

# Untersuchungen zur Funktion von Oxylipinen bei der Pathogenantwort in *Solanum tuberosum* L.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Fachbereich Biochemie / Biotechnologie)

von

**Cornelia Göbel**

geboren am 17. April 1974 in Schönebeck / Elbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Gutachter: PD Dr. Ivo Feußner
3. Gutachter: Prof. Dr. Mats Hamberg

Halle / Saale, 5. Dezember 2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000003095**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003095>]

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Cornelia Göbel

Halle / Saale, im September 2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Pflanze-Pathogen-Interaktionen</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pflanzenpathogene und ihre Ernährungsformen .....	2
1.2	Konstitutive Abwehrmechanismen.....	2
1.3	Erkennung zwischen Pflanze und Pathogen .....	3
1.4	Signaltransduktion nach Elicitor-Rezeptor-Bindung .....	3
1.5	Induzierte Abwehrmechanismen.....	4
1.6	Sekundäre Signalmoleküle in der Pathogenabwehr .....	5
<b>2</b>	<b>Lipoxygenasen in Pflanzen</b> .....	<b>6</b>
2.1	Der Lipoxygenase-Reaktionsweg .....	8
2.2	Physiologische Funktionen der Lipoxygenasen .....	11
2.2.1	Expression der Lipoxygenasen während der Ausprägung von Abwehrreaktionen.....	12
2.2.2	Oxylipine in der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	12
<b>3</b>	<b>Die Pflanze-Pathogen-Interaktion von <i>Solanum tuberosum</i> und <i>Phytophthora infestans</i></b> .....	<b>15</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>1</b>	<b>Material</b> .....	<b>17</b>
1.1	Pflanzenzellen .....	17
1.1.1	Kultivierung .....	17
1.1.2	Elicitierung .....	17
1.2	Pflanzen.....	18
1.2.1	Anzucht.....	18
1.2.2	Behandlung der Blätter mit Pathogenen .....	18
1.2.3	Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	19
1.3	Bakterien.....	20
1.3.1	Kultivierung von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> .....	20
1.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.3.2.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	20
1.3.2.2	Transformation .....	20
1.3.3	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
1.3.3.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	21
1.3.3.2	Transformation .....	21
1.4	Klonierungsvektoren.....	22
1.5	Oligonukleotide .....	22
1.6	Oomycet <i>Phytophthora infestans</i> .....	22

---

1.6.1	Präparation des Kulturfiltrats .....	23
1.6.2	Isolation von Zoosporensuspensionen .....	23
<b>2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1	Nukleinsäureanalysen .....	23
2.1.1	Präparation von Nukleinsäuren .....	23
2.1.1.1	RNA-Präparation .....	23
2.1.1.2	Präparation genomischer DNA .....	24
2.1.1.3	Präparation von Plasmid-DNA .....	24
2.1.1.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	25
2.1.2	Agarosegel-Elektrophorese.....	25
2.1.2.1	Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese.....	25
2.1.2.2	Nichtdenaturierende Agarosegel-Elektrophorese .....	26
2.1.3	Transfertechniken und radioaktive Hybridisierung .....	26
2.1.3.1	Northern-Transfer .....	26
2.1.3.2	Southern-Transfer .....	27
2.1.3.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	27
2.1.3.4	Radioaktive Hybridisierung .....	27
2.1.4	Klonierungstechniken .....	28
2.1.4.1	Dephosphorylierung .....	28
2.1.4.2	Ligation.....	28
2.1.5	PCR.....	29
2.1.6	RT-PCR.....	29
2.1.7	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	30
2.1.7.1	Automatisierte Sequenzierung .....	30
2.1.7.2	Computergestützte Sequenzanalyse.....	30
2.2	Proteinanalysen.....	30
2.2.1	Proteinisolierung.....	30
2.2.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.2.3	Western-Transfer und Immunodetektion .....	31
2.2.3.1	Western-Transfer .....	31
2.2.3.2	Immunodetektion .....	31
2.3	LOX-Aktivitätsmessung.....	32
2.3.1	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode.....	32
2.3.2	HPLC-Analyse der LOX-Aktivität .....	32
2.4	Aufnahme der Metabolitenprofile der Oxylipine .....	33
2.4.1	Bestimmung von Hydroperoxid- und Hydroxid-Derivaten sowie der Divinylether .....	33
2.4.2	Analyse von Trihydroxid-Derivaten.....	34
2.4.3	Jasmonsäure-Bestimmung.....	36

---

2.4.4	Analyse von Aldehyd-Derivaten.....	36
2.4.5	Bestimmung der freien Fettsäuren .....	37
2.5	Phospholipase A <sub>2</sub> -Aktivitätstest.....	37
<b>C</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>1</b>	<b>Untersuchungen am Modellsystem der Zellen von <i>Solanum tuberosum</i> nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von <i>Phytophthora infestans</i>.....</b>	<b>38</b>
1.1	Induktion der Expression von LOX-, PR- und Abwehrgenen .....	38
1.1.1	Transkriptakkumulation .....	38
1.1.2	Anstieg der LOX-Proteinmenge .....	39
1.2	LOX-Aktivität .....	40
1.3	Akkumulation der Metabolite des LOX-Reaktionsweges .....	41
1.4	Bereitstellung der LOX-Substrate .....	43
1.4.1	Transkriptakkumulation eines Gens mit Homologien zu $\Delta^{12}$ -Acyl-Lipid-Desaturasen.....	43
1.4.2	Induktion der Phospholipase A <sub>2</sub> -Aktivität .....	44
<b>2</b>	<b>Analyse des LOX-Reaktionsweges nach Pathogenbefall in Blättern von <i>S. tuberosum</i> .....</b>	<b>45</b>
2.1	<i>S. tuberosum</i> L. cv. Désirée in der Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola und in der kompatiblen Interaktion mit <i>Phytophthora infestans</i> .....	45
2.1.1	Transkriptakkumulation von LOX-, PR- und Abwehrgenen .....	46
2.1.2	Stimulierung der 9-LOX-Aktivität .....	47
2.1.3	Metabolitenprofil des LOX-Reaktionsweges .....	48
2.1.4	Transkriptanalyse von Genen, die für Enzyme des LOX-Reaktionsweges kodieren.....	51
2.1.5	Untersuchungen zur Bereitstellung der LOX-Substrate .....	52
2.2	Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhter Basisresistenz gegenüber <i>P. infestans</i> .....	53
2.2.1	Feldresistenz von <i>S. tuberosum</i> .....	53
2.2.2	Analyse der Metabolitenprofile.....	54
<b>3</b>	<b>Akkumulation von 9-LOX-Metaboliten während der Ausprägung von Blattnekrosen.....</b>	<b>55</b>
3.1	Metabolitenakkumulation nach Infiltration von Eosin .....	56
3.2	Untersuchungen von Wildtyp- und <i>nahG</i> -Pflanzen nach Pep13-Behandlung....	57
<b>4</b>	<b>Funktionelle Analyse des 9-LOX-Reaktionsweges .....</b>	<b>59</b>
4.1	PR-Genexpression nach Behandlung mit LOX-Metaboliten.....	59
4.2	Charakterisierung der 9-LOX-Isoformen in <i>S. tuberosum</i> nach Pathogenbefall	61

4.2.1	Restriktionsanalyse eines 9-LOX-spezifischen Fragmentes .....	62
4.2.2	Identifizierung eines neuen LOX-Fragmentes.....	64
4.2.3	Expressionsprofil der 9-LOXen nach Pathogenbefall .....	64
4.3	Funktionsanalyse der POTLX-3 in transgenen Pflanzen (RNA-Interferenz) .....	66
4.3.1	Konstruktion des RNAi-Fragmentes und Pflanzentransformation.....	66
4.3.2	Charakterisierung der RNAi-Pflanzen nach Pathogenbefall .....	67
<b>D</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>Der LOX-Reaktionsweg in <i>S. tuberosum</i> nach Pathogenbefall .....</b>	<b>71</b>
1.1	Präferentielle Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges.....	72
1.2	Charakterisierung des 13-LOX-Reaktionsweges .....	75
1.3	Bereitstellung der LOX-Substrate .....	76
<b>2</b>	<b>Der LOX-Reaktionsweg während der Ausprägung von Nekrosen.....</b>	<b>78</b>
2.1	Korrelation zwischen Nekrosebildung und SA-abhängiger Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges nach Pep13-Infiltration in <i>nahG</i> -Pflanzen.....	80
<b>3</b>	<b>Induktion der PR-Genexpression nach Infiltration von Oxylipinen.....</b>	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>Der 9-LOX-Reaktionsweg und Resistenzausprägung in <i>S. tuberosum</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>G</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Acc. No.	<i>accession number</i>
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintri-phosphat
Avr	Avirulenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
C	Cytosin
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CA	Colnensäure
ca.	zirka
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	<i>copy</i> DNA bzw. reverse transkribierte DNA
4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase
cm	Zentimeter
CnA	Colnelensäure
CP	<i>chiral phase</i>
cv.	Kultivar
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Divinylethersynthase
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
EAS	Epoxyalkoholsynthase
EC	<i>enzyme classification</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FAD	Acyl-Lipid-Desaturase
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanosin
GC	Gaschromatographie
GRP	prolinreiches Glykoprotein
h	Stunde(n)
9-HOD	(9S,10E,12Z)-9-Hydroxy-10,12-octadecadiensäure
13-HOD	(9Z,13S,11E)-13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure
9-HOT	(9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatriensäure
12-HOT	(9Z,13E,15Z)-12-Hydroxy-9,13,15-octadecatriensäure
13-HOT	(9Z,11E,13S,15Z)-13-Hydroxy-9,11,15-octadecatriensäure
16-HOT	(9Z,12Z,14E)-16-Hydroxy-9,12,14-octadecatriensäure
HPL	Hydroperoxidlyase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

9-HPOD	(9S,10E,12Z)-9-Hydroperoxy-10,12-octadecadiensäure
13-HPOD	(9Z,13S,11E)-13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure
9-HPOT	(9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroperoxy-10,12,15-octadecatriensäure
13-HPOT	(9Z,11E,13S,15Z)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure
HR	Hypersensitive Reaktion
HRGP	hydroxyprolinreiches Glykoprotein
IgG	Immunoglobulin G
ISR	induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
JIP	Jasmonsäure-induziertes Protein
JRG	Jasmonat-reguliertes Gen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LA	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
LnA	$\alpha$ -Linolensäure
M	mol/Liter
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeJA	Methyljasmonat
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
MM	Molekularmasse
MS	Massenspektrometrie
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
m/z	Masse/Ladungsquotient
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte (bezogen auf 1 cm Küvettenbreite) bei 600 nm
(OPR 3)	12-Oxo-PDA-Reduktase
12-oxo-PDA	(10Z,15Z)-12-Oxo-10,15-phytodiensäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PC	Phosphatidylcholin
PCD	Programmierter Zelltod
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> bzw. Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Phytodiensäure
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>P.i.</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
pmol	Picomol
<i>Ppn</i>	<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
Psm	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>

---

PTGS	Posttranskriptionelles <i>gene silencing</i>
PUFA	vielfach ungesättigte Fettsäure
pv.	Pathovar
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen/min
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s.	siehe
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SP	<i>straight phase</i>
St	<i>Solanum tuberosum</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
9,10,11-TriHOD	(9S,10S,11R,12Z,15Z)-9,10,11-Trihydroxy-12,15-octadecadiensäure
9,12,13-TriHOD	(9S,10E,12S,13S,15Z)-9,12,13-Trihydroxy-10,15-octadecadiensäure
9,10,11-TriHOE	(9S,10S,11R,12Z)-9,10,11-Trihydroxy-12-octadecensäure
9,12,13-TriHOE	(9S,10E,12S,13S)-9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units bzw. Einheiten
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel

## A Einleitung

Pflanzen sind ortsgebundene Organismen und damit den Umweltbedingungen ihres Standortes unmittelbar ausgesetzt. Sie haben ein breites Spektrum an Mechanismen ausgeprägt, um entwicklungshemmende Situationen, wie Trockenheit, mechanische Verwundung, UV-Strahlung, Temperaturstreß und den Befall durch phytopathogene Organismen zu überstehen. Ein weiteres Charakteristikum pflanzlicher Organismen ist ihr Aufbau aus bewegungsunfähigen Zellen, die von starren Zellwänden umgeben sind. Im Vergleich zum Immunsystem der Vertebraten besitzen Pflanzen keine spezialisierten Zellen, die bei Erkrankungen schnell zum Infektionsort transportiert werden können, um eindringende Organismen abzuwehren (Lam *et al.* 2001). Jede Pflanzenzelle besitzt indes die Fähigkeit, auf Infektionen zu reagieren und Abwehrreaktionen zu aktivieren (Ebel und Mithöfer 1998). Die bei der Pathogenabwehr ablaufenden Signaltransduktionsvorgänge weisen große Ähnlichkeit zu den Prozessen der angeborenen Immunität tierischer Organismen auf (Cohn *et al.* 2001; Nürnberger und Scheel 2001).

Die Erforschung der molekularen Grundlagen von Pflanze-Pathogen-Interaktionen sind Gegenstand der modernen Phytopathologie. Es werden stressinduzierte Signalmechanismen untersucht, um die einzelnen pflanzlichen Reaktionen auf abiotische Umweltfaktoren und nach Infektionen aufzuklären.

### 1 Pflanze-Pathogen-Interaktionen

Pflanzen sind ununterbrochen dem Einfluß von Bakterien, Viren, Pilzen und Invertebraten (Insekten und Nematoden) ausgesetzt. Trotz dieser Vielzahl von Schädlingen kommt es nur selten zu einer Besiedlung von Pflanzen durch phytopathogene Organismen, da die attackierten Pflanzen meist die Lebensbedürfnisse der Pathogene nicht erfüllen, d. h. Nichtwirtspflanzen darstellen. Diese Pathogene sind nicht in der Lage, konstitutiv vorhandene Barrieren der Pflanzenzelle zu überwinden (Basisresistenz, Nichtwirtsresistenz). Wird die Pflanze jedoch von einem Pathogen parasitiert, kann der befallene Bereich durch die Aktivierung induzierbarer Abwehrmechanismen sofort lokal abgegrenzt werden. Diese Mechanismen der Nichtwirtsresistenz werden auch unter dem Begriff der Basisinkompatibilität zusammengefaßt, und die Interaktion wird somit als inkompatibel bezeichnet. Unter bestimmten Umständen, bei denen die Abwehrmechanismen der Pflanze unzureichend sind, kann die Basisresistenz jedoch durch das Pathogen überwunden werden, die Pflanze erkrankt und die Interaktion ist kompatibel (Hammond-Kosack und Jones 1996; Hammond-Kosack und Jones 2000; Heath 2000).

Die meisten Pathogene sind auf die Besiedlung eines sehr engen Pflanzenspektrums spezialisiert. Aber auch diese Wirtspflanzen können Resistenzen ausprägen. Bei diesen

Wirtsresistenzen unterscheidet man eine generelle bzw. horizontale Resistenz von einer spezifischen bzw. vertikalen Resistenz. Die horizontale Resistenz einer Wirtspflanze ist gegenüber allen Rassen eines Pathogens wirksam und ist polygen bestimmt, im Vergleich zur monogenetischen Determination der vertikalen Resistenz. Bei dieser Form der Interaktion sind die Wirtspflanzen gegenüber nur einigen bestimmten Rassen des Phytopathogens resistent (Prell 1996).

Diese Inkompatibilität von Wirt und Pathogen, die zur Resistenzausprägung führt, wird durch die „Gen-für-Gen“-Hypothese (genvermittelte Resistenz) beschrieben (Flor 1971). Danach sind die Anwesenheit und die Wechselwirkung von Produkten eines dominanten, pflanzlichen Resistenzgens (R-Gen) und eines komplementären, dominanten, mikrobiellen Avirulenzgens (Avr-Gen) die Voraussetzungen für eine inkompatible Interaktion.

### 1.1 Pflanzenpathogene und ihre Ernährungsformen

Phytopathogene Organismen haben im Verlauf der Evolution mehrere Ernährungsstrategien entwickelt, um ihre Wirtszellen als Nährstoffquelle zu nutzen, und werden demzufolge in drei Gruppen eingeteilt: biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Parasiten (Hammond-Kosack und Jones 2000).

Bei der biotrophen Ernährungsform entnimmt der eindringende Organismus Nährstoffe aus lebenden und damit noch stoffwechselaktiven Pflanzenzellen durch intrazelluläre Kontakte, die z. B. durch Haustorien vermittelt werden. Zu dieser Gruppe der biotrophen Pathogene gehören die pilzlichen Erreger von Mehltau- und Rostkrankheiten, Nematoden und einige *Pseudomonas*-Arten, wobei diese Organismen meist sehr begrenzte Wirtsspektren besitzen. Hemibiotrophe Pathogene durchleben zunächst eine kurze, biotrophe Phase, bei der die Pflanzenzellen lebensfähig bleiben, und dann eine nekrotrophe Phase, die zum Abtöten des pflanzlichen Gewebes führt. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule in *Solanum tuberosum*, der Oomycet *Phytophthora infestans*. Eine große Anzahl von Pflanzenspezies wird von nekrotrophen Organismen, wie Pilzen der Gattung *Pythium* und *Botrytis* sowie *Erwinia*-Bakterien, befallen. Diese produzieren zellwandabbauende Enzyme oder wirtsselektive Toxine bzw. ein Gemisch aus diesen Substanzen und ernähren sich anschließend von dem abgestorbenen, pflanzlichen Gewebe (Hammond-Kosack und Jones 2000).

### 1.2 Konstitutive Abwehrmechanismen

Gesunde Pflanzen bilden strukturelle und chemische Barrieren aus, die in einer ersten Ebene der Pathogenabwehr konstitutiv vorhanden sind und einen primären Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen darstellen. Mechanische Barrieren gegenüber einem Pathogenbefall stellen die Lignine der Zellwand sowie Cutin und Suberin dar, die in der Kutikula enthalten sind. Weiterhin werden niedermolekulare Verbindungen mit

antimikrobiellen Eigenschaften konstitutiv gebildet, die extrazellulär (im Interzellularraum) und intrazellulär (in Vakuolen) in ihrer biologisch aktiven Form bzw. als inaktive Vorstufen gespeichert werden. Nach Pathogenbefall oder Gewebeverletzungen werden diese Substanzen freigesetzt bzw. aktiviert. Dazu zählen unter anderem Saponine mit antifungaler Wirkung, cyanogene Glykoside, die durch Freisetzung von Blausäure die Atmungskette zahlreicher Organismen hemmen, und schwefelhaltige Glukosinolate, die nach Umsetzung zu Isothiocyanaten, Thiocyanaten und Nitrilen auf fungale Pathogene der *Brassicaceae* toxisch wirken (Osborn 1996).

### 1.3 Erkennung zwischen Pflanze und Pathogen

Nach mikrobiellen Infektionen werden eine Reihe weiterer Abwehrmechanismen in Pflanzenzellen induziert, die durch die Erkennung spezifischer Signalmoleküle (Elicitoren) ausgelöst werden. Diese Elicitoren stammen von Pathogenen (exogene Elicitoren) oder werden durch hydrolytische Enzyme aus den Zellwänden der Pflanze freigesetzt (endogene Elicitoren). Es wurden Oligosaccharide, Proteine und Glykoproteine (Ebel und Mithöfer 1998) sowie Lipide (Bostock *et al.* 1981) als Auslöser der pflanzlichen Abwehrreaktionen identifiziert. Die Signalerkennung erfolgt an Rezeptoren der Pflanzenzelle, die für fungale Elicitoren zumeist an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Ebel und Scheel 1997), wohingegen bakterielle Elicitoren wahrscheinlich innerhalb der Zelle perzipiert werden (Bonas und van den Ackerveken 1997; Hammond-Kosack und Jones 1997).

Das Elicitor-Rezeptor-Modell stellt eine erweiterte Erklärungsmöglichkeit der „Gen-für-Gen“-Hypothese dar (Yang *et al.* 1997). Es existieren keine grundsätzlichen Unterschiede in den Signalmechanismen der Pathogenerkennung der Wirt- und Nichtwirtinteraktion sowie der Perzeption rassenspezifischer und genereller (nichtrassenspezifischer) Elicitoren (Grant und Mansfield 1999). Im Folgenden werden deshalb allgemeine Abwehrreaktionen von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen nach Pathogenbefall oder Elicitorbehandlung beschrieben. Dennoch verursacht jede individuelle Signalerkennung eine spezifische Aktivierung sekundärer Botenstoffe und charakteristischer Reaktionen dieser komplexen Abwehrmechanismen (Feys und Parker 2000). Im Vergleich zu suszeptiblen Pflanzen kommt es in resistenten Pflanzen zu einer schnellen Erkennung des Pathogens (zum Teil durch R/AVR-Interaktion vermittelt) und einer unmittelbar anschließenden effizienten Aktivierung von Abwehrreaktionen (Yang *et al.* 1997).

### 1.4 Signaltransduktion nach Elicitor-Rezeptor-Bindung

Die Elicitor-Rezeptor-Bindung stellt den ersten Schritt einer Signaltransduktionskette dar, die zur Aktivierung komplexer Abwehrreaktionen führt (Yang *et al.* 1997). Unmittelbar nach der Signalperzeption werden Ionenkanäle der Plasmamembran aktiviert, und es

kommt zur Stimulierung von Ionenflüssen ( $H^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Einstrom,  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ausstrom; Nürnberger *et al.* 1994; Zimmermann *et al.* 1997). Der Anstieg des cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Gehaltes und die Depolarisierung der Plasmamembran induzieren die extrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), den *oxidative burst* (Blumwald *et al.* 1998; Blume *et al.* 2000). Hierzu gehören vor allem Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroperoxyl- und Hydroxylradikale (Low und Merida 1996; Lamb und Dixon 1997), deren Synthese auf der Aktivität membrangebundener NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischer Peroxidasen beruht (Kombrink und Somssich 1995). Es werden zwei Phasen der ROS-Bildung beobachtet, wobei die erste Phase innerhalb von Minuten sowohl bei suszeptiblen als auch bei resistenten Interaktionen erfolgt. Eine zweite, über Stunden andauernde Phase kommt jedoch nur bei der rassenspezifischen Resistenz vor (Yang *et al.* 1997). Zusammen mit den ROS wird auch Stickstoffmonoxid als sekundärer Botenstoff bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen beschrieben (Delledonne *et al.* 1998).

An den frühen Signalreaktionen der pflanzlichen Abwehr sind weiterhin Proteinkinasen und -phosphatasen beteiligt, die eine Reihe von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen katalysieren (Boller 1995; Ebel und Scheel 1997). So werden innerhalb von Phosphorylierungskaskaden Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen; Ligterink *et al.* 1997) aktiviert, die möglicherweise die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verursachen und somit die Abwehrgenexpression stimulieren (Eulgem *et al.* 1999).

## 1.5 Induzierte Abwehrmechanismen

In einer zweiten Ebene der pflanzlichen Abwehr, als Reaktion auf den Pathogenbefall und vermittelt durch die oben beschriebene Signaltransduktion werden eine Vielzahl weiterer Abwehrreaktionen induziert.

Die unmittelbare Auflagerung von Kallose auf die Zellwand (Bell 1981; Kauss *et al.* 1989) und die Einlagerung von Lignin, die zusätzlich zur konstitutiv vorhandenen Lignifizierung erfolgt, bewirken eine lokale Verstärkung der Zellwand direkt am Infektionsort. Eine im Verlauf der Pathogenese stattfindende Stimulierung der Synthese hydroxyprolin- und prolinreicher Glykoproteine (HRGPs und GRPs; Bowles 1990) und die kovalente Vernetzung dieser Sekundärmetabolite, ausgelöst durch die Bildung von ROS (Bradley *et al.* 1992), trägt außerdem zur Zellwandverstärkung nach mikrobiellen Infektionen bei.

Neben der Beteiligung von ROS an Signaltransduktionskaskaden wirken diese Verbindungen direkt toxisch auf eindringende Pathogene (Lamb und Dixon 1997). Außerdem ist die Produktion von ROS ein charakteristisches Merkmal der Hypersensitiven Reaktion (HR; Ebel und Scheel 1997; Lamb und Dixon 1997), die wenige Stunden nach dem Pathogenkontakt zum Absterben der pflanzlichen Zellen am Infektionsort durch die Aktivierung des programmierten Zelltodes (PCD) führt (Lam *et al.* 2001). Hierbei kommt es zur Entstehung makroskopisch sichtbarer Nekrosen. Dadurch wird die weitere

Ausbreitung des Pathogens in unbefallenes Gewebe verhindert. Biotrophe Pathogene werden aufgrund von Nahrungsentzug in ihrem Wachstum eingeschränkt (Hammond-Kosack und Jones 1996). Bei der Besiedlung mit hemibiotrophen Pathogenen kommt es meist zur Freisetzung toxischer Verbindungen aus pflanzlichen Vakuolen (Dangl *et al.* 1996; Osbourn 1996).

Die HR ist sowohl ein Bestandteil der Basis- als auch der Wirtsresistenz (Heath 2000). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ausprägung der HR und der Induktion anderer Abwehrmechanismen konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Dangl *et al.* 1996). Es wurden *Isd*-Mutanten beschrieben, die in Abwesenheit von Pathogenen spontan die HR ausprägen und die Abwehrgenexpression aktivieren (Dietrich *et al.* 1994). Einen Beweis dafür, daß HR und Abwehrgenaktivierung nicht unmittelbar miteinander verbunden sind, erbrachte die *dnd1*-Mutante von *Arabidopsis thaliana*, die nach Pathogenbefall keine HR ausprägt und dennoch eine erhöhte Resistenz aufweist (Yu *et al.* 1998)

Verbunden mit der Ausprägung der HR erfolgt die *de novo*-Synthese zahlreicher Proteine, die durch eine transkriptionelle Aktivierung der korrespondierenden Gene nach Pathogenbefall ausgelöst werden (Kombrink und Somssich 1995). Dazu gehören Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels, wie z. B. die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und die 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL), die Komponenten des Sekundärstoffwechsels sind und die Akkumulation antimikrobieller Sekundärmetaboliten (Phytoalexine) sowie die Synthese von Ligninvorstufen katalysieren (Weisshaar und Jenkins 1998). Desweiteren akkumulieren die Transkripte einer Vielzahl *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine) und anderer *defense related proteins* wenige Minuten bis Stunden nach Pathogenbefall. Der Begriff „PR-Proteine“ umfaßt intra- und extrazelluläre Proteine, die in gesunden Pflanzen nicht nachweisbar sind und erst nach Pathogeninfektionen bzw. unter bestimmten Streßbedingungen akkumulieren (Bowles 1990). Es wurden bisher mindestens 14 PR-Protein-Familien klassifiziert, die  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Chitinasen, Proteinase-Inhibitoren, Endoproteinasen und Peroxidasen sowie Proteine mit antifungalen Eigenschaften umfassen (Übersicht in: Hammond-Kosack und Jones 2000). Zu den *defense related proteins* gehören Lipoxygenasen (LOXen), die an der pflanzlichen Abwehr einerseits durch die Synthese von Signalmolekülen, wie Jasmonsäure (JA), und andererseits durch die Bildung antimikrobieller Verbindungen, wie C<sub>6</sub>-Aldehyden, beteiligt sind (Blée 1998). Diese Enzymklasse und der sich daraus ableitende Stoffwechselweg werden in einem gesonderten Abschnitt genauer erläutert.

## 1.6 Sekundäre Signalmoleküle in der Pathogenabwehr

Nach den frühen Reaktionen, die durch die Elicitorerkennung aktiviert werden, erfolgt eine Verstärkung der Signale und eine Regulation der Abwehrgenexpression durch die

Erzeugung sekundärer Signalmoleküle, wie Salicylsäure (SA), JA und Ethylen (Yang *et al.* 1997; Feys und Parker 2000).

SA hat eine sehr entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Resistenzantworten in einer Vielzahl von Pflanzen. Sie ist an der Akkumulation von PR-Proteinen sowohl direkt am Ort der Infektion als auch in Geweben, die sich weit entfernt vom ursprünglichen Infektionsort befinden, beteiligt. Dabei kann eine Immunisierung gegenüber später auftretenden Infektionen zahlreicher Pathogene erfolgen, die über Wochen bis Monate anhalten kann. Dieser Vorgang wird als systemisch erworbene Resistenz (SAR) bezeichnet (Ryals *et al.* 1996).

Neben diesen SA-abhängigen Abwehrreaktionen gibt es aber auch SA-unabhängige Reaktionen, die zeigen, daß SA nicht an der Abwehr aller Pathogene beteiligt ist (Pieterse und van Loon 1999). JA und Ethylen sind ebenfalls Phytohormone, die viele physiologische Prozesse regulieren und unter anderem die Akkumulation pflanzlicher Defensine, Thionine und PR-Proteine induzieren, deren Synthese jedoch nicht durch SA stimuliert wird (Pieterse und van Loon 1999). Diese Signalmoleküle sind außerdem an der durch Rhizobakterien vermittelten, induzierten systemischen Resistenz (ISR) beteiligt, die schützende Abwehrreaktionen in entfernten Geweben unabhängig von der Expression von PR-Genen stimulieren (van Wees *et al.* 1999).

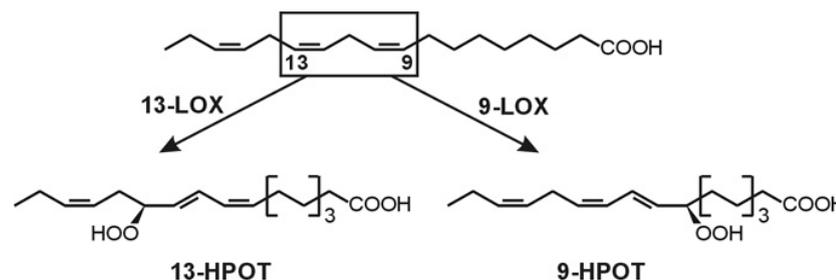
Nach Pathogenbefall wird ein komplexes Muster von Abwehrreaktionen induziert, an denen SA, JA und Ethylen in spezifischer Weise beteiligt sind (Feys und Parker 2000). Dabei bestehen möglicherweise sowohl synergistische als auch antagonistische Beziehungen zwischen den einzelnen Signalmolekülen, die es der Pflanze ermöglichen, auf verschiedene Pathogene unterschiedlich zu reagieren (Reymond und Farmer 1998). Es ist möglich, daß SA-abhängige Reaktionswege besonders effektiv bei der Abwehr biotropher Pathogene sind. JA/Ethylen-abhängige Reaktionen würden dagegen eher bei der Abwehr nekrotropher Pathogene aktiviert (Thomma *et al.* 2001).

## 2 Lipxygenasen in Pflanzen

Die Aufklärung der Bedeutung oxygenierter Fettsäuren, der sogenannten Oxylipine (Gerwick *et al.* 1991), bei pflanzlichen Wund- und Abwehrreaktionen ist von großem Interesse in der Pflanzenforschung. Während bei Pflanzen bisher nur relativ wenige Daten existieren, sind in tierischen Systemen die Funktionen von Oxylipinen (Leukotriene und Lipoxine) bereits sehr genau aufgeklärt worden. Hier sind sie an Entzündungs- und Immunprozessen sowie hypersensitiven Reaktionen beteiligt (Samuelson *et al.* 1987).

Der erste Schritt der Oxylipinsynthese ist die Bildung von Hydroperoxid-Derivaten vielfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs), die in Pflanzen entweder durch Autoxidation oder durch enzymatische Prozesse erfolgt (Feussner *et al.* 2001). An der enzymatischen Bildung sind nicht-hämhaltige LOXen (Linoleat:Sauerstoff Oxidoreduktase, EC 1.13.11.12; Rosahl 1996) und hämhaltige  $\alpha$ -Dioxygenasen (Hamberg *et al.* 1999) beteiligt. LOXen

gehören zur Familie der Dioxygenasen (Siedow 1991), enthalten ein über Aminosäureseitenketten gebundenes Eisenatom und wurden bisher in Vertebraten, Algen, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen (Brash 1999). Sie katalysieren die regiospezifische Umsetzung von Fettsäuren mit einem (1Z,4Z)-Pentadiensystem zu (1Z,3E)-Hydroperoxyfettsäuren (Gardner 1991). Das Hydroperoxid entsteht stereospezifisch nur in der S-Konfiguration. Die Einteilung der LOXen erfolgt anhand der Regiospezifität gegenüber ihren Substraten. Tierische LOXen setzen in vielen Fällen Arachidonsäure um, eine Polyenfettsäure mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen und 4 Doppelbindungen, wobei die Hydroperoxidgruppe an den Kohlenstoffatomen 5, 8, 9, 11, 12 oder 15 eingeführt werden kann (Yamamoto 1992). Die vorwiegenden Substrate pflanzlicher Lipoxygenasen sind jedoch Linol- (LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (LnA), aus denen die Glycerolipide pflanzlicher Membranen hauptsächlich aufgebaut sind (Gunstone 1992). Durch die LOX-Reaktion entstehen Isomere der Positionen 9 und 13 (Abb. A-1). Das Verhältnis der 9- und 13-Hydroperoxid-Derivate unterscheidet sich bei den LOXen verschiedener Pflanzenspezies (Vick und Zimmerman 1987). 9-LOXen katalysieren vorwiegend die Synthese von (9S,10E,12Z)-9-Hydroperoxy-10,12-octadecadiensäure (9-HPOD) bzw. (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroperoxy-10,12,15-octadecatriensäure (9-HPOT). Die Aktivität von 13-LOXen führt überwiegend zur Entstehung von (9Z,11E,13S)-13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure (13-HPOD) bzw. (9Z,11E,13S,15Z)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (13-HPOT). Die nur in wenigen Pflanzen vorkommende Arachidonsäure ist in den Lipiden von Oomyceten, die zum Teil phytopathogene Organismen sind, enthalten und kann ebenfalls von pflanzlichen LOXen umgesetzt werden (Rosahl 1996).



**Abb. A-1: Die LOX-Reaktion.**  
Dargestellt am Beispiel der LnA.

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

wodurch das Hydroperoxid-Derivat entsteht. Parallel dazu verläuft die Reaktivierung des Eisenatoms in die Fe(III)-Form durch stöchiometrische Mengen eines beliebigen Peroxides (Feussner und Kühn 2000).

Pflanzliche LOX-Proteine bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht zwischen 94 und 104 kDa (Brash 1999). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen, abgeleitet von cDNAs und genomischen Klonen verschiedener Pflanzen, zeigt einen hohen Homologiegrad zwischen den einzelnen LOXen, die jedoch keine Verwandtschaft zu anderen Proteinen aufweisen (Siedow 1991). Eine weitere Einteilung der LOXen erfolgt aufgrund differenzieller Sequenzhomologien. Danach werden Typ 1-LOXen, die kein chloroplastidäres Transitpeptid besitzen und mehr als 75 %ige Sequenzhomologien aufweisen, von LOXen des Typs 2 unterschieden, die ein solches Transitpeptid enthalten und zueinander etwa 35 % homolog sind (Shibata *et al.* 1994). Die phylogenetische Analyse der inzwischen sehr zahlreichen Sequenzinformationen offenbart, daß Typ 1- und Typ 2-LOXen sowie 9- und 13-LOXen separate Zweige des LOX-Stammbaums bilden und die Isoformen mono- und dikotyledoner Pflanzen darin unterschieden werden können (Feussner und Wasternack 2002).

## 2.1 Der Lipoxygenase-Reaktionsweg

Die Produkte der LOX-Reaktionen, die Hydroperoxid-Derivate von PUFAs, werden in Pflanzen sehr schnell durch eine Vielzahl von Enzymreaktionen weiter umgesetzt (Rosahl 1996; Blée 1998). Bisher wurden sieben Enzymfamilien beschrieben, die Hydroperoxyfettsäuren umsetzen und damit um diese LOX-Produkte konkurrieren (Abb. A-2; Feussner *et al.* 2001).

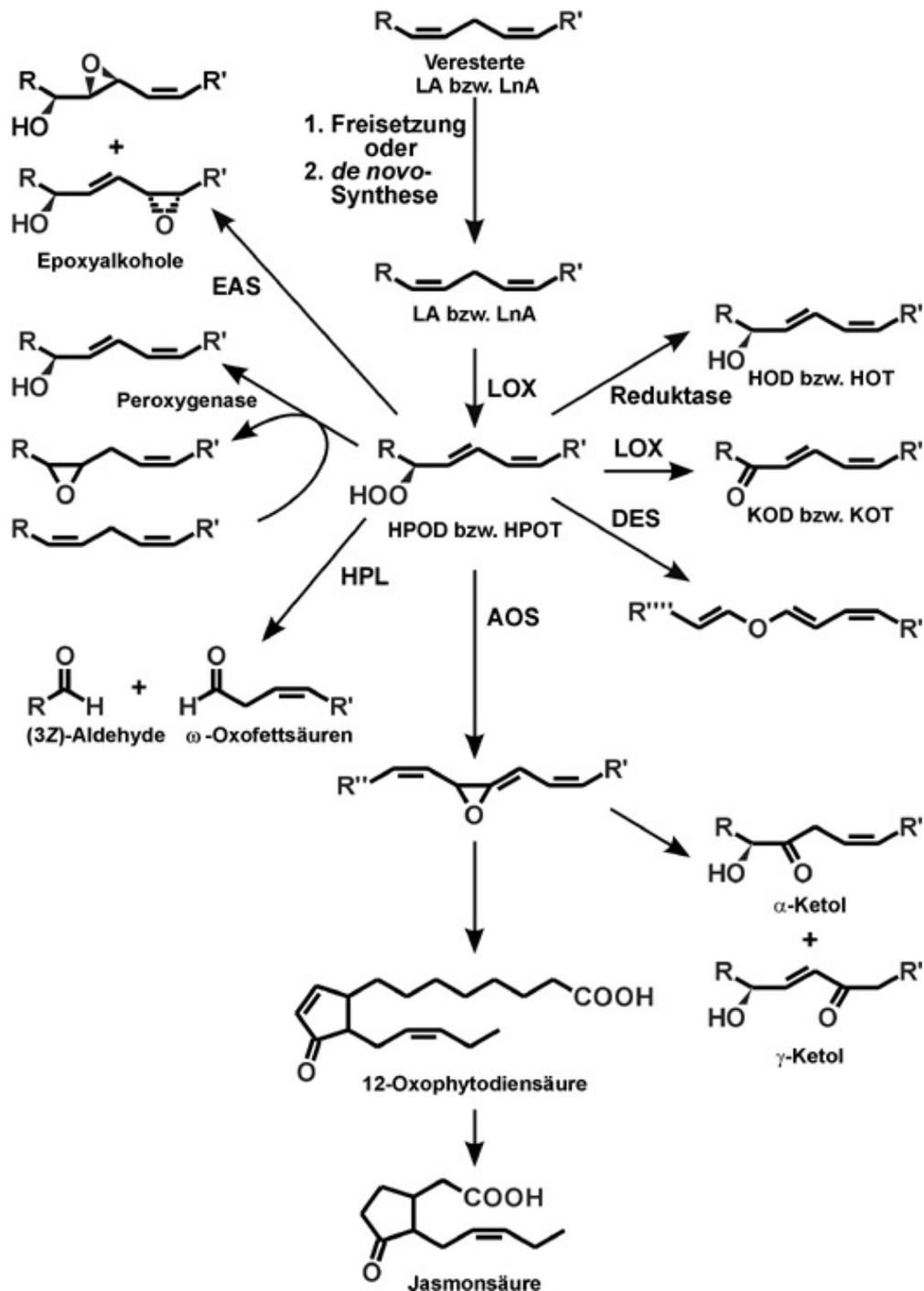
Der Allenoxidsynthese (AOS)-Reaktionsweg besteht aus einer Enzymkaskade, die zur Biosynthese von JA und Ketolen führt. Der erste Schritt ist die Umsetzung zu einem instabilen Allenoxid, der durch die AOS katalysiert wird (Hamberg und Gardner 1992). Dieses Enzym gehört zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (Song und Brash 1991; Howe *et al.* 2000; Maucher *et al.* 2000). Die meisten der bisher klonierten AOS besitzen eine Substratspezifität für 13-Hydroperoxide und setzen zudem nur das S-Isomer um. Das aus (13S)-HPOT durch die AOS-Aktivität entstandene Allenoxid zerfällt spontan in Gegenwart von Wasser zu  $\alpha$ -Ketol [(9Z,13S,15Z)-12-Oxo-13-Hydroxy-9,15-octadecadiensäure] und  $\gamma$ -Ketol [(9S,10E,15Z)-12-Oxo-9-Hydroxy-10,15-octadecadiensäure] oder wird in Gegenwart der hochspezifischen Allenoxidcyclase (AOC) zur (10Z,15Z)-12-Oxo-10,15-phytodienensäure (12-Oxo-PDA) zyklisiert (Ziegler *et al.* 2000). Anschließend wird die  $\Delta^{10}$ -Doppelbindung des Cyclopentanonringes durch die Aktivität eines spezifischen Isoenzym der 12-Oxo-PDA-Reduktase (OPR 3) reduziert (Schaller *et al.* 2000) und die Karbonsäureseitenkette durch drei  $\beta$ -Oxidationsschritte verkürzt. Es entsteht (3R,7S)-JA, die spontan zu (3R,7R)-JA epimerisiert (Sembdner und Parthier 1993). Beide Verbindungen, deren Methylester und bestimmte Aminosäure-Konjugate,

insbesondere jene mit Leucin und Isoleucin, sind biologisch aktiv (Creelman und Mullet 1997; Kramell *et al.* 1997) und werden zusammenfassend als Jasmonate bezeichnet. Die JA-Biosynthese erfolgt in zwei unterschiedlichen Zellkompartimenten. Während LOX, AOS und AOC in den Chloroplasten lokalisiert sind, befinden sich OPR 3 und die abschließenden  $\beta$ -Oxidationszyklen in den Peroxisomen (Feussner und Wasternack 2002).

Hydroperoxidlyasen (HPLs) katalysieren die Spaltung der *S*-Isomere der Hydroperoxide in (3*Z*)-Aldehyde und  $\omega$ -Oxofettsäuren. Sie sind in Pflanzen weit verbreitet und gehören ebenfalls zur Klasse der Cytochrom-P450-Enzyme (Bate *et al.* 1998; Matsui 1998; Howe *et al.* 2000). 13-HPLs spalten 13-HPOD bzw. 13-HPOT in (3*Z*)-Hexanal bzw. (3*Z*)-Hexenal und 9(*Z*)-12-Oxo-9-dodecensäure. Letztere wird zu Traumatin isomerisiert und oxidiert anschließend zu Traumatinsäure (Zimmerman und Coudron 1979). Die zweite Familie der HPLs katalysieren neben der Spaltung von 13-Hydroperoxiden auch die der 9-Isomere, wobei (3*Z*)-Nonenal und (3*Z*,6*Z*)-Nonadienal entstehen. Diese Enzyme werden als 9/13-HPLs bezeichnet und weisen einen höheren Grad der Sequenzhomologie zur AOS-Enzymfamilie als zu 13-HPLs auf (Matsui *et al.* 2000). Die durch die HPL-Reaktion entstandenen (3*Z*)-Aldehyde können zu den entsprechenden (2*E*)-Derivaten isomerisieren (Hatanaka 1993) und wahrscheinlich durch eine Alkoholdehydrogenase zu (3*Z*)- bzw. (2*E*)-Alkoholen umgesetzt werden. Außerdem können die (3*Z*)-Aldehyde und Traumatin zu Hydroxyaldehyden und 9-Hydroxytraumatin umgesetzt werden (Gardner und Hamberg 1993; Noordermeer *et al.* 2000).

Ein weiteres Cytochrom-P450-Enzym ist die Divinylethersynthase (DES), die die Bildung von Divinylethern aus Hydroperoxyfettsäuren katalysiert (Galliard und Phillips 1972). 9-HPOD und 9-HPOT werden zu Colnensäure (CA; 9-[1'*E*,3'*Z*-Nonadienyloxy]-8*E*-nonensäure) bzw. Colnelensäure (CnA; 9-[1'*E*,3'*Z*,6'*Z*-Nonatrienyloxy]-8*E*-nonensäure) umgesetzt, 13-HPOD und 13-HPOT zu Etherolsäure (12-[1'*E*-Hexenyloxy]-9*Z*,11*E*-dodecadiensäure) bzw. Etherolensäure (12-[1'*E*,3'*Z*-Hexadienyloxy]-9*Z*,11*E*-dodecadiensäure). Die erste DES wurde aus *Lycopersicon esculentum* kloniert und ist hochspezifisch für (9*S*)-Hydroperoxide (Itoh und Howe 2001).

AOS, HPL und DES sind Monooxygenasen mit einem Häm-Molekül als prosthetischer Gruppe (Cytochrom-P450-Enzyme). Im Unterschied zu anderen Cytochrom-P450-Enzymen benötigen sie nicht-molekularen Sauerstoff und NADPH für ihre Aktivität, sondern verwenden Acylhydroperoxide als Sauerstoffdonor und Substrat, in denen eine neue Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung gebildet wird. Sie gehören weiterhin zur Unterfamilie CYP74, die nur eine geringe Affinität zu Kohlenmonoxid besitzen (Itoh und Howe 2001).



**Abb. A-2: Der LOX-Reaktionsweg.**  
Abkürzungen sind im Text erläutert.

Ein ebenfalls gut charakterisiertes Enzym des LOX-Reaktionsweges ist die Peroxygenase, ein membrangebundenes Cytochrom-P450-Enzym (Blée und Schuber 1990; Hamberg und Hamberg 1990). Es kann die hydroperoxidabhängige Biosynthese von Hydroxy-, Epoxy- und Hydroxyepoxyfettsäuren katalysieren, wobei die cooxidativen Prozesse durch intra- und intermolekulare Umlagerungen eines Sauerstoffatoms erfolgen (Blée 1998). Die Epoxygruppen können anschließend zu Dihydroxygruppen hydrolysiert werden, so daß Di- und Trihydroxyfettsäuren entstehen (Hamberg 1993).

Der Epoxyalkoholsynthase (EAS)-Reaktionsweg, der zur Synthese von Epoxyhydroxiden und Trihydroxyfettsäuren führt, wurde erst kürzlich in Blättern von *S. tuberosum* beschrieben (Hamberg 1999). (9S)-HPOD und (9S)-HPOT werden jeweils spezifisch zu  $\alpha,\beta$ - und  $\gamma,\delta$ -Epoxyalkoholen durch intramolekulare Sauerstoffumlagerung umgesetzt, die wahrscheinlich durch eine EAS katalysiert wird. Diese Metaboliten können durch die Aktivität einer Epoxidhydrolase zu Trihydroxyfettsäuren hydrolysiert werden. Es entstehen die LA-Derivate (9S,10S,11R,12Z)-9,10,11-Trihydroxy-12-octadecensäure (9,10,11-TriHOE) und (9S,10E,12S,13S)-9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure (9,12,13-TriHOE) sowie die LnA-Derivate (9S,10S,11R,12Z,15Z)-9,10,11-Trihydroxy-12,15-octadecadiensäure (9,10,11-TriHOD) und (9S,10E,12S,13S,15Z)-9,12,13-Trihydroxy-10,15-octadecadiensäure (9,12,13-TriHOD).

Der Hydroperoxidreduktase-Reaktionsweg ist bisher in Pflanzen nur wenig charakterisiert worden. Ein Enzym, das für die Bildung der Hydroxyfettsäuren mit konjugiertem Diensystem verantwortlich ist, konnte noch nicht beschrieben werden. Es wurde bisher nur eine pflanzliche Glutathion-Peroxidase mit hydroperoxidreduzierender Aktivität charakterisiert (Eshdat *et al.* 1997; Feussner *et al.* 2001).

Unter bestimmten Bedingungen, wie Sauerstoffmangel, können LOXen die O-O-Bindung der Hydroperoxid-Derivate spalten und Alkoxyradikale bilden, die sich zu Ketodien- und Ketotrien-Verbindungen umlagern (Feussner und Kühn 2000).

## 2.2 Physiologische Funktionen der Lipoxygenasen

LOXen und die Produkte des LOX-Reaktionsweges haben physiologische Funktionen während der pflanzlichen Entwicklung, wie z. B. bei der Samenkeimung, der Knollenbildung bei *S. tuberosum* und bei Seneszenzvorgängen (Übersicht in: Rosahl 1996; Feussner *et al.* 2001). Besonders intensiv sind dabei die morphologischen und physiologischen Effekte der Jasmonate auf die Pflanzenentwicklung untersucht worden (Übersicht in: Sembdner und Parthier 1993; Creelman und Mullet 1997). Daneben sind LOX-Produkte aber auch an zahlreichen Stressantworten beteiligt. Traumatin und Traumatinsäure wirken wahrscheinlich an der Wundantwort durch Förderung der Zellteilung mit (Zimmerman und Coudron 1979). Jasmonate und ihre Octadecan-Vorstufen (LnA, (13S)-HPOT und 12-Oxo-PDA) induzieren nach mechanischer Verwundung sowie Fraßschäden durch Insekten die Expression von Proteinase-Inhibitoren lokal im beschädigten Bereich sowie in Blättern, die über dem Ort der Verwundung liegen (Farmer und Ryan 1992; Wasternack und Parthier 1997). Dabei wird diese systemische Wirkung durch das phloemaktive Peptid Systemin vermittelt (Schaller 1999).

### 2.2.1 Expression der Lipoxygenasen während der Ausprägung von Abwehrreaktionen

Lipoxygenasen gehören zur Gruppe der *defense related proteins*, die nach einem Pathogenbefall in Pflanzen akkumulieren. So wurde in zahlreichen Mono- und Dikotyledonen eine Verstärkung der LOX-Expression und ein Anstieg der LOX-Aktivität nach Infektion mit phytopathogenen Mikroorganismen und Viren bestimmt (Rosahl 1996; Slusarenko 1996). Die LOX-Aktivität steigt in Blättern von *Triticum aestivum* nach Inokulation mit avirulenten Rassen von *Puccinia graminis* während der Ausprägung der HR an (Ocampo *et al.* 1986). In einer inkompatiblen Interaktion von *Phaseolus vulgaris* mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* korreliert die HR mit einer Stimulierung der LOX-Aktivität, die jedoch bei suszeptiblen Interaktionen ausbleibt (Croft *et al.* 1990). Die Infiltration von *A. thaliana* mit einem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae* induziert die Expression des AtLOX1-Gens, die im Vergleich zur Infiltration mit einem virulenten Stamm wesentlich früher erfolgt (Melan *et al.* 1993). Die LOX-Expression und deren Aktivität werden spezifisch bei der inkompatiblen Interaktion von *L. esculentum* mit *P. syringae* pv. *syringae* während der Ausprägung der HR induziert (Koch *et al.* 1992). In *Oryza sativa* wird eine 13-LOX nach Inokulation mit einer inkompatiblen Rasse von *Magnaporthe grisea* exprimiert, die dagegen in einer suszeptiblen Interaktion schwächer ausgeprägt ist (Peng *et al.* 1994). Bei der rassenspezifischen Resistenz von *Nicotiana tabacum* gegenüber *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (*Ppn*) erfolgt die Induktion der LOX-Expression und Aktivität in der inkompatiblen Interaktion früher als in der kompatiblen (Véronési *et al.* 1996). Damit wurde eine Korrelation zwischen der LOX-Aktivierung und dem Ablauf von Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall gezeigt, wobei zumeist in inkompatiblen Interaktionen, verbunden mit der Ausprägung von Resistenzen, eine verstärkte Stimulierung der LOXen erfolgt.

Durch eine funktionelle Analyse konnte die Bedeutung von 9-LOXen bei Resistenzmechanismen in der Interaktion von *N. tabacum* mit *Ppn* gezeigt werden. Der in Wildtyp-Pflanzen nach Pathogenbefall induzierte Anstieg der 9LOX-Aktivität wurde in transgenen Pflanzen durch Expression von *antisense*-Konstrukten dieser 9-LOX inhibiert (Rancé *et al.* 1998). Dabei erfolgte die Umwandlung einer inkompatiblen in eine kompatible Interaktion, was auf eine entscheidene Bedeutung der 9-LOX bei der Resistenzausprägung in *N. tabacum* hindeutet.

### 2.2.2 Oxylipine in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die LOX-Reaktion katalysiert die Bildung von Hydroperoxiden, die Substrate für zahlreiche Enzyme darstellen. Diese Enzyme des LOX-Reaktionsweges sowie deren Produkte sind an der pflanzlichen Pathogenabwehr durch die Synthese von Signalmolekülen und Phytoalexinen beteiligt. Die Elicitorbehandlung von verschiedenen

Pflanzenzellen stimuliert die Freisetzung von LnA und die Bildung von 12-Oxo-PDA sowie JA (Blechert *et al.* 1995; Parchmann *et al.* 1997). Wahrscheinlich wird durch die Aktivierung zellwandgebundener Rezeptoren nach Insekten- oder Pathogenbefall eine Lipase aktiviert und dadurch LnA aus Membranlipiden freigesetzt, die durch LOXen und den anschließenden AOS-Reaktionsweg zu JA umgesetzt wird (Farmer und Ryan 1992). Den Jasmonaten wird neben SA eine entscheidende Bedeutung als Bestandteile der Signaltransduktionskette zugesprochen (s. 1.6). So induzieren exogen applizierte Jasmonate die Synthese einer Vielzahl von Proteinen, den Jasmonsäure-induzierten Proteinen (JIPs; Weidhase *et al.* 1987; Mueller-Uri *et al.* 1988) und die Expression Jasmonsäure-regulierter Gene (JRGs; Lee *et al.* 1996). JIPs mit bekannter Funktion sind z. B. Proteinase-Inhibitoren (Farmer und Ryan 1990), LOXen (Feussner *et al.* 1995) und Ribosomen-inaktivierende Proteine (Reinbothe *et al.* 1994). In *O. sativa* akkumulieren Phytoalexine nach der exogenen Applikation von Jasmonaten (Tamogami *et al.* 1997), und in *Phaseolus lunatus* induzieren Jasmonate und deren Octadecan-Vorstufen die Biosynthese flüchtiger Verbindungen (Koch *et al.* 1999). Methyljasmonat (MeJA), der flüchtige Methylester der JA, ist wahrscheinlich an der Aktivierung von Abwehrgenen in nicht infizierten Nachbarpflanzen beteiligt (Farmer und Ryan 1990).

Funktionelle Analysen in transgenen Pflanzen deuten auf die Bedeutung der LOXen sowie der Enzyme und Produkte des LOX-Reaktionsweges bei der Antwort auf Verwundung und Pathogenbefall in Pflanzen hin. In transgenen Pflanzen von *A. thaliana*, die eine verminderte Expression der 13-LOX AtLOX2 aufweisen, bleibt im Gegensatz zu den Wildtyp-Pflanzen der Anstieg von JA nach Verwundung aus, und die Transkriptakkumulation des VSP-Gens, das für ein vegetatives Speicherprotein kodiert, ist in den transgenen Pflanzen vermindert (Bell *et al.* 1995). Die Analyse einer Mutante von *A. thaliana* (*fad3-2 fad7-2 fad8*), deren LnA-Synthese nicht mehr vorhanden ist, ergab, daß die transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen weniger JA enthalten und suszeptibler nach dem Befall saprophytischer Insekten sind (McConn *et al.* 1997). Desweiteren ist die Abwehr dieser LnA-freien Mutanten gegenüber dem phytopathogenen Oomyceten *Pythium mastophorum* vermindert (Vijayan *et al.* 1998). Eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Insektenbefall wurde auch in transgenen Pflanzen von *S. tuberosum* beobachtet, die geringere Mengen einer 13-LOX oder 13-HPL exprimieren (Royo *et al.* 1999; Vancanneyt *et al.* 2001). Die *A. thaliana*-Mutante *jar1*, die eine reduzierte Sensitivität gegenüber MeJA aufweist, ist ebenfalls suszeptibler nach dem Befall von *Pythium irregulare* (Staswick *et al.* 1998). Eine weitere Signalmutante von *A. thaliana*, die *coi1*-Mutante, ist insensitiv gegenüber Coronatin, einem chloroseinduzierenden Toxin aus *P. syringae*, und gegenüber exogen appliziertem JA. Die *coi1*-Mutante weist eine erhöhte Suszeptibilität bei Befall mit nekrotrophen Pathogenen, wie z. B. *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*, auf (Thomma *et al.* 1998). Vor kurzem wurde eine weitere *coi1*-Mutante (*coi1-20*) beschrieben, deren erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae* mit einer

verstärkten SA-Synthese und einer SA-vermittelten Abwehrreaktion nach der Infektion verbunden ist (Kloek *et al.* 2001). Neben diesen „loss-of-function“-Mutanten wurde die *cev1*-Mutante beschrieben, deren JA-regulierte Signaltransduktionskette konstitutiv aktiv ist und die eine erhöhte Resistenz gegenüber Erregern von Mehltauerkrankungen aufweist (Ellis und Turner 2001).

Ein neuer Metabolit des AOS-Reaktionsweges wurde in verwundeten Blättern von *A. thaliana* und *S. tuberosum* beschrieben (Weber *et al.* 1997). Diese cyclopentenhaltige Verbindung mit 16 Kohlenstoffatomen wird als Dinor-oxo-PDA bezeichnet und stellt möglicherweise ein Hexadecan-Signalmolekül dar.

In *Hordeum vulgare* wird nach SA-Behandlung bevorzugt der Reduktaseweg stimuliert (Weichert *et al.* 1999). Da das aus diesem Reaktionsweg resultierende 13-HOT eine PR1-Transkriptakkumulation nach exogener Applikation induziert, wird 13-HOT als ein weiteres Signalmolekül diskutiert.

Arachidonsäure kommt nicht in Pflanzen vor, ist aber ein Bestandteil fungaler Membranen und kann als Elicitor pflanzliche Abwehrmechanismen induzieren. In Knollen von *S. tuberosum* werden nach Arachidonsäure-Behandlung Phytoalexine gebildet, und die LOX-Aktivität steigt an (Bostock *et al.* 1981; Bostock *et al.* 1992). Dieses LOX-Substrat stellt somit ein weiteres Signalmolekül während der pflanzlichen Reaktionen auf Pathogenbefall dar.

Die Kutikula der Pflanzen, die einen ersten Oberflächenschutz gegen Pathogenbefall darstellt, besteht aus Epoxy- und Hydroxyderivaten der Palmitin-, Öl- und Linolsäure, die möglicherweise durch die Aktivität von Peroxygenasen und Epoxidhydrolasen entstanden sind (Blée 1998). Fragmente der Kutikula können ebenfalls als Signale bei der Induktion von Abwehrreaktionen wirken (Schweizer *et al.* 1996).

Eine weitere Funktion des LOX-Reaktionsweges bei pflanzlichen Abwehrmechanismen kann in der Synthese antimikrobieller Metaboliten bestehen. Die Primärprodukte der LOX-Reaktion, die Hydroperoxyfettsäuren, wirken inhibierend auf das Wachstum von *M. grisea* und *P. infestans*, wobei die Hydroxyderivate bereits bei geringeren Konzentrationen wesentlich effizienter sind als die Hydroperoxide (Ohta *et al.* 1990; Ricker und Bostock 1994). Ebenso werden wachstumshemmende Effekte für Trihydroxy- und Epoxyderivate diskutiert (Kato *et al.* 1985; Masui *et al.* 1989). Der HPL-Reaktionsweg katalysiert die Synthese der C<sub>6</sub>-Aldehyde, die den charakteristischen Geruch verwundeter Pflanzen verursachen (Hatanaka 1993). Diese akkumulieren in *P. vulgaris* nach Inokulation mit *P. syringae* (Croft *et al.* 1993) und wirken sowohl bakterizid als auch antifungal (Deng *et al.* 1993; Vaughn und Gardner 1993). Wahrscheinlich sind die Aldehyde besonders an frühen Abwehrreaktionen beteiligt, bevor andere Mechanismen aktiviert werden (Croft *et al.* 1993). Dabei wirken die C<sub>9</sub>-Aldehyde toxischer als die C<sub>6</sub>-Aldehyde, die dafür aber weniger flüchtig sind (Vaughn und Gardner 1993). Die Produkte der DES (CA und CnA), die in Blättern von *S. tuberosum* nach Infektion mit *P. infestans*

akkumulieren, besitzen ebenfalls antimikrobielle Aktivität (Weber *et al.* 1999). Möglicherweise sind sie an der Resistenzausprägung gegenüber *P. infestans* beteiligt, da sie in einer Sorte von *S. tuberosum* mit erhöhter Resistenz schneller akkumulieren als in einer suszeptiblen (Weber *et al.* 1999). Außerdem besitzt JA neben seiner Funktion als Signalmolekül eventuell auch antifungale Eigenschaften, die verschiedene Entwicklungsprozesse von Pilzen inhibieren können (Schweizer *et al.* 1993).

### **3 Die Pflanze-Pathogen-Interaktion von *Solanum tuberosum* und *Phytophthora infestans***

*S. tuberosum* wurde im 16. Jahrhundert aus Südamerika eingeführt und gehört heute zu den wichtigsten Kulturpflanzen in Europa. Aufgrund der verhältnismäßig anspruchslosen Wachstumsbedingungen gestaltet sich der landwirtschaftliche Anbau relativ einfach. Probleme dabei bereiten jedoch immer wieder Erkrankungen, wie Rost, Brand, Mehltau und vor allem die durch den Oomyceten *P. infestans* verursachte Kraut- und Knollenfäule, die bei großflächigem Befall erhebliche Ertragseinbußen verursacht. Die Zoosporen von *P. infestans* werden durch Wind und Regen verbreitet, und bei feuchtem, kühlem Sommerwetter bieten sich optimale Bedingungen für das Auskeimen auf den Blättern von *S. tuberosum*. Zu Beginn der Infektion entstehen wässrige Läsionen, und innerhalb weniger Tage kommt es aufgrund des Pathogenwachstums zum vollständigen Absterben des Blattes. In den Boden gelangende Sporangien von *P. infestans* können auch die Knollen von *S. tuberosum* infizieren. Befallene Knollen sind anhand unregelmäßig braungrauer Flecken erkennbar und bis ins Knolleninnere braun und trockenfaulig. Diese Knollen stellen während der Lagerung Infektionsherde für gesunde Knollen dar. Die Kraut- und Knollenfäule wird derzeit durch den kostenintensiven Einsatz umweltbelastender Fungizide bekämpft. Daneben wurde versucht, wirksame Resistenzgene aus den Wildtypformen *Solanum demissum* und *Solanum commersonii* in kultivierte Sorten von *S. tuberosum* einzukreuzen. Aufgrund des sehr schnellen Auftretens neuer virulenter Rassen von *P. infestans* waren die erzielten Resistenzen aber nicht sehr dauerhaft. Deshalb besteht weiterhin großes Interesse, alternative Methoden zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule zu finden.

Es wurden mehrere LOX-Isoformen von *S. tuberosum* isoliert, deren Expression zum Teil in Verbindung mit der pflanzlichen Antwort auf Verwundung und Pathogenbefall beschrieben worden sind. StLOX1 stellt eine knollenspezifische, wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisierte 9-LOX dar (Geerts *et al.* 1994). Ein weiterer cDNA-Klon aus *S. tuberosum*, der zu 9-LOXen korrespondiert, ist die PLOX1, die in Blättern nach Infektion mit *P. infestans* und nach Behandlung mit dem Elicitor Arachidonsäure exprimiert wird (Fidantsef und Bostock 1998). Vor kurzem wurde eine weitere 9LOX, die POTLX-3, beschrieben, deren Expression in Blättern nach Ethylen- und MeJA-Behandlung sowie nach Inokulation mit *P. infestans* induziert ist (Kolomiets *et al.* 2000). Eine Funktion der

POTLX-2 während der frühen Knollenentwicklung von *S. tuberosum* wurde in transgenen Pflanzen gezeigt, in denen die verminderte Expression dieser 9LOX mit reduzierten Knollenerträgen und -größen sowie Störungen in der Knollenbildung korreliert (Kolomiets *et al.* 2001). Desweiteren wurden 13-LOXen beschrieben, die chloroplastidäre Transitpeptide enthalten (Royo *et al.* 1996). Dies sind die StLOX2, die blattspezifisch exprimiert wird, und die StLOX3, die in Wurzeln und Blättern exprimiert wird. Die Expression beider LOXen wird durch Verwundung induziert. Während die Akkumulation der StLOX3 Transkripte bereits 30 min nach Verwundung ihr Maximum erreicht, akkumulieren die Transkripte der StLOX2 kontinuierlich über 24 h. Detaillierte Analysen, um die Bedeutung der einzelnen LOX-Isoformen, der Enzyme und Produkte des LOX-Reaktionsweges bei Abwehrreaktionen zu untersuchen, erfolgten bisher in *S. tuberosum* nicht. Es wurde gezeigt, daß die Divinylether CA und CnA nach Pathogenbefall akkumulieren und möglicherweise mit der Resistenzprägung korrelieren (Weber *et al.* 1999).

### **Zielsetzung der Arbeit**

Die Zielsetzung der Arbeit war die Bedeutung des LOX-Reaktionsweges während der Ausprägung von Abwehrreaktionen bei Pathogenbefall in *S. tuberosum* zu untersuchen.

Dabei sollte zunächst am Modellsystem der Zellen von *S. tuberosum* die Genexpression von drei Lipoxygenase-Isoformen (StLOX1, StLOX2, StLOX3) und das Metabolitenprofil des LOX-Reaktionsweges nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans* analysiert werden, um eine mögliche bevorzugte Akkumulation bestimmter Oxylipine charakterisieren zu können. Anschließend sollte die Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* und die kompatible Interaktion mit *P. infestans* in Blättern von *S. tuberosum* L. cv. Désirée untersucht werden, um den LOX-Reaktionsweg in verschiedenen Interaktionssystemen beschreiben zu können. Weiterhin sollten auch resistenterere Sorten von *S. tuberosum* analysiert und dadurch eine Beteiligung des LOX-Reaktionsweges an der Resistenzprägung untersucht werden.

Ergänzend sollten *gain of function*-Experimente mittels Infiltration von Produkten der LOX-Reaktion durchgeführt werden, um deren Beteiligung an der HR und Induktion der Abwehrgenexpression zu untersuchen. *Loss of function*-Experimente mit transgenen Pflanzen sollten zur Untersuchung der Rolle von 9-LOXen bei Abwehrreaktionen in *S. tuberosum* erfolgen.

## **B Material und Methoden**

### **1 Material**

#### **1.1 Pflanzenzellen**

Es wurde eine Zellkultur aus dem Kallusgewebe verwundeter Blätter von *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée angelegt.

Dazu wurden die Blätter steriler Pflanzen mit einem Skalpell verwundet und über einen Zeitraum von 4 Wochen auf Kallusinduktionsmedium im Dunkeln bei einer Temperatur von 22 °C inkubiert. Die entstandenen Kalli wurden weitere 4 Wochen unter diesen Bedingungen subkultiviert. Kleinere Stücke des Kallusgewebes wurden anschließend in Flüssigmedium überführt und im Dunkeln bei 22 °C und 120 rpm geschüttelt. Im Abstand von 7d wurde die Zellkultur über einem Sieb abgesehen, die Zellen mit einem Skalpell verfeinert und in frisches Flüssigmedium überführt. Nach etwa 8 Wochen stand eine homogene Suspension der Zellen von *S. tuberosum* zur Verfügung.

Mit einer weiteren Zellkultur aus Blättern von *S. tuberosum* L. cv. Désirée, die von Dr. A. Schmidt (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt wurde, erfolgten Vorversuche und Jasmonsäurebestimmungen.

##### **Kallusinduktionsmedium:**

MS-Medium (s. 2.1.2.1);  
2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure;  
pH 5,7

##### **Flüssigmedium:**

Salze und Vitamine des MS-Mediums mit Gamborg B5 Vitaminen (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande);  
2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure;  
pH 5,7

#### **1.1.1 Kultivierung**

Nach jeweils 7 d wurden ca. 3,4 g Zellen in 50 ml frisches Flüssigmedium überführt und im Dunkeln bei 22 °C und 120 rpm geschüttelt.

#### **1.1.2 Elicitierung**

5 d nach dem Überführen in frisches Flüssigmedium wurden die Pflanzenzellen über definierte Zeiträume mit dem Kulturfiltrat von *Phytophthora infestans* inkubiert. Die Endkonzentration des Kulturfiltrats im Medium betrug 10 µg/ml Glucoseäquivalente (s. 1.6.1).

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen in einem Büchnertrichter aus dem Medium abgesaugt, zweimal gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## 1.2 Pflanzen

4 verschiedene Sorten von *S. tuberosum* L. standen für Untersuchungen an Ganzpflanzen zur Verfügung. Diese waren von Dr. E. Tacke (BIOPLANT GmbH, Ebsdorf) bereitgestellt worden. Die Untersuchung der Nichtwirt-Pathogen- und der kompatiblen Interaktion erfolgte mit Pflanzen der Sorte Désirée. Resistenzantworten wurden anhand der Sorten Tomba, Producent und Kuras analysiert, die für die Krautfäule die Boniturnote 3 nach der Liste des Bundessortenamtes haben. Die Boniturnoten reichen von 9 (hoch anfällig) bis 1 (immun). Weiterhin wurden transgene *nahG*-Pflanzen der Sorte Désirée untersucht (von Dr. P. Landgraf, IPB Halle, zur Verfügung gestellt), die das für die Salicylathydroxylase kodierende Gen aus *Pseudomonas putida* exprimieren.

### 1.2.1 Anzucht

Die Pflanzen wurden als sterile Gewebekulturen gehalten, die auf MS-Medium in der Phytokammer bei 23 °C mit einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 und 8 h und einer Lichtmenge von 100 µE angezogen wurden.

**MS-Medium** (Murashige und Skoog, 1962):

Salze und Vitamine des MS-Mediums (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande);

0,8 % (w/v) *plant agar*;

2,0 % (w/v) Saccharose;

pH 5,8

### 1.2.2 Behandlung der Blätter mit Pathogenen

Für Infektionsexperimente wurden Gewebekulturpflanzen, die etwa 4 Wochen auf MS-Medium gewachsen waren, weitere 4 Wochen auf einem Erde/Sand-Gemisch (1:1) in der Phytokammer bei 22 °C (Lichtphase) bzw. 18 °C (Dunkelphase) und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit bei einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 und 8 h angezogen und über den Zeitraum der Versuchsdurchführung bei gleichen Bedingungen inkubiert.

Die Infiltration mit einer Suspension von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (s. 1.3.1), mit 100 mM Pep13, 10 µM Eosin bzw. mit verschiedenen Konzentrationen von LOX-Metaboliten (von Prof. Dr. M. Hamberg, Karolinska Institut, Stockholm und M. Stumpe, IPK, Gatersleben zur Verfügung gestellt) erfolgte mit Hilfe einer 1 ml-Spritze durch die Stomata der Blattunterseite. Kontrollpflanzen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert. Es wurden etwa 2/3 der Blattfläche von zwei älteren Blättern infiltriert.

Für die Inokulation mit *P. infestans* wurden zwischen 20 und 30 Tropfen von je 10 µl einer Zoosporensuspension (s. 1.6.2) auf der Blattunterseite von zwei älteren Blättern verteilt. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser behandelt. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde während dieser Infektionsversuche auf 100 % erhöht.

Die behandelten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 1.2.3 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von Pflanzen der Sorte Désirée mit dem Plasmidkonstrukt pBKTX-*LOXas-GUS-LOXs* bzw. pBKTX-*POTLX-3as* erfolgte mit der Blattscheiben-Transformationsmethode (Horsch *et al.* 1985) durch den *A. tumefaciens*-vermittelten T-DNA-Transfer.

Jeweils eine *A. tumefaciens*-Kolonie, die die oben genannten Plasmidkonstrukte bzw. das Plasmid pBKTX besaßen, wurden in 20 ml YEB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin (s. 1.3.3) über Nacht kultiviert, zentrifugiert (10 min, 2.700 x g, RT), das Sediment mit 20 ml 10 mM Magnesiumsulfat gewaschen und in 20 ml 3MS-Flüssigmedium resuspendiert. Blätter von etwa 3 Wochen alten Gewebekulturpflanzen wurden an der Unterseite eingeritzt, die Petiolen entfernt und die Blätter mit der Oberseite auf 10 ml 3MS-Flüssigmedium gelegt. Nach Zugabe von 100 µl der entsprechenden Agrobaktériensuspension wurden die Blätter bei 23 °C 2 d im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blätter mit der Unterseite auf GMS-Kallusinduktionsmedium ausgelegt und in der Phytokammer inkubiert. Nach etwa 10 d wurden die Blätter auf GMS-Sproßinduktionsmedium transferiert. Nachdem 2 bis 3 cm lange Sprosse entstanden waren, wurden diese abgetrennt und auf 3MS-Wurzelinduktionsmedium umgesetzt. Nach der Wurzelbildung wurden die transgenen Pflanzen auf MS-Transformationsmedium gehalten.

#### 3MS-Flüssigmedium:

Salze und Vitamine des MS-Mediums;  
3,0 % (w/v) Saccharose;  
pH 5,8

#### GMS-Medium:

Salze und Vitamine des MS-Mediums;  
0,8 % (w/v) *plant agar*;  
1,6 % (w/v) Glucose;  
pH 5,8

#### GMS-Kallusinduktionsmedium:

GMS-Medium;  
nach Autoklavieren:  
5 µg/ml Naphthyllessigsäure;  
0,1 µg/ml Benzylaminopurin;  
40 µg/ml Cefotaxim;  
50 µg/ml Kanamycin

#### GMS-Sproßinduktionsmedium:

GMS-Medium;  
nach Autoklavieren:  
2 µg/ml Zeatinriboside;  
0,02 µg/ml Naphthyllessigsäure;  
0,02 µg/ml Gibberellin A<sub>3</sub>;  
40 µg/ml Cefotaxim;  
50 µg/ml Kanamycin

#### 3MS-Wurzelinduktionsmedium:

3MS-Flüssigmedium;  
0,8 % (w/v) *plant agar*;  
nach Autoklavieren:  
40 µg/ml Cefotaxim;  
50 µg/ml Kanamycin

#### MS-Transformantenmedium:

MS-Medium;  
nach Autoklavieren:  
50 µg/ml Kanamycin

### 1.3 Bakterien

#### 1.3.1 Kultivierung von *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

Der verwendete Bakterienstamm *P. syringae* pv. *maculicola* M2 (Debener *et al.* 1991) war von Prof. Dr. J. Dangl (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt worden.

Für Infektionsexperimente wurden Bakterien aus der Glycerinkultur auf King's B-Medium ausgestrichen und für 3 d bei 28 °C angezogen. Von dieser Kultur wurde eine einzelne Kolonie in Flüssig-King's B-Medium über Nacht bei 28 °C und 160 rpm angezogen. Diese Übernachtskultur wurde zentrifugiert (5 min, 2.700 x g, RT), das Sediment mit 10 mM Magnesiumchlorid gewaschen und in 10 mM Magnesiumchlorid resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt, was einer Bakteriendichte von 1x10<sup>8</sup> cfu/ml entspricht.

##### King's B-Medium:

2	% (w/v)	Glycerin;
3	% (w/v)	Proteose Pepton No. 3;
0,8	% (w/v)	<i>plant agar</i> ;
nach Autoklavieren:	0,1	% (w/v) Dikaliumhydrogenphosphat (sterilfiltriert);
	0,1	% (w/v) Magnesiumchlorid (sterilfiltriert);
	50	µg/ml Rifampicin

##### Flüssig-King's B-Medium:

King's B-Medium ohne *plant agar*

#### 1.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5α (Hanahan 1983) diente als Wirtsbakterienstamm für Transformationsexperimente.

Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Platten [LB-Medium mit 0,8 % (w/v) *plant agar*] bei 37 °C unter Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin, wobei für die Anzucht in Flüssigkultur außerdem mit 160 rpm geschüttelt wurde .

##### LB-Medium:

1	% (w/v)	Trypton;
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt;
0,5	% (w/v)	Natriumchlorid;
		pH 7,0

##### 1.3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode (Tang *et al.* 1994) hergestellt, aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und maximal 3 Monate bei -80 °C gelagert.

##### 1.3.2.2 Transformation

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut, 30 min mit Plasmid-DNA auf Eis inkubiert, 30 sec auf 42 °C erhitzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden

400 µl SOB-Medium zugegeben, 30 - 60 min bei 37 °C geschüttelt, und der Transformationsansatz auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

**SOB-Medium:**

LB-Medium;  
nach Autoklavieren: 20 mM Magnesiumsulfat (sterilfiltriert)

### 1.3.3 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Pflanzentransformation wurde der *A. tumefaciens*-Stamm LBA4404 (Hoekema *et al.* 1983) verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in YEB-Medium bzw. auf YEB-Platten [YEB-Medium mit 0,8 % (w/v) *plant agar*] bei 28 °C unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin, wobei für die Anzucht in Flüssigkultur zusätzlich mit 160 rpm geschüttelt wurde.

**YEB-Medium:**

0,5 % (w/v) *beef extract*;  
0,1 % (w/v) Hefeextrakt;  
0,5 % (w/v) Pepton;  
0,5 % (w/v) Saccharose;  
nach Autoklavieren: 2 mM Magnesiumsulfat (sterilfiltriert)

#### 1.3.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Eine Kolonie wurde nach der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988) in 2ml YEB-Medium über Nacht bei 28 °C angezogen. Von dieser Übernachtskultur wurde 1 ml in 50 ml YEB-Medium bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 subkultiviert. Es wurde zentrifugiert (10 min, 2.700 x g, 4 °C), die Zellen in 1 ml YEB-Medium aufgenommen, aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und maximal 3 Monate bei -80 °C gelagert.

#### 1.3.3.2 Transformation

200 µl kompetente Zellen wurden nach der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988) vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA versetzt und jeweils 5min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1ml YEB-Medium wurde 2h bei 28 °C geschüttelt, der Transformationsansatz auf YEB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und 2 d bei 28 °C inkubiert.

## 1.4 Klonierungsvektoren

Folgende Plasmidvektoren wurden für diese Arbeit eingesetzt:

**Tab. B-1: Plasmidvektoren.**

Plasmid-Vektor	Merkmale	Verwendungszweck	Referenz
pCR <sup>®</sup> 2.1	T7-Promotor, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Standardklonierung und Sequenzierung	INVITROGEN (Groningen, Niederlande)
pKN-GUS	KpnI/EcoRI-Fragment des GUS-Gens (2,1 kb), Amp <sup>r</sup>	Konstruktion des RNAi-Fragmentes	(Feltkamp <i>et al.</i> 1995)
pBKTX	35S-TX-Promotor, MCS, OCS-Poly(A), NOS-Promotor, Kan <sup>r</sup>	Pflanzentransformation	Dr. S. Rosahl (IPB, Halle)

## 1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) synthetisiert.

**Tab. B-2: Oligonukleotid-Primer.**

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Funktion
5coDES	TGG GTI AWH GCH CAY GAR TGB GG <sup>1</sup>	Amplifizierung eines $\Delta^{12}$ -FAD-homologen cDNA-Fragmentes
3coDES	CCA RTY CCA YTC IGW BGA RTC RTA RTG <sup>1</sup>	
cg5hom	ACA AAC AGG CAA CTA AGT GTG CTT CAC C	Restriktionsanalyse
cg3hom	GCG ATT TGG GAG GTA ACC TGC ATA AGG	
cg5i	GAG CTC TAT GTT GCA GTG AAT GAC TCG	POTLX-3sense-RNAi-Fragment mit <i>SacI</i> -Schnittstellen
cg3i	GAG CTC GGA TAG TCT TGA ATT AGC AAG	
cg5i-2	GGA TCC TAT GTT GCA GTG AAT GAC TCG	POTLX-3antisense-RNAi-Fragment mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Pst</i> I- <i>Kpn</i> I-Schnittstelle
cg3i-2	CTG CAG GGT ACC GGA TAG TCT TGA ATT AGC	
cg5potas	TCT AGA AAG CTA TCT CTG GGA GTG	POTLX-3 mit <i>Xba</i> I bzw. <i>Kpn</i> I-Schnittstelle
cg3potas	GGT ACC GGA TAG TCT TGA ATT AGC AAG	

<sup>1</sup> Fritsche *et al.* 1999

## 1.6 Oomycet *Phytophthora infestans*

Die Präparationen des Kulturfiltrats für die Behandlung der Pflanzenzellen (s. 1.1.2) und der Zoosporensuspensionen für die Inokulationsexperimente (s. 1.2.2), erfolgten aus entsprechenden Kulturen von *P. infestans*, die von Dr. T. Nürnberger, IPB, Halle, zur Verfügung gestellt wurden.

Die Kultivierung erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium bei 18 °C im Dunkeln.

### Hafer-Bohne-Medium:

3,4	% (w/v)	Bohnenmehl;
1,7	% (w/v)	Hafermehl;
0,85	% (w/v)	Saccharose;
1,5	% (w/v)	Agar

### 1.6.1 Präparation des Kulturfiltrats

Für die Herstellung einer Rohelicitorpräparation wurde eine Kultur von *P. infestans* in flüssigem Henniger-Medium (Henniger 1959) angezogen. Nach 6 Wochen wurde das Medium durch ein Nylonnetz (45 µm Maschengröße) filtriert und anschließend gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gegen Wasser dialysiert. Die Bestimmung der Glucosekonzentration des Kulturfiltrates erfolgte mit der Anthron-Methode (Dische 1962).

### 1.6.2 Isolation von Zoosporensuspensionen

Ein Stück des mit *P. infestans* bewachsenen Hafer-Bohne-Mediums wurde auf frisches Hafer-Bohne-Medium überführt und 10 bis 12 d kultiviert. Das Pilzmycel wurde dann mit 8 ml Wasser überschichtet und 4 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend kräftig geschüttelt und die Sporenkonzentration mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Für die Inokulationsexperimente wurden Konzentrationen von 400.000 bis 500.000 Sporen/ml eingesetzt.

## 2 Methoden

### 2.1 Nukleinsäureanalysen

#### 2.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

Allgemein gilt für den Umgang mit RNA, daß alle Lösungen vor Gebrauch zur Inaktivierung von RNasen mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt und anschließend autoklaviert wurden. Tris-haltige Puffer wurden mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

##### 2.1.1.1 RNA-Präparation

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen nach der Methode von Logemann *et al.* (1987) wurden 300 mg gefrorenes Zellmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 1 ml RNA-Extraktionspuffer homogenisiert und mit 0,7 Vol. PCI versetzt. Nach der Zentrifugation (20 min, 12.000 x g, 4 °C) wurde die RNA aus der oberen, wäßrigen Phase unter Zugabe von 0,05 Vol. 1 M Essigsäure mit 0,7 Vol. Ethanol für mindest. 1 h bei -20 °C gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde hintereinander mit 1 ml 70 %igem Ethanol, 1 ml 3M Natriumacetat, pH 4,8, 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen.

Gesamt-RNA aus etwa 100 mg Blattmaterial wurde mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Das gefrorene und gemörserte Blattmaterial wurde mit 1 ml „TRIzol<sup>®</sup> Reagent“ (GIBCO BRL, Eggenstein) homogenisiert und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach der Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4 °C) wurde die RNA aus der oberen, wäßrigen Phase mit 0,8 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 x g,

4 °C). Das Präzipitat wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

**RNA-Extraktionspuffer:**

8 M Guanidiniumchlorid;  
20 mM MES;  
20 mM EDTA;  
pH 7,0

**PCI:**

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol  
(25:24:1, v/v/v)

**2.1.1.2 Präparation genomischer DNA**

Etwa 500 mg gefrorenes Blattmaterial wurden mit 1 ml DNA-Extraktionspuffer homogenisiert und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 wurde vorsichtig geschwenkt, mindest. 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Die obere, wäßrige Phase wurde mit 0,7 Vol. PCI versetzt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Aus der wäßrigen Phase wurde die genomische DNA mit 0,5 Vol. Isopropanol gefällt und anschließend zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

**DNA-Extraktionspuffer:**

100 mM Tris-HCl, pH 8,0;  
50 mM EDTA, pH 8,0;  
500 mM Natriumchlorid;  
1,5 % (w/v) SDS

**TE-Puffer:**

10 mM Tris-HCl;  
1 mM EDTA;  
pH 8,0

**2.1.1.3 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim und Doly 1979).

**Mini-Präparation**

Eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5α, die in 1,5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen worden war, wurde zentrifugiert (1 min, 12.000 x g, RT), in 0,1 ml Lysispuffer aufgenommen und mit 0,2 ml frisch angesetzter, alkalischer SDS-Lösung versetzt. Diese Suspension wurde geschwenkt, nachfolgend mit 0,15 ml 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 versetzt, wiederholt geschwenkt und 5min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4 °C) wurden die Nucleinsäuren aus dem Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

**Lysispuffer:**

50	mM	Tris-HCl, pH 8,0;
50	mM	EDTA;
15	% (w/v)	Saccharose

**Alkalische SDS-Lösung:**

0,2	N	Natriumhydroxid;
1	% (w/v)	SDS

Zur Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde der „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

**Midi-Präparation**

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$ , in 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen, und der „QIAfilter™ Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

**Präparation von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens***

Eine Kultur von *A. tumefaciens* LBA4404 wurde in 1,5 ml YEB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum 2d bei 28 °C geschüttelt. Nach der Zentrifugation (1 min, 12.000 x g, RT) wurde die Suspension in 0,1 ml Lysozym-Lösung aufgenommen, 30 min bei RT inkubiert, mit 0,2 ml frisch angesetzter, alkalischer SDS-Lösung versetzt, geschwenkt und 30 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension mit 0,15 ml 3 M Kaliumacetat versetzt, geschwenkt und zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde mit 1 Vol. PCI versetzt, zentrifugiert (3 min, 12.000 x g, 4 °C), die obere, wäßrige Phase mit 1 Vol. Chloroform versetzt und zentrifugiert (2 min, 12.000 x g, 4 °C). Die DNA wurde aus dem Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol für 5 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

**Lysozym-Lösung:**

0,9	% (w/v)	wasserfreie Glukose;
10	mM	EDTA, pH 8,0;
25	mM	Tris-HCl, pH 8,0;
0,4	% (w/v)	Lysozym

**2.1.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Unter UV-Licht wurde zuvor das DNA-Fragment enthaltende Agarosegelstück mit einem Skalpell ausgeschnitten.

**2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese****2.1.2.1 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese**

Jeweils 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit 1,5 Vol. RNA-Probenpuffer versetzt, 15 min bei 65 °C erhitzt, 5 min auf Eis inkubiert, mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) versetzt

und auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Die RNA wurde 1,5 h bei 6 V/cm mit 1xMOPS-Puffer als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele unter Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) fotografiert.

**RNA-Probenpuffer:**

50	% (v/v)	Formamid;
6	% (v/v)	Formaldehyd;
6	% (v/v)	Glycerin;
10	% (v/v)	10xMOPS;
0,04	% (w/v)	Bromphenolblau

**Denaturierendes Agarosegel:**

1	% (w/v)	Agarose;
6	% (v/v)	Formaldehyd;
10	% (v/v)	10xMOPS-Puffer

**10xMOPS-Puffer:**

200	mM	Morpholinopropansulfon- säure;
50	mM	Natriumacetat;
5	mM	EDTA;
		pH 7,0

### 2.1.2.2 Nichtdenaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Die DNA wurde mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und auf das nichtdenaturierende Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurde  $\lambda$ -DNA, die mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I geschnitten war, eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 1,5 bis 6 V/cm mit 1xTAE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Agarosegel 10 bis 15 min in der Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert. Unter Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) konnte die Auftrennung der DNA dokumentiert werden.

**DNA-Probenpuffer:**

30	% (v/v)	Glycerin;
2	% (v/v)	50xTAE;
0,25	% (w/v)	Bromphenolblau

**Nichtdenaturierendes Agarosegel:**

1 - 2	% (w/v)	Agarose; in 1xTAE
-------	---------	----------------------

**50xTAE:**

2	M	Tris-HCl;
1	M	Natriumacetat;
100	mM	EDTA;
		pH 8,0

**Ethidiumbromid-Färbelösung:**

0,5	µg/ml	Ethidiumbromid; in 1xTAE
-----	-------	-----------------------------

### 2.1.3 Transfertechniken und radioaktive Hybridisierung

#### 2.1.3.1 Northern-Transfer

Der Transfer der im denaturierenden Agarosegel aufgetrennten RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Dabei wurde die RNA unter Verwendung von Filterpapier (FILTRAK, Niederschlag) mit 20xSSC auf positiv geladene Nylonmembranen (ROCHE, Mannheim) überführt. Der Kapillartransfer erfolgte für ca. 16 h bei RT. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung mit 120 mJ im „UV Stratalinker™ 1800“ (STRATAGENE, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

**20xSSC:**

3	M	Natriumchlorid;
0,3	M	Natriumcitrat;
		pH 7,0

### 2.1.3.2 Southern-Transfer

Ca. 30 µg genomische DNA wurden mit einer Restriktionsendonuklease unter Zusatz von RNase A über Nacht bei 37 °C gespalten und im nichtdenaturierenden Agarosegel für ca. 16 h bei 1,5 V/cm aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend jeweils 45 min in Denaturierungslösung sowie Neutralisierungslösung geschwenkt. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte wie für den Northern-Transfer (s. 2.1.3.1) beschrieben.

#### Denaturierungslösung:

0,5 M Natriumhydroxid;  
1,5 M Natriumchlorid

#### Neutralisierungslösung:

0,5 M Tris-HCl;  
1,5 M Natriumchlorid;  
pH 7,0

### 2.1.3.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktive Markierungen von DNA-Fragmenten erfolgten mit dem „Megaprime-DNA Labelling System“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg). Es wurden 50 bis 100 ng DNA-Fragment (s. 2.2.1.1.4) und 1,85 mBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) eingesetzt. Die nichteingebauten Nukleotide wurden über „Probe Quant™ G-50 Micro Columns“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) abgetrennt.

### 2.1.3.4 Radioaktive Hybridisierung

Nach dem Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen erfolgte die Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuremoleküle.

Für Northern-Blot-Analysen wurden folgende Fragmente verwendet:

Tab. B-3: cDNA-Fragmente für Northern-Blot-Analysen.

Gen	cDNA-Fragment	Referenz
StLOX1	1,4 kb; <i>EcoRI</i>	(Geerts <i>et al.</i> 1994)
StLOX2	2,2 kb; <i>BamHI</i>	(Royo <i>et al.</i> 1996)
StLOX3	1,8 kb; <i>PstI</i>	(Royo <i>et al.</i> 1996)
POTLX-3	0,4 kb; RNAi-Fragment	s. 4.3 (Kolomiets <i>et al.</i> 2000)
StPRB1b	0,3 kb; <i>EcoRI</i>	(Kistner 1999)
StPR10	0,8 kb; <i>EcoRI</i>	(Göbel <i>et al.</i> 2001)
StPAL	1,2 kb; <i>EcoRI</i>	(Joos und Hahlbrock 1992)
St4Cl	2,0 kb; <i>EcoRI</i>	(Becker-André <i>et al.</i> 1991)
StTHT	0,95 kb; <i>EcoRI</i>	(Schmidt <i>et al.</i> 1999)
St25SrRNA	1,3 kb; <i>BamHI</i>	J. Petters (IPB, Halle)

Die Southern-Blot-Analysen der RNAi-Transformanten erfolgten mit dem *EcoRV/SacI*-Fragment des pKN-GUS (GUS-Gen), die Analyse der POTLX-3as-Transformanten bzw. der Kontrollpflanzen mit dem *EcoRI/HindIII*-Fragment des pBK-TX (35S-TX-Promotor).

Für die Hybridisierung wurde die Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre überführt. Alle Hybridisierungsschritte wurden in einem Hybridisierungsofen unter

ständigem Drehen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Prähybridisierung in 20 ml Hybridisierungslösung für 1 h bei 42 °C. Zur Hybridisierung wurde diese Lösung durch die Hybridisierungslösung mit dem radioaktiv markierten, 10 min bei 95 °C denaturierten und auf Eis rasch abgekühlten DNA-Fragment ersetzt und ca. 16 h bei 42 °C inkubiert.

Die Nylonmembran wurde nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung dreimal 20 min mit der Waschlösung bei 60 °C inkubiert und dann mit Folie abgedeckt. Der Nachweis der radioaktiv markierten Nukleinsäuren erfolgte mittels *storage phosphor*-Technik unter Verwendung eines „phosphoscreens“ (MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld), der nachfolgend mit Hilfe eines Laserstrahls an einem „phosphoimager“ (MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) abgelesen wurde.

Zum Entfernen der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurde die Nylonmembran dreimal 15 min mit 0,1 % (w/v) SDS bei 65 °C inkubiert.

#### Hybridisierungslösung:

0,2 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon-40 (SIGMA, Deisenhofen);
0,2 % (w/v)	Ficoll 400 (PHARMACIA, Uppsala, Schweden);
0,2 % (w/v)	BSA Fraktion V (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim);
48 % (v/v)	Lösung N;
48 % (v/v)	Formamid;
100 µg/ml	hitzenaturierte Heringssperma-DNA (SIGMA, Deisenhofen)

#### Lösung N:

1,8 M	Natriumchlorid;
100 mM	Natriumdihydrogenphosphat;
10 mM	EDTA;
0,2 % (w/v)	SDS;
	pH 7,0

#### Waschlösung:

15 % (v/v)	20xSSC (s. 2.1.3.1);
0,1 % (w/v)	SDS

## 2.1.4 Klonierungstechniken

Zur Konstruktion und Klonierung von Plasmiden wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma ROCHE (Mannheim) verwendet. Die Standardmethoden erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989).

### 2.1.4.1 Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren, die zuvor mit Restriktionsendonukleasen gespalten waren, zu verhindern, wurden diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit alkalischer Phosphatase aus *Palaemon borealis* (ROCHE, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

### 2.1.4.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten bzw. überhängenden Enden erfolgte mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (ROCHE, Mannheim) bzw. mit der „T4 DNA Ligase“ (ROCHE, Mannheim), die nach Herstellerangaben verwendet wurden. PCR-Produkte

wurden mit dem „TOPO TA Cloning® Kit“ (INVITROGEN, Groningen, Niederlande) nach Herstellerangaben in den pCR 2.1-Vektor kloniert.

### 2.1.5 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von Nukleotidsequenzen verwendet.

Als DNA-Matrize dienten Plasmid-DNA bzw. Bakterienkolonien bei der Selektion positiver Klone nach Klonierungsexperimenten. In je 50 µl PCR-Ansätzen wurde 1 µl DNA-Lösung eingesetzt bzw. Zellmaterial einer *E. coli*-Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgestreift. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotid-Primer (s. 1.5) wurden folgendermaßen berechnet:

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{Prozent des G/C-Gehalts}) - 650 / \text{Länge des Primers}$$

Die PCR wurde nach den Herstellerangaben mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Bei Verwendung von Koloniematerial wurde 10 min bei 95 °C vorinkubiert, um den Zellaufschluß zu ermöglichen.

#### PCR-Ansatz (50 µl):

- 1 µl Template-DNA (50 - 200 ng/µl) oder Bakterienkolonie;
- 1 µl 5'-Primer (100 µM);
- 1 µl 3'-Primer (100 µM);
- 5 µl dNTP-Mix (10 mM);
- 5 µl 10x *Taq*-Reaktionspuffer (mit 15 mM Magnesiumchlorid);
- 2-5 U *Taq*-DNA-Polymerase (ROCHE, Mannheim)

### 2.1.6 RT-PCR

Die Reverse Transkription von mRNA und anschließende Amplifikation der cDNA erfolgte mittels RT-PCR.

Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen in RNA-Lösungen wurden je 10 µg Gesamt-RNA mit 10 U RNase-freier DNase I (ROCHE, Mannheim) in Gegenwart von 10 U RNase-Inhibitor (ROCHE, Mannheim) 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v)- und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v)-Extraktion gereinigt, nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt und zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 µl Wasser aufgenommen (ca. 1 µg/µl).

Für die RT-PCR wurden die „Ready-To-Go™ RT-PCR Beads“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) nach Herstellerangaben verwendet. Je 2 µl DNase-behandelte RNA-Lösung wurden in 50 µl RT-PCR-Ansätzen eingesetzt.

#### RT-PCR-Ansatz:

- „Ready-To-Go™ RT-PCR Bead“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg);
- 2 µl DNase-behandelte RNA (ca 2 µg);
- 1,5 µl 5'-Primer (10 µM);
- 1,5 µl 3'-Primer (10 µM);
- 45 µl Wasser

Desweiteren wurde die „SuperScript™II RNase H Reverse Transcriptase“ (GIBCO BRL, Eggenstein) benutzt. Je 2 µl DNase-behandelte RNA-Lösung wurden nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.1.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

### 2.1.7.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der automatischen Sequenzierer „LiCor, Modell 4000L“ bzw. „LONGREADIR 4200“ (MWG-BIOTECH, Ebersberg). Für die Sequenzierreaktionen kam der „SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ Sequencing Kit“ (BIOZYM, Oldendorf) zum Einsatz, wobei die nichtradioaktive Markierung der DNA über die 5'-Fluoreszenzmarkierung der Primer durch „IRD700“ bzw. „IRD800“ (MWG-BIOTECH, Ebersberg) erfolgte.

### 2.1.7.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzdaten wurden zunächst mit dem „Basic ImagIR Version 4.00“-Programm (MWG-BIOTECH, Ebersberg) analysiert. Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe von Programmen, die vom *National Centre for Biotechnological Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) und vom *ExpASy Molecular Biology Server* (<http://www.expasy.ch>) angeboten werden.

## 2.2 Proteinanalysen

### 2.2.1 Proteinisolierung

Je 0,3 bis 0,5 g gefrorenes Zellmaterial wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 0,5 ml Protein-Extraktionspuffer versetzt. Zur Extraktion wurde kräftig geschüttelt, anschließend zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Bicinchoninsäure (ROTH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

#### Protein-Extraktionspuffer:

100	mM	Tris-HCl, pH 7,6;
5	mM	EDTA;
0,1	% (w/v)	SDS;

### 2.2.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgel mit einem aufgelagerten Startgel nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Es wurde die „Mini-PROTEAN® 3 Cell“-Apparatur (BIO-RAD, München) verwendet.

Jeweils 40 µg Protein wurden, mit 0,2 Vol. Protein-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert, auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 8 µl

„prestained protein marker“ (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in Elektrophoresepuffer 15 min bei 15 mA, 30 min bei 20 mA und bis zum Erreichen des unteren Gelendes durch die Bromphenolblau-Bande bei 30 mA.

**10 %ige Trenngel-Lösung:**

10	% (w/v)	Acrylamid;
2,7	% (w/v)	Bisacrylamid;
250	mM	Tris-HCl, pH 8,8;
0,1	% (w/v)	SDS;
5	% (v/v)	Glycerin;
0,4	% (v/v)	TEMED;
0,05	% (w/v)	APS

**Protein-Probenpuffer:**

100	mM	Tris-HCl, pH 6,8;
2,5	% (w/v)	SDS;
20	% (v/v)	Glycerin

**Sammelgel:**

3,75	% (w/v)	Acrylamid;
1	% (w/v)	Bisacrylamid;
125	mM	Tris-HCl, pH 6,8;
0,1	% (w/v)	SDS;
0,4	% (v/v)	TEMED;
0,08	% (w/v)	APS

**Elektrophoresepuffer:**

25	mM	Tris;
200	mM	Glycin;
0,1	% (w/v)	SDS;
		pH 8,3

## 2.2.3 Western-Transfer und Immunodetektion

### 2.2.3.1 Western-Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel nach dem Naßblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (MACHEREY-NAGEL, Düren) transferiert. Dazu wurde eine „Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell“-Apparatur (BIO-RAD, München) verwendet. Der Transfer wurde bei 100 V für 1 h mit Transferpuffer durchgeführt.

Zur Kontrolle des Transfers, zur Markierung des Molekulargewichtstandards und zur Abschätzung der aufgetrennten Proteinmenge erfolgte die Anfärbung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceau nach einer Methode von Steffen und Linck (1989).

**Transferpuffer:**

25	mM	Tris-HCl, pH 8,3;
192	mM	Glycin;
20	% (v/v)	Methanol

### 2.2.3.2 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese dreimal 15 min in PBS-Puffer gewaschen und dann für 5 h in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer 1:1000-Verdünnung des polyklonalen Antikörpers gegen die 539 N-terminalen Aminosäuren der StLOX1 (Geerts *et al.* 1994) in Blockierungslösung für ca. 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min in PBS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper, „Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase Conjugate“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg), in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungslösung 1 h mit der Nitrocellulosemembran geschwenkt. Die Membran wurde dreimal 3 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit „ECL+Plus Reagenz“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) nach Angaben des Herstellers behandelt.

Die Nitrocellulosemembran wurde nun in Folie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenfilmkassette für 30 s bis 5 min bei RT inkubiert.

**PBS-Puffer:**

0,58 M Dinatriumhydrogenphosphat;  
0,17 M Natriumdihydrogenphosphat;  
0,68 M Natriumchlorid;  
pH 7,4

**Blockierungslösung:**

5 % (w/v) Trockenmilch (BIO-RAD, München) in PBS-Puffer

## 2.3 LOX-Aktivitätsmessung

### 2.3.1 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode

Je 0,6 g gefrorenes und gemörsertes Zellmaterial wurden mit 1 ml Extraktionspuffer homogenisiert und 20 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Proteinextrakt wurde für die Messung des Sauerstoffverbrauchs in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode (BIOLYTIK, Bochum) und mit LA (SIGMA, Deisenhofen) als Substrat eingesetzt.

**Extraktionspuffer:**

100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0;  
0,1 % (v/v) Tween 20

### 2.3.2 HPLC-Analyse der LOX-Aktivität

Je 0,5 g gefrorenes und gemörsertes Zellmaterial bzw. je 0,2 g Blattmaterial wurden mit 1 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 extrahiert und 20 min bei 4 °C geschüttelt. Nach der Zentrifugation (5 min, 8.000 x g, RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurden aus Blattmaterial Extrakte mit 1 ml Kaliumphosphatpuffer bzw. 1 ml Tris-Puffer hergestellt.

**Kaliumphosphatpuffer:**

100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0;  
10 % (v/v) Glycerin;  
0,1 % (v/v) Tween 20;  
0,5 M Natriumchlorid

**Tris-Puffer:**

100 mM Tris-HCl, pH 7,0;  
10 % (v/v) Glycerin;  
0,1 % (v/v) Tween 20;  
0,5 M Natriumchlorid

Die Oxygenierung von LA erfolgte durch Inkubation des Proteinextraktes mit dem Substrat (Endkonzentration 120 µM) für 30 min bei RT. Durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumborhydrid erfolgte die Reduktion der gebildeten Hydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen. Mit 0,1 ml Essigsäure wurde anschließend auf pH 3 angesäuert. Die Reaktionsprodukte wurden mit einer Chloroform/Methanol-Extraktion (wässrige Phase/Chloroform/Methanol, 1:1:1, v/v/v) nach der Methode von Bligh und Dyer

(1959) isoliert. Die organische Phase wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und anschließend in 0,05 ml HPLC-Laufmittel [Methanol/H<sub>2</sub>O/Essigsäure (85:15:0,1, v/v/v)] aufgenommen.

Die HPLC-Analysen erfolgten mit Geräten der „Agilent Series 1100“ (HEWLETT PACKARD, Waldbronn), die mit einem Dioden-Array-Detektor betrieben wurden. Alle Analysen wurden bei einer Säulentemperatur von 20 °C durchgeführt. Die zur eindeutigen Identifizierung der Produkte verwendeten Standards wurden von CAYMAN CHEMICALS (USA) bezogen bzw. von H. Weichert (IPK, Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Das spezifische Absorptionsmaximum der Hydroxide wurde bei 234 nm detektiert. An der Umkehr-Phase (RP-HPLC) wurden die Oxidationsprodukte der Fettsäureumsetzung vorgereinigt. Die Auftrennung der Positionsisomere erfolgte an der Normal-Phase (SP-HPLC). Die R/S-Isomere der Hydroxid-Derivate wurden an der Chiral-Phase (CP-HPLC) getrennt (Feussner und Kühn 1995; Feussner *et al.* 1997).

#### Umkehr-Phase (RP-HPLC):

Säule:	NUCLEOSIL C-18 (250 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße; MACHEREY-NAGEL, Düren)		
Laufmittel:	A	Methanol/H <sub>2</sub> O/Essigsäure (85:15:0,1, v/v/v)	
	B	Methanol/Essigsäure (100:0,1, v/v)	
Laufschema:	Zeit	% Laufmittel B	Fluß (ml/min)
	0	0	0,18
	20	0	0,18
	30	100	0,18
	70	100	0,18
	75	0	0,18
	80	0	0,18
Retentionszeit:	13/9-HOD → 18,0 – 21,0 min		

#### Normal-Phase (SP-HPLC):

Säule:	ZORBAX SIL (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; HEWLETT PACKARD, Waldbronn)	
Laufmittel:	n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure (100:1:0,1, v/v/v)	
Fluß:	1 ml/min	
Laufschema:	isokratisch von 2 bis 50 min	
Retentionszeit:	13-HOD →	13,0 min
	9-HOD →	16,7 min

#### Chiral-Phase (CP-HPLC):

Säule:	CHIRAL OD-H (150 x 2,1 mm, 5 µm Partikelgröße; BAKER, Deventer, Niederlande)	
Laufmittel:	n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure (100:5:0,1, v/v/v)	
Fluß:	0,1 ml/min	
Laufschema:	isokratisch von 2 bis 25 min	

## 2.4 Aufnahme der Metabolitenprofile der Oxylipine

### 2.4.1 Bestimmung von Hydroperoxid- und Hydroxid-Derivaten sowie der Divinylether

Etwa 2g gefrorenes und gemörseretes Zellmaterial wurden in 20 ml HIP-Lösung mit (6Z,9S,10E,12Z)-9-Hydroxy-6,10,12-octadecatriensäure als internem Standard, der von H. Weichert, IPK, Gatersleben zur Verfügung gestellt wurde, und 0,15 ml 1 M Salzsäure für

30 sec auf Eis und unter dem Argonstrom mit einem Ultraturrax homogenisiert, 5 min bei RT geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 5.000 x g, 4 °C). Die wäßrige Phase wurde mit 10 ml HIP-Lösung wiederholt extrahiert, 5 min bei RT geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 5.000 x g, 4 °C). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,5 Vol. 6,7 % (w/v) Kaliumsulfat-Lösung versetzt, 5 min bei RT geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 5.000 x g, 4 °C). Die organische Phase wurde anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 0,1 ml HPLC-Laufmittel [Methanol/H<sub>2</sub>O/Essigsäure (85:15:0,1, v/v/v)] aufgenommen.

**HIP-Lösung:**

iso-Hexan/Isopropanol (3:2, v/v) mit 0,0025 % (w/v) 2-Butyl-6-Hydroxytoluen (BHT; SIGMA, Deisenhofen)

Die Analyse der Oxylipine erfolgte wie in Weichert *et al.* 1999 und unter 2.3.2 beschrieben. Die Hydroxide und Hydroperoxide wurden zunächst an der Umkehr-Phase vorgereinigt und bei 234 nm detektiert. Die Regioisomere wurden an der Normal-Phase getrennt, und anschließend das Verhältnis der R/S-Isomere an der Chiral-Phase bestimmt. Die Divinylether wurden an der Umkehr-Phase bei 250 und 268 nm analysiert.

**Umkehr-Phase (RP-HPLC):**

s. 2.3.2

Retentionszeit:	Colnensäure	→	13,0	min
	Etherolsäure	→	15,1	min
	13/9-HOT	→	25 - 27	min

**Normal-Phase (SP-HPLC):**

s. 2.3.2

	13-HOT	→	15,1	min
	9-HOT	→	21,3	min

**Chiral-Phase (CP-HPLC):**

s. 2.3.2

Die Identität der detektierten CA wurde durch saure Hydrolyse und anschließende HPLC-Analyse der entstandenen Aldehyde überprüft. Dazu wurden 10 µg CA mit 0,75 ml Methanol und 0,25 ml 20 % Salzsäure versetzt, 30 min bei RT inkubiert und die Aldehyde mit 0,2 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung derivatisiert (s. 2.4.4).

Die Analyse der Oxylipine aus Blättern von *S. tuberosum* erfolgte wie oben beschrieben aus 0,1 g gefrorenem und gemörsertem Blattmaterial. Weiterhin wurden diese Metabolite mittels GC/MS-Analysen, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, in Kombination mit der Untersuchung der Trihydroxyfettsäuren bestimmt.

**2.4.2 Analyse von Trihydroxid-Derivaten****Untersuchung von Pflanzenzellen**

Etwa 1 g gefrorenes und gemörsertes Zellmaterial wurden in 20 ml Ethanol mit 6,5 nmol [17,17,18,18,18-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]- (9Z,11R,12S,13S,15Z)-11,12,13-Trihydroxy-9,15-octadecadiensäure als internem Standard (von Prof. Dr. M. Hamberg, Karolinska Institut, Stockholm

zur Verfügung gestellt) 3 min auf Eis mit einem Ultraturrax homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, RT). Der Überstand wurde zweimal mit Diethylether bei pH 3 extrahiert, bis zur Trockene eingeeengt, in 2-Propanol/Chloroform (1:2, v/v) aufgenommen und auf eine Aminopropylsäule „Supelclean SPE tube“ (0,5 g; SUPELCO, Bellefonte, USA) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Diethylether/Essigsäure (98:2, v/v) und Methanol/Essigsäure (98:2, v/v). Das Methanol/Essigsäure-Eluat wurde bis zur Trockene eingeeengt, die freie Carboxygruppe der Fettsäuren mit Diazomethan methyliert und anschließend die OH-Gruppen silyliert.

Die GC/MS-Analysen erfolgten mit einer GC-Anlage (Typ 5890, HEWLETT PACKART) gekoppelt mit einem massensensitiven Detektor (Typ 5970B, HEWLETT PACKART). Die Anfangssäulentemperatur betrug 120 °C und wurde in Form eines linearen Gradienten von 10 K/min bis auf 240 °C erhöht. Die Retentionszeiten der Methylester-/Trimethylsilylether-Derivate waren unter diesen Bedingungen 14,2 min (9,10,11-TriHOE), 14,3 min (9,10,11-TriHODD) und 14,5 min (Standard). Die Detektion des deuterierten Standards erfolgte anhand des Masse/Ladungsquotienten ( $m/z$ ) 278, der Trihydroxide mit  $m/z$  271 (Göbel *et al.* 2001).

### Untersuchung von Blattmaterial

0,2 bis 0,5 g gefrorenes und gemörseretes Blattmaterial wurden in 20 ml Ethanol mit 14,6 nmol [9,10,12,13,15,16-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]- (9S,10E,12S,13S,15Z)-9,12,13-Trihydroxy-10,15-octadeciensäure und 8,7 nmol [9,10,12,13,15,16-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]- (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatriensäure als interne Standards (beide von Prof. Dr. M. Hamberg, Karolinska Institut, Stockholm zur Verfügung gestellt) 3 min auf Eis mit einem Ultraturrax homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, RT). Der Überstand wurde bis zur Trockene eingeeengt, in 2-Propanol/Chloroform (1:2, v/v) aufgenommen und auf eine Aminopropylsäule „Supelclean SPE tube“ (0,5 g; SUPELCO, Bellefonte, USA) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Diethylether/Essigsäure (98:2, v/v) und Methanol/Essigsäure (98:2, v/v). Beide Eluate wurden separat bis zur Trockene eingeeengt, die Fettsäurederivate mit Diazomethan methyliert und anschließend silyliert.

Für die GC/MS-Analyse mit der oben aufgeführten Anlage wurde eine SPB-1701 Kapillarsäule (Länge: 15 m; Filmdicke: 0,25 mm) verwendet. Die Anfangssäulentemperatur betrug 120 °C und wurde in Form eines linearen Gradienten von 8 K/min bis auf 260 °C erhöht. Die Retentionszeiten der Methylester/Trimethylsilyl-ether-Derivate der Metabolite unter diesen Bedingungen sowie die  $m/z$  der Ionen-fragmente sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. B-4: Retentionszeiten und Masse/Ladungsquotienten der Methylester/Trimethylsilyl-ether-Derivate in der GC/MS-Analyse.**

Diethylether/Essigsäure-Eluat			Methanol/Essigsäure-Eluat		
Metabolit	Ret.-Zeit (min)	m/z	Metabolit	Ret.-Zeit (min)	m/z
LA	10,0	294	9,10,11-TriHOD	14,5	271
LnA	10,2	292	9,12,13-TriHOD	14,9	171
13-HOT	12,5	311	deuterierter TriHOD-Standard	14,9	174
deuterierter 9-HOT-Standard	12,6	229			
9-HOT	12,6	223			
CA	12,5	308			
CnA	12,7	306			

### 2.4.3 Jasmonsäure-Bestimmung

Etwa 2 g gefrorenes Zell- bzw. Blattmaterial wurden mit 10 ng 9,10-Dihydrojasmonsäure in 10 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung, 0,5 ml 1 M Ascorbinsäure und 25 ml Diethylether [mit 0,005 % (w/v) BHT] für 3 min mit einem Ultraturrax homogenisiert und zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, RT). Die wässrige Phase wurde mit 25 ml Diethylether [mit 0,005 % (w/v) BHT] wiederholt extrahiert und zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, RT). Die vereinigten Etherphasen wurden auf eine Aminopropyl-Säule (MACHEREY-NAGEL, Düren) aufgetragen und mit 5 ml Chloroform/Isopropanol (2:1, v/v) gewaschen. Die Jasmonate wurden mit 7 ml Diethylether/Essigsäure (98:2, v/v) eluiert, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 200 µl Chloroform/N,N-Diisopropylethylamin (1:1, v/v) aufgenommen und mit 10 µl Pentafluorbenzylbromid (SIGMA, Deisenhofen) derivatisiert. Die Mischung wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 5 ml Hexan aufgenommen und auf eine Kieselgel-Säule (MACHEREY-NAGEL, Düren) aufgetragen. Die Derivate wurden mit 7 ml Hexan/Diethylether (2:1, v/v) eluiert, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Die Bestimmung der Jasmonate erfolgte mit dem Finnigan GCQ GC/MS-System. Die GC/MS-Analysen wurden von PD Dr. I. Feußner (IPK, Gatersleben) bzw. Dr. O. Miersch (IPB, Halle) durchgeführt (Mueller und Brodschelm 1994; Göbel *et al.* 2001).

### 2.4.4 Analyse von Aldehyd-Derivaten

Etwa 3g gefrorenes Zell- bzw. Blattmaterial wurden in 10 ml Extraktionslösung mit 20 ng (2E)-Pentenal (ALDRICH, Steinheim) für 30 sec auf Eis und unter dem Argonstrom mit einem Ultraturrax homogenisiert und zentrifugiert (25 min, 5.000 x g, 4 °C). Das Gewebematerial wurde zweimal mit 5 ml Extraktionslösung gewaschen. Die oberen Phasen wurden vereinigt, zur Bildung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone mit 1 ml 0,1 % (w/v) 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (in 1M HCl) für 1 h bei RT gerührt und dreimal mit Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 0,4 ml Acetonitril aufgenommen. Die

2,4-Dinitrophenylhydrazon-Derivate der Aldehyde wurden mittels HPLC-Analysen detektiert (Kohlmann *et al.* 1999), die von H. Weichert (IPK, Gatersleben) durchgeführt wurden.

**Extraktionslösung:**

Methanol/2 mM HCl (1:1, v/v), pH 3,0 mit 0,001 % (w/v) BHT

## 2.4.5 Bestimmung der freien Fettsäuren

Die LOX-Substrate (LA und LnA) wurden aus Zellmaterial parallel zur Extraktion der Oxylipine, wie unter 2.4.1 beschrieben, aufgereinigt und an der Umkehr-Phase bei 210 nm detektiert (Weichert *et al.* 1999). Die freien Fettsäuren aus Blattmaterial wurden im Diethylether/Essigsäure-Eluat der Trihydroxyfettsäure-Bestimmung (s. 2.4.2) analysiert.

Die Bestimmung der freien Fettsäuren in den RNAi-Pflanzen erfolgte mittels GC-Analysen. Dazu wurde 1/10 der Extrakte, die wie unter 2.4.1 erhalten waren, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 400 µl Methanol aufgenommen und mit 10 µl 10 % (w/v) 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (in Methanol) versetzt. Es wurde 2h bei RT geschüttelt und anschließend zweimal mit 1ml Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanphasen wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in je 10 µl Acetonitril aufgenommen. Davon wurde je 1 µl analysiert. Die Auftrennung erfolgte mit dem „6890 Series GC-System“ (AGILENT, Waldbronn) an einer HP-INNOWax-Säule (Cross-Linked PEG; 30 m x 0,32 mm, Beschichtungsdicke: 0,5 µm; AGILENT, Waldbronn). Als Trägergas diente Helium mit einer Flußrate von 1,5 ml/min. Die Injektionstemperatur betrug 220 °C. Das verwendete Temperaturprogramm lautete: 150 °C für 1 min, dann Erwärmen auf 200 °C mit 15 K/min und auf 250 °C mit 2 K/min. Die Temperatur von 250 °C wurde für 5 min gehalten. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor bei 275 °C.

Retentionszeit:	LA	→	10,2 min
	αLnA	→	11,3 min

## 2.5 Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivitätstest

Je 0,3 g gefrorenes und gemörsertes Zellmaterial wurden mit 500 µl 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 und 15 µl 0,1 M Kalziumchlorid homogenisiert und mit 3,7 kBq [<sup>14</sup>C]-PC (L-α-1-Palmityl-2-linolyll-[linolyll-1-<sup>14</sup>C]-phosphatidylcholin; NEN, Boston, USA) 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl Essigsäure wurde zweimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Die Proben wurden auf Kieselgel-Platten (MERCK, Darmstadt) in Chloroform gelöst aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform:Methanol:Wasser (65:25:4, v/v/v) unter sättigenden Bedingungen verwendet. <sup>14</sup>C-markierte LA und mit PLA<sub>2</sub> (SIGMA, Deisenhofen) umgesetztes, <sup>14</sup>C-markiertes PC wurden als Kontrollen eingesetzt. Die Detektion der radioaktiv markierten Verbindungen erfolgte entsprechend dem Nachweis von radioaktiv markierten Nukleinsäuren mit der *storage phosphor*-Technik (s. 2.1.3.4).

## C Ergebnisse

Die Bedeutung von LOXen sowie der Enzyme und Produkte des LOX-Reaktionsweges bei pflanzlichen Abwehrreaktionen ist anhand funktioneller Analysen einiger Isoformen in transgenen Pflanzen gezeigt worden (s. A.2.2). In *Solanum tuberosum* ist bisher aber eine umfassende Charakterisierung des LOX-Reaktionsweges bei der Antwort auf Pathogenbefall noch nicht durchgeführt worden.

### 1 Untersuchungen am Modellsystem der Zellen von *Solanum tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *Phytophthora infestans*

Zur Untersuchung der Pflanze-Pathogen-Interaktion von *S. tuberosum* und *P. infestans* wurden zunächst Zellen von *S. tuberosum* verwendet, die mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans* behandelt wurden. In diesem Modellsystem sollte das Genexpressionsmuster der StLOX1, StLOX2 und StLOX3 sowie das Oxylinprofil untersucht werden, um einen ersten umfassenden Einblick in die Funktion des LOX-Reaktionsweges bei Abwehrreaktionen von *S. tuberosum* zu erhalten.

#### 1.1 Induktion der Expression von LOX-, PR- und Abwehrgenen

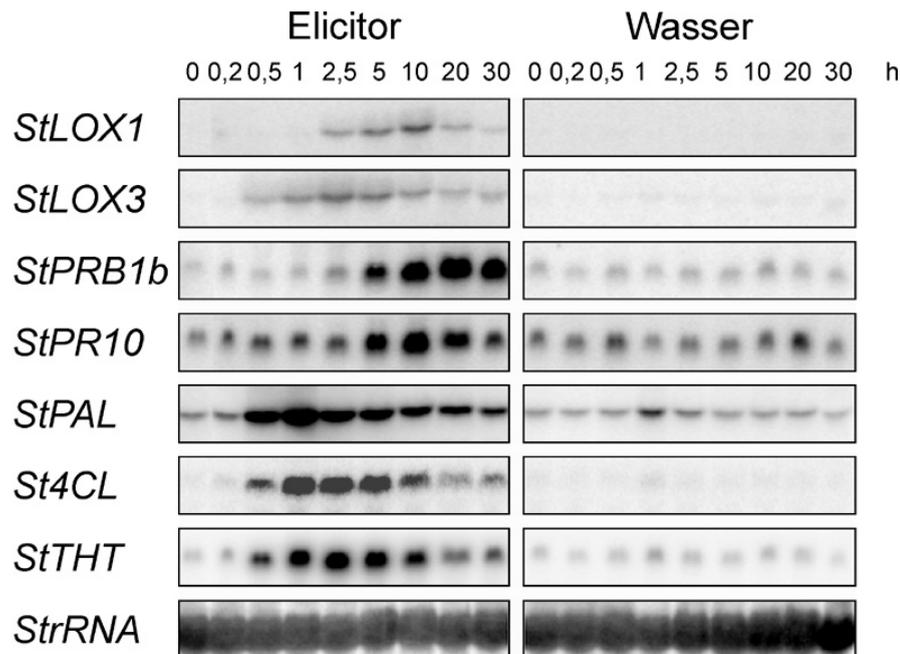
Die Analyse der Genexpression nach Elicitorbehandlung erfolgte mit Zellen von *S. tuberosum*, die mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans* versetzt wurden. Eine etwa 20 h nach Elicitorzugabe einsetzende Verbräunung der Zellen deutet auf die Induktion der HR hin. Es ist bekannt, daß die Elicitorbehandlung die Expression von Abwehrgenen, wie z. B. denen für Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels, induziert (Schmidt *et al.* 1998).

##### 1.1.1 Transkriptakkumulation

Gesamt-RNA wurde aus Pflanzenzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans* bzw. nach Wasserzugabe isoliert und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt, anhand derer die Expressionsmuster der drei LOX-Gene sowie der PR- und Abwehrgene bestimmt wurde.

Die Transkripte der StLOX1 und StLOX3 akkumulierten transient nach Elicitorbehandlung (Abb. C-1), während die Mengen an StLOX2-Transkripten unterhalb der Detektionsgrenze lagen (Daten nicht gezeigt). Die Akkumulation der StLOX1-Transkripte begann 2,5 h nach Elicitorzugabe, und das Maximum wurde nach 5 bis 10 h erreicht. Die Transkripte der StLOX3, deren maximale Akkumulation nach 2,5 bis 5 h erreicht wurde, waren bereits 30 min nach Elicitorzugabe detektierbar. Die Untersuchung der Expression der PR-Gene StPRB1b und StPR10 ergab, daß die Transkriptakkumulation 5h nach Elicitorzugabe begann. Als Kontrolle für eine erfolgte Induktion der Abwehrgenexpression nach

Elicitorbehandlung wurden die Transkripte der Gene untersucht, die für die Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels kodieren und deren Expression in elicitierten Zellen von *S. tuberosum* bereits beschrieben worden war (Schmidt *et al.* 1998). Die Transkripte der StPAL, St4CL und StTHT waren transient induziert. Sie begannen 30 min nach Elicitorbehandlung zu akkumulieren. Dies erfolgte damit zeitlich ähnlich zur Induktion der StLOX3-Expression. Die Standardisierung der eingesetzten mRNA-Mengen wurde mit einem cDNA-Fragment der St25SrRNA durchgeführt.



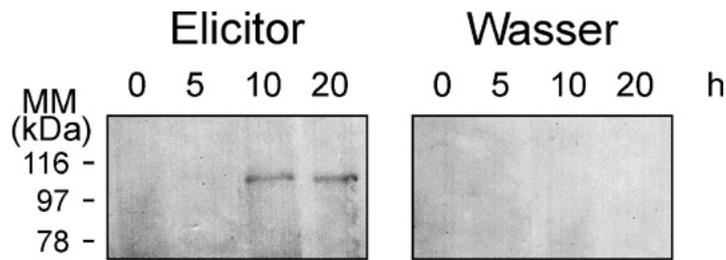
**Abb. C-1: Northern-Blot-Analyse der Genexpression in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

Gesamt-RNA wurde aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Elicitor bzw. Wasser isoliert. Je 20 µg RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von StLOX1, StLOX3, StPRB1b, StPR10, StPAL, St4CL, StTHT und St25SrRNA hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

### 1.1.2 Anstieg der LOX-Proteinmenge

Die Korrelation zwischen der Akkumulation der StLOX-Transkripte und einem Anstieg der LOX-Proteinmenge nach Elicitorbehandlung in Zellen von *S. tuberosum* wurde durch Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. C-2). Dazu wurden Proteine aus den oben genannten Pflanzenzellen isoliert und nach dem Western-Transfer mit dem polyklonalen StLOX1-Antikörper (Geerts *et al.* 1994) immunodetektiert.

Die Proteinextrakte der Pflanzenzellen enthielten nach kurzen Inkubationszeiten mit dem Kulturfiltrat kein nachweisbares LOX-Protein (Daten für 1 und 2,5 h nicht gezeigt). Ein Anstieg der Menge an LOX-Protein wurde 10 und 20 h nach Elicitorzugabe detektiert.



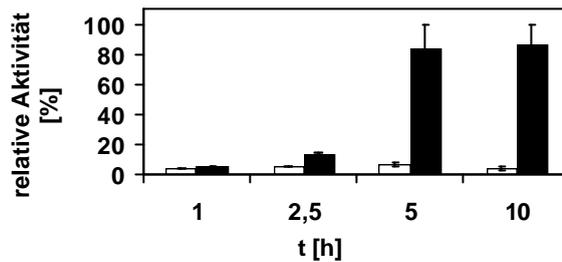
**Abb. C-2: Western-Blot-Analyse der LOX-Genexpression in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

Gesamt-Protein wurde aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Elicitor bzw. Wasser isoliert. Je 40 µg Protein wurden in eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit dem Antiserum gegen die 549 N-terminalen ASen der StLOX1 (Geerts *et al.* 1994) detektiert. Das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

## 1.2 LOX-Aktivität

Nach der Expressionsanalyse der LOX-Gene wurde die Enzymaktivität der LOXen in den oben beschriebenen Zellen von *S. tuberosum* nach Elicitorbehandlung gemessen. Der Nachweis sauerstoffverbrauchender Reaktionen in Proteinextrakten der Pflanzenzellen erfolgte mit einer Sauerstoff-Elektrode nach Zugabe von LA als LOX-Substrat. In den Extrakten der elicitierten Zellen wurde ein LA-abhängiger Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu den Kontrollansätzen gemessen (Daten nicht gezeigt).

Parallel wurde die LOX-Aktivität durch Quantifizierung der gebildeten LOX-Produkte mittels HPLC-Analysen bestimmt. Nach der Inkubation der Proteinextrakte mit LA wurden die entstandenen Hydroperoxide zu den Hydroxiden reduziert. Diese wurden anschließend durch HPLC analysiert, wobei sowohl 9 als auch 13-HOD detektiert wurde. In allen Extrakten wurden nahezu konstante Mengen an 13-HOD bestimmt. Demgegenüber war der Gehalt an 9-HOD in den Zellen, die längere Zeit mit dem Elicitor behandelt waren, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen deutlich höher. In Abb. C-3 ist die 9-LOX-Aktivität dargestellt, die 2,5 h nach Elicitorbehandlung zu steigen begann und nach 5 und 10 h eine fünffache Erhöhung aufwies. Mit Hilfe von CP-HPLC erfolgte die Trennung der Enantiomere der Hydroxide. Mehr als 90 % des 9-HOD kamen als S-Enantiomer vor. Dies deutet auf eine enzymatische Bildung dieses Hydroxid-Derivates hin, wohingegen das racemische Verhältnis der 13-HOD-Enantiomere nicht auf einen enzymatischen Ursprung dieser Verbindung hinweist (Daten nicht gezeigt). Somit wurde in Korrelation mit der Induktion der 9-LOX-Expression eine Stimulierung der 9-LOX-Aktivität in Zellen von *S. tuberosum* nach Elicitorbehandlung nachgewiesen. Obwohl die Transkripte der 13-LOXen StLOX2 und StLOX3 nach Elicitierung akkumulieren, wurde keine 13-LOX-Aktivität in diesen Zellen gemessen.



**Abb. C-3: 9-LOX-Aktivität in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

LOX-Aktivität wurde mit HPLC-Analysen in Proteinextrakten aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Elicitor (schwarz) bzw. Wasser (weiß) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Analysen sind dargestellt.

### 1.3 Akkumulation der Metabolite des LOX-Reaktionsweges

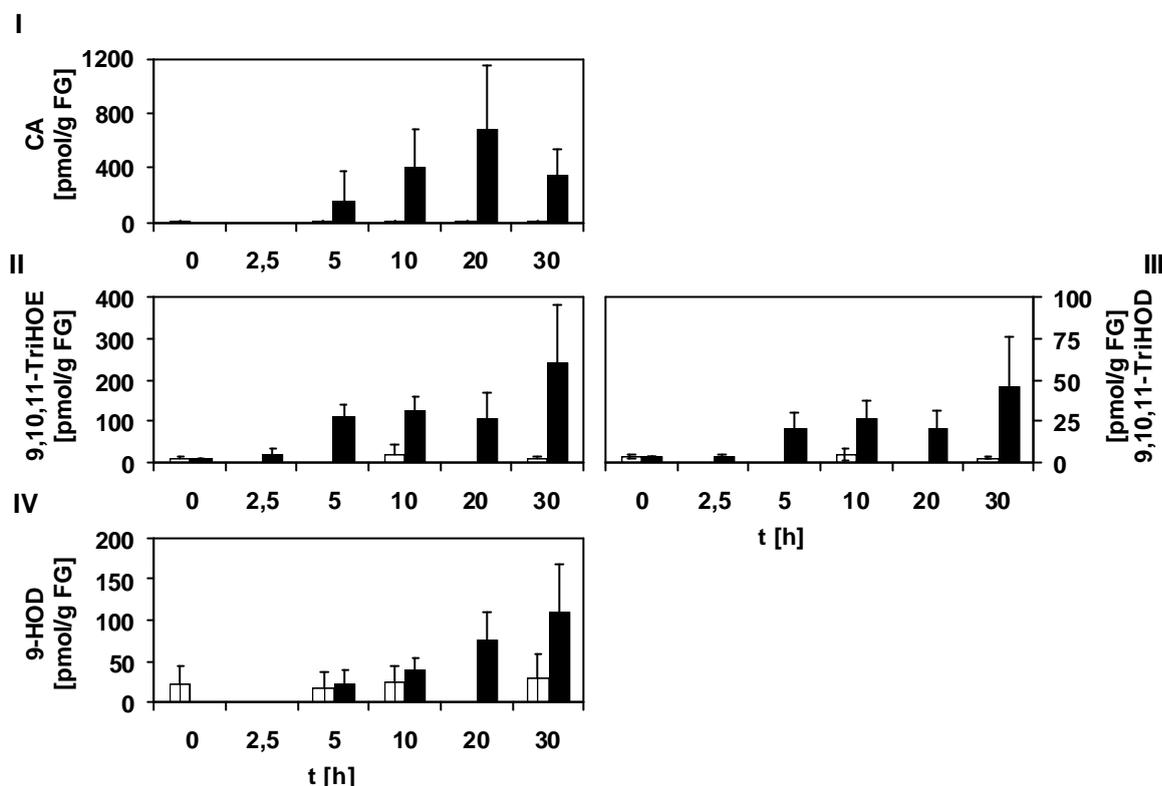
Die Beziehung zwischen der spezifischen Induktion der 9-LOX-Aktivität und einer Akkumulation der Metabolite des LOX-Reaktionsweges (Abb. A-2) nach Elicitorbehandlung wurde anhand von Oxylinprofilen untersucht (Abb. C-4). Dazu wurden Extrakte der Pflanzenzellproben analysiert, die für die oben aufgeführten Analysen verwendet wurden.

Der Divinylether Colnensäure (CA), das Produkt der Umsetzung von 9-HPOD durch die Divinylethersynthase (DES; Galliard und Phillips 1972), konnte in den Extrakten der Zellen mittels HPLC-Analysen nachgewiesen werden. Die Akkumulation von CA begann 5 h nach Elicitierung und erreichte nach 20 h ein Maximum von 680 pmol/g FG (Abb. C-4 I). Dagegen wurden Colnelensäure (CnA), das Produkt der Umsetzung von 9-HPOT, sowie die Divinylether, die aus den entsprechenden 13-LOX-Produkten durch die Aktivität der DES entstehen, nicht detektiert.

Die Produkte des Epoxyalkoholsynthase (EAS)-Reaktionsweges wurden unter Verwendung von GC/MS-Analysen bestimmt. 9,10,11-TriHOE, das bei der Umsetzung von 9-HPOD entsteht, sowie 9,10,11-TriHOD, das entsprechende Produkt aus 9-HPOT (Hamberg 1999), akkumulierten in den elicitierten Zellen. Diese Akkumulation begann zwischen 2,5 und 5 h nach Elicitorzugabe. Der Gehalt stieg in den elicitierten Zellen bis 30 h an (Abb. C-4 II/III). Das Maximum der Akkumulation von 9,10,11-TriHOE beträgt 240 pmol/g FG (Abb. C-4 II). Im Vergleich dazu ist das Maximum an 9,10,11-TriHOD von 46 pmol/g FG (Abb. C-4 III) deutlich geringer. Von beiden Metaboliten wurden auch geringe Mengen in den Kontrollzellen detektiert.

Die Akkumulation an 9-HOD in den elicitorbehandelten Zellen von *S. tuberosum* wurde durch HPLC-Analysen bestimmt. 9-HOD entsteht bei der Reduktion von 9-HPOD durch eine Reduktase (Feussner *et al.* 1998). Die Akkumulation von 9-HOD begann zwischen 10 und 20 h nach Elicitierung (Abb. C-4 IV). Der Gehalt stieg bis 30 h auf 105 pmol/g FG in den elicitierten Zellen an, im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einem Gehalt von 25 pmol/g FG. Die CP-HPLC-Analyse des detektierten 9-HOD ergab, daß mehr als 90 %

des 9-HOD in den elicitierten Zellen als *S*-Enantiomere vorkamen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine enzymatische Bildung dieses Oxylipins nach Elicitorbehandlung hin.



**Abb. C-4: Oxylinprofil in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

Der Gehalt an CA (I), 9,10,11-TriHOE (II), 9,10,11-TriHOD (III) und 9-HOD (IV) wurde mit HPLC- (CA und 9-HOD) bzw. GC/MS-Analysen (Trihydroxide) in Extrakten aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Elicitor (schwarz) bzw. Wasser (weiß) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei (IV) bzw. drei unabhängigen Analysen (I-III) sind dargestellt.

Die Hydroperoxid-Derivate von LA und LnA wurden in den untersuchten Extrakten nicht detektiert. Es ist aber bekannt, daß diese Verbindungen mit der verwendeten HPLC-Methode nachgewiesen werden können (Feussner *et al.* 1997). Weiterhin wurden die Metabolite der Umsetzung von LOX-Produkten durch Hydroperoxidlyasen (HPL) analysiert. Es wurde weder eine Akkumulation von 9-HPL-Produkten, wie der C<sub>9</sub>-Aldehyde Nonenal und Nonadienal, noch von Produkten der 13-HPL, der C<sub>6</sub>-Aldehyde Hexanal und Hexenal, detektiert. Die Untersuchung von Produkten der Umsetzung von 13-Hydroperoxiden ergab weder einen Nachweis von Jasmonsäure (JA) noch von 13-HOD bzw. 13-HOT. Außerdem konnten die Autoxidationsprodukte 12- und 16-HOT (Rustérucci *et al.* 1999; Berger *et al.* 2001) nicht detektiert werden.

Die Aufnahme des Metabolitenprofils der Oxylipine in den kultivierten Zellen ergab zusammenfassend, daß mehrere 9-LOX-Produkte nach Behandlung mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans* akkumulieren. Dies sind der Divinylether CA, die Trihydroxide 9,10,11-TriHOE und 9,10,11-TriHOD sowie das Hydroxid-Derivat 9-HOD. Hierbei ist einerseits bemerkenswert, daß nur CA transient über den Beobachtungszeitraum akkumulierte,

während die Mengen der anderen nachgewiesenen Oxylipine stetig zunahm. Andererseits entsprach die bevorzugte Bildung von Metaboliten, die sich von LA über 9-HPOD ableiteten, dem Stoffwechselstatus der im Dunkeln kultivierten Zellen. In Übereinstimmung mit der Abwesenheit an 13-LOX-Aktivität konnten keine 13-LOX-Produkte bestimmt werden.

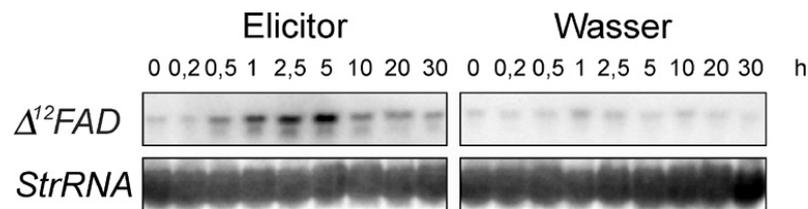
#### 1.4 Bereitstellung der LOX-Substrate

Die Bestimmung der Metabolite des LOX-Reaktionsweges zeigte, daß nach der Elicitorbehandlung vorwiegend eine Akkumulation von LA-Derivaten in Zellen von *S. tuberosum* erfolgt. Daraus ergab sich die Frage, ob durch die Elicitorbehandlung auch Reaktionen beeinflußt werden, die LA als LOX-Substrat bereitstellen. Aus diesem Grunde wurde zum einen die Expression eines Gens mit Homologien zu  $\Delta^{12}$ -Acyl-Lipid-Desaturasen ( $\Delta^{12}$ -FAD) untersucht, die die Bildung von LA aus Ölsäure an der *sn2*-Position von Phosphatidylcholin (PC) im endoplasmatischen Reticulum (ER) katalysieren (Heinz 1993). Zum anderen wurde die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) bestimmt, die für die Freisetzung von Fettsäuren aus der *sn2*-Position von PC in das Cytosol verantwortlich ist.

##### 1.4.1 Transkriptakkumulation eines Gens mit Homologien zu $\Delta^{12}$ -Acyl-Lipid-Desaturasen

Um die Expression von  $\Delta^{12}$ -FAD untersuchen zu können, wurde ein cDNA-Fragment mit Homologien zu  $\Delta^{12}$ -FAD in einer RT-PCR hergestellt. Es wurden dabei die degenerierten Primer 5coDES und 3coDES (s. B.1.5) und Gesamt-RNA aus Zellen von *S. tuberosum* eingesetzt, die 5h mit Elicitor behandelt waren. Der zum Nachweis des  $\Delta^{12}$ -FAD-homologen Gens hergestellte cDNA-Klon enthält ein 547 bp langes Fragment mit 97 % Sequenzidentität zu einer  $\Delta^{12}$ -Acyl-Lipid-Desaturase-cDNA aus *S. commersonii* (Accession Number X92847; Sequenz des Fragmentes im Anhang).

Die Untersuchung der Expression des  $\Delta^{12}$ -FAD-homologen Gens erfolgte mit der unter 1.1.1 beschriebenen Northern-Blot-Analyse. Die Transkripte akkumulierten transient nach Elicitorbehandlung in den Zellen von *S. tuberosum* (Abb. C-5). Die Akkumulation war 30 min nach Elicitorzugabe nachweisbar, und die maximalen Transkriptmengen wurden nach 5 h erreicht.



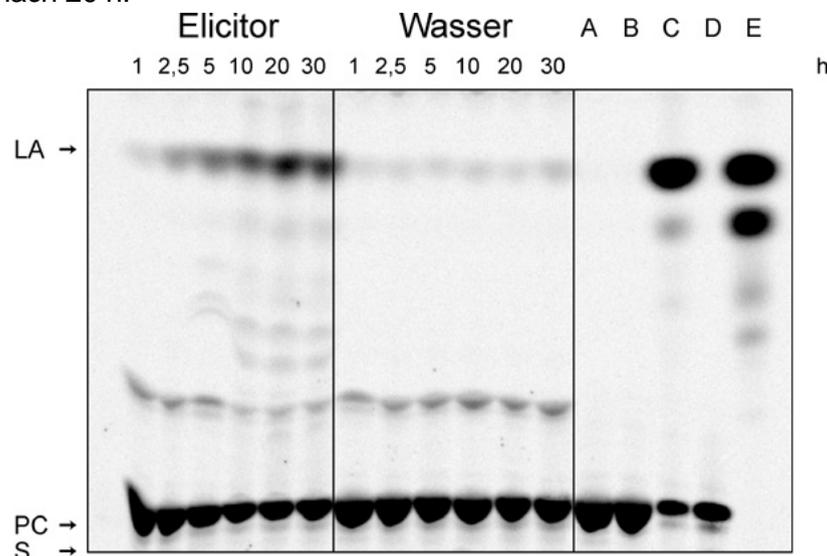
**Abb. C-5: Northern-Blot-Analyse der Expression eines  $\Delta^{12}$ -FAD-homologen Gens in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

Gesamt-RNA wurde aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Kulturfiltrat (*P.i.-Kf*) bzw.  $H_2O$  isoliert. Je 20  $\mu g$  RNA wurden in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten Fragment eines partiellen cDNA-Klons mit Homologien zu  $\Delta^{12}$ -FAD sowie mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der St25SrRNA hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

#### 1.4.2 Induktion der Phospholipase $A_2$ -Aktivität

Die  $PLA_2$ -Aktivität wurde in Extrakten der Zellen von *S. tuberosum* anhand der Freisetzung radioaktiv markierter LA aus der *sn2*-Position von Phosphatidylcholin detektiert und mittels Dünnschichtchromatographie dokumentiert (Abb. C-6).

Die Extrakte der elicitierten Zellen wiesen höhere  $PLA_2$ -Aktivitäten als die wasserbehandelten Zellen auf. Dies wird durch die zunehmende Intensität des Signals der freien LA mit fortschreitender Inkubationsdauer nach Elicitorzugabe deutlich. Die  $PLA_2$ -Aktivität begann zwischen 1 und 2,5 h nach Elicitorzugabe anzusteigen und erreichte ein Maximum nach 20 h.



**Abb. C-6: Phospholipase  $A_2$ -Aktivität in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans*.**

Die  $PLA_2$ -Aktivität wurde in Proteinextrakten aus Pflanzenzellen zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Behandlung mit Kulturfiltrat (*P.i.-Kf*) bzw.  $H_2O$  bestimmt. Die Freisetzung von  $[^{14}C]$ -LA aus PC wurde mittels Dünnschichtchromatographie dokumentiert. Als Kontrolle wurde die Aktivität in hitzedenaturierten Extrakten elicitierten (A) bzw. wasserbehandelter (B) Zellen bestimmt, 1,85 kBq  $[^{14}C]$ -LA (C) bzw. 1,85 kBq  $[^{14}C]$ -PC (D) aufgetragen sowie  $[^{14}C]$ -PC mit gereinigter  $PLA_2$  (SIGMA, München) umgesetzt (E). Der Startpunkt (S) sowie die Positionen von  $[^{14}C]$ -PC (PC) und  $[^{14}C]$ -LA (LA) sind markiert. Das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

Diese Untersuchung von Reaktionen, die an der Bereitstellung der LOX-Substrate beteiligt sein können, ergab, daß möglicherweise LA innerhalb des ER oder der Plastidenhülle durch die Aktivität einer  $\Delta^{12}$ -FAD *de novo* synthetisiert und von einer PLA<sub>2</sub> aus dem PC freigesetzt wird. Ein signifikanter Anstieg der freien Fettsäuren wurde in den elicitorbehandelten Zellen mittels HPLC-Analysen aber nicht detektiert (Daten nicht gezeigt), was auf eine vollständige Metabolisierung dieser LOX-Substrate schließen lassen könnte.

## **2 Analyse des LOX-Reaktionsweges nach Pathogenbefall in Blättern von *S. tuberosum***

Im Modellsystem der Zellen von *S. tuberosum* korrelierte die 9-LOX-Expression mit der Akkumulation von Produkten des 9-LOX-Reaktionsweges nach der Behandlung mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans*. Im Gegensatz dazu akkumulierten die 13-LOX-Produkte nach Elicitorzugabe nicht entsprechend der StLOX3-Transkriptakkumulation. Dies deutet auf die Bedeutung der Aufnahme eines Oxylinprofils neben der Untersuchung der LOXen auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene hin, um die komplexe Regulation von 9- und 13-LOX-Expression sowie der Enzyme des LOX-Reaktionsweges nach Pathogenbefall einschätzen zu können. Bisher ist der LOX-Reaktionsweg in Verbindung mit Pathogeninfektionen auch in Pflanzen von *S. tuberosum* nur wenig erforscht worden. Um die Funktion von LOXen und insbesondere der Oxyline bei Abwehrreaktionen in Blättern von *S. tuberosum* analysieren zu können, wurde das Oxylinmuster in mehreren Pflanze-Pathogen-Interaktionen bestimmt.

### **2.1 *S. tuberosum* L. cv. Désirée in der Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* und in der kompatiblen Interaktion mit *Phytophthora infestans***

Zum einen stand das Nichtwirt-Pathogen-Interaktionssystem mit dem *Brassicaceae*-Pathogen *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) zur Verfügung, das in der Arbeitsgruppe „Streß- und Entwicklungsbiologie“ am IPB, Halle, zur Untersuchung der SAR etabliert worden war (Kistner 1999). Die Infiltration der Blätter von *S. tuberosum* mit Bakteriensuspensionen induziert hierbei die Ausprägung der HR und damit verbunden die Ausbildung von Nekrosen in den infiltrierten Bereichen.

Zum anderen wurde die kompatible Interaktion von *S. tuberosum* L. der Sorte Désirée mit *P. infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule, untersucht. Nach dem Befall mit diesem hemibiotrophen Pathogen kommt es zunächst zur Entstehung wäßriger Läsionen und anschließend zum Absterben der infizierten Blätter.

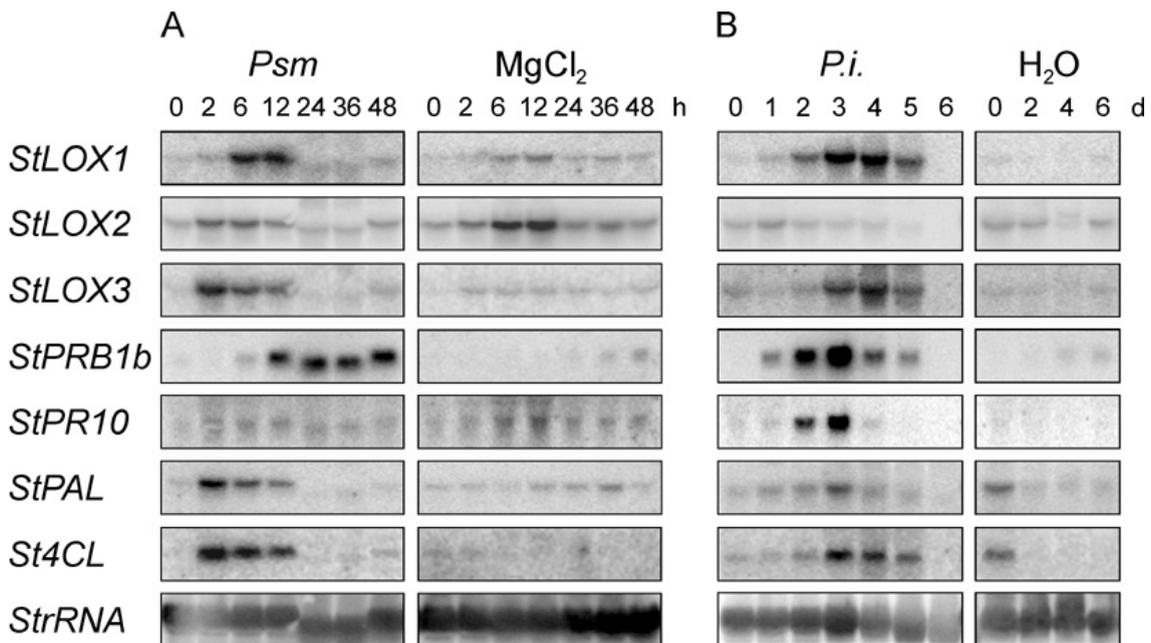
### 2.1.1 Transkriptakkumulation von LOX-, PR- und Abwehrgenen

Die Untersuchung der Genexpression in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall erfolgte anhand von Northern-Blot-Analysen, die mit Gesamt-RNA aus Blattmaterial nach Infiltration mit *Psm* bzw.  $MgCl_2$  (Abb. C-7A) und nach Inokulation mit *P. infestans* bzw.  $H_2O$  durchgeführt wurden (Abb. C-7B).

Die Analyse der Expressionsmuster der LOX-Isoformen ergab, daß die Transkripte der StLOX1 nach 6 und 12 h in den bakterieninfiltrierten Blättern im Vergleich zu den Transkriptmengen der Kontrollblätter akkumulierten und dabei einen transienten Anstieg aufwiesen (Abb. C-7A). Die Ausbildung der Nekrosen in den infiltrierten Blattsegmenten begann ebenfalls zwischen 6 und 12 h nach Bakterieninfiltration. Die Transkriptmengen der StLOX2 wiesen nach Bakterieninfiltration jedoch auch in den  $MgCl_2$ -Kontrollen leichte Veränderungen zwischen 2 und 12 h auf. Die maximalen Mengen der StLOX3-Transkripte wurden bereits 2 h nach Bakterieninfiltration erreicht und bis 12 h detektiert. Hier wurde in den Kontrollen keine Induktion gefunden. Als Kontrolle für die PR- und Abwehrgenexpression wurden die Transkripte, die für die PR-Proteine StPRB1b und StPR10 sowie für Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels (StPAL und St4CL) kodieren, untersucht. Die StPRB1b-Transkriptmenge nahm 12 h nach Bakterieninfiltration zu und war auf diesem Niveau bis 48 h nachweisbar. Die Expression von StPR10 wird durch Verwundung, Elicitierung mit Arachidonsäure und Infektion mit *P. infestans* induziert (Marineau *et al.* 1987; Matton und Brisson 1989). Nach Bakterieninfiltration erfolgt keine Akkumulation der Transkripte des StPR10-Gens. Die maximalen Transkriptmengen der StPAL und St4CL wurden transient zwischen 2 und 12 h detektiert und damit zeitlich ähnlich zur StLOX3-Transkriptakkumulation.

Die Northern-Blot-Analyse zeigt außerdem, daß die Transkriptakkumulation der StLOX1 und StLOX3 parallel zur Ausprägung nekrotischer Bereiche 2 d nach Inokulation mit *P. infestans* begann (Abb. C-7B). Die Maxima wurden hier zwischen 3 und 4 d nach Behandlung mit der Zoosporensuspension erreicht. Die Transkriptmengen der StLOX2 sind wie im Fall der Nichtwirt-Pathogen-Interaktion von *S. tuberosum* und *Psm* unverändert. Die Detektion der StPRB1b- und StPR10-Transkripte begann 1 bzw. 2 d nach Inokulation, und die maximalen Transkriptmengen wurden nach 3 d erreicht. Die Transkripte der StPAL und St4CL akkumulierten ebenfalls nach 3 d, wobei die StPR10- und StPAL-Transkripte transient nur bis 4 d und die StPRB1b- und St4CL-Transkripte bis 5 d nach Inokulation detektiert wurden.

Die Blätter einer Kontrollpflanze (0 d  $H_2O$ ) enthielten erhöhte Mengen an StPAL- und St4CL-Transkripten. Da dies weder in den anderen Kontrollen dieser Analyse noch in Kontrollpflanzen weiterer Inokulationsexperimente beobachtet wurde, ist diese Transkriptakkumulation nicht repräsentativ für die Kontrollpflanzen. Möglicherweise wurde die Abwehrgenexpression in dieser Pflanze durch eine Vorinfektion mit anderen Pathogenen hervorgerufen.



**Abb. C-7: Northern-Blot-Analyse der Genexpression in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) bzw.  $MgCl_2$

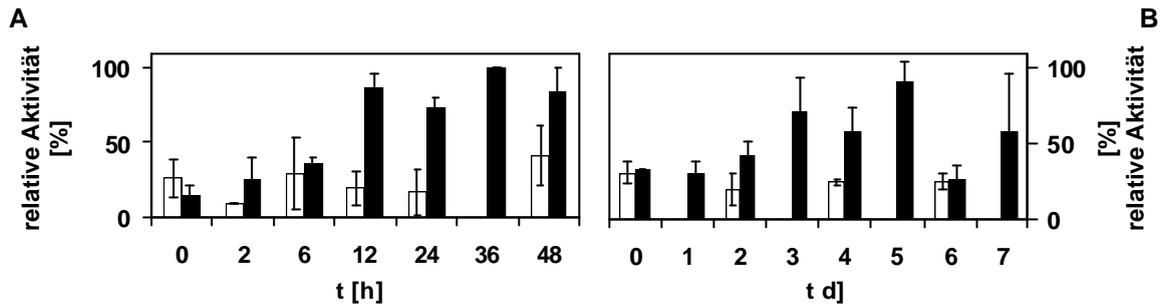
**B:** Inokulation mit *Phytophthora infestans* (*P.i.*) bzw.  $H_2O$

Gesamt-RNA wurde aus Blattermaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall isoliert, je 20  $\mu g$  RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von *StLOX1*, *StLOX2*, *StLOX3*, *StPRB1b*, *StPR10*, *StPAL*, *St4CL* und *St25SrRNA* hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von jeweils drei unabhängigen Analysen ist dargestellt. Die *StLOX1*-Signale der mit  $MgCl_2$  infiltrierten Blätter resultieren aus der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der *StLOX2* und konnten durch Waschen der Nylonmembran mit 0,1 % (w/v) SDS bei 65 °C nicht vollständig entfernt werden.

### 2.1.2 Stimulierung der 9-LOX-Aktivität

Um die Korrelation zwischen der LOX-Transkriptakkumulation und einer Stimulierung der Enzymaktivitäten zu untersuchen, wurde die LOX-Aktivität in Proteinextrakten des oben aufgeführten Blattmaterials gemessen (Abb. C-8).

Nach Inkubation der Proteinextrakte mit LA bei pH 6 wurden mittels HPLC-Analysen sowohl 9- als auch 13-HOD detektiert. Die Mengen an 13-HOD blieben nach Pathogenbefall und den Kontrollinokulationen nahezu unverändert. Dagegen stieg der Gehalt an 9-HOD in den pathogenbehandelten Blättern im Vergleich zu den Kontrollblättern an (Abb. C-8). Diese Stimulierung der 9-LOX-Aktivität begann zwischen 6 und 12 h nach Infiltration mit *Psm* und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 48 h auf diesem Niveau (Abb. C-8A). Im Gegensatz dazu war eine erhöhte 9-LOX-Aktivität nach Inokulation mit *P. infestans* transient zwischen 3 und 5 d mit einer zwei- bis vierfachen Erhöhung nachweisbar (Abb. C-8B). Die Trennung der Enantiomere des 9HOD mittels CP-HPLC ergab, daß bei beiden Infektionsregimen mehr als 90 % dieses Hydroxid-Derivates als S-Enantiomer vorlagen und damit im Gegensatz zum racemischen 13-HOD enzymatisch entstanden waren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. C-8: 9-LOX-Aktivität in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (schwarz) bzw.  $MgCl_2$  (weiß)

**B:** Inokulation mit *P. infestans* (schwarz) bzw.  $H_2O$  (weiß)

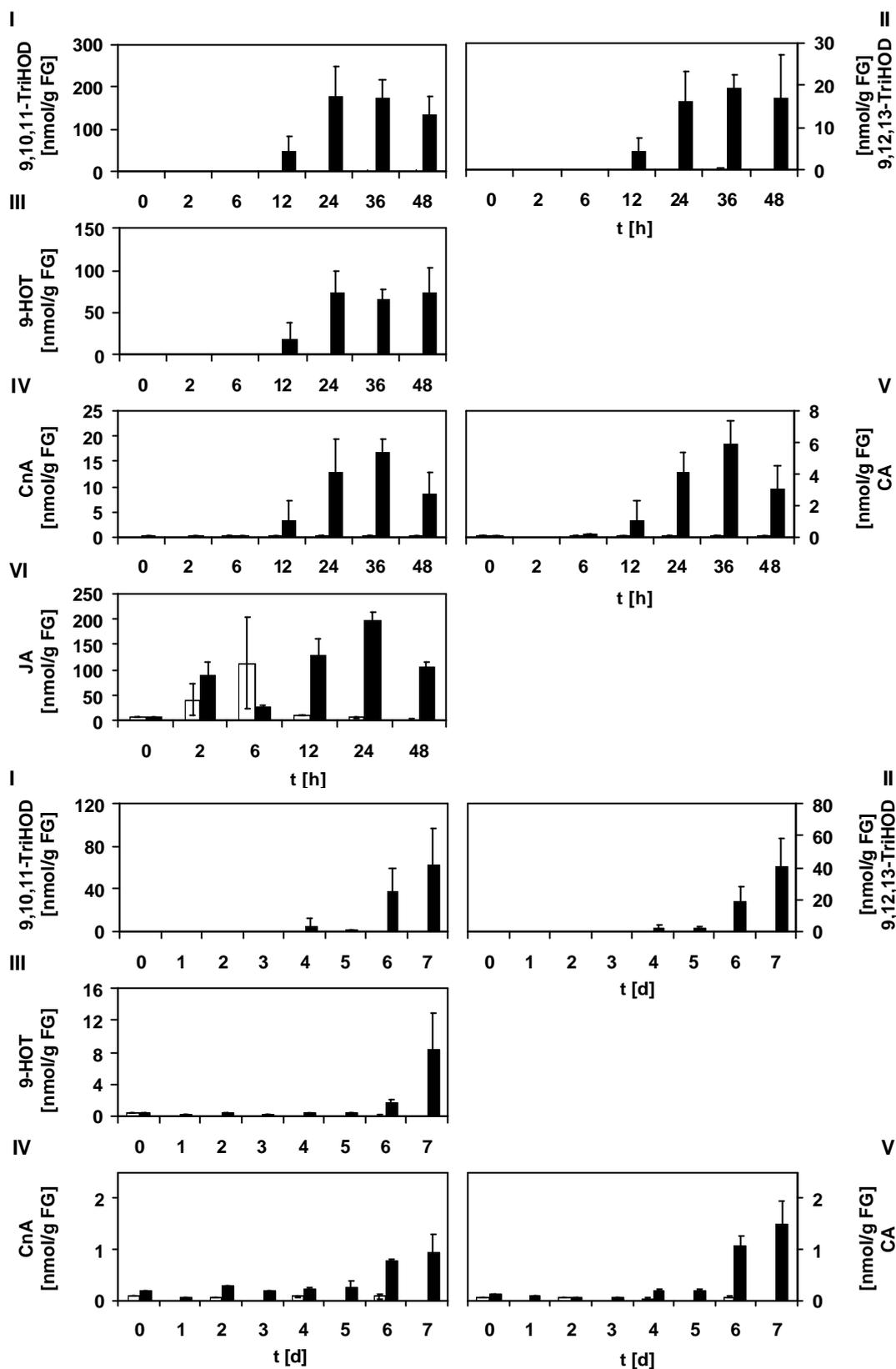
LOX-Aktivität wurde mit HPLC-Analysen in Proteinextrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Analysen sind dargestellt.

Die cDNAs der StLOX1, StLOX2 und StLOX3 sind in *Escherichia coli* exprimiert und die pH-Optima der Isoformen bestimmt worden (Royo *et al.* 1996). StLOX1 und StLOX2 haben ein pH-Optimum von 6, wohingegen die höchste StLOX3-Aktivität bei pH 7 gemessen worden ist. Um die Aktivität der StLOX3 in Blattextrakten von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall bestimmen zu können, wurden weitere Messungen bei pH 7 durchgeführt. Jedoch konnte keine 13-LOX-Aktivierung bei diesem pH-Wert bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), die mit der Transkriptakkumulation der StLOX3 nach Pathogenbefall korreliert.

### 2.1.3 Metabolitenprofil des LOX-Reaktionsweges

Nach Pathogenbefall akkumulierten in Blättern von *S. tuberosum* die Transkripte der 9-LOX StLOX1 und der 13-LOX StLOX3, wobei die 9-LOX-Aktivität bevorzugt stimuliert wurde. Um die Eigenschaften der einzelnen LOX-Isoformen bei Abwehrreaktionen in *S. tuberosum* zu charakterisieren, erfolgte die Aufnahme eines Oxylinprofil, wobei die Bestimmung der Verbindungen in Extrakten des oben genannten Blattmaterials mittels GC/MS-Analysen durchgeführt wurde (Abb. C-9).

Die Produkte des EAS-Reaktionsweges, die bei der Umsetzung von 9-HPOT entstehen, sind 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD. Diese Oxyline akkumulierten in den pathogenbehandelten Blättern (Abb. C-9A/B I/II). Eine Zunahme im Gehalt beider Verbindungen war ab 12 h nach Infiltration von *Psm* bzw. 6 d nach Inokulation mit *P. infestans* nachweisbar. Das Maximum der Akkumulation nach Bakterienbehandlung wurde zwischen 24 und 36 h erreicht und betrug 175 nmol/g FG für 9,10,11-TriHOD bzw. 20 nmol/g FG für 9,12,13-TriHOD. Der Gehalt dieser Verbindungen stieg 7 d nach Inokulation mit *P. infestans* bis auf 65 nmol/g FG bzw. 40 nmol/g FG an. Die Kontrollblätter enthielten durchschnittlich 0,5 nmol/g FG dieser Verbindungen.



**Abb. C-9: Oxylinprofil in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (schwarz) bzw. MgCl<sub>2</sub> (weiß)

**B:** Inokulation mit *P. infestans* (schwarz) bzw. H<sub>2</sub>O (weiß)

Der Gehalt an 9,10,11-TriHOD (I), 9,12,13-TriHOD (II), 9-HOT (III), CnA (IV), CA (V) und Jasmonsäure (VI) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei (A VI, B III, IV und V), drei (A IV und V), vier (A III, B I und II) bzw. sechs (A I und II) unabhängigen Analysen sind dargestellt.

Das Hydroxid-Derivat der Umsetzung von 9-HPOT durch eine Reduktase ist 9-HOT, und es wurde gezeigt, daß die Akkumulation dieses Metaboliten 12 h nach Bakterieninfiltration zunahm (Abb. C-9A III). Der Gehalt stieg im Vergleich zu den Kontrollblättern mit 0,4 nmol/g FG zwischen 24 und 48 h bis auf 75 nmol/g FG in den bakterieninfiltrierten Blättern an. In den *P. infestans* inokulierten Blättern begann die Akkumulation des 9-HOT 6 d nach Pathogenbehandlung, und nach 7 d wurde ein Gehalt von 8 nmol/g FG erreicht (Abb. C-9B III). Durch HPLC-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß mehr als 90 % des nach *Psm*-Behandlung bzw. nach *P. infestans*-Inokulation detektierten 9-HOT als S-Enantiomer vorkamen und damit enzymatisch entstanden waren (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Akkumulation von Produkten des 9-LOX-Reaktionsweges nach Pathogenbefall wurde bezüglich der Divinylether CnA und CA nachgewiesen (Abb. C-9A/B IV/V). Die Akkumulation begann 12 h nach Bakterieninfiltration bzw. 6 d nach Inokulation mit *P. infestans*. Der Gehalt stieg nach 36 h auf 17 nmol/g FG CnA bzw. 6 nmol/g FG CA in den bakterienbehandelten Blättern und nach 7 d auf 1 nmol/g FG bzw. 1,5 nmol/g FG in den *P. infestans* inokulierten Blättern an. Die Kontrollblätter enthielten von beiden Verbindungen durchschnittlich 0,05 nmol/g FG.

Außerdem wurde eine Akkumulation von JA, dem Produkt der Umsetzung von 13-HPOD durch den AOS-Reaktionsweg, nach Infiltration mit *Psm* bestimmt (Abb. C-9A VI). Das Maximum betrug 195 nmol/g FG und wurde 24 h nach Pathogenbehandlung erreicht. Die Kontrollblätter enthielten durchschnittlich 14 nmol/g FG mit einer Ausnahme, bei der in den mit  $MgCl_2$  inokulierten Blättern 200 nmol/g FG gemessen worden sind. Eventuell resultiert dieser hohe Gehalt aus Fehlern bei der Versuchsdurchführung. Weiterhin wurden die JA-Mengen nach Inokulation mit *P. infestans* bestimmt. Es können jedoch keine Aussagen gemacht werden, da zwei unabhängige Analysen unterschiedliche Ergebnisse ergeben hatten (Daten nicht gezeigt).

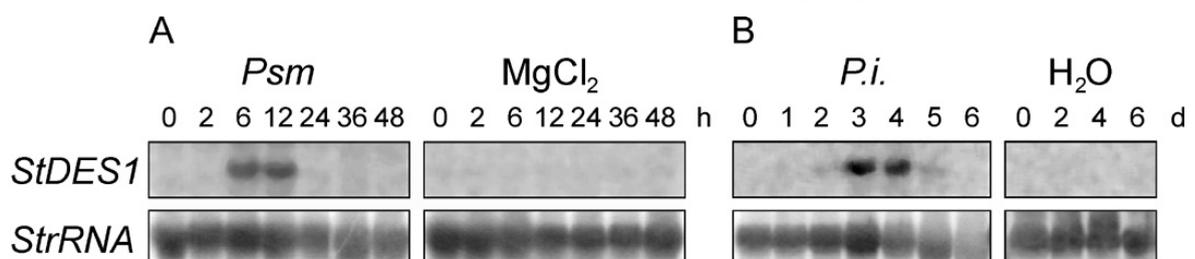
Bei der Untersuchung der Metabolite, die von der Aktivität der HPL resultieren, konnten signifikante Mengen an (2E)-Hexenal gemessen werden. Diese waren aber in den bakterienbehandelten Blättern und den entsprechenden Kontrollen nahezu unverändert (Daten nicht gezeigt). Die Produkte von Autoxidationsprozessen (12- und 16-HOT) wurden nicht detektiert. Die beschriebenen Oxylinprofile wurden anhand von GC/MS-Analysen aufgenommen. Da die Hydroperoxid-Derivate bei dieser Methode instabil sind, konnten sie somit nicht nachgewiesen werden.

Die zusammenfassende Betrachtung des Oxylinprofils verdeutlicht, daß entsprechend dem Modellsystem der Zellen auch in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall bevorzugt die Metabolisierung von 9-LOX-Produkten stimuliert wurde. Im Vergleich zu den Zellen, in denen nach Elicitierung der Divinylether CA hauptsächlich akkumulierte, wurde in der Interaktion der Blätter mit Pathogenen vor allen Dingen der EAS-Reaktionsweg aktiviert, der zur Synthese der Trihydroxide 9,10,11-TriHOD und

9,12,13-TriHOD führt. Nach Bakterieninfiltration erfolgte aufgrund der JA-Akkumulation außerdem eine Aktivierung des AOS-Reaktionsweges, der einen Teil des 13-LOX-Reaktionsweges darstellt. Nach Bakterieninfiltration wiesen die Mengen aller dokumentierten Metabolite mit Ausnahme von 9-HOT einen transienten Verlauf auf. Im Gegensatz dazu akkumulierten diese Metabolite nach Inokulation mit *P. infestans* bis zum Ende der Beobachtungszeit. Es erfolgte vor allem eine Akkumulation von LnA-Derivate, wobei bemerkenswert ist, daß nach Inokulation von *P. infestans* der Gehalt an CA höher als an CnA war, diese Verbindungen aber nur eine sehr schwache Akkumulation aufwiesen.

#### 2.1.4 Transkriptanalyse von Genen, die für Enzyme des LOX-Reaktionsweges kodieren

Die cDNA einer Divinylethersynthase (StDES1) war aus RNA der Zellen von *S. tuberosum* nach Elicitorbehandlung isoliert worden (Stumpe *et al.* 2001). So konnte die Biosynthese der Divinylether CA und CnA, die nach Pathogenbefall in Blättern von *S. tuberosum* akkumulieren, genauer charakterisiert werden. Dafür wurden die in 2.1.1 dargestellten Northern-Blot-Analysen verwendet (Abb. C-10A/B). Die Transkripte der StDES1 wurden transient 6 und 12 h nach Infiltration mit *Psm* sowie 3 und 4 d nach Inokulation mit *P. infestans* detektiert. Dies läßt vermuten, daß der Anstieg der Produktmengen des DES-Reaktionsweges in den pathogenbehandelten Blättern mit einer Transkriptakkumulation der StDES1 korrelierte. Außerdem war die Akkumulation der StDES1-Transkripte der DES-Produktakkumulation zeitlich vorgelagert.



**Abb. C-10: Northern-Blot-Analyse der Expression einer Divinylethersynthase in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) bzw.  $MgCl_2$

**B:** Inokulation mit *Phytophthora infestans* (*P.i.*) bzw.  $H_2O$

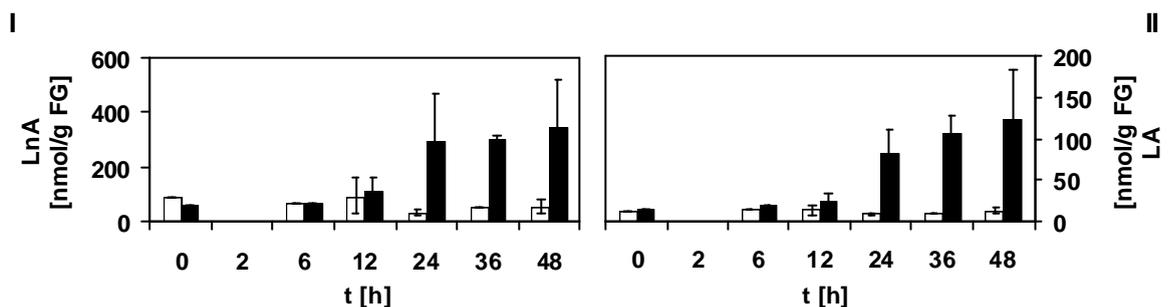
Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall isoliert, je 20  $\mu g$  RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von StDES1 und St25SrRNA hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von jeweils drei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

Das cDNA-Fragment einer 9-Hydroperoxidlyase (9-HPL; von M. Stumpe, IPK, Gatersleben, zur Verfügung gestellt) wurde verwendet, um die Genexpression eines weiteren Enzyms des 9-LOX-Reaktionsweges zu untersuchen. In den verwendeten Northern-Blot-Analysen lagen die Transkriptmengen der 9-HPL unterhalb der

Detektionsgrenze (Daten nicht gezeigt). Dies korreliert mit den Ergebnissen der Oxylinanalyse, wonach Nonenal und Nonadienal, die Produkte der 9-HPL-Aktivität, in den bakterieninfiltrierten Blättern nicht akkumulierten.

### 2.1.5 Untersuchungen zur Bereitstellung der LOX-Substrate

Im Gegensatz zu den Zellen, in denen vor allem LA-Derivate nach Elicitorbehandlung akkumulierten, wurden in Blättern von *S. tuberosum* insbesondere LnA-Derivate nach Pathogenbefall gebildet. Mittels GC/MS-Analysen wurden die freien Fettsäuren in den Extrakten des oben beschriebenen Blattmaterials bestimmt. Dabei wurde gezeigt, daß die Mengen an LOX-Substraten 24 h nach Infiltration mit *Psm* drastisch zunahm (Abb. C-11). Der Gehalt an LnA stieg in den pathogenbehandelten Blättern bis 48 h auf 340 nmol/g FG, der LA-Gehalt bis 125 nmol/g FG. Die Kontrollblätter enthielten durchschnittlich 65 nmol/g FG LnA und 12 nmol/g FG LA. Auch hier zeigt die Akkumulation der Substrate einen analogen Verlauf zur Bildung der Produkte der LOX-Reaktion (Abb. C-9 versus Abb. C-11) In der kompatiblen Interaktion mit *P. infestans* wurde keine Akkumulation der freien Fettsäuren detektiert (Daten nicht gezeigt).

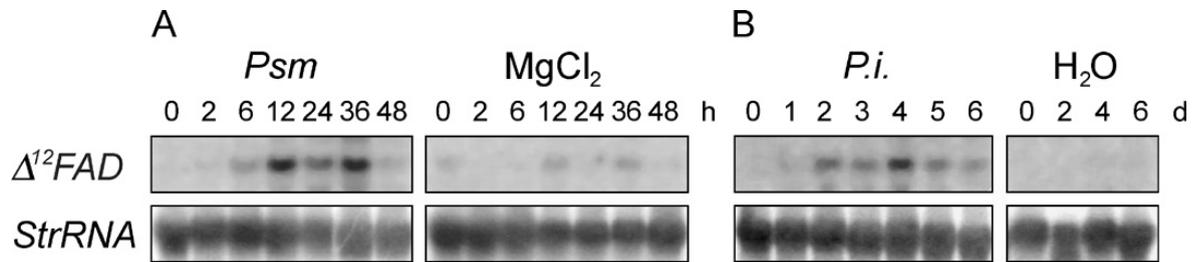


**Abb. C-11: Bestimmung der freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

Der Gehalt an LnA (I) und LA (II) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (schwarz) bzw. MgCl<sub>2</sub> (weiß) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Analysen sind dargestellt.

Zur Untersuchung der *de novo*-Synthese der LOX-Substrate LA und LnA stand das cDNA-Fragment mit Homologien zu einer  $\Delta^{12}$ -FAD zur Verfügung (s. 1.4). Die Transkripte des  $\Delta^{12}$ -FAD-homologen Gens akkumulierten in den Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall (Abb. C-12). Die Akkumulation war transient und begann 6 h nach Bakterieninfiltration (Abb. C-12A). Die maximalen Transkriptmengen wurden nach 12 h und 36 h erreicht. Das schwächere Signal nach 24 h scheint durch eine geringere Beladung des Agarosegels mit Gesamt-RNA dieser Probe verursacht zu sein. In der kompatiblen Interaktion mit *P. infestans* nahmen die Transkripte ab 2 d nach Inokulation transient zu (Abb. C-12B) und erreichten nach 4 d ihre maximale Akkumulation. Aus diesem und dem vorangegangenen Experiment könnte gefolgert werden, daß im Falle der kompatiblen Interaktion offensichtlich die Substrate LA und LnA vollständig umgesetzt werden, da

einerseits eine Änderung der Mengen der freien Fettsäuren nicht nachgewiesen wurde, aber andererseits eine Induktion der Expression eines Biosynthesenzymes auf der Transkriptebene nachweisbar war.



**Abb. C-12: Northern-Blot-Analyse der Expression eines  $\Delta^{12}$ -FAD-homologen Gens in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) bzw.  $MgCl_2$

**B:** Inokulation mit *Phytophthora infestans* (*P.i.*) bzw.  $H_2O$

Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall isoliert, je 20  $\mu g$  RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten Fragment eines partiellen cDNA-Klons mit Homologien zu  $\Delta^{12}$ -FAD sowie mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der *St25SrRNA* hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

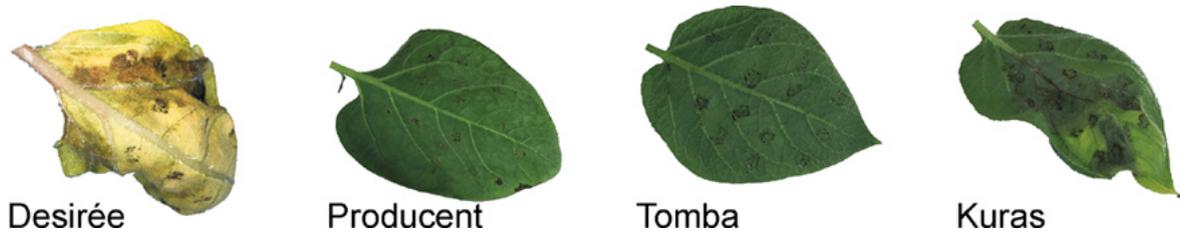
## 2.2 Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhter Basisresistenz gegenüber *P. infestans*

### 2.2.1 Feldresistenz von *S. tuberosum*

Es standen drei Sorten von *S. tuberosum* zur Verfügung, die bei der Interaktion mit *P. infestans* resistenter als die susceptible Sorte Désirée sind. Mit diesen Pflanzen wurde die Bedeutung des LOX-Reaktionsweges bei der Resistenzausprägung in *S. tuberosum* untersucht.

Die Blätter von Pflanzen der Sorten Producent, Tomba und Kuras überlebten den Pathogenbefall im Gegensatz zu denen der susceptible Sorte Désirée, die nach Inokulation mit *P. infestans* abstarben (Abb. C-13). Die Kontrollblätter, die mit Wasser inkubiert wurden, wiesen keine phänotypischen Veränderungen auf. Die Resistenz dieser Sorten beruht jedoch nicht auf einer Interaktion von R- und Avr-Genprodukten, sondern auf einer erhöhten Basisresistenz (Feldresistenz). Mit Zoosporensuspensionen, die eine höhere Konzentration (800.000 Sporen/ml) als die normalerweise verwendeten Suspensionen (400.000 Sporen/ml) aufwiesen, konnte diese Feldresistenz jedoch überwunden werden, und die Blätter von Pflanzen der Sorten Producent, Tomba und Kuras starben ebenfalls ab (Daten nicht gezeigt).

In resistenten Sorten von *S. tuberosum* waren im Vergleich zu susceptible Sorten erhöhte Transkriptmengen von PR-Genen nachgewiesen worden. Deshalb wurde vermutet, daß diese konstitutive PR-Genexpression an der nichtspezifischen Resistenz gegenüber *P. infestans* beteiligt sein könnte (Vleeshouwers *et al.* 2000).



**Abb. C-13: Phänotyp der Blätter verschiedener Sorten von *S. tuberosum* nach Inokulation mit *P. infestans*.**

Blätter der Sorten Désirée, Producent, Tomba und Kuras wurden mit einer Zoosporensuspension (400.000 Sporen/ml) von *P. infestans* an der Blattunterseite inokuliert. Die Pflanzen wurden 6 d bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Expression von LOXen, PR-Proteinen und Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels wurde in drei unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der vier Sorten untersucht. Die Northern-Blot-Analysen zeigten die für die Pflanzen der Sorte Désirée beschriebene Transkriptakkumulation nach Inokulation mit *P. infestans* (Abb. C-7B). Da in den Pflanzen mit erhöhter Basisresistenz die detektierten Transkriptmengen der LOX-, PR- und Abwehrgene sehr variabel waren (Daten nicht gezeigt), bestand keine Korrelation zwischen der Expression dieser Gene und der Ausprägung eines resistenten Phänotyps.

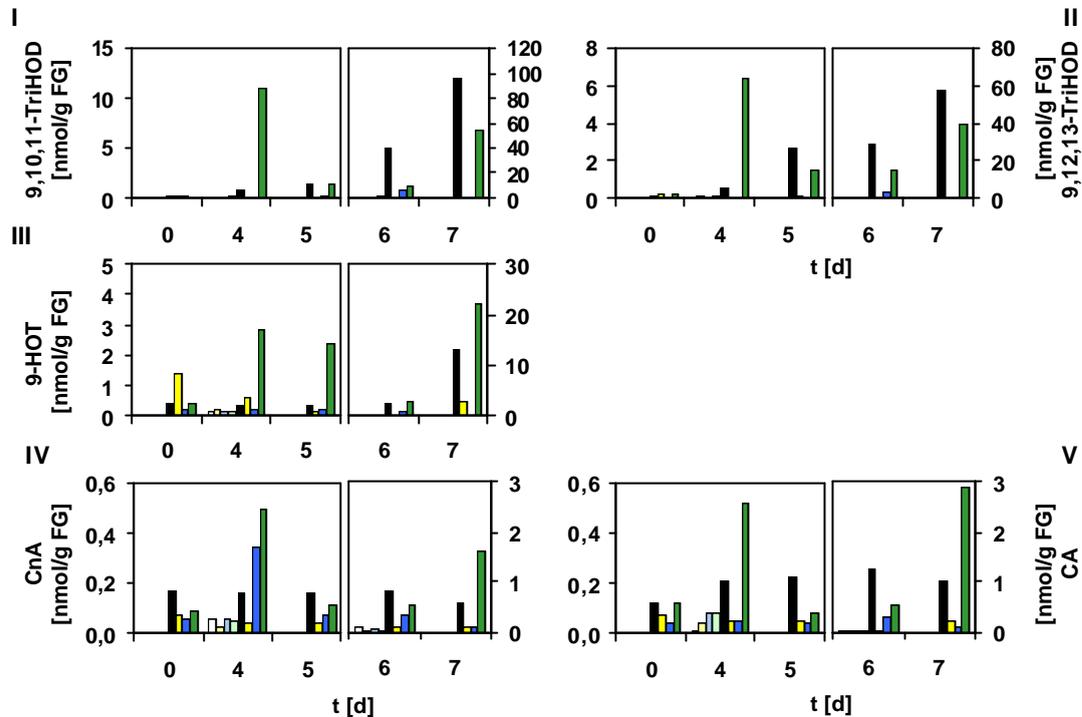
### 2.2.2 Analyse der Metabolitenprofile

Neben der Untersuchung der Genexpression wurden die Oxylinprofile nach Inokulation mit *P. infestans* in den Pflanzen mit erhöhter Basisresistenz aufgenommen. Da nur ein Inokulationsexperiment vollständig analysiert wurde, können aufgrund der biologischen Variabilität, die bei der Untersuchung der Pflanze-Pathogen-Interaktionssysteme sehr ausgeprägt war, keine absoluten Aussagen gemacht werden.

Um einen ersten Überblick zu erhalten, wurden mittels GC/MS-Analyse die Oxyline bestimmt, die hauptsächlich in der kompatiblen Interaktion akkumulieren. Dies sind die Trihydroxide 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD, das Hydroxid-Derivat 9-HOT und die Divinylether CnA und CA (Abb. C-14). Dabei muß eine frühe Phase der Akkumulation, die vor bzw. parallel zur Ausprägung nekrotischer Bereiche auf den suszeptiblen Blättern stattfindet (0 bis 5 d nach Inokulation), von einer späteren Phase unterschieden werden, die während des Absterbens der anfälligen Blätter erfolgt (6 bis 7 d nach Inokulation). In den Sorten mit erhöhter Basisresistenz wurden im Vergleich zu der suszeptiblen Sorte während der frühen Phase leicht erhöhte Mengen an Oxylinen gemessen. Insbesondere in der Sorte Kuras akkumulierten diese Verbindungen bereits 4 d nach Inokulation. Außerdem enthielt die Sorte Tomba 4 d nach Inokulation höhere Mengen an CnA als die suszeptiblen Sorte Désirée.

Während der zweiten Phase erfolgte eine starke Akkumulation in der suszeptiblen Sorte Désirée. Auffällig ist eine mit der kompatiblen Interaktion vergleichbare Akkumulation,

wenn die erhöhte Basisresistenz durch *P. infestans* überwunden wurde und es zur Ausbildung von Nekrosen kam. So wurden in den nekrotischen Blättern der Sorte Kurasa, die 7 d mit *P. infestans* inokuliert waren, sogar höhere Mengen an 9-HOT und Divinylethern als in den Blättern der Sorte Désirée bestimmt.



**Abb. C-14: Oxylinprofil in Blättern verschiedener Sorten von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

Der Gehalt an 9,10,11-TriHOD (I), 9,12,13-TriHOD (II), 9-HOT (III), CnA (IV) und CA (V) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (d) nach Inokulation mit *P. infestans* (Désirée: schwarz, Producent. gelb, Tomba: blau, Kurasa: grün) bzw. H<sub>2</sub>O (Désirée: weiß, Producent: hellgelb, Tomba: hellblau, Kurasa: hellgrün) bestimmt.

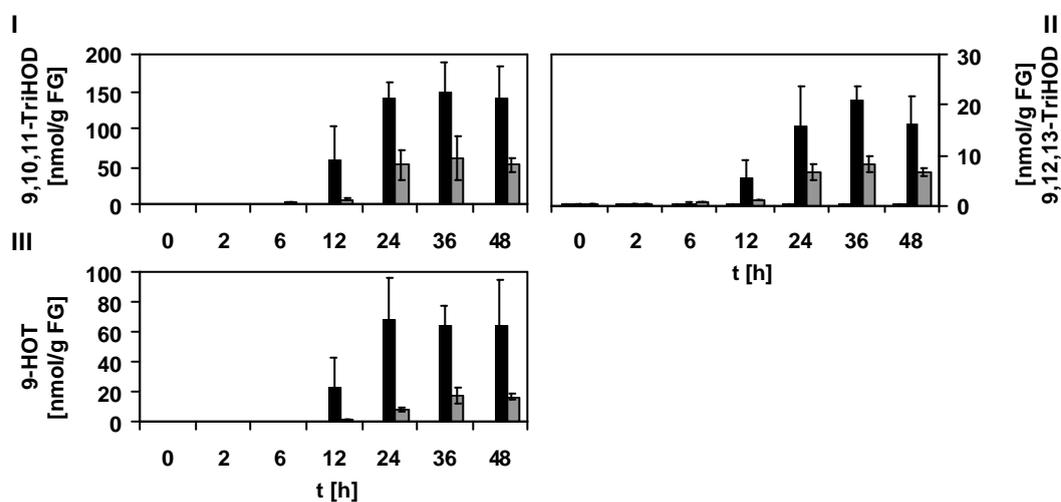
### 3 Akkumulation von 9-LOX-Metaboliten während der Ausprägung von Blattnekrosen

Während der Ausprägung der HR ist die irreversible Schädigung von Membranen eine der frühesten physiologischen Veränderungen innerhalb der Zelle, woran Prozesse beteiligt sind, die die Peroxidation vielfach ungesättigter Fettsäuren bewirken (Keppler und Novacky 1987). Diese Lipidperoxidation kann durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, s. A.1.4) oder die Aktivierung von LOXen hervorgerufen werden (Keppler und Novacky 1987). Bisher konnte nicht genau geklärt werden, ob LOXen an der Auslösung der Lipidperoxidation beteiligt sind oder lediglich durch die radikalinduzierten Membranveränderungen induziert werden (Rosahl 1996). Zur Untersuchung der Bedeutung von 9-LOX-Metaboliten während der Ausprägung von Blattnekrosen in *S. tuberosum* sollte eine Analyse der Oxyline nach Behandlung mit der photodynamischen Substanz Eosin und dem Oligopeptidelicitor Pep13 erfolgen.

### 3.1 Metabolitenakkumulation nach Infiltration von Eosin

Um Nekrosen unabhängig von einem Pathogenbefall zu erzeugen, wurden die Blätter von *S. tuberosum* mit Eosin infiltriert. Diese Behandlung führt zur lichtabhängigen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Superoxidanionen und Singulett-Sauerstoff), wodurch oxidativer Streß entsteht und Nekrosen gebildet werden (Penninckx *et al.* 1996).

Wie in den 2.2.2 aufgeführten Experimenten wurden auch hier nur die wichtigsten Oxylipine bestimmt. Die Trihydroxide 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD sowie das Hydroxid-Derivat 9-HOT wurden deshalb mittels GC/MS-Analysen nach Infiltration von *Psm*, Eosin und  $MgCl_2$  bestimmt (Abb. C-15). Die Mengen an Divinylether waren nach Eosinbehandlung sehr gering und wurden deshalb in diesen Infiltrationsexperimenten nicht ausgewertet. Die dokumentierten Metabolite des 9-LOX-Reaktionsweges akkumulierten transient sowohl nach Bakterien- (schwarze Balken) als auch nach Eosinbehandlung (graue Balken). Die Akkumulation nach Infiltration von Eosin begann jedoch zeitlich verzögert im Vergleich zur Akkumulation nach Bakterieninfiltration. In den eosinbehandelten Blättern begannen die drei Oxylipine parallel zur Ausbildung der Nekrosen nach 24 h zu akkumulieren und waren transient zwischen 24 und 48 h nachweisbar. Nach Bakterienbehandlung entstanden die Nekrosen bereits nach 12 h, und die 9-LOX-Metabolite akkumulierten ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Der maximale Gehalt der Trihydroxide war nach Eosininfiltration dreifach geringer als nach Bakterieninfiltration (Abb. C-15 I und II), der Gehalt an 9-HOT war vierfach geringer (Abb. C-15 III).



**Abb. C-15: Oxylinprofil in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall und Behandlung mit Eosin.**

Der Gehalt an 9,10,11-TriHOD (I), 9,12,13-TriHOD (II) sowie 9-HOT (III) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (schwarz), Eosin (grau) bzw.  $MgCl_2$  (weiß) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei (Eosin) bzw. drei (*Psm* und  $MgCl_2$ ) unabhängigen Analysen sind dargestellt.

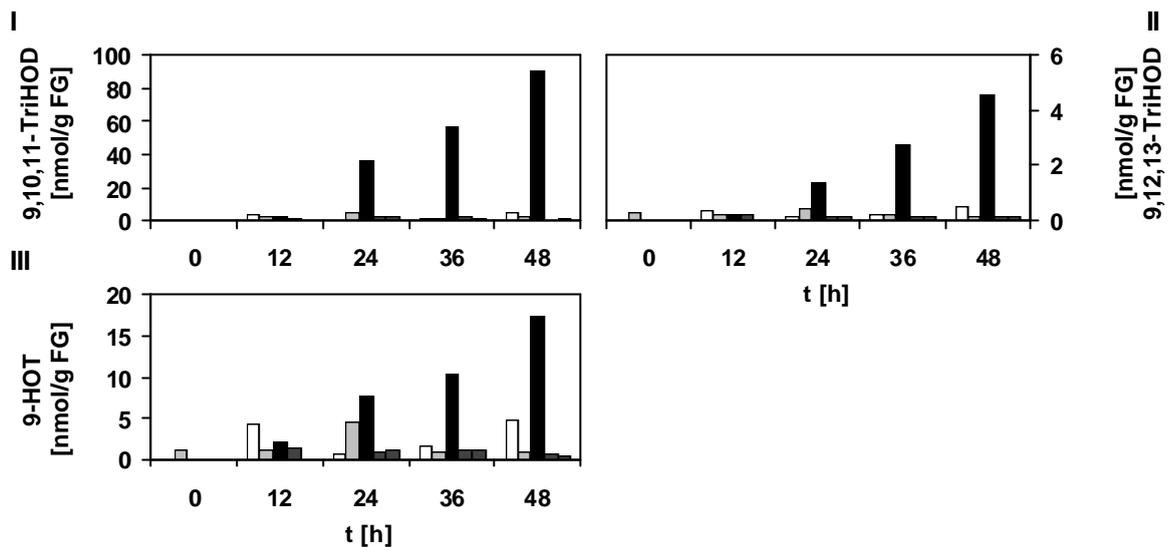
Die Northern-Blot-Analyse mit RNA dieser Blätter zeigte, daß die Expression der PR-Gene StPRB1b und StPR10 nach Infiltration von Eosin und Bakterien induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Akkumulation von 9-LOX-Metaboliten erfolgte somit nach Eosinbehandlung nicht unabhängig von der Induktion der Abwehrgenexpression. Aus diesem Grund kann eine Verbindung zwischen der Abwehrgenexpression und der Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges bei der Reaktion auf Eosininfektion nicht ausgeschlossen und keine Aussagen gemacht werden, ob die 9-LOX-Metabolite an der Ausprägung von Nekrosen beteiligt oder eine Folge- bzw. Begleiterscheinung der HR sind.

### 3.2 Untersuchungen von Wildtyp- und *nahG*-Pflanzen nach Pep13-Behandlung

Der Oligopeptidelicitor aus *Phytophthora sojae*, Pep13, aktiviert eine Reihe von Abwehrreaktionen in Zellen von *Petroselinum crispum*, einschließlich der Expression von Abwehrgenen und der Bildung von Phytoalexinen (Nürnberger *et al.* 1994). In allen bisher untersuchten Pflanzenarten entstehen nach der Behandlung mit Pep13 keine Nekrosen (Dr. T. Nürnberger, persönliche Mitteilung). Dagegen induziert die Pep13-Infiltration in *S. tuberosum* die Bildung von Nekrosen und die Induktion der Abwehrgenexpression. Transgene *nahG*-Pflanzen von *S. tuberosum*, die das bakterielle Gen für eine Salicylathydroxylase exprimieren und deren endogener Salicylsäuregehalt damit herabgesetzt wurde, exprimieren ebenfalls Abwehrgene nach Pep13-Behandlung. Die Nekrosebildung ist jedoch in diesen Pflanzen inhibiert, was darauf hinweist, daß Pep13 eine salicylatabhängige Nekrosebildung induziert (Geiler 2001).

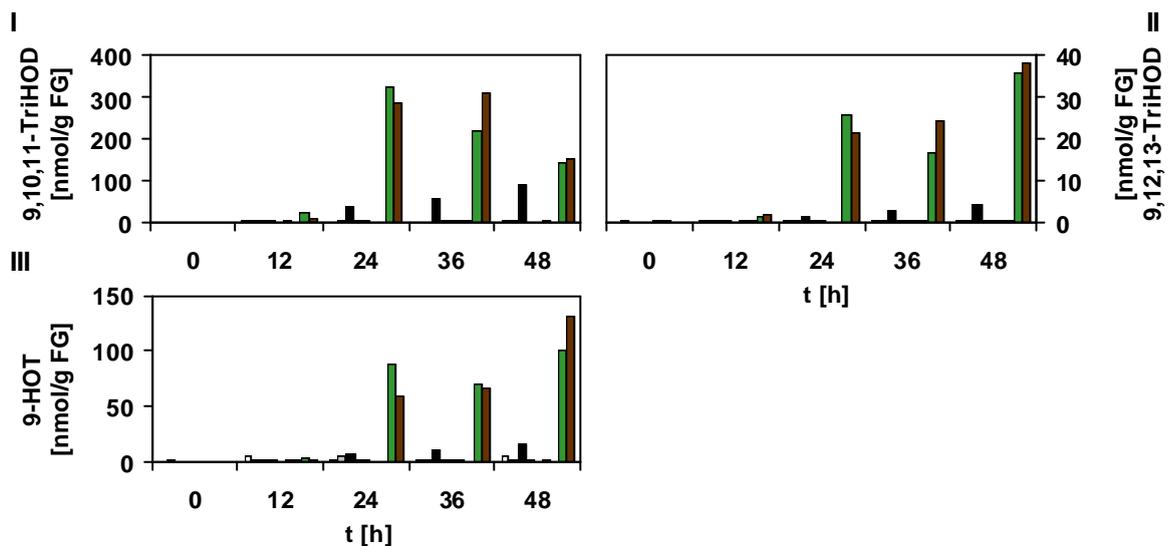
Die GC/MS-Analyse der wichtigsten Oxylipine in *S. tuberosum*-Pflanzen ergab, daß die Metabolite des 9-LOX-Reaktionsweges in den Pep13-behandelten Blättern der Wildtyp-Pflanzen bis zum Versuchsende akkumulierten (Abb. C-16). Wie im Fall der Eosinbehandlung waren auch die Mengen an Divinylethern nach Pep13-Infiltration sehr gering und wurden deshalb in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt. Der Gehalt der Trihydroxide 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD sowie des Hydroxid-Derivates 9-HOT stieg bis 48 h nach Pep13-Behandlung an, wohingegen der Gehalt dieser Metabolite in den *nahG*-Pflanzen nahezu konstant blieb. Im Gegensatz zur Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges in den Wildtyp-Pflanzen akkumulierten damit nach Infiltration von Pep13 in den *nahG*-Pflanzen keine 9-LOX-Metabolite.

Nach Infiltration mit *Psm* werden Nekrosen auch in den Blättern der *nahG*-Pflanzen ebenso wie in den Wildtyp-Pflanzen ausgeprägt. Dieser Phänotyp korrelierte mit der Akkumulation von 9,10,11-TriHOD, 9,12,13-TriHOD und 9-HOT in den *nahG*- und Wildtyp-Pflanzen (Abb. C-17). Der Gehalt dieser 9-LOX-Metabolite in den transgenen Pflanzen ist mit dem in Wildtyp-Pflanzen vergleichbar.



**Abb. C-16: Oxylinprofil in Blättern von Wildtyp- und *nahG*-Pflanzen nach Behandlung mit Pep13.**

Der Gehalt an 9,10,11-TriHOD (I), 9,12,13-TriHOD (II) sowie 9-HOT (III) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Infiltration mit Pep13 (Wildtyp: schwarz, *nahG*: dunkelgrau) bzw. H<sub>2</sub>O (Wildtyp: weiß, *nahG*: hellgrau) bestimmt. Es sind jeweils 2 *nahG*-Pflanzen parallel mit Pep13 infiltriert worden.



**Abb. C-17: Oxylinprofil in Blättern von Wildtyp- und *nahG*-Pflanzen nach Behandlung mit Pep13 und Pathogenbefall.**

Der Gehalt an 9,10,11-TriHOD (I), 9,12,13-TriHOD (II) sowie 9-HOT (III) wurde mit GC/MS-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h) nach Infiltration mit Pep13 (Wildtyp: schwarz, *nahG*: dunkelgrau) bzw. H<sub>2</sub>O (Wildtyp: weiß, *nahG*: hellgrau) sowie nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (Wildtyp: grün, *nahG*: braun) bzw. MgCl<sub>2</sub> (Wildtyp: hellbraun, *nahG*: hellgrün) bestimmt. Die Analyse der Pep13-Behandlung ist identisch mit der in Abb. C-16 dargestellten.

Die Auswertung der Oxylinprofile in Blättern von Wildtyp- und *nahG*-Pflanzen nach Behandlung mit Pep13 und Pathogenbefall deuten auf eine Korrelation zwischen Nekrosebildung und Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges. Bemerkenswert ist dabei, daß die Aktivierung des 9-LOX-Reaktionsweges nach Pep13-Behandlung nicht aber nach Pathogenbefall über SA-abhängige Prozesse erfolgt. Daraus folgt, daß der 9-LOX-

Reaktionsweg über einen SA-abhängigen und einen SA-unabhängigen Weg induziert werden kann.

In den Wildtyp-Pflanzen war das Maximum der Trihydroxid-Akkumulation nach Bakterieninfiltration drei- bzw. achtfach höher als nach Pep13-Behandlung, die Akkumulation von 9-HOT war siebenfach höher. Die unterschiedlichen Maxima der Metabolitenakkumulation können durch unterschiedliche Induktionsstärken der Nekrosebildung nach Bakterien- bzw. Pep13-Infiltration und durch Eigenschaften des Pathogens, die weitere Abwehrreaktionen induzieren, verursacht sein. Da nur ein Pep13-Infiltrationsexperiment analysiert wurde, muß die Allgemeingültigkeit dieser Analyse durch weitere Untersuchungen in Zukunft überprüft werden.

#### 4 Funktionelle Analyse des 9-LOX-Reaktionsweges

Zusätzlich zu den bisher dargestellten, korrelativen Daten war die Bedeutung der 9-LOXen bei Resistenzantworten von *N. tabacum* in einer funktionellen Analyse beschrieben worden, bei der die Aktivität einer pathogeninduzierten 9LOX durch die Expression von *antisense* LOX-Sequenzen inhibiert wurde (Rancé *et al.* 1998). Im Gegensatz zu den resistenten Wildtyp-Pflanzen waren die transgenen Pflanzen suszeptibel nach Infektion mit *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Diese Umwandlung einer inkompatiblen in eine kompatible Interaktion deutet auf eine entscheidende Rolle von 9-LOXen bei der Ausprägung von Resistenzen in *Solanaceae*. Um den Zusammenhang zwischen der Stimulierung der LOX-Aktivität und der Aktivierung von Abwehrreaktionen in *S. tuberosum* zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *gain of function*- und *loss of function*-Experimente durchgeführt.

##### 4.1 PR-Genexpression nach Behandlung mit LOX-Metaboliten

In *Hordeum vulgare* weist die Induktion der HvPR1-Genexpression durch exogen appliziertes 13-HOT auf eine Rolle der Hydroxid-Derivate von PUFAs bei der Pathogenabwehr hin (Weichert *et al.* 1999). Die Ausprägung von Nekrosen und Induktion der PR-Genexpression wurde daraufhin in Blättern von *S. tuberosum* nach Infiltration von LOX-Produkten der LnA analysiert. Es wurden 9-HPOT und 13-HPOT, sowie die 9-LOX-Metabolite, die nach Pathogenbefall stark akkumulieren (9,10,11-TriHOD, 9-HOT und CA) und das LOX-Substrat LnA infiltriert (Abb. C-18).

Die Hydroperoxid-Derivate 9-HPOT und 13-HPOT induzierten Nekrosen, wenn Lösungen einer Konzentration von 10 mM appliziert wurden. Dies korreliert mit der Beobachtung, daß 13-HPOD ab diesen Konzentrationen in Blättern von *N. tabacum* ebenfalls die Nekrosebildung induziert (Rustérucci *et al.* 1999). Nekrosen entstanden weiterhin nach Infiltration von 5 und 10 mM 9-HOT-Lösung. Da im Falle der Hydroperoxide anstelle von 5 mM-Lösungen nur 2 mM verwendet wurden, können keine Aussagen über die Nekrosebildung durch 5 mM-Lösungen von 9-HPOT und 13-HPOT

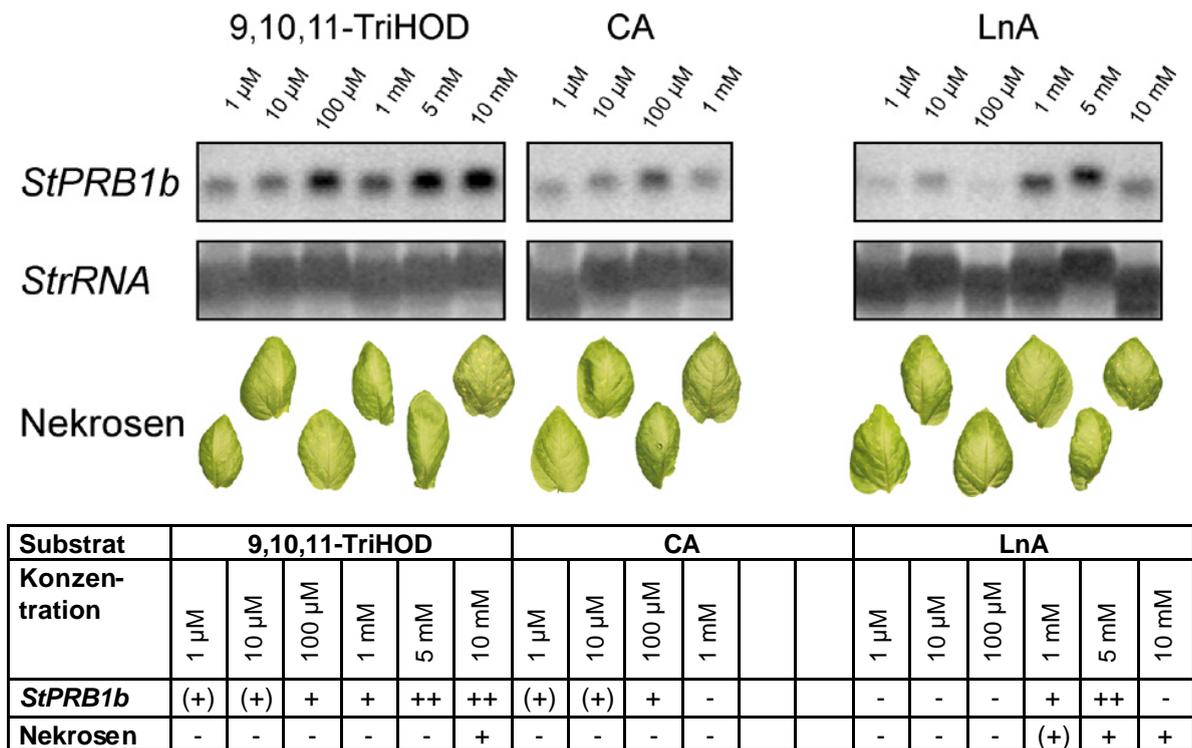
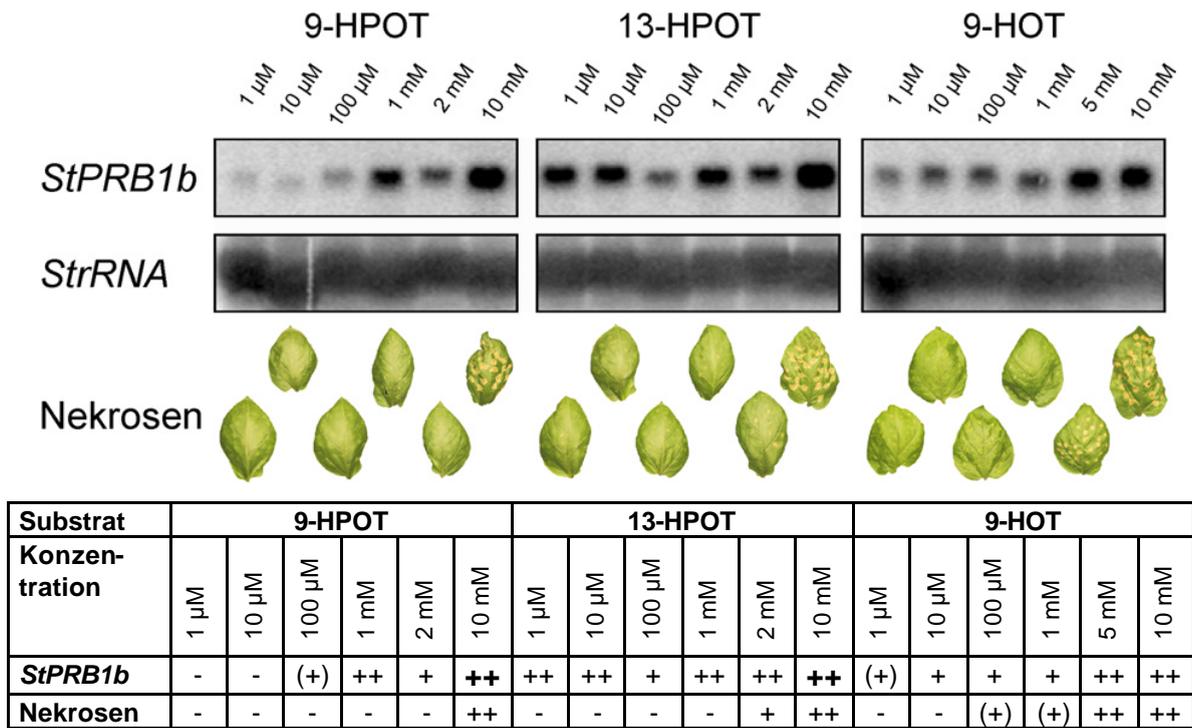


Abb. C-18: Northern-Blot-Analyse der *StPRB1b*-Genexpression in Blättern von *S. tuberosum* und Phänotyp dieser Blätter nach Behandlung mit Oxylipinen.

Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial 48 h nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu$ M bis 10 mM) von 9-HPOT, 13-HPOT, 9-HOT, 9,10,11-TriHOD, CA und LnA isoliert, je 20  $\mu$ g RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von *StPRB1b* und *St25SrRNA* hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Analysen ist dargestellt, mit Ausnahme der Ergebnisse der Infiltration von 13-HPOT, die nur einmal durchgeführt worden ist.

gemacht werden. Die Trihydroxid-Lösung mit einer Konzentration von 10 mM induzierte schwache Blattnekrosen. Nach Infiltration von Lösungen mit Konzentrationen bis zu 1 mM des Divinylethers CA wurden keine Nekrosen gebildet. Höhere Konzentrationen konnten nicht getestet werden, da die entsprechenden Mengen dieser Verbindung nicht zur Verfügung standen. Bei Behandlung mit LnA entstanden mit 5 bzw. 10 mM-Lösungen schwache Nekrosen.

Die StPRB1b-Genexpression wurde anhand von Northern-Blot-Analysen dieser Blätter untersucht (Abb. C-18). Beim Vergleich der Wirkung der Positionsisomere 9- und 13-HPOT ist auffällig, daß 13-HPOT-Lösungen bereits in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 100 µM eine StPRB1b-Transkriptakkumulation induzierten, wohingegen 9HPOT-Lösungen erst über einer Konzentration von 100 µM eine solche Akkumulation verursachten. Außerdem induzierten die 9-LOX-Metabolite 9-HOT und 9,10,11-TriHOD die Transkriptakkumulation des StPRB1b-Genes bereits, wenn Lösungen von geringen Konzentrationen appliziert wurden (ab 10 µM bzw. 100 µM). Dies geschah unabhängig von einer Nekrosebildung. Damit können Oxylipine direkt an der Induktion der Abwehrgenexpression in *S. tuberosum* nach Pathogenbefall beteiligt sein.

#### **4.2 Charakterisierung der 9-LOX-Isoformen in *S. tuberosum* nach Pathogenbefall**

In *S. tuberosum* sind bisher 12, zum Teil vollständige cDNA-Klone beschrieben worden, die zur Familie der 9-LOXen gehören und deren Nukleotidsequenzen zueinander über 90 % identisch sind (Kolomiets *et al.* 2001). Eine Funktionsanalyse pathogeninduzierter LOXen wurde in transgenen Pflanzen von *S. tuberosum* versucht, die mit *antisense*-Konstrukten einer knollenspezifischen LOX-Isoform (LOX1-St-2; *Acc. No.* Y18548) transformiert waren (von Prof. Dr. R. Casey, John Innes Centre, Norwich, GB zur Verfügung gestellt) und in deren Knollen keine 9-LOX-Transkripte nach Behandlung mit Arachidonsäure akkumulieren (Dr. S. Rosahl, persönliche Mitteilung). In den Blättern dieser Pflanzen wurde jedoch nach Infiltration mit *Psm* bzw. Inokulation mit *P. infestans* die Akkumulation der StLOX1-Transkripte mittels Northern-Blot-Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Somit war die Expression der *antisense*-Sequenzen der knollenspezifischen 9-LOX nicht effizient genug, um die Expression der beschriebenen 9-LOX-Isoformen, deren Sequenzen über 90 % identisch sind, in den Blättern von *S. tuberosum* zu reprimieren.

Vor kurzem wurde eine weitere 9-LOX-Isoform aus *S. tuberosum* charakterisiert, die in Blättern nach Pathogenbefall exprimiert wird (Kolomiets *et al.* 2000). Die Sequenz dieser POTLX-3 ist etwa 80 % identisch mit den Sequenzen anderer 9-LOXen aus *S. tuberosum* und besitzt somit einen relativ geringen Homologiegrad innerhalb dieser Gruppe der 9-LOXen vom Typ 1.

Da eine große Anzahl von 9LOX-Isoformen in *S. tuberosum* bereits beschrieben worden ist, deren Transkripte in Northern-Blot-Analysen aufgrund der hohen Sequenzhomologien wahrscheinlich nicht unterschieden werden können, sollte das Expressionsprofil der 9-LOXen nach Pathogenbefall charakterisiert werden. Ein spezifisches cDNA-Fragment aller bekannten 9LOXen wurde hergestellt und in einer Restriktionsanalyse analysiert, anhand derer der Anteil dieser 9LOX-Isoformen an der pathogeninduzierten Expression von 9-LOXen in *S. tuberosum* abgeschätzt werden sollte.

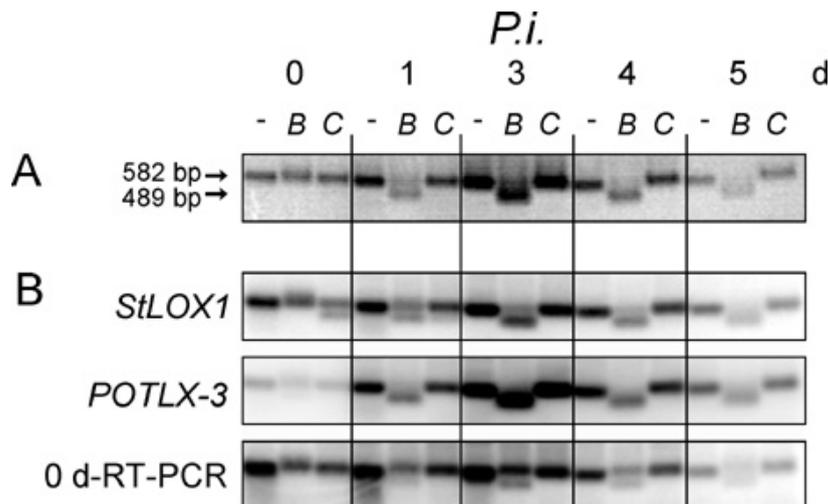
#### 4.2.1 Restriktionsanalyse eines 9-LOX-spezifischen Fragmentes

Nach einer Sequenzanalyse der 9-LOXen aus *S. tuberosum* wurde ein 582 bp-Fragment ausgewählt, anhand dessen die einzelnen Isoformen mit einer Restriktionsanalyse unterschieden werden können. Das Fragment der pathogeninduzierten POTLX-3 (Kolomiets *et al.* 2000) besitzt eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl*II in der Nähe des 5'-Endes. Die Fragmente der knollenspezifischen PLOX1 und StLOX1, deren verstärkte Expression nach Behandlung mit Arachidonsäure und Inokulation mit *P. infestans* beschrieben worden ist (Fidantsef und Bostock 1998; Abschnitt 2), enthalten dagegen eine *Cla*I-Schnittstelle im 3'-Bereich (Sequenzanalyse im Anhang).

Die 9-LOX-spezifischen Fragmente wurden durch RT-PCR mit homologen Primern aus RNA von mit *P. infestans* inokulierten Blättern amplifiziert und anschließend der Restriktionsanalyse unterzogen (Abb. C-19). Nach der Spaltung mit *Bgl*II bzw. *Cla*I entstanden jeweils Fragmente mit 489 und 93 bp, wobei das kleinere Fragment in dieser Abbildung nicht dargestellt ist.

Auf dem Bild des mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels der Restriktionsanalyse ist zu erkennen, daß die amplifizierten Fragmente von *Bgl*II geschnitten wurden, mit Ausnahme der aus RNA unbehandelter Pflanzen amplifizierten cDNA (Abb. C-19A). Die Spaltung mit *Cla*I ergab dagegen keine detektierbare Menge an 489 bp-langen Fragmenten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Gesamt-RNA-Präparationen der *P. infestans* inokulierten Blätter vor allem POTLX-3-Transkripte enthielten.

Die RT-PCR-Produkte wurden anschließend auf Nylonmembranen transferiert, um durch radioaktive Hybridisierungen sehr geringe Fragmentmengen nachweisen zu können (Abb. C-19B). Nach der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der StLOX1 konnten *Cla*I-geschnittene Fragmente ausschließlich in der cDNA aus RNA-Präparationen unbehandelter Blätter detektiert werden. Dies bedeutet, daß keine Transkripte der StLOX1 in den mit *P. infestans* inokulierten Blättern vorhanden und anscheinend die StLOX1-Expression nach der Inokulation reprimiert war. Im Vergleich dazu wurden mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der POTLX-3 die *Bgl*II-geschnittenen Fragmente detektiert.



**Abb. C-19: Restriktionsanalyse eines 9-LOX-spezifischen cDNA-Fragmentes aus Blättern von *S. tuberosum* nach Inokulation mit *Phytophthora infestans*.**

Ein 582 bp-Fragment wurde aus je etwa 2 µg DNase-behandelter Gesamt-RNA von Blättern, die mit *P. infestans* inokuliert und zu entsprechenden Inkubationszeiten (d) geerntet worden waren, unter Verwendung der homologen Primer cg5hom und cg3hom (s. B.1.5) mittels RT-PCR amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl* II bzw. *Cla* I gespalten. Aliquots der RT-PCR-Produkte (-) bzw. der Produkte der Spaltungen mit *Bgl* II bzw. *Cla* I wurden im nichtdenaturierenden Agarosegel aufgetrennt und das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel fotografiert (A). Anschließend wurden die RT-PCR-Produkte auf Nylonmembranen transferiert und mit folgenden radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten hybridisiert (B): *StLOX1*, *POTLX-3* und den Produkten der Ansätze mit RNA aus Blättern, die am Beginn der Inokulation geerntet worden waren (0 d-RT-PCR). Das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

In den RT-PCR-Ansätzen, die mit Gesamt-RNA aus unbehandelten Blättern durchgeführt waren, erfolgte eine Amplifikation von Fragmenten, die weder von *Bgl* II noch von *Cla* I gespalten wurden (Abb. C-19A). Diese Fragmente stammten damit weder von Transkripten der *POTLX-3* noch von Transkripten anderer beschriebener 9-LOX-Isoformen ab. Die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten RT-PCR-Produkten der unbehandelten Blätter ergab, daß die ungespaltenen Fragmente auch in den RT-PCR-Produkten enthalten waren, die aus RNA von *P. infestans* inokulierten Blättern amplifiziert wurden (Abb. C-19B). Dies wird daran ersichtlich, daß im Gegensatz zur Ethidiumbromidfärbung nach der Hybridisierung das ungespaltene Fragment verstärkt in den *Bgl* II-Ansätzen detektiert wurde. In den Ansätzen, die mit RNA von 3 d-inokulierten Blättern durchgeführt waren, wurde diese Änderung des Verhältnisses von ungespaltenem zu gespaltenem Fragmenten in den beiden Nachweismethoden besonders deutlich. Da diese ungespaltenen Fragmente sowohl in der RNA unbehandelter als auch *P. infestans* inokulierter Blätter nachgewiesen wurden, konnte vermutet werden, daß die Transkripte einer solchen 9-LOX, von der diese Fragmente amplifiziert wurden, in Blättern von *S. tuberosum* konstitutiv exprimiert sind. Nachfolgend wird deshalb ein aus dem „0 d-RT-PCR“-Ansatz isoliertes Fragment näher beschrieben.

#### 4.2.2 Identifizierung eines neuen LOX-Fragmentes

Die Produkte der RT-PCR mit der Gesamt-RNA-Präparation aus Blättern, die am Beginn der Inokulation geerntet waren (0 d-RT-PCR), wurden in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 kloniert und anschließend sequenziert.

11 cDNA-Klone wurden erhalten, die Fragmente mit Homologien zu bekannten LOX-Sequenzen aus Datenbanken enthalten. 10 Fragmente besitzen eine Sequenzidentität von 97 % zu einer toxininduzierten LOX aus *Lycopersicon esculentum* (LeLOX), 90% zu einer elicitorinduzierten LOX aus *N tabacum* (NtLOX1), 87 % zur POTLX-3 und 83 % zur StLOX1. Diese Fragmente besitzen damit eine relativ geringe Homologie zu anderen 9-LOXen aus *S. tuberosum* (Abb. C-20). Im Folgenden wird das Fragment als StLOX4 bezeichnet, da es eventuell von einer 9LOX stammt, die zu einer neuen Klasse der LOXen von *S. tuberosum* gehört.

Die Sequenz eines 11. Fragmentes ist 98 % identisch zur StLOX1 (Geerts *et al.* 1994). Dies entspricht dem Vorhandensein von *Cla* I-geschnittenen Fragmenten, die in den RT-PCR-Produkten der RNA-Präparationen am Beginn der Inokulation nachgewiesen wurden (Abb. C-19B).

		Sequenzidentität [%]					
		LeLOX	POTLX-3	StLOX1	StLOX4	NtLOX1	
Sequenzunterschiede [%]	LeLOX		85,2	81,0	95,9	89,9	LeLOX
	POTLX-3	14,6		85,2	85,1	83,7	POTLX-3
	StLOX1	19,8	15,7		80,9	80,6	StLOX1
	StLOX4	2,8	13,6	18,8		88,7	StLOX4
	NtLOX1	9,8	16,8	19,9	10,4		NtLOX1
		LeLOX	POTLX-3	StLOX1	StLOX4	NtLOX1	

**Abb. C-20: Sequenzvergleich des StLOX4-Fragmentes mit 9-LOX-Isoformen.**

LeLOX (Acc. No. AY008278)

POTLX-3 (Acc. No. U60202)

StLOX1 (Acc. No. S73865)

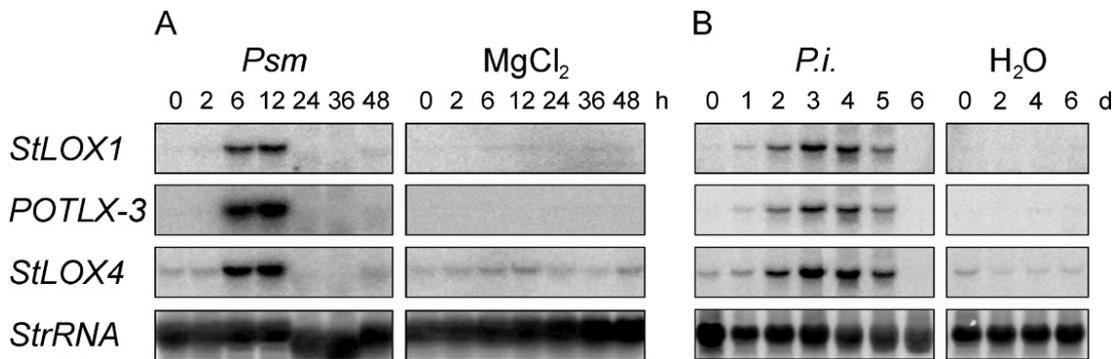
NtLOX1 (Acc. No. X84040)

#### 4.2.3 Expressionsprofil der 9-LOXen nach Pathogenbefall

Die Restriktionsanalyse 9-LOX-homologer Fragmente hatte gezeigt, daß die POTLX-3-Transkripte nach Inokulation mit *P. infestans* in Blättern von *S. tuberosum* akkumulieren. Dagegen konnten die Transkripte der PLOX1- bzw. StLOX1 in den inokulierten Blättern nicht nachgewiesen werden. Außerdem wurde das StLOX4-Fragment einer eventuell konstitutiv exprimierten LOX-Isoform isoliert.

Da in der RT-PCR der Restriktionsanalyse kein interner Standard verwendet wurde, ist eine Quantifizierung der Fragmentmengen nicht möglich, und somit können keine Aussagen über die Transkriptmengen der einzelnen 9-LOX-Isoformen nach Inokulation

gemacht werden. Außerdem fehlt die Analyse entsprechender Kontrollblätter, um die Expression der StLOX4 beschreiben zu können. Deshalb erfolgte die Untersuchung der Expressionsmuster der 9LOX-Isoformen in Northern-Blot-Analysen, in denen Gesamt-RNA aus Blättern von *S. tuberosum* eingesetzt wurde, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infiltration mit *Psm* und nach Inokulation mit *P. infestans* sowie aus entsprechenden Kontrollblättern isoliert waren (Abb. C-21).



**Abb. C-21: Northern-Blot-Analyse der Expressionsmuster von 9-LOXen in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) bzw.  $MgCl_2$

**B:** Inokulation mit *Phytophthora infestans* (*P.i.*) bzw.  $H_2O$

Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial zu entsprechenden Inkubationszeiten (h bzw. d) nach Pathogenbefall isoliert, je 20  $\mu g$  RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten der *StLOX1*, *POTLX-3*, *StLOX4* und *St25SrRNA* hybridisiert. Das repräsentative Ergebnis von jeweils zwei unabhängigen Analysen ist dargestellt.

Die erhöhten Signalintensitäten der LOX-Isoformen nach Pathogenbefall weisen auf eine Transkriptakkumulation der entsprechenden LOX-Isoformen nach Bakterieninfiltration und Inokulation mit *P. infestans* hin. Da die *StLOX1*-Fragmente in der Restriktionsanalyse der inokulierten Blätter nicht nachgewiesen werden konnten, wurde die Zunahme der Signalintensitäten der *StLOX1*-Transkripte vermutlich durch eine Kreuzhybridisierung mit den Transkripten einer pathogeninduzierten LOX-Isoform verursacht. Dies ist möglicherweise die *POTLX-3*, deren Expression durch Pathogeninfektionen in Blättern induziert wird (Kolomiets *et al.* 2000; Abb. C-19). Die Akkumulation der *POTLX-3*-Transkripte wurde in dieser Northern-Blot-Analyse bestätigt und entspricht den Ergebnissen der Restriktionsanalyse der RT-PCR-Produkte.

Die Untersuchung der *StLOX4*-Expression ergab, daß die entsprechenden Transkripte nach Pathogenbefall akkumulierten. Aber auch diese Akkumulation kann durch eine Kreuzhybridisierung mit den Transkripten einer anderen Isoform entstanden sein. Auffallend sind erhöhte Transkriptmengen der *StLOX4* im Vergleich zu denen der anderen Isoformen während früher Infektionszeitpunkte und in den Kontrollblättern. Diese deuten auf die nach der Restriktionsanalyse postulierte konstitutive Expression der *StLOX4*.

### 4.3 Funktionsanalyse der POTLX-3 in transgenen Pflanzen (RNA-Interferenz)

Die Restriktionsanalyse 9-LOX-spezifischer Fragmente hatte gezeigt, daß nicht die knollenspezifischen LOXen nach Pathogenbefall in Blättern von *S. tuberosum* exprimiert werden, sondern vielmehr die Transkripte der POTLX-3 akkumulieren (Abb. C-19). In Northern-Blot-Analysen werden die Transkripte der einzelnen Isoformen nicht unterschieden, da die radioaktiv markierten cDNA-Fragmente mit den Transkripten unterschiedlicher 9-LOXen kreuzhybridisieren (Abb. C-21). Außerdem wurde in transgenen Pflanzen, die mit *antisense*-Konstrukten einer knollenspezifischen 9-LOX transformiert waren, die pathogeninduzierte Expression von 9-LOXen in Blättern nicht reprimiert.

Eine Methode zur Untersuchung von Genfunktionen stellt das posttranskriptionelle *gene silencing* (PTGS) dar, das durch RNA-Doppelstrang-Interferenz vermittelt wird (Bass 2000). Durch Einführen doppelsträngiger RNA, die der *sense*- und *antisense*-Sequenz einer endogenen RNA entspricht, wird die verwandte mRNA degradiert und das entsprechende Gen ausgeschaltet. Dieser RNA-Interferenz-Mechanismus (RNAi) ist ubiquitär als eine sehr effektive Methode des PTGS beschrieben worden (Kennerdell und Carthew 1998; Waterhouse *et al.* 1998; Chuang und Meyerowitz 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNAi-Technik in *S. tuberosum* angewendet, um die Funktion der pathogeninduzierten Expression der POTLX-3 bei Abwehrreaktionen zu untersuchen.

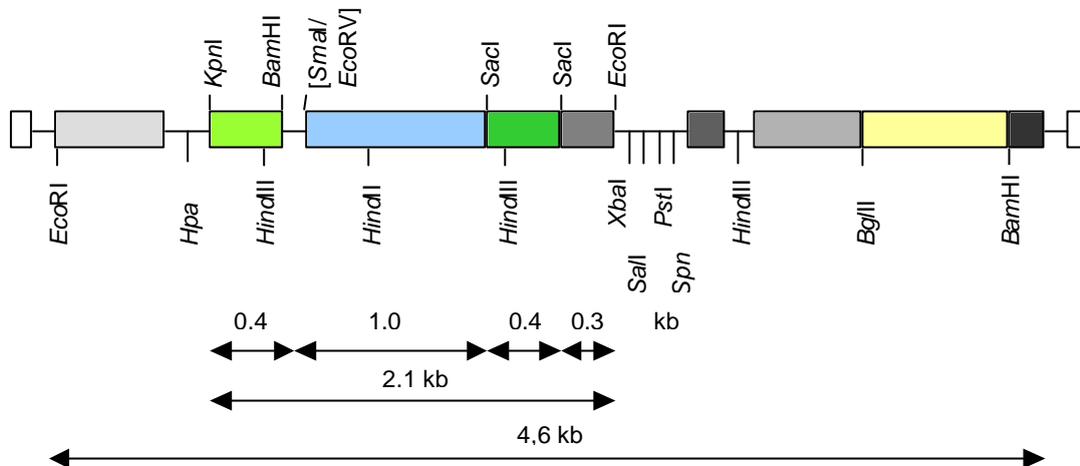
#### 4.3.1 Konstruktion des RNAi-Fragmentes und Pflanzentransformation

Es wurde ein Konstrukt hergestellt, das doppelsträngige RNA bildet, indem die genspezifischen Sequenzen in *antisense*- und *sense*-Orientierung über ein Fragment des  $\beta$ -Glucuronidasegens (*uidA*, *Acc. No.* S69414) verbunden und unter die Kontrolle des konstitutiven Blumenkohl-Mosaik-Virus-35S-Promotors (CaMV-35S-Promotor) im Plasmid pBKTX gestellt wurden (Abb. C-22). Als genspezifische Sequenz wurde ein cDNA-Fragment der POTLX-3 verwendet, das die Nukleotide 1563 bis 1936 enthält (*Acc. No.* U60202). Aus der cDNA des GUS-Gens im Plasmid pKN-GUS (Feltkamp *et al.* 1995) wurde das *Sma*/*EcoRV*-Fragment herausgeschnitten, so daß das für das RNAi-Konstrukt verwendete GUS-Fragment aus den Nukleotiden 789 bis 1812 besteht.

Das RNAi-Plasmidkonstrukt pBKTX-LOXas-GUS-LOXs wurde für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *S. tuberosum* L. cv. Désirée verwendet. Die durch RT-PCR erhaltene, vollständige cDNA der POTLX-3 wurde außerdem in *antisense*-Orientierung unter die Kontrolle des CaMV-35S-Promotors im Plasmid pBKTX gestellt (pBKTX-POTLX-3as) und für die Pflanzentransformation eingesetzt. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit dem Plasmid pBKTX transformiert.

Nach der Regeneration wurde der Einbau der T-DNA in das Genom dieser Pflanzen durch Southern-Blot-Analysen überprüft. Die transgenen Pflanzen wurden für

Inokulationsexperimente verwendet, da die pathogen-spezifische Expression der POTLX-3 erst nach Pathogenbefall analysiert werden kann.



**Abb. C-22: Restriktionskarte des RNAi-T-DNA-Konstruktes.**

Blumenkohl-Mosaik-Virus-35S-TX-Promotor	
POTLX-3-Fragment in <i>antisense</i> -Orientierung	
GUS-Fragment	
POTLX-3-Fragment in <i>sense</i> -Orientierung	
Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens	
Polyadenylierungssignal des Octopinsynthasegens	
Promotor des Nopalinsynthasegens	
Neomycinphosphotransferasegen	
Polyadenylierungssignal des Gens 7 der T-DNA	
Linke und rechte Grenzsequenz der T-DNA	

### 4.3.2 Charakterisierung der RNAi-Pflanzen nach Pathogenbefall

Die transgenen RNAi-, POTLX-3as- und Kontrollpflanzen wurden mit *Psm* und Pep13 infiltriert sowie mit *P. infestans* inokuliert, um den Verlauf der Nekrosebildung beobachten zu können und die pathogeninduzierte Expression der POTLX-3 zu untersuchen.

Nach den Pathogeninfektionen bzw. der Elicitorbehandlung wurden keine Unterschiede bei der Nekrosebildung in den verschiedenen transgenen Pflanzen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Sowohl die Flächen des nekrotischen Gewebes als auch der zeitliche Verlauf der Nekroseausprägung waren in den einzelnen RNAi-, POTLX-3as- und Kontrollpflanzen ähnlich.

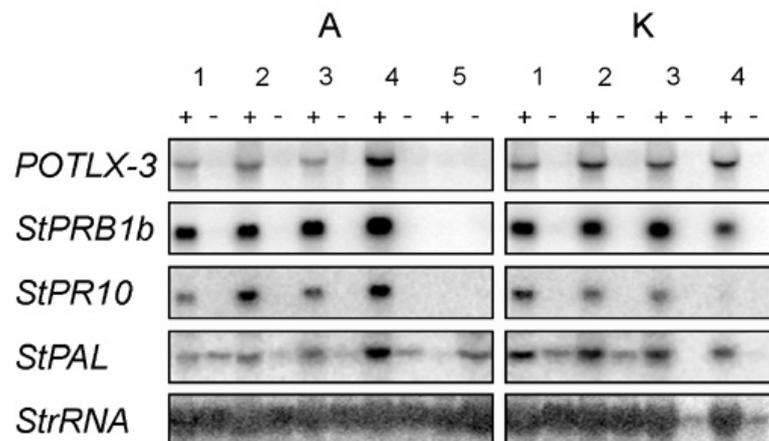
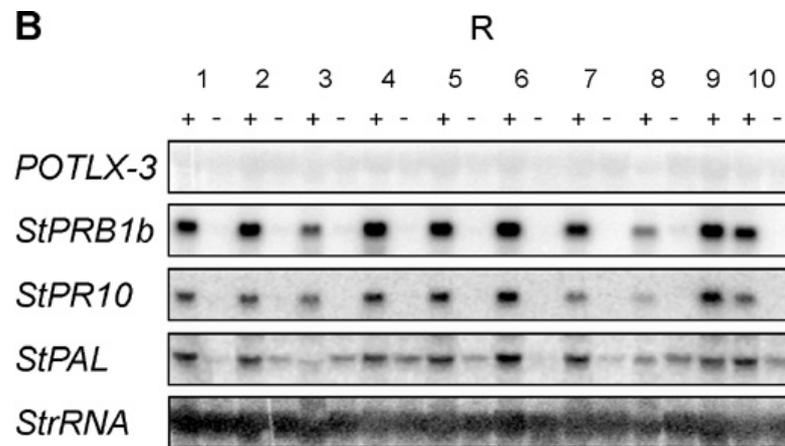
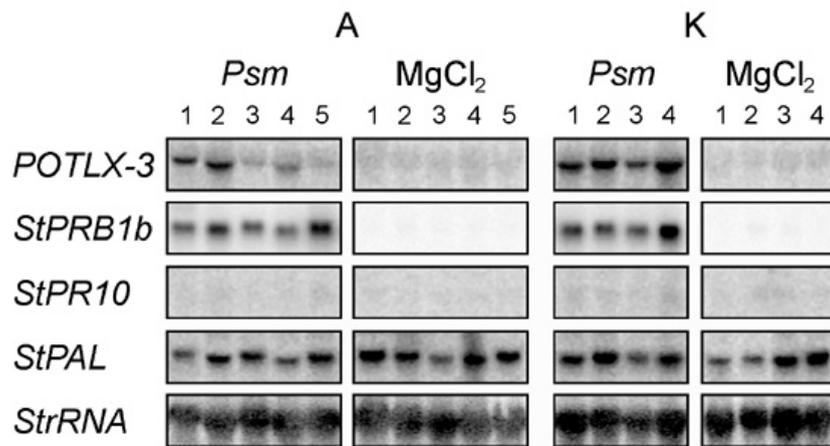
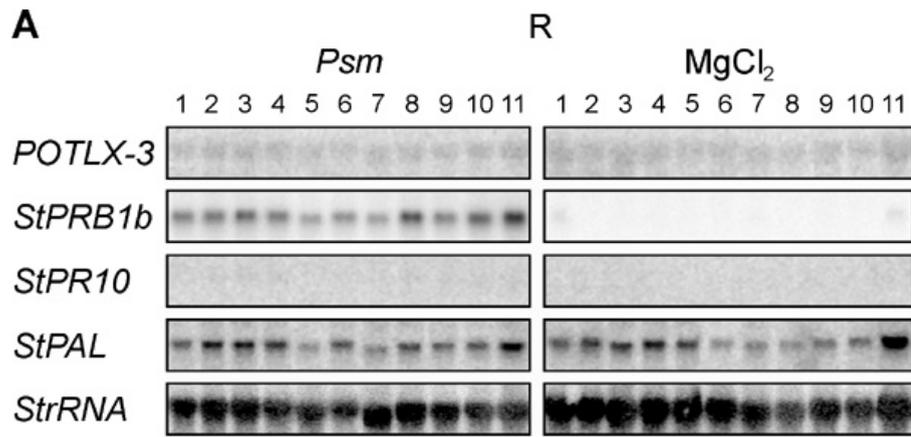
Die Untersuchung der Expression der POTLX-3 sowie von PR- und Abwehrgenen erfolgte anhand von Northern-Blot-Analysen, die mit Gesamt-RNA aus den inokulierten und unbehandelten Blättern der transgenen Pflanzen durchgeführt wurden (Abb. C-23).

**Abb. C-23: Northern-Blot-Analyse der Genexpression in Blättern transgener Pflanzen von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall.**

**A:** Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) bzw.  $MgCl_2$

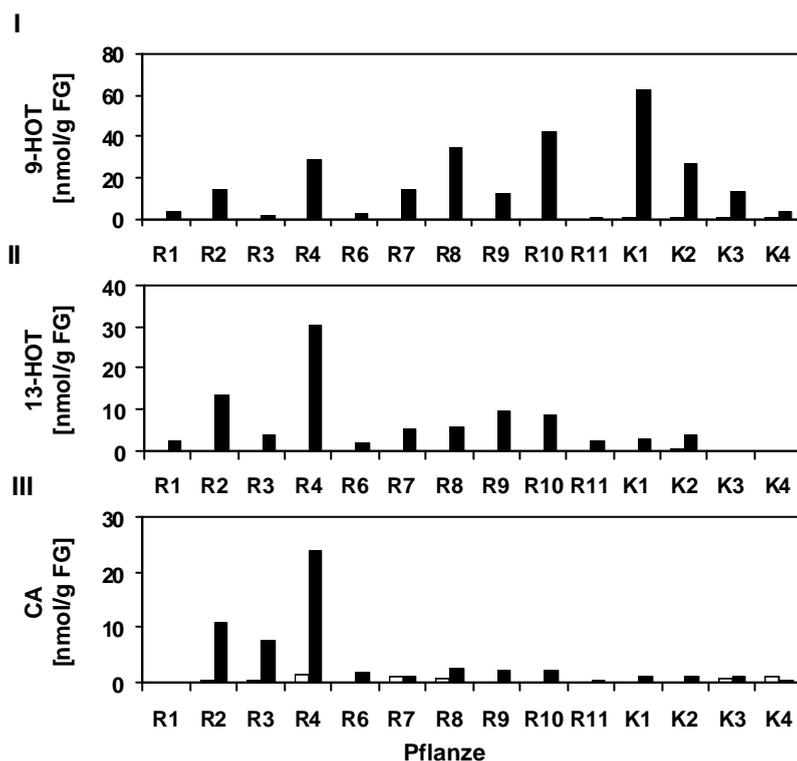
**B:** Inokulation mit *Phytophthora infestans* (+) bzw.  $H_2O$  (-)

Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial 48 h nach Infiltration mit *Psm* bzw.  $MgCl_2$  und 4 d nach Inokulation mit *P. infestans* bzw.  $H_2O$  aus RNAi- (R1-R11), POTLX-3as-Pflanzen (A1-A5) und Kontrollpflanzen (K1-K4) isoliert, je 20  $\mu g$  RNA in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit dem radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von POTLX-3, StPRB1b, StPR10, StPAL und St25SrRNA hybridisiert.



Durch die Transformation der Pflanzen mit dem RNAi-Konstrukt der POTLX-3 konnte das Gen dieser LOX ausgeschaltet werden, da keine POTLX-3-Transkripte in den RNAi-Pflanzen nach Pathogenbefall detektiert wurden. Im Gegensatz dazu akkumulierten die Transkripte der POTLX-3 in den POTLX-3as- und Kontrollpflanzen nach Pathogenbefall, wobei nach Transformation mit der *antisense*-Sequenz der POTLX-3 die transgene Pflanze A5 erhalten wurde, in der das POTLX-3-Gen ebenfalls ausgeschaltet wurde. In Korrelation mit der Nekrosebildung in allen Pflanzen nach Pathogenbefall akkumulierten die Transkripte der PR-Gene StPRB1b und StPR10 sowie des Abwehrgenes StPAL in den pathogenbehandelten Blättern. Nach Bakterieninfiltration erfolgte, wie bereits unter 2.1.1 beschrieben, keine Akkumulation der StPR10-Transkripte.

Da in den RNAi-Pflanzen nach dem Befall durch Pathogene Nekrosen ausgebildet wurden, obwohl die POTLX-3-Expression ausgeschaltet war, erfolgte eine HPLC-Analyse der Hydroxid- und Hydroperoxid-Derivate sowie der Divinylether, die aus LA und LnA im LOX-Reaktionsweg gebildet werden. Damit sollte überprüft werden, ob die Nekrosebildung mit einer Akkumulation von LOX-Metaboliten in den RNAi-Pflanzen korrelierte.



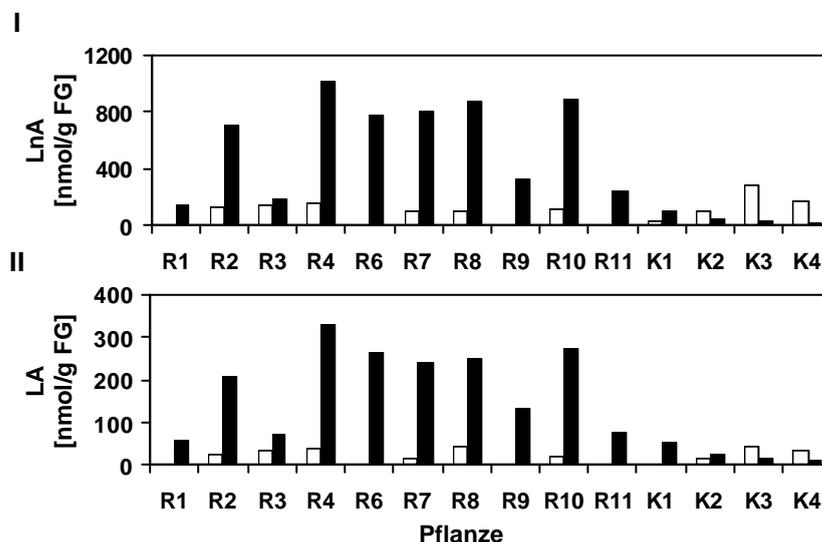
**Abb. C-24: Oxylinprofil in Blättern transgener Pflanzen von *S. tuberosum* nach Inokulation mit *P. infestans*.**

Der Gehalt an 9-HOT, 13-HOT und CA wurde mit HPLC-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial der RNAi- (R1-R11) und Kontrollpflanzen (K1-K4) 4d nach Inokulation mit *P. infestans* (schwarz) bzw. H<sub>2</sub>O (weiß) bestimmt.

9-HOT, 13-HOT und CA akkumulierten in den mit *P. infestans* für 4d inokulierten Blättern der Kontrollpflanzen im Vergleich zu den wasserbehandelten Blättern (Abb. C-24). Dabei war insbesondere der Gehalt an 9-HOT in den einzelnen Pflanzen sehr variabel (4

bis 62 nmol/g FG). In den pathogenbehandelten Blättern der RNAi-Pflanzen akkumulierte 9-HOT ebenfalls in einem mit den Kontrollpflanzen vergleichbaren Bereich (1 bis 43 nmol/g FG). Die CP-HPLC-Analyse der Enantiomere des detektierten 9HOT ergab, daß dieses in den RNAi-Pflanzen racemisch war, wohingegen in den Kontrollpflanzen mehr als 90 % des 9-HOT als S-Enantiomer vorkamen (Daten nicht gezeigt). Einige RNAi-Pflanzen enthielten außerdem ungewöhnlich hohe Mengen an 13-HOT und CA. So weist z. B. die transgene Pflanze R4 eine fünfzehnfach höhere Akkumulation an 13-HOT und fünfundzwanzigfach höhere Akkumulation an CA im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf. Die Kontrollpflanzen enthielten durchschnittlich 2 nmol/g FG an 13-HOT und 1 nmol/g FG an CA, die RNAi-Pflanzen dagegen zwischen 2 und 30 nmol/g FG an 13-HOT und zwischen 1 und 24 nmol/g FG an CA. 13-HOT war sowohl in den RNAi- als auch in den Kontrollpflanzen racemisch (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde der Gehalt an freien Fettsäuren durch GC-Analyse in den Blättern der RNAi- und Kontrollpflanzen nach Inokulation mit *P. infestans* bestimmt (Abb. C-25). Wie bereits für Wildtyp-Pflanzen in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, wurde auch in den Kontrollpflanzen keine erhöhte Akkumulation der freien Fettsäuren detektiert. Diese enthielten durchschnittlich 30 nmol/g FG an LA und 100 nmol/g FG an LnA. Im Gegensatz dazu akkumulierten in den RNAi-Pflanzen die freien Fettsäuren nach Inokulation mit *P. infestans*. Der Gehalt an LA stieg bis auf 330 nmol/g FG bzw. im Falle von LnA auf bis zu 1000 nmol/g FG in den pathogenbehandelten Blättern dieser Pflanzen an.



**Abb. C-25: Bestimmung der freien Fettsäuren in Blättern transgener Pflanzen von *S. tuberosum* nach Inokulation mit *P. infestans*.**

Der Gehalt an LnA und LA wurde mit GC-Analysen in Extrakten aus Blattmaterial der RNAi- (R1-R11) und Kontrollpflanzen (K1-K4) 4 d nach Inokulation mit *P. infestans* (schwarz) bzw. H<sub>2</sub>O (weiß) bestimmt.

## D Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung des LOX-Reaktionsweges an pflanzlichen Abwehrreaktionen untersucht. Dies geschah durch die Analyse der Korrelation zwischen LOX-Expression und den Metaboliten des LOX-Reaktionsweges während der Ausprägung von Abwehrreaktionen in Zellen und Blättern von *Solanum tuberosum* nach Pathogenbefall. Die Funktion der Metabolite des LOX-Reaktionsweges und die Konsequenzen der Expression einer pathogeninduzierten 9-LOX wurden mittels *gain of function*- und *loss of function*-Experimente analysiert.

### 1 Der LOX-Reaktionsweg in *S. tuberosum* nach Pathogenbefall

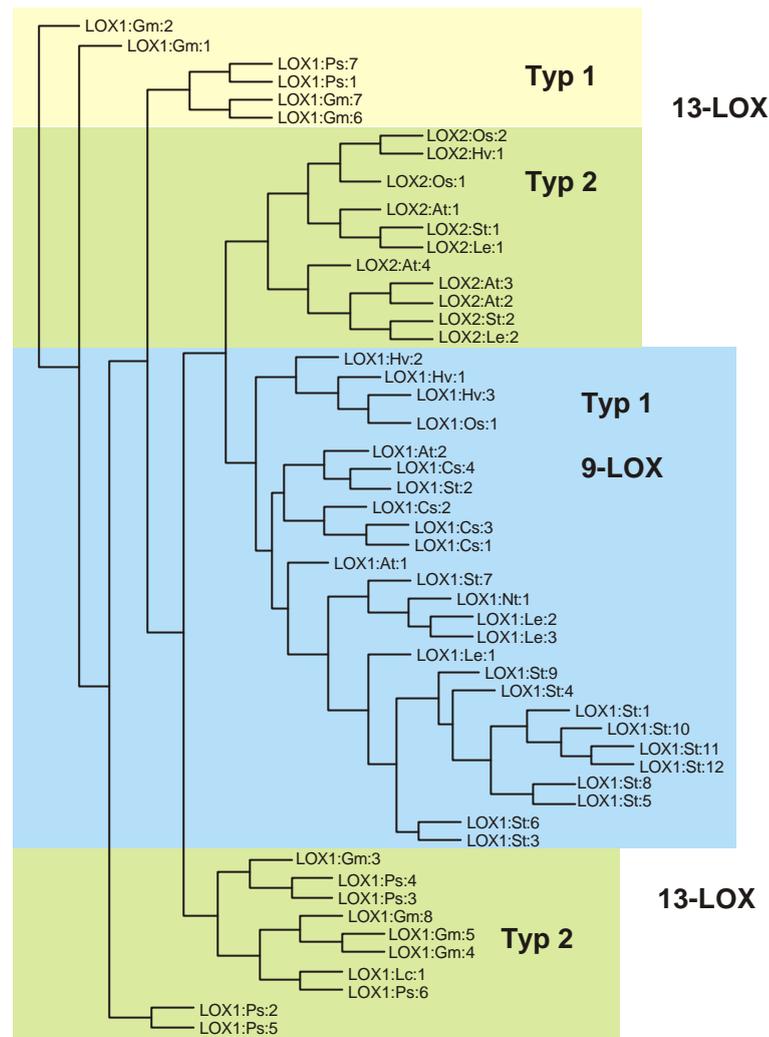
Im Verlauf der Pathogenese wird in zahlreichen Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen die Akkumulation von LOX-Transkripten beobachtet. Oft ist damit auch eine Stimulation von LOX-Aktivität verbunden (Übersicht in: Rosahl 1996; Slusarenko 1996). Die daraus resultierenden Hydroperoxid-Derivate der vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) und die davon abgeleitete Vielfalt an Oxylipinen, die in pathogenbefallenen Zellen gebildet werden, sind toxisch gegenüber den eindringenden Mikroorganismen, wirken als Signalmoleküle auf benachbarte Zellen oder aktivieren die Synthese von Phytoalexinen sowie PR-Proteinen (Übersicht in: Rosahl 1996; Slusarenko 1996; Blée 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde der LOX-Reaktionsweg in *S. tuberosum* nach Pathogenbefall durch parallele Kartierung der Expression mehrerer LOX-Isoformen, der Enzymaktivität und das daraus resultierende Metabolitenprofil analysiert.

Aufgrund des äußerst destruktiven Charakters der Kraut- und Knollenfäule besteht in der Phytopathologie ein großes Interesse an der Aufklärung der Wirt-Pathogen-Interaktion von *S. tuberosum* mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* (Govers *et al.* 1997). Die Interaktion der Zellen von *S. tuberosum* mit dem Kulturfiltrat von *P. infestans* stand zudem als etabliertes Modellsystem für Pflanzen zur Verfügung, mit dem die Aktivierung der Abwehrgenexpression nach Elicitorbehandlung bereits gezeigt war (Schmidt *et al.* 1998). Hiermit sollte ein erster umfassender Einblick in die Funktion des LOX-Reaktionsweges erhalten werden. Da mit diesem Modellsystem jedoch nur eingeschränkte Aussagen über die Situation *in planta* erhalten werden konnten, wurden für weiterführende Analysen des LOX-Reaktionsweges Pflanzen von *S. tuberosum* verwendet, die mit Zoosporen von *P. infestans* inokuliert wurden. Außerdem wurde die Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) untersucht, die ein System für Untersuchungen im Zusammenhang mit Nichtwirtsresistenzen darstellt und im Vergleich zur Interaktion mit *P. infestans* eine geringere Variabilität in der Ausprägung von Abwehrreaktionen aufweist.

## 1.1 Präferentielle Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges

Die umfassende Charakterisierung des LOX-Reaktionsweges verdeutlicht die bevorzugte Stimulierung von 9-LOX-Reaktionen in Zellen von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelektorpräparation von *P. infestans* und in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall. Diese verstärkte 9-LOX-Genexpression nach Elicitorzugabe bzw. Pathogeninfektion korreliert mit einer erhöhten 9-LOX-Enzymaktivität und einer Akkumulation von Metaboliten des 9-LOX-Reaktionsweges in den entsprechenden Zellen bzw. im Blattgewebe. In *Solanaceae* erfolgt damit anscheinend generell eine verstärkte Expression von 9-LOXen, was anhand mehrerer Untersuchungen in *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum* und *S. tuberosum* beschrieben worden ist. So wurde in Zellen und Pflanzen von *N. tabacum* nach Elicitorbehandlung bzw. nach Infektion mit *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (*Ppn*) die Transkriptakkumulation einer spezifischen 9-LOX (NtLOX1 bzw. LOX1:Nt:1) und die Stimulierung der 9-LOX-Aktivität gezeigt (Fournier *et al.* 1993; Véronési *et al.* 1996). In *S. tuberosum* ist inzwischen die Expression der knollenspezifischen PLOX1 (LOX1:St:11) beschrieben worden, die nach Infektion mit *P. infestans* und nach Behandlung mit dem Elicitor Arachidonsäure induziert wird (Fidantsef und Bostock 1998). In Blättern von *L. esculentum* wurde nach Mehltaubefall eine erhöhte 9-LOX-Aktivität gemessen (Kato *et al.* 1992). Im Gegensatz zu den *Solanaceae* werden in anderen Pflanzenspezies bevorzugt 13-LOXen nach Pathogenbefall induziert, wie z. B. in *Oryza sativa* (ORYSALOXC; LOX2:Os:1) nach Inokulation mit *Magnaporthe grisea* (Peng *et al.* 1994) und in *Phaseolus vulgaris* nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Croft *et al.* 1990). In *Arabidopsis thaliana* wird allerdings ebenfalls eine 9-LOX (AtLOX1; LOX1:At:1) nach Pathogenbefall induziert (Melan *et al.* 1993).

Charakteristisch für alle LOXen ist der hohe Homologiegrad ihrer Aminosäuresequenzen untereinander sowie ihr Vorkommen als größtenteils Multigenfamilien, wodurch die Unterscheidung einzelner Isoformen einer Pflanzenspezies erschwert wird. So kennt man z. B. aus *Glycine max* die vollständigen cDNAs für 8 Isoformen, und aus *L. esculentum* sind 5 Isoformen isoliert worden. In Abb. D-1 ist eine phylogenetische Analyse ausgewählter pflanzlicher LOXen dargestellt. In *S. tuberosum* sind sogar schon 12, zumeist vollständige cDNAs beschrieben worden, die für 9-LOXen kodieren und nur 2 für 13-LOXen. Im Falle der 9-LOXen sind diese meist in 95 % ihrer Nukleotidsequenzen zueinander identisch. Eine Ausnahme bildet dabei die erst kürzlich beschriebene POTLX-3 (LOX1:St:7), deren Transkripte nach Behandlung mit Ethylen und MeJA sowie nach Infektion mit *P. infestans* in Blättern von *S. tuberosum* akkumulieren (Kolomiets *et al.* 2000). Diese 9-LOX besitzt nur etwa 80 % Identität auf der Sequenzebene zu anderen 9-LOX-Isoformen aus *S. tuberosum*.



**Abb. D-1: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher LOXen.**

Die Analyse wurde mit dem Programm phylip 3.5 durchgeführt. Die verwendeten Bezeichnungen der Proteine sind auf die entsprechenden *accession numbers* in der Datenbank bezogen. Zur Vereinfachung wurden die Sequenzen nur bestimmter Pflanzenspezies verwendet und diese teilweise nach der Nomenklatur von Shibata *et al.* (1994) umbenannt: *Arabidopsis thaliana*: LOX1:At:1 (AtLOX1, Q06327), LOX2:At:1 (AtLOX2, P38418), LOX2:At:2 (AtLOX3, AAF79461), LOX2:At:3 (AtLOX4, AAF21176), LOX1:At:2 (AtLOX5, CAC19365), LOX2:At:4 (AtLOX6, AAG52309); *Cucumis sativus*: LOX1:Cs:1 (AAC61785), LOX1:Cs:2 (CsULOX, AAA79186), LOX1:Cs:3 (CsLBLOX, CAA63483), LOX1:Cs:4 (CAB83038); *Glycine max*: LOX1:Gm:1 (Soybean LOX1, AAA33986), LOX1:Gm:2 (Soybean LOX2, AAA33987), LOX1:Gm:3 (Soybean LOX3, CAA31664), LOX1:Gm:4 (Soybean vlxa, BAA03101), LOX1:Gm:5 (Soybean vlxb, AAB67732), LOX1:Gm:6 (Soybean vlxc, AAA96817), LOX1:Gm:7 (Soybean vlxd, S13381), LOX1:Gm:8 (Soybean vlxe, AAC49159); *Hordeum vulgare*: LOX1:Hv:1 (HvLOXA, Barley LOXA, AAA64893), LOX1:Hv:2 (HvLOXB, Barley LOXB, AAB60715), LOX1:Hv:3 (HvLOXC, Barley LOXC, AAB70865), LOX2:Hv:1 (HvLOX1, AAC12951); *Lycopersicon esculentum*: LOX1:Le:1 (tomLOXA, P38415), LOX1:Le:2 (tomLOXB, P38416), LOX1:Le:3 (tomLOX-tox, AAG21691), LOX2:Le:1 (tomLOXC, AAB65766), LOX2:Le:2 (tomLOXD, AAB65767); *Nicotiana tabacum*: LOX1:Nt:1 (NtLOX, S57964); *Oryza sativa*: LOX1:Os:1 (CAA45738), LOX2:Os:1 (ORYSALOX, BAA03102), LOX2:Os:2 (OsLOX, CAC01439); *Pisum sativum*: LOX1:Ps:1 (AAB71759), LOX1:Ps:2 (CAA55318), LOX1:Ps:3 (CAA55319), LOX1:Ps:4 (Pea LOX, CAA30666), LOX1:Ps:5 (Pea LOX2, CAA34906), LOX1:Ps:6 (Pea LOXG, CAA53730), LOX1:Ps:7 (CAC04380); *Solanum tuberosum*: LOX1:St:1 (SOLTULOX1, S44940), LOX1:St:2 (STLOX, AAD09202), LOX1:St:3 (StLOX1, S73865), LOX1:St:4 (CAA64766), LOX1:St:5 (CAA64765), LOX1:St:6 (POTLX-2, AAB67860), LOX1:St:7 (POTLX-3, AAB67865), LOX1:St:8 (POTLX-1, AAB67858), LOX1:St:9 (AAD04258), LOX1:St:10 (pLOX2, AAB81595), LOX1:St:11 (pLOX1, AAB81594), LOX1:St:12 (CAB65460), LOX2:St:1 (StLOXH1, CAA65268), LOX2:St:2 (StLOXH3, CAA65269). Diese Abbildung wurde von PD Dr. I. Feußner (IPK, Gatersleben) zur Verfügung gestellt.

In dem phylogenetischen Stammbaum der pflanzliche LOXen werden Typ 1- und Typ 2-LOXen sowie weiterhin 9 und 13-LOXen in separaten Gruppen eingeordnet. Im Falle der 9-LOXen vom Typ 1 ist auffällig, daß POTLX-3 nicht in der Gruppe der für Knollen spezifischen 9-LOXen von *S. tuberosum* erscheint, die aufgrund ihrer Vielzahl sogar als Marker in der Züchtung von Kartoffelsorten verwendet werden (Bachem *et al.* 1996). Die POTLX-3 hingegen besitzt eine sehr hohe Sequenzidentität zur pathogeninduzierten NtLOX1. Zur Charakterisierung des Expressionsprofils der 9-LOX-Isoformen nach Pathogenbefall wurde die Restriktionsanalyse 9-LOX-spezifischer Fragmente durchgeführt (Abb. C-19), die erstmalig verdeutlicht, daß nicht, wie bisher vermutet, knollenspezifische 9-LOX-Isoformen sondern die POTLX-3 nach Pathogenbefall verstärkt exprimiert wird. Dementsprechend wurde wahrscheinlich auch in den Zellen von *S. tuberosum* aufgrund einer Kreuzhybridisierung von StLOX1- und POTLX-3-Transkripten die verstärkte Expression der POTLX-3 nach Elicitorbehandlung detektiert.

Im Gegensatz zu den bereits intensiv untersuchten Produkten des 13-LOX-Reaktionsweges, wie z. B. den Jasmonaten und C<sub>6</sub>-Aldehyden (Wasternack und Parthier 1997; Blée 1998), sind die Funktionen der 9-LOX-Produkte bei Abwehrreaktionen bisher nur wenig beschrieben worden. Eine zentrale Rolle scheinen hier die Divinylether zu spielen. Ihr Vorkommen in höheren Pflanzen ist bisher nur in 3 Arten gezeigt worden, in *Allium sativum*, *L. esculentum* und *S. tuberosum* (Grechkin 1998). Darüberhinaus sind inzwischen cDNA-Klone, die für Divinylether-Synthasen kodieren, aus *L. esculentum* und *S. tuberosum* charakterisiert worden (Itoh und Howe 2001; Stumpe *et al.* 2001). Die Divinylether CA und CnA sind die Produkte des 9-LOX-Reaktionsweges und akkumulieren in Zellen und in Blättern von *S. tuberosum* nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans* bzw. nach Pathogenbefall. Eine Akkumulation dieser Verbindungen wurde auch von Weber *et al.* (1999) nach Inokulation mit *P. infestans* beschrieben, wobei die susceptible Sorte Bintje verwendet wurde. Diese weist im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten, gleichfalls susceptible Sorte Désirée eine 6- bzw. 20fach höhere Akkumulation der Divinylether auf. Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Sorten von *S. tuberosum*, der verwendeten Analysemethoden, Unterschieden im Alter der verwendeten Pflanzen oder ihren Anzuchtbedingungen. Es wurde von Weber *et al.* (1999) weiterhin gezeigt, daß die Divinylether CA und CnA inhibierend auf das Wachstum und die Sporenkeimung von *P. infestans* wirken (Weber *et al.* 1999). Diese Befunde wiesen erstmals auf eine Funktion dieser Produkte des 9-LOX-Reaktionsweges als antimikrobielle Substanzen hin. Die Charakterisierung des DES-Reaktionsweges auf der Ebene der Transkripte und der Enzymprodukte in der vorliegenden Arbeit zeigt, daß sowohl die StDES1-Transkripte als auch die Produkte dieses Enzyms, das durch das StDES1-Gen kodiert wird, nach Pathogenbefall akkumulieren. Dabei ist auffällig, daß die Transkriptmengen der StDES1 bereits unterhalb der Nachweisgrenze liegen, wenn die

Akkumulation der Divinylether beginnt (Abb. C-9 versus Abb. C-10). Wahrscheinlich ist die Translation der StDES1-mRNA oder die Aktivierung der DES-Enzymaktivität in bezug auf die Transkriptakkumulation der StDES1 zeitlich verzögert, was durch Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern und Messung der Enzymaktivität genauer geklärt werden könnte.

Weitere Metabolite des 9-LOX-Reaktionsweges, deren Funktionen bei Abwehrreaktionen in Pflanzen noch sehr wenig analysiert sind, stellen die Produkte des EAS-Reaktionsweges dar, die Trihydroxide der LA und LnA. Vor kurzem wurde das Vorkommen dieser Oxylipine in Blättern von *S. tuberosum* beschrieben (Hamberg 1999). Die Akkumulation dieser Verbindungen nach Pathogenbefall in *S. tuberosum* wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt (Abb. C-4 und C-9). Auch für diese Oxylipine wird eine Funktion als antimikrobielle Substanzen diskutiert, da (9S,10E,12S,13S)-9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure, die in *Oryza sativa* nach Infektionen mit *M. grisea* akkumuliert, wachstumsinhibierend auf dieses Pathogen wirkt (Kato *et al.* 1983; Kato *et al.* 1985). Desweiteren wurde (10E)-9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure als eine antifungale Verbindung in Knollen von *Colocasia antiquorum* beschrieben, die mit *Ceratocystis fimbriata* infiziert waren (Masui *et al.* 1989). Da die Produkte des EAS-Reaktionsweges unter den hier untersuchten Metaboliten des LOX-Reaktionsweges die Oxylipine darstellen, die in Blättern von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall hauptsächlich akkumulieren, ist eine genauere Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung dieser Trihydroxide bei der Pathogenabwehr in *S. tuberosum* von großer Bedeutung. Ein weiterer Metabolit des 9-LOX-Reaktionsweges wurde kürzlich ebenfalls in *S. tuberosum* gefunden. Dies ist (15Z)-10-Oxo-11,15-phytydiensäure, ein Regioisomer der 12-Oxo-PDA (Hamberg 2000), die in weiteren Analysen ebenso noch analysiert werden muß.

## 1.2 Charakterisierung des 13-LOX-Reaktionsweges

Obwohl die Transkripte einer 13-LOX (StLOX3) in Zellen von *S. tuberosum* nach Elicitorbehandlung akkumulieren, korreliert dies weder mit einem Anstieg der 13-LOX-Aktivität noch mit einer Akkumulation von Metaboliten des 13-LOX-Reaktionsweges, wie z. B. 13-HOD bzw. 13-HOT, JA und C<sub>6</sub>-Aldehyden. Im Gegensatz dazu reagieren Zellen zahlreicher anderer Pflanzenspezies auf Elicitorbehandlung mit der Akkumulation von JA und deren Vorstufe 12-Oxo-PDA (Parchmann *et al.* 1997). So induziert die Behandlung von Tabakzellen mit einem Elicitor aus *Ppn* einen schnellen und transienten Anstieg von JA (Rickauer *et al.* 1997). Da in der vorliegenden Arbeit keine 13-LOX-Produkte in zwei unabhängig erzeugten Zellkulturen von *S. tuberosum* bestimmt wurden, ist das Fehlen der 13-LOX-Aktivität und die Abwesenheit von 13-LOX-Produkten vermutlich kein Artefakt der verwendeten Zellkulturen.

Einige Pathogene verursachen Veränderungen im JA-Gehalt der befallenen Pflanzen, wie z. B. der Pilz *Alternaria brassicicola* in *A. thaliana* (Penninckx *et al.* 1996). In der

resistenten Sorte Matilda von *S. tuberosum* wurde 3d nach Inokulation mit *P. infestans* jedoch kein signifikanter Unterschied des JA-Gehaltes der pathogenbehandelten Blätter im Vergleich zu Kontrollblättern beschrieben (Weber *et al.* 1999). Obwohl die Transkripte der StLOX3 in Blättern der suszeptiblen Sorte Désirée nach Inokulation mit *P. infestans* akkumulieren, wurde ein Anstieg des JA-Gehaltes in diesen Blättern nicht reproduzierbar nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich wird der 13-LOX-Reaktionsweg in *S. tuberosum* nach Inokulation mit *P. infestans* bzw. nach Behandlung mit der Rohelicitorpräparation aus *P. infestans* nicht aktiviert. Möglich ist auch, daß Aminosäurekonjugate der JA akkumulieren, die z. B. in *Hordeum vulgare* die Expression von Abwehrgenen induzieren (Kramell *et al.* 1997). Diese konnten aber mit der in dieser Arbeit verwendeten Analysemerhode nicht detektiert werden.

Lediglich nach Infiltration mit *Psm* wurde in den Blättern von *S. tuberosum* eine Akkumulation von Jasmonsäure (JA) detektiert (Abb. C-9). Über eine Beteiligung der Jasmonate bei der Pathogenantwort in *Solanaceae* ist nur wenig bekannt, wohingegen die JA- und wundinduzierte Signaltransduktion sowie Genexpression sehr gut untersucht wurde (Ryan 2000; León *et al.* 2001). Die wundinduzierte Expression der StLOX2- und StLOX3-Gene in *S. tuberosum* läßt auf eine Beteiligung dieser 13-LOXen bei der Wundantwort schließen (Royo *et al.* 1996). Transgene Pflanzen von *S. tuberosum*, die geringere Mengen der StLOX3 oder der nachgeschalteten 13-HPL exprimieren, sind anfälliger gegenüber Insektenbefall (Royo *et al.* 1999; Vancanneyt *et al.* 2001).

Bei der Bestimmung der Hydroxyfettsäuren in Blättern von *S. tuberosum* muß allerdings berücksichtigt werden, daß methodisch bedingt keine Unterscheidung der 9- und 13-Hydroxid-Derivate möglich war, da die Regioisomere in der GC/MS-Analyse nahezu identische Retentionszeiten haben und in Ionenfragmente mit gleichen Masse/Ladungsquotienten ( $m/z$ ) fragmentieren. Parallel dazu waren aber auch HPLC-Analysen durchgeführt worden, die verdeutlichten, daß in den Blättern von *S. tuberosum* keine 13-Hydroxid-Derivate nach Pathogenbefall akkumulieren (Daten nicht gezeigt).

In Blättern von *S. tuberosum* und *A. thaliana* akkumuliert nach Verwundung neben 12-Oxo-PDA und JA auch Dinor-oxo-PDA, das cyclopentenhaltige Derivat einer Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen und 3 Doppelbindungen (Weber *et al.* 1997). Dinor-oxo-PDA wird ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der Wundantwort zugesprochen. Da die Bedeutung dieses Oxylipins bei Abwehrreaktionen jedoch noch völlig ungeklärt ist, müßte eine Untersuchung in pathogenbehandelten Blättern erfolgen.

### 1.3 Bereitstellung der LOX-Substrate

Nach Elicitorbehandlung akkumulieren in Zellen von *S. tuberosum* hauptsächlich jene Oxylipine, die aus der Umsetzung von LA resultieren (Abb. C-4). Die im Dunkeln kultivierten Zellen entsprechen dem Stoffwechselstatus von etiolierem Gewebe und enthalten somit große Mengen an Proplastiden, die bis zu 90 % aus Phospholipiden bestehen und damit vor allem LA beinhalten (Gunstone 1992). Im Gegensatz dazu stellen

Blätter photosynthetisch aktive Gewebe dar. Hier sind die dominierenden Membranen jene der vollständig differenzierten Chloroplasten, die Thylakoide, die zum Großteil aus Galactolipiden bestehen (Joyard *et al.* 1994). Dementsprechend akkumulieren in den Blättern von *S. tuberosum*-Pflanzen nach Pathogenbefall vor allem LnA-Derivate.

Die Überexpression verschiedener LOXen in transgenen Pflanzen von *N. tabacum*, die keine bzw. nur eine geringe Änderung der Mengen an LOX-Metaboliten im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen aufweisen, verdeutlicht die Bedeutung der Bereitstellung der LOX-Substrate für die Aktivierung des LOX-Reaktionsweges (Deng *et al.* 1992; Hause *et al.* 2000). Aus diesem Grunde wurden zwei Reaktionen untersucht, die zur Bereitstellung von LOX-Substraten beitragen können. Dazu war zum einen ein cDNA-Fragment aus RNA von elicitorbehandelten Zellen hergestellt worden, mit dem die Expression von  $\Delta^{12}$ -Acyl-Lipid-Desaturasen ( $\Delta^{12}$ -FAD) charakterisiert wurde, die die Bildung von LA aus Ölsäure katalysieren (Heinz 1993). Das Besondere an dieser Reaktion ist, daß sie mit Fettsäuren erfolgt, die an der *sn2*-Position von Phosphatidylcholin (PC) im endoplasmatischen Retikulum verestert sind. In Zellen wie auch in Blättern von *S. tuberosum* akkumulieren nach Elicitorbehandlung bzw. Pathogenbefall die  $\Delta^{12}$ -FAD-Transkripte (Abb. C-5 und C-12). Eine ebenfalls transiente, aber im Vergleich zu *S. tuberosum* wesentlich schnellere Akkumulation von  $\Delta^{12}$ -FAD-Transkripten wurde in Zellen von *Petroselinum crispum* nach Elicitorbehandlung beschrieben (Kirsch *et al.* 1997). Die Funktion einer  $\omega^3$ -FAD, die die Umsetzung von LA zu LnA bei der pflanzlichen Antwort auf Insektenbefall katalysiert, wurde anhand transgener Pflanzen von *S. tuberosum* verdeutlicht. Die Expression von *antisense*-Sequenzen dieser  $\omega^3$ -FAD bewirkt die drastische Reduktion des LnA- und JA-Gehaltes dieser Pflanzen, was mit einer verminderten Expression des Proteinase-Inhibitors II nach Verwundung korreliert (Martín *et al.* 1999). Die Akkumulation von Proteinase-Inhibitoren wird normalerweise durch Insektenfraß, mechanische Verwundung und Oligosaccharide induziert und stellt einen Schutz des nicht infizierten Gewebes gegenüber Serinproteinasen herbivorer Insekten dar (Ryan 1987; Farmer und Ryan 1990).

Die Bedeutung von Desaturasen bei der Pathogenantwort wurde auch durch Mutantenanalysen in *A. thaliana* gezeigt. Diese wurden bei der Suche nach Suppressoren SA-abhängiger Abwehrreaktionen charakterisiert (Kachroo *et al.* 2001). Der positive Regulator NPR1 wurde anhand von *npr1*-Mutanten beschrieben, die keine SAR und PR-Genexpression nach Behandlung mit SA und anderen SAR-induzierenden Verbindungen ausprägen (Durner *et al.* 1997). Die Überexpression von NPR1 erhöht die Resistenz von *A. thaliana* gegenüber verschiedenen Pathogenen (Cao *et al.* 1998). Demgegenüber weist die *npr1*-Suppressor-Mutante *ssi2* einen NPR1-unabhängigen Reaktionsweg auf, der zur konstitutiven PR-Genexpression, spontaner Nekrosebildung und einer verstärkten Resistenz gegenüber *Peronospora parasitica* führt. Außerdem kommt es in dieser Mutante zu einer Verminderung JA-regulierter Abwehrreaktionen, wie Defensin-Genexpression und Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*. Da SSI2 als eine Stearoyl-ACP-Desaturase

charakterisiert wurde, deutet dies ebenfalls daraufhin, daß von Fettsäuren abgeleitete Signale bei der Vermittlung zwischen verschiedenen Signaltransduktionsketten beteiligt sein können (Kachroo *et al.* 2001), was weiter unten ausführlicher diskutiert wird.

Zur weiteren Untersuchung der Bereitstellung von Substrat für die LOX-Reaktion nach Pathogenbefall wurde die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) bestimmt, die die Freisetzung von Fettsäuren aus der *sn2*-Position von PC in das Cytosol katalysiert. Eine PLA<sub>2</sub>-Aktivierung wurde in den Zellen von *S. tuberosum* nach Elicitorbehandlung detektiert (Abb. C-6) und ist gleichermaßen an der Antwort der Knollen von *S. tuberosum* auf *P. infestans* sowie der Zellen von *N. tabacum* auf *Ppn* beteiligt (Kawakita *et al.* 1993; Roy *et al.* 1995). Demgegenüber wurde hier in den Blättern von *S. tuberosum* keine Induktion einer PLA<sub>2</sub>-Aktivität nachgewiesen. Andererseits ist diese Enzymaktivität Bestandteil der Wundantwort in Blättern von *L. esculentum* (Narváez-Vásquez *et al.* 1999). Da die PUFAs von Blättern zum Großteil in Mono- und Digalactosyldiacylglyceriden der chloroplastidären Thylakoidmembranen lokalisiert sind, können sie demnach auch aus diesen Lipiden freigesetzt werden.

Obwohl in Zellen von *S. tuberosum* eine Aktivierung von substratbereitstellenden Reaktionen bestimmt wurde, konnten keine signifikanten Veränderungen der Mengen freier PUFAs beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch in Blättern von *S. tuberosum* akkumulieren nach Inokulation mit *P. infestans* keine freien PUFAs (Daten nicht gezeigt). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die LOX-Substrate in dieser Interaktion vollständig metabolisiert werden. Andererseits wurde nach Bakterieninfiltration eine Akkumulation sowohl von freier LA als auch LnA detektiert, der die Transkriptakkumulation der  $\Delta^{12}$ -FAD zeitlich vorgelagert ist, die zur Synthese dieser LOX-Substrate beiträgt (Abb. C-11 und C-12). Aufgrund der massiven Akkumulation von Oxylipinen während der Ausprägung dieser Nichtwirtsresistenz könnte es zu einer besonders starken Aktivierung von Reaktionen, die an der Bereitstellung der LOX-Substrate beteiligt sind, und somit in dieser Situation zu einer nachweisbaren Akkumulation der freien PUFAs kommen.

## 2 Der LOX-Reaktionsweg während der Ausprägung von Nekrosen

Eine der frühesten pflanzlichen Reaktionen auf Elicitorbehandlung oder Pathogenbefall ist der *oxidative burst*, die rasche extrazelluläre Synthese von ROS (Wojtaszek 1997), die verschiedene Funktionen während der Ausprägung von Abwehrreaktionen besitzt. Insbesondere Wasserstoffperoxid, das an der oxidativen Vernetzung von Zellwandproteinen beteiligt ist, führt zur Verstärkung der Zellwände, wodurch diese resistenter gegenüber proteolytischen Enzymen phytopathogener Organismen werden (Bradley *et al.* 1992). Die ROS wirken außerdem direkt toxisch auf das Pathogen (Mehdy 1994) und sind als sekundäre Signalmoleküle bei der Aktivierung von Abwehrgenen beteiligt (Ebel und Mithöfer 1998). Die ROS-Bildung ist ein

charakteristisches Merkmal der HR (Lamb und Dixon 1997), obwohl eine direkte Induktion des pflanzlichen Zelltodes durch ROS nicht bewiesen ist.

Oxidationsreaktionen von PUFAs während der Ausprägung der HR erzeugen irreversible Schäden in Zellmembranen, die zum massiven Verlust an Elektrolyten und somit zur schnellen Zerstörung des pflanzlichen Gewebes führen (Keppler und Nowacky 1986). Besonders aufgrund der Bildung von Radikalen, verursacht durch die Hydroperoxid-Derivate der PUFAs, werden Kettenreaktionen ausgelöst, die die autokatalytische Degradation von Lipiden bewirken (Porter *et al.* 1995). Neben Wasserstoffperoxid wurde eine entscheidende Bedeutung von Superoxidanionen in Kotyledonen von *Cucumis sativus* nach Infiltration mit einem avirulenten Stamm von *P. syringae* gezeigt, da nach Zugabe von Superoxiddismutase das Ausmaß der Lipidperoxidation und der Membranschäden reduziert ist (Keppler und Novacky 1987). Weiterhin bewirken Antioxidantien eine verminderte Lipidperoxidation und verzögerte Ausprägung der HR in *N. tabacum* nach Behandlung mit *P. syringae* pv. *syringae* (Ádám *et al.* 1989). In verschiedenen *Solanum*-Spezies ist die ROS-Bildung in suszeptiblen Zellen intensiver und von längerer Dauer im Vergleich zu resistenten Zellen, und auch die Lipidperoxidation ist am auffälligsten in den suszeptiblen Zellen ausgeprägt (Polkowska-Kowalczyk und Maciejewska 2001).

Die Lipidperoxidation kann neben einer unspezifischen Bildung durch ROS auch durch enzymatische Prozesse ausgelöst werden, die durch LOXen katalysiert werden (Keppler und Novacky 1987). So korreliert die erhöhte LOX-Aktivität mit Membranschädigungen in Blättern von *P. vulgaris* nach Infiltration mit einem avirulenten Stamm von *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Croft *et al.* 1990). Bei der Nichtwirt-Pathogen-Interaktion von *Triticum aestivum* mit *Puccinia coronata avenae* ist während der HR-Ausprägung die LOX-Aktivität erhöht, die auch in der kompatiblen Interaktion mit *Puccinia graminis tritici* nicht vor Sporulationsbeginn dieses Pilzes ansteigt (Ocampo *et al.* 1986). Da die LOX-Aktivität zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Entstehung von Lipidperoxid-Radikalen beitragen kann, ist es auch möglich, daß LOXen die nicht enzymatische Peroxidation von Membranlipiden auslösen (Croft *et al.* 1990). Ähnliche Prozesse werden auch im Verlauf der Blattseneszenz beobachtet (Berger *et al.* 2001).

In *N. tabacum* induziert Cryptogein, ein Elicitin aus *Phytophthora cryptogea*, eine ROS-Bildung, die mit der Ausprägung der HR und Expression von Abwehrgenen einhergeht (Ricci *et al.* 1989; Rustérucchi *et al.* 1996). In zeitlicher Korrelation mit der Nekrosebildung erfolgt wiederum in den mit Cryptogein behandelten Blättern die Stimulierung einer 9-LOX-Aktivität und damit verbunden eine massive Akkumulation von Hydroperoxid-Derivaten (Rustérucchi *et al.* 1999). Durch die Untersuchung der Regio- und Enantiomerelektivität dieser Fettsäurederivate konnte zwischen Autoxidationsprodukten und Metaboliten der LOX-Reaktion unterschieden werden. Trotz nicht ganz

eindeutiger Ergebnisse wird eine Beteiligung der 9-LOX-abhängigen Lipidperoxidation an der Entwicklung von Nekrosen in *N. tabacum* zumindest diskutiert (Rustérucci *et al.* 1999).

In *S. tuberosum* erfolgt die Transkriptakkumulation von 9-LOXen eindeutig parallel zur Nekroseentstehung nach Pathogenbefall bzw. zur Verbräunung der Zellen nach Elicitorbehandlung (Abb. C-1 und C-7). Der Anstieg der 9-LOX-Aktivität und von Metaboliten des 9-LOX-Reaktionsweges beginnen ebenfalls parallel zur Ausprägung der Nekrosen. Auch erfolgt in den Sorten von *S. tuberosum* mit erhöhter Basisresistenz eine starke Akkumulation von 9-LOX-Metaboliten, die mit der Akkumulation in der suszeptiblen Sorte Désirée vergleichbar ist, wenn diese Feldresistenz durch *P. infestans* durchbrochen wird und die Blätter dieser Pflanzen absterben. Desweiteren lösen die durch Eosin unabhängig von einem Pathogenbefall induzierten Nekrosen eine Akkumulation von Metaboliten des 9-LOX-Reaktionsweges aus (Abb. C-15). Hier ist allerdings bemerkenswert, daß erstmals eine spezifische Akkumulation von Produkten des Reduktase- und EAS-Reaktionsweges gezeigt wurde, während die Metabolite des DES-Reaktionsweges spezifisch für Reaktionen auf Pathogenbefall zu sein scheinen. Diese Zusammenhänge deuten auf eine Korrelation zwischen dem Absterben der pflanzlichen Zellen und der LOX-Expression. Da die durch Eosininfiltration induzierte Nekrosebildung jedoch von einer Aktivierung der Abwehrgenexpression begleitet ist (Daten nicht gezeigt), kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Akkumulation von Oxylipinen eine Folge- bzw. Begleiterscheinung der Induktion der Abwehrreaktionen ist. Unabhängig davon ist aber für die den 9-LOXen homologen 5-LOXen bei Vertebraten eine Beteiligung an der Auslösung von apoptotischen Prozessen gezeigt worden (Ding *et al.* 1999; Ghosh und Myers 1999).

## **2.1 Korrelation zwischen Nekrosebildung und SA-abhängiger Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges nach Pep13-Infiltration in nahG-Pflanzen**

Mit dem Oligopeptidelicitor Pep13 stand ein definiertes Elicitormolekül für *S. tuberosum* zur Verfügung, um eine Korrelation zwischen Nekrosebildung und Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges untersuchen zu können. Pep13 ist ein Peptid von 13 Aminosäuren und stammt aus einem Glykoprotein von 42 kDa aus *Phytophthora sojae*. Der Sequenzabschnitt von Pep13 ist hinreichend und notwendig für die Elicitoraktivität des 42 kDa-Proteins gegenüber *P. crispum* (Nürnberger *et al.* 1994). Dieses Oligopeptid, das Glykoprotein und eine Rohelicitorpräparation aus der Zellwand von *P. sojae* sind in der Lage, alle Abwehrreaktionen mit Ausnahme des lokalen Zelltodes und der Bildung von Kallose in Zellen und Protoplasten von *P. crispum* auszulösen, die auch die Zoosporen von *P. sojae* in Pflanzen induzieren (Dangl *et al.* 1987; Nürnberger *et al.* 1994; Hahlbrock *et al.* 1995). Dazu gehören die gesteigerte Aktivität hydrolytischer Enzyme (Kombrink und Hahlbrock 1986) und die Transkriptakkumulation von Genen, die für Enzyme des generellen Phenylpropanstoffwechsels (Chappell und Hahlbrock 1984), für PR-Proteine (Somssich *et al.* 1986) und für Enzyme der Furanocumarinsynthese (Scheel

*et al.* 1986) kodieren. Die Elemente des Signaltransduktionsweges, der nach Bindung von Pep13 an einen monomeren Plasmamembranrezeptor von 100 kDa (Nennstiel *et al.* 1998) zur Aktivierung der Abwehrgene führt, sind bereits intensiv untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, daß transiente Ionenflüsse ( $H^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Einstrom,  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ausstrom), die Akkumulation von ROS und der anhaltende Anstieg des cytoplasmatischen Kalziums essentiell für die Aktivierung der PR-Genexpression und Phytoalexinsynthese sind (Nürnberg *et al.* 1994; Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Blume *et al.* 2000). Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom ist außerdem notwendig für die Aktivierung mehrerer MAP-Kinasen (Scheel *et al.* 2000). Dabei wurde für eine der untersuchten MAP-Kinasen nach der Aktivierung ein Transport in den Zellkern nachgewiesen, was auf eine Beteiligung an der Regulation von Transkriptionsfaktoren hindeutet (Ligterink *et al.* 1997).

Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Pflanzenarten führt die Infiltration von Pep13 in *S. tuberosum* zur Ausbildung von Nekrosen (Geiler 2001). Die Pep13-Behandlung der Zellen von *S. tuberosum* bewirkt außerdem die Aktivierung der Abwehrgenexpression, die von einem Anstieg des Wasserstoffperoxid-Gehaltes und einer Alkalinisierung des Kulturmediums begleitet wird (Geiler 2001). Weiter konnte gezeigt werden, daß Pep13 die Akkumulation von Metaboliten des 9-LOX-Reaktionsweges induziert (Abb. C-16). In transgenen *nahG*-Pflanzen hingegen, die das bakterielle Gen für eine Salicylathydroxylase exprimieren, wird die Abwehrgenexpression unabhängig von einer Nekrosebildung und einer Akkumulation von Metaboliten des 9-LOX-Reaktionsweges nach Pep13-Infiltration induziert. Da in diesen *nahG*-Pflanzen sowohl Nekrosebildung als auch die Stimulierung des 9-LOX-Reaktionsweges nach Behandlung mit Pep13 ausbleiben, ist es sehr wahrscheinlich, daß eine Induktion der Bildung von 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD sowie 9-HOT durch Pep13 abhängig von SA ist. Die Salicylathydroxylase, die in den *nahG*-Pflanzen exprimiert wird, katalysiert die Umwandlung von SA in Catechol und reduziert damit den endogenen SA-Gehalt dieser Pflanzen. Nach Bakterieninfiltration erfolgt sowohl in den Wildtyp-Pflanzen als auch in den *nahG*-Pflanzen eine Ausprägung von Nekrosen und eine Akkumulation der 9-LOX-Metabolite. Dies zeigt, daß Pathogene im Gegensatz zu Pep13 die Nekrosebildung und die Induktion des 9-LOX-Reaktionsweges in den *nahG*-Pflanzen unabhängig von SA zu induzieren vermögen.

Im allgemeinen wird angenommen, daß SA als ein Signalmolekül während der SAR wirkt (Malamy *et al.* 1990; Métraux *et al.* 1990; Rasmussen *et al.* 1991; Enyedi *et al.* 1992). SA wird nach Pathogenbefall in *C. sativus* (Métraux *et al.* 1990) und *N. tabacum* (Malamy *et al.* 1990) im infizierten und nicht infizierten Gewebe gebildet und hat eine Bedeutung bei der lokalen Induktion von Abwehrreaktionen. In *N. tabacum* werden nach Behandlung mit SA auch *defense related genes* exprimiert, die nach Infektion mit dem Tabakmosaikvirus im infizierten und nicht infizierten Gewebe induziert werden (Ward *et al.* 1991). Die Prozesse der HR benötigen in *A. thaliana* nach Befall mit *P. parasitica* SA, da statt der HR

der Wildtyp-Pflanzen in *nahG*-Pflanzen eine kompatible Interaktion beobachtet wird (Delaney *et al.* 1994). Im Vergleich zu anderen Pflanzen enthält *S. tuberosum* relativ hohe Mengen an SA (Coquoz *et al.* 1995). Das offenbare Fehlen einer SA-Akkumulation im nicht infizierten Gewebe während der Arachidonsäure-induzierten SAR-Ausprägung (Coquoz *et al.* 1995) und demgegenüber das Ausbleiben der SAR in SA-defizienten *nahG*-Pflanzen, deuten eine einzigartige Funktion von SA bei der SAR in *S. tuberosum* an.

### 3 Induktion der PR-Genexpression nach Infiltration von Oxylipinen

Die Produkte des LOX-Reaktionsweges besitzen eine Bedeutung bei der pflanzlichen Pathogenantwort als antimikrobielle Substanzen und Signalmoleküle, die an der Aktivierung der Abwehrgenexpression beteiligt sind (Rosahl 1996; Slusarenko 1996; Reymond und Farmer 1998). Die Divinylether CA und CnA könnten als antifungale Substanzen wirken, da sie die Sporenkeimung von *P. infestans* inhibieren (Weber *et al.* 1999). Daneben haben auch Trihydroxide und Aldehyde eine antimikrobielle Wirkung (Kato *et al.* 1985; Croft *et al.* 1993). Für JA und 12-Oxo-PDA wurde dagegen gezeigt, daß sie als Signalmoleküle an der Antwort auf Verwundung und Insektenbefall beteiligt sind (Wasternack und Parthier 1997; Koch *et al.* 1999). Auch C<sub>6</sub>-Aldehyde induzieren in *A. thaliana* nach Pathogenbefall die Abwehrgenexpression (Bate *et al.* 1998).

Um die Funktion der 9-LOX-Metabolite zu untersuchen, die nach Pathogenbefall in *S. tuberosum* akkumulieren, wurden Blätter mit Lösungen dieser Metaboliten in einem Konzentrationsbereich von 1 µM bis 10 mM infiltriert. Dabei ist zu beachten, daß nicht bekannt ist, welche intrazellulären Konzentrationen dann vorliegen. Beim Vergleich der StPRB1b-Transkriptakkumulation nach Infiltration von 9- und 13-HPOT ist auffällig, daß 13-HPOT bei relativ geringen Konzentrationen die PR-Genexpression unabhängig von einer Nekrosebildung induziert (Abb. C-18). Dies korreliert mit der in *H. vulgare* beschriebenen Akkumulation von HvPR1b-Transkripten nach Behandlung mit 13-HOT (Weichert *et al.* 1999) und weist auf eine Funktion von 13-HPOT und davon abgeleiteten Metaboliten bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall hin. Durch die Verwendung von (13S)-HPOT kann hier aber nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Substrat des AOS-Reaktionsweges zu JA umgesetzt und die StPRB1b-Transkriptakkumulation durch das aus (13S)-HPOT synthetisierte JA verursacht wird. Die Akkumulation von StPRB1b-Transkripten wurde nach Behandlung mit *Psm* sowie nach Ethylen- und Dunkelbehandlung in Bättern von *S. tuberosum* beschrieben (Kistner 1999). Da nach Bakterieninfiltration in *S. tuberosum* eine Akkumulation von JA nachgewiesen wurde, kann möglicherweise von einer JA-vermittelten Induktion der StPRB1b-Genexpression ausgegangen werden. Deshalb wäre die Infiltration von 13-HOT interessant, um die Induktion der PR-Genexpression durch diesen Metaboliten des LOX-Reaktionsweges zu untersuchen. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß 9-HOT, 9,10,11-TriHOD und CA eine nekroseunabhängige Akkumulation von StPRB1b-Transkripten induzieren (Abb. C-

18). Da noch sehr wenig über die Funktion dieser Oxylipine bei Abwehrreaktionen von *S. tuberosum* nach Pathogenbefall bekannt ist, stellt diese Untersuchung einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung ihrer Funktionen dar. Hier müßte insbesondere durch ein *gain of function*-Experiment in Pflanzen mit erhöhtem Oxylipingehalt die Expression von PR-Genen analysiert werden.

Die unter 4.2 beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine Korrelation zwischen der LOX-Expression und der Ausprägung von Blattnekrosen hin. Es stellt sich die Frage, ob LOXen als Initiatoren der Lipidperoxidation agieren oder aber nur in Folge ihrer Aktivierung Membranschädigungen eine unspezifische Begleiterscheinung sind. Die Peroxidation der Membranlipide wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Infiltration von 9-HPOT, 13-HPOT und 9-HOT löst ab Konzentrationen von 5 bzw. 10 mM die Nekrosebildung aus, wohingegen das LOX-Substrat LnA bei diesen Konzentrationen wesentlich schwächere Nekrosen induziert (Abb. C-18). Inwieweit LOX-Produkte bei der Entstehung der HR nach Pathogenbefall eine zentrale Rolle spielen, kann aus dieser Beobachtung nicht geschlossen werden und muß daher noch durch *loss of function*-Experimente gezeigt werden.

#### 4 Der 9-LOX-Reaktionsweg und Resistenzausprägung in *S. tuberosum*

Die vier verwendeten Sorten von *S. tuberosum* unterscheiden sich in ihrer Basisresistenz gegenüber *P. infestans*. Im Gegensatz zur suszeptiblen Sorte Désirée, die in jedem Fall nach Infektion mit *P. infestans* abstirbt, besitzen die Sorten Producent, Tomba und Kuras eine erhöhte Basisresistenz gegenüber *P. infestans*. Diese rassenunspezifische Resistenz oder allgemeine Feldresistenz ist gegenüber allen Pathogenrassen wirksam. Daneben existieren aber auch Sorten mit rassenspezifischer Resistenz, die durch ein einzelnes, dominantes R-Gen vermittelt wird und nur gegen einige Pathogenrassen aktiv ist. Aufgrund der großen genetischen Variabilität der Pathogenpopulation kann diese Resistenz jedoch sehr schnell gebrochen werden (Colen *et al.* 1995; Melchers und Stuiver 2000). Da die Feldresistenz der in dieser Arbeit verwendeten Sorten durch Veränderung der Infektionsbedingungen überwunden werden kann, war die Untersuchung der Bedeutung des LOX-Reaktionsweges bei der Resistenzausprägung in *S. tuberosum* nur eingeschränkt möglich.

Die Trihydroxid-Derivate, die nach Pathogenbefall sowohl in der suszeptiblen Sorte Désirée als auch nach Durchbrechen der erhöhten Basisresistenz von Kuras während des Absterbens der Blätter besonders stark akkumulieren, sind scheinbar nicht an Resistenzantworten beteiligt, sondern werden vielmehr als Reaktion auf den Pathogenbefall gebildet. Eine Korrelation der CnA-Akkumulation und der Resistenzausprägung erscheint dagegen wahrscheinlicher, da diese 4 d nach Inokulation mit *P. infestans* in den Pflanzen mit erhöhter Resistenz zum Teil stärker akkumulieren als in den suszeptiblen Pflanzen. Die Akkumulation der Divinylether CA und CnA ist zudem in

Verbindung mit der Resistenzausprägung in *S. tuberosum* bereits beschrieben worden (Weber *et al.* 1999). Hier akkumulierten die Metabolite in der kompatiblen Interaktion 3 d nach Inokulation, in der inkompatiblen Interaktion begann diese Akkumulation bereits nach 2 d. Da der Gehalt der Oxylipine in jedem Fall relativ spät und parallel zur Bildung sichtbarer Symptome ansteigt, könnte eine Korrelation dieser Akkumulation mit der Ausbildung der HR bestehen.

Eine entscheidende Rolle von 9-LOXen bei der Resistenzausprägung in *Solanaceae* ist anhand transgener Pflanzen von *N. tabacum* gezeigt worden, in denen die Aktivität der pathogeninduzierten 9-LOX NtLOX1 durch die Expression von *antisense*-LOX-Sequenzen inhibiert wurde (Rancé *et al.* 1998). Im Gegensatz zur rassenspezifischen Resistenz der Wildtyp-Pflanzen waren die transgenen Pflanzen suszeptibel für eine Infektion mit *Ppn*. Diese Interaktion scheint besonders geeignet zur Untersuchung von Resistenzphänomenen, da die Autoren nur eine geringe Anzahl von LOX-Genen in *N. tabacum* annehmen, von denen bisher nur die NtLOX1 beschrieben worden ist. Im Gegensatz dazu enthalten andere Pflanzen, wie z. B. *S. tuberosum* mit bisher 12 charakterisierten 9-LOX-Genen, wesentlich mehr LOX-Isoformen (Abb. D-1). Der Effekt in *N. tabacum* könnte somit aber auch durch die hohe Sequenzhomologie von 9-LOXen bei *Solanaceae* erklärt werden, so daß auch in diesem Ansatz die Expression mehrerer 9-LOXen herunter reguliert waren.

Da mittels der Restriktionsanalyse 9-LOX-spezifischer cDNA-Fragmente gezeigt werden konnte, daß die Transkripte der POTLX-3 nach Pathogenbefall in *S. tuberosum* akkumulieren, sollte die Funktion dieser pathogeninduzierten Expression bei Abwehrreaktionen in transgenen Pflanzen in Analogie zu *N. tabacum* untersucht werden. Dazu wurde der RNA-Interferenz-Mechanismus (RNAi) verwendet, der als eine sehr effektive Methode des posttranskriptionellen *gene silencing* (PTGS) beschrieben worden ist (Kennerdell und Carthew 1998; Waterhouse *et al.* 1998; Chuang und Meyerowitz 2000). Die normalerweise pathogeninduzierte Expression der POTLX-3 ist in allen regenerierten RNAi-Pflanzen vollständig unterbunden (Abb. C-23), was die Effizienz der RNAi-Methode erstmals auch in *S. tuberosum* zeigt. Im Gegensatz dazu ist durch Expression von *antisense*-Sequenzen der POTLX-3 deren Expression in nur 20 % der regenerierten POTLX-3as-Pflanzen inaktiviert.

Obwohl das POTLX-3-Gen in den RNAi-Pflanzen ausgeschaltet werden konnte, ist die Nekrosebildung, die Expression der PR- und Abwehrgene sowie der Krankheitsverlauf in diesen Pflanzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpflanzen nach Pathogenbefall in ersten Untersuchungen unverändert. Somit können mit diesen Pflanzen noch keine Aussagen zur Funktion der pathogeninduzierten Expression der POTLX-3 erhalten werden. Zudem akkumulieren in den RNAi-Pflanzen 9-LOX-Metabolite nach Inokulation mit *P. infestans*, was auf eine weitere 9-LOX-Aktivität in diesen Pflanzen hinweist, deren Expression in den transgenen RNAi-Pflanzen nicht inhibiert werden konnte.

Da weder Transkripte der knollenspezifischen StLOX1 noch der hier neu gefundenen, konstitutiv exprimierten StLOX4 in den RNAi-Pflanzen nach Pathogenbefall detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt), kann vermutet werden, daß im Genom von *S. tuberosum* noch weitere Gene, die für 9-LOX kodieren, vorhanden sind, deren Expression in den transgenen Pflanzen durch das RNAi-Konstrukt nicht reprimiert wurde.

In einigen RNAi-Pflanzen akkumulieren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen besonders stark das Hydroxid-Derivat 13-HOT (Abb. C-24) und die Autoxidationsprodukte 12- und 16-HOT (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist weiterhin, daß das in den RNAi-Pflanzen gebildete 9HOT im Vergleich zu dem in den Kontrollpflanzen entstandenen 9-HOT ein verändertes Verhältnis der R/S-Enantiomere aufweist. Dies läßt eine Verstärkung von autoxidativen Prozessen in den transgenen RNAi-Pflanzen vermuten oder kann von der Aktivität einer 9-LOX-Isoform mit einer veränderten Regio- und Stereospezifität verursacht werden. Diese könnte eine homologe Form der *R*-LOXen sein, die aus Invertebraten, wie z. B. *Plexaura homomalla* beschrieben worden ist (Brash *et al.* 1996). Im Gegensatz zu den *S*-LOXen bilden diese das Hydroperoxid stereospezifisch in der *R*-Konfiguration. Die verstärkte Akkumulation des Divinylethers CA in einigen RNAi-Pflanzen deutet außerdem auf eine Aktivierung des Divinylethersynthase-Reaktionsweges hin.

In den RNAi-Pflanzen erfolgt eine pathogeninduzierte Akkumulation von freien Fettsäuren (Abb. C-25). Diese könnte durch eine Inhibierung der Metabolisierung dieser LOX-Substrate verursacht werden. Andererseits können auch Prozesse, die diese PUFAs bereitstellen, als eine Reaktion auf das Fehlen der Produkte des LOX-Reaktionsweges verstärkt und damit durch eine *feedback*-Regulation ausgelöst werden.

Die unveränderte Nekrosebildung und das Vorhandensein von LOX-Metaboliten in den RNAi-Pflanzen sind damit ein weiterer Hinweis darauf, daß eine Korrelation zwischen der Akkumulation von LOX-Metaboliten und der Ausprägung von Nekrosen besteht. Inwieweit dagegen tatsächlich eine Bedeutung der Divinylether bei der Resistenzausprägung existiert, kann nicht geschlußfolgert werden, da die starke Akkumulation von CA in einigen RNAi-Pflanze nicht mit einer erhöhten Resistenz dieser Pflanzen gegenüber einem Pathogenbefall korreliert.

### **Zukünftige Arbeiten**

Aufgrund der Kenntnisse über den 9-LOX-Reaktionsweg in *S. tuberosum* nach Pathogenbefall ergibt sich die Frage nach weiteren, in Verbindung mit Abwehrreaktionen akkumulierenden Metaboliten, die für die Pathogenabwehr von Bedeutung sind. Dabei wäre gerade die Untersuchung von Derivaten der 16:3-Fettsäure interessant, wie z. B. Dinor-oxo-PDA, die nach Verwundung in Blättern von *A. thaliana* und *S. tuberosum* akkumuliert (Weber *et al.* 1997). Möglicherweise wird das Hydroperoxid-Derivat dieser Fettsäure auch durch andere Enzyme des LOX-Reaktionsweges umgesetzt, und es entstehen dabei eventuell Metabolite, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind.

Inzwischen wurde in *A. thaliana* gezeigt, daß nach Verwundung eine Akkumulation von veresterten Oxylipinen erfolgt (Stelmach *et al.* 2001), die aus der Umsetzung membrangebundener Fettsäuren durch LOXen resultieren. Inwieweit auch diese Fettsäurederivate eine Bedeutung bei Abwehrreaktionen besitzen, könnte in Zukunft untersucht werden.

Vor kurzem wurde die cDNA der StDES1 isoliert und steht somit auch für *loss of function*-Experimente in transgenen Pflanzen zur Verfügung. So könnte die Bedeutung der CA-Akkumulation in den RNAi-Pflanzen bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen durch Transformation dieser Pflanzen mit einem RNAi-T-DNA-Konstrukt der StDES1 untersucht werden.

## E Zusammenfassung

Lipoxygenasen (LOXen) sind an der pflanzlichen Antwort auf Pathogenbefall beteiligt. Sie katalysieren die Dioxygenierung vielfach ungesättigter Fettsäuren und somit die Synthese von Hydroperoxid-Derivaten. Die Produkte der LOX-Reaktion werden durch die Enzyme des LOX-Reaktionsweges unter anderem zu Signalmolekülen und antimikrobiellen Verbindungen umgesetzt. Die Rolle der LOXen bei der Pathogenabwehr in *S. tuberosum* wurde insbesondere bei der Reaktion auf den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, den Oomyceten *Phytophthora infestans* untersucht.

In Zellen von *S. tuberosum* erfolgt nach Behandlung mit einer Rohelicitorpräparation von *P. infestans* die präferentielle Stimulierung von 9-LOXen, die die Hydroperoxidgruppe am Kohlenstoffatom 9 der Linolsäure (LA) einführen. Der Hauptmetabolit des LOX-Reaktionsweges ist der Divinylether Colnensäure, eine Verbindung mit antifungaler Wirkung. Es akkumulieren außerdem die Trihydroxid-Derivate 9,10,11-TriHOE und 9,10,11-TriHOD sowie das Hydroxid-Derivat 9-HOD in den elicitorbehandelten Zellen.

Die Metabolisierung von 9-LOX-Produkten ist ebenfalls in Blättern von *S. tuberosum* bei der kompatiblen Interaktion mit *P. infestans* und der Nichtwirt-Pathogen-Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) stimuliert, wobei hier vor allem die Produkte der Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure (LnA) akkumulieren. Am stärksten ist die Synthese der Trihydroxide 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD aktiviert, die als antifungale Substanzen diskutiert werden. Parallel akkumulieren in beiden Interaktionssystemen in geringeren Mengen auch das Hydroxid-Derivat 9HOT und die Divinylether Colnensäure (CA) und Colnelensäure (CnA).

In Übereinstimmung mit der Abwesenheit der Aktivität von 13-LOXen, die die Hydroperoxidgruppe am Kohlenstoffatom 13 von LA bzw. LnA einführen, wurden keine Produkte des 13-LOX-Reaktionsweges nach Pathogenbefall gemessen. Lediglich nach *Psm*-Behandlung akkumuliert das Signalmolekül Jasmonsäure (JA), das möglicherweise an der Wundantwort in *S. tuberosum* beteiligt ist.

Die Stimulierung des 9LOX-Reaktionsweges erfolgt parallel zur Verbräunung der Zellen bzw. der Ausprägung von Nekrosen auf den pathogenbehandelten Blättern. Ein Zusammenhang zwischen der Nekrosebildung und der Akkumulation von 9-LOX-Produkten wurde anhand chemisch induzierter (nach Eosinbehandlung) und durch Infiltration mit dem Oligopeptidelicitor Pep13 verursachter Nekrosen untersucht. Die 9-LOX-Metabolite 9,10,11-TriHOD und 9,12,13-TriHOD sowie 9-HOT akkumulieren in zeitlicher Korrelation mit der Nekrosebildung, wohingegen die Mengen der Divinylether unverändert bleiben. Daß diese Oxylipine eher eine Rolle nach Pathogenbefall spielen könnten, zeigen gering erhöhte Mengen an Divinylethern in Blättern von Kartoffelsorten mit erhöhter Basisresistenz gegenüber *P. infestans*.

Hinweise auf die Funktion der Oxylipine bei Abwehrreaktionen in *S. tuberosum* wurden in *gain of function*-Experimenten durch exogene Applikation von LOX-Metaboliten-Lösungen erhalten. Dabei induzieren 13-HPOT, möglicherweise aufgrund der Metabolisierung zu JA, und 9-HOT, 9,10,11-TriHOD, CA sowie 9-HPOT eine StPRB1b-Transkriptakkumulation unabhängig von der Ausprägung von Nekrosen. Somit könnten diese Oxylipine direkt an der Induktion von Abwehrreaktionen beteiligt sein.

Zur Untersuchung der pathogeninduzierten Expression von 9-LOX-Genen wurde das posttranskriptionelle *gene silencing* (PTGS) durch RNA-Doppelstrang-Interferenz (RNAi) für die Pflanzentransformation verwendet. In den transgenen Pflanzen ist die Expression aller bekannten 9-LOXen aus *S. tuberosum* unterbunden, wohingegen die Nekrosebildung, die Expression der PR- und Abwehrgene sowie der Krankheitsverlauf im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpflanzen unverändert ist. Erste Analysen der Metabolite des LOX-Reaktionsweges zeigen, daß in den RNAi-Pflanzen ein verändertes Oxylipin-Muster vorliegt, dessen Funktion aber noch näher charakterisiert werden muß.

**F Literaturverzeichnis**

**Ádám, A., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M., Király, Z.** (1989) Consequence of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**: 13-26

**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

**Bass, B.L.** (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* **101**: 235-238

**Bate, N.J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J.M., Thompson, J.E., Rothstein, S.J.** (1998) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol* **117**: 1393-1400

**Becker-André, M., Schulze-Lefert, P., Hahlbrock, K.** (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative *cis*-acting elements of the two coumarate:CoA ligase genes in potato. *J Biol Chem* **266**: 8551-8559

**Bell, A.A.** (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **32**: 21-81

**Bell, E., Creelman, R., Mullet, J.** (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., Wasternack, C., Feussner, I.** (2001) Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochem Biophys Acta*: im Druck

**Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523

**Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q., Zenk, M.H.** (1995) The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4099-4105

**Blée, E.** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33-72

**Blée, E. und Schuber, F.** (1990) Efficient epoxidation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxide-dependent oxygenase. *J Biol Chem* **265**: 12887-12894

**Bligh, E.G. und Dyer, W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917

**Blume, B., Nürnberger, N., Nass, N., Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-1440

**Blumwald, E., Aharon, G.S., Lam, B.C.-H.** (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **3**: 342-346

- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 189-214
- Bonas, U. und van den Ackerveken, G.** (1997) Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial disease? *Plant J* **12**: 1-8
- Bostock, R.M., Kuc, J.A., Laine, R.A.** (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* **212**: 67-69
- Bostock, R.M., Yamamoto, H., Choi, D., Ricker, K.E., Ward, B.L.** (1992) Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. *Plant Physiol* **100**: 1448-1456
- Bowles, D.J.** (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907
- Bradley, D.J., Kjellbohm, P., Lamb, C.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- Brash, A.** (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **274**: 23679-23682
- Brash, A.R., Boeglin, W.E., Chang, M.S., Shieh, B.-H.** (1996) Purification and molecular cloning of an 8*R*-lipoxygenase from the coral *Plexaura homomalla* reveal the related primary structures of *R*- and *S*-lipoxygenases. *J Biol Chem* **271**: 20949-20957
- Cao, H., Li, X., Dong, X.** (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6531-6536
- Chappell, J. und Hahlbrock, K.** (1984) Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**: 76-78
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- Chuang, C.F. und Meyerowitz, E.M.** (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4985-4990
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G.B.** (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62
- Colen, L.T., Turkensteen, L.J., Prummel, W., Budding, D.J., Hoogendoorn, J.J.** (1995) Durable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in old potato cultivars. *Eur J Plant Pathol* **101**: 387-397
- Coquoz, J.-L., Buchala, A., Meuwly, P., Métraux, J.-P.** (1995) Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathol* **85**: 1219-1224

- Creelman, R.A. und Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 355-381
- Croft, K.P.C., Jüttner, F., Slusarenko, A.J.** (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101**: 13-24
- Croft, K.P.C., Voisey, C.R., Slusarenko, A.J.** (1990) Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**: 49-62
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H.** (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Dangl, J.L., Hauffe, K.D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J* **6**: 2551-2556
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M., Dangl, J.L.** (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J* **1**: 289-302
- Delaney, T., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J.** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Deng, W., Grayburn, W., Hamilton-Kemp, T., Collins, G., Hildebrand, D.** (1992) Expression of soybean-embryo-lipoxygenase 2 in transgenic tobacco tissue. *Planta* **187**: 203-208
- Deng, W., Hamilton-Kemp, T.R., Nelson, M.Z., Andersen, R.A., Collins, G.B., Hildebrand, D.F.** (1993) Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *J Agric Food Chem* **41**: 506-510
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L.** (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**: 565-577
- Ding, X.Z., Kuszynski, C.A., El-Metwally, T.H., Adrian, T.E.** (1999) Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **266**: 392-399
- Dische, Z.** (1962) General color reactions. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. (Whistler, R.C. und Wolfrom, M.L.) Academic Press, New York, 478-512
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F.** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 266-274
- Ebel, J. und Mithöfer, A.** (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348

- Ebel, J. und Scheel, D.** (1997) Signals in host-parasite interactions. In: *The Mycota V Part A Plant Relationships*. (Carroll, G.C. und Tudzinsky, P.) Springer, Berlin Heidelberg,
- Ellis, C. und Turner, J.G.** (2001) The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to Pathogens. *Plant Cell* **13**: 1025-1033
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I.** (1992) Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2480-2484
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G.** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* **100**: 234-240
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.** (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J* **18**: 4689-4699
- Farmer, E.E. und Ryan, C.A.** (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7713-7716
- Farmer, E.E. und Ryan, C.A.** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134
- Feltkamp, D., Baumann, E., Schmalenbach, W., Masterson, R., Rosahl, S.** (1995) Expression of the mannopine synthase promotor in roots is dependent on the *mas* elements and correlates with high transcript levels of *mas*-binding factor. *Plant Sci* **109**: 57-65
- Feussner, I., Bachmann, A., Hohne, M., Kindl, H.** (1998) 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.** (1997) 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., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B., Wasternack, C.** (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J* **7**: 949-957
- Feussner, I. und Kühn, H.** (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *FEBS Lett* **367**: 12-14
- Feussner, I. und Kühn, H.** (2000) Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In: *Enzymes in Lipid Modification*. (Bornscheuer, U.T.) Wiley-VCH, Weinheim, 309-336

- Feussner, I., Kühn, H., Wasternack, C.** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**: 268-273
- Feussner, I. und Wasternack, C.** (2002) The lipoxygenase pathway. zur Veröffentlichung eingereicht
- Feys, B.J. und Parker, J.E.** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**: 449-455
- Fidantsef, A.L. und Bostock, R.M.** (1998) Characterization of potato tuber lipoxygenase cDNAs and lipoxygenase expression in potato tubers and leaves. *Physiol Plant* **102**: 257-271
- Flor, H.H.** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296
- Fournier, J., Pouénat, M.-L., Rickauer, M., Rabinovitch-Chable, H., Rigaud, M., Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1993) Purification and characterization of elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells. *Plant J* **3**: 63-70
- Fritsche, K., Hornung, E., Peitzsch, N., Renz, A., Feussner, I.** (1999) Isolation and characterization of a calendic acid producing (8,11)-linoleoyl desaturase. *FEBS Lett* **462**: 249-253
- Galliard, T. und Phillips, D.** (1972) The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)-non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem* **129**: 743-753
- Gardner, H.W.** (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway in plants. *Biochim Biophys Acta* **1084**: 221-239
- Gardner, H.W. und 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
- Geerts, A., Feltkamp, D., Rosahl, S.** (1994) Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol* **105**: 269-277
- Geiler, C.** (2001) Induktion von Abwehrreaktionen in *Solanum tuberosum* L. durch den Oligopeptid-Elicitor Pep-13 aus *Phytophthora sojae*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
- Gerwick, W.H., Moghaddam, M., Hamberg, M.** (1991) Oxylin metabolism in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids. *Arch Biochem Biophys* **290**: 436-444
- Ghosh, J. und Myers, C.E.** (1999) Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells. *Adv Exp Med Biol* **469**: 577-582
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., Rosahl, S.** (2001) Oxylin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**: 6267-6273

- Govers, F., Drenth, A., Pieterse, C.M.J.** (1997) The potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* and other pathogenic Oomycota. In: The Mycota V Part B Plant Relationships. (Carroll, G.C. und Tudzinsky, P.) Springer, Berlin Heidelberg,
- Grant, M. und Mansfield, J.** (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 312-319
- Grechkin, A.** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**: 317-352
- Gunstone, F.D.** (1992)  $\gamma$ -Linolenic Acid - Occurrence and physical and chemical properties. *Prog Lipid Res* **31**: 145-161
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., Schmelzer, E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4150-4157
- Hamberg, M.** (1993) Pathways in the biosynthesis of oxylipins in plants. *J Lipid Med* **6**: 375-384
- Hamberg, M.** (1999) An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* **34**: 1131-1142
- Hamberg, M.** (2000) New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids* **35**: 353-363
- Hamberg, M. und Gardner, H.W.** (1992) Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochim Biophys Acta* **1165**: 1-18
- Hamberg, M. und Hamberg, G.** (1990) Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acids in the broad bean (*Vicia faba* L.). *Arch Biochem Biophys* **283**: 409-416
- Hamberg, M., Sanz, A., Castresana, C.** (1999)  $\alpha$ -Oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an  $\alpha$ -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503-24513
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 575-607
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (2000) Responses to plant pathogens. In: Biochemistry and molecular biology of plants. (Buchanan, B., Gruissem, W. und Jones, R.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1102-1156
- Hanahan, D.** (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hatanaka, A.** (1993) The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34**: 1201-1218

- Hause, B., Weichert, H., Hohne, M., Kindl, H., Feussner, I.** (2000) Expression of cucumber lipid-body lipoxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta* **210**: 708-714
- Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315-319
- Heinz, E.** (1993) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. CRC Press, London.
- Henninger, H.** (1959) Versuche zur Kultur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf künstlichem Nährboden. *Phytopathol Z* **34**: 285-306
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A.** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877
- Horsch, R., Fry, J., Hoffmann, N., Eichholtz, D., Rogers, S., Fraley, R.** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L., DeRocher, A.E.** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123**: 711-724
- Itoh, A. und Howe, G.A.** (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J Biol Chem* **276**: 3620-3627
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4800-4805
- Joos, H. und Hahlbrock, K.** (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur J Biochem* **204**: 621-629
- Joyard, J., Marechal, E., Malherbe, A., Block, M.A., Douce, R.** (1994) Importance of diacylglycerol in glycerolipid biosynthesis by spinach chloroplast envelope membranes. *Prog Lipid Res* **33**: 105-118
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., Klessig, D.F.** (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9448-9453
- Kato, T., Maeda, Y., Hirukawa, T., Namai, T., Yoshioka, N.** (1992) Lipoxygenase activity increment in infected tomato leaves and oxidation product of linolenic acid by its *in vitro* enzyme reaction. *Biosci Biotech Biochem* **56**: 373-375
- Kato, T., Yamaguchi, Y., Abe, N., Uyehara, T., Nakai, T., Kodama, M., Shiobara, Y.** (1985) Structure and synthesis of unsaturated trihydroxy  $C_{18}$  fatty acids in rice suffering from rice blast disease. *Tetrahedron Lett* **26**: 2357-2360

- Kato, T., Yamaguchi, Y., Uyehara, T., Yokoyama, T., Namai, T., Yamanaka, S.** (1983) Self-defensive substances in rice plant against rice blast disease. *Tetrahedron Lett* **24**: 4715-4718
- Kauss, H., Jeblick, W., Domard, A.** (1989) Degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**: 385-392
- Kawakita, K., Senda, K., Doke, N.** (1993) Factors, affecting *in vitro* activation of potato phospholipase A<sub>2</sub>. *Plant Sci* **92**: 183-190
- Kennerdell, J.R. und Carthew, R.W.** (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**: 1017-1026
- Keppler, L.D. und Novacky, A.** (1987) The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**: 233-245
- Keppler, L.D. und Nowacky, A.** (1986) Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathol* **76**: 104-108
- Kirsch, C., Hahlbrock, K., Somssich, I.** (1997) Rapid and transient induction of a parsley microsomal  $\Delta$  12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol* **115**: 283-289
- Kistner, C.** (1999) Isolierung und Charakterisierung eines nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* systemisch responsiven Gens von *Solanum tuberosum* L.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., Kunkel, B.N.** (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J* **26**: 509-522
- Koch, E., Meier, B.M., Eiben, H.-G., Slusarenko, A.** (1992) A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiol* **99**: 571-576
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., Boland, W.** (1999) Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol* **121**: 153-162
- 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
- Kolomiets, M.V., Chen, H., Gladon, R.J., Braun, E.J., Hannapel, D.J.** (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol* **124**: 1121-1130
- Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymeson, M., Gladon, R.J.** (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**: 613-626

- Kombrink, E. und Hahlbrock, K.** (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol* **81**: 216-221
- Kombrink, E. und Somssich, I.E.** (1995) Defense responses of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research*. (Andrews, J.H. und Tommerup, I.C.) Academic Press, New York, 1-34
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., Wasternack, C.** (1997) Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett* **414**: 197-202
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M.** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853
- Lamb, C. und Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lee, J., Parthier, B., Löbler, M.** (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* **199**: 625-632
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J.** (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* **52**: 1-9
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- Low, P.S. und Merida, J.R.** (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**: 533-542
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004
- Marineau, C., Matton, D.P., Brisson, N.** (1987) Differential accumulation of potato tuber mRNAs during the hypersensitive response induced by arachidonic acid elicitor. *Plant Mol Biol* **9**: 335-342
- Martín, M., Leon, J., Dammann, C., Albar, J.P., Griffiths, G., Sanchez-Serrano, J.J.** (1999) Antisense-mediated depletion of potato leaf omega3 fatty acid desaturase lowers linolenic acid content and reduces gene activation in response to wounding. *Eur J Biochem* **262**: 283-290
- Masui, H., Kondo, T., Kojima, M.** (1989) An antifungal compound, 9,12,13-trihydroxy-(*E*)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytochemistry* **26**: 2613-2615
- Matsui, K.** (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belgian Journal of Botany* **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
- Matton, D.P. und Brisson, N.** (1989) Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol Plant-Microbe Interact* **2**: 325-331
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J., Wasternack, C.** (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J* **21**: 199-213
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5473-5477
- Mehdy, M.C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* **105**: 467-472
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.D., Ausubel, F.M., Peterman, T.K.** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **101**: 441-450
- Melchers, L.S. und Stuiver, M.H.** (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 147-152
- Métraux, J.-P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Mueller, M. und Brodschelm, W.** (1994) Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem* **218**: 425-435
- Mueller-Uri, F., Parthier, B., Nover, L.** (1988) Jasmonate-induced alteration of gene expression in barley leaf segments analyzed by *in-vivo* and *in-vitro* protein synthesis. *Planta* **176**: 241-247
- Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C.** (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: 2249-2260
- Nennstiel, D., Scheel, D., Nürnberger, T.** (1998) Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett* **431**: 405-410
- 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
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**: 449-460

- Nürnberg, T. und Scheel, D.** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**: 372-379
- Ocampo, C.A., Moerschbacher, B., Grambow, H.J.** (1986) Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with avirulent rust fungi or treated with fungal elicitor. *Z Naturforsch* **41c**: 559-563
- Ohta, H., Shida, K., Peng, Y.-L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S., Morita, Y.** (1990) The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol* **31**: 1117-1122
- Osborn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831
- Parchmann, S., Gundlach, H., Mueller, M.** (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* **115**: 1057-1064
- Peng, Y.L., Shirano, Y., Ohta, H., Hibino, T., Tanaka, K., Shibata, D.** (1994) A novel lipoxygenase from rice - primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J Biol Chem* **269**: 3755-3761
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323
- Pieterse, C.M.J. und van Loon, L.C.** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **4**: 52-58
- Polkowska-Kowalczyk, L. und Maciejewska, U.** (2001) The oxidative processes induced in cell suspensions of *Solanum* species by culture filtrate of *Phytophthora infestans*. *Z Naturforsch* **56c**: 235-244
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A.** (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**: 277-290
- Prell, H.H.** (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer, Jena.
- Rancé, I., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6554-6559
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, T., Zook, M.N.** (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **97**: 1342-1347
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K., Parthier, B.** (1994) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivation protein involved in plants stress reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7012-7016

- Reymond, P. und Farmer, E.E.** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 404-411
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., Pernollet, J.** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* **183**: 555-563
- Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Véronési, C., Grimal, H., Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1997) The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta* **202**: 155-162
- Ricker, K.E. und Bostock, R.M.** (1994) Eicosanoids in the *Phytophthora infestans*-potato interaction: lipoxygenase metabolism of arachidonic acid and biological activities of selected lipoxygenase products. *Physiol Mol Plant Pathol* **44**: 65-80
- Rosahl, S.** (1996) Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Z Naturforsch* **51**: 123-138
- Roy, S., Pouénat, M.-L., Caumont, C., Cariven, C., Prévost, M.-C., Esquerré-Tugayé, M.-Z.** (1995) Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Sci* **107**: 17-25
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castañera, P., Sanchez-Serrano, J.J.** (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1146-1151
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, 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
- Rustérucci, C., Montillet, J., Agnel, J., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J., Triantaphylides, C.** (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446-36455
- Rustérucci, C., Stallaert, V., Milat, M.-L., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P.** (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* **111**: 885-891
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1818
- Ryan, C.A.** (1987) Oligosaccharide signalling in plants. *Annu Rev Cell Biol* **3**: 295-317
- Ryan, C.A.** (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 112-121

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuelson, B., Dahlän, S.E., Lindgren, J.Ü., Rouzer, C.A., Serhan, C.N.** (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**: 1171-1175
- Schaller, A.** (1999) Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol Biol* **40**: 763-769
- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., Weiler, E.** (2000) 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984
- Scheel, D., Blume, B., Brunner, F., Fellbrich, G., Dalboge, H., Hirt, H., Kauppinen, S., Kroj, T., Ligterink, W., Nürnberger, T., Tschöpe, M., Zinecker, H., Zur Nieden, U.** (2000) Receptor-mediated signal transduction in plant defense. In: *Biology of plant-microbe-interactions*. (De Wit, P.D.G.M., Bisseling, T. und Stiekema, W.J.) International Society of Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN,
- Scheel, D., Hauffe, K.D., Jahnen, W., Hahlbrock, K.** (1986) Stimulation of phytoalexin formation in fungus-infected plants and elicitor-treated cell cultures of parsley. In: *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. (Lugtenberg, B.) Springer, Berlin Heidelberg, 325-331
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S.** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* **274**: 4273-4280
- Schmidt, A., Scheel, D., Strack, D.** (1998) Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* **205**: 51-55
- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., Métraux, J.-P.** (1996) Perception of free cutin monomers by plant cells. *Plant J* **10**: 331-341
- Schweizer, P., Gees, R., Mössinger, E.** (1993) Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Physiol* **102**: 503-511
- Sembdner, G. und 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., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., Bell, E.** (1994) Lipoxigenases. *Plant Mol Biol Reporter* **12**: S41-S42
- Siedow, J.N.** (1991) Plant lipoxigenase: 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.) AOCS Press, Champaign, IL, 176-197
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K.** (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. Proc Natl Acad Sci USA **83**: 2427-2430
- Song, W.-C. und Brash, A.R.** (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. Science **253**: 781-784
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehman, C.C.** (1998) Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. Plant J **15**: 747-754
- Steffen, W. und Linck, R.W.** (1989) Multiple immunoblot: a sensitive technique to stain proteins and detect multiple antigens on a single two-dimensional replica. Electrophoresis **10**: 714-718
- Stelmach, B.A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M., Weiler, E.W.** (2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem **276**: 12832-12838
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S., Feussner, I.** (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (*CYP74D*) from elicitor-treated potato suspension cells. zur Veröffentlichung eingereicht
- Tamogami, S., Rakwal, R., Kodama, O.** (1997) Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. FEBS Lett **412**: 61-64
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H.O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K.** (1994) The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. Nucleic Acids Res **22**: 2857-2858
- Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 15107-15111
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A.** (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. Curr Opin Immunol **13**: 63-68
- van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. Plant Mol Biol **41**: 537-549

- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P., Sanchez-Serrano, J.J.** (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8139-8144
- Vaughn, S.F. und Gardner, H.W.** (1993) Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. *J Chem Ecol* **19**: 2337-2345
- Véronési, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouénat, M.-L., Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1996) Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol* **112**: 997-1004
- Vick, B.A. und Zimmerman, D.C.** (1987) Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: *The Biochemistry of Plants*. (Stumpf, P.K. und Conn, E.E.) Academic, Orlando, 53-90
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7209-7214
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S., Colon, L.T.** (2000) Does basal PR gene expression in Solanum species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiol Mol Plant Pathol* **57**: 35-42
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, A., Ahl-Goy, P., Metraux, J.-P., Ryals, J.A.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094
- Wasternack, C. und Parthier, B.** (1997) Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* **2**: 302-307
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B.** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13959-13964
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D., Farmer, E.E.** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**: 485-493
- Weber, H., Vick, B.A., Farmer, E.E.** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10473-10478
- 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
- Weisshaar, B. und Jenkins, G.I.** (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 251-257
- Wojtaszek, P.** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692

**Yamamoto, S.** (1992) Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* **1128**: 117-131

**Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F.** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* **11**: 1621-1639

**Yu, I., Parker, J., Bent, A.** (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7819-7824

**Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganal, M., Wasternack, C.** (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem* **275**: 19132-19138

**Zimmerman, D.C. und Coudron, C.A.** (1979) Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol* **63**: 536-541

**Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2751-2755

## G Anhang

### Anhang 1: Sequenz des cDNA-Fragmentes mit Homologien zu einer D<sup>12</sup>-Acyl-Lipid-Desaturase aus *Solanum commersonii*

```

TTTGGGTGAA TGCACATGAG TGTGGCCATC ACGCTTTCAG TGATTACCAA TGGGTTGATG   60
ACACCGTTGG ACTTATCCTT CACTCTGCTC TGTTGGTGCC GTACTTCTCT TGGAAATATA  120
GTCATCGTCG CCACCACTCC AACACTGGCT CCCTCGAGCG TGATGAGGTC TTTGTGCCCA  180
AGCCAAAATC TCAGCTCGGA TGGTATTCCA AGTACTTGAA CAATCCACCA GGCAGGGTCC  240
TCTCACTTAC AATCACCCCTC ACTCTTGGCT GGCCGTTGTA CTTGGCCTTC AATGTATCTG  300
GCAGACCATA CGACCGATTT GCATGTCACT ATGACCCTTA CGGCCCAATC TACAACAACC  360
GTGAGAGGCT ACAGATCTTC GTTCTGATG CTGGAGTTCT CGGAGTTTGT TATCTGCTAT  420
ACCGTATTGC CTTAGTGAAA GGTCTAGCTT GGCTAGTGTG CATCTACGGT GTACCCCTCC  480
TGGTCGTGAA CGGCTTCCTT GTCCTGATCA CCTACTTGCA GCACACTCAC CCATCATTCG  540
CTCACTA

```

### Anhang 2: Sequenz des cDNA-Fragmentes der StLOX4

```

ACAAACAGGC AACTAAGTGT GCTTCACCCT ATTCATAAGC TTCTCCTTCC TCATTTTCGT   60
GAAACGATGA ACATAAATGC TTTAGCAAGA CAAATCCTAA TCAATGGTGG CGGACTTCTT  120
GAATTTACCG TCTTCCCTGC CAAATATTCC ATGGAAGTGT CATCAGTAAT TTACAAAGAC  180
TGGATTTTTT CGGAACAAGC ACTTCCTGCT GATCTCATCA AAAGGGGAGT GGCTGTTGAG  240
GACTCAAGCT CCCACATGG CGTTCGCTTA CTGATTCAGG ACTATCCATA TGCTGTTGAT  300
GGGTTGGAAA TTTGGTCAGC AATCAAAAGT TGGGTAACAG AATATTGCAA CTACTIONTAC  360
AAATCAGATG ACGCGGTACA GAAAGACTT GAACTCCAAG CCTGGTGGAA GGAGCTCCGC  420
GaAGAAGGAC ATGCGGACAA GAAAGATGAG CCTTGGTGGC CTAATAATGCA AACTGTGCAA  480
GAGCTCATAG ATTCTGCAC CATCACTATA TGGWTAGCTT CAGCACTTCA TGCAGCAGTT  540
AATTTTGGGC AATACCCTTA TGCAGGTTAC CTCCCAAATC GCC

```

### Anhang 3: Sequenzanalyse eines 9-LOX-spezifischen Fragmentes

Nukleotide, die von der *consensus*-Sequenz abweichen, sind blau gekennzeichnet, die *Bgl* II-Schnittstelle ist gelb und die *Cla* I-Schnittstelle grün markiert.

SiLOX1 (Acc. No. S73865): Nukleotide 1599 bis 2180;

PLOX1 (Acc. No. AF019613): Nukleotide 1648 bis 2229;

POTLX-3 (Acc. No. U60202): Nukleotide 1650 bis 2231

```

SiLOX1  ACAAACAGGCAACTAAGTGTGCTTCACCCATTCATAAGCTTCTATATCCTCATTTCCTGG  60
PLOX1   ACAAACAGGCAACTTAGTGTGCTTCACCCATTCATAAGCTTCTATATCCTCATTTCCTGG  60
POTLX-3 ACAAACAGGCAACTAAGTGTGCTTCACCCAAATTCATAAGCTTTTACATCCTCATTTCCT  60

SiLOX1  GACACAATGAATATTAATGCTTCGGCAAGACAAAATCCTAATCAATGCTGGTGGAGTTCTT  120
PLOX1   GACACAATGAATATTAATGCTTCGGCAAGACAAAATCCTAGTCAATGCTGGTGGAGTTCTT  120
POTLX-3 GACACGATGAAATAAATGCTTTGGCAAGACAGATCTTAATCAATGCTGGTGGAGTTCTT  120

SiLOX1  GAGAGTACAGTTTTTCAATCCAAATTTGCCCTGGAAATGTCAGCTGTCGTTTACAAAGAT  180
PLOX1   GAGAGTACAGTTTTTCAATCCAAATTTGCCATGGAAATGTCAGCTGTCGTTTACAAAGAT  180
POTLX-3 GAGATGACAGTTTTTCTGCCAAATATGCGATGGAAATGTCAGCTGTAGTTTACAAAAGT  180

SiLOX1  TGGGTTTTCCCTGATCAAGCCCTTCCAGCTGATCCTTGTTAAAGGGGAGTAGCAGTTGAG  240
PLOX1   TGGGTTTTCCCTGATCAAGCCCTTCCGGCTGATCCTTGTTAAGAGGGGAGTAGCAGTTGAG  240
POTLX-3 TGGGTTTTTCCTGAAACAAGCACTTCCAGCTGATCCTATAAAGAGGGGAGTGGCCGTAGAG  240

SiLOX1  GACTCGAGTTCTCCTCATGGTGTTCGTTTACTGATAGAGGACTATCCATACGCTGTTGAT  300
PLOX1   GACTCGAGTTCTCCTCATGGTGTTCGTTTACTGATAGAGGACTATCCATACGCTGTTGAT  300
POTLX-3 GACTCTAGTTCCCAACATGGTGTTCGCTTGCTAATTCAGACTATCCATATGCTGTTGAT  300

SiLOX1  GGCTTAGAAATATGGTCTGCAATCAAAAGTTGGGTGACAGACTACTGCAGCTTCTACTAT  360
PLOX1   GGCTTAGAAATATGGTCTGCAATCAAAAGTTGGGTGACAGACTACTGCAGTTTCTACTAT  360
POTLX-3 GGCTTAGAAATATGGTCAAGCAATCAAAAGTTGGGTAAACGAATATGCAACTTCTATAT  360

SiLOX1  GGATCGGACGAAGAGATTCTGAAAGACAATGAACTCCAAGCCTGGTGGAAGGAACTCCGA  420
PLOX1   GGATCGGATGAAGAGATTCTGAAAGACAATGAACTACAAGCCTGGTGGAAGGAACTCCGA  420
POTLX-3 AAATCAGATGAATTAGTTTGTAAAGATAATGAACTCCAAGCGTGGTGGAAGGAGCTTCGA  420

SiLOX1  GAAGTGGGACATGGTGACAAGAAAAATGAACCATGGTGGCCTGAAATGAAAACACCACAA  480
PLOX1   GAAGTGGGACATGGTGACAAGAAAAATGAACCATGGTGGCCTGAAATGAAAACACCACAA  480
POTLX-3 GAAGAAAGGACATGGTGACAAGAAAGATGAACCTTGGTGGCCTAAAATGAAAACCTCGCCAA  480

SiLOX1  GAGCTAATCGATTTCGTGTACCACCATCATATGGATAGCTTCTGCACTTCATGCAGCAGTT  540
PLOX1   GAGTTAATCGATTTCGTGTACCACCATCATATGGATAGCTTCTGCACTTCATGCAGCAGTT  540
POTLX-3 GAGCTAAAAGATTCTTGCACTATTATTATTGGATAGCATCAGCACTTCATGCAGCAGTC  540

SiLOX1  AATTTTGGGCAATATCCTTATGCAGGTTACCTCCCAAATCGC  582
PLOX1   AATTTCCGGGCAATATCCTTATGCAGGTTACTCCCAAATCGC  582
POTLX-3 AATTTTGGGCAATAACCTTATGCAGGTTACCTCCCAAATCGC  582

```

## Lebenslauf

Name: Cornelia Göbel  
Geburtsdatum: 17.04.1974  
Geburtsort: Schönebeck/Elbe  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1980 - 1990 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Calbe/Saale  
1990 - 1992 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Calbe/Saale, Reifezeugnis

### Studium

10/1992 - 09/1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Wirkung von JIP60 auf die Proteinsynthese in transgenen Pflanzen in *Nicotiana tabacum* L."  
(Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale )

### Tätigkeit

11/1997 - 08/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale  
Anfertigung einer Promotionsarbeit in der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie unter Anleitung von Prof. Dr. D. Scheel und Dr. S. Rosahl

## **Publikationen und wissenschaftliche Beiträge:**

**Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M., Scheel, D., Rosahl, S.** (2000) Lipoxygenase isoforms of potato are differentially expressed in response to pathogen attack. International Symposium on Non-Mammalian Eicosanoids and Bioactive Lipids, Berlin

**Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M., Scheel, D., Rosahl, S.** (2000) Lipoxygenase isoforms of potato are differentially expressed in response to pathogen attack. "Plant Biology 2000" The Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Diego (CA USA)

**Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., Rosahl, S.** (2001) Oxylin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. J Biol Chem **276**: 6267-6273