

# Jasmonat-induzierter Lipidkatabolismus im Gerstenblatt (*Hordeum vulgare* L. cv. Salomé)

## Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl. Biochem. Astrid Bachmann

geb. am: 16.08.1972 in: Rochlitz

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Wasternack, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. I. Feußner, Göttingen
3. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann, Halle (Saale)

Halle (Saale), den 03.03.2003 (Datum der Verteidigung)

**urn:nbn:de:gbv:3-000005014**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005014>]

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGEN .....	III
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Lipoxygenasen	1
1.2 Enzymreaktion und Einteilung von Lipoxygenasen	2
1.3 Metabolismus der LOX-Produkte	3
1.4 Lipoxygenasen in Pflanzen	7
1.4.1 Intrazelluläre Lokalisation	7
1.4.2 Mögliche physiologische Funktionen pflanzlicher Lipoxygenasen	8
1.4.3 Lipoxygenasen aus Gerste	11
1.5 Aufgabenstellung	13
2 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON LOXS .....	15
2.1 Etablierung des Testsystems	15
2.2 Biochemische Charakterisierung von LOXs aus Oliven	17
2.3 Biochemische Charakterisierung von LOXs aus Gerste	18
3 ENDOGENES VORKOMMEN VON LOX-METABOLITEN .....	20
3.1 Oxylipine in Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten	20
3.2 Oxylipine in JM-behandelten Gerstenblattsegmenten	22
3.3 Lokalisation von LOX-Metaboliten in Chloroplasten	24
4 ZUSAMMENFASSUNG .....	29
5 LITERATUR.....	31
LITERATUR.....	31
6 VERÖFFENTLICHTE ORIGINALARBEITEN.....	40
6.1 All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro. I. Feussner, <u>A. Bachmann</u> , M. Hoehne, H. Kindl. <i>FEBS Lett.</i> 431: 433-436 (1998)	40

---

6.2 Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. M.D. Georgalaki, <u>A. Bachmann</u> , T.G. Sotiroudis, A. Xenakis, A. Porzel and I. Feussner. <i>Fett/Lipid</i> 100: 554-560 (1998)	40
6.3 Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. M. Kohlmann, <u>A. Bachmann</u> , H. Weichert, A. Kolbe, T. Balkenhohl, C. Wasternack and I. Feussner. <i>Eur. J. Biochem.</i> 260: 885-895 (1999)	40
6.4 Oxylipins in sorbitol-stressed barley leaf segments. <u>A. Bachmann</u> , M. Kohlmann, C. Wasternack and I. Feussner. <i>Advances in Plant Lipid Research</i> (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. & Martínez-Force, E., eds) pp. 288-290 (1998)	41
6.5 Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. <u>A. Bachmann</u> , B. Hause, H. Maucher, E. Garbe, K. Vörös, H. Weichert, C. Wasternack and I. Feussner. <i>Biol. Chem.</i> 383 (10): 1645-1657 (2002)	41
ANHANG .....	IV
Erklärung	IV
Danksagung	V
Lebenslauf	VI

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	Akohldehydrogenase
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
bzw.	beziehungsweise
cDNA	DNA-Kopie eines RNA Moleküls
<i>cis</i> -(+)-OPDA	(9 <i>S</i> , 13 <i>S</i> , 15 <i>Z</i> )-12-Oxo-9,13,15-phytodienonsäure
<i>CYP74</i>	Unterfamilie der Familie Cytochrom P-450 enthaltender Enzyme
<i>CYP74A</i>	Gruppe der 9-, 13- und 9/13-AOSs
<i>CYP74B</i>	Gruppe der 13-HPLs
<i>CYP74C</i>	Gruppe der 9/13-HPLs
<i>CYP74D</i>	Gruppe der 9- und 9/13-DESSs
DES	Divinylether-Synthase
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure, DNS
EAS	Epoxyalkohol-Synthase
EC	Enzymkatalog
<i>et al.</i>	und andere
FPLC	Schnelle Flüssigchromatographie
h	Stunde
His	Histidin
HPL	Hydroperoxidlyase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
9-H(P)OD	(9 <i>S</i> , 10 <i>E</i> , 12 <i>Z</i> )-9-Hydro(pero)xy-10,12-octadecadiensäure
13-H(P)OD	(13 <i>S</i> , 9 <i>Z</i> , 11 <i>E</i> )-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure
9-H(P)OT	(9 <i>S</i> , 10 <i>E</i> , 12 <i>Z</i> , 15 <i>Z</i> )-9-Hydro(pero)xy-10,12,15-octadecatriensäure
13-H(P)OT	(13 <i>S</i> , 9 <i>Z</i> , 11 <i>E</i> , 15 <i>Z</i> )-13-Hydro(pero)xy-9,11,15-octadecatriensäure
JA	Jasmonsäure
JIP	Jasmonat-induziertes Protein
JM	Jasmonsäuremethylester
kDa	Kilodalton
LA	Linolsäure
LeA	Linolensäure
LOX	Lipoxygenase
µm	Mikrometer
mRNA	Boten-RNA
POX	Peroxygenase
PUFA	Polyenfettsäure
RNA	Ribonukleinsäure, RNS
s.	siehe
SA	Salicylsäure
TAG	Triacylglycerid
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (Linoleat : Sauerstoff-Oxidoreduktasen, EC 1.13.11.12; LOXs) sind in Eukaryoten ubiquitär verbreitet. Diese zur Familie der Dioxygenasen gehörenden Enzyme katalysieren die regio- und stereospezifische Umsetzung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxiden (Brash 1999). Vor 70 Jahren wurde erstmals eine LOX näher beschrieben (Andre und Hou 1932). Es folgten zahlreiche Arbeiten, so z. B. über den Einfluß dieser Enzyme auf die Qualität von Nahrungsmitteln (Eskin *et al.* 1977). Man begann mit der Aufklärung der physiologischen Eigenschaften (Galliard und Chan 1980, Hildebrand 1989) und entdeckte die Beteiligung von LOXs an der Bildung von Jasmonsäure (Jasmonsäure-Kaskade) (Vick und Zimmerman 1984). Bald gelang eine genauere Beschreibung des katalytischen Mechanismus (Gardner 1991). Die Aufklärung der Struktur des aktiven Zentrums (Boyington 1993) durch Kristallisation von LOX 1 aus Samen der Sojabohne führte schließlich zu einem ziemlich genauen Verständnis des Mechanismus dieser Klasse von Enzymen (Feussner und Kühn 2000). LOXs sind nach wie vor Gegenstand intensiver Untersuchungen, da noch immer nur wenig über die physiologischen Funktionen pflanzlicher LOXs bekannt ist. Vermutet wird nicht nur eine Beteiligung an Entwicklungsprozessen wie Keimung (Feussner *et al.* 2001) oder Seneszenz von Blüten und Blättern und eine damit verbundene Bildung von Blattaldehyden und Blattalkoholen, sondern vor allem an der pflanzlichen Stressantwort. Neben Divinylethern und anderen Oxylipinen stehen hier das Pflanzenhormon Jasmonsäure und seine Vorstufe, die (9S,13S)-12-Oxophytodienonsäure (*cis*-(+)-OPDA), im Vordergrund (Feussner und Wasternack 2002).

Im Gegensatz zu den pflanzlichen LOXs wurden die Vertreter aus tierischen Systemen erst vor 20 Jahren entdeckt (Rapoport *et al.* 1979). Bei Säugetier-LOXs ist insbesondere die Umsetzung von Arachidonsäure, einer Polyenfettsäure (PUFA) der Kettenlänge C<sub>20</sub>, gut charakterisiert (Funk 1996). Bei den entstehenden Intermediaten handelt es sich oft um Vorstufen wichtiger regulatorischer Substanzen,

wie z. B. Leukotriene und Lipoxine, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Entzündungsreaktionen spielen (Ford-Hutchinson *et al.* 1994).

## 1.2 Enzymreaktion und Einteilung von Lipoxygenasen

LOXs enthalten ein Eisenatom pro Enzymmolekül, das über Histidin-Seitenketten direkt im Protein koordiniert ist (Siedow 1991). Sie katalysieren die regiospezifische Umsetzung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einem (1Z,4Z)-Pentadiensystem und molekularem Sauerstoff unter Bildung von (1Z,3E,4S)-Hydroperoxyfettsäuren (Gardner 1991). Es entsteht dabei stereospezifisch das Hydroperoxid in der S-Konfiguration (Abb. 1).

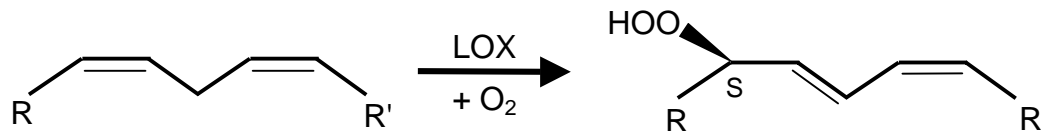


Abb. 1. Allgemeiner Reaktionsmechanismus von LOXs.

Substrate der pflanzlichen LOXs sind die im gesamten Pflanzenreich ubiquitär vorkommenden Fettsäuren Linolsäure (18:2) und  $\alpha$ -Linolensäure (18:3). Nach dem allgemeinen Reaktionsmechanismus kann die Umsetzung von Linolsäure zu den beiden Hydroperoxidisomeren (9S,10E,12Z)-9-Hydroperoxy-10,12-octadecadiensäure (9-HPOD) und (13S,9Z,11E)-13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure (13-HPOD) führen (Abb. 2).

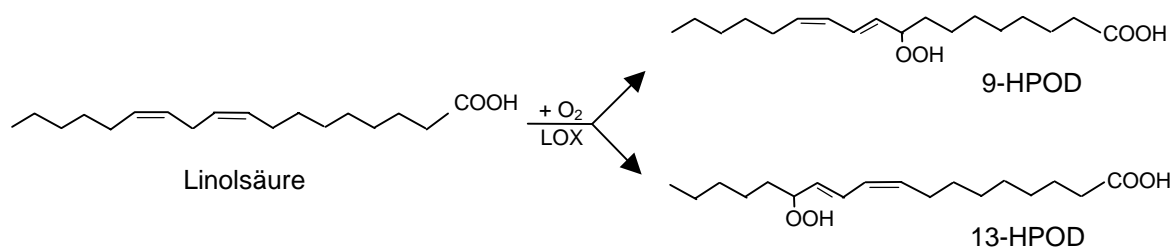


Abb. 2. LOX-Reaktion mit Linolsäure als Substrat.

Bei der Umsetzung von Linolsäure durch LOXs können die zwei möglichen Reaktionsprodukte 9-HPOD und 13-HPOD entstehen.

Analog kann die Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure zu den beiden Hydroperoxidisomeren (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroperoxy-10,12,15-octadecatriensäure (9-HPOT)

und (13S,9Z,11E,15Z)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (13-HPOT) führen. Die hierbei zu beobachtende Produktspezifität dient der Einteilung von LOXs entsprechend der durch die LOX-Reaktion entstehenden Regioisomeren der Position 9 bzw. 13 (Gardner 1991). LOXs, die nur 13-HPO(D/T) bilden, werden als 13-LOXs und jene, die nur 9-HPO(D/T) bilden, als 9-LOXs bezeichnet. Da jedoch die Art der Regiospezifität der Enzyme von den vorhandenen Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert und Temperatur, abhängig sein kann (Feussner und Kühn 2000), wurde für pflanzliche LOXs eine neue Einteilung vorgeschlagen. Diese erfolgt in zwei Gruppen anhand ihrer Homologien auf Ebene von cDNA-Sequenzen. Man unterscheidet dabei zwischen Enzymen ohne chloroplastidäres Transitpeptid (*LOX1*-Typ) und jenen mit chloroplastidärem Transitpeptid (*LOX2*-Typ) (Shibata *et al.* 1994). Nur die Enzyme vom *LOX1*-Typ weisen dabei aber untereinander einen erhöhten Grad an Sequenzhomologie auf (Feussner und Wasternack 2002).

### 1.3 Metabolismus der LOX-Produkte

Die durch LOXs gebildeten Fettsäurehydroperoxide werden in Pflanzen sehr schnell durch eine große Anzahl verschiedener Enzymreaktionen weiter metabolisiert. Bisher kennt man sieben Enzymfamilien, die in der Lage sind Fettsäurehydroperoxide umzusetzen (Abb. 3; Feussner und Wasternack 2002). Die Enzyme Hydroperoxid-Lyase (HPL), Peroxygenase (POX), LOX, Divinylether-Synthase (DES) und Allenoxid-Synthase (AOS) sind im Gegensatz zur Hydroperoxid-Reduktase und Epoxyalkohol-Synthase (EAS) bereits gut charakterisiert. Das am besten untersuchte Enzym ist die AOS. Es wurde als erstes dieser Enzyme isoliert und kloniert (Song *et al.* 1993, Song und Brash 1991). AOS gehört zur Familie der Cytochrom P-450-Enzyme, Unterfamilie *CYP74A*. Es wurden bis jetzt neun verschiedene AOS-cDNAs aus Pflanzen isoliert. Die meisten kodieren für 13-AOS, einige wenige für 9/13-AOS und kürzlich wurde außerdem eine 9-AOS isoliert (Feussner und Wasternack 2002). Während 9- und 13-AOS hochspezifisch für die entsprechenden Fettsäurehydroperoxid-Isomere sind, besitzen 9/13-AOS keine Spezifität. Die Umsetzung der 13-Hydroperoxide mit AOS und deren Folgereaktionen werden häufig auch unter dem Namen „Jasmonsäure-Kaskade“ zusammengefasst (Creelman und Mullet 1997). Die von der AOS zu instabilen Allenoxi-

den umgesetzten Fettsäurehydroperoxide können im Fall von (13S)-HPOT alternativ von Allenoxid-Cyclase (AOC) in *cis*-(+)-OPDA umgewandelt werden oder sie hydrolysieren spontan zu  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Ketolen. Die bei der enzymatischen Umsetzung von (13S)-HPOT entstehende *cis*-(+)-OPDA ist die essentielle Vorstufe zur Bildung von Jasmonsäure, da sie jene enantiomere Struktur enthält wie sie in der natürlich vorkommenden Jasmonsäure auftritt (Wasternack und Hause 2002). Nach Reduktion der Doppelbindung im Cyclopentanonring und drei  $\beta$ -Oxidationszyklen entsteht (3*R*,7*S*)-Jasmonsäure, die spontan zu (3*R*,7*R*)-Jasmonsäure isomerisiert, wobei das Gleichgewicht von (3*R*,7*S*) zu (3*R*,7*R*) etwa 9 : 1 beträgt (Sembdner und Parthier 1993). Beide Verbindungen sind biologisch aktiv. Neben der freien Säure sind außerdem ihr Methylester, verschiedene Aminosäurekonjugate, Glukoseester und hydroxylierte Derivate in Pflanzen bekannt (Sembdner und Parthier 1993). Jasmonsäure und Jasmonsäuremethylester (JM) sind pleiotrope Effektoren mit Phytohormon-ähnlichen Aktivitäten. Eine Beteiligung an der Regulation von Entwicklungsprozessen (Keimung, Seneszenz), Wundreaktionen und Pathogenabwehr wird schon seit langem diskutiert und erste funktionale Beweise liegen vor (Sembdner und Parthier 1993, Creelman und Mullet 1997, Wasternack und Parthier 1997, Wasternack und Hause 2002).

HPL katalysiert die Spaltung von Fettsäurehydroperoxiden in Aldehyde und  $\omega$ -Oxofettsäuren (Matsui 1998). Das membrangebundene Enzym ist ein Homotrimer und gehört ebenfalls zur Familie der Cytochrom P-450 enthaltenden Enzyme (Shibata *et al.* 1995a, Shibata *et al.* 1995b). Inzwischen sind 17 HPL-cDNAs isoliert worden. Anhand unterschiedlicher Substratspezifitäten können HPLs in mehrere Unterfamilien gegliedert werden. Während 13-HPLs der Gruppe *CYP74B* angehören, bilden 9/13-HPLs eine eigene Unterfamilie *CYP74C*. Von ihnen wurden erst kürzlich zwei Vertreter isoliert (Matsui *et al.* 2000, Tijet *et al.* 2001). Sie besitzen darüber hinaus eine größere Homologie zu AOSs als zu HPLs. 9-HPLs wurden bisher nicht isoliert. Die bei der HPL-Reaktion entstehenden Aldehyde und davon abgeleitete durch Alkoholdehydrogenase gebildete Alkohole sind für den charakteristischen Geruch von Pflanzen und Früchten verantwortlich (Matsui 1998). Aus 13-HPO(D/T) entsteht (9*Z*)-12-Oxo-9-dodecaensäure oder Traumatin, das durch spontane Oxidation in Traumatinsäure umgewandelt wird. Beide Verbindungen werden auch als „Wundhormone“ bezeichnet, da ihnen eine Funktion bei der Wundheilung verletzter Pflanzen zugeschrieben wird (Zimmerman und



Caudron 1979). Kürzlich wurde ein weiterer Vertreter der Familie der *CYP74* identifiziert, die Gruppe der DES. Hier sind bisher 9-DESS aus Tomate und Kartoffel (Itoh und Howe 2001, Stumpe *et al.* 2001) sowie eine 9/13-DES aus *Physcomitrella patens* bekannt (Feussner und Wasternack 2002). Sie bilden die Unterfamilie *CYP74D*.

Ein weiteres gut charakterisiertes Enzym, das ebenfalls LOX-Produkte umzusetzen vermag, ist die POX (Blée und Schuber 1990). Diese katalysiert die Oxidation der Fettsäurehydroperoxide zu Hydroxy-, Epoxy- und  $\beta$ -Hydroxyepoxyfettsäuren. Durch anschließende Hydrolyse der Epoxygruppen zu Dihydroxygruppen mittels Epoxidhydrolase kommt es zur Bildung von Di- und Trihydroxyfettsäuren (Blée 1996). Die entstehenden Epoxy- und Hydroxyfettsäuren besitzen antimikrobielle Aktivität (Blée 1998).

Des Weiteren konkurrieren LOXs selbst um ihre eigenen Produkte. Unter Sauerstoffmangel erfolgt die Oxidation der Fettsäurehydroperoxide zu den entsprechenden Ketodienen (Kühn *et al.* 1991). Abschließend seien noch die Umsetzungen durch die zwei bisher noch weniger gut charakterisierten Enzyme, die EAS (Hamberg 1999) und die Hydroperoxid-Reduktase (Feussner *et al.* 1998b) erwähnt.

Über die Art und Weise des Zusammenspiels all dieser um das Substrat Hydroperoxyfettsäure konkurrierenden Enzyme ist bis jetzt noch nichts Genaues bekannt. Man nimmt aber an, dass ihre unterschiedliche Kompartimentierung in der inneren bzw. äußeren Hüllmembran der Chloroplasten hier von zentraler Bedeutung sein könnte (Froehlich *et al.* 2001). Darüber hinaus werden auch die grundlegenden Regulationsmechanismen des LOX-Reaktionsweges noch nicht verstanden. Nur für wenige Produkte des LOX-Reaktionsweges, die auch als „Oxylipine“ bezeichnet werden, wurden bereits Hinweise auf mögliche Funktionen gefunden. Die meisten Informationen hat man gegenwärtig über die Bildung und Funktion von Jasmonaten (Wasternack und Hause 2002).

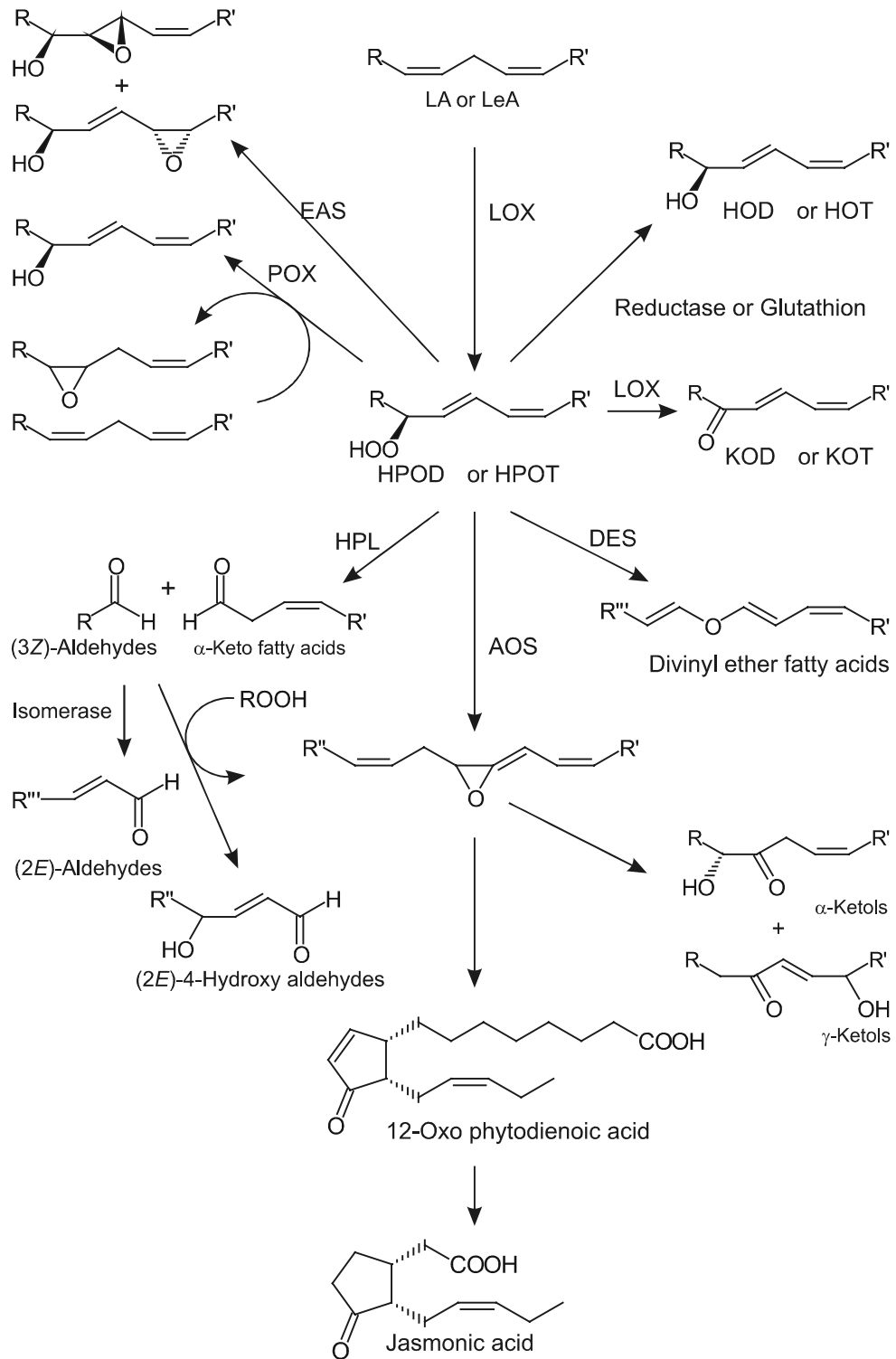


Abb. 3. Metabolismus von Polyenfettsäuren durch LOXs (nach Weichert *et al.* 2002).  
 AOS: Allenoxid-Synthase; DES: Divinylether-Synthase; EAS: Epoxyalkohol-Synthase; HPL: Hydroperoxidlyase; H(P)O(D/T): Hydro(pero)xylol(en)säure; KO(D/T): Ketololol(en)säure, LA: Linolsäure; LeA: Linolensäure, LOX: Lipoxygenase; POX: Peroxygenase

## 1.4 Lipoxygenasen in Pflanzen

Katalytische Aktivitäten, die auf LOXs zurückzuführen sind, wurden bisher in mehr als 60 höheren Pflanzen (Axelrod 1974, Pinsky *et al.* 1971), in Pilzen (Hamberg 1986) und in eukaryotischen Algen (Vick und Zimmerman 1989) beschrieben. Da LOXs in Pflanzen als Multigenfamilie vorkommen, ist eine Unterscheidung sehr schwierig. Aus Sojabohne wurden bisher bereits 8 verschiedene cDNAs bzw. Gene isoliert, die für LOXs kodieren (Shibata 1996). Die enorme Vielzahl an LOX-Genen in der Kartoffel – bisher wurden 11 Gene isoliert, es werden aber 30-40 LOX-Gene vermutet – dient hier sogar der Unterscheidung von Kartoffelsorten (Bachem *et al.* 1996). Außerdem kann die Regulation der Expression von LOX-Genen in einer Zelle von einem entwicklungspezifischen Programm und/oder durch abiotischen bzw. biotischen Stress bestimmt werden (Saravitz und Siedow 1995, Saravitz und Siedow 1996). Die Höhe der LOX-Aktivität innerhalb einer Pflanze ist zudem von Organ zu Organ verschieden und ebenfalls abhängig vom Entwicklungsstadium eines Gewebes. Junge und wachsende Gewebe sind reich an LOXs (Siedow 1991).

### 1.4.1 Intrazelluläre Lokalisation

Um Hinweise auf die physiologischen Funktionen von LOXs zu erlangen, wurden viele Versuche unternommen, deren genaue intrazelluläre Lokalisation zu identifizieren. Bei LOXs handelt es sich größtenteils um lösliche, cytoplasmatische Enzyme (Feussner und Wasternack 2002). LOX-Isoformen wurden jedoch auch in Mitochondrien (Grossman *et al.* 1972), Vakuolen (Tranbarger *et al.* 1991), im Zellkern (Feussner *et al.* 1995a), an Lipidkörpern (Feussner und Kindl 1992), gebunden an Mikrosomen- und Plasmamembranen (Droillard *et al.* 1993, Feussner und Kindl 1994, Nellen *et al.* 1995) sowie in Chloroplasten (Bell *et al.* 1995, Blée und Joyard 1996, Feussner *et al.* 1995a) gefunden. Aus Chloroplasten von Tomate wurde eine an die Thylakoidmembran gebundene LOX gereinigt (Bowsher *et al.* 1992), hingegen konnte in Chloroplasten von Spinatblättern LOX-Aktivität in der Hüllenfraktion nachgewiesen werden (Blée und Joyard 1996). LOXs sind demnach in Chloroplasten verschiedener Pflanzenarten nicht nur in unterschiedlichen Kompartimenten, sondern zudem sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form zu finden. Gerade wegen dieser weiten Verbreitung von LOX-

Isoformen innerhalb einer Zelle ist es so schwierig, eine allgemeine Aussage über mögliche Funktionen von LOXs zu machen.

Im Gegensatz hierzu ist die intrazelluläre Lokalisation von Enzymen, die der LOX-Reaktion nachfolgen, bisher vergleichsweise einfach. So sind die Enzyme AOS und HPL der *CYP74*-Familie und die AOC in den Chloroplasten und hier zum Teil in oder an den Hüllmembranen lokalisiert (Blée und Joyard 1996, Froehlich *et al.* 2001, Ziegler *et al.* 2000). In wie weit hierbei HPL und AOC in der äußeren Hüllmembran und AOS immer in der inneren Hüllmembran lokalisiert sind, wie es kürzlich für Tomate beschrieben wurde (Froehlich *et al.* 2001), muss eine Analyse in anderen Pflanzen aber erst noch zeigen.

#### **1.4.2 Mögliche physiologische Funktionen pflanzlicher Lipoxygenasen**

LOXs katalysieren in der Hauptsache die Umsetzung von PUFAs zu den entsprechenden Hydroperoxidderivaten. Zwei Entwicklungsstadien, die sich durch einen erhöhten Katabolismus von PUFAs auszeichnen, sind die Keimung und die Seneszenz (Gerhardt 1993, Thomas 1986).

##### **1. Keimung:**

Die Regulation der Genexpression und Enzymaktivität von LOXs in Keimlingen wurde bereits in vielen verschiedenen Pflanzen untersucht (Übersicht siehe Rosahl 1996). So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche LOX-Isoformen während der Keimung aktiviert oder aber LOXs *de novo* synthetisiert werden (Feussner und Kindl 1994, Kato *et al.* 1992).

Im gesamten Pflanzenreich stellen Triacylglycerine (TAGs) die Speicherform für Fette und Öle dar. In Samen werden TAGs in kleinen, subzellulären Tröpfchen gespeichert, die als Lipidkörper, Oleosomen oder auch Ölkörper bezeichnet werden (Huang 1996). Lipidkörper besitzen Durchmesser zwischen 0,5 und 2,5 µm, eine Membran aus einer einzelnen Phospholipidschicht und eine verhältnismäßig einfache Proteinausstattung. Während der Samenreifung werden vor allem die für dieses Entwicklungsstadium charakteristischen Strukturproteine, das Oleosin sowie das Caloleosin, gebildet (Murphy 2001).

Bislang gibt es keinen gesicherten Hinweis auf eine bestimmte physiologische Funktion von LOXs während der Keimung, aber es existieren mehrere Hypothesen dazu. So wird eine Mitwirkung von LOXs am Abbau von Zellmembranen ver-

mutet, der dem Transport von Speicherstoffen zum Embryo dienen könnte (Hildebrand 1989). Diskutiert wird auch eine Beteiligung von LOXs an der Mobilisierung von Speicherfetten während der Keimung. So wurde in Lipidkörpern von Gurken-, Anis-, Sonnenblumen-, Lein- und Sojakeimlingen das transiente Vorkommen einer spezifischen, membranständigen LOX in diesem Entwicklungsstadium nachgewiesen (Feussner *et al.* 2001). Im Vergleich zu anderen Lipidkörperproteinen wies diese LOX eine enorm hohe Syntheserate in diesem Stadium auf (Höhne *et al.* 1996). Außerdem besaß sie ein ungewöhnlich alkalisches pH-Optimum (Feussner und Kindl 1994) und zeigte eine Steigerung der Enzymaktivität als auch eine Veränderung der Regiospezifität nach Bindung an die Membran des Lipidkörpers (Feussner und Kühn 1995). Bis vor etwa 15 Jahren wurde davon ausgegangen, dass ausschließlich freie PUFAs die natürlichen Substrate pflanzlicher LOXs sind. Dann zeigte sich jedoch, dass auch veresterte PUFAs *in vitro* Substrate für LOXs darstellen können (Brash *et al.* 1987, Maccarrone *et al.* 1994). Schließlich konnte gezeigt werden, dass die an eine Membran gebundenen Lipidkörper-LOXs in der Lage sind, veresterte Linol(en)säure direkt umzusetzen (Feussner *et al.* 1997a, Feussner *et al.* 1995b). Auf diesen Befunden basierend wurde dann ein neuer Abbauweg für mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Pflanzen vorgeschlagen (Feussner *et al.* 1997b). Dieses Konzept beruht darauf, dass die für TAG spezifischen LOXs der Lipidkörper zunächst die im Speicherlipid enthaltenen Fettsäurereste oxidieren müssen, bevor diese durch für oxidierte Fettsäuren spezifische TAG-Lipasen mobilisiert werden können. Demnach würden LOX-Produkte das eigentliche endogene Substrat für die sich anschließende  $\beta$ -Oxidation darstellen.

## 2. Seneszenz:

Die Seneszenz stellt das abschließende Entwicklungsstadium eines Organs oder Organismus dar. Vom Verlauf der Seneszenz bei Pflanzen hat man bisher nur ungenaue Vorstellungen (Nooden *et al.* 1997, Quirino *et al.* 2000, Smart 1994). Charakteristische Seneszenzmerkmale sind der Abbau des Chlorophylls sowie eines großen Teils zellulärer Proteine und der RNA. Ein weiteres Merkmal ist der Verlust der Membranintegrität (Thompson *et al.* 1998). In Analogie zum tierischen System, in dem 15-LOXs am Membranabbau beteiligt zu sein scheinen (Schewe und Kühn 1991), wird auch für pflanzliche LOXs eine solche Rolle bei Seneszenz-

prozessen vermutet (Feussner und Wasternack 1998). Über die Mechanismen des Lipidabbaues während dieses pflanzlichen Entwicklungsstadiums und seine Auslösung gibt es bisher aber nur Hypothesen. So geht man bei Tieren von einer durch Kalziumionen aktivierbaren Phospholipase A<sub>2</sub> aus, die Fettsäuren aus der Membran freisetzt und zur Akkumulation von freier Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure führen könnte. Entsprechende pflanzliche Homologe würden dann Substrate für chloroplastidäre LOXs darstellen. Kürzlich wurde tatsächlich eine entsprechende Seneszenz-induzierte Lipase isoliert (Hong *et al.* 2000). In der weiteren Umsetzung des LOX-Substrates  $\alpha$ -Linolensäure zu Jasmonsäure könnte eine Ursache der Seneszenz liegen, weil eine Jasmonsäurebehandlung Seneszenz-ähnliche Prozesse fördert (Parthier 1991, Thompson *et al.* 1998). Andererseits könnte durch die Freisetzung von PUFAs analog zur Keimung, deren Abbau in den Gerontosomen eingeleitet werden (Landolt und Matile 1990, Vicentini und Matile 1993, Wanner *et al.* 1991). Ergänzend wurde ein anderes Modell aufgestellt (Paliyath und Droillard 1992). Der Metabolismus von Phospholipiden könnte hierbei über eine durch Ethylen aktivierbare Phospholipase D ausgelöst werden. Durch eine Phosphatase könnte das entstehende Phosphatidat zum Diacylglycerol umgesetzt und dieses anschließend durch eine Lipase gespalten werden. Für Galaktolipide wurde ein analoger Abbauweg vorgeschlagen (Wanner *et al.* 1991). So soll auch ihr Katabolismus über Diacylglyceride erfolgen. Bei allen diesen Modellen wäre eine Beteiligung von LOXs am Abbau von Linol(en)säure denkbar.

### 3. Weitere mögliche physiologische Funktionen:

LOXs katalysieren die Bildung von Hydroperoxidderivaten mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Deren weitere Umsetzung führt zu Metaboliten mit unterschiedlichen biologischen Aktivitäten, die in Entwicklungsprozessen, bei der Antwort auf Verwundung, bei Pathogenbefall der Pflanzen sowie bei der Synthese von Signalmolekülen eine Rolle zu spielen scheinen.

Pflanzen "antworten" auf Verwundung mit Verstärkung von Zellwänden, Induktion der Expression spezifischer Gene, deren Produkte zu einer Abwehrreaktion beitragen, Synthese antimikrobieller Substanzen und Einleitung von Wundheilungsprozessen. Auch viele Produkte des LOX-Stoffwechsels entstehen als Antwort auf Verwundung und tragen zur Abwehr bei. Die am umfangreichsten untersuchte und als Signal der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress bekannte Verbin-

dung ist die Jasmonsäure. Diese löst die Induktion einer Reihe von Genprodukten aus, die für zahlreiche Abwehrreaktionen von Bedeutung sind (Wasternack und Hause 2002). Auf Pathogenbefall reagieren Pflanzen mit der Aktivierung von spezifischen Abwehrgenen, Synthese antimikrobieller Stoffe, wie Phytoalexine, und in einigen Fällen mit lokalem Zelltod oder Ausbildung von Resistenzen. Viele dieser Prozesse sind durch Jasmonsäure induzierbar. Auch wurde eine Beteiligung von LOXs und deren Metabolite diskutiert (Slusarenko 1996, Slusarenko *et al.* 1993). So lässt das große Vorkommen von LOX-Protein in der Epidermis der Keimblätter von *Arabidopsis thaliana* vermuten, dass LOX-Produkte die Keimlinge vor Pathogenbefall schützen oder alternativ Wachstum und Entwicklung der Epidermis regulieren (Melan *et al.* 1994).

Nicht nur die Wirkung dieser Produkte, sondern auch der Anstieg von LOXs auf Transkript- und Proteinebene deutet auf eine Beteiligung von LOXs an diesen Prozessen hin. Bisher ist es aber nur in wenigen Fällen gelungen, konkrete Funktionen für LOXs zu formulieren. Weitere Untersuchungen sind deshalb notwendig.

### **1.4.3 Lipoxygenasen aus Gerste**

Zum ersten Mal wurde 1950 von einer LOX aus Gerste berichtet (Kolesnikov 1950). Später konnte in ungekeimten Samen der Gerste eine LOX, nachfolgend mit LOX-1 bezeichnet, nachgewiesen werden, die aus Linolsäure bevorzugt das 9-HPOD (> 90 %) bildet (Yabuuchi 1976). In Keimlingen wurde eine zusätzliche LOX (LOX-2) detektiert, die im Gegensatz zu LOX-1 bevorzugt 13-HPOD bildet (Yabuuchi 1976). Schließlich gelang eine vollständige Reinigung und Charakterisierung beider LOX-Isoenzyme aus gekeimten Gerstenkörnern (Doderer *et al.* 1992). Es folgten die Isolierung der entsprechenden cDNAs sowie detaillierte Expressionsstudien während der Keimung (Holtman *et al.* 1996). Der auffälligste Unterschied zwischen beiden Isoenzymen bestand in deren zeitlich versetzter Expression der sie kodierenden Gene in ruhenden Samen und frühen Stadien der Samenkeimung. Es konnte gezeigt werden, dass für die LOX-Aktivität in ruhenden Samen nur LOX-1 verantwortlich war. Erst am zweiten Tag der Keimung erfolgte ein drastischer Anstieg der LOX-2-Aktivität. Von diesem Zeitpunkt an zeigten beide LOX-Formen ähnliche Aktivitäten und Proteinmengen. Darüber hinaus war LOX-2 in der Lage, auch veresterte Lipide umzusetzen (Holtman *et al.* 1997).

Neben Samen wurden auch Blätter der Gerste auf LOX-Formen untersucht. In 6 Tage alten Gerstenblättern konnte eine chloroplastidäre LOX mit einem Molekulargewicht von 100 kDa (LOX-100) nachgewiesen werden (Feussner *et al.* 1995a). Außerdem wurde festgestellt, dass durch Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit Sorbit, Salicylsäure (SA) oder JM eine Induktion spezifischer LOXs erfolgt (Feussner *et al.* 1995a, Weichert *et al.* 1999). Eine Erhöhung der spezifischen LOX-Aktivität wurde jedoch nur nach Behandlung mit JM registriert (Feussner *et al.* 1995c). Die Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit JM hatte zudem einen drastischen Anstieg der Proteinmenge der bereits vor JM-Behandlung nachweisbaren LOX-100 und das Auftreten von zwei neuen LOX-Formen von 98 kDa (LOX-98) und 92 kDa (LOX-92) zur Folge, wobei die Stärke der Induktion von der Behandlungsdauer mit JM abhängig war.

Die intrazelluläre Lokalisation dieser LOXs innerhalb des Gerstenblattes wurde mittels Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analyse untersucht. So wurde im immunocytoologischen Bild keine der LOX-Formen außerhalb der Chloroplasten nachgewiesen (Feussner *et al.* 1995a). Aussagen zur Lokalisation der einzelnen LOX-Formen in den Subkompartimenten der Chloroplasten waren jedoch mit der benutzten Methodik nicht möglich, da der verwendete Antikörper alle drei LOX-Formen gleichermaßen erkannte und zudem LOX-100 gegenüber LOX-92 und LOX-98 abundant auftrat. In für 24 h mit Wasser behandelten Gerstenblattsegmenten wurden durch Immunfluoreszenzfärbung LOXs in den Chloroplasten von Zellen nahe der Leitbündelscheiden nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden nach einer Behandlung mit JM über 24 h in den Chloroplasten aller Chloroplastenhaltigen Zellen des Blattes LOXs detektiert. Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakten gereinigter Chloroplasten aus unbehandelten, aus für 43 h mit Wasser behandelten und für 3 h mit JM und nachfolgend für 40 h mit Wasser behandelten (verkürzte JM-Behandlung) Gerstenblattsegmenten bestätigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analyse. In Chloroplasten von mit Wasser behandelten Blättern wurde dabei eine LOX-100 detektiert. Diese LOX-Form und eine weitere LOX-Form, LOX-92, konnten in Chloroplasten verkürzt JM-behandelter Blätter nachgewiesen werden. Andererseits gelang der Nachweis der im Rohextrakt von (mindestens) für 48 h mit JM behandelten Gerstenblättern enthaltenen LOX-98 in Chloroplasten nicht. Ebenso konnten mit dieser Methode in



Chloroplasten der Frischkontrolle keine LOX-Formen detektiert werden (Feussner *et al.* 1995a).

Abschließend sei noch erwähnt, dass bei Blättern durch exogene Applikation von JM ähnliche Veränderungen hervorgerufen werden, wie sie bei der natürlichen Blattseneszenz auftreten. Speziell im Gerstenblatt der Sorte Salomé sind diese verbunden mit (1) dem Abbau von Chlorophyll und einer dadurch bedingten Reduktion der photosynthetischen Leistung (Parthier 1991), (2) Abbruch der Synthese zahlreicher Proteine einschließlich der Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Roloff *et al.* 1994), (3) Anstieg der zellulären Atmung sowie der Menge und Aktivität von Proteasen und Peroxidasen und (4) Synthese neuer abundant auftretender Proteine, die auch als JIPs (Jasmonat-induzierte Proteine) bezeichnet werden (Sembdner und Parthier 1993). Durch JM-Behandlung wird jedoch besonders drastisch die Morphologie der Gerstenchloroplasten verändert. Bereits nach 24 h JM-Behandlung war die Zahl der Thylakoide stark verringert und die Integrität der Chloroplastenhülle vermindert. Außerdem wurde die Ausbildung fibrillenartiger Strukturen und die Bildung von Lipidpartikeln beobachtet und die Dichte des Stromas schien erhöht (Hause *et al.* 1994).

## 1.5 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit sollte zur Beantwortung der Frage nach möglichen physiologischen Funktionen pflanzlicher chloroplastidärer LOXs im Modellsystem Gerstenblatt beitragen. Für die Untersuchung physiologischer Funktionen einzelner LOXs stehen mittlerweile vielfältige Methoden zur Verfügung. Erste Einblicke in die Funktion von LOXs konnten vor allem mit Hilfe von transgenen Ansätzen, wie z. B. bei Kartoffel und Tomate, erhalten werden (vgl. Übersicht Feussner und Wasternack 2002). Da jedoch im Fall der Gerste die Bearbeitung dieser Fragestellung mit Hilfe eines Transformationsansatzes zum einen durch die nur sehr schwer durchführbare Transformation von Gerste und zum anderen durch das Vorkommen von LOXs in einer Multigenfamilie aussichtslos erscheint, sollten zur Analyse einer physiologischen Funktion von LOXs *in vitro* Experimente herangezogen werden.

Dazu sollte ein Testsystem für rekombinante LOXs etabliert werden, um die biochemischen Eigenschaften der drei rekombinanten chloroplastidären LOXs aus

---

Gerstenblättern analysieren zu können. Die Etablierung sollte hier anhand der gut untersuchten rekombinanten Lipidkörper-LOX aus Keimblättern der Gurke und einer LOX aus Oliven erfolgen, die ebenfalls untersucht und biochemisch charakterisiert werden sollte, um anhand ihrer spezifischen biochemischen Eigenschaften erste Aussagen über mögliche physiologische Funktionen von LOXs treffen zu können.

Des Weiteren sollte die Analytik für das endogene Vorkommen von LOX-Metaboliten anhand von nicht veresterten Hydro(pero)xyfettsäuren erstmalig etabliert und jene freien Hydroxyfettsäuren im Gerstenblatt nach Behandlung mit Wasser, JM und Sorbit quantifiziert werden. In diesem Zusammenhang bestand eine weitere Aufgabe in der Lokalisation von LOXs und ihren Metaboliten innerhalb der Chloroplasten von Gerstenblättern.

## 2 Biochemische Charakterisierung von LOXs

Obwohl LOXs in Pflanzen weit verbreitet sind und man nun schon seit mehr als 60 Jahren diese Enzyme intensiv erforscht, beginnt man die möglichen physiologischen Funktionen erst für einzelne LOXs zu verstehen (Feussner und Wasternack 2002). Grund dafür ist die überaus schwierige Zuordnung von distinkten physiologischen Funktionen zu einzelnen LOX-Isoformen, z. B. wegen der für alle LOXs charakteristischen, hohen Homologie auf der Ebene ihrer Aminosäuresequenz, ihres Vorkommens als Multigenfamilie (Bachem *et al.* 1996, Shibata 1996), der komplexen Regulation der Expression von LOX-Genen (Saravitz und Siedow 1996) sowie der Lokalisation mehrerer LOXs in einer Zelle oder sogar in einem zellulären Kompartiment (Feussner und Kindl 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zusätzlich zur Untersuchung der inter- und intrazellulären Lokalisation bestimmter LOXs in einem Gewebe ein Testsystem aufgebaut, mit dessen Hilfe die biochemische Charakterisierung von LOXs umfangreicher als bisher möglich wurde.

### 2.1 Etablierung des Testsystems

Generell katalysieren LOXs die Umsetzung von PUFAs zu den entsprechenden Hydroperoxidderivaten (vgl. 1.1). Vor Beginn der vorliegenden Arbeit waren die aus dieser Reaktion resultierenden Lipidhydroperoxide und deren Metabolite *in planta* nur wenig untersucht (Rosahl 1996). Man nahm im Falle der pflanzlichen LOXs an, dass ihr natürliches Substrat ausschließlich freie PUFAs darstellten (Andre und Hou 1932). In späteren Studien konnte jedoch durch Umsetzung von Phospholipiden oder Lipidgemischen aus Membranpräparationen mit LOXs aus Samen der Sojabohne gezeigt werden, dass auch veresterte PUFAs zunächst *in vitro* Substrate für LOXs darstellen können (Brash *et al.* 1987, Maccarrone *et al.* 1994). Bei Analysen der Triacylglycerinfraktion isolierter Lipidkörper aus Gurken- und Sonnenblumenkeimlingen gelang schließlich erstmals *in planta* der Nachweis von aus der LOX-Reaktion entstandenen Triacylglycerinderivaten, die ein, zwei oder drei Moleküle von 13-HPOD enthielten (Feussner *et al.* 1997a). Damit waren zu Beginn dieser Arbeit neben freien PUFAs nun auch eine große Anzahl von ver-

esterten Lipiden, die PUFAs enthalten, als Substrate für pflanzliche LOXs in Betracht zu ziehen. Zudem ergab sich daraus aber auch die Möglichkeit, die Substratspezifität von pflanzlichen LOXs weitaus umfangreicher als bisher zu analysieren.

Die Etablierung des Testsystems für LOXs erfolgte deshalb mit Hilfe der rekombinanten LOX aus Lipidkörpern der Gurke, die für diese Zwecke durch Expression in *Escherichia coli* gewonnen wurde. Es war bekannt, dass das gereinigte Protein nicht nur die Umsetzung von PUFAs, sondern im Gegensatz zu anderen Vertretern der Enzymfamilie der Linolsäure-13-LOXs (z. B. LOX-1 der Sojabohne) auch die vollständige Umsetzung von Trilinolein in das Trihydroperoxidderivat katalysierte (Feussner *et al.* 1997a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu zunächst die biochemischen Charakteristika des rekombinanten Enzyms gegenüber Triglyceriden eingehend untersucht (vgl. 6.1), um dann die in der Arbeitsgruppe etablierte HPLC-Trennung für oxidierte Triglyceridmoleküle (Feussner *et al.* 1997a) zur Unterscheidung von LOX-Formen zu nutzen. So wurde erwartet, dass es einerseits LOX-Formen gibt, die diese Moleküle vollständig umzusetzen vermögen und andererseits solche LOX-Formen existieren, die nur freie PUFAs metabolisieren können. Hier zeigte sich jedoch bei dem Vergleich der Lipidkörper-LOX der Gurke mit LOX-1 aus Sojasamen, dass die Unterschiede nicht eindeutig sind. Während das erste Enzym in der Lage war alle Fettsäurereste von Trilinolein vollständig zu oxidieren, vermochte das zweite Enzym dies nur unvollständig. Wie sich in den nachfolgend beschriebenen Arbeiten weiter zeigte, gibt es demgegenüber aber LOX-Isoformen, die eindeutig keine veresterten PUFAs akzeptieren, wie jene LOX des Endosperms der Olive (vgl. 6.2) oder die chloroplastidären 13-LOXs der Gerste (vgl. 6.5).

Diese hochspezifische Eigenschaft bestimmter LOXs komplexe Substrate wie Trilinolein zu oxidieren, gibt Hinweise auf spezifische physiologische Funktionen bestimmter 13-LOXs. Außerdem stellte dieser Befund eine weitere wichtige Unterscheidungsmöglichkeit innerhalb der sehr umfangreichen Familie der 13-LOXs dar. Es wäre möglich, dass eine Gruppe von 13-LOXs existiert, die hauptsächlich an der Oxidation freier PUFAs beteiligt ist, die anschließend nicht nur in der  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden, sondern in erster Linie der Biosynthese der enormen Vielfalt an Metaboliten des LOX-Reaktionsweges dienen. Eine andere Gruppe wiederum könnten die 13-LOXs darstellen, die in der Lage sind veresterte PUFAs

zu oxidieren und somit für Veränderungen in der Membranstruktur verantwortlich oder am Abbau von Speicherlipiden beteiligt sind.

## 2.2 Biochemische Charakterisierung von LOXs aus Oliven

Eines der wohl am längsten bekannten Pflanzenöle ist das Olivenöl. Es zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es ohne vorherige Reinigung direkt konsumiert werden kann. Olivenöl ist jedoch mit einem bedeutenden Qualitätsproblem behaftet. Es wird durch die Oxidation von PUFAs ranzig. Hierfür werden unter anderem Fettsäurehydroperoxide und deren Abbauprodukte verantwortlich gemacht (Salas *et al.* 2000). Insbesondere die weitere Umsetzung der Fettsäurehydroperoxide zu Verbindungen, wie z. B. Hexanal und (3Z)-Hexenal, kann zudem einen unangenehmen Geruch und Geschmack verursachen (Boskou 1996, Olias *et al.* 1993). Während die Autoxidation von PUFAs schon seit langem eingehend untersucht wurde (Frankel *et al.* 1977a, Frankel *et al.* 1977b, Frankel *et al.* 1977c, Frankel *et al.* 1982, Frankel *et al.* 1990), ist über die enzymatischen Oxidationsprozesse nur wenig bekannt. Neben der Autoxidation wurde die Beteiligung einer oder mehrerer LOX(s) und von Enzymen des LOX-Reaktionsweges, wie z. B. HPL, vorgeschlagen (Boskou 1996). Kürzlich wurde dann in kalt gepresstem Olivenöl eine LOX detektiert (Georgalaki *et al.* 1998b).

Die biochemische Charakterisierung dieser LOX aus Olivenöl und Ölkörpern des Endosperms von Oliven wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (vgl. 6.2). HPLC- und <sup>1</sup>H-NMR-Analysen zeigten, dass Olivenöl ca. 1,6 % nicht an Glycerin gebundenes 13-HPOD enthält, das aufgrund der Aktivität einer 13-LOX aus freier Linolsäure gebildet wurde (vgl. 6.2). Das pH-Optimum dieser 13-LOX konnte mittels LOX-Aktivitätsmessungen mit pH 5,5 bis 6,0 bestimmt werden (vgl. 6.2). Bei der Untersuchung der Substratspezifität mit dem oben etablierten Testsystem wurde eine eindeutige Präferenz des Enzyms für freie PUFAs beobachtet (vgl. 6.2). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erkenntnis, dass freie PUFAs die bevorzugten Substrate der meisten löslichen pflanzlichen LOXs unter physiologischen Bedingungen sind (Feussner und Wasternack 2002).

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von LOX-Aktivität im Olivenöl konnte durch die Untersuchung des Endosperms von Oliven auf LOX-Formen gefunden

werden. Die chromatographische Auftrennung von Proteinextrakten dieses Gewebes zeigte, dass LOX-Aktivität beinahe ausschließlich mit einer hochmolekularen Fraktion assoziiert ist (vgl. 6.2). Lichtmikroskopische Analysen dieser Fraktion in Kombination mit der Bestimmung des Phosphat-, Lipid- und Proteingehalts, deuteten auf eine Assoziation der LOX-Aktivität mit der Membran von Ölkörpern hin (vgl. 6.2). Die biochemische Charakterisierung dieser LOX-Aktivität ergab ein pH-Optimum von 6,0 und Aktivitätsmessungen bei verschiedenen Temperaturen zeigten eine überraschend hohe Stabilität der enzymatischen Aktivität bis zu einer Temperatur von 55 °C. Nach Bestimmung der Produkt- und Substratspezifität konnte auch diese LOX-Aktivität, analog zu der aus Olivenöl, als eine 13-LOX mit Präferenz für freie Fettsäuren identifiziert werden (vgl. 6.2).

Aufgrund der erhaltenen Resultate liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Ölkörper-13-LOX des Endosperms von Oliven und der 13-LOX aus Olivenöl um ein und dasselbe Enzym handelt, dessen katalytische Aktivität bei der Herstellung von kalt gepresstem Olivenöl zumindest teilweise erhalten bleibt.

Im Vergleich zur Lipidkörper-LOX der Gurke weist die hier untersuchte Ölkörper-13-LOX aus Oliven deutliche Unterschiede bezüglich der biochemischen Eigenschaften auf. Vor allem aber spricht die Präferenz der Ölkörper-LOX für freie Linolsäure dafür, dass sie im Gegensatz zur Lipidkörper-LOX der Gurke nicht am Katabolismus der Reservelipide während der Samenkeimung beteiligt ist und man hier auf eine bisher noch nicht bekannte physiologische Funktion schließen muss.

### **2.3 Biochemische Charakterisierung von LOXs aus Gerste**

Gerstenblätter zeigen nach Behandlung mit Jasmonsäure oder JM einen der natürlichen Blattseneszenz ähnlichen Phänotyp (Wasternack und Parthier 1997). Neben dem Vergilben der Blätter kommt es dabei zum Abbau chloroplastidärer Membranen und der Induktion von Proteinen, die auch als Jasmonat-induzierte Proteine bezeichnet werden (Weidhase *et al.* 1987). Mindestens drei dieser Proteine konnten als LOXs identifiziert und anhand ihrer Molekulargewichte von 92, 98 und 100 kDa (LOX-92, LOX-98, LOX-100) unterschieden werden (Feussner *et al.* 1995a). Die biochemische Charakterisierung ergab, dass es sich bei allen untersuchten LOX-Formen um 13-LOXs mit einem sauren pH-Optimum zwischen pH

5 und 6,5 handelt (vgl. 6.3). Ähnliche Resultate wurden auch für chloroplastidäre LOXs aus Kartoffel gefunden (Royo *et al.* 1996).

Eingehende Untersuchungen zur Substratspezifität von chloroplastidären LOXs aus Gerste anhand des oben etablierten Testsystems zeigten auch hier eine Präferenz für freie PUFAs (vgl. 6.5). Dieses Ergebnis bestätigt einmal mehr die Tatsache, dass freie PUFAs die bevorzugten Substrate der meisten löslichen pflanzlichen LOXs sind (Feussner und Wasternack 2002). Untersuchungen zur Blattseneszenz haben gezeigt, dass dieser Prozess unter anderem mit einem massiven Abbau der Galaktolipide einhergeht (Gut und Matile 1989). Da diese vorwiegend  $\alpha$ -Linolensäure als Fettsäurereste enthalten, könnte die beobachtete Präferenz der im seneszenten Gerstenblatt induzierten und hier untersuchten chloroplastidären 13-LOXs für freie  $\alpha$ -Linolensäure ein Hinweis auf deren Beteiligung am Lipidkatabolismus während der Blattseneszenz sein. Die Vermutung, dass ähnlich wie beim Abbau der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen (Feussner *et al.* 1997a) die 13-LOXs der Gerste in der Lage sind, Membranlipide direkt zu oxidieren, erscheint aufgrund der hier erhaltenen Resultate eher unwahrscheinlich. In diesem Fall muss wohl vielmehr davon ausgegangen werden, dass die freien PUFAs durch eine bisher noch nicht charakterisierte Lipase für die LOX-Reaktion bereitgestellt werden, wie dies in einem alternativen Modell vorgeschlagen wurde (Feussner und Wasternack 1998).

### 3 Endogenes Vorkommen von LOX-Metaboliten

Durch die biochemische Analyse des gereinigten- bzw. des rekombinanten Enzyms können Hinweise auf seine Aktivität *in vitro* gewonnen werden. Jedoch durch die Analyse des endogenen Vorkommens seiner Metaboliten im gesamten Gewebe und/oder im isolierten Organell lässt sich die enzymatische Aktivität von Enzymen schließlich auch *in vivo* zurückverfolgen. Daher sollte mit Beginn dieser Arbeit parallel zur biochemischen Analyse der isolierten Proteine eine vergleichende Kartierung von Metaboliten des LOX-Reaktionsweges unter verschiedenen physiologischen Bedingungen begonnen werden. Dies sollte insbesondere im Fall der chloroplastidären 13-LOXs eine weitere zentrale Möglichkeit darstellen, mehrere und zudem am gleichen Ort lokalisierte LOXs mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften zu unterscheiden. Um weitere Hinweise auf mögliche physiologische Funktionen chloroplastidärer LOXs der Gerste zu erhalten, wurde eine unterschiedliche Behandlung der Gerstenblätter (vgl. 6.3 und 6.4) durchgeführt, was auf Ebene der Proteine ein differenziertes Muster von LOXs zur Folge hat. So sind der zeitliche Verlauf, die Intensität sowie das Isoformenmuster über den Induktionszeitraum chloroplastidärer LOXs bei der Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit JM, Sorbit oder SA verschieden. Während die exogene Applikation von JM eine drastische Induktion von LOX-100, LOX-98 und LOX-92 zur Folge hat (Feussner *et al.* 1995a), führt ein Anstieg des endogenen Jasmonatgehalts durch osmotischen Stress mit Sorbit nicht zu einer nachweisbaren Induktion dieser LOX-Formen auf Ebene der Proteine (Vörös *et al.* 1998).

#### 3.1 Oxylipine in Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten

Die Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit Sorbit führt zu einem seneszenz-ähnlichen Phänotyp, ähnlich dem nach JM-Behandlung sowie einem transienten Anstieg des endogenen Gehalts an Jasmonsäure (Lehmann *et al.* 1995), Jasmonsäure-Aminosäure-Konjugaten (Kramell *et al.* 1995) und C<sub>18</sub>-Verbindungen, wie z. B. *cis*-(+)-OPDA, die auch als "Oktadekanoide" bezeichnet werden (Kramell *et al.* 2000). Dieser erhöhte Gehalt an Jasmonaten deutet darauf hin, dass eine Behandlung mit Sorbit unter anderem zur Aktivierung von Enzymen der "Jasmonsäure-Kaskade" zu führen scheint. In einer vorangegangenen Arbeit konnte unter



diesen Bedingungen bereits *in vitro* die Aktivität einer vermutlich konstitutiv vorhandenen LOX nachgewiesen werden (Feussner *et al.* 1995c). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund *in vivo* weiterverfolgt und es sollte außerdem festgestellt werden, ob auch andere Enzymaktivitäten des LOX-Reaktionsweges nachweisbar sind. Hierzu erfolgte in Extrakten aus Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten die quantitative Messung repräsentativer Metabolite mittels HPLC (vgl. 6.4). Zusätzlich zu der bereits erwähnten Jasmonsäure konnten (2*E*)-Hexenal (Metabolit des HPL-Reaktionsweges) und 13-HOT (Metabolit des Reduktase-Reaktionsweges) als weitere repräsentative Produkte erstmalig nachgewiesen werden. Der Gehalt an (2*E*)-Hexenal war dabei am höchsten, der an 13-HOT am geringsten (vgl. 6.4). Diese Ergebnisse belegen, dass in Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten die drei Wege, die durch AOS, HPL bzw. Reduktase katalysiert werden, aktiv sind. Hingegen ganz andere Resultate ergaben die Untersuchungen nach JM- bzw. SA-Behandlung. In beiden Fällen scheint jeweils nur ein einzelner, von der Art der Behandlung abhängiger und somit ganz spezifischer Reaktionsweg aktiv zu sein. So wurden in mit JM behandelten Gerstenblattsegmenten hauptsächlich Metabolite des HPL-Reaktionsweges (s. 3.2), in SA-behandelten nur Metabolite des Reduktase-Reaktionsweges (Weichert *et al.* 1999) nachgewiesen. Da, wie bereits zu Beginn erwähnt, die unterschiedlichen Behandlungsarten auf Ebene der Proteine zu einem differenzierten Muster der LOX-Formen führen, könnte man eine Interaktion spezifischer LOX-Formen mit diesen spezifischen Reaktionsabfolgen annehmen.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass der relative Gehalt verschiedener Oktadekanoide und Jasmonate von Pflanzenspezies zu Pflanzenspezies variiert. Seither wird angenommen, dass durch die bevorzugte Akkumulation ausgewählter Oktadekanoide oder davon abgeleiteter Verbindungen in einer Pflanze ein für jede Pflanze ganz spezifisches Muster entsteht, das man als „Oxylipin Signatur“ bezeichnet und ein spezifisches Signal bei der entsprechenden Stressantwort sein könnte (Weber 2002). Ganz analog dazu könnten neben Metaboliten der "Jasmonat-Kaskade" auch jene des Reduktase- und des HPL-Zweigs des LOX-Reaktionsweges aufgrund der unterschiedlichen Akkumulation von 13-HOT bzw. (2*E*)-Hexenal nach SA bzw. JM-Behandlung eine gewisse Signalwirkung besitzen. Hierfür spricht die Expression von *PR1b* unter Bedingungen, die zur Akkumulation von 13-HOT führen, wie z. B. nach SA-Behandlung (Weichert *et al.* 1999). Inwie-

weit in diesem Zusammenhang die verhältnismäßig unspezifische Akkumulation von Oxylipinen bei Sorbit-Behandlung eine physiologische Funktion besitzt, lässt sich im Moment aber anhand der vorliegenden Daten nicht abschätzen.

### 3.2 Oxylipine in JM-behandelten Gerstenblattsegmenten

Während es für die Induktion von LOXs durch den endogenen Anstieg von Jasmonaten in Gerstenblättern bis jetzt keine Belege zu geben scheint, ist die Induktion von LOXs durch exogene Applikation von JM bereits mehrfach dokumentiert worden (Feussner *et al.* 1995a, Feussner *et al.* 1995c, Kohlmann *et al.* 1999, Vörös *et al.* 1998). Gemäß der Fragestellung nach möglichen physiologischen Funktionen von JM-induzierten LOXs, erfolgte neben der biochemischen Charakterisierung (s. 2.3 und vgl. 6.3) auch deren Analyse im Totalextrakt JM-behandelter Gerstenblattsegmente. Dazu wurde zunächst eine Kartierung von Metaboliten des LOX-Reaktionsweges in diesem System vorgenommen (vgl. 6.3 und 6.5).

In grünen Blättern findet man vor allem PUFAs als Hauptbestandteile der Lipide, wobei  $\alpha$ -Linolensäure den Hauptteil ausmacht (Gunstone *et al.* 1994). So führt dann auch eine Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit JM bereits nach einigen Stunden zu einer drastischen Erhöhung des Gehalts dieser Fettsäuren in ihrer freien Form (vgl. 6.5). Über einen Zeitraum von 72 h wurde eine transiente Akkumulation dieser PUFAs mit jeweils einem Maximum nach 18 h JM-Behandlung beobachtet. Das dabei gefundene Verhältnis zwischen  $\alpha$ -Linolen- und Linolsäure betrug 10 : 1 und entspricht damit dem natürlichen Vorkommen dieser Fettsäuren im Blattgewebe. Daraus kann man schließen, dass die beteiligte Lipase zumindest zwischen diesen beiden Fettsäuren nicht unterscheiden kann.

Linolsäure wie auch  $\alpha$ -Linolensäure sind Substrate von LOXs und werden durch sie zu Hydroperoxyfettsäuren umgesetzt. Dabei können Regioisomere der Position 9- bzw. 13 gebildet werden (s. Abb. 2). In JM-behandelten Gerstenblattsegmenten konnte als Hauptmetabolit jeweils das Isomer bei dem der Sauerstoff an Kohlenstoffatom 13 eingefügt wurde, nachgewiesen werden. Aus Linolsäure bildete sich somit 13-HPOD und aus  $\alpha$ -Linolensäure 13-HPOT. Diese Ergebnisse *in vivo* bestätigen anschaulich die *in vitro* Befunde der biochemischen Charakterisierung (s. 2.3), dass es sich bei den untersuchten JM-induzierten chloroplastidären

LOXs tatsächlich ausschließlich um Linolsäure-13-LOXs handelt. Ein weiterer wichtiger Befund war, dass alle nachgewiesenen Lipidhydroperoxide ausschließlich enzymatisch gebildet wurden, da sie alle als *S*-Enantiomere vorlagen. Auch Regioisomere der  $\alpha$ -Linolensäure, wie 16- bzw. 12-HPOT, die durch Autoxidation entstehen würden und die in 6.4 genau charakterisiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich folgern, dass trotz der unter diesen Bedingungen erstmalig endogen beobachteten dramatischen Akkumulation von Fettsäurehydroperoxiden offensichtlich noch keine sekundären Oxidationsreaktionen initiiert werden. Anders stellt sich scheinbar die Situation in natürlich gealterten Blättern von Bäumen und *Arabidopsis thaliana* dar. In einer auf den Ergebnissen von 6.4 aufbauenden Arbeit zeigte sich, dass in diesen Geweben fast nur für autoxidative Prozesse typische Oxylipine nachgewiesen wurden (Berger *et al.* 2001). Aufgrund des endogenen Vorkommens der durch LOXs gebildeten, hoch toxischen Lipidhydroperoxide in JM-behandelten Gerstenblattsegmenten stellte sich nun die Frage, wie deren weiterer Katabolismus innerhalb des LOX-Reaktionsweges erfolgte. Eine wichtige Reaktionssequenz im pflanzlichen Lipidkatabolismus stellt die Umsetzung der Fettsäurehydroperoxide durch HPL und die ihr nachfolgenden Enzyme dar (Hatanaka *et al.* 1995). Die Spaltung der Fettsäurehydroperoxide von  $\alpha$ -Linolen- bzw. Linolsäure führt zu (3*Z*)-Alkenalen bzw. zum gesättigten Aldehyd Hexanal und  $\omega$ -Oxofettsäuren (Matsui 1998). Während über den weiteren Metabolismus der  $\omega$ -Oxofettsäuren bisher sehr wenig bekannt ist, stellen die (3*Z*)-Alkenale einen weiteren Verzweigungspunkt dar. Durch die Reduktion mittels Alkoholdehydrogenasen (ADHs) können einerseits (3*Z*)-Alkenole entstehen, die mit kurzkettigen Karbonsäuren flüchtige Ester bilden (Hatanaka *et al.* 1995). Andererseits können aus den (3*Z*)-Alkenalen durch (3*Z*):(2*E*)-Enoyl-Isomerasen (2*E*)-Alkenale entstehen, die dann ebenfalls durch ADHs reduziert und anschließend verestert werden (Noordermeer *et al.* 1999, Phillips *et al.* 1979). Es wird sogar noch eine weitere Reaktion für (3*Z*)-Alkenale vorgeschlagen. So sollen diese Aldehyde erneut Substrate für LOXs darstellen können und die entstehenden (2*E*)-4-Hydroperoxy-2-aldehyde mittels POX zu (2*E*)-4-Hydroxy-2-aldehyden reduziert werden (Gardner und Grove 1998, Gardner und Hamberg 1993). Ob die Bildung von (2*E*)-4-Hydroxy-2-aldehyden tatsächlich enzymatisch erfolgt oder doch eher unspezifische, autoxidative Prozesse dafür verantwortlich

sind, wird aber derzeit noch diskutiert (Gardner und Grove 1998, Noordermeer *et al.* 2000, Schneider *et al.* 2001).

Bei der Untersuchung des Lipidkatabolismus von JM-behandelten Gerstenblattsegmenten konnten die für die HPL-Reaktion typischen Aldehyde *in vivo* nachgewiesen werden, wobei (2*E*)-Hexenal deutlich dominierte (vgl. 6.3). Es wurde weiterhin eine deutliche, wenn auch wesentlich geringere Zunahme an Hydroxyfettsäuren im Verlauf der JM-Behandlung beobachtet, was auf eine Aktivierung des Reduktase-Reaktionsweges hinzudeuten scheint. In diesem Zusammenhang sei bemerkt, dass eine Reduktase bisher noch nicht isoliert und charakterisiert werden konnte. Bisher ist nicht auszuschließen, dass die Bildung dieser Hydroxyfettsäuren unspezifisch auf chemischem Weg, z. B. durch Reduktion mittels Glutathion (Feussner *et al.* 1998b), erfolgt. Diese letztere Reaktion könnte dann eine sehr effektive Art eines breiten Schutzmechanismus vor einer zu hohen Konzentration der hoch toxischen Lipidperoxide in der Zelle darstellen. Weder für den AOS- noch für den DES-Reaktionsweg konnten die charakteristischen Metabolite nachgewiesen werden. Damit scheint unter diesen Bedingungen (2*E*)-Hexenal nicht nur der dominierende Metabolit des HPL-Reaktionsweges, sondern in diesem Fall sogar des gesamten LOX-Reaktionsweges zu sein (vgl. 6.5).

Das gezielte "An-" und/oder "Abschalten" von Reaktionssequenzen des LOX-Reaktionsweges unter JM bzw. SA läßt auf einen komplexen Regulationsmechanismus dieses Stoffwechsels schließen. Inwieweit LOX-Isoformen bzw. LOX-Produkte selbst daran beteiligt sind, ist derzeit noch unklar. Die hier erhaltenen Resultate geben jedoch Hinweise auf die spezifische Funktion einer LOX-Isoform. So könnte man im JM-behandelten Gerstenblatt auf eine direkte Interaktion einer bestimmten chloroplastidären LOX mit einer 13-HPL schließen. Es wäre denkbar, dass die dominierende JM-induzierte chloroplastidäre LOX aus Gerste (LOX-100) unter diesen Bedingungen ganz spezifisch für die Substratbereitstellung für die HPL-Reaktion verantwortlich ist.

### **3.3 Lokalisation von LOX-Metaboliten in Chloroplasten**

Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von LOXs in Blättern der Gerste zeigten, dass LOXs in diesem Gewebe ausschließlich in den Chloroplasten zu finden sind (Feussner *et al.* 1995a). Durch eine Analyse des Produktspektrums

sollte hier die Lokalisation auf Subfraktionen dieses Kompartimentes ausgedehnt werden (vgl. 6.5). Aus diesem Grund wurde neben der Analyse des endogenen Vorkommens von LOX-Produkten im Totalextrakt von Gerstenblattsegmenten (s. 3.1 und 3.2) auch deren Analyse in Protoplasten, Chloroplasten und Subfraktionen von Chloroplasten durchgeführt (vgl. 6.5). Die dabei beobachtete bevorzugte Akkumulation von 13-HOT im Stroma der Chloroplastenpräparationen von unbehandelten Primärblättern der Gerste bestätigt die bereits im Totalextrakt gefundene Aktivität von 13-LOX(s) und legt deren Vorkommen in diesem Subkompartiment nahe. Zudem wurde erneut die bevorzugte Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure, dem Hauptbestandteil chloroplastidärer Membranen beobachtet. Bei der Analyse der chloroplastidären Subfraktionen JM-behandelter Gerstenblattsegmente wurde 13-HOT nicht nur im Stroma, sondern auch in den Thylakoiden gefunden (vgl. 6.5). Neben der Ausbildung eines Seneszenz-ähnlichen Phänotyps und der Induktion von mindestens drei chloroplastidären Linolsäure-13-LOXs (s. 2.3) führt die Behandlung von Gerstenblättern mit JM zu drastischen morphologischen Veränderungen innerhalb der Chloroplasten (vgl. 6.5; Hause *et al.* 1994). Besonders auffällig sind dabei die dramatischen Veränderungen der Ultrastruktur der Thylakoide, bei denen nach einer Behandlung von 24 h mit JM eine deutlich verminderte Anzahl intakter Thylakoidstapel und Thylakoidmembranen beobachtet wurde (vgl. 6.5). Im Fall der Gerste ist die Herkunft der gemessenen Hydroxyfettsäuren noch nicht geklärt. Einerseits könnte die Zerstörung der Kompartimentierung durch den Abbau chloroplastidärer Membranen für das Auftreten von 13-HOT in der Fraktion der Thylakoide in diesem System verantwortlich sein. Andererseits erfolgt die Akkumulation der Hydroxyfettsäuren parallel zum Abbau der Galaktolipide im seneszenten Gerstenblatt (Gut und Matile 1989), so dass es auch denkbar wäre, dass das spezifische Vorkommen der LOX-Isoformen in den Chloroplasten der Gerste auf eine spezifische Funktion dieser LOXs beim Abbau der Thylakoidmembranen, hier aber auf Ebene der freien Fettsäuren, hinweist (Feussner und Wasternack 1998).

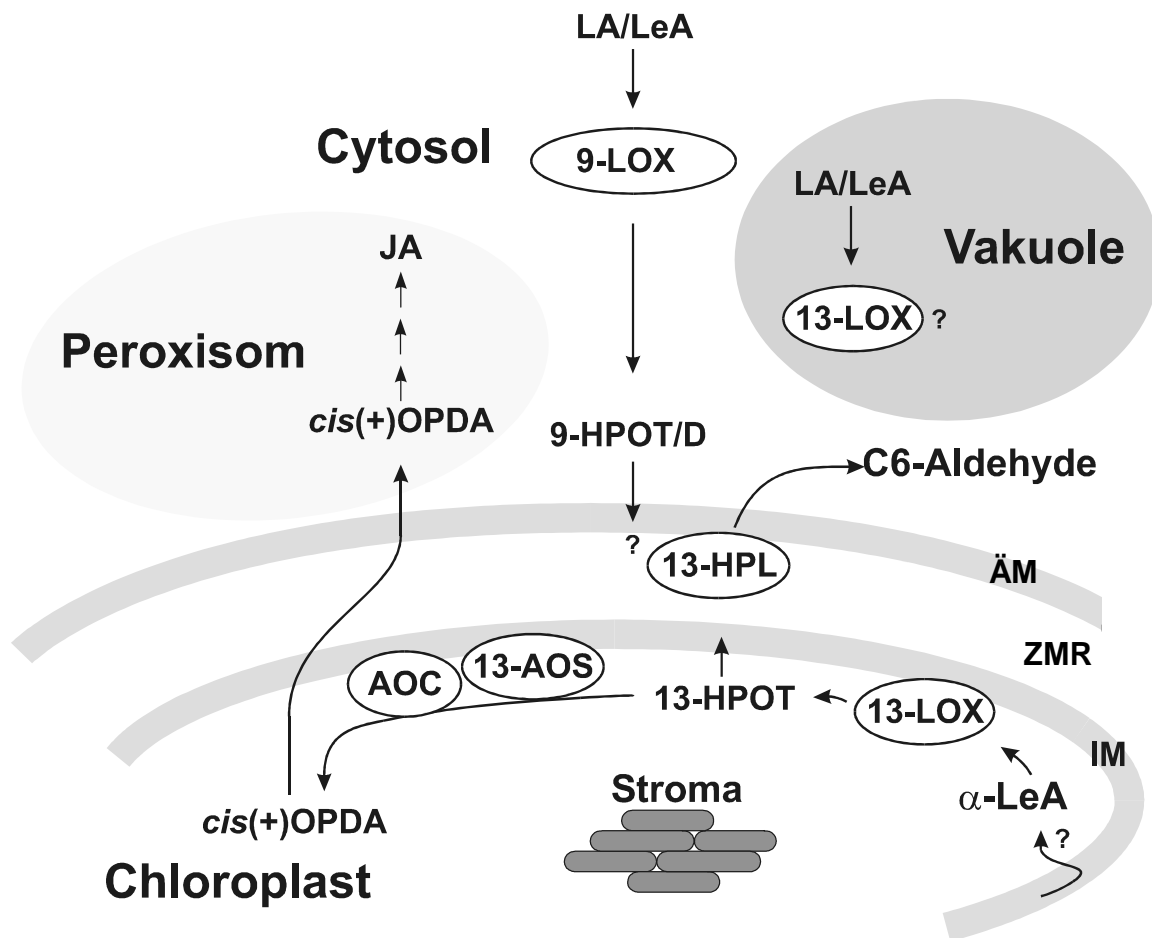


Abb. 4. Intrazelluläre Lokalisation der Reaktionen des LOX-Reaktionsweges (nach Feussner und Wasternack 2002). ÄM/IM: Äußere und Innere Membran der Chloroplastenhülle; AOC: Allenoxid-Cyclase; AOS: Allenoxid-Synthase; HPL: Hydroperoxidlyase; HPO(D/T): Hydroperoxylinol(en)säure; LA/LeA: Linol-/Linolensäure, LOX: Lipoxygenase; ZMR: Zwischenmembranraum.

Gemäß einem Modell zur intrazellulären Lokalisation der Reaktionen des LOX-Reaktionsweges (s. Abb. 4) wird eine komplexe Kompartimentierung der beteiligten Enzyme vorgeschlagen. Dies ist zur Zeit besonders gut für eine Vielzahl von LOXs verschiedener Spezies und die *CYP74*-Enzyme HPL und AOS bei Tomate untersucht. So scheinen im Cytosol ubiquitär nur 9-LOXs angetroffen zu werden, während man im Chloroplasten bisher nur 13-LOXs gefunden hat. Demzufolge sollten in Chloroplasten (13S)-Hydroperoxid metabolisierende *CYP74*s vorwiegend in der inneren, (9S)-Hydroperoxid metabolisierende *CYP74*s dagegen eher in der äußeren Hülle lokalisiert sein. Andererseits fand man bei Tomate eine 13-AOS in der inneren Hüllmembran und eine HPL, ebenfalls mit Spezifität für (13S)-Hydroperoxide, in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten (Froehlich *et al.* 2001). Weiter wird für 9-LOXs vorgeschlagen, dass deren Substrat aus dem Pool der PUFA-CoA-Ester des Cytosols stammen könnte. Für chloroplastidäre 13-

LOXs wird hingegen angenommen, dass deren Substrat, d. h. vorwiegend freie  $\alpha$ -Linolensäure, durch eine Phospholipase A<sub>1</sub> aus den Chloroplastenmembranen freigesetzt wird (Feussner und Wasternack 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Lokalisation von Metaboliten der 13-LOX-Reaktion auf Ebene der freien PUFAs in der Stroma- und der Thylakoid-Fraktion von Chloroplasten JM-behandelter Gerstenblätter und die in diesem System beobachteten Veränderungen der Ultrastruktur der Thylakoide sowie auch die beobachtete Lokalisation von Metaboliten der 9-LOX-Reaktion im Cytosol (vgl. 6.5) stehen somit im Einklang mit diesem Modell.

*weiterführende Arbeiten:*

Die Kompartimentierung des LOX-Reaktionsweges beginnt man erst allmählich zu verstehen. AOS wurde mit Ausnahme einer Latex bildenden Pflanze (Pan *et al.* 1995) in Chloroplasten gefunden (Harms *et al.* 1995, Maucher *et al.* 2000, Froehlich *et al.* 2001). In *in vitro* Import-Experimenten an Chloroplasten aus Tomate konnte gezeigt werden, dass AOS in der inneren Hüllmembran mit Ausrichtung ins Stroma lokalisiert, HPL jedoch in der äußeren Hüllmembran mit Orientierung in den Membranzwischenraum zu finden ist (Froehlich *et al.* 2001). Um zu klären, ob das bestehende Kompartimentierungsmodell (s. Abb. 4) generelle Gültigkeit hat oder nur einen Spezialfall repräsentiert, müssen demnach noch weitere Untersuchungen zur Lokalisation und der Substratspezifität der *CYP74s* in verschiedenen Pflanzenspezies durchgeführt werden. Aufgrund der vorgeschlagenen Kompartimentierung wird es interessant sein, die Mechanismen des daraus resultierenden Substrattransfers zu untersuchen.

Auch über die Regulation des LOX-Reaktionsweges ist bisher nur wenig bekannt. Am besten untersucht ist zur Zeit die Jasmonsäure-Biosynthese, für deren Regulation Faktoren verantwortlich zu sein scheinen wie z. B. die Bereitstellung von Substrat aufgrund externer Stimuli, gewebespezifische Bildung und Akkumulation von Jasmonsäure sowie die Umwandlung von Jasmonsäure in JM oder in das flüchtige Abbauprodukt *cis*-Jasmon, was zu einer zeitlich und räumlich differenzierten Funktion des Jasmonsäure-Signals führen kann (vgl. Feussner und Wasternack 2002). Der HPL-Reaktionsweg scheint ebenfalls über die Substratverfügbarkeit reguliert zu sein. Hier scheint es sich um eine gleichzeitige organspezifische und Wund-induzierte Aktivierung auf Transkriptionsebene zu handeln.

Noch viel weniger ist über die Regulation der anderen Verzweigungen des LOX-Reaktionsweges bekannt. Es bleibt zu klären, ob auch Regulationsmechanismen, wie z. B. Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen und/oder Proteinabbauprozesse, im regulatorischen Netzwerk des LOX-Reaktionsweges existieren. Zumindest für die Jasmonatsignaltransduktion sind Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch einen pharmakologischen Ansatz belegt (Rojo *et al.* 1998), und die Beteiligung von ubiquitinabhängigem Proteinabbau ist mit der Identifizierung der Jasmonat-insensitiven Arabidopsis-Mutante *coi1*, die in einem F-Box-Protein-kodierenden Gen gestört ist, bewiesen (Xie *et al.* 1998).

Weitere Einblicke in die physiologische Rolle der am LOX-Stoffwechsel beteiligten Enzyme bzw. deren Metabolite bei der pflanzlichen Entwicklung sowie bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen könnten mit Hilfe hinsichtlich des LOX-Reaktionsweges genetisch veränderter Pflanzen erhalten werden. Interessant wäre dabei die Herstellung und Untersuchung von Mutanten, bei denen Gene, die für Enzyme des LOX-Reaktionsweges kodieren inaktiviert bzw. erhöht sind. Die im Rahmen dieser Arbeit wegen ihrer nach JM-Behandlung besonders gut ausgeprägten Seneszenzmerkmale verwendete Sommergerstenvarietät *Hordeum vulgare* L. cv. Salomé ist jedoch unter anderem wegen ihrer schweren Transformierbarkeit und der langen Regenerationszeit für derartige Experimente ungeeignet, weshalb zur Herstellung von Oxylin-Biosynthese-Mutanten z. B. *Arabidopsis thaliana* ein geeigneteres System darstellen würde.



## 4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Hinweise auf mögliche physiologische Funktionen pflanzlicher chloroplastidärer LOXs im Modellsystem Gerstenblatt zu erhalten.

Dazu wurde ein Testsystem etabliert, mit dem die biochemischen Eigenschaften verschiedener pflanzlicher LOXs analysiert wurden. Die Etablierung dieses Testsystems erfolgte anhand der gut untersuchten rekombinanten Lipidkörper-LOX aus Keimblättern der Gurke. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biochemischen Charakteristika des rekombinanten Enzyms bei Verwendung von Triglyceriden als Substrat eingehend untersucht und mit denen von LOX-1 aus Sojasamen verglichen. Während das erste Enzym in der Lage war alle Fettsäurereste eines Moleküls Trilinolein vollständig zu oxidieren, vermochte das zweite Enzym dies nur unvollständig. Die Untersuchung der LOX des Endosperms der Olive und der chloroplastidären 13-LOXs der Gerste mit diesem Testsystem zeigte, dass diese LOX-Isoformen im Gegensatz dazu keine veresterten PUFAs akzeptieren. Aufgrund der Präferenz der Ölkörper-LOX für freie PUFAs ist eine Beteiligung dieser LOX am Lipidmetabolismus während der Samenkeimung unwahrscheinlich und es muss auf eine bisher unbekannte physiologische Funktion geschlossen werden.

Des Weiteren wurde die Analytik für das endogene Vorkommen von LOX-Metaboliten anhand von nicht veresterten Hydro(pero)xyfettsäuren erstmalig etabliert und die freien Hydroxyfettsäuren im Gerstenblatt nach Behandlung mit Wasser, JM und Sorbit quantifiziert. In Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten wurden neben Jasmonsäure, (2E)-Hexenal (Metabolit des HPL-Reaktionsweges) und 13-HOT (Metabolit des Reduktase-Reaktionsweges) als weitere repräsentative Hauptprodukte erstmalig nachgewiesen. Der Gehalt an (2E)-Hexenal war dabei am höchsten, der an 13-HOT am geringsten. Es wurde belegt, dass in Sorbit-behandelten Gerstenblattsegmenten AOS-, HPL- und Reduktase-Reaktionsweg aktiv sind. In JM-behandelten Gerstenblattsegmenten wurden die für die HPL-Reaktion typischen Aldehyde *in vivo* nachgewiesen, wobei (2E)-Hexenal dominierte. Es wurde weiterhin eine deutliche, wenn auch wesentlich geringere Zunahme an Hydroxyfettsäuren im Verlauf der JM-Behandlung beobachtet, was auf eine Aktivierung des Reduktase-Reaktionsweges hindeutet.

Eine weitere Aufgabe bestand in der Lokalisation von LOXs und ihren Metaboliten innerhalb der Chloroplasten von Gerstenblättern. Dabei wurde eine bevorzugte Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure, dem Hauptbestandteil chloroplastidärer Membranen sowie eine Akkumulation von 13-HOT im Stroma der Chloroplastenpräparationen von unbehandelten Primärblättern der Gerste beobachtet. Bei der Analyse der chloroplastidären Subfraktionen JM-behandelter Gerstenblattsegmente wurde 13-HOT nicht nur im Stroma, sondern auch in den Thylakoiden gefunden.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit erhaltenen Resultate bestätigen mit einem anderen methodischen Ansatz ein erst kürzlich aufgestelltes Modell zur intrazellulären Lokalisation von Reaktionen des LOX-Reaktionsweges, in dem eine komplexe Kompartimentierung der beteiligten Enzyme, zudem in Abhängigkeit von ihrer Substratspezifität, vorgeschlagen wird. Hierbei scheinen chloroplastidäre 13-LOXs freie PUFAs als Substrat zu bevorzugen und diese in Abhängigkeit definierter Stimuli in sehr spezifische „Oxylipin Signaturen“ umzusetzen.

Die Frage nach einer möglichen physiologischen Funktion von JM-induzierten chloroplastidären LOXs aus Gerste kann noch nicht eindeutig beantwortet werden. Es ist weiterhin unklar, ob den gebildeten Lipidhydroperoxiden eine spezifische Funktion während der JM-induzierten Seneszenz zuzuschreiben ist. Eine mögliche Funktion der untersuchten chloroplastidären LOXs könnte sein, dass diese durch die Peroxidation von PUFAs die Zerstörung von Membranen verursachen, so dass Metabolite und ihre Stoffwechselprozesse nicht mehr getrennt sind und es damit zur ungerichteten Induktion weiterer Reaktionen des LOX-Reaktionsweges kommt, wie z. B. des HPL-Reaktionsweges in JM-behandelten Gerstenblättern. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate sprechen derzeit nicht dafür, dass die Peroxidation von Lipiden durch chloroplastidäre LOXs unmittelbar den Abbau von PUFAs als Bestandteil der Membranen einleitet, wie dies analog zu dem für die Keimung vorgeschlagenen Stoffwechselweg vermutet wurde. Im Augenblick scheint es wahrscheinlicher, dass diese Rolle einer der LOX-Reaktion vorgeschalteten Lipase zukommt.

## 5 Literatur

### Literatur

- Andre, E. & Hou, K.-W.** (1932) The presence of a lipid oxidase in soybean, glycine soya, Lieb. C. R. Acad. Sci. (Paris) 194, 645-647.
- Axelrod, B.** (1974) Lipoxygenases, ACS Adv. Chem. Ser. 136, 324-348.
- Bachem, C. W. B., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. & Visser, R. G. F.** (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development, *Plant J.* 9, 745-753.
- Bachmann, A., Hause, B., Maucher, H., Garbe, E., Vörös, K., Weichert, H., Wasternack, C. & Feussner, I.** (2002) Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts, *Biol. Chem.* 383, 1645-1657.
- Bachmann, A., Kohlmann, M., Wasternack, C. & Feussner, I.** (1998) Oxylipins in sorbitol-stressed barley leaf segments in *Advances in Plant Lipid Research* (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. & Martínez-Force, E., eds) pp. 288-290, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Bell, E., Creelman, R. A. & Mullet, J. E.** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8675-8679.
- Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kühn, H. & Feussner, I.** (2001) Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development, *Biochem. Biophys. Acta* 1533, 266-276.
- Blée, E.** (1996) Phytooxylipins: the peroxygenase pathway in *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (Piazza, G. J., ed) pp. 138-161, AOCS Press, Champaign, IL.
- Blée, E.** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions, *Prog. Lipid Res.* 37, 33-72.
- Blée, E. & Joyard, J.** (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides, *Plant Physiol.* 110, 445-454.
- Blée, E. & Schuber, F.** (1990) Efficient epoxydation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxid-dependent oxygenase, *J. Biol. Chem.* 265, 12887-12894.
- Boskou, D.** (1996) Changes caused by enzymes and oxidation. in *Olive Oil: Chemistry and Technology* (Boskou, D., ed) pp. 96-100, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.
- Bowsher, C. G., Ferrie, B. J. M., Ghosh, S., Todd, J., Thompson, J. E. & Rothstein, S. J.** (1992) Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit, *Plant Physiol.* 100, 1802-1807.
- Boyington, J.C., Gaffney, B.J. & Amzel, L.M.** (1993) Structure of soybean lipoxygenase-I, *Biochem. Soc. Trans.* 21, 744-748.

- Brash, A. R.** (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682.
- Brash, A. R., Ingram, C. D. & Harris, T. M.** (1987) Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids, *Biochemistry* 26, 5465-5471.
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355-381.
- Doderer, A., Kokkelink, I., Van der Veen, S., Valk, B. E., Schram, A. W. & Douma, A. C.** (1992) Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley, *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 97-104.
- Droillard, M. J., Rouet-Mayer, M. A., Bureau, J. M. & Lauriere, C.** (1993) Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp - characterization and involvement in membrane alterations, *Plant Physiol.* 103, 1211-1219.
- Eskin, N. A., Grossman, S. & Pinsky, A.** (1977) Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 9, 1-41.
- Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H.** (1998a) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro, *FEBS Lett.* 431, 433-436.
- Feussner, I., Balkenhohl, T. J., Porzel, A., Kühn, H. & Wasternack, C.** (1997a) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination, *J. Biol. Chem.* 272, 21635-21641.
- Feussner, I., Blée, E., Weichert, H., Rousset, C. & Wasternack, C.** (1998b) Fatty acid catabolism at the lipid body membrane of germinating cucumber cotyledons in *Advances in Plant Lipid Research* (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. & Martínez-Force, E., eds) pp. 311-313, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B. & Wasternack, C.** (1995a) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv Salome), *Plant J.* 7, 949-957.
- Feussner, I. & Kindl, H.** (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization, *FEBS Lett.* 298, 223-225.
- Feussner, I. & Kindl, H.** (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes - comparison of molecular and enzymatic properties, *Planta* 194, 22-28.
- Feussner, I. & Kühn, H.** (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity, *FEBS Lett.* 367, 12-14.
- Feussner, I. & Kühn, H.** (2000) Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids in *Enzymes in Lipid Modification* (Bornscheuer, U. T., ed) pp. 309-336, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Feussner, I., Kühn, H. & Wasternack, C.** (1997b) Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate  $\beta$ -oxidation?, *FEBS Lett.* 406, 1-5.

- Feussner, I., Kühn, H. & Wasternack, C.** (2001) The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids, *Trends Plant Sci.* 6, 268-273.
- Feussner, I. & Wasternack, C.** (1998) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids, *Fett/Lipid* 100, 146-152.
- Feussner, I. & Wasternack, C.** (2002) The lipoxygenase pathway, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53, 275-297.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H. & Kühn, H.** (1995b) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11849-11853.
- Feussner, I., Ziegler, J., Miersch, O. & Wasternack, C.** (1995c) Jasmonate- and stress-induced lipoxygenase forms in barley leaf segments (*Hordeum vulgare* cv. Salome) in *Plant Lipid Metabolism* (Kader, J.-C. & Mazliak, P., eds) pp. 292-294, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ford-Hutchinson, A. W., Gresser, M. & Young, R. N.** (1994) 5-Lipoxygenase, *Annu. Rev. Biochem.* 63, 383-417.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Rohwedder, W. K., Khambay, B. P. S., Garwood, R. F. & Weedon, B. C. L.** (1977a) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: I. methyl oleate, *Lipids* 12, 901-907.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Rohwedder, W. K., Khambay, B. P. S., Garwood, R. F. & Weedon, B. C. L.** (1977b) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: II. methyl linoleate, *Lipids* 12, 908-913.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Rohwedder, W. K., Khambay, B. P. S., Garwood, R. F. & Weedon, B. C. L.** (1977c) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: III. methyl linolenate, *Lipids* 12, 1055-1061.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Selke, E. & Weisleder, D.** (1982) Photosensitized oxidation of methyl linoleate: Secondary and volatile thermal decomposition products, *Lipids* 17, 11-18.
- Frankel, E. N., Neff, W. E. & Weisleder, D.** (1990) Determination of methyl linoleate hydroperoxides by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Meth. Enzymol.* 186, 380-387.
- Froehlich, J. E., Itoh, A. & Howe, G. A.** (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope, *Plant Physiol.* 125, 306-317.
- Funk, C. D.** (1996) The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1304, 65-84.
- Galliard, T. & Chan, H. W.-S.** (1980) Lipoxygenases in *The Biochemistry of Plants* (Stumpf, P. K. & Conn, E. E., eds) pp. 131-161, Academic Press, London.
- Gardner, H. W.** (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 221-239.
- Gardner, H. W. & Grove, M. J.** (1998) Soybean lipoxygenase-1 oxidizes 3Z-nonenal - A route to 4S-hydroperoxy-2E-nonenal and related products, *Plant Physiol.* 116, 1359-1366.

- Gardner, H. W. & Hamberg, M.** (1993) Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia-Faba* L), *J. Biol. Chem.* 268, 6971-6977.
- Georgalaki, M. D., Bachmann, A., Sotiroudis, T. G., Xenakis, A., Porzel, A. & Feussner, I.** (1998a) Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms, *Fett/Lipid* 100, 554-560.
- Georgalaki, M. D., Sotiroudis, T. G. & Xenakis, A.** (1998b) The presence of oxidizing enzyme activities in virgin olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 155-159.
- Gerhardt, B.** (1993) Catabolism of fatty acids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -oxidation) in *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, J., T.S., ed) pp. 527-565, CRC Press, London.
- Grossman, S., Ben-Aziz, A., Ascarelli, I. & Budowski, P.** (1972) Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves, *Phytochemistry* 11, 509-514.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Padley, F. B.** (1994) *The Lipid Handbook*, 2<sup>nd</sup> edition, Chapman & Hall, London.
- Gut, H. & Matile, P.** (1989) Breakdown of galactolipids in senescent barley leaves, *Bot. Acta* 102, 31-36.
- Hamberg, M.** (1986) Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica*, *Biochem. Biophys. Acta* 876, 688-692.
- Hamberg, M.** (1999) An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: Biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato, *Lipids* 34, 1131-1142.
- Harms, K., Atzorn, R., Brash, A., Kühn, H., Wasternack, C.** (1995) Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes, *Plant Cell* 7, 1645-1654.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T. & Matsui, K.** (1995) The biogeneration of green odour by green leaves and its physiological functions - past, present and future, *Z. Naturforsch.* 50c, 467-472.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J. & Wasternack, C.** (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles, *Plant J.* 24, 113-26.
- Hause, B., zur Nieden, U., Lehmann, J., Wasternack, C. & Parthier, B.** (1994) Intracellular localization of jasmonate-induced proteins in barley leaves, *Bot. Acta* 107, 333-341.
- Hildebrand, D. F.** (1989) Lipoxygenases, *Physiol. Plant.* 76, 249-253.
- Höhne, M., Nellen, A., Schwennesen, K. & Kindl, H.** (1996) Lipid body lipoxygenase characterized by protein fragmentation, cDNA sequence und very early expression of the enzyme during germination of cucumber seeds, *Eur. J. Biochem.* 241, 6-11.
- Holtman, W. L., Vanduijn, G., Sedee, N. J. A. & Douma, A. C.** (1996) Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley, *Plant Physiol.* 111, 569-576.

- Holtman, W. L., Vredenburg-Heistek, J. C., Schmitt, N. F. & Feussner, I.** (1997) Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley, *Eur. J. Biochem.* 248, 452-458.
- Hong, Y., Wang, T. W., Hudak, K. A., Schade, F., Froese, C. D. & Thompson, J. E.** (2000) An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8717-8722.
- Huang, A. H. C.** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs, *Plant Physiol.* 110, 1055-1061.
- Itoh, A. & Howe, G. A.** (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase: Identification as a CYP74 cytochrome P450, *J. Biol. Chem.* 276, 3620-3627.
- Kato, T., Ohta, H., Tanaka, K. & Shibata, D.** (1992) Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene, *Plant Physiol.* 98, 324-330.
- Kohlmann, M., Bachmann, A., Weichert, H., Kolbe, A., Balkenhohl, T., Wasternack, C. & Feussner, I.** (1999) Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment, *Eur. J. Biochem.* 260, 885-895.
- Kolesnikov, P.A.** (1950) *Dokl. Acad. Nauk. SSSR* 71, 1085-1088.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brückner, C., Schmidt, J., Sembdner, G. & Parthier, B.** (1995) Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue, *J. Plant Growth Regul.* 14, 29-36.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B. & Wasternack, C.** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin Signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways, *Plant Physiol.* 123, 177-88.
- Kühn, H., Eggert, L., Zabolotsky, O. A., Myagkova, G. I. & Schewe, T.** (1991) Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates, *Biochemistry* 30, 10269-10273.
- Landolt, R. & Matile, P.** (1990) Glyoxysome-like microbodies in senescent spinach leaves, *Plant Sci.* 72, 159-163.
- Lehmann, J., Atzorn, R., Bruckner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C. & Parthier, B.** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments, *Planta* 197, 156-162.
- Maccarrone, M., Van Aarle, P. G. M., Veldink, G. A. & Vliegthart, J. F. G.** (1994) In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2, *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 164-169.
- Matsui, K.** (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase, *Belgian J. Bot.* 131, 50-62.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwara, T. & Feussner, I.** (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber, *FEBS Lett.* 481, 183-188.

- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. & Wasternack, C.** (2000) Alkene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salomé): tissue specific regulation in seedling development, *Plant J.* 21, 199-213.
- Melan, M. A., Enriquez, A. L. D. & Peterman, T. K.** (1994) The LOX1 gene of arabidopsis is temporally and spatially regulated in germinating seedlings, *Plant Physiol.* 105, 385-393.
- Murphy, D. J.** (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, *Prog. Lipid Res.* 40, 325-438.
- Nellen, A., Rojahn, B. & Kindl, H.** (1995) Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane, *Z. Naturforsch.* 50c, 29-36.
- Nooden, L. D., Guamet, J. J. & John, I.** (1997) Senescence mechanisms, *Physiol. Plant.* 101, 746-753.
- Noordermeer, M. A., Feussner, I., Kolbe, A., Veldink, G. A. & Vliegenthart, J. F.** (2000) Oxygenation of (3Z)-alkenals to 4-hydroxy-(2E)-alkenals in plant extracts: A nonenzymatic process, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 112-116.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A. & Vliegenthart, J. F. G.** (1999) Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity und a 3Z : 2E-enal isomerase, *FEBS Lett.* 443, 201-204.
- Olias, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J. & Sanz, L. C.** (1993) Aroma of virgin olive oil - biogenesis of the green odor notes, *J. Agric. Food Chem.* 41, 2368-2373.
- Paliyath, G. & Droillard, M. J.** (1992) The mechanisms of membrane deterioration und disassembly during senescence, *Plant Physiol. Biochem.* 30, 789-812.
- Pan, Z., Durst, F., Wreck-Reichart, D., Gardner, H.W., Camara, B., Cornish, K., Backhaus, R.A.** (1995) The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450, *J. Biol. Chem.* 100, 8487-8494.
- Parthier, B.** (1991) Jasmonates, new regulators of plant growth und development: many facts und few hypotheses on their actions, *Bot. Acta* 104, 446-454.
- Phillips, D. R., Matthew, J. A., Reynolds, J. & Fenwick, G. R.** (1979) Partial purification und properties of a cis-3:trans-2-enal isomerase from cucumber fruit, *Phytochem.* 18, 401-404.
- Pinsky, A., Grossman, S. & Trop, M.** (1971) Lipoxygenase content und antioxidant activity of some fruits und vegetables, *J. Food Science* 36, 571-572.
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E. & Amasino, R. M.** (2000) Molecular aspects of leaf senescence, *Trends Plant Sci.* 5, 278-282.
- Rapoport, S. M., Schewe, T., Wiesner, R., Halang, W., Ludwig, P., Janicke-Hoehne, M., Tannert, C., Hiebsch, C. & Klatt, D.** (1979) The lipoxygenase of reticulocytes, *Eur. J. Biochem.* 96, 545-561.
- Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G. & Sanchez-Serrano, J.J.** (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent wound signal transduction pathway in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 13, 153-165.



- Roloff, A., Parthier, B. & Wasternack, C.** (1994) Relationship between degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase oxygenase and synthesis of an abundant protein of 23 kDa of barley leaves (*Hordeum vulgare* L. cv. Salomé) induced by jasmonates, *J. Plant Physiol.* 143, 39-46.
- Rosahl, S.** (1996) Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response, *Z. Naturforsch.* 51c, 123-138.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S. & Sanchez-Serrano, J. J.** (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns, *J. Biol. Chem.* 271, 21012-21019.
- Salas, J. J., Sanchez, J., Ramli, U. S., Manaf, A. M., Williams, M. & Harwood, J. L.** (2000) Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits, *Prog. Lipid Res.* 39, 151-80.
- Saravitz, D. M. & Siedow, J. N.** (1995) The lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves - changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal, *Plant Physiol.* 107, 535-543.
- Saravitz, D. M. & Siedow, J. N.** (1996) The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves, *Plant Physiol.* 110, 287-299.
- Schewe, T. & Kühn, H.** (1991) Do 15-lipoxygenases have a common biological role?, *Trends Biochem. Sci.* 16, 369-373.
- Schneider, C., Tallman, K. A., Porter, N. A. & Brash, A. R.** (2001) Two distinct pathways of formation of 4-hydroxy-nonenal: Mechanisms of non-enzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals, *J. Biol. Chem.* 276, 20831-20838.
- Sembdner, G. & Parthier, B.** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 569-589.
- Shibata, D.** (1996) Plant lipoxygenase genes in *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (Piazza, G. J., ed) pp. 39-56, AOCS Press, Champaign, IL.
- Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D. & Bell, E.** (1994) Lipoxygenases, *Plant Mol. Biol. Reporter* 12, S41-S42.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. & Hatanaka, A.** (1995a) Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 438-443.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. & Hatanaka, A.** (1995b) Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits, *Plant Cell Physiol.* 36, 147-156.
- Siedow, J. N.** (1991) Plant lipoxygenase - structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145-188.
- Slusarenko, A.** (1996) The role of lipoxygenase in plant resistance to infection in *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (Piazza, G. J., ed) pp. 176-197, AOCS Press, Champaign, IL.

- Slusarenko, A. J., Meier, B. M., Croft, K. P. C. & Eiben, H. G.** (1993) Lipoxygenase in plant disease in *Mechanisms of Plant Defense Responses* (Fritig, B. & Legrand, M., eds) pp. 211-220, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam
- Smart, C. M.** (1994) Gene expression during leaf senescence, *New Phytol.* 126, 419-448.
- Song, W.-C. & Brash, A. R.** (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450, *Science* 253, 781-784.
- Song, W. C., Funk, C. D. & Brash, A. R.** (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase - a cytochrome-P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8519-8523.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S. & Feussner, I.** (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells, *FEBS Lett.* 507, 371-376.
- Thomas, H.** (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in senescence, *J. Plant Physiol.* 123, 97-105.
- Thompson, J. E., Froese, C. D., Madey, E., Smith, M. D. & Hong, Y. W.** (1998) Lipid metabolism during plant senescence, *Prog. Lipid Res.* 37, 119-141.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L. & Brash, A. R.** (2001) Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids, *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 281-289.
- Tranbarger, T. J., Franceschi, V. R., Hildebrand, D. F. & Grimes, H. D.** (1991) The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles, *Plant Cell* 3, 973-987.
- Vicentini, F. & Matile, P.** (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisome in senescent leaves, *J. Plant Physiol.* 142, 50-56.
- Vick, B. A. & Zimmerman, D. C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species, *Plant Physiol.* 75, 458-461.
- Vick, B. A.** (1993) Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway in *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, J., T.S., ed) pp. 167-191, CRC Press, London.
- Vick, B. A. & Zimmerman, D. C.** (1989) Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*, *Plant Physiol.* 90, 125-132.
- Vörös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Löbler, M., Parthier, B. & Wasternack, C.** (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salomé) leaves, *Eur. J. Biochem.* 251, 36-44.
- Wanner, L., Keller, F. & Matile, P.** (1991) Metabolism of radiolabelled galactolipids in senescent barley leaves, *Plant Sci.* 78, 199-206.
- Wasternack, C. & Hause, B.** (2002) Jasmonates and octadecanoids - signals in plant stress responses and development, *Progr. Nucleic Acids Res.* 72, 165-221.

- Wasternack, C. & Parthier, B.** (1997) Jasmonate signalled plant gene expression, *Trends Plant Sci.* 2, 302-307.
- Weber, H.** (2002) Fatty acid-derived signals in plants, *Trends Plant Sci.* 7, 217-24.
- Weichert, H., Kolbe, A., Kraus, A., Wasternack, C. & Feussner, I.** (2002) Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings - lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes, *Planta* 215, 612-619.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. & Feussner, I.** (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate, *FEBS Lett.* 464, 133-137.
- Weidhase, R. A., Kramell, H.-M., Lehmann, J., Liebisch, H. W., Lerbs, W. & Parthier, B.** (1987) Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments, *Plant Sci.* 51, 171-186.
- Xie, D. X., Feys, B.F., James, S., Nietorostro, M. & Turner, J.G.** (1998) *COI1*: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility, *Science* 280, 1091-1094.
- Yabuuchi, S.** (1976) Occurrence of a new lipoxygenase isoenzyme in germinating barley embryos, *Agr. Biol. Chem.* 40, 1987-1992.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H. & Hamberg, M.** (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase, *J. Biol. Chem.* 275: 19132-19138.
- Zimmerman, D. C. & Caudron, C. A.** (1979) Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid, *Plant Physiol.* 63, 536-541.

## 6 Veröffentlichte Originalarbeiten<sup>1</sup>

- 6.1 All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro. I. Feussner, A. Bachmann, M. Hoehne, H. Kindl. *FEBS Lett.* 431: 433-436 (1998)**

Eigenanteil:

Messung der LOX-Aktivität und Bestimmung des pH-Optimum der rekombinanten Lipidkörper-LOX mittels Sauerstoffelektrode, Lipidextraktion und HPLC-Analyse der LOX-Produkte zur Bestimmung der Produktspezifität der rekombinanten Lipidkörper-LOX und LOX-1 aus Sojasamen

- 6.2 Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. M.D. Georgalaki, A. Bachmann, T.G. Sotiroidis, A. Xenakis, A. Porzel and I. Feussner. *Fett/Lipid* 100: 554-560 (1998)**

Eigenanteil:

HPLC-Analyse der Fraktionen von veresterten und freien Fettsäuren zur Bestimmung der Produktspezifität von LOXs aus Oliven

- 6.3 Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. M. Kohlmann, A. Bachmann, H. Weichert, A. Kolbe, T. Balkenhohl, C. Wasternack and I. Feussner. *Eur. J. Biochem.* 260: 885-895 (1999)**

Eigenanteil:

Behandlung des Blattmaterials, Separation der LOX-Formen mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und FPLC, Detektion der LOX-Formen durch Western-Blot-Analyse, Aktivitätsmessung und Bestimmung der pH-Optima der separierten LOX-Formen, Bestimmung der Produktspezifität mittels HPLC; Extraktion von Lipiden aus Gerstenblättern und deren HPLC-Analyse auf LOX-Produkte

---

<sup>1</sup> aus urheberrechtlichen Gründen sind die der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten in der veröffentlichten Version der Dissertationsschrift nicht enthalten

- 6.4 Oxylipins in sorbitol-stressed barley leaf segments. A. Bachmann, M. Kohlmann, C. Wasternack and I. Feussner. *Advances in Plant Lipid Research* (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. & Martínez-Force, E., eds) pp. 288-290 (1998)**

Eigenanteil:

Behandlung des Blattmaterials, Lipidextraktion und HPLC-Analyse der extrahierten Lipide auf LOX-Produkte

- 6.5 Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. A. Bachmann, B. Hause, H. Maucher, E. Garbe, K. Vörös, H. Weichert, C. Wasternack and I. Feussner. *Biol. Chem.* 383 (10): 1645-1657 (2002)**

Eigenanteil:

Behandlung des Blattmaterials, Kartierung von Metaboliten des Lipoxygenase-Reaktionsweges in Gerstenblattsegmenten; Isolation und Subfraktionierungen von Chloroplasten, Kartierung von Metaboliten des Lipoxygenase-Reaktionsweges in Protoplasten, Chloroplasten und Chloroplastensubfraktionen

## Anhang

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ein Promotionsverfahren wurde bisher an keiner anderen Universität eröffnet oder beantragt. Frühere Promotionsversuche sind nicht unternommen worden.

Wädenswil, im Oktober 2002

---

Dipl. Biochem. Astrid Bachmann

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. I. Feussner für die Themenstellung, seine wissenschaftliche und moralische Unterstützung, seine ständige Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen und sein beharrliches sowie aufmunterndes Interesse am Fortgang und an der Fertigstellung der Arbeit.

Bei Prof. C. Wasternack möchte ich mich für die wertvollen Anregungen, das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine tatkräftige Unterstützung bedanken, ohne die es mir kaum möglich gewesen wäre, die vorliegende Arbeit zu beenden.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Hormonforschung, die zu dem angenehmen Arbeitsklima beigetragen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn H. Weichert für seine selbstlose Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analysen und der Ausarbeitung von Tabellen und Grafiken. Frau Dr. E. Hornung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft sowie für ihre langjährige Freundschaft und die zahlreichen Diskussionen, Tips und Anregungen.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei der Arbeitsgruppe in Zürich von Prof. Dr. Ph. Matile und PD Dr. F. Keller für die unkomplizierte Zusammenarbeit. Vor allem bedanke ich mich bei Frau M. Schellenberg für die großartige Unterstützung bei der Etablierung der Methodik zur Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten. In diesem Zusammenhang danke ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung, durch die diese grenzüberschreitende Zusammenarbeit ermöglicht wurde.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mir durch ihr Verständnis, ihre liebevolle Unterstützung und Geduld, die nötige Kraft und Ausdauer zur Fertigstellung dieser Arbeit gegeben haben.

## Lebenslauf

### Personalien

Name: Bachmann (geb. Böhm)  
Vorname: Astrid  
Geburtsdatum: 16.08.1972, Rochlitz  
Nationalität: deutsch  
Zivilstand: verheiratet, 2 Kinder

### Ausbildung

1979 - 1989 Polytechnische Oberschule „Hans-Beimler“, Penig  
1989 - 1991 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium (Gymnasium)  
7/1991 Abschluß: allgemeine Hochschulreife  
1991 - 1996 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie  
9/1993 Vordiplomprüfung Biochemie  
1995 - 1996 Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation von Lipoxygenasen aus Chloroplasten der Sommergerstenvarietät *Hordeum vulgare* L. cv. Salomé", Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Hormonforschung, Halle/S.  
9/1996 Diplomprüfung Biochemie  
1996 Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes  
1996 Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie, Praktikum zur Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten aus Gerste bei Prof. Dr. Ph. Matile  
ab 1996 Dissertation bei Prof. Dr. C. Wasternack/Prof. I. Feussner, Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Hormonforschung, Halle/S.  
1999 Arbeitsaufenthalt, Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie