktoren nicht auch in manche JA-Antworten involviert sind. So wurde nachgewiesen, dass die Induzierbarkeit des *CYP81D11*-Gens durch JA stark abnimmt, wenn im dazugehörigen Promotor keine TGA-Bindestelle vorhanden ist (Koster et al., 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression des durch PPA₁, OPDA oder JA induzierbaren Gens *CYP81D11* in der *coil*-Mutante kaum nachweisbar ist, trotz exogener Applikation von PPA₁ oder OPDA (Mueller et al., 2008). Außerdem scheinen die TGA-Transkriptionsfaktoren auch eine negative Regulationsfunktion aufzuweisen: In der *tga2-5-6*-Mutante werden durch die exogene Zugabe von PPA₁ oder OPDA über 200 Gene induziert, die im Wildtyp nicht durch diese Behandlung hochreguliert werden (Mueller et al., 2008).

Nicht alle durch PPA₁ oder OPDA induzierbaren Gene sind abhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren 2, 5 und 6. Interessanterweise werden die Hitze-responsiven Gene durch PPA₁ oder OPDA unabhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren induziert (Mueller et al., 2008). Signalkomponenten, welche in der HSP-Regulierung durch RES-Oxylipine involviert sind, sind bisher unbekannt.

Weiterhin ist unbekannt, wie RES-Oxylipine die TGA-abhängigen sowie die TGA-unabhängigen Signalwege aktivieren. Erst letztes Jahr (2015) wurde postuliert, dass das Protein Cyclophilin 20-3 (CYP20-3) als putativer OPDA-Rezeptor in *A. thaliana* fungiert. Durch Bindung von OPDA an CYP20-3 wird die Komplexbildung mit der Serin-Acetyltransferase 1 (SAT1) gefördert. Dieser Komplex wiederum veranlasst die Bildung eines hetero-oligomeren Komplexes aus SAT1 und der O-Acetylserin(thiol)lyase, der sogenannte Cystein-Synthase-Komplex. Dieser verstärkt durch die Bildung von Cystein die zelluläre Redox-Kapazität, wodurch OPDA-responsive Gene induziert werden sollen. Durch Untersuchungen der *cyp20-3*-Mutante konnte gezeigt werden, dass durch exogene Zugabe von OPDA die Genexpression bestimmter OPDA-responsiver Gene, wie *HSP17.6* oder *GST6*, im Vergleich zum OPDA-behandelten Wildtyp, geringer war. Eine

1 Einleitung

abgeschwächte Induktion JA-responsiver Gene (*THI2.1* und *VSP2*) durch die exogene Zugabe von JA in der *cyp20-3* Mutante war nicht zu beobachten (Park et al., 2013).

Auch schon vor dieser Veröffentlichung wurde über den Wirkungsmechanismus der RES-Oxylipine viel diskutiert (Almeras et al., 2003; Farmer and Davoine, 2007; Mueller and Berger, 2009; Farmer and Mueller, 2013). Zum einen können direkte Modifikationen an nukleophile Zentren (siehe auch Abschnitt 1.2) eine Wirkung hervorrufen, zum anderen besteht die Möglichkeit eines indirekten Effekts durch Veränderung des Reduktionspotential der Zelle (Farmer and Davoine, 2007), wie bspw. durch den Verbrauch von Glutathion – die spekulierte Wirkweise für das RES Sulforaphan (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015). Dieser indirekte Effekt wurde in einem Übersichtsartikel als Rezeptor-unabhängiger Signal-Mechanismus diskutiert. Entsprechend diesem Mechanismus hat das veränderte Redoxpotential einen Effekt auf Redox-regulierte Proteine, die in Signaltransduktionsketten involviert sind (Mueller and Berger, 2009) und eine Funktion als Redox-Sensoren haben (Cooper et al., 2002). Dies wäre allerdings ein zu stark vereinfachtes Modell: Die Genexpression, induziert durch H_2O_2 , ein anerkanntes Redox-Signalmolekül, bzw. PPA_1 , ähneln sich zu 44 % – eine hohe Zahl, jedoch wahrscheinlich zu gering, wenn der Wirkungsmechanismus beider Substanzen gleich wäre. Deswegen postulierten Mueller und Berger (2009) einen zusätzlichen Rezeptor-abhängigen Mechanismus, bei dem die bereits erwähnte Selektivität eine zentrale Rolle spielt. Der große Unterschied zwischen RES-Oxylipinen und H_2O_2 ist hierbei die Lipophilie der RES-Oxylipine (Mueller and Berger, 2009). Entdeckungen wie die eines elektrophilen Response-Elements in der Promotorregion vieler durch RES-Oxylipine induzierbarer Gene in *Chlamydomonas reinhardtii* helfen, den komplexen Wirkungsmechanismus weiter zu entschlüsseln (Fischer et al., 2012). Dennoch sind bis heute die Signaltransduktionsmechanismen der RES-Oxylipine nahezu ungeklärt. Zusammenfassend lässt sich das Review der Autoren Farmer und Mueller zitieren: es ist nicht bekannt, ob der Wirkungsmechanismus der RES-Oxylipine durch direkte Wahrnehmung mittels RES-sensitive Rezeptoren, durch Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter metabolischer Enzyme, durch Erkennung geschädigter Makromoleküle oder durch Veränderung des Redoxpotentials in der Zelle vermittelt wird (Farmer and Mueller, 2013).

Auch in nicht pflanzlichen Systemen wird der Wirkungsmechanismus elektrophiler Lipidoxidationsprodukte diskutiert (Straus and Glass, 2001; Higdon et al., 2012; Dickinson et al., 2006). Hier wurden bereits Rezeptoren identifiziert, wie beispielsweise der Rezeptor $PPAR_\gamma$, der die Signalwirkung von 15-Deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J_2 (15d-PGJ₂)

1 Einleitung

vermittelt. Aber auch hier sind noch viele Fragen offen, denn auch in Zellen, die PPAR γ nicht exprimieren, kann 15d-PGJ₂ seine Wirkung vermitteln (Straus and Glass, 2001).

1.3 Pflanzliche Reaktionen auf Hitzestress: Hitzeschockantwort und Thermotoleranz

Sind Pflanzen Temperaturen oberhalb ihres Temperaturoptimums ausgesetzt, kann dies die Entwicklung, das Wachstum, die Reproduktion sowie die Ernte beeinträchtigen (Mittler et al., 2012; Larkindale et al., 2007). Eine transiente Erhöhung um 10-15 °C über der Umgebungstemperatur wird im Allgemeinen als Hitzestress bezeichnet. Nicht nur die Intensität, also die Temperatur, ist in diesem Zusammenhang entscheidend, sondern auch die Länge und die Geschwindigkeit des Temperaturanstieges ist von Bedeutung (Wahid et al., 2007).

Auf molekularer Ebene bedeutet Hitzestress, dass die Stabilität und Aktivität zahlreicher Proteine beeinträchtigt wird, da diese durch hohe Temperaturen partiell oder komplett denaturiert werden und im Extremfall aggregieren. Darüber hinaus ändert sich mit der Temperatur auch die Membranfluidität. Pflanzen reagieren deshalb auf eine langanhaltende Temperaturerhöhung (über mehrere Tage) mit einer Änderung der Fettsäurekomposition. So ändert sich das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren. Genauer gesagt nimmt bei höheren Temperaturen die Anzahl an gesättigten Fettsäuren in *A. thaliana* zu und der Anteil an dreifach ungesättigten Fettsäuren (C18:3 und C16:3) verringert sich (Falcone et al., 2004; Iba, 2002). Dadurch verringert sich die Membranfluidität, was zu einer Änderung der Permeabilität und schließlich zu einer Aktivitätsänderung membrangebundener Proteine, wie beispielsweise Ionenkanäle, führt (Iba, 2002). Die Photosynthese, deren Proteine auch Bestandteile von Membranen sind, ist hitzesensitiv und ihre Aktivität nimmt mit zunehmender Temperatur ab. Vor allem das PS II ist hitzesensitiv, aber auch die verringerte Regenerationsfähigkeit des Ribulose-1,5-bisphosphates oder die Inhibierung des Elektronentransports durch hohe Temperaturen wird diskutiert (Mathur et al., 2014; Larkindale et al., 2007; Wise et al., 2004). Auch andere Konsequenzen auf molekularer Ebene sind zu beobachten, so werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet (Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008; Pucciariello et al., 2012; Driedonks et al., 2015) und die Expression vieler Gene wird induziert (Larkindale and Vierling, 2008; Finka et al., 2011). Darunter befinden sich viele Gene für Hitzeschockproteine (HSP) sowie für Enzyme, die wichtig für die Redoxregulation sind, wie die Ascorbatperoxidase 2 (APX2), oder das Enzym Galactinol-Synthase 1 (GOLS1) (Liu et al., 2011; Panchuk et al., 2002;

1 Einleitung

Panikulangara et al., 2004; Busch et al., 2005). Zudem sind metabolische Änderungen während des Hitzestresses zu finden: zum einen akkumulieren vor allem Zucker wie Maltose, Galactinol und Raffinose, welche als osmoprotektive Substanzen und als Antioxidans dienen (Kaplan et al., 2004; Panikulangara et al., 2004; Nishizawa et al., 2008), zum anderen steigt die Anzahl an mehrfach ungesättigten Triacylglycerolen (TAGs) bei Hitze sehr stark an (Mueller et al., 2015). Über die Funktion der Hitze-induzierten TAGs wird noch diskutiert, eventuell dienen sie als transiente Fettsäure-Speicher während der Membran-Umbildung (Mueller et al., 2015).

Die evolutionär hoch konservierte Hitzeschockantwort (HSR, engl.: heat shock response), durch welche Pflanzen unter anderem durch die Expression vieler Gene auf Hitze reagieren, sorgt dafür, dass Pflanzen kurzfristig Temperaturen oberhalb ihres Temperaturoptimums tolerieren können. Für *Arabidopsis thaliana* gilt eine Temperatur von 22 °C als optimal für das Wachstum. Die Eigenschaft, höhere Temperaturen für einen bestimmten Zeitraum zu überleben, wird basale Thermotoleranz genannt (engl.: basal thermotolerance, BT, beispielsweise 1 h bei 45 °C, siehe Larkindale et al., 2005). Die Fähigkeit, kurzzeitige Toleranz gegenüber ansonsten tödlichen Temperaturen zu erwerben, wird als kurzzeitig erworbene Thermotoleranz bezeichnet (engl.: short-term acquired thermotolerance, SAT, beispielsweise 3 h bei 45 °C nach einer Akklimatisierungsphase von 1,5 h bei 38 °C und einer anschließenden Erholungsphase von 2 h bei RT, siehe Larkindale et al., 2005; Yeh et al., 2012). Diese erworbene Thermotoleranz entsteht durch eine kurze Akklimatisierungsphase bei moderaten Temperaturen, in welcher die Expression zahlreicher Gene aktiviert wird. Vor allem die Akkumulation von HSP hat hierbei einen entscheidenden Einfluss (Vierling, 1991; Queitsch et al., 2000). *Arabidopsis*-Mutanten ohne *HSP101*-Expression oder mit deutlich verminderter *HSP101*-Expression verlieren die Fähigkeit zur Thermotoleranz komplett, dies weist auf eine äußerst wichtige Funktion von HSP101 in der Thermotoleranz von *A. thaliana* hin (Hong et al., 2003; Queitsch et al., 2000). Aber auch der Verlust von anderen HSP-Genen hat eine verringerte Thermotoleranz zur Folge, wie beispielsweise die HSP70-Gene im plastidären Stroma (Su and Li, 2008). Die Induktion der HSP-Gene in *A. thaliana* ist abhängig von den vier konstitutiv exprimierten Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d und e (Liu et al., 2011). Diese vier sogenannten Masterregulatoren der HSR regulieren neben der HSP-Genexpression die Expression von mehr als 65 % aller hitze-induzierten Gene und sind essentiell für die Thermotoleranz in *A. thaliana* (Liu et al., 2011).

1 Einleitung

Die erworbene Thermotoleranz kann auch durch andere Stressoren als Hitze, also in Abwesenheit dieser unter isothermen Bedingungen, ausgelöst werden. Massie et al. (2003) konnten zeigen, dass in *Caenorhabditis elegans* eine Thermotoleranz durch die Behandlung mit Natriumazid induziert werden kann (Massie et al., 2003). Bekannt ist außerdem die Wirkung von verschiedenen HSP90-Inhibitoren als Induktoren der Hitzeschockantwort und somit einer Thermotoleranz, sowohl in *Arabidopsis thaliana* und *Physcomitrella patens* für die HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicol als auch in *Saccharomyces cerevisiae* für den Inhibitor Celastrol (Yamada et al., 2007; Saidi et al., 2009; Trott et al., 2008).

1.3.1 Die Hitzeschockproteine: hoch konservierte Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Hitzeschockproteine existieren in allen Organismen und gehören damit zu den evolutionär am stärksten konservierten Proteinen. Sie fungieren meist als sog. Faltungshelfer und werden vor allem durch Hitzestress induziert (Finka et al., 2011). Dennoch führen auch andere Stressoren wie Kälte, Trockenheit, Schwermetalle, oxidativer oder osmotischer Stress zu einer Akkumulation von HSP (Swindell et al., 2007; Neumann et al.; Vierling, 1991; Liu et al., 2011). Einige HSP werden bereits konstitutiv unter optimalen Wachstumsbedingungen exprimiert und sind auch hier für die Protein-Homöostasis wichtig (Waters, 2013; Bokszczanin et al., 2013). So wird vermutet, dass HSP85 unter stressfreien Bedingungen bereits etwa 1 % aller löslichen Proteine im Cytoplasma von Säugetieren darstellt (Lai et al., 1984). Auch Vertreter der HSP70-Familie in *Arabidopsis* wie *AtHSP70-1* oder *AtHSP70-3* sind bereits basal relativ hoch exprimiert und durch Hitze nicht oder nur sehr wenig induzierbar (Lin et al., 2001).

Hitzeschockproteine lassen sich nach ihrer Größe in fünf verschiedene Klassen einteilen (prokaryotische Nomenklatur in Klammern): HSP100 (ClpB), HSP90 (HtpG), HSP70 (DnaK), HSP60 (GroEL) und die kleinen HSP (IbpA und IbpB) (engl.: small HSP, sHSP) (Priya et al., 2013). Jede dieser Klassen weist unterschiedliche Funktionen auf, welche im Folgenden kurz erläutert werden: Die HSP der Klasse HSP100 fördern beispielsweise die Disaggregation und Degradation von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen während HSP60 die korrekte Faltung von Proteinen erst ermöglicht - durch Bindung an Zwischenstadien und somit Verhinderung der Aggregation (Parsell and Lindquist, 1994; Wang et al., 2004; Parsell and Lindquist, 1993). Die kleinen HSP (sHSP) binden an bereits denaturierte Proteine und verhindern so die Aggregation, das HSP70/40-System wird benötigt um dann diese an sHSP gebundene Proteine neu zu falten (Haslbeck and Vierling, 2015; Waters, 2013). Die Vertreter der Familie HSP90 sind besonders interessant, denn sie unterstützen nicht nur bei der korrekten Proteinfaltung, sie binden außerdem an Substrate,

1 Einleitung

welche für die Signaltransduktion essentiell sind. In Säugetieren zum Beispiel ist dies der Fall für Steroidhormon-Rezeptoren und Signal-Kinasen (Pratt and Toft, 1997; Young et al., 2001). In Säugetieren, aber auch in anderen Organismen wie *A. thaliana* reguliert HSP90 außerdem im sog. Multi-Chaperon-Komplex mit HSP70 auf negative Weise die HSFs und inhibiert somit die HSR unter isothermen Bedingungen (Zou et al., 1998; Guo et al., 2001; Hahn et al., 2011) (siehe auch Abschnitt 1.3.2).

Einige Studien mit *HSP*-Mutanten zeigen eindrücklich die Relevanz dieser Proteine. *Arabidopsis*-Mutanten ohne *HSP101*-Expression verlieren die Fähigkeit zur Thermotoleranz (Hong and Vierling, 2001). Auch die sHSP HSP18.1, HSP17.6A oder HSP17.4 sind für die erworbene Thermotoleranz in *Arabidopsis* von Bedeutung (Dafny-Yelin et al., 2008). Der gleichzeitige Verlust von *HSP90.1* und *HSP90.2* in *Arabidopsis* ist sogar letal (Hubert et al., 2009).

Allerdings wurden viele Mutanten beschrieben, die keine Änderung in ihrem HSP-Spiegel zeigen, aber dennoch nicht in der Lage sind, Hitze zu tolerieren. So akkumulieren in den *Arabidopsis*-Mutanten *hot2-1* und *hot4-1* (nach 90 min bei 38 °C, gefolgt von 2 h bei 22 °C) die HSP wie gewohnt, zeigen aber trotzdem eine deutlich verringerte basale Thermotoleranz (Hypokotyl-Elongation nach 120 min bei 45 °C) (Hong et al., 2003). Es scheint also, als wären Hitzeschockproteine essentiell für die Thermotoleranz, aber allein nicht ausreichend (Larkindale et al., 2005).

1.3.2 Hitzestress: Perzeption und Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*

Über die Wahrnehmung von Hitze in *Arabidopsis thaliana* wird bis heute diskutiert. Vermutlich wird die Perzeption und Signaltransduktion über ein komplexes Netzwerk molekularer Sensoren und Proteine reguliert (Saidi et al., 2011). So sind bisher mindestens drei Mechanismen postuliert worden, die einen Hitzeschock erfassen und eine HSR auslösen könnten: die Plasmamembran und ihre verringerte Membranfluidität, was zu einer verstärkten Aktivität eines Calciumkanals führt und einen Calciumeinstrom auslöst, ein Histon-Sensor im Nucleus sowie die sog. Antwort auf ungefaltete Proteine (engl.: unfolded protein response, UPR), die des Cytoplasmas und die des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Mittler et al., 2012).

Bereits recht gut erforscht sind hingegen die sog. Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (engl.: heat shock factors, HSFs). Das Genom von *A. thaliana* kodiert für 21 verschiedene HSFs, welche in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden können: A, B und C (Larkindale et al., 2007; Baniwal et al., 2004). Die konstitutiv exprimierten *HSFA1 a*, *b* und *d* der Klasse A sind außerordentlich bedeutend in der Thermotoleranz und werden deshalb auch als

1 Einleitung

„Masterregulatoren“ bezeichnet (Yoshida et al., 2011). Die Überexpression von *HSFA1 a* führt zu einer gesteigerten Thermotoleranz (Lee et al., 1995; Qian et al., 2014), während die Nullmutanten *hsfa1 abde* und *hsfa1 abd* in verschiedensten Thermotoleranz-Assays keine oder eine stark verringerte Thermotoleranz zeigten (Liu et al., 2011; Liu and Charng, 2012). Der Verlust des hitze-induzierbaren *HSFA2*-Gens verursacht lediglich eine verringerte Thermotoleranz bei der sog. längerfristig erworbenen Thermotoleranz (long-term acquired thermotolerance) (Yeh et al., 2012; Charng et al., 2007; Nishizawa et al., 2006). Versuche mit Mutanten, welche *HSFA2* überexprimieren, führen zu widersprüchlichen Resultaten. Ogawa und Kollegen fanden heraus, dass die *HSFA2*-überexprimierenden Pflanzen eine erhöhte basale als auch kurzzeitig erworbene Thermotoleranz aufweisen, während Nishizawa et al. keinerlei erhöhte Thermotoleranz der *HSFA2*-überexprimierenden Pflanzen feststellen konnten (Ogawa et al., 2007; Nishizawa et al., 2006).

In der Signaltransduktion der HSR spielen diese HSFs eine bedeutende Rolle. Das „klassische Modell“ dieser Signaltransduktion, auch „Chaperon-Titrationsmodell“ bezeichnet, soll im Folgenden erläutert werden:

Das Protein HSP90 bildet mit HSP70 einen sog. Multi-Chaperon-Komplex aus. Dieser ist unter normalen Wachstumsbedingungen an die konstitutiven Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSFA1 gebunden und inhibiert somit die HSR. Proteine der Familien HSP70 und HSP90 fungieren hierbei als negativer Regulator der HSF-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass AtHSP70 mit AtHSF1 und AtHSP90.2 mit AtHSF1 D interagiert (Kim and Schoffl, 2002; Yamada et al., 2007). Auch Yoshida und Kollegen zeigten bereits, dass HSFA1 a, b und auch d sowohl mit HSP90.1 als auch mit HSP90.3 interagieren (Yoshida et al., 2011). Während eines Hitzestresses kommt es zu einer Akkumulation von denaturierten Proteinen, welche die HSP von den HSFs rekrutieren und die freien HSFs nun trimerisieren können und dadurch transkriptionell aktiv werden. Dieses Modell wird in verschiedenen Übersichtsartikeln sowohl für Pflanzen (Nover and Scharf, 1997; Schoffl et al., 1998; Saidi et al., 2011; Scharf et al., 2012) als auch für Säugetiere (West and Marnett, 2006) postuliert. Im Zellkern binden die HSF an sog. Hitzeschock-Elemente (HSE) in den Promotoren verschiedener Gene und aktivieren so deren Genexpression, wie beispielsweise die Gene für *HSFA2* oder *HSP*. Diese *cis*-regulatorischen HSE weisen charakteristische Sequenzabschnitte auf (mehrmalige Wiederholungen von nGAAn in alternierender Orientierung sowie mehrere Segmente von TCC), welche hoch konserviert sind (Amin et al., 1988; Wu, 1995).

1 Einleitung

Behandlung mit HSP90-Inhibitoren wie Geldanamycin oder Radicol induzieren sowohl in *Arabidopsis* als auch in *Physcomitrella* eine HSR-ähnliche Genexpression und führen außerdem zu einer erhöhten Thermotoleranz (Yamada et al., 2007; Saidi et al., 2009). Für *Saccharomyces* konnte gezeigt werden, dass der HSP90-Inhibitor Celastrol ebenso zu einer induzierten Thermotoleranz führt und die Induktion von hitze-induzierbaren Genen erlaubt (Trott et al., 2008).

1.3.2.1 Hitze-Perzeption an der Cytoplasmamembran

Langanhaltender Hitzestress verändert die physikalischen Eigenschaften einer Membran, die gesättigten Fettsäuren nehmen zu und die Fluidität der Cytoplasmamembran wird erniedrigt (Falcone et al., 2004; Iba, 2002). Somit nimmt die Cytoplasmamembran als Sensor Hitze wahr und die veränderte Membranfluidität führt zu einem Öffnen eines spezifischen Calciumkanals. Das heißt, die Lipidzusammensetzung der Membran reguliert primär einen spezifischen Ca^{2+} -Kanal (Saidi et al., 2010; Saidi et al., 2011).

Schon im Jahre 1998 schlugen Gong et al. vor, dass die Thermotoleranz von *Nicotiana glumbaginifolia* im Zusammenhang mit einem zellulären Ca^{2+} -Anstieg steht (Gong et al., 1998). In den nachfolgenden Jahren konnte für *A. thaliana* und *P. patens* nachgewiesen werden, dass es sich bei diesem zellulären Ca^{2+} -Anstieg während einer Hitze-Exposition um einen spezifischen transienten Ca^{2+} -Einstrom durch die Membran handelt (Liu et al., 2006; Saidi et al., 2009). Dieser wird durch einen Ca^{2+} -Kanal, ein sog. CNGC-Kanal (engl.: Cyclic Nucleotide Gated Calcium-Channel) vermittelt: in *Arabidopsis* handelt es sich hierbei um CNGC2 (Finka et al., 2012).

Interessanterweise führt eine Behandlung mit Benzylalkohol oder Pentachlorphenol, beide Substanzen erhöhen die Membranfluidität, zu einem Ca^{2+} -Einstrom unter isothermen Bedingungen in die Zelle; HSP werden vermehrt synthetisiert und eine Thermotoleranz wird ausgebildet. Ist durch Ethylenbisoxoethylennitrotetraessigsäure (EGTA) das extrazelluläre Ca^{2+} nicht mehr frei verfügbar, inhibiert dies den Effekt. Aber auch während eines Hitzestresses lässt sich mittels EGTA-Zugabe die Expression von HSP sowie eine Thermotoleranz in *Arabidopsis* und *Physcomitrella* nicht induzieren (Saidi et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen Saidi und Kollegen schlussfolgern, dass es sich bei der Plasmamembran um einen primären, essentiellen Hitzesensor handelt.

Allerdings ist auch die HSR, ausgelöst durch HSP90-Inhibitoren, abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen von *Physcomitrella*. Eine künstlich herbeigeführte UPR mittels einer thermolabilen Luciferase in *Physcomitrella* kann nur einen HSR auslösen, wenn

1 Einleitung

extrazelluläres Ca^{2+} verfügbar ist (Saidi et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Cytoplasmamembran nicht alleine als primärer Hitzesensor dient.

Die Signalweiterleitung nach dem Ca^{2+} -Einstrom wird vermutlich durch das calciumbindende Calmodulin AtCaM3 vermittelt, welches im weiteren Verlauf MAP-Kinasen (engl.: Mitogen-activated Protein) und Transkriptionsfaktoren aktiviert (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2009; Sangwan and Dhindsa, 2002; Suri and Dhindsa, 2008; Wahid et al., 2007; Bokszczanin et al., 2013).

1.3.2.2 Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) als Mechanismus der Hitze-Perzeption

Durch erhöhte Temperaturen werden hydrophobe Bereiche von Proteinen freigelegt, welche eine Antwort auf ungefaltete Proteine auslösen können (Mittler et al., 2012). Auch diese UPR wird in einer Übersicht von Mittler und Kollegen als ein möglicher Hitzesensor diskutiert.

Im ER ist diese UPR dafür verantwortlich, dass der Transkriptionsfaktor bZIP60 durch alternatives Spleißen in den Zellkern gelangt und dort die Transkription verschiedener Gene induziert (Deng et al., 2011). Auch andere Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie wie bZIP17 und bZIP28 sind an der UPR im ER beteiligt. Dadurch wird unter anderem die Brassinosteroid-Signaltransduktion aktiviert, welche vor allem Wachstums- und Entwicklungsprozesse steuert (Che et al., 2010).

Im Cytosol ist die UPR hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor HSFA2 vermittelt. Dieser reguliert vermutlich durch alternatives Spleißen als Isoform HSFA2-II die cytosolische UPR. Als Konsequenz wird die Genexpression verschiedener hitze-induzierbarer Gene aktiviert, wie beispielsweise die Gene der verschiedenen HSP70-Isoformen (mit Ausnahme von *HSP70B*) (Sugio et al., 2009). Allerdings spricht Sugio und Kollegen bei der UPR von einer untergeordneten Komponente der HSR und nicht von einem Hitze-Sensor. Da HSFA2-Null-Mutanten lediglich eine verringerte Thermotoleranz bei der sog. längerfristig erworbenen Thermotoleranz (long-term acquired thermotolerance) zeigen (Yeh et al., 2012; Charng et al., 2007; Nishizawa et al., 2006), scheint die cytosolische UPR keine primäre Rolle bei der Hitze-Perzeption in *Arabidopsis* zu haben.

1.3.2.3 Hitze-Perzeption mittels Chromatinumbau mit Hilfe des Histons H2A.Z

Das Protein ARP6 (engl.: Actin related Protein 6) ist notwendig um das Histon H2A.Z (anstelle des Histons H2A) in das Nukleosom einzubringen (Mittler et al., 2012). Ein

1 Einleitung

Erwärmen der Pflanzen (von 17 °C auf 27 °C) resultiert in einer verminderten H2A.Z-Besetzung in den Nukleosomen wichtiger hitze-induzierter Gene, wie beispielsweise für *HSP70*. Dies macht die Expression betroffener Gene durch lockerere Chromatinstrukturen möglich. Dies bedeutet, dass ARP6 ein wichtiges Protein zur Unterdrückung der Hitzeschock-Genexpression ist. Auch ein Befund von Kumar und Kollegen verdeutlicht dies: Durch das Erwärmen einer *Arabidopsis*-WT-Pflanze von 12 °C auf 27 °C werden 2454 Gene mehr als 2fach hochreguliert. Dieses hochregulierte Transkriptom ist in der Nullmutante *arp6* schon bei 12 °C zu beobachten (Kumar and Wigge, 2010).

Allerdings reagiert auch die *arp6*-Mutante auf ansteigende Hitze bspw. mit der Verlängerung des Hypokotyls und der Petiolen (Kumar and Wigge, 2010). Somit wird grundsätzlich auch in der *arp6*-Mutante Hitze wahrgenommen. Das Protein ARP6 ist zwar notwendig, um das Transkriptom einer Pflanze der Umgebungstemperatur anzupassen, allerdings kein primärer Hitze-Sensor.

1.3.3 Chemische Induktoren einer Hitzeschock-ähnlichen Reaktion

1.3.3.1 Pflanzliche Hormone

Während eines Hitzestresses akkumulieren verschiedene Pflanzenhormone: Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (JA), 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) sowie Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile) (Details und Quellen hierzu befinden sich in der Tabelle 1.2). Auch andere Phytohormone wie beispielsweise Ethylen akkumulieren während Hitzestress, worauf allerdings im Folgenden nicht näher eingegangen wird.

Tabelle 1.2: Auflistung der Pflanzenhormone, die während eines Hitzestresses akkumulieren

Pflanzenhormon	Pflanzenart und Bedingung	Quelle
Salicylsäure	<i>Arabidopsis thaliana</i> , 40 °C <i>Agrostis palustris</i> , 35 °C	(Kaplan et al., 2004) (Larkindale and Huang, 2005)
Abscisinsäure	<i>Agrostis palustris</i> , nach einem HS (35 °C) während der Erholungsphase (20 °C)	(Larkindale and Huang, 2005)
Jasmonsäure	<i>Arabidopsis thaliana</i> , 38 °C	(Clarke et al., 2009)
12-Oxo-Phytodiensäure	<i>Arabidopsis thaliana</i> , 38 °C	(Clarke et al., 2009)
Jasmonssäure-Isoleucin	<i>Arabidopsis thaliana</i> , 38 °C	(Clarke et al., 2009)
Ethylen	<i>Arabidopsis thaliana</i> , 38 °C	(Clarke et al., 2009)

Diese pflanzlichen Hormone akkumulieren nicht nur, sie werden auch als chemische Induktoren einer HS-ähnlichen Reaktion diskutiert:

So konnte durch Leitfähigkeits-Tests gezeigt werden, dass die exogene Zugabe von SA in *Arabidopsis* die basale Thermotoleranz verbessert. Außerdem induziert exogene SA die Genexpression von *HSP17.6* bei 22 °C (Clarke et al., 2004). Die Genexpression von *HSP70* in *S. lycopersicum* ist mit Zugabe von SA bei 22 °C nicht zu induzieren, allerdings akkumuliert *HSP70* während Hitze stärker in Anwesenheit von SA als ohne das Hormon (Snyman and Cronje, 2008). Eine Vorbehandlung mit SA, aber auch mit ABA, führte in *A. thaliana* zu einer erhöhten Überlebensrate nach einem Hitzeschock (1 h, 40 °C) sowie einem reduzierten oxidativen Stress (Larkindale and Knight, 2002).

Die Mutante *abi-1* ist unempfindlich gegenüber ABA und zeigt eine erhöhte Akkumulation von Malondialdehyd während der Behandlung mit 37 °C. MDA ist ein Produkt der Lipid-Peroxidation und ein Marker für oxidativen Stress. Außerdem weist *abi-1* eine erniedrigte Überlebensrate bei 37 °C im Vergleich zum WT auf, trotz wildtyp-ähnlicher Spiegel von *HSP101* und *sHSP* (Larkindale and Knight, 2002).

Die Relevanz von Jasmonsäure als chemischer Induktor einer HS-ähnlichen Reaktion ist allerdings kontrovers: Einerseits wird die JA-insensitive *Arabidopsis*-Mutante *coi1-1* durch eine Behandlung von 38 °C schwerer geschädigt als ihr korrespondierender Wildtyp. Auch eine Vorbehandlung des WTs mit Methyljasmonat (MeJa) führt zu einem erniedrigten Elektrolyt-Austritt während einer 16-stündigen Behandlung mit 38 °C. Diese Temperatur

1 Einleitung

über einen Zeitraum von 16 h ist für *Arabidopsis* allerdings generell gut tolerierbar. Andererseits konnte bisher nicht gezeigt werden, dass exogenes MeJA zu einer Expression von HSP-Genen führt. Und auch die *opr3*-Mutante, welche kein JA synthetisieren kann, zeigt nur geringe Tendenzen für eine eventuell stärkere Erholung nach einem Hitzestress bei 38 °C als der korrespondierende WT (Clarke et al., 2009).

1.3.3.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Auch reaktive Sauerstoffspezies werden im Laufe eines Hitzestresses gebildet (Volkov et al., 2006; Königshofer et al., 2008; Pucciariello et al., 2012; Driedonks et al., 2015).

Zu Beginn eines Hitzeschockes wurde beobachtet, dass HSFs kurzzeitig die Expression von Genen für Superoxid-Dismutasen unterdrücken (mittels *miRNA398*), wenig später aber die Genexpression für Radikalfänger (engl.: Scavenger) induzieren. Durch diesen scheinbaren Widerspruch kann vermutet werden, dass ROS wichtig für die Initialisierung des HSR ist, allerdings aber auch in zu großen Mengen Schaden verursachen kann (Driedonks et al., 2015).

Hitze führt nicht nur zu einer anfänglichen Unterdrückung der Superoxid-Dismutasen-Transkription, Hitze erhöht zudem die Aktivität der NADPH Oxidase, welche das ROS (Superoxid, O_2^-) herstellt (Miller et al., 2009). Zudem weisen die *Arabidopsis*-Mutanten *rbohD* und *rbohB* eine verringerte Thermotoleranz (basal und erworben) auf (Larkindale et al., 2005).

Die isothermale Behandlung mit einer ROS (H_2O_2) führt zu einer Genexpression von *AtHSP17.6*, *AtHSP18.2* und *AtAPX2*, welche vergleichbar mit der nach Hitzebehandlung (37 °C) ist. Passend dazu führt die Zugabe von Ascorbinsäure (ein Radikalfänger, Scavenger) während eines Hitzestresses zu einer reduzierten Genexpression von *AtHSP17.6* und *AtHSP18.2* (Volkov et al., 2006).

Es konnte außerdem eine Verbindung zu dem Calcium-Signal gefunden werden: Die Zugabe von H_2O_2 resultiert in einer Akkumulation von intrazellulärem Ca^{2+} (Rentel and Knight, 2004). Darüber hinaus wurde berichtet, dass pflanzliche NADPH Oxidasen ein Ca^{2+} -Bindemotiv besitzen, was ein potentieller Mechanismus für die direkte Regulation der Proteinaktivität über Ca^{2+} -Ionen darstellen könnte (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998; Königshofer et al., 2008).

1.3.3.3 HSP90-Inhibitoren

Die Wirkung von verschiedenen HSP90-Inhibitoren als Induktoren der Hitzeschockantwort ist bereits gut erforscht: sowohl in *Arabidopsis thaliana* und *Physcomitrella patens* induzieren die HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol eine HS-ähnliche

1 Einleitung

Genexpression und führen zu einer erhöhten Thermotoleranz (Yamada et al., 2007; Saidi et al., 2009). Für *Saccharomyces* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der HSP90-Inhibitor Celastrol die Expression Hitze-responsiver Gene induziert und somit auch zu einer Thermotoleranz führt (Trott et al., 2008).

Es scheint, als würde in der HSR ein komplexes Netzwerk vieler Hitzesensoren, Induktoren und Signalweiterleitungen zusammenarbeiten, dessen Komplexität noch nicht vollständig aufgedeckt und entdeckt wurde.

1.4 Zielsetzung

Oxylipine entstehen durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und akkumulieren während einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren. So gibt es Hinweise auf eine Akkumulation der Oxylipine 12-Oxophytodiensäure (OPDA), Jasmonsäure (JA) und Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile) in *Arabidopsis thaliana* während einer Behandlung von 38 °C (Clarke et al., 2009). Außerdem ist bekannt, dass die exogene Zugabe von OPDA, aber nicht von JA, eine Induktion von Hitzeschockgenen bewirkt (Mueller et al., 2008; Taki et al., 2005). Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Oxylipinen liegt in ihrer Struktur: OPDA enthält eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe und ist damit chemisch reaktiv, ein sogenanntes reaktives elektrophiles Spezies (RES), während JA kein RES-Oxylipin ist. Der Signalweg und die biologischen Funktionen von JA sind bereits gut aufgeklärt, während über die RES-Oxylipine nur wenig bekannt ist. Die Signaltransduktion verläuft teilweise über TGA-Transkriptionsfaktoren, diese regulieren jedoch nicht die Induktion der Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine. Auch über die Funktionen der RES-Oxylipine in *Arabidopsis thaliana* ist bisher wenig bekannt (Mueller et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion und Signaltransduktion der RES-Oxylipine während der Hitzeschockantwort in *Arabidopsis thaliana* aufzuklären.

Hierfür sollte die RES-Oxylipin-induzierte Genexpression der Hitzeschockgene genauer charakterisiert werden. Es sollte geklärt werden, welche Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine induziert werden und die Stärke der Induktion mit der von Hitze verglichen werden. Dies sollte *in silico* mit bereits publizierten Transkriptom-Daten als auch *in vivo* mit repräsentativen Genen in *A. thaliana* durchgeführt werden.

1 Einleitung

Außerdem sollten Genexpressionsanalysen mit diversen *Arabidopsis*-Mutanten zur Identifizierung von Komponenten der TGA-unabhängigen Signaltransduktion von RES-Oxylipinen dienen.

Zudem sollte geklärt werden, inwieweit strukturell verschiedene RES eine Induktion von Hitzeschockgenen bewirken. Dies sollte mittels eines Screenings verschiedener RES-Spezies und RES-Oxylipine hinsichtlich ihrer *HSP101*-Induktion untersucht werden.

Darüber hinaus sollte aufgeklärt werden, ob die Induktion von Hitzeschockgenen durch RES-Oxylipine ausreicht, um eine (chemisch induzierte) Thermotoleranz zu vermitteln.

Dies sollte durch Thermotoleranzversuche mittels exogener Zugabe von RES-Oxylipinen geklärt werden. Im Speziellen sollte auch die Rolle von endogen gebildeten RES-Jasmonaten in der basalen und erworbenen Thermotoleranz geklärt werden. Hierfür sollten verschiedene funktionale Thermotoleranz-Experimente und Genexpressionsanalysen mit einer Jasmonat-defizienten Mutante durchgeführt werden.

2 Material und Methode

2.1 Chemikalien, Lösungen und andere Reagenzien

Die Substanzen Geldanamycin, Celastrol, Radicicol und PGA₁ wurde von Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) bezogen.

OPDA wurde unter Verwendung von Leinsamenpulver aus Linolensäure synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt (Parchmann et al., 1997).

Tabelle 2.1: Benötigte Chemikalien, Lösungen und andere Reagenzien

Produkt	Hersteller
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
DanKlorix	Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (absolute Molecular Biology grade)	AppliChem, Darmstadt
Glycogen	Fermentas, St. Leon-Rot
Thiaminhydrochlorid	Sigma Aldrich©, München
„HPLC-grade“-H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Murashige und Skoog Medium, Basal Salt Mixture	Duchefa, Biochemie, Haarlem, Niederlande
myo-Inositol	Merck KGaA, Darmstadt
PEG6000	AppliChem, Darmstadt
Phyto Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Saccharose	Südzucker, Mannheim
Sorbitol	AppliChem, Darmstadt

2 Material und Methode

2.2 Enzyme, Puffer und Kits

Tabelle 2.2: Benötigte Enzyme, ihre zugehörigen Puffer und verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H(-)	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Reaktionspuffer (5x)	
TrueStart™ Hot Start Taq DNA-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot
TriFast™, peqGOLD	peqlab, Erlangen
Absolute™ qPCR SYBR® Green Capillary Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase-Puffer DNase I + MgCl ₂ (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.3 Antikörper und verwendetes Material für die Proteinbiochemie

Tabelle 2.3: Benötigte Materialien für die Proteinbiochemie

Bezeichnung	Hersteller
Antikörper gegen HSP101 Produktnr. AS07 253	Agrisera AB, Vännäs, Schweden
Antikörper anti-Maus konjugiert mit HRP (engl.: horseradish peroxidase)	
PVDF Membran Immobilon-P, 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck KGaA, Darmstadt

2.4 Primer für die realtime PCR

Tabelle 2.4: Benötigte Primer (für die Genexpressionsanalysen, quantitative realtime PCR). Alle verwendeten Primer wurden bezogen von TIB® MOLBIOL, Berlin. fwd = forward, rev = revers

Primer	ATG- Nummer		Nukleotidsequenz (5' → 3')	Produkt -länge
<i>SAND</i>	At2g28390	fwd	AACTCTATGCAGCATT	219 bp
		rev	GGTGGTACTAGCACAA	
<i>HSP101</i>	At1g74310	fwd	TGAGCTAGCTGTGAATGCAG	287 bp
		rev	TCAACTGGTCAACAGCCAAA	
<i>HSFA2</i>	At2g26150	fwd	CAGCAAGGATCTGGGATGTC	121 bp
		rev	GCTGTTGCCTCAACCTAACT	
<i>DREB2A</i>	At5g05410	fwd	AGGGTCGAAGAAGGGTTGTA	167 bp
		rev	CAGCTTCTTGAGCAGTAGGG	
<i>HSP26.5</i>	At1g52560	fwd	TGTGAAAGAGGTTTGGTCGG	175 bp
		rev	TGTTACGCCAGAGGCTTTTT	

Alle verwendeten Primer (siehe Tabelle 2.4) wurden mittels „HPLC-grade“-H₂O auf 100 µM verdünnt.

2.5 Geräte

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte und ihre Typenbezeichnungen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessung	Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Schwerte
Autoklav	Tuttnauer Systec 5075ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Dot Blot Apparatur	Bio-Dot®SF Microfiltration Apparatur	Bio-RAD, Hercules, USA
Heizblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Kamera zur Detektion der Chemolumineszenz	ChemiDoc™ MP	Bio-RAD, Hercules, USA

2 Material und Methode

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Klimaschränke	AR-66L	Percival, Perry, USA
	AR-36L (für alle 37 °C- Behandlungen)	Percival, Perry, USA
	KBW 240 (für alle 45 °C- Behandlungen)	Binder GmbH, Tuttlingen
Kugelmühle	MM 400	Retsch, Haan
Massenspektrometer	Quattro Premier Triple Quadrupol	Waters, Milford, USA
PCR-Geräte	CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter	Lab pH meter inoLab® pH 7110	WTW GmbH, Weilheim
Platereader	Microplate Reader MRX® Revelation	DYNEX Technologies. Inc., Chantilly, USA
Reinstwasseranlage	RiOs Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt
	Milli-Q® Gradient System	Merck Millipore, Darmstadt
Rotationsvakuum- konzentrator	RVC 2-25, dazu:	Martin Christ GmbH, Osterode
	Membranvakuumpumpe Typ M2 C2	Vacuubrand GmbH + Co, Wertheim
Sterilbänke		CeagEnvirco, Dortmund
Scanner	Scan Maker 9800 XL	Microtek, Hsinchu, Taiwan
Ultraschalbad	Sonorex TK52	Bandelin, Berlin
	Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH, Darmstadt
UPLC	Acquity UPLC™ (mit entsprechenden Säulen)	Waters, Milford, USA
Vakuum-Pumpe	N740,3 FT.18	KNF Neuberger Inc., Trenton, USA
Waagen	Laborwaage: PE 1600	Mettler Toledo, Gießen
	Analysenwaagen: Mettler AT 200 Fact; Mettler XPE 205	Mettler Toledo, Gießen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
	Galaxy MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt
	Megafuge® 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

2.6 Pflanzenmaterial

Für alle durchgeführten *in vivo* Experimente wurden ausschließlich *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verwendet. Der Ökotyp aller verwendeten transgenen Pflanzen ist Columbia 0 (Col-0) oder Wassilewskja (WS) (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Verwendete transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>hsfA1 ab</i>	WS	T-DNA-Insertionen	Friedrich Schöffl, Tübingen, Deutschland: entspricht der <i>hsf1/3</i> (Lohmann et al., 2004)
<i>hsfA1 abd</i>	Col-0 und WS	T-DNA-Insertionen	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Tokio, Japan (Yoshida et al., 2011)
<i>hsfA1 abde</i>	Col-0 und WS	T-DNA-Insertionen	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Tokio, Japan (Yoshida et al., 2011)
<i>hsfA2</i>	Col-0	T-DNA-Insertion SALK_008978	Friedrich Schöffl, Tübingen, Deutschland
<i>cyp20-3</i>	Col-0	T-DNA-Insertion SALK_024971	ABRC, Columbus, USA (Park et al., 2013)
<i>sat1</i>	Col-0	T-DNA-Insertion SALK_120440	ABRC, Columbus, USA (Park et al., 2013)
<i>dde2</i>	Col-0	mutagenisiert	Beat Keller, Zürich, Schweiz (von Malek et al., 2002)

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>opr3</i>	WS	T-DNA-Insertion	Annick Stintzi, Pullman, Washington, USA (Stintzi and Browse, 2000)

2.7 Anzucht und Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

2.7.1 Pflanzenanzucht auf Erde

Für die Verwundungsversuche sowie für die Experimente mit osmotischen Stress wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen auf Standardzuchterde großgezogen. Dafür wurden Samen direkt auf die Erde ausgesät und nach 14 Tagen pikiert.

Die Kultivierung der Pflanzen fand in einem Percival-Kulturschrank unter Kurztagbedingungen (9 h Licht bei 22 °C, 15 h Dunkel bei 20 °C) statt. Die Lichtintensität lag bei 80 bis 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.7.2 Pflanzenanzucht in und auf MS-Medium

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Keimlinge sowohl in flüssigem als auch auf festem MS-Medium mit 3 % Saccharose (Murashige and Skoog, 1962) großgezogen. Für die Anzucht auf festem MS-Medium wurde vor dem Autoklavieren 9 g/l Phyto Agar zugegeben. Alle Samen wurden vor der Anzucht für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und danach in einem Percival-Kulturschrank kultiviert.

Murashige und Skoog-Medium (1 l):	4,3 g	MS-Medium, Basal Salt Mixture
	0,5 g	MES-Puffer
	1 ml	Vitamin B5
	100 mg	myo-Inositol
	30 g	Saccharose
	mit ddH ₂ O ad 1 l auffüllen	
	pH 5,7 autoklavieren	

2 Material und Methode

Vitamin B5 Stock (1 ml):	100 mg	Myo-Inositol
	10 mg	Thiamin/HCl
	1 mg	Nicotinsäure
	1 mg	Pyrodoxin (=B5)
	mit ddH ₂ O ad 1 l auffüllen	
	sterilfiltrieren	

Für eine Anzucht in und auf MS-Medium wurden zuvor alle benutzten Samen sterilisiert (siehe Abschnitt 2.8).

Für Untersuchungen der Genexpression sowie für die Dot Blot-Analysen wurden *A. thaliana*-Samen auf MS-Agar in Petrischalen ausgelegt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für acht Tage auf MS-Agar, bevor die Keimlinge mittels einer Federstahlpinzette in MS-Medium in eine 24-Loch Multiwellschale transferiert wurden. Es wurden acht Keimlinge pro Loch versetzt. Zwei Tage später, am Tag 10, wurden dem MS-Medium verschiedene Substanzen wie bspw. die RES-Oxylipine PGA₁ oder OPDA (gelöst in DMSO) dazugegeben. Somit besteht bei allen Genexpressions- sowie Dot Blot-Analysen eine Probe aus acht Keimlingen.

Für Beobachtungen der Überlebensrate durch Zugabe von verschiedenen Substanzen wie RES-Oxylipine oder HSP90-Inhibitoren wurden die Keimlinge nach einer achttägigen Anzuchtphase auf MS-Agar in eine 96-Loch-Multiwellschale in flüssiges MS-Medium mittels Federstahlpinzette transferiert. Hier wurde ein Keimling pro Loch versetzt. Auch hier wurden am Tag 10 dem MS-Medium verschiedene Substanzen hinzugegeben.

Um das Wurzelwachstum sowie die Hypokotyl-Elongation zu beobachten, aber auch um die Phytohormone der Keimlinge nach Hitze-Einwirkung zu quantifizieren, wurden Samen direkt mittels sterilen Zahnstochern auf MS-Agar gegeben und auf MS-Agar angezogen.

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte unter Kurztagbedingungen (9 h Licht bei 22 °C, 15 h Dunkel bei 20 °C). Die Lichtintensität lag bei 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.8 Sterilisation der Samen

Arabidopsis thaliana-Samen wurden entweder durch die Begasung mit Chlorgas oder durch eine Bleichlösung sterilisiert.

Für die gasförmige Sterilisation wurden pro 1,5 ml Reaktionsgefäß 50 Samen offen in einen Exsikkator gestellt, in dem sich ein Becherglas befand, welches mit 100 ml DanKlorix gefüllt wurde. Durch Zugabe von 4 ml konzentrierter HCl wurde die Entwicklung von

2 Material und Methode

Chlorgas ausgelöst, was zu einer Sterilisation der Samen führte. Nach 2,5 h Inkubation wurden die Reaktionsgefäße möglichst steril geschlossen, aus dem Exsikkator genommen und für 10 min unter der Sterilbank ausgedampft.

Die flüssige Sterilisation wurde ebenfalls in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Samen wurden für 2 min mit 1 ml 70 % Ethanol inkubiert und danach 10 min mit 1 ml Bleichlösung (frisch angesetzt) behandelt. Zuletzt wurden die Samen fünfmal mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen.

Bleichlösung	10 ml Natriumhypochlorid
	5 ml Wasser (steril)
	10 µl Tween20 (10 %)

2.9 Pflanzenphysiologische Methoden und Behandlungen der Pflanzen

2.9.1 Hitzebehandlung und Behandlung mit RES-Oxylipinen und anderen Substanzen

Alle Hitzebehandlungen erfolgten in Anwesenheit von Licht ($80-100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nur die Versuche zur Hypokotyl-Elongation wurden durch die eingesetzte Alufolie im Dunkeln durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.9.5). Die 37°C -Inkubation der Pflanzen erfolgte in einem Percival-Kulturschrank (AR-36L), während die 45°C -Behandlung in einem Binder-Kulturschrank (KBW 240) durchgeführt wurde. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Kulturschränke ihre jeweilige Temperatur erreicht hatten, bevor die Keimlinge bzw. Pflanzen hineingestellt wurden.

Alle Behandlungen mit RES-Oxylipinen wurden mit Keimlingen durchgeführt, welche zuerst auf festem MS-Agar angezogen wurden, bevor sie mittels einer Federstahlpinzette in flüssiges MS-Medium transferiert wurden. Zwei Tage nach dem Transfer wurde dem MS-Medium verschiedene Substanzen wie beispielsweise die RES-Oxylipine (PGA_1 oder OPDA) oder HSP90-Inhibitoren (GDA, RAD oder CEL) dazugegeben. Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst, so dass zusätzlich Keimlinge als Kontrolle mit der entsprechenden Menge an Lösemittel (DMSO) behandelt wurden.

2.9.2 Verwundung von *Arabidopsis thaliana*

Für die Verwundungsversuche wurden sechs Wochen alte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Col-0 und *dde2*) verwendet, welche auf Standardzuchterde großgezogen wurden. Hierbei wurden jeweils Blätter von zwei Pflanzen pro Probe mittels einer Pinzette durch dreimaliges

2 Material und Methode

Quetschen pro Blattseite, ohne Verwundung der Mittelrippe, verwundet. Nach 1 und 4 h wurden die verwundeten Blätter geerntet und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Als Kontrolle dienten *Arabidopsis*-Blätter, welche nicht verwundet wurden. Die so erhaltenen Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80 °C eingelagert.

2.9.3 Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit PEG6000 und Sorbitol als osmotischer Stressor

Für die Behandlung mit PEG6000 oder Sorbitol zur Erzeugung von osmotischen Stress wurden Blätter von acht Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Col-0 und *dde2*) auf einer 296,5 mM Sorbitol- bzw. 250g/l PEG6000-Lösung so flotiert, dass die Petiolen vollständig in der jeweiligen Lösung eingetaucht waren. Diese Lösungen entsprechen jeweils einem osmotischen Druck von -7,35 bar bzw. -0,735 MPa. Nach 1, 2, 4, 6 und 24 h wurden sieben behandelte Blätter in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Als Kontrolle dienten *Arabidopsis*-Blätter, die für die gleichen Zeiten auf H₂O flotiert wurden. Die so erhaltenen Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80 °C eingelagert.

2.9.4 Bestimmung der Überlebensrate von *Arabidopsis thaliana* (chemisch induzierte Thermotoleranz)

Um zu klären, ob exogen hinzugefügte RES-Oxylipine neben der Expression von Hitzeschockgenen auch eine chemisch induzierte Thermotoleranz (CAT: engl. chemical induced thermotolerance) vermitteln, wurde die Überlebensrate von *Arabidopsis*-Keimlingen bestimmt. Hierfür wurden Samen des Wildtyps Col-0 auf MS-Agar ausgelegt und nach einer Stratifizierungsphase im Percival-Kulturschrank für sechs Tage kultiviert. Die Keimlinge wurden anschließend einzeln in die Löcher von 96-Loch-Multiwellschalen mit flüssigem MS-Medium umgesetzt und an Tag 7 verschiedenen Temperaturprofilen ausgesetzt. Alle Keimlinge zeigten am Tag der Behandlung zwei voll entwickelte Kotyledonen (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001). Die verschiedenen Temperaturprofile sind in der Abbildung 3.18 A genauer erläutert: für die chemisch induzierte Thermotoleranz wurde dem MS-Medium PGA₁ [75 µM], OPDA [75 µM], GDA [50 µM], RAD [50 µM] oder CEL [20 µM] hinzugefügt und die Keimlinge für 4 h darin inkubiert. Im Anschluss wurden sie für 2 h mit 45 °C behandelt. Nach diesem Hitzestress wurden sie weitere 5 bis 6 Tage im Percival-Kulturschrank unter normalen Kurztag-Wachstumsbedingungen kultiviert um dann die Vitalität der Keimlinge zu analysieren. Als "überlebt" galten Keimlinge, welche weitere Blätter ausbildeten und somit weiterhin Wachstum zeigten.

2.9.5 Thermotoleranz-Assays mit *Arabidopsis thaliana* Col-0- und *dde2*-Keimlingen

Zur Analyse der Thermotoleranz im Wildtyp Col-0 sowie in der *dde2*-Mutante wurden Samen beider Genotypen sterilisiert und auf MS-Medium (mit Agar) ausgelegt. Nach einer Stratifizierungsphase wurden die Samen im Percival-Kulturschrank für sechs Tage kultiviert (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001), bevor sie verschiedenen Hitze-Behandlungen ausgesetzt wurden: SAT (37 °C für 2 h, Erholungsphase bei 22 °C für 2 h und anschließender Hitzestress für 2 h bei 45 °C), BT (45 °C für 2 h) oder Kontrolle (22 °C). Nach dieser Behandlung wurden die Keimlinge weitere fünf Tage im Percival-Kulturschrank unter normalen Kurztag-Wachstumsbedingungen kultiviert und dann die Vitalität der Keimlinge analysiert. Als "überlebt" galten Keimlinge, welche weitere Blätter ausbildeten und somit weiterhin Wachstum zeigten.

Die Experimente zur Untersuchung des Wurzelwachstums wurden wie bereits in der Literatur beschrieben durchgeführt (Larkindale et al., 2005). Hierfür wurden vertikal-gewachsene, vier Tage alte Keimlinge (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001) für die verschiedenen Hitzebehandlungen (SAT, BT und Kontrolle, siehe oben) benutzt. Vor der Hitzebehandlung wurde die Wurzellänge der Keimlinge auf der Agar-Platte markiert. Die Keimlinge wurden nach der Hitzebehandlung für drei weitere Tage im Percival-Kulturschrank unter normalen Kurztag-Wachstumsbedingungen kultiviert, bevor die Agar-Platten mit den Keimlingen eingescannt wurden. Die Wurzellängen wurden unter zu Hilfenahme der Software „Agnes Roots Measurements V.1.2“ (Grzegorz Zysko, Polen, 2004) ausgewertet.

Auch die Versuche zur Hypokotyl-Elongation wurden ähnlich durchgeführt wie bereits in der Literatur beschrieben (Hong and Vierling, 2000; Queitsch et al., 2000): auch hier wurden vertikal-gewachsene, vier Tage alte Keimlinge (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001) für die verschiedenen Hitzebehandlungen (SAT, BT und Kontrolle, siehe oben) benutzt. Diese sind allerdings im Dunkeln gewachsen, da die Agar-Platten in Alufolie eingewickelt wurden. Vor der Hitzebehandlung wurde die Hypokotyllänge der Keimlinge auf der Agar-Platte markiert und die Platten erneut in Alufolie eingewickelt. Nach der Hitzebehandlung wurden die Keimlinge für vier weitere Tage, eingewickelt in Alufolie, im Percival-Kulturschrank unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Auch hier wurden die Agar-Platten mit den Keimlingen zur Auswertung eingescannt und die Hypokotyl-Elongation wurde unter zu Hilfenahme der Software „Agnes Roots Measurements V.1.2“ (Grzegorz Zysko, Polen, 2004) gemessen.

2 Material und Methode

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial wurde eine Extraktion mit Trizolpuffer (TriFast™, peqGOLD) durchgeführt. Hierzu wurden die Keimlinge in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäßen mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren und nach Zugabe einer Zirkoniumoxid-Kugel in einer Kugelmühle (2 min, 20 Hz) fein gemahlen. Dieses Pflanzenmaterial wurde nach dem zugehörigen Protokoll aufgearbeitet. Die hierdurch isolierte RNA wurde in DEPC-H₂O gelöst und homogenisiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

2.10.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die isolierte Gesamt-RNA konnte nun auf Konzentration und Reinheit überprüft werden. Hierfür wurde nach entsprechender Kalibrierung mit DEPC-H₂O 1 µl der in DEPC-H₂O gelösten RNA auf den Sensor des Nanodrop 1000 Spectrophotometers pipettiert und die Optische Dichte (OD) bei 260 nm gemessen. Eine OD von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl. Daraus folgt:

$$c \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = E(260) * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.10.3 DNase-Verdau und Fällung der RNA

Um reine RNA zu erhalten und um restliche genomische DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau angesetzt. Hierfür wurde 1 µg RNA auf 8 µl verdünnt (mittels „HPLC-grade“-H₂O) und mit 1 µl DNase I sowie 1 µl DNase-Puffer DNase I + MgCl₂ (10x) versetzt. Dieser Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und die Reaktion mit 1 µl EDTA bei 65 °C über 10 min abgestoppt. Zur Fällung der RNA wurden pro Probe 9 µl DEPC-H₂O, 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 23,1 µl Isopropanol (eisgekühlt) sowie 2,1 µl Ammoniumacetat (5 M) dazugegeben und über Nacht bei -20 °C aufbewahrt.

Die gefällte RNA wurde 20 min bei 4 °C (14000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen (14000 rpm, 8 min, 4 °C). Das so entstandene Pellet wurde bei RT getrocknet, in 7 µl DEPC-H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.10.4 Synthese der cDNA

Mit Hilfe von reversen Transkriptasen ist es möglich, *in vitro* RNA in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde 6,7 µl der DNA-freien RNA (siehe Abschnitt 2.10.3) für 2 min bei 70 °C

2 Material und Methode

inkubiert. Außerdem wurde ein Mastermix aus folgenden Komponenten hergestellt: 2 µl M-MLVxRT 5xReaktions-Puffer, 0,5 µl dNTPS [10 mM] (Fermentas, St. Leon-Rot), 0,4 µl Oligo dT-Primer [100 µM] sowie 0,4 µl M-MLV Reverse Transkriptase RNase H(-). Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 3,3 µl pro Ansatz. Dies wurde auf die wieder heruntergekühlten Proben gegeben und 1 h bei 42 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt. Die so entstandene cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden. Für die realtime PCR wurde außerdem die cDNA mit „HPLC-grade“-H₂O 1:20 bzw. 1:10 (bei Hitzebehandlung) (w/v) verdünnt.

2.10.5 Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels realtime PCR

Um die Genexpression quantitativ untersuchen zu können, wurden realtime PCRs durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf ein weiteres sogenanntes Housekeeping-Gen (Referenzgen) bezogen, da dieses ubiquitär und homogen exprimiert wird (Pfaffl, 2001). Bei dem Housekeeping-Gen dieser Arbeit handelte es sich um *SAND* (At2g28390).

Für die Reaktionsansätze wurde zu 10 µl SYBR® Green Enzymmix und 2 µl cDNA-Template 8 µl eines Primermixes dazugegeben, so dass die Primer-Endkonzentration 1,5 µM pro Primer beträgt. Die Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl durchliefen das in Tabelle 2.7 aufgeführte PCR-Programm.

Tabelle 2.7: Programm der realtime PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Anzahl
95	15:00	1
95	0:15	} 44
59	0:15	
72	0:20	
95	0:10	1
65-95	0:05	1
0,5	∞	1

Zur Auswertung wurde die Genexpression relativ quantifiziert, indem die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Pfaffl angewandt wurde (Pfaffl, 2001).

2 Material und Methode

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Herstellung eines Protein-Gesamtextrakts wurden jeweils acht durch flüssigen Stickstoff tiefgefrorene Keimlinge in einem 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß mit einer Zirkoniumoxid-Kugel versehen und mittels Kugelmühle (2 min, 20 Hz) homogenisiert. Danach wurde 50 µl Schockpuffer (10 mM HEPES-KOH (pH=7,6), 5 mM Saccharose und 5 mM MgCl₂, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert) dazugegeben und für 2 min mittels Vortexermischer gut durchmischt. Durch die darauffolgende, zweifache Zentrifugation (4 min, 4000 rcf, 4 °C) konnten alle gelösten Proteine ohne Präzipitate im Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden. Bei den so hergestellten Proteinextrakten wurde direkt im Anschluss die Konzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.11.2).

2.11.2 Konzentrationsbestimmung des Proteinextrakts

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der isolierte Proteinextrakt mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) und einer BSA-Standardkurve analysiert. Es wurden 2 µl des zu messenden Proteinextrakts mit 98 µl H₂O verdünnt. Danach wurde 150 µl Bradford-Reagenz dazugegeben und für 10 min inkubiert. Es erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Platerader. Alle Konzentrationen wurden zur Fehlervermeidung dreifach bestimmt. Anschließend wurde der restliche Proteinextrakt so quantitativ wie möglich aufgenommen und 1:1 mit 60 %igem Glycerin verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Bradford-Reagenz (100 ml):	10 mg Coomassie blue G-250
	5 ml EtOH (95 %)
	10 ml H ₃ PO ₄
	mit ddH ₂ O ad 100 ml auffüllen

Nach der Herstellung wurde das Bradford-Reagenz zuerst mittels Ethanol-gesäuberte Trichter filtriert und danach zweimal zentrifugiert. Der Überstand wurde im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

2.11.3 Dot Blot und Immunodetektion mittels ChemiDoc™ MP

Die zu analysierenden Proben für den Dot-Blot wurden denaturiert und mit 1xTBS-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Es wurden dreifache, technische Replikaten auf die PVDF

2 Material und Methode

Nitrozellulose-Membran platziert. Hierfür wurde die Dot-Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad sowie eine Vakuum-Pumpe (KNF Neuberger Inc., Trenton, USA) verwendet.

Die Dot-Blot-Apparatur wurde mit drei Filterpapieren und einer durch MeOH aktivierten PVDF-Membran aufgebaut. Nach zweimaligen Spülen mit je 100 µl 1xTBS-Puffer wurde zuerst 100 µl 1x TBS-Puffer, direkt gefolgt von 200 µl der zu analysierende Probe in die jeweiligen Löcher der Dot-Blot-Apparatur gegeben. Durch das angelegte Vakuum wurden so die Proteine auf die Membran gebracht. Nach dem Waschen mittels 300 µl 1xTBS wurde die Membran für 2 h bei RT in der Blocking Solution (3 % Magermilchpulver) inkubiert. Der polyklonale Antikörper Anti-HSP101 (Product No: AS07 253; Lot 1006; Agrisera, Vännäs, Sweden) wurde in der Verdünnung 1:1000 benutzt. Dieser Immunkomplex wurde mittels sekundären HRP-konjugierten AK Anti-Maus (Verdünnung 1:20000) und dem Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD) detektiert. Mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD) konnte die Chemolumineszenz detektiert und mittels Image Lab™ Software, Version 5.0 (BIO-RAD) quantifiziert werden. Zur Normalisierung wurde eine Verdünnungsreihe von 37 °C-Proteinextrakten benutzt, so dass die HSP101-Spiegel prozentual zu denen von 37 °C 4 h ausgedrückt werden konnte.

2.12 Analytische Methoden

2.12.1 Extraktion von Phytohormonen

Das im flüssigen Stickstoff tiefgefrorene Pflanzenmaterial [50 – 250 mg] wurde mit 950 µl Ethylacetat:Ameisensäure (99:1, v/v) und einer Zirkoniumoxid-Kugel versetzt und bis zum vollständigen Auftauen und Bildung einer Suspension gemischt. Nach der Zugabe eines Internen Standard-Gemischs (50 µl; je 1 µg/ml, siehe auch Tabelle 2.11) wurden die Proben für 3 min bei 20 Hz in der Kugelmühle homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei 12000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in einem Rotationsvakuumkonzentrator (40 °C) bis zur Trockne eingengt. Insgesamt wurde die Extraktion viermal durchgeführt, das heißt auf das übriggebliebene Pellet im Schraubdeckelgefäß wurden erneut 950 µl Ethylacetat:Ameisensäure (99:1, v/v) gegeben. Die Probe wurde durch die Kugelmühle homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand wieder eingengt. Nach der vierten Wiederholung dieser Extraktion wurden auf das entstandene Pellet 30 µl Acetonitril gegeben, gut durchmischt und für 5 min ins Ultraschallbad gestellt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (14000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein UPLC-Probengefäß überführt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.12.2 Bestimmung und Quantifizierung von Phytohormonen

Um den Gehalt verschiedener Phytohormone und ihrer Derivate bestimmen und quantifizieren zu können, wurden die Proben zuerst mittels UPLC™ aufgetrennt und dann mittels Massenspektrometer (MS) quantifiziert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine Waters Acquity UPLC, bestehend aus einer Acquity UPLC™ BEH C18 Säule (2,1 x 50 mm; 1,7 µm). Zum Schutz der jeweiligen Säule wurde ein 0,2 µm Inline-Partikelfilter und eine Vorsäule (Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm) vorgeschaltet. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Als mobile Phase wurde 0,1 % Ameisensäure und Acetonitril verwendet. Der Lösungsmittelgradient ist in Tabelle 2.8 angegeben. Das Injektionsvolumen pro Probe betrug 8 µl.

Tabelle 2.8: Lösungsmittelgradient für die chromatographische Auftrennung von Phytohormonen

Zeit [min:s]	0,1 % Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]	Flussrate [µl/min]
0:00	97	3	250
7:00	0	100	250
9:00	0	100	250
9:01	97	3	250
12:00	97	3	250

Die Detektion der chromatographisch aufgetrennten Phytohormone erfolgte durch ein Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer der Firma Waters. Hierfür wurde eine negative Elektrospray-Ionisation (ESI-) durchgeführt. Als Desolvatisierungs- und Konusgas wurde Stickstoff verwendet.

Die einzelnen Verbindungen wurden mittels sog. Multiple Reaction Monitoring (MRM) bestimmt. Die ionisierten Analyte werden im ersten Quadrupol spezifisch ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) isoliert („Parent-Ions“). In der nachfolgenden Kollisionszelle werden sie durch das Kollisionsgas Argon fragmentiert und ein spezifisches Fragment („Daughter-Ion“) im dritten Quadrupol isoliert und im Detektor registriert wird.

Tabelle 2.9: Parameter des Tandem-Massenspektrometers für die Detektion der Phytohormone

Parameter	Einstellung
Kapillarspannung	3 kV
Flussrate Desolvatisierungsgas (N ₂)	800 l/h
Desolvatisierungstemperatur	400 °C
Flussrate Konusgas (N ₂)	50 l/h
Quellentemperatur	120 °C
Flussrate Kollisionsgas (Ar)	0,27 ml/min

Tabelle 2.10: Spezifische Massenübergänge (*m/z*) der einzelnen Analyten sowie verwendeten Kollisionsenergien und Konusspannungen

Verbindung	<i>m/z</i> Parent-Ion	<i>m/z</i> Daughter-Ion	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]
SA	137,1	93,0	17	17
D4-SA	141,1	97,0	17	17
JA	209,1	59,0	19	17
DHJA	211,1	59,0	19	17
DnOPDA	263,1	165,0	22	26
OPDA	291,1	165,0	22	26
18O-OPDA	295,1	165,0	22	26
JA-NVE	308,1	116,0	24	18
JA-Ile	322,1	130,0	24	18

Die Identifikation der Analyten wurde anhand der Retentionszeit und den spezifischen MRM-Übergängen durchgeführt. Die Quantifizierung der Analyten erfolgte durch den Flächenvergleich mit dem jeweiligen Internen Standard (IS) unter Berücksichtigung der substanzspezifischen Responsefaktoren.

Tabelle 2.11: Responsefaktoren zur Quantifizierung der Phytohormone

Analyt	Interner Standard	Responsefaktor	Menge Interner Standard [ng]
JA	dihydroJA (dhJA)	1	50
OPDA	[¹⁸ O ₂]-OPDA	1,4	50
dnOPDA	[¹⁸ O ₂]-OPDA	1,5	50
JA-Ile	JA-Norvalin	1,3	50
ABA	[D ₆]-ABA	2,3	50
SA	[D ₄]-SA	2,4	50

2.12.3 Extraktion von Raffinose

Die im flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Keimlinge [15-30 mg] wurden mit einer Zirkoniumoxid-Kugel versetzt und für 3 min bei 21 Hz zerkleinert. Danach wurde die noch tiefgefrorenen Proben mit je 250 µl Methanol-H₂O (50:50, v/v) sowie einem Internen Standard (50 µl; je 1 µg/µl D2-Trehalose und D2-Glucose) versetzt und gemischt. Es folgte eine dreiminütige Inkubationszeit bei 80 °C im Wasserbad. Danach wurden die Proben für 3 min bei 21 Hz in der Kugelmühle homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation (zweimal 10 min bei 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein UPLC-Probengefäß überführt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.12.4 Bestimmung und Quantifizierung von Raffinose

Um den Gehalt von Raffinose quantifizieren zu können, wurden die Proben zuerst mittels UPLC™ aufgetrennt und dann mittels Massenspektrometer (MS) quantifiziert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine Acquity UPLC™ BEH C18 Säule (2,1 x 100 mm; 1,7 µm). Zum Schutz der jeweiligen Säule wurde ein 0,2 µm Inline-Partikelfilter vorgeschaltet. Die Säulentemperatur betrug 35 °C. Als mobile Phase wurde Wasser mit 0.1 % NH₄OH und Acetonitril verwendet. Der Lösungsmittelgradient hierzu ist in Tabelle 2.12Tabelle 2.12Tabelle 2.8 angegeben. Das Injektionsvolumen pro Probe betrug 5 µl.

Tabelle 2.12: Lösungsmittelgradient für die chromatographische Auftrennung von Zuckern wie Raffinose

Zeit [min:s]	A: 80 % Acetonitril, 20 % Wasser mit 0,1 % NH ₄ OH [%]	B: 30 % Acetonitril, 70 % Wasser mit 0,1 % NH ₄ OH [%]	Flussrate [μl/min]
0:00	90	10	200
10:00	30	70	200
10:01	90	10	200
25:00	90	10	200

Die Detektion der chromatographisch aufgetrennten Zucker erfolgte durch ein Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer der Firma Waters. Hierfür wurde eine negative Elektrospray-Ionisation (ESI-) durchgeführt. Als Desolvatisierungs- und Konusgas wurde Stickstoff verwendet.

Die Raffinose wurden mittels sog. Multiple Reaction Monitoring (MRM) bestimmt. Der ionisierte Analyt wird im ersten Quadrupol spezifisch seines Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) isoliert („Parent-Ion“). In der nachfolgenden Kollisionszelle wird er durch das Kollisionsgas Argon fragmentiert und ein spezifisches Fragment („Daughter-Ion“) im dritten Quadrupol isoliert und im Detektor registriert wird.

Tabelle 2.13: Parameter des Tandem-Massenspektrometers für die Detektion der Zucker

Parameter	Einstellung
Kapillarspannung	2,8 kV
Flussrate Desolvatisierungsgas (N ₂)	500 l/h
Desolvatisierungstemperatur	350 °C
Flussrate Konusgas (N ₂)	50 l/h
Quellentemperatur	120 °C
Flussrate Kollisionsgas (Ar)	0,27 ml/min

Die Identifikation von Raffinose wurde anhand der Retentionszeit (5,9 min) und den spezifischen MRM-Übergängen (m/z 503>179) durchgeführt (Konusspannung 18 V, Kollisionsenergie 14 eV). Die Quantifizierung erfolgte durch den Flächenvergleich mit dem

2 Material und Methode

Internen Standard D2-Trehalose unter Berücksichtigung des substanzspezifischen Responsefaktors von 0,46.

2.13 *In-silico*-Analyse zweier verschiedener Microarray-Daten

Die bereits publizierten Transkriptom-Daten für die *in-silico*-Analyse zweier Microarray-Datensätze sind in der Datenbank „Gene Expression Omnibus at the National Center for Biotechnology Information“ unter den Zugangsnummern GSE26266 und GSE10749 zu finden (Liu et al., 2011; Mueller et al., 2008). Für den Vergleich dieser Datensätze wurde ein p-Wert von $<0,05$ angesetzt und die Software „Excel“ von Microsoft® Office genutzt.

2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA). Es wurde der studentische t-Test unabhängiger Stichproben angewendet und die Signifikanzniveaus mit $*p<0,05$, $**p<0,01$ und $***p<0,001$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der RES-Oxylipin-induzierten Genexpression von Hitzeschockgenen in *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Vergleich zwischen RES-Oxylipin- und Hitze-induzierten Transkriptom *in silico*

Aufgrund der bereits publizierten Transkriptom-Daten der RES-Oxylipine OPDA und PPA₁ ist bereits bekannt, dass RES-Oxylipine, im Gegensatz zu den non-RES-Oxylipinen, Hitzeschockgene induzieren (Mueller et al., 2008; Taki et al., 2005). In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, wie groß die Überschneidung zwischen dem Hitze-induzierten- und dem RES-Oxylipin-induzierten-Transkriptom ist und welche Hitzeschockgene im Detail durch OPDA induziert werden. Hierfür wurden bereits publizierte Microarray-Daten *in silico* verglichen (Mueller et al., 2008; Liu et al., 2011).

Das Transkriptom von Hitze-behandelten *Arabidopsis*-Keimlingen besteht in diesem Falle aus allen Genen, die in sieben Tage alten Col-0-Keimlingen (gewachsen auf 0.5x MS-Agar mit 1 % Zucker, 2 biologische Replikate) durch 37 °C innerhalb einer Stunde um das mindestens 3fache angestiegen sind (GSE26266) (Liu et al., 2011). Das OPDA-Transkriptom besteht in diesem Fall aus allen Genen, die in zehn Tage alten Col-0-Keimlingen (gewachsen in 1x MS-Agar mit 2 % Zucker, 3 biologische Replikate) durch 75 µM OPDA innerhalb von vier Stunden um das mindestens 3fache angestiegen sind (GSE10749) (Mueller et al., 2008). Für beide Microarrays wurde der sog. GeneChip® ATH1 der Firma Affymetrix benutzt und ein p-Wert von <0,05 angesetzt.

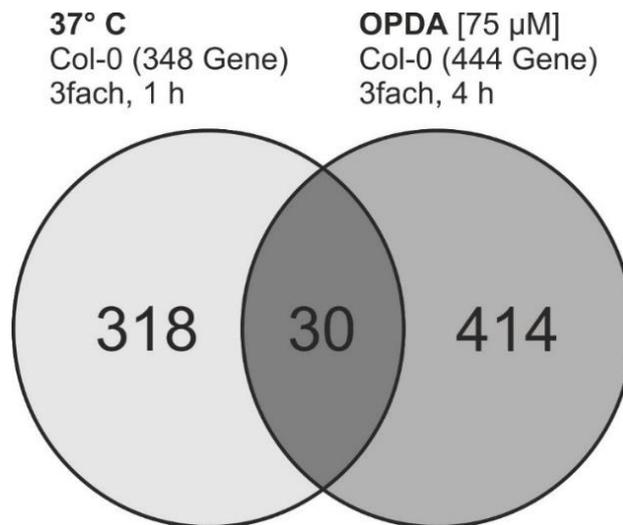


Abbildung 3.1: Venn-Diagramm des *in silico*-Vergleichs zweier Transkriptom-Analysen (Liu et al., 2011; Mueller et al., 2008). Es wurden unter 348 Hitze-induzierbaren Genen und 444 OPDA-induzierbaren Genen die gemeinsamen, OPDA- und Hitze-responsiven Gene herausgesucht.

Die 37 °C-Behandlung des *A. thaliana*-Ökotyps Col-0 führt zu einer (mindestens 3fachen) Induktion von 348 Genen, die exogene Zugabe von 75 µM OPDA zu der Hochregulation (mindestens 3fach) von 444 Genen. Fast 7 % (6,8 %) aller durch OPDA-hochregulierten Gene werden auch durch moderate Hitze induziert, das heißt 30 Gene werden sowohl von OPDA als auch durch 37 °C mehr als 3fach hochreguliert (siehe Abbildung 3.1). Eine Liste dieser Gene ist in Tabelle 3.1 zu finden.

Tabelle 3.1: Auflistung der 30 durch OPDA und durch Hitze induzierbaren Gene. Die grau hinterlegten Gene (Nr. 1- 26) sind in der Hitzeschockantwort abhängig von den Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d und e. Die Gen-Namen wurden mit Hilfe der Datenbank „The Arabidopsis Information Resource (TAIR)“ auf www.arabidopsis.org am 2.3.2016 gefunden (Huala et al., 2001). Weitere Informationen zu diesen Genen befinden sich im Anhang (siehe Abschnitt 8).

ATG- Nummer	Gen-Name	xfach induziert durch OPDA	xfach induziert durch 37 °C
1	AT3G46230 AtHSP17.4	18,6	997
2	AT5G12030 AtHSP17.6A	30,5	988
3	AT1G53540 Unbekannt Sequenz-Ähnlichkeit zu: HSP20-like chaperones superfamily protein	18,4	959

3 Ergebnisse

	ATG- Nummer	Gen-Name	xfach induziert durch OPDA	xfach induziert durch 37 °C
4	AT1G52560	Unbekannt Sequenz-Ähnlichkeit zu: HSP20-like chaperones superfamily protein	52,3	655
5	AT4G27670	AtHSP21	8,3	516
6	AT5G12020	AtHSP17.6II	3,8	478
7	AT2G46240	AtBAG6 (Arabidopsis thaliana BCL-2- Associated Athanogene 6)	10	467
8	AT4G10250	AtHSP22.0	26,8	381
9	AT1G16030	AtHSP70B	28,4	369
10	AT2G29500	Unbekannt Sequenz-Ähnlichkeit zu: HSP20-like chaperones superfamily protein	6,9	343
11	AT1G74310	AtHSP101	13	254
12	AT4G12400	HOP3	4	159
13	AT1G54050	Unbekannt Sequenz-Ähnlichkeit zu: HSP20-like chaperones superfamily protein	4,8	142
14	AT2G32120	AtHSP70T-2	4,4	110
15	AT3G08970	TMS1 (Thermosensitive male sterile 1), ATERDJ3A	3,2	107
16	AT2G47180	AtGOLS1	9,9	81,5
17	AT5G52640	AtHSP90-1, HSP81-1, HSP83	5,3	70,1
18	AT5G48570	ROF2, AtFKBP65	3,2	66,2
19	AT3G24500	MBF1C (Multiprotein bridging factor 1C)	3,6	51,8
20	AT5G05410	DREB2A	11,6	46,4
21	AT4G36990	AtHSF4, AtHSFB1, TBF1 (TL1- Binding Transcription Factor 1)	4,3	28,1
22	AT4G25380	AtSAP10 (Arabidopsis thaliana Stress- Associated Protein 10)	8,9	33
23	AT2G24100	ASG1 (Altered Seed Germination 1)	3,1	16,7
24	AT3G28740	CYP81D11 (Cytochrome P450 Family, Subfamily D, Polypeptide 11)	71,8	3,6
25	AT2G29450	GSTU1 (Glutathione S-Transferase Tau 1), GSTU5, At103-1Am	3,1	13,1

3 Ergebnisse

ATG- Nummer	Gen-Name	xfach induziert durch OPDA	xfach induziert durch 37 °C
26	AT5G59820 AtZAT12, RHL41 (Responsive to high light 41)	6,5	10,5
27	AT5G04340 AtZAT6, C2H2 (Cold induced Zinc Finger Protein 2), CZF2	4,1	13,4
28	AT1G64200 VHA-E3 (Vacuolar H ⁺ -ATPase Subunit E Isoform 3)	3,9	3
29	AT2G23110 Unbekannt Sequenz-Ähnlichkeit zu: Late embryogenesis abundant protein, group 6	3,8	5,1
30	AT3G28210 SAP12 (Stress-Associated Protein 12), PMZ	10,4	34,4

Die Stärke der Induktionen durch beide Behandlungen kann nur schwer verglichen werden, da die Daten von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unter unterschiedlichen Bedingungen generiert wurden und zudem die Angabe „xfache Induktion“ stark durch die basal sehr niedrigen Kontrollwerte beeinflusst wird. Außerdem wurden die Keimlinge für die Microarrays unterschiedlich lange behandelt (1 h 37 °C oder 4 h 75 µM OPDA). Trotzdem fällt bei einem Vergleich eine hohe Differenz auf (siehe Tabelle 3.1), es scheint als würde die Hitzebehandlung (1 h, höchste Induktion ist hier 988fach) eine stärkere Induktion hervorrufen als die Behandlung mit OPDA (4 h, höchste Induktion ist hier 72fach) oder einer anderen Kinetik folgen.

Die Arbeitsgruppe um Liu et al. (2011) hat zusätzlich die Geninduktion durch Hitze in der *hsfA1 abde* Mutante überprüft. Die Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d und e gelten als Masterregulatoren der HSR in *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2011). Durch die Bildung eines Quotienten (xfache Induktion [37 °C in Col-0]/xfache Induktion [37 °C in *hsfA1 abde*]) untersuchte Liu et al. die Abhängigkeit der Hitze-responsiven Gene von den Masterregulatoren HSFA1 a,b,d und e. Die Mehrheit der durch OPDA- und Hitze-induzierbaren Gene (26 von 30) sind in der Hitzeschockantwort abhängig von HSFA1 a,b,d und e (Nr. 1- 26, siehe Tabelle 3.1). Für die Induktion durch OPDA wurde bisher die mögliche Abhängigkeit von den Masterregulatoren noch nicht untersucht.

Da aber über die Stärke der Induktion aufgrund der verschiedenen Behandlungszeiten nur sehr begrenzt eine Aussage getroffen werden kann, wurden in dieser Arbeit vier

3 Ergebnisse

repräsentative Gene der Hitzeschockantwort genauer hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit durch RES-Oxylipine und Hitze untersucht: *HSP101*, *HSP26.5*, *DREB2A* und *HSFA2*.

3.1.2 Vergleich der Induktion durch RES-Oxylipine bzw. Hitze von vier repräsentativen Hitzeschockgenen *in vivo*

Die Hitzeschockproteine *HSP101*, *HSP26.5* sowie der Transkriptionsfaktor *DREB2A* werden entsprechend der *in-silico*-Analyse sowohl von OPDA als auch durch eine 37 °C-Behandlung mehr als 3fach induziert (siehe Tabelle 3.1, Nr. 11,4 und 20). Der Transkriptionsfaktor *HSFA2* wurde als viertes Hitzeschockgen gewählt, da er einen sehr stark Hitze-responsiven Transkriptionsfaktor darstellt (350fach durch 1 h bei 37 °C, p-Wert <0,05) (Liu et al., 2011) und auch durch OPDA zumindest 2,6fach hochreguliert wird (4 h mit 75 µM, p-Wert <0,05) (Mueller et al., 2008). Um dieses *in-silico*-Ergebnis zu bestätigen und um einen Vergleich der Genexpressionsstärke zu ziehen, wurden zehn Tage alte Col-0-Keimlinge für 4 h mit 75 µM OPDA, PGA₁ oder 37 °C behandelt. Danach wurde aus den Keimlingen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels realtime qPCR die Genexpression quantifiziert. Die Daten sind Teil eines größeren Experiments mit Signaltransduktionsmutanten (siehe auch Abschnitt 3.2.2).

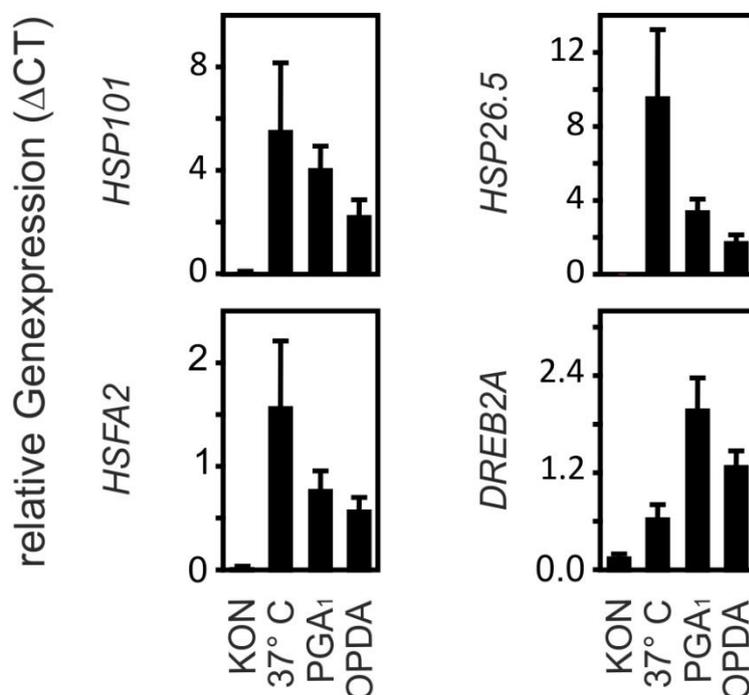


Abbildung 3.2: Genexpressionsanalyse von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge wurden mit 37 °C, PGA₁ oder OPDA [je 75 µM] bzw. DMSO als Kontrolle für 4 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

3 Ergebnisse

Die Abbildung 3.2 zeigt die relative Genexpression des *HSP101*-Gens nach einer vierstündigen Behandlung mit 37 °C, PGA₁ oder OPDA [je 75 µM]. Es ist eine deutliche Induktion sowohl durch 37 °C (70fach stärker als unter Kontrollbedingungen) als auch durch PGA₁ (51fach) oder OPDA (28fach) zu erkennen. Die Induzierbarkeit des Hitzeschockgenes *HSP101* durch RES-Oxylipine scheint zumindest nach 4-stündiger Inkubationszeit mit der durch Hitze durchaus vergleichbar zu sein. Auch die Expression der Gene *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* (Abbildung 3.2) wird sowohl durch 37 °C als auch durch die RES-Oxylipine PGA₁ und OPDA hochreguliert. Jedoch bewirkt die Hitzebehandlung eine etwa 3fach stärkere Induktion der *HSP26.5*-Expression (1206fach) als die Zugabe von RES-Oxylipinen (433fach durch PGA₁ bzw. 226fach durch OPDA) (Abbildung 3.2). Diese Beobachtung trifft auch auf *HSFA2* zu: die Expression ist um das 53fache hochreguliert durch die Inkubation mit 37 °C, jedoch nur um das 26fache durch PGA₁ bzw. 19fache durch OPDA (Abbildung 3.2). Die Genexpressionsanalyse von *DREB2A* jedoch zeigt, dass die exogen zugegebenen RES-Oxylipine nach 4 h eine stärkere Akkumulation von *DREB2A*-mRNA (8 bzw. 12fach) bewirken als die Inkubation mit 37 °C (4fach) (Abbildung 3.2).

Bei einem Vergleich mit den *in-silico*-Ergebnissen ist zu sehen, dass die Resultate aus den Microarrays von Liu et al. und Mueller et al. bestätigt werden konnten: alle vier getesteten Hitzeschockgene werden sowohl durch Hitze als auch durch RES-Oxylipine stark induziert.

Um zu klären, ob die Genexpression nach Hitze-Behandlung einer anderen Kinetik folgt als die nach RES-Oxylipin-Behandlung und um einen besseren Vergleich der Induktionsstärke zu gewährleisten, wurden Wildtyp-Keimlinge zum einen mit 75 µM OPDA, PGA₁ sowie zum anderen mit 37 °C behandelt und nach 1, 2, 4 und 6 h geerntet. Die anschließend isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels realtime qPCR die Genexpression quantifiziert. Die folgenden Daten wurden im Rahmen eines Experiments generiert, in welchem zudem Keimlinge mit HSP90-Inhibitoren behandelt wurden (siehe auch Abschnitt 3.3.1).

3 Ergebnisse

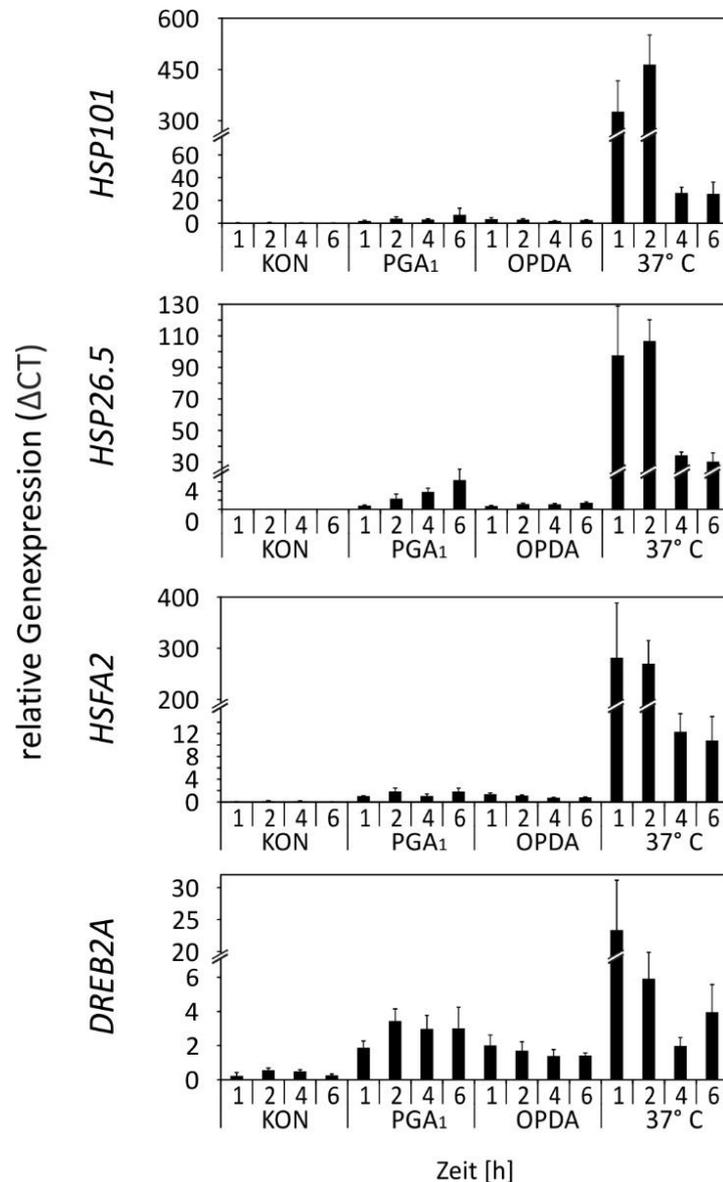


Abbildung 3.3: Genexpressionsanalyse von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* mittels quantitativer realtime PCR. Hierfür wurden Keimlinge mit 37 °C, PGA₁ oder OPDA [75 μM] bzw. DMSO als Kontrolle für 1, 2, 4 und 6 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

Wie in Abbildung 3.3 deutlich zu erkennen ist, führt die Behandlung mit 37 °C zu einer schnellen und transienten Expression der analysierten Hitzeschockgene. Dagegen verläuft der Anstieg der Expression der Hitzeschockgene nach RES-Oxylipin-Zugabe eher langsam und fällt nur wenig bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (6 h) ab. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Kinetik der Genexpression durch verschiedene Behandlungen (Hitze vs. RES-Oxylipine) unterschiedlich und für diese Behandlungen charakteristisch ist. So wird deutlich, dass ein Vergleich der Induktions-Stärke an Hand der 4 h-Werte zu falschen Schlussfolgerungen führen kann. Hitze hat einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Hochregulation der Genexpression als die getesteten RES-Oxylipine.

3 Ergebnisse

Da die Berechnung der „xfachen Induktion“ (ΔCT -Wert Behandlung/ ΔCT -Wert Kontrolle) stark von den Kontrollwerten abhängt, wurden hier für jedes Gen alle Kontrollwerte nach 1, 2, 4 und 6 h gemittelt. Dies war möglich, da alle getesteten Hitzeschockgene unter basalen Kontrollbedingungen sehr schwach und konstant exprimiert sind. Die so ermittelten ΔCT -Werte der Kontrolle betragen für *HSP101* 0,354 ($\pm 0,215$ SD), *HSP26.5* 0,01 ($\pm 0,008$ SD), *HSFA2* 0,106 ($\pm 0,079$ SD) und für *DREB2A* 0,384 ($\pm 0,189$ SD).

Das Maximum der Expression aller vier Gene nach Hitzebehandlung liegt bei 1 bis 2 h und deutlich über der maximalen Induktion durch RES-Oxylipine. Beispielsweise ist *HSP101* nach 2 h bei 37 °C 1313fach induziert (Maximum), während die stärkste Induktion durch ein RES-Oxylipin, in diesem Falle PGA_1 , nach 6 h lediglich 21fach ist (Maximum). Dies entspricht lediglich 1,6 % (Abbildung 3.3) der maximal durch 37 °C induzierten Expression. Auch die maximale Induktion von *HSP26.5* oder *HSFA2* durch PGA_1 (6 h) entsprechen jeweils nur 6 % und 0,7 % der Maximal-Induktion durch 37 °C (Abbildung 3.3). Auch bei *DREB2A* liegt das Maximum nach Hitzebehandlung deutlich über der maximalen Induktion durch RES-Oxylipine. Allerdings sind in diesem Fall die 4 h- und 6 h-Werte mit denen der RES-Oxylipine vergleichbar (Abbildung 3.3).

Beim Vergleich der 4 h-Werte dieses Experiments mit denen des zuvor gezeigten (siehe Abbildung 3.2), ist eine hohe Varianz festzustellen. Aus diesem Grund sind die absoluten ΔCT -Werte der einzelnen Versuche nicht miteinander zu vergleichen, weshalb die Kontrollen für jedes Experiment unerlässlich sind und eine vergleichende Aussage nur innerhalb eines Experiments gemacht werden darf.

Eine unterschiedliche Kinetik nach Hitze bzw. RES-Oxylipin-Zugabe ließe sich durch die Notwendigkeit der RES-Oxylipine, in die Keimlinge zu diffundieren und der damit verbundenen Wirkungsverzögerung begründen, während Hitze direkt und global auf den Keimling einwirken kann. Eine andere Erklärung wäre die Möglichkeit, dass RES-Oxylipine durch einen anderen Mechanismus oder einen anderen Signalweg die Hitzeschockgene induzieren.

3.2 Identifizierung von Signaltransduktionskomponenten der RES-Oxylipine

3.2.1 Der putative OPDA-Rezeptor CYP20-3 und sein Interaktionspartner SAT1

Bisher ist unklar, durch welchen Signalweg RES-Oxylipine die Expression von 30 Hitzeschockgenen regulieren und welche Komponenten hierfür eine wichtige Rolle spielen. Möglich wäre eine Beteiligung des Proteins Cyclophilin 20-3 (CYP20-3), welches

3 Ergebnisse

als putativer OPDA-Rezeptor diskutiert wird. Dieses Protein bildet nach Bindung von OPDA mit der Serin-Acetyltransferase 1 (SAT1) einen Komplex aus, welcher für die Genregulation durch OPDA von zentraler Bedeutung sein soll (Park et al., 2013). Um eine mögliche Beteiligung von CYP20-3 und SAT1 in der Regulation der Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine zu überprüfen, wurden Genexpressionsanalysen von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* in zehn Tage alten Keimlingen durchgeführt. Hierfür wurden *cyp20-3*- und *sat1*-Mutanten sowie der korrespondierende Wildtyp Col-0 für 4 h mit 75 μ M OPDA oder PGA_1 (oder 37 °C, Ergebnis ist nicht dargestellt) behandelt. Danach wurde aus den Keimlingen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels realtime qPCR die Genexpression quantifiziert.

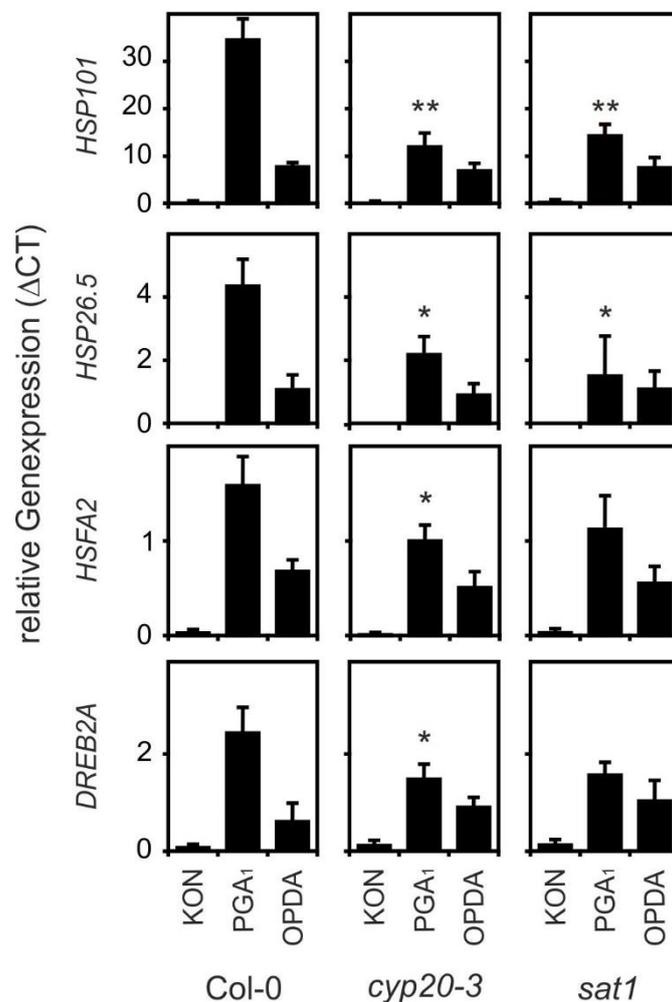


Abbildung 3.4: Genexpressionsanalyse von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge (Col-0, *cyp20-3*, *sat1*) wurden mit PGA_1 oder OPDA [75 μ M] bzw. DMSO als Kontrolle für 4 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. Der t-Test wurde nur mit den jeweiligen PGA_1 - bzw. OPDA-Behandlungen beider Mutanten (*cyp20-3*, *sat1*) gegen die Kontrollwerte (PGA_1 - bzw. OPDA-Behandlung von Col-0) durchgeführt (MW + SD, n = 2-4, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, t-Test unabhängiger Stichproben)

3 Ergebnisse

Auch in der Abbildung 3.4 ist im Wildtyp Col-0 eine deutliche Induktion der Genexpression aller vier untersuchten Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine zu erkennen (bspw. wird *HSP101* 58,3fach durch PGA_1 und 13,5fach durch OPDA hochreguliert). Wird hierzu die Mutante *cyp20-3* mit dem Wildtyp verglichen, fällt auf, dass beide RES-Oxylipine auch ohne das Protein CYP20-3 die Expression aller vier Gene hochregulieren. Während sich die OPDA-induzierte Genexpression in der *cyp20-3*-Mutante im Vergleich zum WT nicht signifikant verändert, ist die PGA_1 -vermittelte Genexpression aller vier getesteter Gene signifikant schwächer als in Col-0. So ist bspw. die „xfache Induktion“ der *HSP101*-Expression in der *cyp20-3*-Mutante um 35,5 % schwächer als im WT Col-0.

Auch in der *sat1*-Mutante ist die Genexpression aller vier Gene nach Behandlung mit OPDA vergleichbar zum WT. Im Falle von PGA_1 ist die Induktion von *HSP101* und *HSP26.5* in der *sat1*-Mutante signifikant schwächer als im Wildtyp, während die Induktion von *HSFA2* und *DREB2A* durch PGA_1 in *sat1*-Keimlingen nur etwas schwächer als im Wildtyp ist.

In dem Experiment wurden die Keimlinge aller Genotypen zum Vergleich auch mit 37 °C behandelt. Dies führte, wie erwartet, zu einer vergleichbaren, starken Genexpression in Col-0-, *cyp20-3*- und *sat1*-Keimlingen (Ergebnis ist nicht dargestellt).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der putative OPDA-Rezeptor CYP20-3 und sein Interaktionspartner SAT1 keine Bedeutung in der Regulation von Hitzeschockgenen durch RES-Oxylipine haben.

3.2.2 Die Masterregulatoren der HSR: HSFA1 a,b,d und e

Andere mögliche Signaltransduktionskomponenten sind die Masterregulatoren der Hitzeschockantwort HSFA1 a,b,d und e. Ihre maßgebliche Beteiligung an der HSR ist bereits gut belegt. Diese konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren sind für die Aktivierung der Genexpression von *HSP101*, *HSP26.5* und der hitze-induzierbaren Transkriptionsfaktoren *HSFA2* und *DREB2A* in der Reaktion auf Hitze essentiell. Auch hier soll eine mögliche Beteiligung von HSFA1 a,b,d,e und HSFA2 mittels entsprechender Verlust-Mutanten (*hsfa1 abde* und *hsfa2*) in der Regulation der Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine überprüft werden. Der korrespondierende Wildtyp für die *hsfa2*-Mutante ist Col-0, während die *hsfa1 abde*-Mutante aus einer Kreuzung der Wildtypen Col-0 und WS hervorgeht. Für dieses Experiment wurden zehn Tage alten Keimlinge (Col-0, WS, *hsfa1 abde* und *hsfa2*) für 4 h mit 75 μ M OPDA oder PGA_1 oder 37 °C behandelt. Danach wurde aus den Keimlingen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels realtime qPCR die Genexpression quantifiziert.

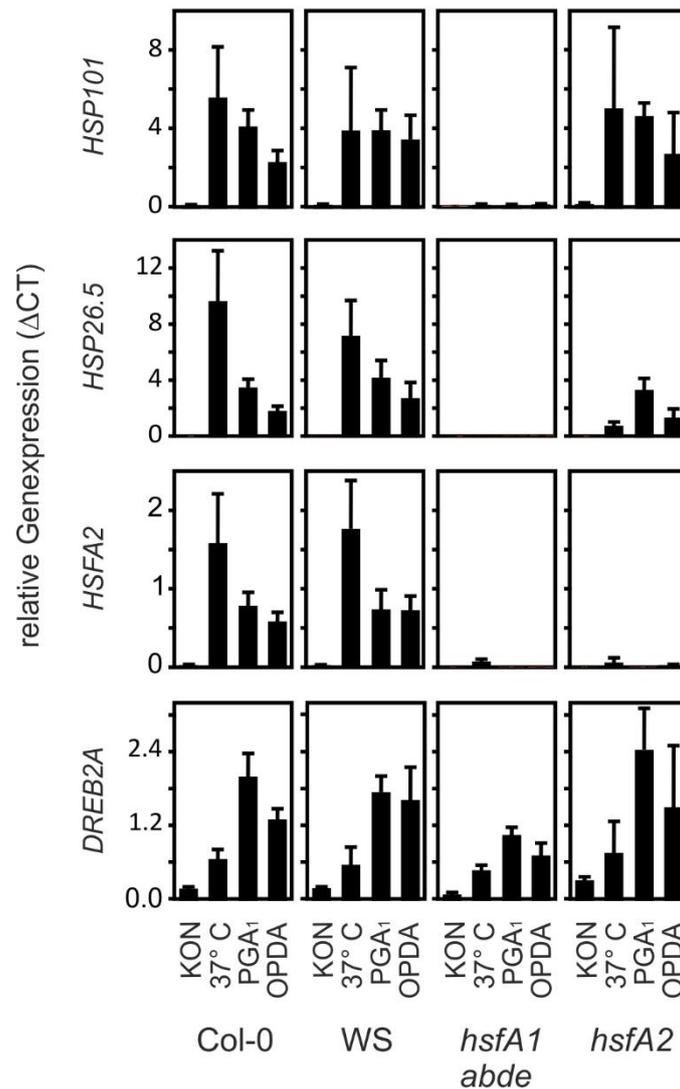


Abbildung 3.5: Genexpressionsanalyse von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge (Col-0, WS, *hsfA1 abde* und *hsfA2*) wurden mit 37 °C, PGA₁ oder OPDA [75 μM] bzw. DMSO als Kontrolle für 4 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

Die Ergebnisse für Col-0 aus Abbildung 3.5 wurden bereits im Abschnitt 3.1.2 ausführlich behandelt: Eine klare Induktion der Gene ist sowohl für die RES-Oxylipine als auch für Hitze gegeben. Keimlinge des zweiten verwendeten Ökotyps WS reagieren vergleichbar auf eine vierstündige Behandlung mit 37 °C bzw. mit den RES-Oxylipinen PGA₁ oder OPDA. Die einzige Ausnahme stellt die Induktion von *HSP101* durch Hitze dar, was allerdings durch die hohe Standardabweichung vernachlässigt werden kann. In der *hsfA1 abde*-Mutante führt weder Hitze noch die getesteten RES-Oxylipine zu einer Induktion von *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2*: diese drei Gene sind ohne Einschränkung von den Masterregulatoren der HSR hinsichtlich ihrer Induktion durch die RES-Oxylipine PGA₁ und OPDA bzw. durch 37 °C abhängig. Die Expression von *DREB2A* in den *hsfA1 abde*-Keimlingen ist durch Hitze

3 Ergebnisse

nicht beeinträchtigt, während eine geringe Reduktion der Expression (im Vergleich zum WT) durch die RES-Oxylipine festzustellen ist.

In Keimlingen, in denen das Gen für den hitze-induzierbaren Transkriptionsfaktor HSFA2 ausgeschaltet ist, ist kein Unterschied in der Reaktion auf RES-Oxylipine im Vergleich zu Col-0 festzustellen. Die durch Hitze induzierte Genexpression ist allerdings bei *HSP26.5* geringer ausgeprägt (nur eine 73fache Erhöhung gegenüber einer 1190fachen Induktion in Col-0), nicht jedoch bei *DREB2A*. Für das Gen *HSP101* kann hier aufgrund der hohen Standardabweichung keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Zusätzlich wurden in diesem Experiment die Mutanten *hsfA1 ab* und *hsfA1 abd* untersucht: auch sie wurden für 4 h mit 37 °C, PGA₁ oder OPDA behandelt und die Genexpression analysiert (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Die Genexpression der Doppelmutante *hsfA1 ab* ist nach allen Behandlungen vergleichbar mit der der Wildtypen während die Genexpression in der Triplemutante *hsfA1 abd* abweicht: Die Zugabe von RES-Oxylipinen bewirkt hier keine Induktion der Genexpression von *HSP101*, *HSP26.5* oder *HSFA2*. Lediglich die Expression von *DREB2A* wird weiterhin, unabhängig von HSFA1, durch RES-Oxylipine induziert. Eine vierstündige Hitzebehandlung der *hsfA1 abd* zeigt eine starke Verringerung der Induzierbarkeit von *HSP101* und *HSP26.5*, während die Genexpression von *HSFA2* und *DREB2A* unverändert hoch ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Masterregulatoren HSFA1 a,b,d (und e) für die Induktion der Hitzeschockgene *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch RES-Oxylipine essentiell und für *DREB2A* zumindest teilweise notwendig sind. Der durch Hitze induzierbare Transkriptionsfaktor HSFA2 jedoch spielt in der Signaltransduktion von RES-Oxylipinen (bezüglich der Hitzeschockgeninduktion) keine Rolle.

Die Genexpression von *DREB2A* in der *hsfA1 abde*-Mutante entspricht nicht den Erwartungen: der *in silico*-Vergleich der Transkriptomdaten (siehe Abschnitt 3.1.1) sagt eine Abhängigkeit der Hitze-Induktion von den Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d, und e voraus. Allerdings publizierte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Yoshida bereits, dass die *DREB2A*-Expression auch HSFA1-unabhängig durch andere Stressoren induziert werden kann (Yoshida et al., 2011).

3.2.3 HSFA1-abhängige Akkumulation von Raffinose während Hitze

Es ist bereits gut untersucht, dass osmoprotektive Substanzen wie Raffinose während Hitze akkumulieren. Verantwortlich hierfür ist das Enzym Galactinol-Synthase 1 (GolS1), welches Galactinol, eine wichtige Komponente für die Biosynthese von Raffinose (überträgt ein Galctosylrest auf Saccharose), synthetisiert. Die Hitze-vermittelte Expression dieses

3 Ergebnisse

Genes ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren HSFA1 a, b, d und e (Panikulangara et al., 2004; Liu et al., 2011). Die *in-silico*-Ergebnisse sagen zudem voraus, dass auch durch Zugabe von OPDA das Gen für GolS1 induziert wird (siehe Tabelle 3.1, Nr. 16). Um die bisherigen Resultate zu unterstützen, wurden zehn Tage alte Keimlinge für 2 und für 4 h mit den RES-Oxylipinen PGA₁ oder OPDA [75 µM], den HSP90-Inhibitoren GDA oder RAD [50 µM] oder 37 °C behandelt und danach auf ihren Raffinose-Gehalt untersucht.

Auch hier wurde für die Berechnung der „xfachen Induktion“ ([nmol/g FG] Behandlung/[nmol/g FG] Kontrolle) der Mittelwert aller Kontrollwerte (2 h und 4 h: 28,1 ±7 nmol/g FG (MW ± SD)) hinzugezogen.

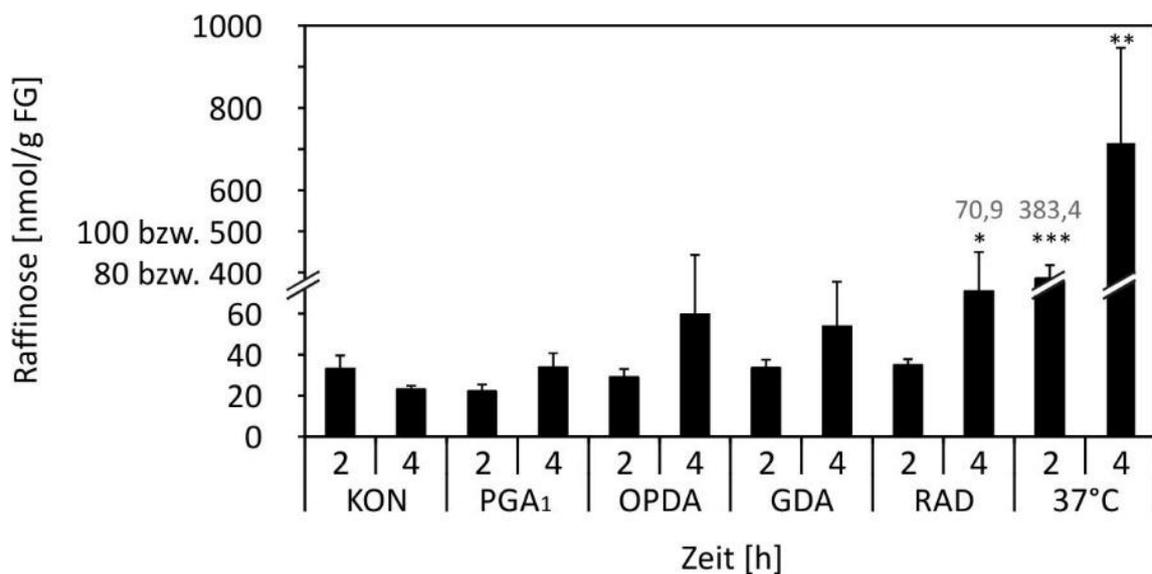


Abbildung 3.6: Raffinose-Gehalt von Col-0-Keimlingen nach Behandlung mit PGA₁, OPDA [je 75 µM], GDA, RAD [je 50 µM] oder 37 °C bzw. DMSO als Kontrolle. Für diese Analyse wurden die Keimlinge 2 und 4 h nach Start der jeweiligen Behandlung geerntet und analysiert. (MW + SD, n = 3, *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001, t-Test unabhängiger Stichproben)**

Wie in der Abbildung 3.6 zu erkennen ist, liegt der basale Gehalt von Raffinose bei 23-33 nmol/g Frischgewicht (28,1 ±7 nmol/g FG (MW ± SD)), akkumuliert aber innerhalb von 2 h bei 37 °C auf das 13,7fache und erreicht nach 4 h bei 37 °C sogar 715 nmol/g Frischgewicht, dies entspricht dem 25,5fachen Gehalt an Raffinose. Durch die Zugabe der RES-Oxylipine PGA₁ und OPDA [je 75 µM] ist kein signifikanter Anstieg zu beobachten, bei PGA₁ liegt die Konzentration nach 4 h mit 34 nmol/g FG nur wenig über dem basalen Wert. Durch Behandlung mit OPDA ist ein leichter Anstieg zu beobachten (2,1fach nach 4 h), der allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist. Außerdem wurde der Raffinose-Gehalt nach Zugabe der HSP90-Inhibitoren Geldanamycin (GDA) und Radicicol (RAD) [je 50 µM] gemessen. Diese HSP90-Inhibitoren

3 Ergebnisse

können laut Literatur eine HSR auslösen und erhöhen somit die Thermotoleranz in *A. thaliana* (Yamada 2007, Saidi 2009). Die Behandlung mit GDA und RAD bewirkt jeweils eine leichte Akkumulation von Raffinose (1,9 bzw. 2,5fach nach 4 h), jedoch ist diese nur nach vierstündiger RAD-Behandlung signifikant erhöht.

Dieses Ergebnis ist durch die fehlende Signifikanz nicht eindeutig, jedoch kann eine Akkumulation von Raffinose durch Hitze bestätigt werden. Ein leicht erhöhter Raffinose-Gehalt durch RES-Oxylipine oder HSP90-Inhibitoren konnte zwar detektiert werden, jedoch müsste für eine genauere Beurteilung die Genexpression von *GolSI* analysiert werden.

3.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen RES-Oxylipinen und der Induktion von Hitzeschockgenen

3.3.1 Screening strukturell verschiedener RES hinsichtlich ihrer Hitzeschockgen-Induktion

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob RES-Oxylipine aufgrund ihrer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe in der Lage sind, die Expression von Hitzeschockgenen zu induzieren. Dieses strukturelle Merkmal ist für die Elektrophilie dieser RES-Oxylipine verantwortlich. So werden Hitzeschockgene beispielsweise durch das non-RES-Oxylipin Jasmonsäure nicht induziert. Um diese Fragestellung zu klären, sollten unterschiedliche RES- und non-RES-Substanzen auf ihre Induktion der Hitzeschockgenexpression untersucht werden. Die getesteten RES weisen entweder eine α,β -ungesättigten Carbonylgruppe auf, die zum Teil allerdings durch Seitenketten sterisch gehindert ist, oder im Falle von Sulforaphan eine Isothiocyanatgruppe, welche ebenfalls elektrophile Eigenschaften aufweist. Unter anderem wurden auch die HSP90-Inhibitoren Celastrol (CEL), Geldanamycin (GDA) und Radicol (RAD) getestet. Diese sind ebenfalls reaktive elektrophile Spezies und bereits publizierte HSR- und Thermotoleranz-Induktoren (Yamada et al., 2007; Saidi et al., 2009; Trott et al., 2008). Ebenso wurden weitere RES-Substanzen, wie Dibromthymochinon (DBMIB), in dieser Arbeit getestet. Auch für dieses Herbizid konnte bereits eine Fähigkeit zur Induktion der Hitzeschockgenexpression nachgewiesen werden (Jung et al., 2013).

Um ein schnelles Screening zu gewährleisten, wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Chih-Hsuan Hsin, 2014) die Dot Blot-Methode für die semiquantitative Analyse des Proteingehalts von HSP101 etabliert. HSP101 wurde ausgewählt, da es essentiell für die

3 Ergebnisse

Thermotoleranz in *A. thaliana* ist (Queitsch et al., 2000). Hierfür wurden zehn Tage alte Keimlinge mit verschiedenen RES behandelt (siehe auch Tabelle 3.2) und nach 4 h geerntet. Zur Normierung wurden bei jedem Versuch Keimlinge für 4 h einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt (entspricht 100 %). Neben den Dot-Blot-Experimenten wurde außerdem die Genexpression durch ausgewählte RES analysiert, um sicherzugehen, dass sich Transkript- und Proteinspiegel vergleichbar verhalten. Durch die Genexpressionsanalysen können nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen getroffen werden.

Tabelle 3.2: Übersicht der gescreenten RES-Substanzen

RES	Eingesetzte Konzentration [μM]
Celastrol	20
Radiciol	50
Geldanamycin	50
OPDA	75
PGA ₁	75
PGB ₁	75
PGE ₁	75
PGF _{1α}	75
(E)-2-Hexenal	10, 40 und 75
Hexanal	10, 40 und 75
Dibromthymochinon	10, 40 und 75
2-Cyclopentenon	10, 40 und 75
β -Cyclocitral	10 und 25

Um zu überprüfen, ob und vor allem wie stark die HSP90-Inhibitoren die Expression des Gens *HSP101* induzieren, wurde mit zehn Tage alten Col-0-Keimlingen eine quantitative realtime PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Keimlinge mit Celastrol [20 μM], Geldanamycin [50 μM], Radiciol [50 μM], 37 °C oder der Lösemittel-Kontrolle (DMSO), behandelt und nach 1, 2, 4 oder 6 h geerntet. Da im Rahmen dieses Experiments die Keimlinge auch mit den RES-Oxylipinen PGA₁ und OPDA behandelt wurden, sind die Kontrollen dieselben wie in Abbildung 3.3. Deswegen wurden auch hier zur Berechnung der „xfachen Induktion“ (ΔCT -Wert Behandlung/ ΔCT -Wert Kontrolle) alle Kontrollwerte nach 1, 2, 4 und 6 h gemittelt. Die so ermittelten ΔCT -Werte der Kontrolle betragen für *HSP101*

3 Ergebnisse

0,354 ($\pm 0,215$ SD), *HSP26.5* 0,01 ($\pm 0,008$ SD), *HSFA2* 0,106 ($\pm 0,079$ SD) und für *DREB2A* 0,384 ($\pm 0,189$ SD).

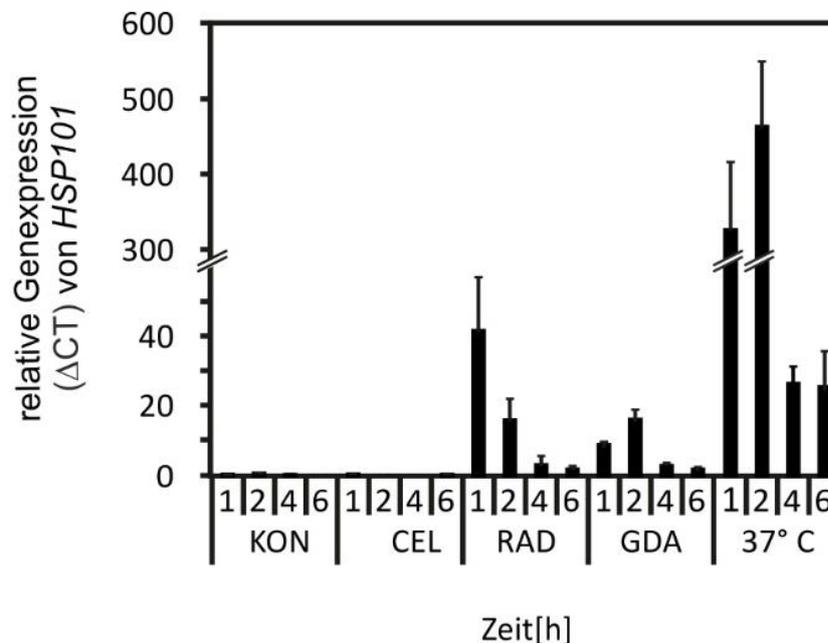


Abbildung 3.7: Genexpressionsanalyse von *HSP101* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge wurden mit 37 °C, Celastrol [20 μM], Radicicol [50 μM], Geldanamycin [50 μM] bzw. DMSO als Kontrolle für 1, 2, 4 oder 6 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

In Abbildung 3.7 ist zu erkennen, dass die Zugabe von 20 μM Celastrol keine Induktion der *HSP101*-Genexpression bewirkt. Die HSP90-Inhibitoren RAD und GDA [je 50 μM] hingegen bewirken eine schnelle, transiente Expression von *HSP101*. Die maximale Induktion durch RAD ist bereits 1 h nach Zugabe erreicht und führt zu einem 119fach höheren *HSP101*-mRNA-Gehalt im Vergleich zur Lösemittel-Kontrolle. Die maximale Induktion von GDA ist ähnlich schnell (nach 2 h) erreicht und ist um das 46fache höher als die Induktion unter Kontrollbedingungen (DMSO). Werden allerdings die Maxima, erreicht durch die HSP90-Inhibitoren, mit dem Maxima durch 37 °C (1313fach nach 2 h) verglichen, wird deutlich, dass die HSP90-Inhibitoren zwar eine starke Expression von *HSP101* verursachen, diese allerdings im Vergleich zu der Hitze-vermittelten Expression sehr viel schwächer ist. Lediglich nach 4 oder 6 h bei 37 °C (75 bzw. 73fach) ähnelt sich der *HSP101*-mRNA-Gehalt mit dem des HSP90-Inhibitors RAD nach 1 h (119fach) bzw. mit dem HSP90-Inhibitors GDA nach 2 h (46fach).

Zusätzlich zu der Genexpressionsanalyse von *HSP101* wurden auch die Gene *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* hinsichtlich ihrer Expression untersucht (Ergebnis ist nicht dargestellt). Auch bei diesen Genen ist Radicicol der stärkste Induktor von allen getesteten

3 Ergebnisse

HSP90-Inhibitoren, aber trotzdem weit unter der Wirkung, welche durch Hitze vermittelt wird.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse auf Proteinebene, wurden Dot-Blot-Versuche mit CEL, GDA, RAD, PGA₁, OPDA und 37 °C wie oben beschrieben durchgeführt. Interessant ist hier vor allem der Proteingehalt nach vierstündiger Hitzebehandlung (entspricht 100 %), da die mRNA von *HSP101* zu diesem Zeitpunkt schon deutlich abnimmt, das Protein HSP101 jedoch eine andere, wesentlich längere Halbwertszeit aufweist, so dass das HSP101 in den ersten 4-6 h einer 37 °C-Behandlung akkumuliert (Ergebnis nicht dargestellt).

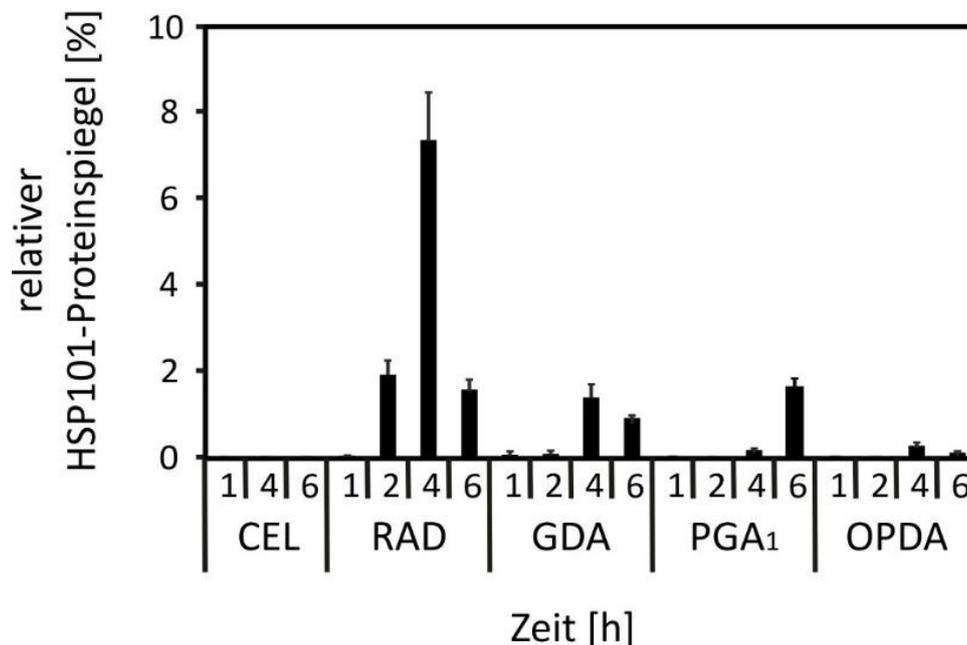


Abbildung 3.8: Relativer Proteingehalt von HSP101 nach Behandlung von Keimlingen mit Celastrol [20 µM], Radicicol [50 µM], Geldanamycin [50 µM], PGA₁ [75 µM] und OPDA [75 µM] für 1, 2, 4 und 6 h im Vergleich zu einer Hitzebehandlung für 4 h bei 37 °C (100 %). Die Werte der Lösemittelkontrolle wurden bereits abgezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate ± SD.

Mit Hilfe des Dot Blots lassen sich die Genexpressions-Ergebnisse von *HSP101* (siehe Abbildung 3.3 und Abbildung 3.7) auf Proteinebene bestätigen (siehe Abbildung 3.8). Während die Behandlung mit 20 µM Celastrol zu keiner erhöhten HSP101-Proteinmenge führt, zeigen alle anderen getesteten HSP90-Inhibitoren und auch die RES-Oxylipine PGA₁ und OPDA eine Induktion der HSP101-Genexpression und damit einen erhöhten HSP101-Proteingehalt. Die HSP101-Menge durch Zugabe von PGA₁ ist in 6 h auf 1,6 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) gestiegen, durch die Zugabe von OPDA ist die Menge an HSP101 innerhalb von 4 h auf 0,26 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) angestiegen.

3 Ergebnisse

Der HSP90-Inhibitor GDA ist mit 1,38 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) nach 4 h vergleichbar wirksam wie PGA_1 . Radicol hingegen ist sehr viel wirksamer und der stärkste Induktor von *HSP101* unter den getesteten Substanzen. Hier erreichen die Proteinspiegel nach 4 h sogar 7,34 % der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C. Nichtsdestotrotz konnte auch mit der semiquantitativen Methode des Dot Blots festgestellt werden, dass die Wirkung der HSP90-Inhibitoren und der RES-Oxylipine weit unter der von moderater Hitze (4 h bei 37 °C) liegt.

Um die Hypothese, dass die Expression von Hitzeschockgenen durch eine reaktive α,β -ungesättigten Carbonylgruppe vermittelt wird, näher zu untersuchen, sollten weitere RES-, aber auch non-RES-Substanzen, auf ihre Induktion der Hitzeschockgenexpression untersucht werden. Hierfür wurden zum einen verschiedene Prostaglandine getestet (siehe Tabelle 3.2), welche keine (PGE_1 und $\text{PGF}_{1\alpha}$) oder lediglich eine sterisch durch längere Seitenketten gehinderte (PGB_1) α,β -ungesättigten Carbonylgruppe aufweisen. Zum anderen wurde (E)-2-Hexenal als ein klassisches RES-Oxylin sowie Hexenal als non-RES-Oxylin (und unmittelbare Kontrolle zu dem strukturell ähnlichen (E)-2-Hexenal) getestet. Diese Substanzen weisen keinen Cyclopentenonring auf und sind somit eine wichtige Kontrolle, um einen Einfluss des Cyclopentenonrings auf die Induktion der Hitzeschockgene auszuschließen. Des Weiteren wurden mit 2-Cyclopentenon, β -Cyclocitral und Dibromthymochinon (DBMIB) weitere RES-Substanzen, die nicht zu den Oxylinen zählen, untersucht.

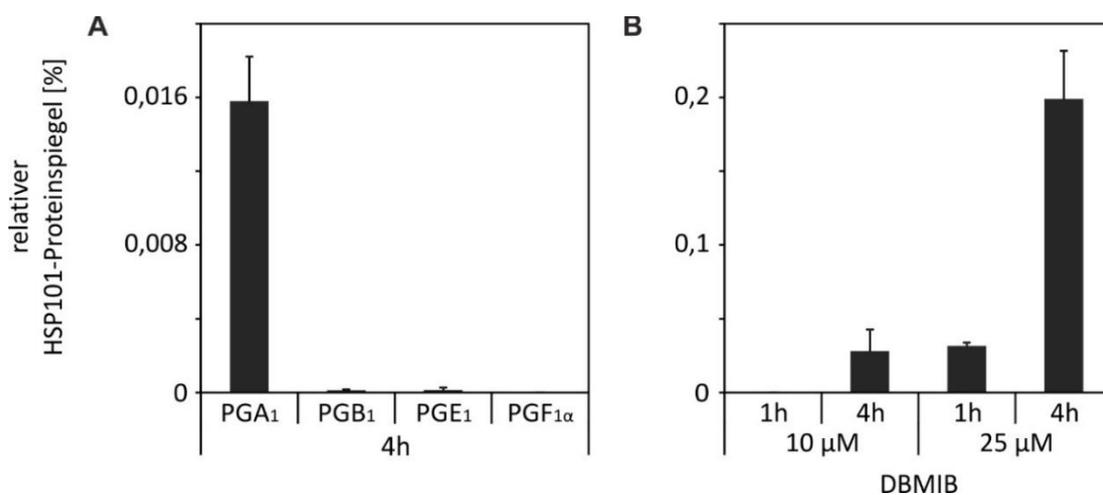


Abbildung 3.9: Relativer Proteingehalt von HSP101 nach Behandlung von Keimlingen mit PGA_1 , PGB_1 , PGE_1 , $\text{PGF}_{1\alpha}$ [je 75 μM] (A) bzw. DBMIB [10 und 25 μM] (B) für 1 und 4 h im Vergleich zu einer Hitzebehandlung für 4 h bei 37 °C (100 %). Die Werte der Lösemittelkontrolle wurden bereits abgezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate \pm SD.

3 Ergebnisse

Bei einem Vergleich der relativen HSP101-Proteinspiegel der Prostaglandin-behandelten Keimlinge (siehe Abbildung 3.9 A) ist erkennbar, dass lediglich das Prostaglandin mit der frei zugänglichen α,β -ungesättigten Carbonylgruppe, PGA_1 , eine Erhöhung der Proteinmenge bewirkt. Die Prostaglandine PGB_1 , PGE_1 und $\text{PGF}_{1\alpha}$ scheinen keinen Einfluss auf den Proteingehalt von HSP101 zu haben. Auffällig ist, dass durch Zugabe von PGA_1 in diesem Experiment die HSP101-Menge in 4 h nur auf 0,02 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) gestiegen ist, während in einem anderen Versuch (vergleiche Abbildung 3.8) die Menge in 4 h auf 0,16 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) gestiegen ist. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass der Dot Blot nur eine semi-quantitative Methode darstellt.

Da die Versuche mit den Substanzen (E)-2-Hexenal, Hexanal, 2-Cyclopentenon und β -Cyclocitral ohne Replikate durchgeführt wurden, wurde hier auf eine Abbildung verzichtet. Die Behandlung mit dem klassischen RES-Oxylin (E)-2-Hexenal, welches keinen Cyclopentenonring aufweist, bewirkt nach einer vierstündigen Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen [10, 40 und 75 μM] keinen erhöhten HSP101-Proteingehalt. Die Kontroll-Substanz Hexanal [10, 40 und 75 μM] vermittelt erwartungsgemäß ebenso keine gesteigerte HSP101-Akkumulation. Auch die Behandlung mit den RES-Substanzen 2-Cyclopentenon und β -Cyclocitral führen mit keiner der getesteten Konzentrationen zu einer Erhöhung der HSP101-Menge.

Im Gegensatz dazu bewirkt Dibromthymochinon eine konzentrationsabhängige Induktion der HSP101-Synthese (siehe Abbildung 3.9 B). Durch eine vierstündige Behandlung mit 10 μM DBMIB steigt der HSP101-Proteinspiegel auf 0,03 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C), durch 25 μM DBMIB steigt der Gehalt an HSP101 auf 0,2 % (der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C), was vergleichsweise ebenfalls eine äußerst geringe Induktion darstellt. Es scheint, dass eine sterisch ungehinderte α,β -ungesättigten Carbonylgruppe für die Induktion von *HSP101* wichtig ist. Allerdings induzierten die RES-Verbindungen (E)-2-Hexenal, 2-Cyclopentenon und β -Cyclocitral bei den getesteten Konzentrationen wider Erwarten nicht das *HSP101*-Gen. Da allerdings die erhöhten Proteinspiegel durch die getesteten Substanzen im Vergleich zu 37 °C generell sehr gering sind, könnte hier die Detektionsgrenze der Methode (unter 0,02 % der Proteinmenge nach 4 h bei 37 °C) zu gering sein. Alternativ könnten diese Substanzen nur in noch höheren (nicht getesteten Konzentrationen) wirksam sein. Für eine genauere Aussage sollte deshalb die Genexpression mittels quantitativer realtime PCR untersucht werden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem das RES Sulforaphan untersucht, welches keine α,β -ungesättigten Carbonylgruppe aufweist. Ob eine Induktion der Hitzeschockgenexpression durch Sulforaphan möglich ist, lässt spannende Schlüsse über die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu. Zudem sollte auch hier die Abhängigkeit einer möglichen Induktion durch die Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d,e und HSFA2 untersucht werden. Hierfür wurden zehn Tage alte Keimlinge für 4 h mit 100 μ M Sulforaphan bzw. DMSO als Lösemittelkontrolle oder 37 °C behandelt. Danach wurde aus den Keimlingen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels realtime qPCR die Genexpression von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* quantifiziert.

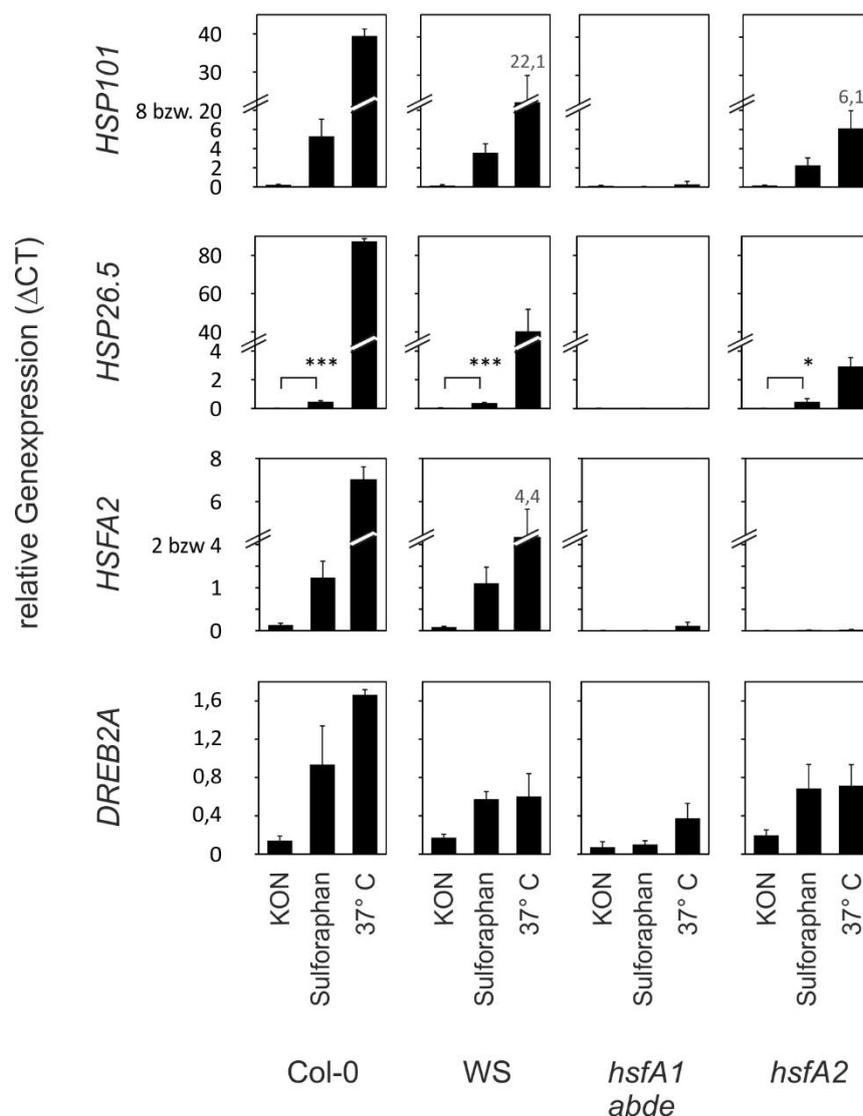


Abbildung 3.10: Genexpressionsanalyse von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge (Col-0, WS, *hsfA1 abde* und *hsfa2*) wurden mit 37 °C, Sulforaphan [100 μ M] bzw. DMSO als Kontrolle für 4 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. Der t-Test wurde nur mit den in der Abbildung gezeigten Werten durchgeführt. (MW + SD, n = 3, *p<0,05, *p<0,001, t-Test unabhängiger Stichproben)**

3 Ergebnisse

In der Abbildung 3.10 ist die Genexpression der Hitzeschockgene *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* der Ökotypen Col-0 und WS sowie der Mutanten *hsfA1 abde* und *hsfA2* dargestellt. Beim Vergleich der basalen Werte (Kon) von Col-0 mit denen nach einer vierstündigen Sulforaphan-Behandlung [100 µM] ist eine Induktion der Gene *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* (Erhöhung um das 23,3fache, 23,3fache, 9,2fache bzw. 6,6fache) durch Sulforaphan festzustellen. Alle vier analysierten Gene werden auch im Ökotyp WS durch Sulforaphan verstärkt exprimiert (23,4fach, 8,7fach, 12,6fach bzw. 3,3fach). Im direkten Vergleich mit Hitze (4 h bei 37 °C) allerdings ist die Sulforaphan-vermittelte Induktion deutlich geringer. So ist beispielsweise die Induktion der *HSP101*-Genexpression in Col-0 durch 37 °C um ein 7,5faches höher als durch Sulforaphan (174fach statt 23,3fach), die *HSP26.5*-Expression sogar um ein 184faches höher als durch Sulforaphan (4277fach statt 23,2fach).

In der *hsfA1 abde*-Mutante führt die Zugabe von 100 µM Sulforaphan zu keiner höheren Expression von *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* als basal: alle vier Gene sind ohne Einschränkung von den Masterregulatoren der HSR hinsichtlich ihrer Induktion durch das RES Sulforaphan abhängig. Dieses Resultat gilt ebenso für eine Induktion von *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch Hitze und bestätigt somit die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2. Die Expression durch 37 °C von *DREB2A* in den *hsfA1 abde*-Keimlingen ist nicht bzw. kaum beeinträchtigt und bestätigt auch die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2.

In der *hsfA2*-Mutante bewirkt die Sulforaphan-Behandlung eine schwache, aber dennoch erhöhte Expression von *HSP101*, *HSP26.5* und *DREB2A*, (13,5fach, 39,7fach, bzw. 3,5fach höher als basal (Kon) in *hsfA2*). Auch beim Vergleich der absoluten Δ CT-Werte der Gene *HSP101*, *HSP26.5* und *DREB2A* nach Sulforaphan-Behandlung ist kein Unterschied zu den WT-Werten erkennbar. Das heißt der hitze-induzierbare Transkriptionsfaktor HSFA2 ist nicht essentiell für die Sulforaphan-abhängige Induktion der Hitzeschockgene. Dieses Resultat ist vergleichbar mit dem Ergebnis des Abschnittes 3.2.2: HSFA2 spielt keine Rolle in der Signaltransduktion von RES-Oxylipinen oder anderen RES-Substanzen wie Sulforaphan (bezüglich der Hitzeschockgeninduktion). Die durch Hitze induzierte Genexpression in den *hsfA2*-Keimlingen ist bei *HSP101* und *HSP26.5* geringer ausgeprägt als in den Wildtypen, nicht jedoch bei *DREB2A*. Auch dies betätigt die Resultate aus Abschnitt 3.2.2.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass nicht die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe essentiell für die Induktion der Hitzeschockgene ist. Vielmehr scheinen viele RES-Substanzen aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften in der Lage zu sein, auf dem gleichen

3 Ergebnisse

Weg, nämlich über die Transkriptionsfaktoren HSFA1, die Expression der Hitzeschockgene zu induzieren.

3.3.2 Untersuchung eines möglichen additiven Effekts von RES-Oxylipinen und Hitze auf die Expression von Hitzeschockgenen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich die Wirkung von moderater Hitze (37 °C) und RES-Oxylipinen addieren lässt. Genauer gesagt, ob in Keimlingen von *A. thaliana* der Effekt der RES-Oxylipine auf die Expression von Hitzeschockgenen verstärkt werden kann, wenn zeitgleich eine Inkubation der Keimlinge bei 37 °C stattfindet.

Um diesen sogenannten additiven Effekt zu untersuchen, wurde zum einen die Dot Blot Methode für eine qualitative HSP101-Untersuchung angewandt. Hier wurden Keimlinge mit 37 °C sowie mit 37 °C unter zeitgleicher Zugabe von OPDA oder PGA₁ [je 75 µM] für 4 h behandelt. DMSO-behandelte Keimlinge dienten als Kontrolle, diese Werte wurden direkt von den Rohdaten abgezogen. Zum anderen wurde für eine quantitative Aussage die Genexpression von *HSP101* analysiert. Hierfür wurden ebenso Keimlinge mit 37 °C, aber auch mit 37 °C und simultaner Zugabe von OPDA [75 µM] für 1, 2, 4 und 6 h behandelt. Die Kontrolle stellten Keimlinge dar, die für 1, 2, 4 und 6 h mit dem Lösemittel DMSO bei 22 °C behandelt wurden. Da im Rahmen dieses Experiments die Keimlinge auch mit den RES-Oxylipinen PGA₁ und OPDA sowie den HSP90-Inhibitoren CEL, GDA und RAD behandelt wurden, sind die Kontrollen dieselben wie in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.7.

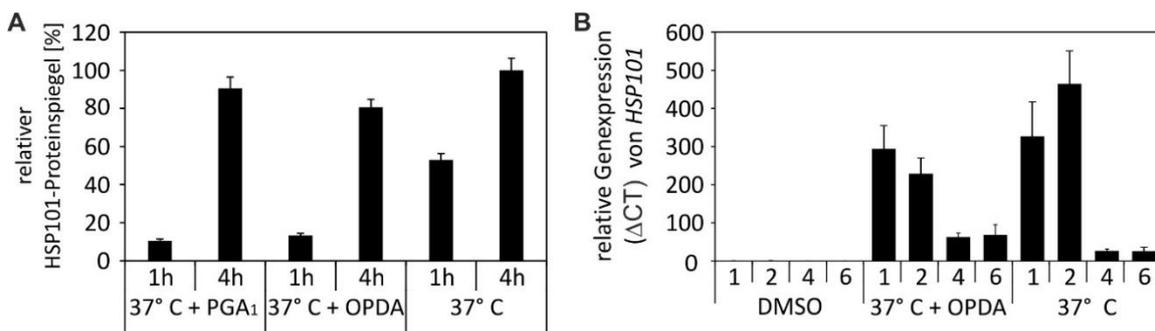


Abbildung 3.11: Relativer Proteingehalt von HSP101 und Genexpressionsanalyse von *HSP101* (A) Der relative Proteingehalt von HSP101 (bezogen auf 4 h 37 °C, 100 %) wurde mittels Dot Blot Analyse ermittelt. Keimlinge wurden mit 37 °C, 37 °C + PGA₁ [75 µM] oder 37 °C + OPDA [75 µM] für 1 und 4 h behandelt. Die Werte der Lösemittelkontrolle wurden bereits abgezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate ± SD. (B) Die Genexpressionsanalyse von *HSP101* wurde mittels quantitativer realtime PCR durchgeführt. Col-0-Keimlinge wurden mit 37 °C oder 37 °C + OPDA [75 µM] bzw. DMSO als Kontrolle für 1, 2, 4 oder 6 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

3 Ergebnisse

In der Abbildung 3.11 ist der relative HSP101-Proteinspiegel sowie der Gehalt von *HSP101*-mRNA in Col-0-Keimlingen zu sehen. Bei einem Vergleich des Proteinspiegels von HSP101 während einer 37 °C-Behandlung mit dem 1 oder 4 h nach Beginn der 37 °C-Behandlung mit dem relativen HSP101-Gehalt 1 oder 4 h nach Beginn der 37 °C-Behandlung mit zeitgleicher Addition von PGA_1 bzw. OPDA [je 75 μM] ist festzustellen, dass die Menge des HSP101-Proteins nach 1 sowie 4 h annähernd vergleichbar mit der Menge nach einer 37 °C Behandlung ohne RES-Oxylipine ist.

Um eine genauere quantitative Aussage treffen zu können und um diese Beobachtung auf Genexpressionsebene zu bestätigen, wurde zudem eine quantitative realtime PCR durchgeführt. Die Genexpression von *HSP101* bei 37 °C ist mit der *HSP101*-Expression bei 37 °C und simultaner Addition von OPDA sowohl nach 1, 2, 4 als auch nach 6 h vergleichbar.

Es ist also kein additiver oder synergistischer Effekt erkennbar, die Wirkungen von 37 °C und RES-Oxylipinen verstärken sich nicht.

3.4 Untersuchung einer möglichen Korrelation der endogenen Oxylipin-Akkumulation während verschiedenen Stress-Behandlungen mit der Genexpression von Hitzeschockgenen

Exogen zugegebene RES-Oxylipine sind in der Lage in *A. thaliana* die Expression von 30 Hitzeschockgenen mehr als 3fach hoch zu regulieren. Außerdem ist bekannt, dass die Oxylipine Jasmonsäure, 12-Oxo-Phytodiensäure sowie Jasmonsäure-Isoleucin während einer Inkubation mit 38 °C akkumulieren (Clarke et al., 2009). Nun stellt sich die Frage, ob und mit welcher Stärke endogen gebildete Oxylipine eine Genexpression der Hitzeschockgene induzieren können. Hierfür sollte zum einen der Gehalt an Oxylipinen während eines Hitzestresses analysiert werden und zum anderen durch Verwundung oder osmotischen Stress sehr hohe endogene Oxylipin-Spiegel erreicht werden, um eine Induktion der Hitzeschock-Genexpression zu provozieren. Es wurde neben des Wildtyps Col-0 die JA-defiziente *opr3*-Mutante und die JA- und OPDA-defiziente *dde2*-Mutante benutzt, um den möglichen Effekt der endogen gebildeten Oxylipine eindeutig als diesen bestimmen zu können.

3.4.1 Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach Hitzestress in *Arabidopsis thaliana*

Die Akkumulation von Jasmonsäure, 12-Oxo-Phytodiensäure sowie Jasmonsäure-Isoleucin in drei Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen während einer Inkubation mit 38 °C (im Dunkeln) wurde bereits publiziert. In der Untersuchung von Clarke et al. (2009) erreichte der Gehalt an JA nach achtstündiger Hitzebehandlung sein Maximum und lag in etwa bei 190 pmol/g Frischgewicht. Dies entsprach einer ca. 4fachen Akkumulation von JA durch eine Behandlung bei 38 °C. OPDA zeigte eine stärkere Akkumulation durch eine 38 °C-Behandlung: hier erreichte das Maximum nach 8 h ungefähr 7000 pmol/g Frischgewicht, was einen etwa 8fachen Anstieg bedeutet (Clarke et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ergebnis von Clarke et al. unter unseren Versuchsbedingungen (zehn Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge, 37 °C Behandlung in Anwesenheit von Licht ($80\text{-}100\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$)) überprüft und zudem mittels einer Genexpressionsanalyse die Induktion der Hitzeschockgene nach dieser endogenen Oxylipin-Akkumulation durch Hitze analysiert werden. Hierfür wurden zehn Tage alte Col-0-Keimlinge unter Kurzzeit-Bedingungen, das heißt für 0,5, 1, 2, 4 und 8 h, aber auch unter Langzeit-Bedingungen (0, 1, 2, 3, 4 und 7 Tage) einer 37 °C Behandlung unter Kurztag-Lichtbedingungen ausgesetzt. Danach wurden die Oxylipine extrahiert, mittels UHPLC aufgetrennt und die Oxylipine OPDA, JA, JA-Ile sowie SA und ABA mittels Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) quantifiziert. Außerdem wurden zehn Tage alte Col-0-, *opr3*- und *dde2*-Keimlinge 1 h mit 22 °C bzw. 37 °C inkubiert um danach eine Genexpressionsanalyse von *HSP101* mittels quantitativer realtime PCR durchzuführen.

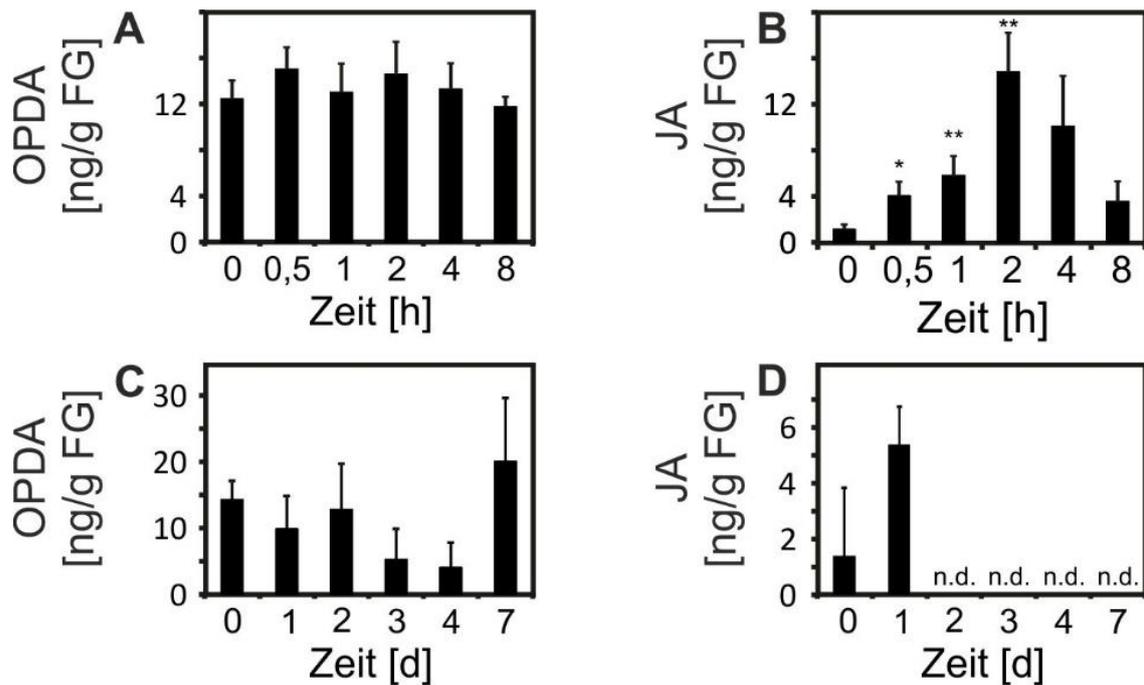


Abbildung 3.12: Endogener OPDA- und JA-Gehalt von Col-0-Keimlingen nach einer Hitze-Behandlung von 37 °C unter Kurzzeit- (A+B) sowie unter Langzeit-Bedingungen (C+D). Gezeigt sind die Mittelwerte von 9 biologischen Replikaten \pm SE (A+B) bzw. 3 biologische Replikate \pm SD (C+D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, t-Test unabhängiger Stichproben

Die Abbildung 3.12 A+B zeigt den OPDA- bzw. den JA-Gehalt vor sowie nach einer kurzzeitigen Hitzebehandlung (0,5, 1, 2, 4 und 8 h). Der basale OPDA-Gehalt in *Arabidopsis* Col-0-Keimlingen beträgt 12,5 ng/g Frischgewicht. Während einer achtstündigen Inkubation der Keimlinge mit 37 °C ändert sich der OPDA-Gehalt nicht signifikant, er schwankt höchstens um -0,7 bzw. +3,7 ng/g Frischgewicht. Der basale JA-Gehalt in *Arabidopsis* Col-0-Keimlingen liegt bei 1,1 ng/g Frischgewicht. Hier ist in den ersten 2 h einer Hitzebehandlung ein signifikanter Anstieg zu erkennen: nach zwei Stunden bei 37 °C ist der JA-Gehalt um das 13fache gestiegen. Diese Akkumulation ist allerdings transient. Bereits 8 h nach Beginn der Hitzebehandlung ist der JA-Spiegel wieder vergleichbar mit dem basalen Gehalt (3,5 ng/g Frischgewicht).

Die Abbildung 3.12 C+D zeigt den OPDA- bzw. den JA-Gehalt nach einer langfristigen Hitzebehandlung (0, 1, 2, 3, 4 und 7 Tage). Unter Kontrollbedingungen (22 °C) liegt der basale OPDA-Gehalt bei 14,3 ng/g Frischgewicht und ist vergleichbar mit dem basalen OPDA-Spiegel von Abbildung 3.12 A. Auch hier akkumuliert OPDA während einer sieben tägigen Inkubation mit 37 °C nicht signifikant, die gemessenen Werte sind alle mit dem gemessenen, basalen Wert vergleichbar. Der basale JA-Gehalt in *Arabidopsis* Col-0-Keimlingen liegt bei 1,4 ng/g Frischgewicht und ist somit vergleichbar mit dem der Abbildung 3.12 A. Es ist ein leichter Anstieg des JA-Spiegels nach dem ersten

3 Ergebnisse

Behandlungstag erkennbar (3,8fach), allerdings ist dieser nicht signifikant. Am Tag 2, 3, 4 und 7 sind die Jasmonsäurekonzentrationen unter das Detektionslimit (0,5 ng/g FG) gesunken (Stingl et al., 2013).

Zusätzlich wurde im Rahmen der Methode zur Quantifizierung der Phytohormone der Gehalt von Jasmonsäure-Isoleucin, Salicylsäure und Abscisinsäure analysiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Weder während der kurzzeitigen Inkubation von 37 °C (bis zu 8 h) noch während der längerfristigen Behandlung mit Hitze (bis zu 7 Tage) ist ein Anstieg von JA-Ile, SA oder ABA zu erkennen. Während der längerfristigen 37 °C-Behandlung ist JA-Ile ebenfalls nicht mehr detektierbar. Für JA-Ile liegt das Detektionslimit bei 0,1 ng/g FG (Stingl et al., 2013).

Diese Ergebnisse zeigen, dass weder während eines kurzzeitigen Hitzestresses (bis zu 8 h) noch während einer längerfristigen Hitzebehandlung (bis zu 7 Tage) der Gehalt des RES-Oxylipins OPDA signifikant ansteigt. Jasmonsäure hingegen scheint geringfügig zu akkumulieren, vor allem innerhalb der ersten 2 h nach Beginn eines Hitzestresses. Allerdings ist dieser Anstieg transient und in seiner Stärke (13fach) nicht vergleichbar mit einer biologisch relevanten Akkumulation nach Verwundung. Nach Verwundung erreichen JA-Spiegel über das 1000fache ihres basalen Gehaltes (Glauser et al., 2008). Dieser Befund bestätigt dennoch teilweise die Ergebnisse von Clarke et al (Clarke et al., 2009): hier wurde eine Akkumulation von JA gezeigt, welche nach 8 h ihr Maximum erreicht und bei 190 pmol/g FG liegt, während im Rahmen dieser Arbeit ein Maximum von JA nach 2 h detektiert wurde, welches bei 70,5 pmol/g FG liegt. Allerdings steht das Resultat der OPDA-Quantifizierung nach 37 °C im Widerspruch mit den Ergebnissen von Clarke et al (Clarke et al., 2009): Während Clarke und seine Kollegen ein Maximum von 7000 pmol/g FG nach 8 h bei 38 °C publizierten, lagen die gemessenen OPDA-Konzentrationen dieser Arbeit nach 8 h bei 37 °C bei 40,2 pmol/g FG.

Da das RES-Oxylipin OPDA durch eine Inkubation bei 37 °C nicht akkumuliert, scheint OPDA keine Bedeutung in *A. thaliana* während eines Hitzestresses zu haben. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde die Genexpression von *HSP101* bei 22 °C und nach 1 h bei 37 °C in Col-0 sowie in der JA-defizienten *opr3*-Mutante und der JA- und OPDA-defizienten *dde2*-Mutante analysiert (siehe Abbildung 3.13).

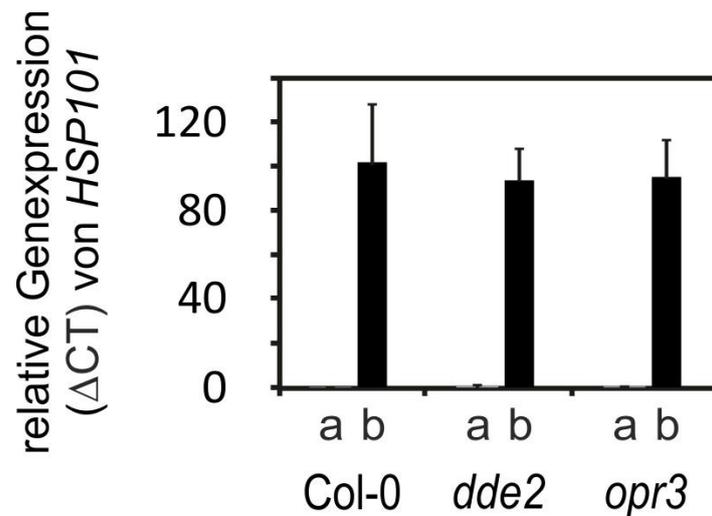


Abbildung 3.13: Genexpressionsanalyse von *HSP101* mittels quantitativer realtime PCR. Keimlinge (Col-0, *dde2* und *opr3*) wurden mit 22 °C (a) bzw. 37 °C (b) für 1 h behandelt. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

Die Inkubation der *Arabidopsis*-Keimlinge mit 37 °C führt in allen getesteten Genotypen zu einem deutlichen Anstieg in der Expression des *HSP101*-Gens (siehe Abbildung 3.13). Die Δ CT-Werte der JA-defiziente *opr3*-Mutante (Δ CT-Wert 95) und der JA- und OPDA-defizienten *dde2*-Mutante (Δ CT-Wert 94) sind vergleichbar mit dem des Wildtyps Col-0 (Δ CT-Wert 102). Die Induktion der Genexpression von *HSP101* nach einer 37 °C-Behandlung ist also nicht abhängig von dem RES-Oxylipin OPDA oder dem non-RES-Oxylipin JA.

3.4.2 Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach Verwundung in *Arabidopsis thaliana*

Es ist bereits publiziert, dass durch Verwundung JA-Spiegel über das 1000fache ihres basalen Gehalts erreichen (Glauser et al., 2008). So akkumuliert JA 2 h nach Verwundung auf über 11 nmol/g Frischgewicht und OPDA auf über 7 nmol/g Frischgewicht innerhalb von 6 h nach Verwundung (Reymond et al., 2000).

Da die Verwundung als mechanischer Stressor ein gutes System zur Akkumulation von Oxylipinen darstellt, wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwundet, um den endogenen Gehalt an den Oxylipinen JA und OPDA zu erhöhen und zu quantifizieren. Des Weiteren sollte mit diesen verwundeten Pflanzen, also Pflanzen mit einem hohen Gehalt an endogenen Oxylipinen, eine Genexpressionsanalyse des Hitzeschockgens *HSP101* durchgeführt werden. Für diese Versuche wurde neben dem WT Col-0 auch die Jasmonat-defiziente *dde2*-Mutante benutzt.

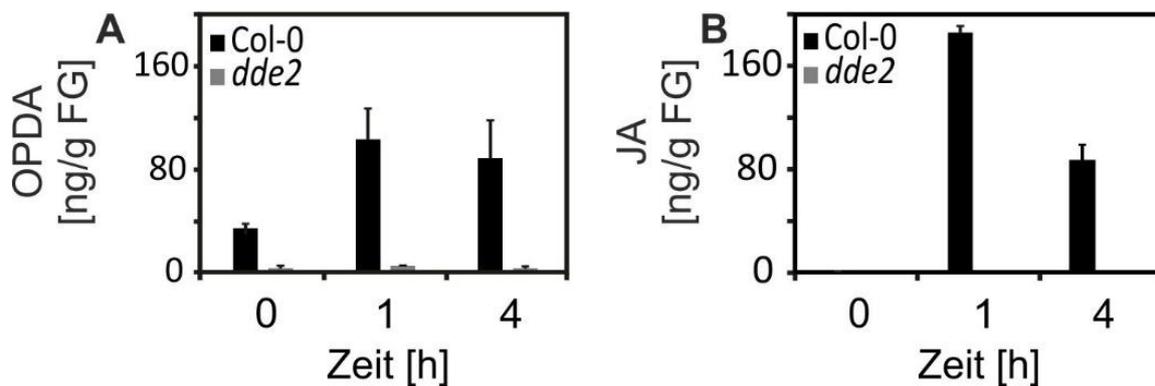


Abbildung 3.14: Endogener OPDA- (A) und JA-Gehalt (B) von Col-0- bzw. *dde2*-Pflanzen vor (0 h) bzw. 1 und 4 h nach Verwundung. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten \pm SD.

In der Abbildung 3.14 ist der Gehalt der Oxylipine OPDA und JA vor (0 h) bzw. 1 und 4 h nach Verwundung gezeigt. Die *dde2*-Mutante zeigt wie erwartet keinen Anstieg beider Oxylipine. Der Wildtyp Col-0 hingegen reagiert auf Verwundung mit einem Anstieg von OPDA und JA. Während der basale Gehalt des RES-Oxylipins OPDA vor der mechanischen Verwundung bei 35 ng/g Frischgewicht liegt, steigt dieser in der ersten Stunde nach Verwundung signifikant um das 3fache (auf 103 ng/g FG bzw. 352,6 pmol/g FG) an. Diese Akkumulation bleibt über die ersten vier Stunden nach Verwundung relativ stabil und ist auch nach 4 h noch bei 90 ng/g Frischgewicht (2,6fach mehr im Vergleich zu den basalen Werten). Der basale Gehalt des non-RES-Oxylipins JA liegt unter 0,9 ng/g Frischgewicht und steigt 1 h nach Verwundung signifikant auf 186 ng/g Frischgewicht an (207fach; 885,3 pmol/g FG). In diesem Falle ist die Akkumulation von JA nach Verwundung eher transient, denn 4 h nach Behandlung liegt der JA-Gehalt bei 87 ng/g Frischgewicht (97fache, signifikante Erhöhung gegenüber des 0 h-Wertes). Der basale Gehalt von JA ist vergleichbar mit denen der vorherigen Versuche (vergleiche Abbildung 3.12), der OPDA-Gehalt unter Kontrollbedingungen ist jedoch in diesem Versuch leicht erhöht im Vergleich zu den basalen Werten in den Hitze-Versuchen (2,4-2,8fach). Allerdings handelt es sich hier um sechs Wochen alte Erdpflanzen, während die Jasmonat-Quantifizierung nach 37 °C in zehn Tage alten Keimlingen stattfand. Die in der Literatur gefundenen Werte von 3 bis 4 Wochen alten Col-0-Pflanzen nach Verwundung (JA nach 2 h bei 11000 pmol/g FG und OPDA nach 6 h bei 7000 pmol/g FG) werden allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht (Reymond et al., 2000). Ein Grund hierfür könnte die Verwundungsmethode sein: im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Blattseiten verwundet, die Mittelrippe blieb intakt, während Reymond und Kollegen die komplette Blattspreite verwundeten.

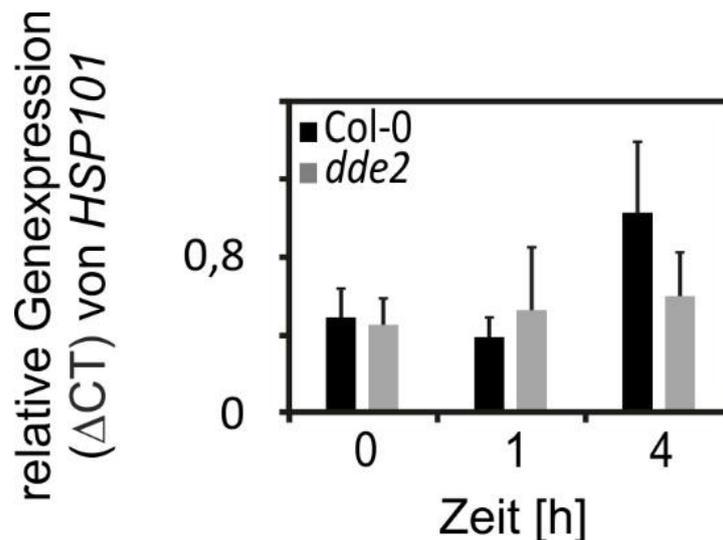


Abbildung 3.15: Genexpressionsanalyse von *HSP101* mittels quantitativer realtime PCR. Sechs Wochen alte Erdpflanzen (Col-0 und *dde2*) wurden verwundet und nach 1 h oder 4 h geerntet bzw. vor Verwundung geerntet (0 h). Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

Da mechanische Verwundung zu einem erhöhten endogenen Gehalt der Oxylipine OPDA und JA in Col-0, aber nicht in der *dde2*-Mutante, führt, wurde mit beiden Genotypen eine Genexpressionsanalyse des Hitzeschockgens *HSP101* durchgeführt (siehe Abbildung 3.15). In diesem Versuch zeigt sich in der *dde2*-Mutante keine Induktion der Expression von *HSP101*. Die Δ CT-Werte sind auch nach Verwundung vergleichbar mit denen davor unter Kontrollbedingungen. Dieses Resultat war zu erwarten, da die Jasmonat-defizienten *dde2*-Pflanzen trotz Verwundung weder JA noch OPDA akkumulieren. In den verwundeten Pflanzen des Wildtyps Col-0 dagegen liegt eine Akkumulation von OPDA und JA vor, diese führt allerdings nicht zu einer erhöhten Induktion der *HSP101*-Genexpression. Auch in diesem Fall sind die Δ CT-Werte vergleichbar mit denen der *dde2*-Mutante und mit denen der Kontroll-Pflanzen (0 h). Das heißt, trotz endogener Akkumulation von OPDA wird die Genexpression von *HSP101* nicht induziert. Dies steht im Gegensatz zu der exogenen Zugabe von OPDA, welche zu einer deutlich erhöhten *HSP101*-Expression führt.

Die durch Verwundung erreichbaren hohen endogenen Spiegel an OPDA sind demzufolge zu gering, um eine Induktion der *HSP101*-Genexpression zu vermitteln. Wird von dem maximalen endogenen OPDA-Gehalt (103 ng/g FG, entspricht 103 μ g/kg FG) nach Verwundung ausgegangen und wird näherungsweise „1 kg“ mit „1 l“ gleichgesetzt, kann der endogene OPDA-Gehalt auf etwa 0,35 μ M berechnet werden. Im Vergleich dazu wurden die exogenen Behandlungen mit 75 μ M OPDA durchgeführt, was zu offensichtlich höheren endogenen Wirkspiegeln führt. Diese höheren endogenen Wirkspiegel durch die exogene Zugabe von OPDA können für die Expression der Hitzeschockgene verantwortlich sein,

3 Ergebnisse

während der endogene OPDA-Gehalt nach Verwundung zu niedrig ist für eine Induktion der Genexpression.

3.4.3 Quantifizierung von Oxylipinen und der Genexpression nach osmotischen Stress in *Arabidopsis thaliana*

Als weiterer Stressor, um eine endogene Akkumulation der Jasmonate zu erreichen, wurde osmotischer Stress ausgewählt. Seltmann et al. konnte bereits zeigen, dass eine Flotierung von *Arabidopsis*-Blättern auf einer 0,5 M Sorbitol-Lösung zu einem starken Anstieg von JA (257 ng/g Frischgewicht nach 24 h) und OPDA (462 ng/g Frischgewicht nach 24 h) führt (Seltmann et al., 2010). Außerdem wurde publiziert, dass osmotischer Stress (300 mM Mannitol) zu einer Akkumulation von HSP führt (Swindell et al., 2007).

Zur Untersuchung des Oxylipin-Gehaltes und der Genexpression von *HSP101* wurden Blätter von acht Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen auf einer 296,5 mM Sorbitol- bzw. 250g/l PEG6000-Lösung flotiert (entspricht jeweils einem osmotischen Druck von -7,35 bar bzw. -0,735 MPa) und nach 1, 2, 4, 6 und 24 h geerntet. Als Kontrolle dienten *Arabidopsis*-Blätter, die für die gleichen Zeiten auf H₂O flotiert wurden. Für diese Versuche wurde die Jasmonat-defiziente *dde2*-Mutante sowie der korrespondierende WT Col-0 benutzt.

3 Ergebnisse

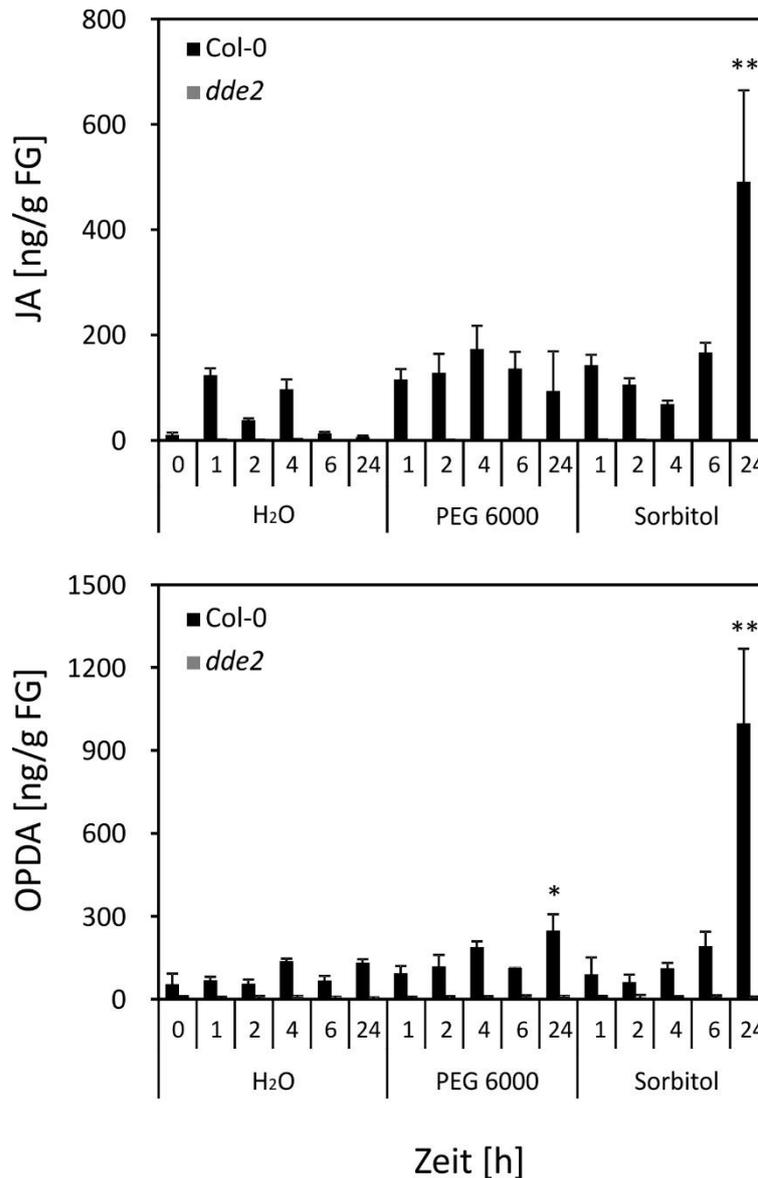


Abbildung 3.16: Endogener OPDA- und JA-Gehalt von Col-0- bzw. *dde2*-Pflanzen vor (0 h) bzw. 1, 2, 4, 6 und 24 h nach Sorbitol- oder PEG6000-Behandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten \pm SD. Der t-Test wurde nur mit den jeweiligen 24 h Werten gegen die 24 h Kontrollwerte durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, t-Test unabhängiger Stichproben).

Die Abbildung 3.16 stellt den Gehalt an OPDA und JA in Col-0- sowie *dde2*-Blättern von acht Wochen alten, auf Erde gewachsenen Pflanzen nach Flotierung auf PEG6000- bzw. Sorbitollösung dar. Es ist deutlich erkennbar, dass in den Blättern der *dde2*-Mutante wie erwartet keine Jasmonate basal vorhanden sind oder während eines osmotischen Stresses akkumulieren.

Durch eine Kontroll-Flotierung mit H₂O steigen die JA-Spiegel von Col-0 nach 1 h sowie nach 4 h an (siehe Abbildung 3.16). Vor der Behandlung (0 h) liegt der basale JA-Gehalt bei 11 ng/g FG. Diesen Anstieg lässt sich durch eine Verwundungsreaktion durch das Abschneiden der Blätter und Einlegen in die Flotierungslösung begründen. Aus diesem

3 Ergebnisse

Grunde ist es ratsam, nur die 24 h-Werte zu betrachten. 24 h nach Beginn der Flotierung ist der JA-Spiegel der Kontrollblätter in H₂O wieder auf 7 ng/g FG gesunken. Durch eine Behandlung der Blätter mit einer hypertonischen PEG6000-Lösung erreicht die Jasmonsäure nach 24 h einen Gehalt von 94 ng/g Frischgewicht (13,4facher, nicht signifikanter Anstieg aufgrund der hohen SD). Durch eine 24stündige Flotierung auf einer hypertonischen Sorbitol-Lösung mit vergleichbarem osmotischem Druck wie die verwendete PEG6000-Lösung akkumuliert im Wildtyp Col-0 JA signifikant auf 491 ng/g FG (70facher Anstieg). Auch der OPDA-Spiegel in Col-0-Blättern erhöht sich signifikant durch eine 24stündige PEG6000- oder Sorbitol-Behandlung (siehe Abbildung 3.16). So steigt der basale OPDA-Spiegel von 132 ng/g Frischgewicht durch eine PEG6000-Flotierung nach 24 h auf 248 ng/g Frischgewicht an (1,9facher, signifikanter Anstieg). Durch die Behandlung mit Sorbitol akkumuliert OPDA und erreicht eine Konzentration von 999 ng/g FG. Somit ist der OPDA-Gehalt signifikant, um das 7,6fache, höher als unter basalen Kontrollbedingungen. Die basalen Werte von OPDA sowie JA sind im Vergleich höher zu den vorherigen Messungen (vergleiche Abschnitt 3.4.1 und Abschnitt 3.4.2). Dies bedeutet, dass die acht Wochen alten Erdpflanzen entweder generell höhere Oxylin-Spiegel aufweisen oder durch einen anderen Einfluss schon vor der Versuchsdurchführung gestresst waren. Die Resultate dieses Versuches sind durchaus vergleichbar mit Werten aus der Literatur: So konnte Seltmann et al. 24 h nach einer Behandlung mit 500 mM Sorbitol einen JA-Gehalt von 257 ng/g Frischgewicht und einen OPDA-Gehalt von 462 ng/g Frischgewicht zeigen (Seltmann et al., 2010), während hier ein JA-Gehalt von 491 ng/g Frischgewicht und ein OPDA-Gehalt von 999 ng/g Frischgewicht jeweils 24 h nach Sorbitol-Behandlung gemessen werden konnte.

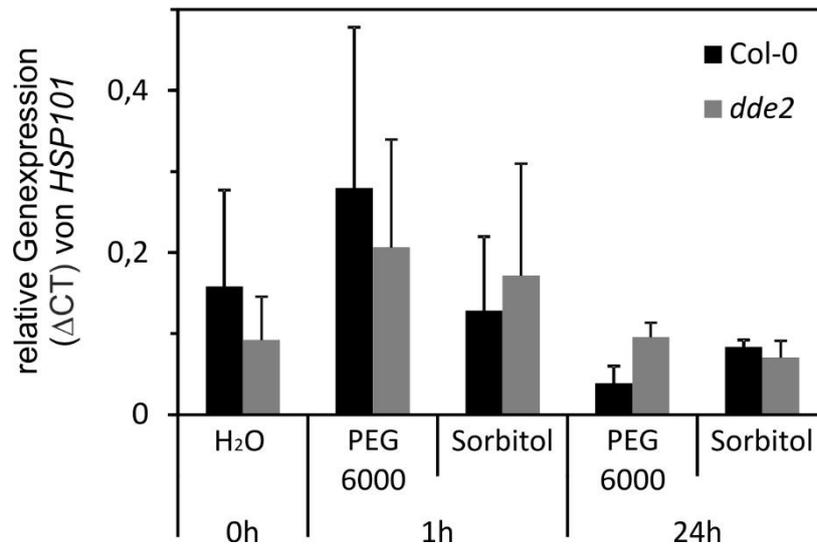


Abbildung 3.17: Genexpressionsanalyse von *HSP101* mittels quantitativer realtime PCR. Blätter von acht Wochen alte Erdpflanzen (Col-0 und *dde2*) wurden mit PEG6000 bzw. Sorbitol behandelt und nach 1 oder 4 h geerntet bzw. vor Behandlung geerntet (0 h). Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf *SAND*. (MW + SD, n = 3)

Die Genexpressionsanalyse der flüchtigen Col-0- bzw. *dde2*-Blätter ist in Abbildung 3.17 zu sehen. Weder eine PEG6000- noch eine Sorbitol-Behandlung führt zu einer Expression des Genes *HSP101*. Die Δ CT-Werte zeigen keine signifikante Erhöhung zu denen ohne Behandlung (0 h-Wert). Für die *dde2*-Mutante war dies zu erwarten, da sie keine Jasmonate bilden kann. Im Wildtyp Col-0 waren auch hier die endogen erhöhten Jasmonat-Spiegel nicht für eine Genexpression von *HSP101* verantwortlich.

Somit konnte das Resultat von Abschnitt 3.4.2 bestätigt werden: trotz einer endogenen Akkumulation des RES-Oxylipins OPDA bewirkt diese keine Induktion der Genexpression von *HSP101*.

Durch diese Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass durch die Einwirkung von Hitze in *Arabidopsis*-Keimlingen das RES-Oxylipin OPDA nicht akkumuliert. Das non-RES-Oxylipin JA akkumuliert zwar signifikant (während eines kurzzeitigen Hitzestresses), aber nur geringfügig im Vergleich zur Wirkung von anderen Stressoren: Während JA durch einen kurzzeitigen Hitzestress von 37 °C (Keimlinge) maximal um das 13fache ansteigt, akkumuliert JA durch Verwundung (Erdpflanzen) um das 207fache (Maximum) bzw. durch osmotischen Stress (Blätter von Erdpflanzen) um das 46fache (Maximum). Es scheint, als würden die Oxylipine OPDA und JA keine Rolle in der Hitzestressantwort von *A. thaliana* spielen. Des Weiteren wurde die Genexpression von *HSP101* nach einer endogenen

3 Ergebnisse

Oxylin-Akkumulation (durch Verwundung oder osmotischen Stress) untersucht: auch hier induziert endogen gebildetes OPDA nicht die Expression dieses Hitzeschockgenes.

3.5 Funktionelle Untersuchung der biologischen Relevanz von RES-Oxylipinen in der Thermotoleranz von *Arabidopsis thaliana*

3.5.1 Können RES-Oxylipine eine chemisch induzierte Thermotoleranz vermitteln?

Um zu überprüfen, ob exogen hinzugefügte RES-Oxylipine neben der Expression von Hitzeschockgenen auch eine chemisch induzierte Thermotoleranz (CAT: engl. chemical induced thermotolerance) vermitteln, wurde ein Thermotoleranz-Assay durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung von *Arabidopsis* mit den HSP90-Inhibitoren GDA und RAD zu einer Induktion der Thermotoleranz unter isothermen Bedingungen führt (Yamada et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 7 Tage alte Keimlinge, welche zwei voll entwickelte Kotyledonen aufwiesen (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001), verschiedenen Temperaturprofilen ausgesetzt (siehe auch Abbildung 3.18 A). Es wurden Keimlinge in flüssigem MS-Medium mit einem Hitzeschock (HS: 80 min bei 45 °C) behandelt oder aber eine Akklimatisationsphase (2 h bei 37 °C) sowie eine nachfolgende Erholungsphase (2 h bei 22 °C) vor dem Hitzeschock (80 min bei 45 °C) durchgeführt. Die Kontroll-Keimlinge (KON) wuchsen durchgängig bei 22 °C auf. Für die Untersuchung der CAT wurde die Akklimatisierungs- sowie die Erholungsphase durch eine vierstündige Behandlung mit verschiedenen RES-Oxylipinen (70 µM PGA₁, OPDA) oder HSP90-Inhibitoren (20 µM CEL, 50 µM GDA und RAD) ersetzt. Fünf bis sechs Tage nach der Behandlung wurde die Vitalität der Keimlinge analysiert.

Für diese Versuche wurde ein Hitzeschock von 80 min bei 45 °C ausgewählt, da durch eine zuvor durchgeführte zeitliche Charakterisierung der basalen Thermotoleranz die optimale Dauer der Behandlung festgelegt wurde: Nach einer 75-minütigen Inkubation von Keimlingen bei 45 °C überlebt fast ein Drittel der Keimlinge (29 %) und zeigt fortlaufendes Wachstum, während eine 80-minütige Behandlung bei 45 °C nur noch 5 % der Keimlinge überleben lässt (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

3 Ergebnisse

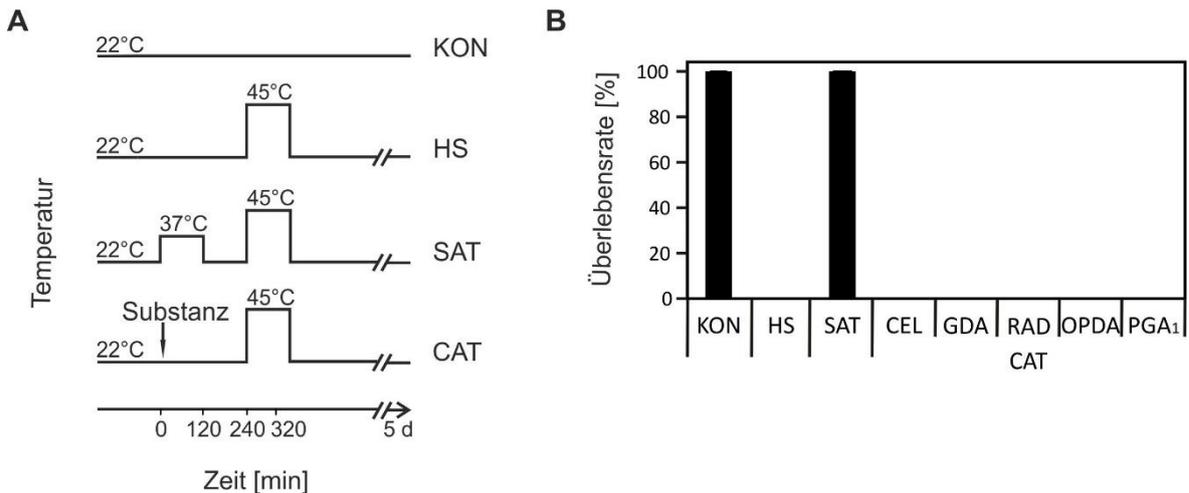


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der angewandten Temperaturprofile und Überlebensrate der Col-0-Keimlinge. (A) Die Kontroll-Keimlinge (KON) wuchsen durchgängig bei 22 °C auf, während die mit Hitzeschock (HS) behandelten Keimlinge für 80min bei 45 °C inkubiert wurden. Das Temperaturprofil der SAT besteht aus einer zweistündigen Akklimatisationsphase bei 37 °C und einer anschließenden, zweistündigen Erholungsphase bei 22 °C. Für die Behandlung CAT wurde die Akklimatisierungs- und die Erholungsphase durch eine vierstündige Behandlung mit verschiedenen RES-Oxylipinen oder HSP90-Inhibitoren ersetzt. (B) Um die Überlebensrate nach CAT zu bestimmen, wurden sieben Tage alte Col-0-Keimlinge den verschiedenen Temperaturprofilen ausgesetzt: KON, HS oder SAT. Außerdem wurden die Keimlinge für 4 h mit den RES-Oxylipinen OPDA oder PGA₁ [70 µM] sowie den HSP90-Inhibitoren GDA, CEL und RAD [50 bzw. 20 µM] behandelt (CAT). Fünf bis sechs Tage nach dem 80-minütigen Hitzeschock bei 45 °C wurde die Überlebensrate der Keimlinge analysiert. Als tot wurden Keimlinge klassifiziert, wenn keine Folgeblätter ausgebildet wurden und sie somit nicht weiterwuchsen. (MW + SD, n = 7-12)

In der Abbildung 3.18 B ist die Überlebensrate der Keimlinge sechs Tage nach der Behandlung mit den verschiedenen Temperaturprofilen (siehe Abbildung 3.18 A) zu sehen. Wie erwartet überlebten alle Keimlinge zu 100 % die Kontrollbedingungen bei 22 °C sowie das Temperaturprofil der kurzzeitig erworbenen Thermotoleranz (SAT). Alle Kotyledonen der Keimlinge, welche einem 80minütigen Hitzeschock bei 45 °C ausgesetzt waren, waren chlorotisch und es war kein weiteres Wachstum festzustellen. Für die chemisch induzierte Thermotoleranz (CAT) wurden Akklimatisierungs- sowie Erholungsphase durch eine Inkubation mit RES-Oxylipinen (70 µM PGA₁, OPDA, 4 h) oder HSP90-Inhibitoren (20 µM CEL, 50 µM GDA oder RAD, 4 h) ersetzt. Weder die exogene Zugabe von RES-Oxylipinen, noch die Addition von HSP90-Inhibitoren führten zu einer Thermotoleranz der getesteten Keimlinge. Auch hier zeigten alle Keimlinge weiße Kotyledonen und kein weiteres Wachstum.

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu bereits veröffentlichten Resultaten, die eine chemisch induzierte Thermotoleranz durch die HSP90-Inhibitoren GDA und RAD in

3 Ergebnisse

Arabidopsis zeigen konnten (Yamada et al., 2007). Da im Rahmen dieser Arbeit auch die Methodik von Yamada und Kollegen getestet wurde (Behandlung mit 50 μ M GDA oder RAD für 6 h, nachfolgender dreimaliger Mediumwechsel und anschließende Erholungsphase für 2 h bei 37 °C; Daten nicht gezeigt), ist die Diskrepanz möglicherweise auf kleine experimentelle Unterschiede (z.B. der Wärmeübertragungsrate auf die Pflanzen) zurückzuführen.

3.5.2 Thermotoleranz-Assays mit Wildtyp und Jasmonat-defizienten *dde2*-Keimlingen

Obwohl die Zugabe von RES-Oxylipinen eine starke Induktion von Hitzeschockgenen auslöst, haben die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Bedeutung von RES-Oxylipinen für die Hitzeresistenz in *Arabidopsis* ergeben. Im Falle des RES-Oxylipins OPDA konnte gezeigt werden, dass es während einer Inkubation von 37 °C nicht akkumuliert und auch durch eine endogene Erhöhung der Jasmonate sich keine Induktion der Expression von Hitzeschockgenen zeigt. Um diese bisherigen Ergebnisse abzusichern, wurden verschiedene Thermotoleranz-Assays mit der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante durchgeführt.

Hierfür wurden Thermotoleranz-Assays ausgewählt, welche in vielen Publikationen bereits erfolgreich etabliert und eingeführt wurden: die Bestimmung der Überlebensrate, das Wurzelwachstum sowie die Hypokotyl-Elongation nach verschiedenen Temperatur-Behandlungen. In diesem Fall wurden die Thermotoleranz-Assays auf festem MS-Medium mit 4 bis 7 Tage alten Keimlingen (Wachstumsstadium 1.0 nach Boyes et al., 2001) des Wildtypes Col-0 und der Mutante *dde2* sowie drei verschiedenen Temperaturprofilen durchgeführt: Hitzeschock (hier 2 h bei 45 °C), kurzzeitig erworbene Thermotoleranz (SAT, 2 h bei 37 °C, 2 h bei 22 °C und 2 h bei 45 °C) sowie die Kontrolltemperatur bei 22 °C. Für die Bestimmung der Überlebensrate wurden einige Tage nach der Hitzebehandlung die überlebenden Keimlinge gezählt. Als tot wurden Keimlinge klassifiziert, wenn keine Folgeblätter ausgebildet wurden und sie somit nicht weiterwuchsen. Bei der Bestimmung des Wurzelwachstums und der Hypokotyl-Elongation wurde vor der jeweiligen Temperaturbehandlung die Länge der Wurzeln bzw. des Hypokotyls gemessen: diese entsprach 100 %. Die Länge der Wurzeln bzw. des Hypokotyls wurde erneut 4 bis 5 Tage nach der jeweiligen Temperaturinkubation gemessen und die Gesamtlänge in % ausgerechnet.

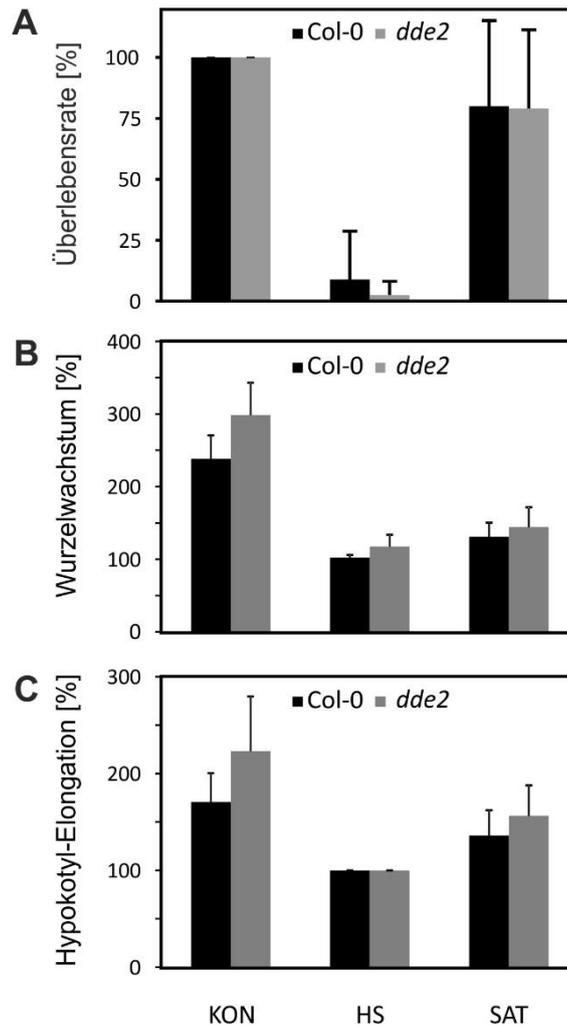


Abbildung 3.19: Thermotoleranz-Assays mit Keimlingen des Wildtypes Col-0 und der Mutante *dde2*. Sowohl für die Bestimmung der Überlebensrate (A) als auch für die Untersuchung des Wurzelwachstums (B) und der Hypokotyl-Elongation (C) wurden vier Tage alte Keimlinge (Wachstumsstadium 1.0 nach (Boyes et al., 2001)) benutzt. Diese wurden entweder einem Hitzeschock (HS: hier 2 h bei 45 °C), oder einer kurzzeitig erworbenen Thermotoleranz (SAT, 2 h bei 37 °C, 2 h bei 22 °C und 2 h bei 45 °C) oder der Kontrolltemperatur (KON) bei 22 °C ausgesetzt. Das Diagramm in (A) stellt den Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dar (n= 7-20), während die Abbildungen von (B) und (C) jeweils die Ergebnisse eines charakteristischen Experiments darstellen (MW + SD, n = 5-11 bei B und n ≥ 14 bei C)

Die Abbildung 3.19 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Thermotoleranz-Assays mit der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante und dem korrespondierenden Wildtyp Col-0. Hier wurde zum einen die Überlebensrate gemessen (siehe Abbildung 3.19 A). Erwartungsgemäß überlebten alle Keimlinge beider Genotypen die Inkubation der Kontrolltemperatur (22 °C). Der Hitzeschock bei 45 °C allerdings war für die meisten der Keimlinge (91 % bzw. 97,5 %) letal. Durch eine Akklimatisierungs- und Erholungsphase vor dem 45 °C-Hitzeschock konnten 80 % der WT-Keimlinge und 79 % der *dde2*-Keimlinge neue Blätter ausbilden. Es zeigten sich also weder beim Hitzeschock noch bei der kurzzeitig erworbenen

3 Ergebnisse

Thermotoleranz Unterschiede zwischen der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante und dem korrespondierenden Wildtyp Col-0.

Auch die Resultate der Wurzelwachstumsbestimmung der *dde2*-Keimlinge und der Col-0-Keimlinge sind vergleichbar (siehe Abbildung 3.19 B). Sowohl beim Hitzeschock (HS) als auch bei der kurzzeitig erworbenen Thermotoleranz (SAT) zeigten die Wurzeln von Col-0 ein um 45-57 % reduziertes und *dde2* ein um 52-61 % reduziertes Wurzelwachstum gegenüber der Kontrollbedingung bei 22 °C (KON).

Darüber hinaus zeigen auch die Ergebnisse des Hypokotyl-Elongations-Assays (siehe Abbildung 3.19 C) dieses Resultat. Nach einer Inkubation der Keimlinge bei 45 °C reduzierte sich die Verlängerung des Hypokotyls in Col-0 um 41 % und in *dde2* um 55 %. Eine vorherige Behandlung bei der Akklimatisierungstemperatur von 37 °C und einer zweistündigen Erholungsphase bei 22 °C führte zu einer Verringerung der Hypokotyl-Elongation um 20 % (Col-0) bzw. 30 % (*dde2*).

In keiner der durchgeführten Thermotoleranz-Assays konnte eine verringerte erworbene Thermotoleranz der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante gezeigt werden. Mittels dieser Versuche wurde somit bestätigt, dass das RES-Oxylin OPDA keine biologische Relevanz in der Ausbildung der Thermotoleranz von *Arabidopsis thaliana* hat.

4 Diskussion

Während viele Funktionen des non-RES JA und einige am JA-Signaltransduktionsweg beteiligte Komponenten bereits erforscht sind, muss zur Aufklärung der RES-Oxylin-Signaltransduktionswege sowie zu deren Funktionen dieser noch viel geleistet werden.

Bisher bekannt ist, dass RES-Oxyline wie OPDA oder PPA₁ vor allem zwei Kategorien von Genen stark hochregulieren: Gene, die bei der Detoxifizierung beteiligt sind, sowie Hitzeschockgene (Mueller et al., 2008). So sind sechs der zehn am stärksten durch PPA₁ induzierten Gene Hitzeschockproteine (siehe Tabelle 1.1) (ausgehend von den publizierten Daten von Mueller et al., 2008). Während die Detoxifizierungsgene abhängig von TGA-Transkriptionsfaktoren induziert werden, erfolgt die Regulation der Hitzeschockgene durch RES-Oxyline unabhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren (Mueller et al., 2008). Bis heute ist unbekannt, welche Funktionen die RES-Oxyline während der Hitzeschockantwort in *Arabidopsis thaliana* innehaben und wie die Signalwege hierfür aktiviert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Fragestellungen geklärt werden.

Zunächst wurde mittels eines *in silico*-Vergleichs bereits publizierter Transkriptom-Daten geklärt, dass 30 **Hitze-induzierte Gene** (d.h. induzierbar durch 1 h bei 37 °C) durch das RES-Oxylin OPDA induziert werden (siehe Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Um die Induktionsstärke durch RES-Oxyline mit der durch Hitze zu vergleichen, wurden Genexpressionsanalysen *in vivo* mit vier repräsentativen Genen (*HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A*) durchgeführt. Hierdurch wurde deutlich, dass die exogene Behandlung mit OPDA als auch mit PGA₁ (ein kommerziell erhältliches PPA₁ Analogon) zu einer deutlichen Induktion aller vier getesteten Hitzeschockgene führt. Diese sind jedoch in ihrer Stärke und Kinetik nicht mit der Induktion nach 37 °C zu vergleichen (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3).

Im Laufe dieser Arbeit, im Jahre 2014, zeigten auch Masuda und seine Kollegen, dass die exogene Zugabe von OPDA zu einer Induktion der Gene *HSFA2*, *DREB2A*, *HSP17.6* sowie *HSP18.2* führt (Masuda et al., 2014). Auch andere RES-Oxyline sind in der Lage, die Expression von Hitzeschockgenen zu induzieren. So reguliert Malondialdehyd bspw. die Genexpression von *HSC70-1* und *DREB2A* in *A. thaliana* hoch (Weber et al., 2004). Auch für humane Zelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass 4-Hydroxynonenal (in Kolonkarzinom-Zellen) die Expression Hitzeschock-responsiver Gene (wie *DnaJA4*, *DnaJB1*, *DnaJB2*, *DnaJB4*, *HSPH1* etc.) induziert und PGA₁ (in K562-Zellen) die

4 Diskussion

Genexpression von *HSP70* und *HSP90* durch Aktivierung von HSF1 induziert (Amici et al., 1992; West and Marnett, 2005; Rossi et al., 1996). Santagata et al. (2012) führten ein Screening mit 80.000 natürlichen Substanzen durch, um neue Komponenten zu finden, welche eine HSFA1-abhängige Stress-Antwort induzieren. Die stärksten Induktoren teilen sich eine strukturelle Gemeinsamkeit: eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe (Santagata et al., 2012).

Für die Induktion der Hitzeschockgene in *Arabidopsis* durch RES-Oxylipine wurden bisher noch keine **Signaltransduktionskomponenten** gefunden. Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren der HSR (die Masterregulatoren HSFA1s sowie HSFA2) ist auch der putative OPDA-Rezeptor CYP20-3 ein potentieller Kandidat. Park konnte 2013 zeigen, dass die *cyp20-3*-Mutante eine verringerte Expression von *HSP17.6*, *CYP81D11*, *GST6*, *GST8* und *GRX480* nach exogener OPDA-Behandlung aufweist (Park et al., 2013). Genexpressionsanalysen mit vier repräsentativen Hitzeschockgenen und entsprechenden Signaltransduktions-Mutanten konnten allerdings zeigen, dass die Proteine CYP20-3 und SAT1 keine Bedeutung in der Regulation der getesteten repräsentativen Hitzeschockgene durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 haben (siehe Abbildung 3.4). Allerdings konnte die Genexpressionsanalyse mit den *hsfA1 abd(e)*- und *hsfA2*-Mutanten Aufschluss darüber bringen, dass die Masterregulatoren HSFA1 a,b,d (und e) für die Induktion der Hitzeschockgene *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 essentiell und für *DREB2A* zumindest teilweise notwendig sind. Der hitze-induzierbare Transkriptionsfaktor HSFA2 spielt jedoch in der Signaltransduktion von den getesteten RES-Oxylipinen (bezüglich der Hitzeschockgeninduktion) keine Rolle (siehe Abbildung 3.5).

Da Park und Kollegen (2013) eine Abhängigkeit der OPDA-responsiven Induktion verschiedener Gene (*HSP17.6*, *CYP81D11*, *GST6*, *GST8* und *GRX480*) von CYP20-3 feststellten, lag die Vermutung nahe, dass auch andere OPDA-responsive Gene durch CYP20-3 reguliert werden. Dies konnte für die vier getesteten Hitzeschockgene *HSP101*, *HSP26.5*, *HSFA2* und *DREB2A* nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 3.4). CYP20-3 und SAT1 sind an der Biosynthese von Cystein und Glutathion beteiligt, welches für die Redox-Kapazität von Zellen sowie für den Detoxifizierungsprozess in Zellen von großer Bedeutung ist. Alle von Park veröffentlichten Gene, die durch CYP20-3 abhängig zu sein scheinen, spielen eine Rolle im Detoxifizierungsprozess in Zellen. Dies könnte bedeuten, dass die Induktion von OPDA-responsiven Genen, vor allem von an der Detoxifizierung beteiligte, teilweise durch CYP20-3 reguliert werden. Beispielsweise ist *CYP81D11* abhängig von den

4 Diskussion

Transkriptionsfaktoren TGA2,5,6 und wird durch CYP20-3 reguliert (Mueller et al., 2008; Park et al., 2013). Möglicherweise liegt hier zumindest teilweise eine Interaktion dieser zwei Signalwege vor. Im Falle der getesteten Hitzeschockgene handelt es sich jedoch nicht um eine CYP20-3-abhängige Regulation. Der Signalweg über die HSFA1-Transkriptionsfaktoren verläuft nicht nur CYP20-3-, sondern auch TGA2,5,6-unabhängig. Die Induktion der getesteten Gene *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 sind, wie bereits erwähnt, HSFA1-abhängig, aber HSFA2-unabhängig (siehe Abbildung 3.5). Im klassischen Modell der Hitze-Signaltransduktion ist HSFA2 direkt abhängig von HSFA1 und die Expression wird von diesen Masterregulatoren induziert und reguliert (Liu et al., 2011). Auch die Hitze-responsive Expression von *HSP101* bspw. wird durch HSFA1 und HSFA2 reguliert (Liu et al., 2011; Liu et al., 2013; Charng et al., 2007). Allerdings schlugen Liu und seine Kollegen 2012 einen hypothetischen, zusätzlichen Signalweg bei Hitze vor, welcher über HSFA2, aber unabhängig von HSFA1, laufen soll (siehe auch Abbildung 4.1). Begründet wurde dies mit der verbleibenden Fähigkeit der *hsfA1 abde*-Mutante zur erworbenen Thermotoleranz unter milden Bedingungen (35 °C zur Akklimatisierung, gefolgt von einem 25minütigen Hitzeschock bei 43 °C, welcher ohne vorherige Akklimatisierung letal für die *hsfA1 abde*-Mutante ist) (Liu and Charng, 2012). Auch Schramm schlug schon 2008 in seinem Modell für die HSR einen HSFA1-unabhängigen Signalweg für HSFA2 vor (Schramm et al., 2008). Es ist also durchaus möglich, dass die Induktion der Genexpression von *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 HSFA1-abhängig, aber HSFA2-unabhängig ist. Die Induktion verschiedener HSPs unter Salzstress, wie auch unter osmotischem und oxidativem Stress verläuft ebenfalls durch die Masterregulatoren der HSR: HSFA1 (Liu et al., 2011). Hitze ist also nicht notwendig, um HSFA1 zu aktivieren, somit können durchaus auch RES-Oxylipine ihre Wirkung über die HSFA1-Transkriptionsfaktoren vermitteln.

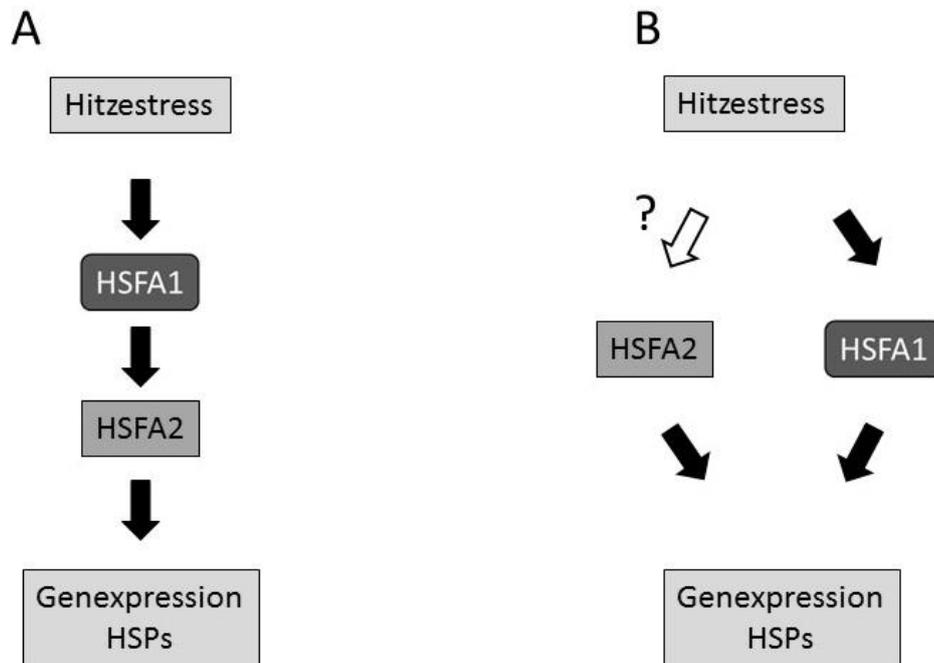


Abbildung 4.1: Vereinfachtes Modell der klassischen Hitze-Signaltransduktion, in der HSFA2 direkt abhängig von HSFA1 ist (A) und der hypothetischen Hitze-Signaltransduktion (B), in der zusätzlich ein weiterer Signalweg über HSFA2, unabhängig von HSFA1, laufen soll.

In einer Publikation von Yamauchi et al. (2015) zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Hier wurde publiziert, dass die exogene Zugabe des RES-Oxylipins (E)-2-Hexenal die Induktion vieler Gene bewirkt, welche teilweise HSFA1-abhängig, teilweise HSFA1-unabhängig reguliert werden. Auch die Expression verschiedener HSPs (bspw. *HSP101*, *HSP26.5*, *HSP17.6*) wird durch (E)-2-Hexenal induziert, allerdings wurde in diesem Fall keine Abhängigkeit von HSFA1 untersucht. Thermotoleranztests zeigten, dass die Behandlung mit (E)-2-Hexenal zu einer gesteigerten Thermotoleranz führt, nicht aber in der *hsfa1 abde*-Mutante, was vermuten lässt, dass auch die Induktion der HSPs über HSFA1 verläuft (Yamauchi et al., 2015).

Die Genexpression von *DREB2A* in der *hsfa1 abde*-Mutante entspricht nicht den Erwartungen (siehe Abbildung 3.5): es wurde bereits publiziert, dass *DREB2A* abhängig von den Transkriptionsfaktoren HSFA1 a,b,d,e durch Hitze induziert wird (Liu et al., 2011). Allerdings konnte die Arbeitsgruppe um Yoshida zeigen, dass die *DREB2A*-Expression durch Hitze HSFA1-abhängig, jedoch durch Trockenstress HSFA1-unabhängig verläuft (Yoshida et al., 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass *DREB2A* auch durch Anoxie vergleichbar stark wie durch Hitze induziert werden kann (2,8fach durch Anoxie und 3fach durch Hitze). Die beteiligten Transkriptionsfaktoren der Anoxie-vermittelten Genexpression sind noch unbekannt (Banti et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Induktion verschiedener Hitzeschockgene durch RES-Oxylipine über die Transkriptionsfaktoren HSFA1 vermittelt wird. Der **Mechanismus dieser Signaltransduktion** ist allerdings noch unklar, jedoch gibt es mindestens drei denkbare Möglichkeiten. Zum einen könnte die Wirkung über das sog. „Chaperon-Titrationsmodell“ vermittelt werden (nachzulesen in 1.3.2): Unter normalen Wachstumsbedingungen ist der sog. Multi-Chaperon-Komplex, bestehend aus HSP90 und HSP70, an die konstitutiven Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSFA1 gebunden und inhibiert somit die HSR. Während eines Hitzestresses kommt es zu einer Akkumulation von denaturierten Proteinen, welche HSP90 und HSP70 von den HSFs rekrutieren. So können die freien HSFs trimerisieren und dadurch transkriptionell aktiv werden (Nover and Scharf, 1997; Schoffl et al., 1998; Saidi et al., 2011; Scharf et al., 2012). Durch die Zugabe der elektrophilen und damit chemisch reaktiven Substanzen könnte es ebenso zu einer Rekrutierung von HSP90 und HSP70 von den HSFs kommen und die Transkriptionsfaktoren könnten transkriptionell aktiv werden. Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass die thiol-reaktiven RES entweder einen indirekten Effekt durch Veränderung des Redoxpotentials der Zelle hervorrufen oder spezifisch ein anderes, Redox-reguliertes Protein modifizieren und somit direkt den Signalweg aktivieren. Ein mögliches Protein wäre hier zum Beispiel das USP in *Arabidopsis* („universal stress protein“, At3g53990) (Jung et al., 2015). Ein Beispiel für den indirekten Effekt durch Änderung des zellulären Redoxpotentials ist die spekulierte Wirkweise für das RES Sulforaphan, welches im hohem Maße Glutathion depletiert (Valgimigli and Iori, 2009; Andersson et al., 2015). Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die thiol-reaktiven RES direkt HSP90 oder HSP70 modifizieren und somit eine Aktivierung des Signalwegs auslösen. Für letztere Hypothese scheint es bereits einige Evidenz zu geben. In Säugern konnte für HNE bereits eine Modifikation von HSP90 und HSP70, sowohl in Mäusen, Ratten als auch in menschlichen Kolonkarzinomzellen, gezeigt werden (Perluigi et al., 2005; Carbone et al., 2004; Vila et al., 2008; Jacobs and Marnett, 2010), was zu einer Hitzeschockantwort führt (Übersichten: (Mollapour and Neckers, 2012; Higdon et al., 2012)). Auch für *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits gezeigt, dass SSA1 (eine HSP70-Isoform) durch thiol-reaktive Substanzen wie 4-HNE modifiziert wird und somit auch eine HSR induzieren kann (Wang et al., 2012). Die HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol, ebenfalls RES, interagieren auch direkt mit HSP90, in humanen wie auch in Hefe-Zellen, und inhibieren so das Protein (Stebbins et al., 1997; Roe et al., 1999). Das elektrophile Sulforaphan scheint außerdem in der Lage zu sein, HSP90 in humanen Pankreaskrebszellen zu modifizieren (Li et al., 2012). Um genaue Aussagen über

4 Diskussion

den Mechanismus der Signaltransduktion über die HSFA1s von OPDA und PPA₁/PGA₁ treffen zu können, müssten proteinbiochemische Experimente durchgeführt werden. Beispielsweise könnte durch die Nutzung von PGA₁-Biotin und einer entsprechenden Aufreinigung mittels Streptavidin mit Hilfe eines spezifischen HSP90- bzw. HSP70-Antikörpers herausgefunden werden, ob eine direkte Modifikation an HSP90 oder HSP70 stattfindet. Dies stellt allerdings kein einfaches Unterfangen dar, da es zum einen in *Arabidopsis thaliana* viele Isoformen von HSP90 und HSP70 gibt, so dass der jeweilige Antikörper spezifisch für alle Isoformen sein müsste, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Zum anderen wäre für eine wissenschaftlich korrekte Versuchsdurchführung eine Positivkontrolle notwendig, was in diesem Fall schwierig zu realisieren wäre. Eine Aufreinigung von Proteinen mittels des Biotin-Streptavidin-Systems setzt außerdem eine hohe Ausgangsmenge an Protein voraus, da der Verlust hierbei sehr hoch ist.

Die Induktion verschiedener Hitzeschockgene durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA₁ mittels HSFA1, wie in vorliegender Arbeit gezeigt, aber auch die Fähigkeit der RES-Oxylipine PPA₁, (E)-2-Hexenal oder MDA zur Induktion verschiedener Hitze-responsiver Gene (Mueller et al., 2008; Yamauchi et al., 2015; Weber et al., 2004) wirft folgende Frage auf: Welche **Funktion** hat die Induktion der Hitzeschockgene bzw. Hitzeschockproteine durch RES-Oxylipine? Einige Hitzeschockproteine werden bereits konstitutiv exprimiert und sind vor allem für die Protein-Homöostasis wichtig (Waters, 2013; Bokszczanin et al., 2013). Vor allem Hitzestress führt zu einer enormen Induktion der HSP-Genexpression. Auch andere Stressoren wie Kälte, Trockenheit, Schwermetalle, oxidativer oder osmotischer Stress führen zu einer Akkumulation von HSPs (Swindell et al., 2007; Neumann et al., 1994; Vierling, 1991; Liu et al., 2011). Die bedeutendste biochemische Funktion der HSPs ist ihre Wirkung als Faltungshelfer: dies reicht von der Förderung der Disaggregation und Degradation fehlgefalteter und aggregierter Proteine bis zur Verhinderung der Aggregation (Parsell and Lindquist, 1994; Wang et al., 2004; Parsell and Lindquist, 1993). HSPs sind essentiell wichtig für die erworbene Thermotoleranz. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die RES-Oxylipin-induzierte HSP-Akkumulation eine Thermotoleranz vermitteln könnte. Tatsächlich wurden Nachweise hierfür bereits mehrfach vorgelegt: für die RES-Oxylipine (E)-2-Hexenal, 2-Butenal und 3-Hepten-2-one konnte bereits gezeigt werden, dass eine exogene Zugabe dieser Substanzen zu einer chemisch induzierten Thermotoleranz in *Arabidopsis* führt (Yamauchi et al., 2015). Auch für andere RES-Substanzen, wie Geldanamycin und Radicol konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe zu einer

4 Diskussion

chemisch induzierten Thermotoleranz in *Arabidopsis* führt (Yamada et al., 2007). Allerdings sind diese Substanzen nicht nur elektrophil, sie inhibieren auch HSP90 und führen somit direkt zu einer Aktivierung der HSR.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Ermittlung der Überlebensraten nach einer Substitution der Akklimatisationsphase (2 h bei 37 °C) durch die RES-Oxylipine OPDA und PGA₁, sowie den HSP90-Inhibitoren CEL, GDA und RAD durchgeführt (siehe Abbildung 3.18). Bei der kurzzeitigen erworbenen Thermotoleranz wird davon ausgegangen, dass vor allem die Induktion der Hitzeschockproteine während der Adaptationsphase bei 37 °C für ein Überleben des ansonsten letal verlaufenden Hitzeschocks bei 45 °C verantwortlich ist. Die RES-Oxylipine OPDA und PGA₁, sowie die HSP90-Inhibitoren GDA und RAD induzieren die Genexpression von HSPs (z.B. *HSP101*) (siehe Abbildung 3.3 und Abbildung 3.7), weshalb eine chemisch induzierte Thermotoleranz, wie auch bereits für GDA und RAD publiziert (Yamada et al., 2007), erwartet wurde. Das HSP101 ist essentiell für eine erworbene Thermotoleranz in *Arabidopsis* (Queitsch et al., 2000). Die erhöhte Expression von *AtHSP101* führt zudem zu einer gesteigerten Thermotoleranz in Reis und auch die erhöhte Expression von *OsHSP101* resultiert in einer gesteigerten Thermotoleranz in Tabak (Katiyar-Agarwal et al., 2003; Chang et al., 2007).

Jedoch führte die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Behandlung mit RES-Oxylipinen sowie mit HSP90-Inhibitoren zu keiner Toleranz des 45 °C-Hitzeschocks. Für die HSP90-Inhibitoren GDA und RAD wurde bereits nachgewiesen, dass die Addition dieser Substanzen zu einer chemisch induzierten Thermotoleranz in *Arabidopsis* führen kann (Yamada et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem auch die Inkubationszeiten von Yamada und Kollegen getestet: auch hier führte die Behandlung nicht zu einer Toleranz des 45 °C Hitzeschocks. Trotz einer gesteigerten Expression der untersuchten Hitzeschockgene, allen voran das für eine erworbene Thermotoleranz essentielle *HSP101*, durch OPDA, PGA₁, RAD sowie GDA führt dies nicht zu einer induzierten Thermotoleranz (von 45 °C). Da im Vergleich zu der zweistündigen Akklimatisierungsphase bei 37 °C die Induktion der Genexpression durch die RES sehr viel schwächer ist, könnte es an einer nicht ausreichenden Menge von HSP101 liegen. Eventuell reicht aber die Induktion durch die getesteten Substanzen aus, um unter bestimmten, weniger harschen Bedingungen eine Schutzwirkung zu erreichen, dies konnte aber durch die hier getesteten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Abweichungen zu bisher veröffentlichten Publikationen (Yamauchi et al., 2015; Yamada et al., 2007) könnten zum einen durch verschiedene Entwicklungsstadien erklärt werden, denn je nach

4 Diskussion

Entwicklungsstatus der *A. thaliana*-Genotypen zeigen sich verschiedene Thermotoleranz-Phänotypen (Larkindale et al., 2005). Zudem ergeben sich durch kleine experimentelle Unterschiede und verschiedene Inkubatorschränke Abweichungen in der Wärmeübertragungsrate. So könnte beispielsweise die 45 °C-Behandlung im Klimaschrank unserer Arbeitsgruppe zu harsch für die Keimlinge und die Wärmeübertragungsrate auf die Pflanzen schneller als bspw. bei Yamada und Kollegen gewesen sein.

Allerdings ist nicht nur alleine die Menge an HSPs entscheidend; zahlreiche Mutanten mit Wildtyp-ähnlicher Akkumulation von HSP101 und sHSPs zeigen dennoch Defekte in der Thermotoleranz (bspw. *aba1*, *aba2*, *NahG*, *vtc1*, *npr1*, *cad2*). Die Autoren vermuten, dass sowohl Abscisinsäure als auch Salicylsäure oder aktive Sauerstoffspezies (engl.: active oxygen species) unabhängig von einer HSP-Induktion eine Rolle in der Thermotoleranz von *Arabidopsis* spielen (Larkindale et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem Thermotoleranz-Assays mit der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante (JA- und OPDA-defizient) und Col-0 durchgeführt (siehe Abbildung 3.19). Auch im Fall der Jasmonate konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass vor allem Jasmonsäure, allerdings ein non-RES-Oxylin, zu einer gesteigerten Thermotoleranz in *A. thaliana* führt (Clarke et al., 2009; Sharma and Laxmi, 2015). Die JA-insensitive Mutante *coi1-1* wie auch die JA-defiziente *opr3*-Mutante zeigten schwerere Schädigungen durch 38 °C bzw. eine geringere Erholung nach 38 °C als ihr korrespondierender Wildtyp. Allerdings handelt es sich bei Jasmonsäure um ein non-RES-Oxylin, welches die Expression der Hitzeschockgene in *A. thaliana* nicht induziert (Taki et al., 2005; Clarke et al., 2009). Dennoch sind in der Literatur auch gegenteilige Beispiele, allerdings für andere Organismen, zu finden. So kann MeJA in *Nicotiana attenuata* die Expression von *HSP70* und einem sHSP mit einer Größe von 21 kD induzieren (Hamilton Iii and Coleman, 2001). Auch in Samen der *Douglasie* soll MeJA sHSPs bzw. in C6 Gliomzellen *HSP72* induzieren, letztes sogar über HFS1 (Übersicht in (Flescher, 2007)).

Die außerdem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten verschiedenen Thermotoleranz-Assays mit der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante und Col-0 zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen: weder bei einem Hitzeschock (hier: 2 h bei 45 °C), noch bei der kurzzeitig erworbenen Thermotoleranz (hier: 2 h bei 37 °C, 2 h bei 22 °C und 2 h bei 45 °C). Dies führt zu dem Schluss, dass Jasmonate in diesem Fall nicht essentiell für eine erworbene Thermotoleranz in *A. thaliana* zu sein scheinen. Auch Routaboul und Kollegen fanden bereits 2012 heraus, dass die Mutanten *coi1*, *aos* und *opr3* nach drei Wochen bei 33 °C eine

4 Diskussion

dem WT-ähnliche Überlebensrate zeigen und Jasmonate somit keine Rolle in der basalen Thermotoleranz spielen (Routaboul et al., 2012).

Da bisher keine Funktion der RES-Oxylipin-vermittelten Expression vieler Hitze-responsiver Gene gefunden werden konnte, wären weitere Untersuchungen sinnvoll. Nicht nur der Einfluss von Hitze, auch andere Stressoren lösen eine Akkumulation von HSPs aus. Auch Anoxie, UV-B-Strahlung, Kälte, Trockenheit, Schwermetalle, oxidativer oder osmotischer Stress bewirken eine starke Induktion der Hitzestress-Genexpression (Pucciariello et al., 2012; Waters, 2013; Swindell et al., 2007; Neumann et al., 1994; Vierling, 1991; Liu et al., 2011). Diese HSP-Akkumulation durch isotherme Stressoren wie bspw. Salzstress, osmotischen oder oxidativen Stress wird zudem zumindest teilweise auch über die Transkriptionsfaktoren HSFA1 vermittelt (Liu et al., 2011). Es scheint, dass die Funktion der RES-Oxylipine auch in einer generellen Stress-Abwehr oder Stress-Adaptation zu finden sein könnte. Hierfür müssten verschiedene Stresstoleranz-Tests durchgeführt werden. Somit könnte überprüft werden, ob die im Vorfeld mit RES-Oxylipinen behandelten Pflanzen verschiedene Stressoren besser tolerieren können oder sich schneller davon erholen können als Pflanzen, welche nicht mit RES-Oxylipinen behandelt wurden. Hitzeschockproteine als Faltungshelfer und Wächter der Protein-Homöostasis könnten wichtig sein, um die Pflanze generell vor Xenobiotika und RES zu schützen. Auch hier könnten verschiedene Toleranztests eine erste Antwort darauf liefern. Des Weiteren werden HSPs in *Arabidopsis* auch induziert, wenn die Temperatur sich ausgehend von niedrigen Werten erhöht (z.B. von 12 °C auf 27 °C) (Kumar and Wigge, 2010). Auch hier wird klar, dass die HSPs nicht nur die alleinige Funktion des Hitzeschutzes innehaben. So diskutierten schon Farmer und Mueller (2013), dass auch die RES-induzierte HSP-Akkumulation nicht immer nur als Antwort auf einen Hitzestress zu sehen ist (Farmer and Mueller, 2013).

Um die durch die Thermotoleranz-Assays mit der *dde2*-Mutante und Col-0 getroffene Annahme, dass Jasmonate nicht essentiell für eine Thermotoleranz in *A. thaliana* sind, weiter zu bestätigen, wurde der **endogene Gehalt der Jasmonate** während eines **37 °C-Hitzestresses** gemessen (siehe Abbildung 3.12). Die Arbeitsgruppe um Clarke et al. zeigte im Jahre 2009, dass JA, OPDA sowie JA-Ile in drei Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen während einer Inkubation mit 38 °C (im Dunkeln) akkumulieren (Clarke 2009). Unter unseren Versuchsbedingungen (zehn Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge, 37 °C, 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) konnte dieses Ergebnis nur teilweise bestätigt werden: Es wurde ein signifikanter Anstieg von JA nach einem zweistündigen Hitzestress von 37 °C detektiert (13fach), welcher aber im Vergleich zu Verwundung deutlich geringer ist (hier ist ein

4 Diskussion

1000facher Anstieg möglich, Vergleiche bspw. mit Glauser et al., 2008). Das RES-Oxylin OPDA akkumuliert unter unseren Versuchsbedingungen nicht: weder während Kurzzeit-Bedingungen, das heißt bis zu 8 h 37 °C, noch während Langzeit-Bedingungen, unter denen die Pflanzen bis zu 7 Tage durchgängig 37 °C ausgesetzt waren (siehe Abbildung 3.12). Allerdings haben die non-RES-Oxyline JA und MeJA, keinen Einfluss auf die Expression der Hitzeschockgene in *A. thaliana* (Taki et al., 2005; Clarke et al., 2009).

Die Beobachtung, dass JA während eines Hitzestresses akkumuliert scheint keine universelle Gültigkeit für das Pflanzenreich zu besitzen: in der Mungbohne (*Vigna radiata*), aber auch in Reis (*Oryza sativa*) konnte bisher kein Anstieg an JA durch einen Hitzestress gezeigt werden (Waqas et al., 2016; Du et al., 2013). Generell scheinen sich Produkte der Lipidperoxidation durch die Einwirkung von Hitze im Pflanzenreich unterschiedlich zu verhalten: der MDA-Gehalt in *A. thaliana* (37 °C) sowie der MDA- und HNE-Gehalt im Zimmer-Alpenveilchen (*Cyclamen persicum*) (38 °C) ändert sich durch eine moderate Hitzeeinwirkung nicht (Weber et al., 2004; Kai et al., 2012). Allerdings konnte ein Hitze-vermittelter (38 °C) Anstieg von Acrolein, MVK und (E)-2-Hexenal in *C. persicum* festgestellt werden (Kai et al., 2012).

Um eine Induktion der **Hitzeschock-Genexpression durch endogenes OPDA** zu provozieren, wurden durch Verwundung, aber auch durch osmotischen Stress, sehr hohe endogene Oxylin-Spiegel in Col-0 und *dde2* erzeugt und diese Proben anschließend auf ihre *HSP101*-Genexpression hin untersucht (siehe Abbildung 3.15 und Abbildung 3.17). Trotz hoher endogener OPDA-Spiegel (im Vergleich zu einer Hitzebehandlung) ließ sich keine Induktion der *HSP101*-Genexpression detektieren: die Jasmonat-defiziente *dde2*-Mutante, welche kein OPDA akkumulieren kann, zeigte eine Wildtyp-ähnliche, basale Expression von *HSP101*, welche sich zudem weder in WT noch in *dde2* durch Verwundung, oder durch osmotischen Stress induzieren ließ. Die exogene Behandlung mit 75 µM OPDA führt zwar zu deutlich höheren endogenen Wirkspiegeln als eine Verwundung (näherungsweise liegt hier der endogene OPDA-Gehalt bei 0,35 µM), allerdings ist zu beachten, dass dieser endogene OPDA-Spiegel nach Verwundung hoch genug ist um generell eine Genexpressionsantwort nach Verwundung zu induzieren (Stintzi et al., 2001; Taki et al., 2005). Das heißt, der endogene OPDA-Gehalt nach Verwundung ist zumindest für die Verwundungsantwort ausreichend (Stintzi et al., 2001; Taki et al., 2005). Allerdings wird durch Verwundung *HSP101* nicht induziert (Taki et al., 2005), bzw. nur sehr gering induziert (etwa 1,8fach 30 min nach Verwundung bzw. etwa 3fach 6 h nach Verwundung) (Devoto et al., 2005).

4 Diskussion

Interessanterweise konnte aber bereits vor Jahren entdeckt werden, dass die endogene Akkumulation von Jasmonsäure nicht immer zu der gleichen Genexpression führt (Seltmann et al., 2010): die exogene Applikation von JA, aber auch die endogene JA-Akkumulation, hervorgerufen durch eine Sorbitolbehandlung, führt zu einer Induktion des *VSP*-Gens (engl. *Vegetative Storage Protein*). Während der natürlichen Alterung steigt der JA-Gehalt, vergleichbar mit dem Effekt einer Sorbitolbehandlung, an. Dieser endogene JA-Gehalt allerdings führt nicht dazu, dass das *VSP*-Gen während der natürlichen Seneszenz induziert wird (Seltmann et al., 2010; Matthes et al., 2008).

Trotz starker Induktion verschiedener Hitzeschockgene durch die Applikation von OPDA und PGA_1 sind Jasmonate für eine Thermotoleranz in *A. thaliana* nicht entscheidend.

Deswegen sollte im Rahmen dieser Arbeit außerdem geklärt werden, inwieweit andere, teilweise **strukturell verschiedene, RES** eine Induktion von Hitzeschockgenen bewirken. Dies wurde mittels eines Screenings verschiedener RES-Spezies und RES-Oxylipine hinsichtlich ihrer *HSP101*-Induktion mittels eines Dot Blots untersucht. Durch die Analyse verschiedener Prostaglandine (siehe Abbildung 3.9) kann nun davon ausgegangen werden, dass eine frei zugängliche und sterisch ungehinderte α,β -ungesättigte Carbonylgruppe, wie sie bei PGA_1 zu finden ist, wichtig für die Akkumulation von *HSP101* zu sein scheint. PGB_1 weist (wie PPB_1) eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe auf, welche aber durch längere Seitenketten sterisch gehindert ist. Damit sind PGB_1 und PPB_1 nur schwach elektrophil, bzw. werden nicht als RES klassifiziert, da sie weder an freie Thiolgruppen konjugieren noch Proteine modifizieren können (Loeffler et al., 2005). PPB_1 ist dennoch in der Lage, die Expression vieler Gene in *Arabidopsis* zu induzieren. Beim Vergleich des Transkriptom mit dem von PPA_1 bzw. OPDA (Loeffler et al., 2005 vs. Mueller et al., 2008), sind einige Gemeinsamkeiten bezüglich der Detoxifizierungsgene zu finden: beide Substanzen induzieren bspw. *GST25* (At2g29420) oder *GST6* (At2g47730). Allerdings scheint PPB_1 keine Expression von Hitzeschockgenen zu induzieren (Loeffler et al., 2005 vs. Mueller et al., 2008). Da die Detoxifizierungsgene bei einer PPA_1 - bzw. OPDA-Behandlung, im Gegensatz zu den Hitzeschockgenen, über die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2,5,6 reguliert werden, kann von zwei verschiedenen Mechanismen ausgegangen werden. Beispielsweise könnte die Elektrophilie für die Induktion der Hitzeschockgene relevant sein, während die Induktoren der Detoxifizierungsgene andere (strukturelle) Eigenschaften aufweisen müssen.

Die RES-Verbindungen (E)-2-Hexenal, 2-Cyclopentenon und β -Cyclocitral induzieren wider Erwarten nicht das *HSP101*-Gen, was sich jedoch auch auf die Detektionsgrenze der

4 Diskussion

Methode oder einer falsch gewählten Konzentration (für die Behandlung) zurückführen lassen könnte. Yamauchi und Kollegen konnten im Jahre 2015 zeigen, dass die Applikation von Hexenal über die Gasphase zu einer Induktion verschiedener Hitzeschockgene, darunter *HSP101*, führt (Yamauchi et al., 2015), allerdings ist diese Methode nicht vergleichbar mit der in vorliegender Arbeit durchgeführten Methode.

Das RES und Herbizid DBMIB (kein Oxylin) führt allerdings wie erwartet zu einer Akkumulation von *HSP101* (siehe auch Jung et al., 2013) (siehe Abbildung 3.9). Auch das RES Sulforaphan, welches keine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe aufweist, ist in der Lage, die Expression der Hitzeschockgene zu induzieren. Auch hier verläuft diese Induktion über die Transkriptionsfaktoren HSF1 (siehe Abbildung 3.10). Diese HSF1-vermittelte HSR-Induktion konnte bereits für menschliche HeLa-Zellen gezeigt werden, welche ebenfalls mit Sulforaphan behandelt wurden (Gan et al., 2010). Auch andere thiol-reaktive Substanzen wie Tetramethylazodicarboxamid („Diamide“) wurden bereits positiv auf ihre Eigenschaft als Induktor verschiedener HSPs getestet (Volkov et al., 2006). Es scheint also, dass die getesteten Substanzen durch ihre elektrophile Eigenschaft und nicht alleine durch die Anwesenheit einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe ihre Wirkung vermitteln. Allerdings zeigen all diese getesteten Substanzen eine mit OPDA vergleichbare oder sogar geringere Induktionsstärke von *HSP101*. Das heißt, obwohl verschiedene RES die Genexpression von *HSP101* hoch regulieren können, ist diese Induktion um ein Vielfaches geringer als durch Hitze (höchstens 7,3 % der erreichten Induktion durch 4 h bei 37 °C) und somit sind wahrscheinlich alle getesteten RES keine ausreichenden Induktoren für die Ausbildung einer kurzzeitig erworbenen Thermotoleranz in *A. thaliana* unter den vorliegenden Bedingungen.

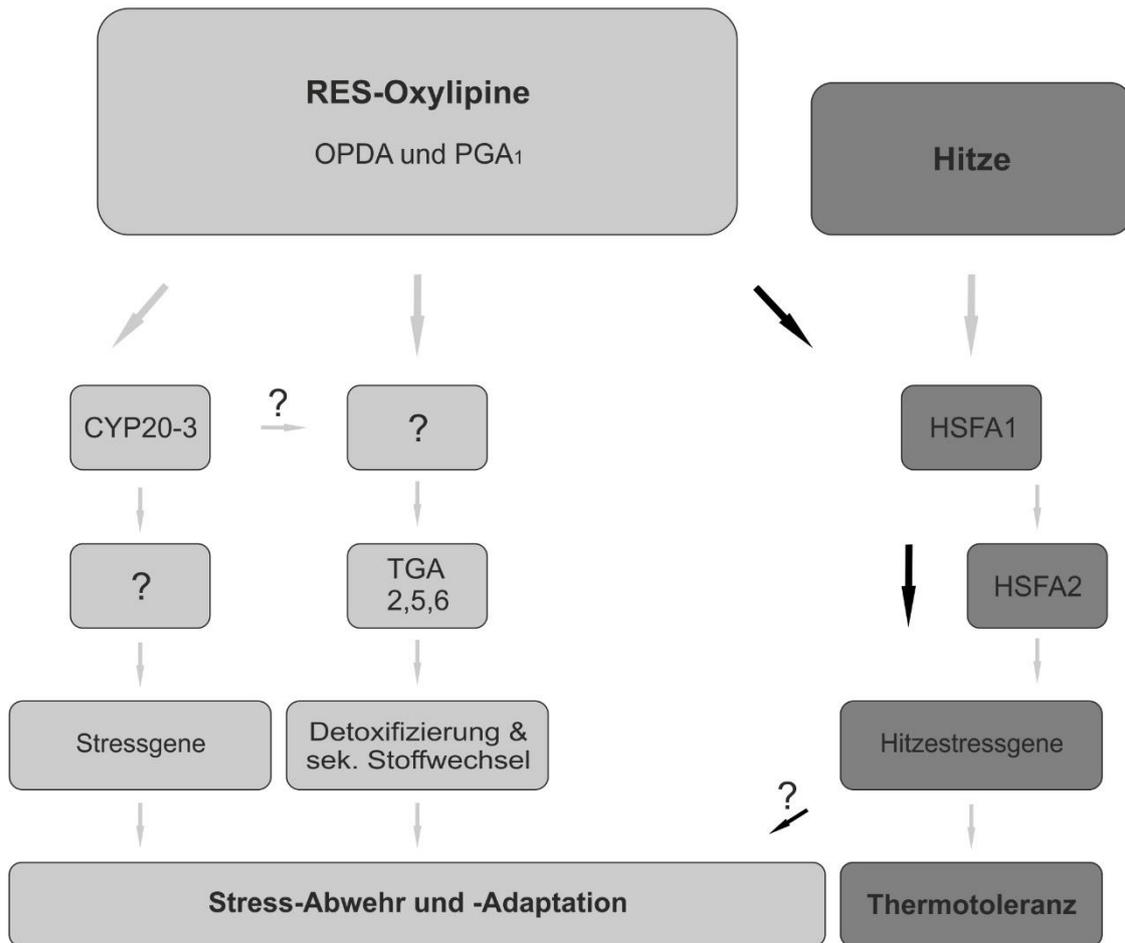


Abbildung 4.2: Vereinfachtes Modell für die RES-Oxylin-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*

Zusammenfassend ergibt sich folgendes **Modell** für die RES-Oxylin-Signaltransduktion (siehe Abbildung 4.2): RES-Oxylipine scheinen zum einen verschiedene Stressgene (z.B. *GRX480*, *CYP81D11*, *GST6*, oder *HSP17.6*) über den putativen OPDA-Rezeptor CYP20-3 zu regulieren (Park et al., 2013). Zum anderen ist die Induktion verschiedener Gene für die Detoxifizierung sowie des sekundären Stoffwechsels (z.B. *CYP81D11*, *GST6*, *OPR1/2*, *MRP1* oder *PDR12*) abhängig von den Transkriptionsfaktoren TGA2,5 und 6 (Mueller et al., 2008). Teilweise überlappen sich diese TGA2,5,6-abhängigen Gene mit denen, die durch CYP20-3 reguliert zu sein scheinen. Möglicherweise liegt hier eine Interaktion dieser zwei Signalwege vor. In der vorliegenden Arbeit konnte nun ein weiterer Signalweg für RES-Oxylipine aufgedeckt werden: über HSFA1 wird durch RES-Oxylipine wie OPDA oder PGA₁ die Induktion verschiedener Hitzestressgene vermittelt (z.B. *HSP101*, *HSP26.5* oder *HSFA2*). Es ist allerdings noch unklar, welche Funktion dieser Signalweg innehat: die gestesten RES-Oxylipine sind nicht in der Lage, eine kurzzeitig erworbene Thermotoleranz in *Arabidopsis thaliana* auszubilden. Eine mögliche Beteiligung in der generellen Stress-Abwehr und -Adaptation wäre denkbar.

5 Zusammenfassung

Oxylipine sind Signalmoleküle, die durch enzymatische Oxidation oder durch Autoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen. Sie akkumulieren während einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressen und spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr verschiedener Stressoren. In vielen physiologischen Entwicklungsprozessen sind Oxylipine ebenfalls wichtig.

Eine bisher wenig erforschte Untergruppe dieser Oxylipine bilden reaktive elektrophile Spezies, die sog. RES-Oxylipine. Hierzu gehören unter anderem der Jasmonsäure-Vorläufer 12-Oxophytodiensäure (OPDA), aber auch (E)-2-Hexenal oder Phytoprostan A₁ (PPA₁). Diese Substanzen sind aufgrund einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe elektrophil und damit chemisch reaktiv. Diese Reaktivität wird als Grund für ihre biologische Aktivität angesehen: RES-Oxylipine sind Induktoren einer Reihe von Genen. Allerdings ist bisher wenig über den Signalweg sowie die Funktionen der RES-Oxylipine in *Arabidopsis thaliana* bekannt.

Fast die Hälfte (40 %) aller durch OPDA-induzierten Gene in *A. thaliana* sind abhängig von TGA-Transkriptionsfaktoren, jedoch werden OPDA-responsive Hitzeschockgene (z.B. Hitzeschockproteine) unabhängig von TGA-Transkriptionsfaktoren induziert. Außerdem gibt es Hinweise auf eine Akkumulation des RES-Oxylipins OPDA, aber auch des non-RES-Oxylipins Jasmonsäure (JA) durch eine Behandlung mit 38° C in *A. thaliana*. Eine exogene Applikation von JA bewirkt jedoch, im Gegensatz zu OPDA, keine Genexpression von Hitzeschockgenen in *Arabidopsis*.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der RES-Oxylipine OPDA und Prostaglandin A₁ (PGA₁, ein Analogon zu PPA₁) während der Hitzeschockantwort in *Arabidopsis thaliana*, sowie die TGA-unabhängige Signaltransduktion der Hitzeschockgene, aufzuklären.

Durch einen Vergleich zweier bereits veröffentlichter Transkriptomdaten *in silico* konnte die Überschneidung des Hitze-induzierten- (1 h, 37 °C) und des OPDA-induzierten-Transkriptoms (4 h, 75 μ M) genau analysiert werden. Es werden 30 Gene sowohl von OPDA als auch durch 37 °C mehr als dreifach hochreguliert. Dieses Ergebnis konnte durch realtime qPCR vier repräsentativer Gene (*HSP101*, *HSP26.5*, *DREB2A*, *HSFA2*) bestätigt werden. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke und Kinetik der Induktion: Hitze (37 °C) hat einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Hochregulation der Genexpression als die getesteten RES-Oxylipine OPDA und PGA₁ (unter 10 % der Induktion durch 37 °C, Ausnahme *DREB2A*). Zudem resultiert eine Hitzebehandlung in

5 Zusammenfassung

einer schnellen und transienten Genexpression, das Maximum ist nach 1 bis 2 h erreicht während die Addition von RES-Oxylipinen eine langsamere Induktion der Genexpression bewirkt (Maximum nach 4 bis 6 h).

Eine Genexpressionsanalyse mit verschiedenen Signaltransduktionsmutanten half bei der Aufklärung möglicher Signaltransduktionskomponenten der RES-Oxylipine. So konnte gezeigt werden, dass der putative OPDA-Rezeptor Cyclophilin 20-3 sowie sein Interaktionspartner, das Protein Serin-Acetyltransferase 1, keine Bedeutung in der Regulation von Hitzeschockgenen durch RES-Oxylipine haben. Die Hitze-Masterregulatoren HSFA1 a,b,d (und e) jedoch sind für die Induktion der Hitzeschockgene *HSP101*, *HSP26.5* und *HSFA2* durch RES-Oxylipine essentiell und für *DREB2A* zumindest teilweise notwendig. Dennoch spielt der durch Hitze induzierbare Transkriptionsfaktor HSFA2 in der Signaltransduktion von RES-Oxylipinen (bezüglich der Hitzeschockgeninduktion) keine Rolle.

Durch ein Screening strukturell verschiedener RES hinsichtlich ihrer Induktion von *HSP101* konnte geklärt werden, dass nicht die Anwesenheit einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe, sondern vielmehr die Eigenschaft der Elektrophilie für die Induktion des *HSP101* verantwortlich ist. Auch das RES Sulforaphan vermittelt, wie die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 , die Induktion der Hitzeschockgene über die HSFA1-Transkriptionsfaktoren.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Quantifizierung der endogenen Oxylipine in zehn Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen nach einer Hitzebehandlung unter Kurztag-Lichtbedingungen. Weder während eines kurzzeitigen Hitzestresses (bis zu 8 h) noch während einer längerfristigen Hitzebehandlung (bis zu 7 Tage) steigt der Gehalt des RES-Oxylipins OPDA signifikant an. Das non-RES-Oxylipin Jasmonsäure hingegen akkumuliert transient (Maximum 2 h nach Beginn eines Hitzestresses) und signifikant, allerdings ist dieser Anstieg in seiner Stärke (13fach) nicht vergleichbar mit einer Akkumulation beispielsweise nach Verwundung (hier ist ein 1000facher Anstieg möglich). In weiteren Experimenten wurde eine mögliche Korrelation der endogenen Oxylipin-Akkumulation (verursacht durch Verwundung oder osmotischen Stress) mit der Genexpression von Hitzeschockgenen untersucht. Trotz erhöhten endogenen Gehalts der Oxylipine OPDA und JA in Col-0 zeigt sich in der *HSP101*-Genexpression kein Unterschied zur *dde2*-Mutante, welche keine Jasmonate aufweist. Außerdem sind keine Unterschiede in der *HSP101*-Expression nach 1 h bei 37 °C zwischen Col-0 und der JA-defizienten *opr3*-Mutante bzw. der JA- und OPDA-defizienten *dde2*-Mutante zu beobachten.

5 Zusammenfassung

Zur Aufklärung der Frage, ob RES-Oxylipine durch ihre Induktion von Hitzeschockgenen eine chemisch induzierte Thermotoleranz vermitteln, wurde die Akklimatisierungsphase, in der Hitzeschockgene durch moderate Hitze (37 °C) induziert werden, durch die Behandlung mit RES-Oxylipinen oder HSP90-Inhibitoren ersetzt. Jedoch führte keine der exogen zugegebenen Substanzen zu einer Thermotoleranz der getesteten Keimlinge. Zur weiteren Bestätigung der Annahme, dass die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 bzw. die Jasmonate keine Rolle in der Thermotoleranz von *Arabidopsis thaliana* spielen, wurde eine funktionelle Untersuchung verschiedener Thermotoleranz-Assays mit der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante sowie des Wildtypes durchgeführt. Auch hier sind keine Unterschiede zu beobachten: In keiner der durchgeführten Thermotoleranz-Assays konnte eine (im Vergleich mit dem Wildtyp) verringerte erworbene Thermotoleranz der Jasmonat-defizienten *dde2*-Mutante gezeigt werden.

Mittels dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RES-Oxylipine OPDA und PGA_1 keine biologische Relevanz in der Ausbildung der Thermotoleranz von *Arabidopsis thaliana* haben, trotz einer sehr starken Induktion von Hitzeschockgenen, welche dennoch viel geringer ist als die Hitze-vermittelte Genexpression der Hitzeschockgene. Da Hitzeschockproteine auch durch viele andere Stressoren wie oxidativem Stress oder Schwermetall-Stress induziert werden, könnte die biologische Relevanz der RES-Oxylipin-vermittelten Induktion der Hitzeschockgene hier zu finden sein. Des Weiteren ist auch der Mechanismus der RES-Oxylipin-vermittelten Signaltransduktion noch nicht aufgeklärt worden.

6 Summary

Oxylipins are important signalling molecules, which are typically produced during a variety of biotic and abiotic stresses. Oxylipins are generated by oxygenation of polyunsaturated fatty acids. This oxygenation can be catalysed by enzymes or non-enzymatically by ROS. In general, Oxylipins are important in defence processes against various stresses and play an important role in plant development.

A subgroup of Oxylipins are reactive electrophile species, termed RES-Oxylipins. For instance, the jasmonic acid precursor 12-oxyphytodienoic acid (OPDA), (E)-2-hexenal or Phytprostane A₁ (PPA₁) are RES-Oxylipins. They are characterized by the presence of an α,β -unsaturated carbonyl group, which is responsible for their reactivity and biological activity. But until now, little is known about the signalling pathways and the functions of this RES-Oxylipins in *Arabidopsis thaliana*.

Almost half of all (40 %) OPDA-induced genes in *A. thaliana* are dependent on TGA transcription factors. However, the OPDA-induced heat shock genes are not dependent on TGA transcription factors. Furthermore, it has been published that the RES-Oxylipin OPDA and also the non-RES-Oxylipin jasmonic acid (JA) accumulate during heat (38 °C). Admittedly, the exogenous application of jasmonic acid on *Arabidopsis* does not lead to the induction of heat shock genes.

Aim of this work was to study the *in vivo* relevance of the RES-Oxylipins OPDA and Prostaglandine A₁ (PGA₁, an analogue of PPA₁) in the heat response of *Arabidopsis thaliana*. Additionally, the signal transduction components, which are required for induction of heat-responsive genes by RES-Oxylipins, should also be clarified.

When comparing heat- and ODA-induced transcriptome data *in silico* (1 h, 37 °C vs. 4 h, 75 μ M OPDA), 30 genes were found to be strongly (more than 3fold) upregulated by both, moderate heat and OPDA. Performing real time PCR analysis of four representative genes (*HSP101*, *HSP26.5*, *DREB2A*, *HSFA2*) confirms this result. However, there is a great difference between the strength and the kinetic of the induction by OPDA or heat, respectively. Moderate heat (37 °C) induces the gene expression much stronger and faster than OPDA or PGA₁ (induction by RES-Oxylipins is under 10 % of the induction by heat, except *DREB2A*).

Gene expression analysis with different signal transduction mutants were important to reveal the (TGA-independent) signalling pathway of RES-Oxylipins. The putative OPDA-receptor Cyclophilin 20-3 and its interacting protein, the serin acetyltransferase 1 are not required for

6 Summary

the upregulation of heat shock genes by RES-Oxylipins. But the results also clearly indicate that the master regulators of heat shock, HSFA1 a,b,d (and e), are essential for induction of *HSP101*, *HSP26.5* and *HSFA2* by RES-Oxylipins and at least partial necessary for the induction of *DREB2A*. The heat-inducible transcription factor HSFA2 plays no role in the signalling pathway of RES-Oxylipins (inducing heat shock genes).

A screening of structural different RES could show, that the electrophilic property itself and not the presence of an α,β -unsaturated carbonyl group is important for the induction of *HSP101*. The RES Sulforaphane induces the heat shock genes via the HSFA1 transcription factors, like the RES-Oxylipins OPDA and PGA_1 .

The quantification of endogenous oxylipins in 10 day old *Arabidopsis* seedlings during heat (under light) was another part of this work. Seedlings did not accumulate OPDA in the response to heat, neither during a short-term (up to 8 h) nor a long-term (up to 7 days) heat stress. In the case of JA, a transient and significant increase could be detected. In comparison to an accumulation of JA after wounding (a 1000fold increase is possible), the increase (13fold) caused by heat treatment is very weak.

A possible correlation between the endogenous Oxylipin accumulation (due to wounding or osmotic stress) and the induction of heat shock genes was analysed. There is no difference in the induction of *HSP101* during heat between the wild type Col-0, which shows high levels of oxylipins, and the JA- and OPDA-deficient *dde2*-mutant, which contains no oxylipins. Furthermore, the induction of *HSP101* during heat (1 h, 37 °C) shows no difference between the Col-0 and the JA-deficient *opr3*-mutant and the JA- and OPDA-deficient *dde2*-mutant, respectively.

To examine the possibility of RES-Oxylipins to confer a chemical induced thermotolerance in *Arabidopsis*, a thermotolerance survival assay was performed. The acclimation phase (37 °C) with the induction of heat shock genes was substituted by treatment with RES-Oxylipins or HSP90-inhibitors. None of these treatments with RES led to an induced thermotolerance.

To further confirm the assumption, that the RES-Oxylipins OPDA and PGA_1 and the jasmonates, respectively, play no role in the thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*, a functional approach with different thermotolerance assays was performed. These thermotolerance assays were performed with the jasmonat-deficient *dde2*-mutant and the wild type Col-0. Here again, there are no differences between the two genotypes: there is no reduced acquired thermotolerance in the jasmonat-deficient *dde2*-mutant in all tested thermotolerance assays.

6 Summary

To sum up, the RES-Oxylipins OPDA and PGA_1 show no biological relevance in the thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. However, they are responsible for a strong induction of heat shock genes, although this intensity is not comparable with the strength due to heat treatment. Since heat shock proteins not only accumulate after heat exposure, this RES-Oxylipin induced heat shock gene induction may be important in another stress or in general stress adaption responses. Furthermore, until now, the mechanism of the signalling pathway could not be enlightened.

7 Literaturverzeichnis

- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *Arabidopsis Book* **8**: e0129
- Almeras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mene-Saffrane L, Farmer EE** (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**: 205-216
- Amici C, Sistonen L, Santoro MG, Morimoto RI** (1992) Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6227-6231
- Amin J, Ananthan J, Voellmy R** (1988) Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* **8**: 3761-3769
- Andersson MX, Nilsson AK, Johansson ON, Boztas G, Adolfsson LE, Pinosa F, Petit CG, Aronsson H, Mackey D, Tor M, Hamberg M, Ellerstrom M** (2015) Involvement of the electrophilic isothiocyanate sulforaphane in *Arabidopsis* local defense responses. *Plant Physiol* **167**: 251-261
- Ayers PW, Parr RG, Pearson RG** (2006) Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. *J Chem Phys* **124**: 194107
- Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf KD, Tripp J, Weber C, Zielinski D, von Koskull-Doring P** (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci* **29**: 471-487
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 1471-1483
- Bate NJ, Rothstein SJ** (1998) C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J* **16**: 561-569
- Blair IA** (2008) DNA adducts with lipid peroxidation products. *J Biol Chem* **283**: 15545-15549
- Blee E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33-72
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-322
- Bokszczanin KL, Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network C, Fragkostefanakis S** (2013) Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Front Plant Sci* **4**: 315
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorkach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brodhun F, Feussner I** (2011) Oxylipins in fungi. *FEBS J* **278**: 1047-1063
- Busch W, Wunderlich M, Schoffl F** (2005) Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **41**: 1-14
- Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Ickes BR, Petersen DR** (2005) Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 8-15
- Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Sampey BP, Petersen DR** (2004) Inhibition of Hsp72-mediated protein refolding by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **17**: 1459-1467
- Chan K, Poon R, O'Brien PJ** (2008) Application of structure-activity relationships to investigate the molecular mechanisms of hepatocyte toxicity and electrophilic reactivity of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *J Appl Toxicol* **28**: 1027-1039

- Chang CC, Huang PS, Lin HR, Lu CH** (2007) Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using Hsp101 as a selection marker for transformation. *Plant Cell Physiol* **48**: 1098-1107
- Chang YY, Liu HC, Liu NY, Chi WT, Wang CN, Chang SH, Wang TT** (2007) A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 251-262
- Che P, Bussell JD, Zhou W, Estavillo GM, Pogson BJ, Smith SM** (2010) Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis. *Sci Signal* **3**: ra69
- Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJ, Wasternack C, Mur LA** (2009) Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* **182**: 175-187
- Clarke SM, Mur LA, Wood JE, Scott IM** (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **38**: 432-447
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA** (1996) Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Plant Physiol* **111**: 797-803
- Cooper CE, Patel RP, Brookes PS, Darley-USmar VM** (2002) Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci* **27**: 489-492
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* **9**: 1211-1223
- Dafny-Yelin M, Tzfira T, Vainstein A, Adam Z** (2008) Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **67**: 363-373
- Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH** (2011) Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7247-7252
- Dennis EA, Norris PC** (2015) Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**: 511-523
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T, Turner JG** (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**: 497-513
- Dickinson DA, Darley-USmar VM, Landar A** (2006) The Covalent Advantage: A New Paradigm for Cell Signaling Mediated by Thiol Reactive Lipid Oxidation Products. *In Redox Proteomics*. John Wiley & Sons, Inc., pp 343-367
- Doorn JA, Petersen DR** (2002) Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **15**: 1445-1450
- Driedonks N, Xu J, Peters JL, Park S, Rieu I** (2015) Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Front Plant Sci* **6**: 999
- Du H, Liu H, Xiong L** (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front Plant Sci* **4**: 397
- Duan H, Huang MY, Palacio K, Schuler MA** (2005) Variations in CYP74B2 (hydroperoxide lyase) gene expression differentially affect hexenal signaling in the Columbia and Landsberg erecta ecotypes of Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 1529-1544

- Dueckershoff K, Mueller S, Mueller MJ, Reinders J** (2008) Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 1975-1985
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG** (2002) The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**: 1557-1566
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR** (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* **4**: 17
- Falletti O, Douki T** (2008) Low glutathione level favors formation of DNA adducts to 4-hydroxy-2(E)-nonenal, a major lipid peroxidation product. *Chem Res Toxicol* **21**: 2097-2105
- Farmer EE, Davoine C** (2007) Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 380-386
- Farmer EE, Mueller MJ** (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 429-450
- Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R** (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715
- Feussner I, Kuhn H, Wasternack C** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**: 268-273
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297
- Finka A, Cuendet AF, Maathuis FJ, Saidi Y, Goloubinoff P** (2012) Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *Plant Cell* **24**: 3333-3348
- Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P** (2011) Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress Chaperones* **16**: 15-31
- Fischer BB, Ledford HK, Wakao S, Huang SG, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Koller A, Eggen RI, Niyogi KK** (2012) SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1302-1311
- Flescher E** (2007) Jasmonates in cancer therapy. *Cancer Lett* **245**: 1-10
- Galliard T, Phillips DR** (1972) The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem J* **129**: 743-753
- Gan N, Wu YC, Brunet M, Garrido C, Chung FL, Dai C, Mi L** (2010) Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27. *J Biol Chem* **285**: 35528-35536
- Gerwick WH** (1993) Carbocyclic oxylipins of marine origin. *Chemical Reviews* **93**: 1807-1823
- Gfeller A, Dubugnon L, Liechti R, Farmer EE** (2010) Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* **3**: cm3
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender JL** (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J Biol Chem* **283**: 16400-16407

- Gong M, van der Luit AH, Knight MR, Trewavas AJ** (1998) Heat-Shock-Induced Changes in Intracellular Ca²⁺ Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance. *Plant Physiol.* 1998 Jan;116(1):429-37.
- Grechkin AN, Hamberg M** (2004) The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta* **1636**: 47-58
- Guo Y, Guettouche T, Fenna M, Boellmann F, Pratt WB, Toft DO, Smith DF, Voellmy R** (2001) Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem* **276**: 45791-45799
- Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD** (2011) Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell* **23**: 741-755
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ, Castresana C** (2005) Alpha-dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 169-174
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C** (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503-24513
- Hamilton Iii EW, Coleman JS** (2001) Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *Am J Bot* **88**: 950-955
- Harizi H, Corcuff JB, Gualde N** (2008) Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* **14**: 461-469
- Haslbeck M, Vierling E** (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* **427**: 1537-1548
- Haynes RL, Szveda L, Pickin K, Welker ME, Townsend AJ** (2000) Structure-activity relationships for growth inhibition and induction of apoptosis by 4-hydroxy-2-nonenal in raw 264.7 cells. *Mol Pharmacol* **58**: 788-794
- Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-USmar VM** (2012) Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J* **442**: 453-464
- Hong SW, Lee U, Vierling E** (2003) Arabidopsis hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Physiol* **132**: 757-767
- Hong SW, Vierling E** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4392-4397
- Hong SW, Vierling E** (2001) Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J* **27**: 25-35
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY** (2001) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res* **29**: 102-105
- Hubert DA, He Y, McNulty BC, Tornero P, Dangl JL** (2009) Specific Arabidopsis HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9556-9563
- Iba K** (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 225-245
- Imbusch R, Mueller MJ** (2000) Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F(1) (phytoprostanes F(1)) in plants. *Plant Physiol* **124**: 1293-1304
- Imbusch R, Mueller MJ** (2000) Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radic Biol Med* **28**: 720-726

- Itoh A, Howe GA** (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J Biol Chem* **276**: 3620-3627
- Jacobs AT, Marnett LJ** (2010) Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Acc Chem Res* **43**: 673-683
- Jung HS, Crisp PA, Estavillo GM, Cole B, Hong F, Mockler TC, Pogson BJ, Chory J** (2013) Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 14474-14479
- Jung YJ, Melencion SM, Lee ES, Park JH, Alinapon CV, Oh HT, Yun DJ, Chi YH, Lee SY** (2015) Universal Stress Protein Exhibits a Redox-Dependent Chaperone Function in *Arabidopsis* and Enhances Plant Tolerance to Heat Shock and Oxidative Stress. *Front Plant Sci* **6**: 1141
- Kai H, Hirashima K, Matsuda O, Ikegami H, Winkelmann T, Nakahara T, Iba K** (2012) Thermotolerant cyclamen with reduced acrolein and methyl vinyl ketone. *J Exp Bot* **63**: 4143-4150
- Kandzia R, Stumpe M, Berndt E, Szalata M, Matsui K, Feussner I** (2003) On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **160**: 803-809
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL** (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**: 4159-4168
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A** (2003) Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Mol Biol* **51**: 677-686
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 22-31
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266
- Kim BH, Schoffl F** (2002) Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *J Exp Bot* **53**: 371-375
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J** (2005) Volatile C6-aldehydes and Allicin activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 1093-1102
- Konigshofer H, Tromballa HW, Loppert HG** (2008) Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant Cell Environ* **31**: 1771-1780
- Koster J, Thurow C, Kruse K, Meier A, Iven T, Feussner I, Gatz C** (2012) Xenobiotic- and jasmonic acid-inducible signal transduction pathways have become interdependent at the *Arabidopsis* CYP81D11 promoter. *Plant Physiol* **159**: 391-402
- Kramell R, Miersch O, Hause B, Ortel B, Parthier B, Wasternack C** (1997) Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett* **414**: 197-202
- Kumar SV, Wigge PA** (2010) H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**: 136-147
- Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, Lanks KW** (1984) Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol* **4**: 2802-2810
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E** (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* **138**: 882-897

- Larkindale J, Huang B** (2005) Effects of Abscisic Acid, Salicylic Acid, Ethylene and Hydrogen Peroxide in Thermotolerance and Recovery for Creeping Bentgrass. *Plant Growth Regulation* **47**: 17-28
- Larkindale J, Knight MR** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* **128**: 682-695
- Larkindale J, Mishkind M, Vierling E** (2007) Plant Responses to High Temperature. *In* *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing Ltd, pp 100-144
- Larkindale J, Vierling E** (2008) Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol* **146**: 748-761
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Hollander-Czytko H, Weiler EW** (1996) Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* **31**: 323-335
- Lee JH, Hubel A, Schoffl F** (1995) Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant J* **8**: 603-612
- Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM** (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**: 373-382
- Li L, Hamilton RF, Jr., Kirichenko A, Holian A** (1996) 4-Hydroxynonenal-induced cell death in murine alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **139**: 135-143
- Li Y, Karagoz GE, Seo YH, Zhang T, Jiang Y, Yu Y, Duarte AM, Schwartz SJ, Boelens R, Carroll K, Rudiger SG, Sun D** (2012) Sulforaphane inhibits pancreatic cancer through disrupting Hsp90-p50(Cdc37) complex and direct interactions with amino acids residues of Hsp90. *J Nutr Biochem* **23**: 1617-1626
- Lin BL, Wang JS, Liu HC, Chen RW, Meyer Y, Barakat A, Delseny M** (2001) Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* **6**: 201-208
- Lin D, Lee HG, Liu Q, Perry G, Smith MA, Sayre LM** (2005) 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **18**: 1219-1231
- Liu HC, Charng YY** (2012) Acquired thermotolerance independent of heat shock factor A1 (HsfA1), the master regulator of the heat stress response. *Plant Signal Behav* **7**: 547-550
- Liu HC, Liao HT, Charng YY** (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **34**: 738-751
- Liu HT, Gao F, Cui SJ, Han JL, Sun DY, Zhou RG** (2006) Primary evidence for involvement of IP3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Cell Res* **16**: 394-400
- Liu HT, Gao F, Li GL, Han JL, Liu DL, Sun DY, Zhou RG** (2008) The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **55**: 760-773
- Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, Qi X** (2013) An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiol* **162**: 512-521
- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ** (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* **137**: 328-340

- Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schoffl F** (2004) Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **271**: 11-21
- Lorenzo O, Solano R** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 532-540
- Mano J** (2012) Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiol Biochem* **59**: 90-97
- Massie MR, Lapoczka EM, Boggs KD, Stine KE, White GE** (2003) Exposure to the metabolic inhibitor sodium azide induces stress protein expression and thermotolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress Chaperones* **8**: 1-7
- Masuda S, Tokaji Y, Kobayashi Y, Ohta H** (2014) Mechanisms of induction of the stress-responsive transcription factors HsfA2 and DREB2A by 12-oxo-phytodienoic acid in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**: 647-650
- Mathur S, Agrawal D, Jajoo A** (2014) Photosynthesis: response to high temperature stress. *J Photochem Photobiol B* **137**: 116-126
- Matsui K, Wilkinson J, Hiatt B, Knauf V, Kajiwara T** (1999) Molecular cloning and expression of Arabidopsis fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Cell Physiol* **40**: 477-481
- Matthes MC, Pickett JA, Napier JA** (2008) Natural variation in responsiveness of Arabidopsis thaliana to methyl jasmonate is developmentally regulated. *Planta* **228**: 1021-1028
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* **2**: ra45
- Mirabella R, Rauwerda H, Struys EA, Jakobs C, Triantaphylides C, Haring MA, Schuurink RC** (2008) The Arabidopsis her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. *Plant J* **53**: 197-213
- Mittler R, Finka A, Goloubinoff P** (2012) How do plants feel the heat? *Trends Biochem Sci* **37**: 118-125
- Mollapour M, Neckers L** (2012) Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 648-655
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd** (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9383-9387
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**: 511-517
- Mueller MJ** (1998) Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem Biol* **5**: R323-333
- Mueller MJ** (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 441-448
- Mueller MJ, Berger S** (2009) Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* **70**: 1511-1521
- Mueller MJ, Mene-Saffrane L, Grun C, Karg K, Farmer EE** (2006) Oxylipin analysis methods. *Plant J* **45**: 472-489
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768-785

- Mueller SP, Krause DM, Mueller MJ, Fekete A** (2015) Accumulation of extra-chloroplastic triacylglycerols in Arabidopsis seedlings during heat acclimation. *J Exp Bot* **66**: 4517-4526
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Neumann D, Lichtenberger O, Günther D, Tschiersch K, Nover L** (1994) Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* **194**: 360-367
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* **147**: 1251-1263
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S** (2006) Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* **48**: 535-547
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JF** (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem* **2**: 494-504
- Nover L, Scharf KD** (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **53**: 80-103
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T** (2007) High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* **58**: 3373-3383
- Panchuk, II, Volkov RA, Schoffl F** (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 838-853
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schoffl F** (2004) Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 3148-3158
- Parchmann S, Gundlach H, Mueller MJ** (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* **115**: 1057-1064
- Parchmann S, Mueller MJ** (1998) Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants. *J Biol Chem* **273**: 32650-32655
- Park SW, Li W, Viehhauser A, He B, Kim S, Nilsson AK, Andersson MX, Kittle JD, Ambavaram MM, Luan S, Esker AR, Tholl D, Cimini D, Ellerstrom M, Coaker G, Mitchell TK, Pereira A, Dietz KJ, Lawrence CB** (2013) Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9559-9564
- Parsell DA, Lindquist S** (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496
- Parsell DA, Lindquist S** (1994) 18 Heat Shock Proteins and Stress Tolerance,
- Pearson RG** (1963) Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 3533-3539
- Perluigi M, Fai Poon H, Hensley K, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, De Marco C, Butterfield DA** (2005) Proteomic analysis of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice--a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **38**: 960-968
- Petersen DR, Doorn JA** (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* **37**: 937-945
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pohl CH, Kock JL** (2014) Oxidized fatty acids as inter-kingdom signaling molecules. *Molecules* **19**: 1273-1285

- Ponce de Leon I, Hamberg M, Castresana C** (2015) Oxylipins in moss development and defense. *Front Plant Sci* **6**: 483
- Pratico D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA** (2001) The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* **12**: 243-247
- Pratt WB, Toft DO** (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**: 306-360
- Pre M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147**: 1347-1357
- Priya S, Sharma SK, Goloubinoff P** (2013) Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Lett* **587**: 1981-1987
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerre-Tugaye MT, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J** (2005) Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol* **139**: 1902-1913
- Pucciariello C, Banti V, Perata P** (2012) ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol Biochem* **59**: 3-10
- Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, Lazarus CM** (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* **22**: 739-745
- Qian J, Chen J, Liu YF, Yang LL, Li WP, Zhang LM** (2014) Overexpression of Arabidopsis HsfA1a enhances diverse stress tolerance by promoting stress-induced Hsp expression. *Genet Mol Res* **13**: 1233-1243
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S** (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 479-492
- Rentel MC, Knight MR** (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**: 1471-1479
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 707-720
- Roberts LJ, 2nd, Morrow JD** (2002) Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* **59**: 808-820
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH** (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* **42**: 260-266
- Rossi A, Elia G, Santoro MG** (1996) 2-Cyclopenten-1-one, a new inducer of heat shock protein 70 with antiviral activity. *J Biol Chem* **271**: 32192-32196
- Routaboul JM, Skidmore C, Wallis JG, Browse J** (2012) Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids. *J Exp Bot* **63**: 1435-1443
- Saidi Y, Finka A, Goloubinoff P** (2011) Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol* **190**: 556-565
- Saidi Y, Finka A, Muriset M, Bromberg Z, Weiss YG, Maathuis FJ, Goloubinoff P** (2009) The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell* **21**: 2829-2843
- Saidi Y, Peter M, Finka A, Cicekli C, Vigh L, Goloubinoff P** (2010) Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca(2+)-dependent heat shock response. *Plant Signal Behav* **5**: 1530-1533
- Sangwan V, Dhindsa RS** (2002) In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant map kinases. *FEBS Lett* **531**: 561-564

- Santagata S, Xu YM, Wijeratne EM, Kontnik R, Rooney C, Perley CC, Kwon H, Clardy J, Kesari S, Whitesell L, Lindquist S, Gunatilaka AA** (2012) Using the heat-shock response to discover anticancer compounds that target protein homeostasis. *ACS Chem Biol* **7**: 340-349
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L** (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 104-119
- Schoffl F, Prandl R, Reindl A** (1998) Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol* **117**: 1135-1141
- Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, Ganguli A, English G, Vierling E, von Koskull-Doring P** (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J* **53**: 264-274
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1940-1950
- Sharma M, Laxmi A** (2015) Jasmonates: Emerging Players in Controlling Temperature Stress Tolerance. *Front Plant Sci* **6**: 1129
- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Matsui K, Takabayashi J** (2006) Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16672-16676
- Snyman M, Cronje MJ** (2008) Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *J Exp Bot* **59**: 2125-2132
- Stamatakis K, Pérez-Sala D** (2006) Prostanoids with Cyclopentenone Structure as Tools for the Characterization of Electrophilic Lipid-Protein Interactomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1091**: 548-570
- Stanley D** (2006) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu Rev Entomol* **51**: 25-44
- Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6837-6840
- Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP** (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**: 239-250
- Stingl N, Krischke M, Fekete A, Mueller MJ** (2013) Analysis of Defense Signals in Arabidopsis thaliana Leaves by Ultra-performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Jasmonates, Salicylic Acid, Abscisic Acid. *In* T Munnik, I Heilmann, eds, *Plant Lipid Signaling Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 103-113
- Stintzi A, Browse J** (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10625-10630
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12837-12842
- Straus DS, Glass CK** (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**: 185-210
- Stumpe M, Gobel C, Demchenko K, Hoffmann M, Klosgen RB, Pawlowski K, Feussner I** (2006) Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation

- of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J* **47**: 883-896
- Su PH, Li HM** (2008) Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol* **146**: 1231-1241
- Sugio A, Dreos R, Aparicio F, Maule AJ** (2009) The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 642-654
- Suri SS, Dhindsa RS** (2008) A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. *Plant Cell Environ* **31**: 218-226
- Swiatek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inze D, Van Onckelen H** (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **128**: 201-211
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H** (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 1268-1283
- Thoma I, Krischke M, Loeffler C, Mueller MJ** (2004) The isoprostanoid pathway in plants. *Chem Phys Lipids* **128**: 135-148
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ** (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* **34**: 363-375
- Tokoroyama T** (2010) Discovery of the Michael Reaction. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**: 2009-2016
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD** (1998) Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**: 365-370
- Trombetta D, Saija A, Bisignano G, Arena S, Caruso S, Mazzanti G, Uccella N, Castelli F** (2002) Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Lett Appl Microbiol* **35**: 285-290
- Trott A, West JD, Klaic L, Westerheide SD, Silverman RB, Morimoto RI, Morano KA** (2008) Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. *Mol Biol Cell* **19**: 1104-1112
- ul Hassan MN, Zainal Z, Ismail I** (2015) Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J* **13**: 727-739
- Valgimigli L, Iori R** (2009) Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environ Mol Mutagen* **50**: 222-237
- Vellosillo T, Martinez M, Lopez MA, Vicente J, Cascon T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846
- Vierling E** (1991) The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620
- Vila A, Tallman KA, Jacobs AT, Liebler DC, Porter NA, Marnett LJ** (2008) Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chem Res Toxicol* **21**: 432-444

- Volkov RA, Panchuk, II, Mullineaux PM, Schoffl F** (2006) Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **61**: 733-746
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chetelat A, Farmer EE** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J* **24**: 467-476
- 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
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR** (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 199-223
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**: 244-252
- Wang Y, Gibney PA, West JD, Morano KA** (2012) The yeast Hsp70 Ssa1 is a sensor for activation of the heat shock response by thiol-reactive compounds. *Mol Biol Cell* **23**: 3290-3298
- Waqas M, Shahzad R, Khan AL, Asaf S, Kim YH, Kang SM, Bilal S, Hamayun M, Lee IJ** (2016) Salvaging effect of triacontanol on plant growth, thermotolerance, macronutrient content, amino acid concentration and modulation of defense hormonal levels under heat stress. *Plant Physiol Biochem* **99**: 118-125
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Wasternack C, Hause B** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* **111**: 1021-1058
- Waters ER** (2013) The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J Exp Bot* **64**: 391-403
- Weber H, Chetelat A, Reymond P, Farmer EE** (2004) Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde. *Plant J* **37**: 877-888
- Weber H, Vick BA, Farmer EE** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10473-10478
- West JD, Marnett LJ** (2005) Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **18**: 1642-1653
- West JD, Marnett LJ** (2006) Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol* **19**: 173-194
- Winger AM, Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH** (2007) The Cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria. *J Biol Chem* **282**: 37436-37447
- Wise RR, Olson AJ, Schrader SM, Sharkey TD** (2004) Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell & Environment* **27**: 717-724
- Wu C** (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-469
- Yamada K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I, Nishimura M** (2007) Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **282**: 37794-37804
- Yamauchi Y, Furutera A, Seki K, Toyoda Y, Tanaka K, Sugimoto Y** (2008) Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiol Biochem* **46**: 786-793

- Yamauchi Y, Kunishima M, Mizutani M, Sugimoto Y** (2015) Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Sci Rep* **5**: 8030
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D** (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**: 2220-2236
- Yeh CH, Kaplinsky NJ, Hu C, Charng Y** (2012) Some Like It Hot, Some Like It Warm: Phenotyping to Explore Thermotolerance Diversity. *Plant Sci* **195**: 10-23
- Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim JM, Seki M, Todaka D, Osakabe Y, Sakuma Y, Schoffl F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol Genet Genomics* **286**: 321-332
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU** (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* **154**: 267-273
- Zhang W, Zhou RG, Gao YJ, Zheng SZ, Xu P, Zhang SQ, Sun DY** (2009) Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 1773-1784
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R** (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**: 471-480

8 Anhang

Tabelle 8.1: Beschreibungen und Funktionen der 30 durch OPDA und Hitze induzierbaren Gene (siehe auch Abschnitt 3.1.1). Diese Information wurden mit Hilfe der Datenbank „The Arabidopsis Information Resource (TAIR)“ auf www.arabidopsis.org am 2.3.2016 gefunden (Huala et al., 2001).

	ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
1	AT3G46230	Member of the class I small heat-shock protein (sHSP) family, which accounts for the majority of sHSPs in maturing seeds	protein binding
2	AT5G12030	Encodes a cytosolic small heat shock protein with chaperone activity that is induced by heat and osmotic stress and is also expressed late in seed development	unfolded protein binding
3	AT1G53540	HSP20-like chaperones superfamily protein; Contains InterPro Domains/s; Heat shock protein HSP20 (InterPro: IPR002068), HSP20-like chaperone (InterPro: IPR008978); Best Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 17.4 (TAIR: AT3G46230)	unknown
4	AT1G52560	HSP20-like chaperones superfamily protein; INVOLVED IN: response to high light intensity, response to hydrogen peroxide, response to heat; LOCATED IN: mitochondrion; EXPRESSED IN: 6 plant structures; EXPRESSED DURING: 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein Hsp20 (InterPro:IPR002068), HSP20-like chaperone (InterPro:IPR008978); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 21 (TAIR:AT4G27670.1)	molecular function*

	ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
5	AT4G27670	Encodes Hsp21, a chloroplast located small heat shock protein. A structure model of Hsp21, obtained by homology modeling, single-particle electron microscopy, and lysine-specific chemical crosslinking, shows that the Hsp21 subunits are arranged in two hexameric discs, rotated by 25 degree in relation to each other.	unknown
6	AT5G12020	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6II); CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein Hsp20 (InterPro:IPR002068), HSP20-like chaperone (InterPro:IPR008978); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 17.6A (TAIR:AT5G12030.1)	unknown
7	AT2G46240	A member of Arabidopsis BAG (Bcl-2-associated athanogene) proteins, plant homologs of mammalian regulators of apoptosis. Expression of BAG6 in leaves was strongly induced by heat stress. Knockout mutants exhibited enhanced susceptibility to fungal pathogen Botrytis cinerea. Plant BAG proteins are multi-functional and remarkably similar to their animal counterparts, as they regulate apoptotic-like processes ranging from pathogen attack, to abiotic stress, to plant development. The mRNA is cell-to-cell mobile	calmodulin binding, protein binding
8	AT4G10250	Columbia endomembrane-localized small heat shock protein	molecular function*

ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
9	AT1G16030 LOCATED IN: cytosol, cell wall, plasma membrane, chloroplast, membrane; EXPRESSED IN: 19 plant structures; EXPRESSED DURING: 10 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein 70, conserved site (InterPro:IPR018181), Heat shock protein Hsp70 (InterPro:IPR001023), Heat shock protein 70 (InterPro:IPR013126); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 70 (TAIR:AT3G12580.1)	ATP binding
10	AT2G29500 HSP20-like chaperones superfamily protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein Hsp20 (InterPro:IPR002068), HSP20-like chaperone (InterPro:IPR008978); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: HSP20-like chaperones superfamily protein (TAIR:AT1G07400.1)	molecular funtion*
11	AT1G74310 Encodes ClpB1, which belongs to the Casein lytic proteinase/heat shock protein 100 (Clp/Hsp100) family. Involved in refolding of proteins which form aggregates under heat stress. Also known as AtHsp101. AtHsp101 is a cytosolic heat shock protein required for acclimation to high temperature	ATP binding, ATPase activity, protein binding
12	AT4G12400 Encodes one of the 36 carboxylate clamp (CC)-tetratricopeptide repeat (TPR) proteins (Prasad 2010, Pubmed ID: 20856808) with potential to interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones.	unknown
13	AT1G54050 HSP20-like chaperones superfamily protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein Hsp20 (InterPro:IPR002068), HSP20-like chaperone (InterPro:IPR008978); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 17.6A (TAIR:AT5G12030.1)	molecular function*

	ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
14	AT2G32120	INVOLVED IN: protein folding, response to high light intensity, response to hydrogen peroxide, response to heat; LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 12 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Heat shock protein 70, conserved site (InterPro:IPR018181), Heat shock protein Hsp70 (InterPro:IPR001023), Heat shock protein 70 (InterPro:IPR013126); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: heat shock protein 70 (TAIR:AT3G12580.1)	ATP binding
15	AT3G08970	domain protein localized in ER lumen. Can compensate for the growth defect in jem1 scj1 mutant yeast. Also shows similarity to HSP40 proteins and is induced by heat stress. At high temperatures, mutant alleles are not transmitted through the pollen due to defects in pollen tube growth.	oxidoreductase activity
16	AT2G47180	GolS1 is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. GolS1 transcript levels rise in response to methyl viologen, an oxidative damage-inducing agent. Plants over-expressing GolS1 have increased tolerance to salt, chilling, and high-light stress.	inositol 3-alpha-galactosyltransferase activity, metal ion binding, transferase activity, transferring hexosyl groups
17	AT5G52640	Encodes a cytosolic heat shock protein AtHSP90.1. AtHSP90.1 interacts with disease resistance signaling components SGT1b and RAR1 and is required for RPS2-mediated resistance. The mRNA is cell-to-cell mobile.	unknown
18	AT5G48570	Encodes one of the 36 carboxylate clamp (CC)-tetratricopeptide repeat (TPR) proteins (Prasad 2010, Pubmed ID: 20856808) with potential to interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones.	FK506 binding, calmodulin binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, protein binding

ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
19 AT3G24500	<p>One of three genes in <i>A. thaliana</i> encoding multiprotein bridging factor 1, a highly conserved transcriptional coactivator. May serve as a bridging factor between a bZIP factor and TBP. Its expression is specifically elevated in response to pathogen infection, salinity, drought, heat, hydrogen peroxide, and application of abscisic acid or salicylic acid. Constitutive expression enhances the tolerance of transgenic plants to various biotic and abiotic stresses.</p>	<p>sequence-specific DNA binding, transcription coactivator activity, transcription factor activity</p>
20 AT5G05410	<p>Encodes a transcription factor that specifically binds to DRE/CRT cis elements (responsive to drought and low-temperature stress). Belongs to the DREB subfamily A-2 of ERF/AP2 transcription factor family (DREB2A). There are eight members in this subfamily including DREB2B. The protein contains one AP2 domain. Overexpression of transcriptional activation domain of DREB2A resulted in significant drought stress tolerance but only slight freezing tolerance in transgenic <i>Arabidopsis</i> plants. Microarray and RNA gel blot analyses revealed that DREB2A regulates expression of many water stress-inducible genes. The mRNA is cell-to-cell mobile.</p>	<p>DNA binding, transcription regulatory region DNA binding, DNA binding, protein binding, sequence-specific DNA binding, transcription factor activity, sequence-specific DNA binding</p>
21 AT4G36990	<p>Encodes a protein whose sequence is similar to heat shock factors that regulate the expression of heat shock proteins. Transcript level is increased in response to heat shock. However, overexpression of this gene did not result in the increase or decrease of heat shock proteins.</p>	<p>DNA binding</p>

ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
22 AT4G25380	INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: 6 plant structures; EXPRESSED DURING: 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Zinc finger, AN1-type (InterPro:IPR000058), Zinc finger, A20-type (InterPro:IPR002653); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: A20/AN1-like zinc finger family protein (TAIR:AT4G22820.2)	DNA binding, zinc ion binding
23 AT2G24100	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G30780.1)	molecular function*
24 AT3G28740	Encodes a member of the cytochrome p450 family. Expression is upregulated in response to cis-jasmonate treatment. Overexpression induces synthesis of volatile compounds that affect chemical ecology and insect interactions	oxygen binding, heme binding, iron ion binding, oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
25 AT2G29450	Encodes a member of the TAU glutathione S-transferase gene family. Gene expression is induced by exposure to auxin, pathogen and herbicides. Naming convention according to Wagner et al. (2002)	glutathione binding

ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
26	<p>AT5G59820 Encodes a zinc finger protein involved in high light and cold acclimation. Overexpression of this putative transcription factor increases the expression level of 9 cold-responsive genes and represses the expression level of 15 cold-responsive genes, including CBF genes. Also, lines overexpressing this gene exhibits a small but reproducible increase in freeze tolerance. Because of the repression of the CBF genes by the overexpression of this gene, the authors speculate that this gene may be involved in negative regulatory circuit of the CBF pathway. The mRNA is cell-to-cell mobile</p>	nucleic acid binding, zinc ion binding
27	AT5G04340 putative c2h2 zinc finger transcription factor mRNA	nucleic acid binding, transcription regulatory region DNA binding, zinc ion binding
28	<p>AT1G64200 vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 3 (VHA-E3); INVOLVED IN: ATP synthesis coupled proton transport; LOCATED IN: plasma membrane, vacuole, mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex; EXPRESSED IN: 27 plant structures; EXPRESSED DURING: 17 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ATPase, V1/A1 complex, subunit E (InterPro:IPR002842); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: vacuolar ATP synthase subunit E1 (TAIR:AT4G11150.1)</p>	proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
29	<p>AT2G23110 Late embryogenesis abundant protein, group 6; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Late embryogenesis abundant protein, group 6 (InterPro:IPR018930); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Late embryogenesis abundant protein, group 6 (TAIR:AT2G23120.1)</p>	unknown

ATG- Nummer	Beschreibung	Funktion
30 AT3G28210	Encodes a putative zinc finger protein (PMZ)	zinc ion binding

*Definition der „molecular function“ laut der Datenbank „The Arabidopsis Information Resource (TAIR)“ auf www.arabidopsis.org (2.3.2016):

Elemental activities, such as catalysis or binding, describing the actions of a gene product at the molecular level. A given gene product may exhibit one or more molecular functions

Danksagung

An erster Stelle gilt meinen Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller für die Möglichkeit, diese Dissertation nicht nur in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sondern auch für das interessante Thema, welches er mir zur Verfügung gestellt hat. Die vielen fachlichen Diskussionen, Anregungen und das stetige Engagement, das er meiner Arbeit entgegen gebracht hat, gebühren meinem besonderen Dank und trugen maßgeblich zur erfolgreichen Erstellung dieser Arbeit bei.

In besonderen Maße danke ich außerdem Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe der Pharmazeutischen Biologie. Die herzliche Arbeitsatmosphäre, der kollegiale Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft aller waren mir stets eine große Freude. Aber auch die schönen Mittagspausen im Botanischen Garten werden mir lange im Gedächtnis bleiben. Vielen Dank an das gesamte Team. Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Studenten, die ich betreuen durfte, für den unermüdlichen Fleiß während der Praktika, Bachelor- oder Masterarbeit.

Dem GK 1342 danke ich für die finanzielle Unterstützung. Besonders die Möglichkeit, an internationalen Konferenzen teilnehmen zu können, hat mich in meiner Motivation stetig bestärkt und meiner Forschung neue Anreize gegeben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, die weit über das Korrekturlesen hinaus reicht.

DANKE!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Funktionelle Untersuchungen zur Oxylin-abhängigen Regulation von Hitzeschockproteinen in *Arabidopsis thaliana*“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, den

.....

Miriam Münch