

Der Einfluss von Ozon auf den LOX-Weg bei Pflanzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Britta Engelhardt

aus

Helmarshausen

Mai 2008

Aus dem Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre (ICG-III)
des Forschungszentrums Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Jun.Prof. Dr. I. Janzik

1. Koreferent: Prof. Dr. W. Hummel

2. Koreferentin: Prof. Dr. M. Baier

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2008

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Symbole

∅	Durchmesser
Abb.	Abbildung
ADH, ADHs	Alkohol Dehydrogenase(n)
AOC, AOCs	Allenoxid-Cyclase(n)
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Chn	basische Chitinase
cv.	Kultivar
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EH, EHs	Epoxidhydrolase(n)
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Glc	basische β -1, 3-Glucanase
GUS	β -Glukuronidase
HPLC	engl.: <i>High Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>
HPL, HPLs	Hydroperoxid-Lyase(n)
HR	Hypersensitive Reaktion
IC ₅₀	InhibitorKonzentration, die ein Enzym <i>in vitro</i> zu 50 % blockiert
JA	Jasmonsäure
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
LA	Linolsäure
LE	Linolensäure
FG	Frischgewicht
LOOH,	Lipidhydroperoxid(e)
LOX, LOXs	Lipoxygenase(n)
Lsg.	Lösung(en)
MeJa	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Nah-G	Nah-G Gen kodiert für Salicylathydroxylase
NBT	Nitroblautetrazolium

OD	Optische Dichte
OPR	12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase
PCD	programmierter Zelltod
ppb	hier: ein Milliardstel des Volumens (= nl/l)
rel.	relativ
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SA	Salicylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSPE	Natriumhydroxid Natriumchlorid Phosphat EDTA Puffer
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
VOCs, VOC	flüchtige organische Verbindungen
Vol	Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Ozon	1
1.1.1	Ozonentstehung und –abbau in der Troposphäre	1
1.1.2	Aufnahme von Ozon in Pflanzen	2
1.2	Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies, oxidativer Stress	3
1.3	Ozonschäden bei Pflanzen	5
1.4	Signalmoleküle bei der Abwehrantwort von Pflanzen	11
1.4.1	Hypersensitive Reaktion und oxidativer Burst	13
1.4.2	Programmierter Zelltod	14
1.5	Lipide	15
1.5.1	Lipidperoxidation	16
1.6	Lipoxygenasen in Pflanzen	18
1.6.1	Reaktionsmechanismus, Substratspezifität und Sekundärreaktionen	18
1.6.2	Intrazelluläres Vorkommen	22
1.6.3	Die physiologische Bedeutung der Lipoxygenasen	22
1.7	Metabolite und weitere Enzyme des LOX-Reaktionsweges	25
1.7.1	Der Reduktase Weg	26
1.7.2	Der Epoxy-Alkohol-Synthase Weg	26
1.7.3	Der Peroxygenase Weg	26
1.7.4	Der Divenylether-Synthase Weg	29
1.7.5	Der Allenoxid-Synthase Weg (Jasmonat-Kaskade)	29
1.7.6	Der Hydroperoxid-Lyase Weg	34
1.8	Zielsetzung der Arbeit	36
2.	Material und Methoden	38
2.1	Geräte	38
2.2	Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide	38
2.2.1	Chemikalien	38
2.2.2	Enzyme	39
2.2.3	Oligonukleotide	39
2.3	Verbrauchsmaterial	39
2.4	Bakterienstamm	39
2.4.1	Anzucht, Ausplattierung und Lagerung	39
2.4.2	Transformation kompetenter Zellen	39
2.5	Pflanzenmaterial	40

2.5.1	Herkunft und Anzucht	40
2.5.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	40
2.5.1.2	<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Tabak)	41
2.6	Behandlungsvarianten der Pflanzen	42
2.6.1	Ozonbehandlung der Pflanzen	42
2.6.1.1	Große Expositions-küvetten (Vegatron)	42
2.6.1.2	Kleine Expositions-küvette	44
2.6.1.3	Durchführung der Ozonbehandlung der Pflanzen	45
2.6.2	Verwundungsexperiment bei Tabak	45
2.6.3	Exposition mit Methyljasmonat	45
2.6.4	Behandlung von Tabak mit Wasserstoffperoxid	47
2.6.4.1	Stängelapplikation	47
2.6.4.2	Infiltration	47
2.7	Bonitur von Blattschäden	47
2.8	Ernte des Blattmaterials	49
2.9	Proteinbiochemische Methoden	49
2.9.1	Proteinbestimmung	49
2.9.2	Messung der Lipoxygenase Aktivität	49
2.9.2.1	Optimierung des Extraktionspuffers	50
2.9.2.2	Gewinnung des Rohextrakts	51
2.9.2.3	Bestimmung des optimalen pH-Wertes von Lipoxygenase	51
2.9.2.4	Kontrollversuche zum Einfluss des pH-Wertes auf Substrat oder Rohextrakt	52
2.9.2.5	Bestimmung von K_m und V_{max}	52
2.9.2.6	Lipoxygenase Aktivität in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen	53
2.9.2.7	Durchführung der Messung	54
2.9.2.8	Inhibitor Versuche	55
2.9.3	Bestimmung der β -Glukuronidase (GUS) Aktivität	56
2.9.3.1	Histochemischer Nachweis	56
2.9.3.2	Spektrofluorimetrischer GUS-Aktivitätstest	57
2.10	Molekularbiologische Methoden	58
2.10.1	Isolierung von Nukleinsäuren	58
2.10.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen	58
2.10.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenzellen	58
2.10.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	59

2.10.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	59
2.10.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	60
2.10.3 Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	60
2.10.3.1 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA-Erststrangsynthese)	60
2.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	60
2.10.4.1 PCR mit Reverse Transkriptase Ansatz	60
2.10.4.2 PCR mit cDNA Fragmenten oder isolierten Plasmiden	61
2.10.5 Relative Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion.....	61
2.10.6 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	63
2.10.7 Verwendete Primer	63
2.10.8 Gelelektrophorese	65
2.10.8.1 DNA-Agarosegelelektrophorese	65
2.10.8.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese	65
2.10.9 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese	65
2.10.9.1 Nachweis der Lipoxygenase Aktivität mittels in-Gel Färbung	66
2.10.10 DNA-Sequenzierung	67
2.10.11 Digoxigeninmarkierung von cDNA-Fragmenten.....	67
2.10.12 Herstellung genspezifischer Sonden	68
2.10.13 RNA-Transferblot (Northern Blot)	68
2.10.14 Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	69
2.10.15 Immunologische Chemielumineszenz-Detektion	69
2.10.16 Rehybridisierung der Membran.....	69
2.10.17 Quantifizierung der Hybridisierungssignale.....	69
2.10.18 Restriktion genomischer DNA.....	70
2.10.19 DNA-Transferblot (Southern-Blot)	70
2.10.20 Dot-Blot.....	71
2.10.21 Computergestützte Sequenzanalysen	71
2.11 Histochemischer Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies	71
2.11.1 DAB (3, 3'-Diaminobenzidin)	72
2.11.2 NBT (4-Nitroblau Tetrazolium).....	72
2.12 HPLC der LOX Reaktionsprodukte	73
2.12.1 Reduktion der Linolsäurehydroperoxide mittels Natriumborhydrid	74
2.13 Bestimmung des endogenen Jasmonsäure- und Salicylsäuregehalts	76

3.	Ergebnisse	78
3.1	Läsionenbildung bei ozonbehandelten <i>Nicotiana tabacum</i> L. Varietäten	78
3.1.1	Abhängigkeit des Nekrotisierungsgrades von der Ozonkonzentration	80
3.2	Etablierung des Lipoxygenase Enzymtests für <i>N. tabacum</i> L. cv. Bel W3....	83
3.2.1	Optimierung des Extraktionspuffers.....	83
3.2.2	Abhängigkeit der LOX Aktivität von der eingesetzten Enzymmenge	85
3.2.3	Bestimmung des optimalen pH-Wertes für Lipoxygenase.....	86
3.2.4	Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Enzymaktivität von LOX.....	89
3.3	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die LOX Aktivität	89
3.4	Zeitverlauf der Lipoxygenase Aktivität nach Ozonbehandlung bei Tabak	91
3.5	Nachweis ozoninduzierter Isoformen der Tabak Lipoxygenase.....	95
3.6	Klonierung von genspezifischen Sonden für LOX, OPR, AOC, EH, ADH, HPL, Glc und Chn.....	96
3.7	Ozonvermittelte Induktion von Lipoxygenase auf Transkriptebene	101
3.7.1	RT-PCR zum Zeitverlauf der Lipoxygenase Transkriptakkumulation	101
3.8	Dosisabhängige Ozoninduktion der Lipoxygenase bei Tabak cv. Bel W3 in Abhängigkeit vom Blattalter	104
3.8.1	Nachweis auf Transkriptebene	104
3.8.2	Nachweis auf Proteinebene.....	105
3.9	Southern Blot Analyse der LOX bei den Tabak Varietäten cv. Bel W3, cv. Bel B und cv. xanthi.nc-Nah-G.....	107
3.10	Northern Blot Analysen von Lipoxygenase ozonbehandelter <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3, cv. Bel B und cv. xanthi.nc-Nah-G	108
3.11	Einfluss von Methyljasmonat, Verwundung und Wasserstoffperoxid auf die Induktion der Lipoxygenase und β -1, 3-Glucanase mRNA.....	111
3.11.1	Methyljasmonat induzierte Lipoxygenase Aktivität.....	113
3.12	Zeitverlauf der ozoninduzierten LOX-Weg Enzyme HPL, EH, AOC, OPR und ADH sowie der Chn und Glc auf Transkriptebene bei Tabakpflanzen. 115	
3.12.1	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3.....	115
3.12.2	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel B.....	118
3.12.3	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. xanthi.nc-Nah-G	120
3.13	Bestimmung des endogenen Jasmonsäure- und Salicylsäuregehalts in <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3.....	122
3.14	Ozoninduktion reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Burst).....	125
3.14.1	Histochemische Lokalisation von H_2O_2 und O_2^{*-} in ozonbehandelten <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3.....	126
3.15	Induktion der β -Glukuronidase Aktivität unter der Kontrolle von LOX2-	

oder Bgl2-Promotoren in <i>A. thaliana</i> durch Ozon oder Methyljasmonat	128
3.15.1 Entwicklung der Nekrosen bei ozonbehandelten <i>A. thaliana</i> Varietäten	128
3.15.2 Ozoninduktion der β -Glukuronidase unter dem LOX2 bzw. Bgl2 Promotor.	130
3.15.2.1 Histochemische Lokalisation der GUS Expression	130
3.15.2.2 GUS Aktivitäts Bestimmung	133
3.15.3 Induktion der GUS durch Methyljasmonat unter dem LOX2 Promotor	134
3.15.3.1 Histochemische Lokalisation der LOX2 (GUS) Aktivität	134
3.15.3.2 GUS Aktivitäts Bestimmung	135
4. Diskussion	137
4.1 Optimierung des Lipoxygenase Enzymaktivitätstest	138
4.2 Korrelation von Nekrosen mit LOX Genexpression und LOX Aktivität sowie C ₆ -Emissionen bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3	141
4.3 Korrelation zwischen Ozon-induzierter LOX Aktivität und reaktiven Sauerstoffspezies mit der Hypersensitiven Reaktion	151
4.4 Ozoninduktion von HPL- und ADH-Transkripten im Vergleich mit den Emissionen flüchtiger kurzkettiger Aldehyde und Alkohole bei Tabak	157
4.5 Ozon- und Methyljasmonat-Induktion chloroplastidärer LOX2 bei transgenen <i>A. thaliana</i> LOX2 GUS/FLUC in Korrelation zu Nekrosen	164
4.6 Korrelation zwischen Ozon-induzierten Transkripten von AOC und OPR mit dem endogenen Gehalt an freier Jasmonsäure bei Tabak	168
4.7 Ozoninduktion der EH mRNA bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B	173
4.8 Verflechtung von LOX-Weg und SA bei der Ozonantwort von Tabak	175
4.9 Schlussbetrachtung und Ausblick	182
5. Zusammenfassung	186
6. Abstract	188
7. Literaturverzeichnis	190
8. Anhang	219

1. Einleitung

1.1 Ozon

In den 60er Jahren beschrieben Heggestad und Middleton (1959) in Amerika Läsionen an Tabakkultivaren, die nicht durch Schädlingsbefall oder Nährstoffmangel bedingt waren. Sie beobachteten an den jüngsten vollentwickelten Blättern zunächst unregelmäßig verteilte dunkle Flecken von 1-3 mm Durchmesser. Das Gewebe war an diesen Stellen plasmolysiert wodurch es dunkler erschien (engl: *water soaked areas*). Die Flecken wurden innerhalb von 48 h braun und nekrotisierten. Da sie häufig bei feucht-warmen Wetter auftraten, erhielten sie die Bezeichnung Wetter-Flecken (engl: *weather fleck*). Als Ursache für diese Läsionen wurde bodennahes Ozon (O₃) des photooxidativen Smogs der Troposphäre identifiziert (Übersicht in: Heggestad, 1991).

1.1.1 Ozonentstehung und –abbau in der Troposphäre

Vereinfacht dargestellt erfolgt die Entstehung von Ozon in der Troposphäre in einer komplexen Abfolge katalytischer Kreisprozesse, die als "Photosmog-Mechanismus" bezeichnet werden. Hierbei werden in Anwesenheit von Wasserdampf und Stickstoffdioxid (NO₂) flüchtige organische Verbindungen (engl.: *volatile organic compounds*, VOCs) und Kohlenstoffmonoxid (CO) photochemisch durch intensives Sonnenlicht im kurzwelligen Bereich ($\lambda < 430$ nm) oxidiert (Kondratyev und Varotsos, 2001). Diese Strahlungsabhängigkeit ist auch verantwortlich dafür, dass die Ozonbildung einen Tagesgang mit Konzentrationsmaxima um die Mittagszeit aufweist und generell in den Sommermonaten stärker auftritt als in den lichtarmen Wintermonaten. Ozon wird also nicht von der Umwelt emittiert, sondern gebildet. Man bezeichnet es daher als sekundären Schadstoff (UBA, 2001). Die Quellen der Vorläuferstoffe wie Kohlenstoffmonoxid und Stickoxide (NO_x = NO+NO₂) sind in erster Linie anthropogenen Ursprungs wie sie z. B. bei Industrieemissionen (25 %) und Straßenverkehr (53 %) auftreten (Ryerson et al., 2001; Kley et al., 1999). Es tragen jedoch auch biogene Emissionen wie VOCs (z. B. Terpene und Isoprene) aus Laub- und Nadelbäumen und NO_x aus überdüngten Böden zu einer Nachlieferung der Ozon-Vorläuferstoffe (Ryerson et al., 2001; UBA, 2001) und damit zu verstärkter Ozonbildung bei (Richter et al., 1998).

Der Abbau von Ozon erfolgt mit Hilfe von Stickstoffmonoxid (NO), das vermehrt an Stellen primärer Verbrennungsprozesse, z. B. bei hoher Verkehrsdichte, entsteht. Dies ist die Erklärung dafür, dass abends in innerstädtischen Bereichen niedrigere Ozon Konzentrationen gemessen werden, als in ländlichen Reinluftgebieten (Kley et al., 1999). Gegenwärtig wird angenommen, dass Ozon der bedeutendste Luftschadstoff in vielen Teilen Europas, Nord- und Mittelamerikas und des Fernen Ostens ist (Reich, 1987; Heagle, 1989; Chameides et al., 1994; Krupa et al., 1995; Stockwell et al., 1997).

1.1.2 Aufnahme von Ozon in Pflanzen

Ozon kann die lipophile Kutikula der Pflanzen nicht durchdringen und diffundiert mit dem normalen Gaswechsel (Kohlenstoffdioxid (CO₂), Sauerstoff (O₂)) durch die Stomata ins Blattinnere (Abb. 1). Die Aufnahme ist neben dem Grenzflächenwiderstand (Blattmorphologie, z. B. Haare) und den stomatären Leitwiderständen (Anzahl, Größe und Anatomie der Stomata) auch von den Faktoren abhängig, die Einfluss auf die Regulation der Spaltöffnungen haben (u. a. Nährstoffverfügbarkeit, CO₂-Konzentration) (Lendzian, 1987). So kann die sommerliche Bewässerung von landwirtschaftlichen Kulturen, die zur Öffnung der Stomata führt, deren Ozonempfindlichkeit drastisch steigern (UBA, 2001). Der direkte Einfluss von Ozon auf die Stomata wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Übersicht bei Darrall (1989) zeigt, dass bei Ozondosen unter 400 µg/m³ (200 ppb) für Stomata bei verschiedenen Pflanzen sowohl Öffnung, Verschluss als auch keine Änderung beobachtet werden konnte. Neueste Studien mit *Arabidopsis* zeigten, dass der Ausgangswert der stomatären Leitfähigkeit 9 - 12 Minuten nach Start einer Ozonbehandlung mit 150 ppb um 60 % – 70 % abnahm, dieser jedoch noch während der Behandlung nach 30 – 40 Minuten zurückgewonnen wurde (Kollist et al., 2007).

Im Blatt gelangt Ozon zunächst in den Apoplasten, der sich aus dem interzellulären Gasraum (18 % bis 46 % des gesamten Blattvolumens), dem Feuchtfilm, der die Zellen im Blattinneren umgibt, und der hydrierten Zellwand zusammensetzt. In Tabak sind 5 % bis 20 % des im Blatt vorhandenen Wassers im Apoplasten gebunden (Grignon und Sentenac, 1991; Dietz, 1997). Hierin scheint Ozon schnell abzureagieren (Lendzian, 1987), denn die kalkulierte Ozonkonzentration im Interzellullarraum beträgt fast null (Laisk et al., 1989). In diesem wässrigen Milieu

des Apoplasten kann Ozon zerfallen unter passiver Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie des Singulett-Sauerstoffs ($^1\text{O}_2$), des Wasserstoffperoxids (H_2O_2), der Superoxidanionen (O_2^-), der Hydroperoxyradikale ($^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$) oder der besonders toxischen Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) (Heath und Taylor, 1997). Der im Apoplasten vorherrschende pH-Wert von 5–7 kann hierdurch alkalisiert werden (Dietz, 1997). Da Ozon unter sauren pH Bedingungen relativ stabil ist, trägt diese pH Erhöhung gleichzeitig zu einem verstärkten Zerfall von Ozon bei (Heath, 1987). Von den reaktiven Sauerstoffspezies gelten die Hydroxylradikale als die stärksten Oxidantien in der Zelle (Scandalios, 1993).

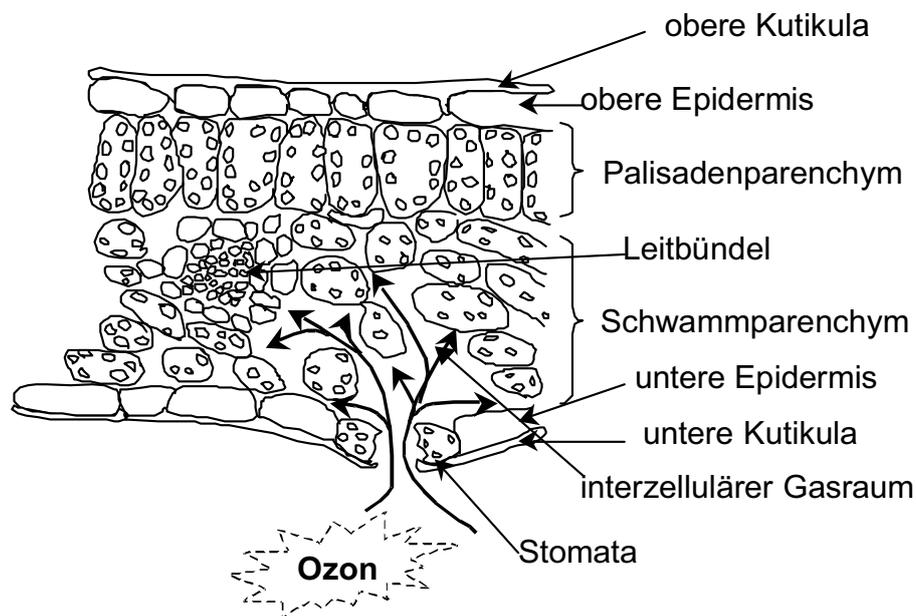


Abb. 1 Ozonaufnahme, dargestellt anhand eines Blattquerschnitts (verändert nach: Braune et al., 1987).

1.2 Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies, oxidativer Stress

Da auch in ungestressten Pflanzen reaktive Sauerstoffspezies unter normalen metabolischen Bedingungen als Nebenprodukte des Stoffwechsels entstehen (siehe Tab. 1), haben Pflanzen Mechanismen entwickelt diese zu entgiften. Diese Mechanismen bestehen aus verschiedenen, in den jeweiligen subzellulären Kompartimenten vorhandenen, enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponenten und bilden zusammen das Antioxidative System (Tab. 1; Alscher et al., 1998; Aono et al., 1998; Gechev et al., 2006). In Tab. 1 sind die verschiedenen von Ozon abgeleiteten reaktiven Sauerstoffspezies sowie ihre natürliche Quelle und die wichtigsten Antioxidantien mit ihrer Lokalisation zusammenfassend dargestellt.

Tab. 1 ROS: a) Natürliche Quellen (Zerfall im Apoplast oder Nebenprodukt des Stoffwechsels) und b) biochemische Antioxidantien (Lokalisation) (Zusammengestellt nach: Scandalios, 1993; Bueno et al., 1995; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Heldt, 1996; Wojtaszek, 1997; Alscher et al., 1998; Foyer, 1998; Foyer and Noctor, 2005; Kliebenstein et al., 1998; Vanacker et al., 1998; Gechev et al., 2006). Chl: Chloroplast, Perox: Peroxisomen, Apo: Apoplast, Mito: Mitochondrion, Cyt: Cytosol, Glyox: Glyoxisomen.

ROS	a) ROS Entstehung und b) ROS Entgiftung
1O_2	a) Photoinhibition, Energietransfer vom angeregten Chlorophyll auf O_2 b) Karotinoide (Car); β -Carotin (Vitamin A), Lutein / (Chl) $^1Car + ^1O_2 \rightarrow 3 Car \rightarrow \text{Wärme} + ^1Car + O_2$ mit Ascorbinsäure im Halliwell-Asada-Zyklus (s. u.) + 1O_2
$O_2^{\cdot-}$	a) e^- -Übertragung auf O_2 im Photosystem I (Mehler Reaktion/ Chl); e^- -Übertragung in den Mitochondrien; Photorespiration (Glyoxisomen); Peroxisomen Aktivität; Plasmamembran; Xanthin- oder Aldehyd-Oxydasen, Flavin-Dehydrogenasen NADPH-Oxydase: $NADPH + H^+ + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + 2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+$ b) Superoxid Dismutasen (Cu/Zn-, Mn-, Fe-SOD) / (Chl, Mito, Cyt, Perox, Apo); $O_2^{\cdot-} + SOD \rightarrow H_2O_2 + H_2O$ bei pH ≥ 7 Disproportionierung von $O_2^{\cdot-}$ zu $H_2O_2 + O_2$
O_2H^*	steht im Gleichgewicht mit $O_2^{\cdot-}$
H_2O_2	Photorespiration bzw. β -Oxidation, (Peroxisomen); Abbau von $O_2^{\cdot-}$ durch SOD (s. o.); Diamin- und Polyaminoxidasen (Apoplast): $Putrescin + O_2 + H_2O \rightarrow 4\text{-Aminobutyraldehyd} + NH_3 + H_2O_2$ Oxalatoxidase: $Oxalat + O_2 \rightarrow H_2O_2 + CO_2$ Katalase (Cat; Hämenzym): $H_2O_2 + Cat \rightarrow 1/2 O_2 + H_2O$ / (Perox - Matrix) Peroxidase (Fe^{3+}) + $H_2O_2 \rightarrow$ Ligninsynthese + H_2O / (Zellwand) $GSH + GPX + H_2O_2 \rightarrow GSSH$ $H_2O_2 +$ Ascorbinsäure (Vitamin C) + Ascorbatperoxidase $\rightarrow 2 H_2O$ Regeneration der Ascorbinsäure: 1. Monodehydroascorbat (MDH) \rightarrow spontan \rightarrow Ascorbinsäure 2. MDH + MDH-Reduktase + NADPH \rightarrow Ascorbinsäure + NADP+ / (Chl) Halliwell-Asada-Zyklus 3. MDH \rightarrow spontan \rightarrow Dehydroascorbat (DAH) DAH + DAH-Reduktase + Glutathion (GSH) \rightarrow Ascorbinsäure + ox. Glutathion ox. Glutathion (GSSG) + Glutathion-Reduktase \rightarrow GSH (Chl, Apo, Mito, Cyt, Perox, Glyox)
OH^*	a) Haber-Weiss-Reaktion: $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^* + OH^- + O_2$ Fenton-Reaktion: $H_2O_2 + Fe^{2+}/Cu^{2+}$ -katalysiert $\rightarrow OH^* + OH^- + Fe^{3+}/Cu^{3+}$

Das im Apoplasten vorliegende antioxidative Schutzsystem (Tab. 1) sowie die hier vorkommenden Polyaminkonjugate, stellen somit die erste Abwehr gegen Ozon und hieraus passiv entstehende reaktiven Sauerstoffspezies dar (Langebartels et al.,

1991; Luwe et al., 1993; Heath und Taylor, 1997; Borrell et al., 1997; Bouchereau et al., 1999). Darüber hinaus induzierte Ozon die verstärkte Expression einiger antioxidativer Enzyme wie Gluthation Reduktase, -Transferase, Peroxidase und Ascorbat Peroxidase (Sharma und Davis, 1994; Rao et al., 1996). Kann das Antioxidative System die Entgiftung der reaktiven Sauerstoffspezies nicht mehr bewältigen, kommt es für die Pflanze zu oxidativem Stress.

1.3 Ozonschäden bei Pflanzen

Doppelbindungen ungesättigter Kohlenwasserstoffe in Plasmamembranen und funktionelle Gruppen hieran assoziierter Proteine können indirekt durch die während des oxidativen Stresses erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies und direkt durch Ozon selbst (Criegee-Mechanismus) angegriffen werden (Heath, 1987; Heath und Taylor, 1997). So bezeichnen Heath und Taylor (1997) die Lipidperoxidation (Kap. 1.5.1) der Zellmembranen als einen Hauptgrund für die phytotoxische Wirkung des Ozons bei Pflanzen, die häufig als Nekrosen sichtbar werden (Kap. 1.1). Die Reaktionen führen zu toxischen Verbindungen wie Aldehyden, Lipidhydroperoxiden und Criegee Ozoniden (Pryor und Uppu, 1993). Zusätzlich kann die Oxidation von Amino-, Alkohol- und Aldehydgruppen zur Inhibition wichtiger Enzyme führen. Darüber hinaus können Sulfhydrylgruppen zu Disulfidbrücken oder Sulfonen reagieren, was ebenfalls zur Inhibition von z. B. ATPasen führen kann (Mudd, 1996; Heath, 1987).

Bisher ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die passiv aus Ozon gebildeten ROS solche toxischen Konzentrationen erreichen, dass dies z. B. Lipidperoxidation und Zelltod von Pflanzen zur Folge hat. Schraudner et al. (1998) und Pasqualini et al. (2003) konnten zeigen, dass Ozon bei dem ozonsensitiven Tabak Kultivar cv. Bel W3 eine biphasische Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2) induziert, wobei dem ersten schwachen Wasserstoffperoxid Peak ein zweiter wesentlich stärkerer folgte, begleitet von auftretenden Nekrosen. Im Gegensatz dazu zeigte der ozontolerante Tabak cv. Bel B nur den ersten schwachen Wasserstoffperoxid Peak und bildete keine Nekrosen aus (Schraudner et al., 1998). Auch in anderen Pflanzenspezies wie verschiedenen *Arabidopsis* Varietäten induzierte Ozon eine biphasische Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies verbunden mit Läsionen (Overmyer et al., 2000; Mahalingam et al., 2006) wobei in der *Arabidopsis* Mutante *rcd1* (engl.: *radical induced cell death*) Superoxid als

Hauptkomponente nachgewiesen wurde (Overmyer et al., 2000). Insgesamt vermuten die Autoren daher einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen stärkeren Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies und auftretendem Zelltod unter Ozonexposition (Schraudner et al., 1998; Overmyer et al., 2000). Unterstützt wird diese Hypothese durch neuere Studien mit ozonbehandelten Tabak-, Birken-, *Arabidopsis*- und Malven Spezies, bei denen ihrer Empfindlichkeit entsprechend eine lokale und quantitative Korrelation zwischen Zelltod und Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies gezeigt wurde (Pellinen et al., 1999; Rao und Davis, 1999; Overmyer et al., 2000; Wohlgemuth et al., 2002; Pasqualini et al., 2003; Mahalingam et al., 2006). Die Ozon-induzierte biphasische Generation großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies erinnert stark an den oxidativen Burst während der hypersensitiven Reaktion (HR) bei einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion auf die in Kapitel 1.4.1 näher eingegangen wird. Neben der zuvor beschriebenen Annahme einer passiven Entstehung von ozoninduzierten apoplastischen reaktiven Sauerstoffspezies bei ozonempfindlichen Pflanzen, wird aufgrund von Inhibitor Studien mit Diphenyleneiodonium (DPI, Flavin Oxydase Inhibitor) hierfür vermehrt ein aktiver Prozess der Pflanze diskutiert. Es wird vermutet, dass zumindest ein Teil der ROS durch den NAD(P)H Oxydase Komplex gebildet wird (Schraudner et al., 1998; Pellinen et al., 1999; Wohlgemuth et al., 2002). Als weitere enzymatische Quellen der aktiven apoplastischen ROS Bildung werden neben der NADPH Oxydase auch die apoplastische Peroxidase, Diamin- und Polyamin-Oxidasen sowie die Oxalat Oxydase diskutiert (Übersicht in: Langebartels et al., 2002). Unterstützt wird die Hypothese durch den Nachweis der ozoninduzierten biphasischen Expression der *NtrbohD* NADPH Oxydase nach 2 h und 6 h in Tabak cv. Bel W3 (Langebartels et al., 2002). Doch auch bei anderen enzymatischen Reaktionen wie z. B. der Lipoxygenase (LOX) Reaktion (Kap. 1.6) können reaktive Sauerstoffspezies in Form von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) als Nebenprodukt auftreten (Lynch und Thompson, 1984; Thompson et al., 1987; Pastore et al., 2000).

Die nach Ozonexposition nachgewiesenen reaktiven Sauerstoffspezies (Schraudner et al., 1998; Overmyer et al., 2000; Rossetti und Bonatti, 2001; Wohlgemuth et al., 2002; Pasqualini et al., 2003) können wie zuvor beschrieben eine Lipidperoxidation (Kap. 1.5.1) in Pflanzen auslösen (Rossetti und Bonatti, 2001). Dies bewirkt jedoch eine unspezifische autokatalytische Degradation der Lipide, deren Mechanismus

näher in Kapitel 1.5.1 beschrieben ist. Ein hiermit verbundener Zelltod könnte sich unkontrolliert ausbreiten, was bei einem enzymatisch vermittelten Prozess durch z. B. Lipoxygenase nicht der Fall wäre. So wurde zunehmend in verschiedenen Studien eine Korrelation zwischen induzierter Lipoxygenase (LOX) Aktivität und Membranschädigungen vor und/oder während der Hypersensitiven Reaktion bei inkompatiblen Pflanze/Pathogen- oder Pflanze/Elicitor-Interaktion festgestellt, die zum schnellen Zelltod und Resistenz führten (Ocampo et al., 1986; Keppler und Novacky, 1987; Slusarenko et al., 1991; Croft et al., 1990; Cacas et al., 2005). Cacas et al. (2005) beschrieben darüber hinaus, dass die 9-LOX abhängige Lipidperoxidation bei mit Cryptogein infiziertem Tabak ausreichend war für die Ausprägung des Zelltods. Einige Autoren halten bei diesen Interaktionen sogar die aus dem LOX-Weg (Kap. 1.6) stammenden reaktiven Lipidhydroperoxide zur Ausprägung des Zelltod für notwendig (Rustérucchi et al., 1999). Ob es auch zwischen Ozon-induziertem Zelltod in Pflanzen und LOX Aktivität eine Korrelation gibt, bleibt zu untersuchen und ist u. a. Gegenstand dieser Arbeit. Es wird daher in Kapitel 1.6 ausführlicher auf den LOX Reaktionsweg und die hieraus abgeleiteten Signalmoleküle eingegangen. Das bekannteste Signalmolekül des LOX-Wegs ist das Phytohormon Jasmonsäure, das nicht nur an der Induktion vieler Abwehrreaktionen beteiligt ist sondern darüber hinaus in jüngster Zeit als negativer Regulator des oxidativen Zelltod Zyklus bei Pflanzen unter Ozonstress diskutiert wird (Kanna et al., 2003; Overmyer et al., 2003). Aufgrund der besonderen Bedeutung der Membranlipide als Angriffsziel für Ozon und Quelle vieler Signalmoleküle erfolgt eine vereinfachte kurze Darstellung über ihren Aufbau sowie ihre Peroxidation.

Lipidperoxidation (Kap. 1.5.1) wird unter anderem durch physiologische (u. a. Blattalter, Entwicklungszustand, Frucht) und biochemische Faktoren (Zucker, Antioxidantien ect.) der Pflanzen, sowie durch vorherrschende Umweltbedingungen beeinflusst (Guderian, 1985; Chameides, 1989; Krupa et al., 1995; Heath und Taylor, 1997; UBA, 2001). Letztlich erfolgt die Zerstörung der Membranintegrität (Kap. 1.5.1), was den Verlust ihrer selektiven Permeabilität verursacht. Dies zieht einen Kalium-Kationen (K^+)-Abfall und einen Magnesium- (Mg^{2+})- und Kalzium-Kationen (Ca^{2+})-Anstieg im Zytoplasma nach sich (Heath und Taylor, 1997). Darüber hinaus induzierte Ozon innerhalb weniger Minuten einen biphasischen Ca^{2+} -Anstieg in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* (Evans et al., 2005). Der Ca^{2+} -Anstieg kann

wiederum Induktionen von z. B. ERK-MAP Kinase (engl.: *extracellular signal regulated kinase-mitogen activated protein kinase*) bewirken, wie Samuel et al. (2000) nach Ozonbehandlung nachwies. Ozon induzierte in *Arabidopsis thaliana* auch AtMPK3 (Ahlfors et al., 2004), AtMPK6 (Overmyer et al., 2005) und NtMPK4 in Tabak (Gomi et al., 2005). MAP Kinasen wird eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen bei der biotischen und abiotischen Abwehrantwort, von der extrazellulären- zur intrazellulären Zellseite bis hin zum Zellkern, zugesprochen. In *Arabidopsis* wurden bisher 3 MAP-K Kaskaden in Abhängigkeit des eingehenden Stresssignals beschrieben. So reguliert MKK2–MPK6 Kälte- und Salzstress-responsive Gene, MKK4/MKK5–MPK6 Pathogen-responsive Gene durch Aktivierung der Ethylenbiosynthese und JA aktivierte MKK3–MPK6 beeinflussen die JA abhängige Genexpression sowie das Wurzelwachstum (Takahashi et al., 2007). In Prosystemin überexprimierenden Tomaten hingegen führte Ko-Silencing von MPK1 und MPK2 in verwundeten Pflanzen zu einer verminderten JA Biosynthese und silencing von MPK3 zu einer verringerten Expression von LOXD mRNA Transkripten (Kandath et al., 2007). Eine Übersicht über MAP Kinasen und ihre Aktivierung in Pflanzen sowie eine phylogenetische Analyse geben Morris (2001), Zhang und Klessig (2001) und Rohila und Yang (2007). Der veränderte Ionentransport nach Ozonstress bewirkt den Verlust von Metaboliten, die Depolarisation des Membranpotentials, verändert die Gentranskription und induziert die Aktivität vieler Enzyme (Heath und Taylor, 1997). Eine Übersicht über ozoninduzierte Genexpression und Aktivität verschiedener Pflanzenspezies geben Sandermann (1996) und Langebartels et al. (1997). Die Komplexität der Ozonantwort hinsichtlich einer veränderten Genexpression sowie die Detektion ozonresponsiver Gene wurde in neueren Studien auch anhand von Mikro- bzw. Makroarrays, vornehmlich mit *Arabidopsis thaliana*, untersucht. Hierbei wurden sowohl spezifische cDNA Arrays, die neben Genen aus z. B. *A. thaliana* cv. Col-0 auch Gene von Mutanten wie *A. thaliana ein2* (Ethylen insensitiv) und *A. thaliana jar1* (JA insensitiv) enthielten (Tuominen et al., 2004), als auch kommerziell verfügbare Gen Chips z. B. von *Arabidopsis thaliana* cv. Col-0 (Tosti et al., 2006), eingesetzt. Weitere Untersuchungen werden u. a. beschrieben von Heidenreich et al. (2005), Olbrich et al. (2005), Overmyer et al. (2005), D’Haese et al. (2006) und Mahalingam et al. (2006).

Die durch Ozon bei den Pflanzen hervorgerufenen zellphysiologischen Wirkungen werden in akute und chronische Schäden unterteilt (Guderian, 1985; Reich, 1987).

Akute Schäden entstehen, wenn nach Kuzzeitbehandlung mit hohen Ozonkonzentrationen Zellschäden auftreten, die dann zu Nekrosenbildung führen, wobei Ähnlichkeiten zu der Hypersensitiven Reaktion (HR; Kap. 1.4.1) nach Pathogenbefall bestehen (Schraudner et al., 1997).

Chronische Schäden treten oft nach einer Langzeitexposition mit niedrigen Ozonkonzentrationen in Form von Seneszenzerscheinungen auf und werden oft begleitet durch die Expression von Seneszenz-assoziierten Genen (SAG) (Miller et al., 1999). Ozon führt zu einer gestörten Photosynthese durch die Verminderung des Chlorophyllgehalts, der Einschränkung der Rubisco Aktivität bis hin zur Inhibition des Stärkeabbaus bei Tabak cv. Bel W3 (Wieser et al., 1998; Battistelli et al., 2001). Hieraus ergibt sich eine Reduktion in der Assimilat-Verfügbarkeit und -Verteilung, was Wachstumsstörungen und Ertragseinbußen (Frucht/Samen) zur Folge hat (Reich und Amundsen, 1985; Heagle, 1989; Krupa et al., 1995; Pell et al., 1997; Miller et al., 1999; Grantz und Farrer, 2000). So war nach 21 tägiger Ozonbehandlung bei Weizen die Biomasse der Wurzeln um 9 % und die des Spross um 17 % reduziert (McCrary und Andersen, 2000). Eine Übersicht über die Auswirkungen von Ozon auf die vegetative Entwicklung und Fortpflanzungsprozesse von (Nutz)pflanzen geben Heagle (1989) und Black et al. (2000). Die makroskopische Schädigung insgesamt wird letztlich als Verfärbung (phenolische Sekundärverbindungen) oder in Form von Chlorosen und Nekrosen an der Blattoberfläche sichtbar (Saitanis et al., 2001). Eine Einteilung der Pflanzen in verschiedene Empfindlichkeitsstufen gestaltet sich aufgrund unterschiedlicher Schadausprägung innerhalb einzelner Arten oder Varianten, als schwierig (Black et al., 2000). Tendenziell scheinen jedoch die Familien der *Solanaceae*n, zu denen auch der Tabak gehört, sowie die *Fabaceae*n besonders ozonsensitiv zu sein (Langebartels et al., 1991).

Als Folge der Ozonschäden waren Ertragseinbußen bei Tabak- und anderen Nutzpflanzen sowie Waldbäumen zu verzeichnen, die zu enormen ökonomischen Verlusten führten, die alleine in den USA auf ca. 4 Milliarden US\$ geschätzt wurden (Middleton et al., 1950; Adams et al., 1988; Heggstad, 1991; FAO, 1998; Murphy et al., 1999). Die Ozonwirkungsforschung wurde daraufhin in den folgenden Jahren intensiviert und unterschiedlichste Nutzpflanzen in Open-Top Kammer

Experimenten mit ozonhaltiger bzw. ozonfreier Luft analysiert (Preston und Tingey, 1988; Heagle, 1989).

Als Konsequenz der Ozonwirkungsforschung wurden Schwellenwerte zum Schutz der Vegetation erstellt, die in Deutschland derzeit bei $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($\triangleq 100$ ppb, Ein-Stunden-Mittelwert) und bei $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($\triangleq 32,5$ ppb, 24-Stunden-Mittelwert) liegen. Es kommt jedoch immer wieder zu Überschreitungen wie der Messwert von $253 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($\triangleq 126,5$ ppb, 1h-Maximum) aus dem Jahr 2000 zeigt (UBA, 2001). Diese Ozonkonzentrationen reichen bereits aus, sensitive Pflanzen zu schädigen (Guderian, 1985). Zu den ozonsensitiven Pflanzen zählt auch die Tabak Varietät Bel W3 (Heggestad, 1991), die weltweit (Übersicht: Heggestad, 1991; Griechenland: Saitanis und Karandinos, 2001; Italien: Nali et al., 2000) als Bioindikator für Luftverschmutzung eingesetzt wird, wobei die ozontolerante Varietät Bel B als Kontrolle dient (Heggestad und Menser, 1962). In Europa führt das europäische Netzwerk EuroBionet (www.eurobionet.com) standardisierte Expositionsexperimente mit Tabak durch, deren Resultate Klumpp et al. (2006) beschreiben. Neben den Tabak Varietäten sind auch andere verschiedene ozonsensitive bzw. -tolerante Pflanzen-Paare bekannt, die in Wellburn und Wellburn (1996) ausführlich beschrieben werden.

Ozon induziert vor allem bei ozonempfindlichen Pflanzen bereits vor der Ausprägung makroskopisch sichtbarer Schadsymptome biochemische Veränderungen, die denen nach Pathogenbefall ähneln. Hierzu zählen u. a. die Änderungen im Polyaminstoffwechsel, eine Zunahme von Phenylpropanoid- und Flavonoidenzymen sowie die erhöhte und schnelle Emission von Ethylen (Guderian, 1985; Kangasjärvi, et al., 1994; Sandermann, 1996; Tuomainen et al., 1997; Vahala et al., 2003; Tuominen et al., 2004; Kangasjärvi et al., 2005; Castagna et al., 2007). Die Emission von Stressethylen war stets in ozonempfindlichen Pflanzen stärker als in ozontoleranten und wird daher als ein Marker der Ozonempfindlichkeit angesehen (Langebartels et al., 1991; Wellburn und Wellburn, 1996). Die Biosynthese dieses Phytohormons geht von der Aminosäure Methionin über S-Adenosylmethionin (SAM) aus, wobei SAM auch als Vorstufe der Polyaminbiosynthese dient. Ethylen ist auch an der Abwehrantwort nach Pathogenbefall sowie an der pflanzlichen Entwicklung (z. B. Seneszenz, Fruchtreife) beteiligt (Crozier et al., 2000). Unter Ozonstress wird Ethylen als Auslöser eines positiven feed back Zyklus vermehrter Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert, welches die Läsionenbildung

fördert und in wechselseitiger antagonistischer Interaktion mit Jasmonsäure fungiert (Kanna et al., 2003; Overmyer et al., 2003; Tuominen et al., 2004; Kangasjärvi et al., 2005). Ogawa et al. (2005) beschreiben darüber hinaus, dass Ethylen die SA Akkumulation bei *N. tabacum* L. cv. SR-1 unter Ozonstress (6 h, 200 ppb) durch die Geninduktion von Phenylalanine Ammoniumlyase (PAL) und Chorismate Mutase (CM) verstärkt.

Die Ozon-induzierte Expression einer Vielzahl von Abwehrgenen, die auch bei der HR (Kap. 1.4.1), nach Pathogeninfektion und der SAR (engl.: *systemic acquired resistance*; Kap. 1.4) induziert werden, kann zu Toleranz gegenüber einem späteren Befall mit einem avirulenten Pathogen führen. Dieses Phänomen wird als „Kreuzinduktion“ bezeichnet (Sandermann, 1996; Sharma et al., 1996; Bowler und Fluhr, 2000). Es gibt Anlass zu der Vermutung, dass Ozon und Pathogene einen gemeinsamen und/ oder überlappenden Signaltransduktionsweg aktivieren (Sharma und Davis, 1997).

1.4 Signalmoleküle bei der Abwehrantwort von Pflanzen

Die PR-Proteine (engl.: *pathogenesis related proteins*) von Pflanzen stellen Gruppen induzierbarer und wirtskodierter Gene dar, deren Genprodukte direkt oder indirekt Pathogene durch z. B. die Hydrolyse der Zellwand inhibieren (Kombrink und Somssich, 1995). Eine Übersicht über die Familien der PR-Proteine geben Van Loon und Van Strien (1999). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Enzyme durch ihre Aktivität die Freisetzung von Elicitoren (chemische Signalmoleküle) in Form von β -Glucanen bzw. Chitin-/Chitosan oligomeren bewirken, die die Abwehrgene in Pflanzenzellen aktivieren (Bowles, 1990; Mauch und Staehlin, 1989). Innerhalb der Gruppen unterscheidet man saure und basische PR-Proteine, wobei die sauren Isoformen hauptsächlich im Apoplasten zu finden sind. Dahingegen sind die basischen Isoformen der β -1,3-Glucanasen und Chitinasen überwiegend in der Vakuole zu finden (Van Loon und Van Strien, 1999). Durch Ozon werden diese PR-Proteine in Tabak auf Transkript- und Enzym-Ebene induziert (Ernst et al., 1992; Schraudner et al., 1992; Thalmair et al., 1996; Ernst et al., 1996, Janzik et al., 2005). Behandelt man nur einzelne Blätter oder Pflanzenteile von Tabak mit Ozon, so kommt es für eine Isoform der basischen β -1, 3-Glucanase nur zur lokalen, nicht aber zur systemischen Induktion (Ernst et al., 1996).

Die Akkumulation der PR-Proteine abseits eines Infektionsorts, wird als molekularer Marker für die Ausprägung systemischer Resistenz (engl.: *systemic acquired resistance*, SAR) in Pflanzengewebe gesehen (Ryals et al., 1996; Sticher et al., 1997). Die systemische Resistenz vermittelt nach einer lokalen Infektion die nachfolgende Resistenz der gesamten Pflanze gegenüber einem breiten Spektrum an Pathogenen (Uknes et al., 1996). Chitinasen, Glucanasen, Hydroxyprolinreiche-Glykoproteine (HRGP) und Peroxidasen sind nach der SAR Induktion stärker präsent als bei der Erstinfektion und erlauben eine schnelleren Abwehrreaktion gegenüber erneutem Pathogenbefall (Kessman et al., 1994).

Ein Signalmolekül bei der SAR ist die Salicylsäure (SA), die in Pflanzen verstärkt nach Pathogenbefall gebildet wird und verknüpft ist mit der Signaltransduktion während der Hypersensitiven Reaktion (Kap. 1.4.1) (Gaffney et al., 1993; Durner et al., 1997; Alvarez, 2000; Martinez et al., 2000). Salicylsäure wird eine Beteiligung bei der Ausprägung von Nekrosen während der Hypersensitiven Reaktion zugeschrieben, wobei hier eine enge Verflechtung zu reaktiven Sauerstoffspezies als Signalstoff diskutiert wird (Alvarez, 2000). Gegen eine Rolle von H₂O₂ als Signalstoff der Salicylsäure-vermittelten systemischen Resistenz sprechen jedoch die Versuche mit Tabak Mosaik Virus (TMV) infiziertem Tabak (Hunt et al., 1996). Es ist gezeigt worden, dass Salicylsäure die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies induzieren kann (Hunt et al., 1996; Kawano und Muto, 2000), aber das auch umgekehrt, reaktive Sauerstoffspezies die Salicylsäure Akkumulation induzieren können (Neuenschwander et al., 1995). Darüber hinaus bewirkt auch abiotischer Stress wie UV-B Strahlung (Surplus et al., 1998) und Ozon eine SA Akkumulation in Pflanzen (Yalpani et al., 1994; Sharma et al., 1996; Möder et al., 1999; Rao und Davis, 1999, Pasqualini et al., 2002; Ogawa et al., 2005). Neben SA-abhängiger Induktion von Abwehrgenen wie einiger PR-Proteine (Durner et al., 1997) sind auch SA-unabhängige Signalwege beobachtet worden. So wurde eine SA unabhängige PR-Genexpression in transgenen Pflanzen (Nah-G), die eine bakterielle Salicylat-Hydroxylase exprimieren und kein SA akkumulieren, gezeigt (Vidal et al., 1997). Darüber hinaus wird als Antagonist SA-induzierter Abwehrantwort Jasmonsäure (JA) diskutiert. So beschreiben Lorenzo und Solano (2005) in ihrer Übersicht, dass z. B. der Transkriptionsfaktor WRKY70 durch SA positiv reguliert wird, wohingegen JA negativ regulierend wirkt und die SA-induzierte Genexpression unterdrückt.

Auch Stickstoffmonoxid (NO) wird als Signalgeber bei der Abwehrantwort von Pflanzen in Synergie mit reaktiven Sauerstoffspezies (Kap. 1.4.1) sowie Jasmonsäure und Salicylsäure unterschiedlich diskutiert. So potenzierte NO den hypersensitiven Zelltod zusammen mit ROS in Soja Zellen, wohingegen die Inhibition der NO Synthese zu einer beeinträchtigten HR Antwort in pathogeninfizierten (Avirulenzgen *avrRpm1* tragende *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*) *Arabidopsis* Pflanzen führte. Darüber hinaus reduzierten NO-freisetzende Verbindungen die Läsionen bei TMV infiziertem Tabak (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Song und Goodman, 2001; Übersicht: Wendehenne et al., 2004). Nach Ozonbehandlung (6 h, 300 ppb) konnte in der ozonsensitiven *Arabidopsis thaliana* Varietät Wassilewskija (Ws-0) nach neun Stunden ein NO Burst nachgewiesen werden (Mahalingam et al., 2006). Der Einfluss von NO auf die Genexpression (2.500 Gene) wurde auch anhand von cDNA-Amplifikations-Fragmentlängen Polymorphismus (AFLP) Analysen oder der Microarray Technik (Gesamtgenom) bei *Arabidopsis thaliana* untersucht, wie in einer Übersicht von Grün et al. (2006) dargestellt wurde.

1.4.1 Hypersensitive Reaktion und oxidativer Burst

Die Wechselwirkung einer Pflanze mit einem avirulenten Pathogen führt zu einer sog. inkompatiblen Interaktion, die oft durch eine Hypersensitive Reaktion (HR) gekennzeichnet ist (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Die HR ist durch einen schnellen Zelltod charakterisiert, der auf eine geringe Anzahl von Zellen um den Ort der Infektion beschränkt bleibt, mit dem Ziel eine weitere Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze zu verhindern. Makroskopisch wird sie häufig in Form von Nekrosen sichtbar. Zu den physiologischen Veränderungen, die die HR begleiten, zählen u. a. die Deposition antimikrobieller Verbindungen, Membranschädigung, Verstärkung der Zellwände durch Lignifizierung, Phytoalexinbildung (antimikrobielle Verbindungen) und die Expression von Abwehrgenen, zu denen auch die LOX zählt. Die LOX Reaktion ist an der pflanzlichen Abwehr u. a. durch die Synthese von Signalmolekülen wie Jasmonsäure (JA) sowie durch die Bildung biologisch aktiver Verbindungen wie flüchtiger C₆-Aldehyde und -Alkohole beteiligt auf die ausführlicher in Kapitel 1.6 eingegangen wird. Besonders kennzeichnend für die Hypersensitive Reaktion ist eine schnelle Bildung großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (Kap. 1.2) dem

sog. "oxidativen Burst" (Goodman und Novacky, 1994, Kombrink und Somssich, 1995; Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Der oxidative Burst wird im Allgemeinen als eine rasche und transiente Produktion großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), als Reaktion auf Pathogene oder Elicitoren definiert. Auch Ozon wird gerne als flüchtiger Elicitor bezeichnet (Sandermann et al., 1998). Der oxidative Burst ist eine der am frühesten (innerhalb von Minuten) wahrnehmbaren Verteidigungsstrategie von Pflanzen (Apostol et al., 1989; Lamb und Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997). Dieser frühe oxidative Burst ist in kompatiblen und inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktionen festzustellen, ein zweiter oxidativer Burst jedoch nur bei letzterer Wechselwirkung (Lamb und Dixon, 1997). In Kap 1.3 wurde bereits darauf hingewiesen, dass auch Ozon in Tabak Bel W3 einen biphasischen „oxidativen Burst“ induziert (Schraudner et al., 1998).

Neben der direkt toxischen Wirkung der gebildeten ROS, wird insbesondere H_2O_2 eine Funktion als sekundärer Signalstoff bei der Signaltransduktion zur Aktivierung von Abwehrgenen, auch in Nachbarzellen, zugesprochen (Baker und Orlandi, 1995; Tenhaken et al., 1995; Low und Merida, 1996). Eine Übersicht über die duale Rolle von ROS während abiotischer Stressantworten bei Pflanzen geben Dat et al. (2000). Desweiteren ist H_2O_2 an der oxidativen Quervernetzung von Zellwandproteinen via Peroxygenase zur Verstärkung der mechanischen Barriere gegen Pathogene beteiligt und wird als "second messenger" bei der Signaltransduktion von SAR und HR diskutiert (Doke und Ohashi, 1988; Tenhaken et al., 1995; Hammond-Kosack und Jones, 1996).

1.4.2 Programmierter Zelltod

Die Allgegenwart der HR in Pathogen-infizierten, resistenten Pflanzen hat zu der Annahme geführt, dass es sich hierbei um ein kontrolliertes Absterben der Zellen, eine Form von programmiertem Zelltod (PCD) (engl: *programmed cell death*) handeln könnte (Greenberg et al., 1994). Doch auch ohne die Anwesenheit von Pathogenen oder bei sogenannten Läsionsmutanten tritt in Pflanzen HR-ähnlicher Zelltod auf. PCD in tierischen Systemen wird auch als Apoptose bezeichnet, die sich durch morphologische Charakteristika wie Chromatin Kondensation, DNA Degradation und Teilung des Zytoplasmas auszeichnet (Übersicht in: Jabs, 1999). Diese Merkmale wurden auch in Pathogen- oder Phytotoxin-behandelten Pflanzen und bei Ozon-behandelten *Arabidopsis* beobachtet (Dangl et al., 1996; Wang et al.,

1996; Mittler und Lam, 1997; Rao und Davis, 2001; Kiba et al., 2006). Neuere Studien wiesen diese morphologischen Charakteristika des PCD auch bei der Ausprägung Ozon-induzierter Nekrosen ozonsensitiver Pflanzen nach, so u. a. bei *Nicotiana tabacum* L. (Pasqualini et al., 2003) und bei der *rcd1* (engl.: *radical-induced cell death1*) Mutante von *Arabidopsis thaliana* (Overmyer et al., 2005). Eine Beteiligung des PCD an diesem Prozess wird heute weitestgehend akzeptiert. Als ein natürlicher PCD bei Pflanzen werden u. a. die Ausbildung der Siebröhrenplatten, Tracheenentwicklung, die Differenzierung des Xylems und die Degeneration der Aleuronschicht in Samen bezeichnet (Sitte et al., 1991; Übersicht in: Lam et al., 1999).

1.5 Lipide

Lipide bilden einen wichtigen Bestandteil in biologischen Systemen. Sie treten in Tieren und Pflanzen in Form von Speicherlipiden (Triglyceriden), welche als Energie- und Stoffreserven dienen oder als Membranlipide (Glykolipide, Sphingolipide mit Sterolen und Phospholipide) sog. Strukturbildnern, auf (Sitte et al. 1991; Jadhav et al., 1996).

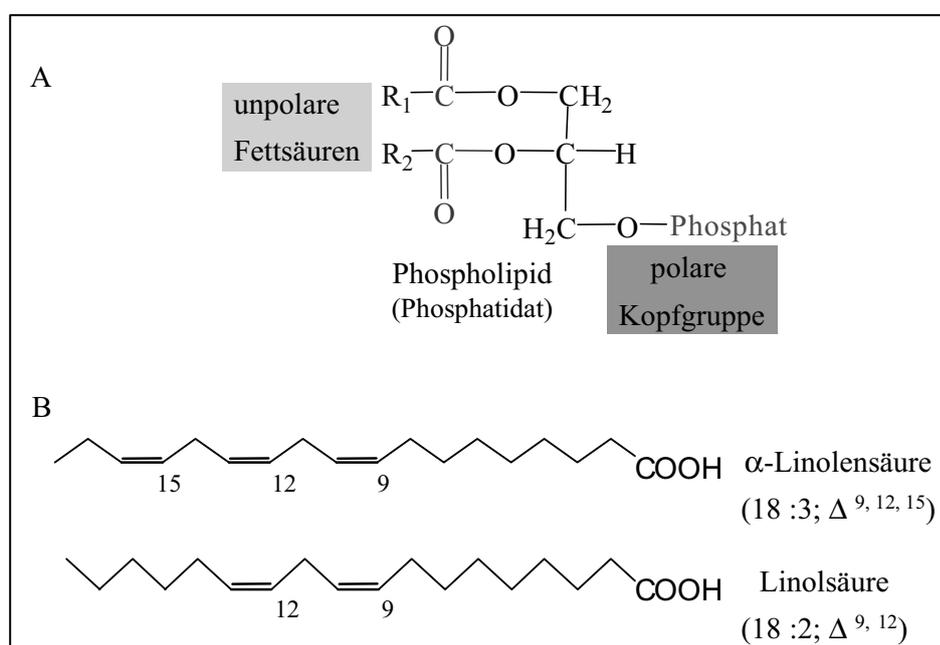


Abb. 2 Ein Phospholipid (A) und die ungesättigten Fettsäuren α-Linolensäure und Linolsäure (B).

Membranlipide bestehen aus einem Glycerin-Grundgerüst an dem die drei Hydroxylgruppen mit Glyko-, Phospho- oder Neutrallipiden verestert sind. Sie bilden

dadurch bimolekulare Lipidfilme aus, wobei die Berührungsfläche mit dem wässrigen Medium von den hydrophilen Köpfen gebildet wird und die unpolare hydrophobe Fettsäurereste dazu vorzugsweise senkrecht im Inneren der Doppelschicht aufeinandertreffen. Durch automatische Selbstorganisation entstehen dünne, flächig ausgedehnte Lipidaggregate mit fluidem Charakter (Fluidmosaik-Modell) (Sitte et al. 1991). Eine Übersicht über die in Plastiden von Pflanzen vorkommenden Lipide geben Maréchal et al. (1997). Die Fettsäuren sind im Wesentlichen in den Phospholipiden der Membranen enthalten (Abb. 2). Neben α -Linolensäure (Oktadekatriensäure; 18:3) ist Linolsäure (Oktadekadiensäure; 18:2) die am häufigsten vorkommende Fettsäure in biologischem Gewebe (Spiteller et al., 1999; Griffiths et al., 2000) und stellt einen Anteil von 69 % in Kürbis Samen (Al-Khalifa, 1996) sowie 59 % in der Phospholipidfraktion von Tabakzellkulturen (Rickauer et al., 1989) (Abb. 2).

1.5.1 Lipidperoxidation

Lipiddoppelmembranen umgeben Zellen und Organellen in Pflanzen. Ihre Semipermeabilität erlaubt Ionengradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Jeder Verlust dieser Membranintegrität durch Lipidzerstörung (Peroxidation) z. B. durch Ozon (Kap. 1.1.2) führt zu einem Verlust des Gradienten, Turgorverlust gefolgt von reduzierter Transpiration und Photosynthese bis hin zum Zelltod (Keitel und Arndt, 1983; Hogg und Kalyanaraman, 1999). Die Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren (Abb. 2B) erfolgt im Wesentlichen durch Autoxidation, die durch Radikale oder Photooxidation initiiert wurde oder enzymatisch durch die Lipoxygenase katalysierte Reaktion. Jeder der genannten Mechanismen produziert eine charakteristische Zusammensetzung an Lipidhydroperoxiden (LOOHs), die in Montillet et al. (2004) wie folgt beschrieben sind:

Linolsäure:

- a) Radikalisch: 9- und/oder 13- LOOHs ; (R- und S-Enantiomere)
- b) Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$): 9- und/oder 13- LOOHs sowie 10- und/oder 12- LOOHs; (R- und S-Enantiomere)
- c) LOX: 9- und/oder 13- LOOHs; (spezifisch nur S-Enantiomere)

Linolensäure:

- a) Radikalisch: 9- und/oder 13- LOOHs sowie 12- und/oder 16- LOOHs; (R- und S-Enantiomere)

b) Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$): 9- und/oder 13- LOOHs sowie 10- und/oder 12- LOOHs sowie 15- und/oder 16- LOOHs; (R- und S-Enantiomere)

c) LOX: 9- und/oder 13- LOOHs; (spezifisch nur S-Enantiomere)

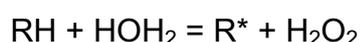
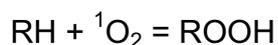
Radikale initiieren unspezifische Oxidationen ungesättigter Fettsäuren, die durch Schwermetallionen oder Häm(in)-Verbindungen begünstigt werden (Porter, 1986).

Die Photooxygenierung ist die in Anwesenheit von Photosensibilisatoren lichtabhängige Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), der direkt mit den Doppelbindungen von z. B. ungesättigten Fettsäuren zu Endohydroperoxiden, Hydroperoxiden oder Dioxetanen reagieren kann. Als Intermediärprodukte entstehen u. a. Peroxide und Zwitterionen, die ihrerseits weiterreagieren können (Elstner, 1990; Montillet et al., 2004).

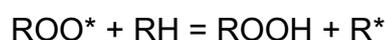
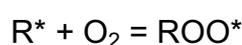
Mechanismus der Autoxidation

Greifen Radikale ungesättigte Fettsäuren (RH) an, so entstehen R^* (Fettsäure-Radikale) welche schnell mit Sauerstoff zu den relativ stabilen Peroxy-Radikalen (ROO^*) reagieren. Diese können in einer Kettenreaktion von weiteren ungesättigten Fettsäuren ein aktiviertes (Wasserstoff) H-Atom abstrahieren und so Lipidhydroperoxide (ROOHs) und weitere Fettsäure-Radikale bilden (Belitz und Grosch, 1987; Hogg und Kalyanaraman, 1999). ROOHs , die auch durch den Angriff von $^1\text{O}_2$ auf die Doppelbindungen von Fettsäuren entstehen, sind instabil und können durch bivalente Metallionen (Fe^{2+} , Cu^{2+}) zu Alkoxy-Radikalen (RO^*) gespalten werden (Spiteller et al., 1999). Durch Addition zweier Radikale oder Radikalfänger wie das membranständige α -Tocopherol (Vitamin E) stoppt die Autoxidation.

Startreaktion:



Kettenreaktion:



Peroxy- (ROO^*)-; Alkoxy- (RO^*)-; Alkyl- (R^*)-Radikale

Die Konzentration an Peroxy-Radikalen bestimmt also das Ausmaß der Lipidperoxidation (Belitz und Grosch, 1987).

Lipoxygenase (LOX) Reaktion

Die Lipoxygenase katalysiert spezifisch die Peroxygenierung von ungesättigten Fettsäuren (Kap. 1.6.1). Im Gegensatz zur Autoxidation hat diese Reaktion eine niedrigere Aktivierungsenergie (17kJ/mol) und läuft mit einer um Größenordnungen

höheren Geschwindigkeit ab (Belitz und Grosch, 1987). Sie führt unter anderem zu zahlreichen besonders potenten und biologisch wichtigen Signalverbindungen (Kap. 1.6).

Eine erhöhte LOX Aktivität wurde auch unter Ozonstress in Sojakeimlingen beobachtet (Maccarrone et al., 1992). Eine gezielte Induktion der LOX durch Ozon könnte somit neben der Autoxidation durch ROS zur Lipidperoxidation beitragen.

1.6 Lipoxygenasen in Pflanzen

Lipoxygenasen (Linoleat:Sauerstoff Oxidoreduktase, EC 1.13.11.12; LOXs) sind ubiquitär verbreitete Dioxygenasen, die ein über Aminosäureseitenketten gebundenes Eisenatom (Fe) enthalten. Sie katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einem cis, cis-1, 4-Pentadiensystem (Abb. 2 B; Abb. 3). Hierbei wird der Sauerstoffeinbau an Position C-9 durch eine 9-LOX bzw. an Position C-13 durch eine 13-LOX katalysiert, wodurch stereospezifisch ein 9S- bzw. 13S-Hydroperoxid ausschließlich in der S-Konfiguration entsteht (Abb. 4; Kap. 1.6.1; Brash 1999; Feussner, 2000; Porta und Rocha-Sosa 2002).

LOXs bilden eine große Multigen-Familie (Gardner, 1991; Prescott und John, 1996; Brash, 1999; Schaller, 2001; Nemchenko et al., 2006; Marmey et al., 2007) und sind die Schlüsselenzyme des Oktadecabiosynthese-Wegs (LOX-Weg) (Abb. 4).

Bei Säugetieren ist das bevorzugte Substrat von LOX Arachidonsäure (Eikosatetraenolsäure; $C_{20:4}$), das in die physiologisch aktiven Eicosanoide, zu denen auch die Prostaglandine und Thromboxane („Stress-Hormone“) zählen, umgesetzt wird. Die LOXs werden hier nach der Position des Sauerstoffeinbaus in die Fettsäure als 5-, 8-, 12- und 15-LOXs klassifiziert (Siedow, 1991; Staswick und Lehman, 1999; Kuhn und Thiele, 1999).

In Pflanzen kommt Arachidonsäure als natürliche Komponente der Membranen nicht oder nur in sehr geringer Menge vor (Anderson, 1989). Hier sind Linol- ($C_{18:2}$) und α -Linolensäure ($C_{18:3}$) (Abb. 2 B) die bevorzugten Substrate seltener auch Hexadecatrienolsäuren ($C_{16:3}$) (Siedow, 1991).

1.6.1 Reaktionsmechanismus, Substratspezifität und Sekundärreaktionen

Reaktionsmechanismus

LOXs stellen monomere Proteine dar, die sich in Substratspezifität, pH Optimum, Molekulargewicht, Selektivität der Oxygenierung und der Stabilität der Enzyme

unterscheiden (Axelrod et al., 1981; Siedow, 1991; Liavonchanka und Feussner, 2006). Bei den pflanzlichen LOXs katalysierten Reaktionen sind zwei Positionsisomere möglich. Der molekulare Sauerstoff kann an die Position C₉ oder C₁₃ der ungesättigten Fettsäure inseriert werden (Abb. 3) (Vick und Zimmermann, 1987b).

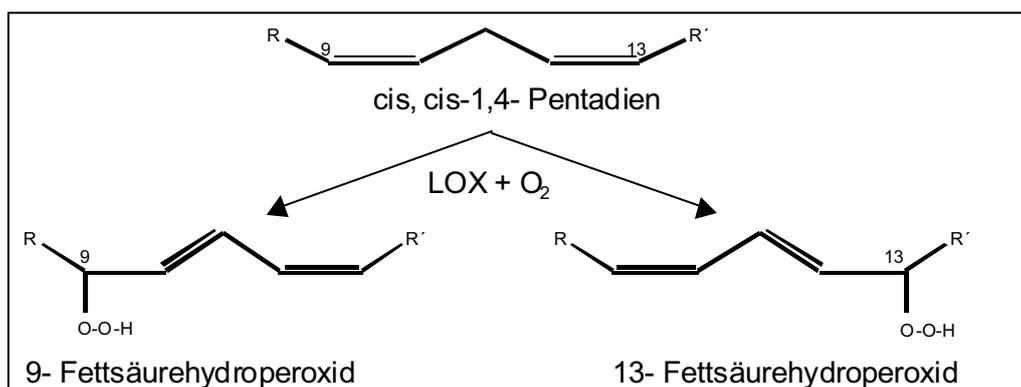


Abb. 3 Lipoxygenase (LOX) Reaktion. Dioxygenierung einer ungesättigten Fettsäure mit cis, cis-1, 4 Pentadiensystem.
R: Carboxylende; R': Methylenende.

Für die Positionsspezifität wird die Substratorientierung, d. h. ob zuerst das Methylen- oder das Carboxylende in die Substrattasche des aktiven Zentrums des Enzyms hineinragt, verantwortlich gemacht (Gardner, 1989). Dabei spielen die Ladung der Aminosäuren Histidin, Phenylalanin bzw. Valin, die in fast allen LOX konserviert sind, eine Rolle sowie ihre Auswirkung auf die Größenausbildung der Substrattasche (Feussner, 2000; Liavonchanka und Feussner, 2006; Marmey et al., 2007). Unterstützt wird diese Aussage durch Mutationsversuche mit Lipidkörper-LOX der Gurke. Hierbei erfolgte der Austausch eines Histidins (H608) durch Valin im aktiven Zentrum des Enzyms, was eine veränderte Substrattasche zur Folge hatte. Eine 13-LOX konnte so in eine 9-LOX umgewandelt werden (Hornung et al., 1999). Konservierte Regionen von Aminosäureresten pflanzlicher LOX scheinen somit über die Positionsspezifität 9- oder 13-LOX zu bestimmen. Sequenzvergleiche zeigen, dass pflanzliche 9-LOX durch das Vorkommen der Aminosäuren Thyrosin/Valin um die Position 584 u. a. bei Tabak LOX1 (X84040), Weizen LOXA (L35931) und Baumwolle GhLOX1 (DQ861284) determiniert werden (Hornung et al., 1999; Liavonchanka und Feussner, 2006; Marmey et al., 2007). Neuere phylogenetische

Stammbaumanalysen der inzwischen zahlreichen Sequenzinformationen geben eine Übersicht der 9- oder 13-LOXs vieler Pflanzenspezies (Schaller, 2001; Agrawal et al., 2004; Zhang et al., 2006; Nemchenko et al., 2006; Lang und Feussner, 2007; Marmey et al., 2007). Der genaue Reaktionsmechanismus der LOX ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Die Aktivierung des Enzyms erfolgt wahrscheinlich durch Oxidation seines Fe(III) zu Fe(II) durch das Hydroperoxid-Produkt, wobei das Enzym jedoch in der Lage ist die Katalyse auch ohne vorhandene Hydroperoxide zu starten (Belitz und Grosch, 1987). Nach einem generell akzeptiertem Modell wird ein H-Atom von der allylständigen Methylengruppe des Fettsäure-Substrates abstrahiert und als Zwischenschritt ein Peroxyradikal mit delokalisiertem Elektronenzustand gebildet. Dieses reagiert schnell mit Sauerstoff und einem Proton wobei das Fe(II) des Enzyms zum Fe(III) oxidiert wird und das Lipidhydroperoxid-Produkt entlässt (Belitz und Grosch, 1987; Mueller, 1997; Blée, 1998).

Substratspezifität

Die Positionsspezifität wird durch den vorherrschenden pH-Wert des Umgebungsmilieus beeinflusst (Gardner, 1989). So zeigt LOX-1 aus den Kotyledonen der Sojabohne ein pH Optimum von 9.0 und setzt Linolsäure hauptsächlich zu 13-Hydroperoxiden um. Im Gegensatz dazu wandeln LOX-2 und LOX-3 mit pH Optima von 6.5 bzw. 7.0, das Substrat zu gleichen Teilen in 13- und 9-Hydroperoxide um (Siedow, 1991).

In den 1970ern wurde eine Nomenklatur entwickelt, die auf diesen unterschiedlichen pH-Aktivitäten beruht. Als Typ-1 LOX wurden LOX mit hohem pH Optimum (~ pH 9.0) bezeichnet und als Typ-2 LOX solche mit niedrigem (~ pH 7.0) (Galliard und Chan, 1980). Typ-1 LOXs setzen nur freie Fettsäuren mit hoher Stereospezifität um, wohingegen Typ-2 LOXs weniger spezifisch als Katalysatoren der Autoxidation wirken können und auch veresterte Substrate, wie Phospholipide (Abb. 2), metabolisieren (Siedow, 1991). Das LOXs veresterte Fettsäuren als Substrate verwenden können wurde *in vitro* an isolierten Membranen (Maccarrone et al., 1994) und bei der 13-LOX aus Lipidkörpern gezeigt (Feussner et al., 2001). Die Vorarbeit einer Lipase entfällt somit.

Typ-2 LOX können zudem Carotinoide und Chlorophylle co-oxidieren (Belitz und Grosch, 1987; Siedow, 1991), was einige Autoren auf ein vom Enzym entlassenes Peroxyradikal zurückführen (Gardner, 1991). Andere Studien jedoch beschreiben,

dass die Peroxyl-Radikal-Zwischenstufen den Enzymkomplex nicht verlassen können (Spiteller, 2003).

Shibata und Mitarbeiter führten 1994 eine neue Nomenklatur für pflanzliche LOX ein, die auch im Rahmen dieser Arbeit Verwendung findet. Sie basiert auf Homologien in den cDNA-Sequenzen. Enzyme, die kein chloroplastidäres Transitpeptid besitzen werden als LOX1-Typ bezeichnet und besitzen untereinander eine Aminosäure-Sequenzhomologie von ~ 75 %. LOXs, die ein chloroplastidäres Transitpeptid am N-terminalen Ende besitzen werden als LOX2-Typ bezeichnet und sind untereinander weniger homolog (~ 35%). Neben diesen beiden Klassifizierungen tauchen in der Literatur auch Bezeichnungen von 9- und 13-LOX auf, die sich in Anlehnung an die in tierischen Systemen verwendete Nomenklatur nach dem Einbau des Sauerstoff an die Position 9- oder -13 der Fettsäure richten (Feussner und Wasternack, 2002). Pflanzliche Typ2 LOX mit chloroplastidärem Transitpeptid wurden bisher immer als 13-LOX beschrieben und es ist bislang keine plastidäre 9-LOX bekannt. Demgegenüber wurden Typ1 LOX ohne chloroplastidäres Transitpeptid sowohl als 9-LOX (Typ1 9-LOX) als auch als 13-LOX (Typ1 13-LOX) nachgewiesen (Feussner und Wasternack, 2002; Liavonchanka und Feussner, 2006).

Sekundär-Reaktionen

Neben den Primärreaktionen der LOX gibt es auch Sekundärreaktionen, die Produkte abweichend von den klassischen Fettsäurehydroperoxiden bilden. Hierzu zählen z. B. die zuvor beschriebenen co-Oxidationen der Carotinoide und Chlorophylle, worauf sich der ursprüngliche Name des Enzyms als Carotin-Oxydase begründet (Gardner, 1991). Auch Pestizide (Xenobiotics) können co-oxidiert werden. So wurde das Pestizid Aminocarb durch LOX Wasserstoffperoxid-vermittelt N-demethyliert (Hydroperoxidase Aktivität) (Hu und Kulkarni, 1998).

Hauptsächlich bei Sauerstoffmangel im Gewebe kann es vorkommen, dass LOXs vorhandene Hydroperoxide ein weiteres Mal metabolisiert (Jolivet und Bergeron, 1988; Grechkin et al., 1991). Unter diesen Bedingungen kann LOXs auch eine Lyase ähnliche Reaktion (homolytische 13-Hydroperoxid -O-O- Spaltung mit Alkoxy-Intermediaten) katalysieren, die flüchtige Pentan-Verbindungen und 13-oxo-9(Z),11(E)-oktadekadiensäuren (13-OTA) entlässt. Dieses wurde bei LOX aus Sojabohnen Samen und der Alge *Chlorella pyrenoidosa* beobachtet (Salch et al., 1995; Nuñez et al., 2000). Auch bei *Arabidopsis thaliana* Hydroperoxid-Lyase

Knockout Mutanten nahm die LOX Enzymaktivität zu und führte im Vergleich zum Wildtyp zu vierfach erhöhten C₅-Emissionen (Salas et al., 2006). Für 13-OTA wurden antifungizide Eigenschaften beschrieben (Kondo et al., 1995). Cucurou et al. (1991) beschrieben eine Peroxidase-ähnliche Aktivität der LOX bei verschiedenen Substraten. Darüber hinaus zeigten neuere Ergebnisse, dass 4 Hydroxy-2(E)-Alkenale durch Autoxidation von 3(Z)-Hexenal, 3(Z) –Nonenal und Traumatin *in vitro* entstanden (Noordermeer et al., 2000).

1.6.2 Intrazelluläres Vorkommen

LOXs lassen sich in Pflanzen in nahezu jedem Gewebe (Kotyledonen, Wurzel, Blätter, Früchte und Blüten) nachweisen wobei die gewebespezifische Expression sehr stark vom Entwicklungszustand und den äußeren Einflüssen der Pflanzen abhängt (Rosahl, 1996).

Bei dem Großteil der beschriebenen LOXs handelt es sich um cytosolische Proteine (Hildebrand, 1989; Siedow, 1991). Sie kommen jedoch auch in der Vakuole (Wardale und Lambert, 1980, Tranbarger et al., 1991), den Chloroplasten (Bell und Mullet, 1993; Feussner et al., 1995a; Royo et al., 1996; Heitz et al., 1997; Schaffrath, et al., 2000), im Apoplasten (Membran-assoziiert) von *Phaseolus vulgaris* L. (Sicilia et al., 2005) und in Wurzelknöllchen von Erbsen (Gardner et al., 1996) vor. Außerdem lassen sich LOXs in mikrosomalen Membranfraktionen (Bostock et al., 1992) sowie in den Lipidkörpern fetthaltiger Samen (Feussner und Kindl, 1992), und als Plasmamembran-gebundene Isoformen (Fornaroli et al., 1999; Vianello et al., 1995; Baracat-Pereira et al., 2001) detektieren. Bei letzterem wurde jedoch keine Aussage darüber getroffen, auf welcher Seite der Plasmamembran die LOX lokalisiert war.

Eine Übersicht zu dem Vorkommen von LOXs in Samen findet sich bei Loiseau und Mitarbeitern (2001).

1.6.3 Die physiologische Bedeutung der Lipoxygenasen

Viele physiologische Rollen für pflanzliche LOXs werden in der Literatur diskutiert. Sie scheinen bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen genauso beteiligt zu sein, wie bei der pflanzlichen Stressantwort.

Wachstum und Entwicklung

Bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen wurde eine erhöhte LOX Aktivität beobachtet (Siedow, 1991; Zhang et al., 2006). Ebenso wie bei der Fruchtreife

(Kausch und Handa, 1997; Zhang et al., 2006) und der Seneszenz (Thompson et al., 1987; Fukuchi-Mizutani et al., 2000). Ein typisches Merkmal der Seneszenz ist der Verlust der Membranintegrität, die durch Lipidperoxidation verursacht wird (Rosahl, 1996). Dies kann enzymatisch durch LOX sowie freier werdender Radikale erfolgen (Thompson et al., 1987). Gegenteilige Meinungen bezweifeln die Beteiligung von LOX bei der Seneszenz (Siedow, 1991). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass evtl. nur bestimmte LOX-Isoformen bei der Seneszenz induziert werden (Rosahl, 1996).

Desweiteren ist LOX bei der Aktivierung der Speicherlipide in Gurken (Feussner und Kühn, 1995) und bei der Keimung (Kubicka et al., 2000; Porta et al., 1999; Terp und Brandt, 2000) beteiligt. Diskutiert wird hier die Funktion der LOX zusammen mit Lipasen und reduzierender Enzyme in der Mobilisierung von Lipiden und der Bereitstellung reduzierender Äquivalente und Acetyl-CoA. Diese Verbindungen sind für Synthese-Prozesse während des Wachstums des keimenden Embryos notwendig (Hildebrand, 1989; Feussner und Kindl, 1992; Feussner et al., 2001). Widersprüchliche Ergebnisse bei Studien mit Tripel-Null-Linien, d. h. Soja-Samen ohne drei LOX Isozyme, ergaben jedoch keinen Zusammenhang zwischen Wachstum und Entwicklung (Narvel et al., 1998).

Auch bei der Knollenbildung von Kartoffeln scheint LOX indirekt, durch die Bildung von Tuberonsäure, involviert zu sein (Rosahl, 1996; Kolomiets et al., 2001). In neueren Studien wird hingegen vorgeschlagen, dass durch die Weitermetabolisierung von Tuberonsäure (12-OH-JA) überschüssige JA inaktiviert wird (Wasternack et al., 2006).

LOX ist außerdem bei der zeitweiligen Speicherung von Stickstoff (N_2) in vegetativem Gewebe von Sojabohnen beteiligt und wird daher als Vegetatives-Speicher-Protein (engl.: *vegetative storage protein*; VSP) bezeichnet (Fischer et al., 1999).

Pflanzliche Stressantwort

Bei der pflanzlichen Stressantwort kommt den LOXs eine bedeutende Rolle zu. Die Induktion der LOXs durch a) abiotische- b) chemische- oder c) biotische- Induktoren führt zur Bildung von 9(S)- bzw. 13(S)-Fettsäurehydroperoxiden (Abb. 3), die durch eine Vielzahl von Enzymreaktionen weiter umgesetzt werden (Abb. 4). Ausgehend von Linolensäure können 9(S)- bzw. 13(S)-Hydroperoxyoctadecatriensäuren durch eine 9- bzw. 13-LOX gebildet werden (Abb. 4). In den nachfolgenden

Reaktionswegen werden wichtige Metabolite gebildet, die toxisch auf Pathogene wirken oder die Induktion von Abwehrgenen auslösen können. Hier ist vor allem die Bildung der Jasmonate (Kap. 1.7.5) und der C₆- und C₉-Aldehyde (Kap. 1.7.6) mit ihren antimikrobiellen Eigenschaften, zu nennen.

Die einzelnen Reaktionswege mit ihren Metaboliten und physiologischen Funktionen sind unter Kap. 1.7 und in Abb. 4, ausgehend von α -Linolensäure als Substrat, ausführlicher dargestellt.

a) Abiotische Induktoren

Eine Induktion der LOX auf Transkript- und/oder Protein-Ebene erfolgt durch osmotischen Stress (Aziz und Larher, 1998; Maccarrone et al., 2000), mechanische Belastung (Wind) (Mauch et al., 1997) bzw. Berührungsreize bei der Rankenkrümmung von *Bryonia dioica* (Weiler et al., 1993) und durch Ozon in Sojakeimlingen (Maccarrone et al., 1992). Zahlreiche Untersuchungen zeigen auch eine schnelle LOX-Induktion (max. bei ca. 2 h) nach Verwundung (Porta et al., 1999; Royo et al., 1996; Heitz et al., 1997; Ievanish, 1992; Saravitz und Siedow, 1996; Bell und Mullet, 1993). Desweiteren wurde die LOX Aktivität durch Bestrahlung mit ultraviolett-B Licht in Weizen (An et al., 2000) und in *Nicotiana longiflora* Cav. (Izaguirre et al., 2003) sowie durch Kälte- oder Trockenstress in Bohnen (Porta et al., 1999; Nemchenko et al., 2006) induziert.

b) Chemische Induktoren

In Reis (*Oryza sativa*) bewirken chemische Pflanzenstärkungsmittel wie BTH (Benzo (1, 2, 3) thiadiazol-7-thiocarbonsäure S-methylester: BION-Wirkstoff), die als Herbizid eingesetzte 2,6-Dichloroisoinikotinsäure (INA; funktionales Analogon von SA) und Probenazol, eine LOX-Induktion (Schaffrath et al., 2000). Außerdem können exogen applizierte Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA) (Porta et al., 1999; Nemchenko et al., 2006) und Methyljasmonat (MeJA) (Bell und Mullet, 1993), die Verbindungen Dinatriumphosphat (Avdiushko et al., 1993) und die als Signalstoff diskutierte Salicylsäure (SA) (Feussner et al., 1997; Weichert et al., 1999; Nemchenko et al., 2006) eine LOX-Induktion auslösen.

c) Biotische Induktoren

Besonders intensiv untersucht wurde die Reaktion pflanzlicher LOX nach Pathogenbefall oder der Applikation verschiedener von Pathogenen stammender Elicitoren. Hierbei stellte man fest, dass die LOX Aktivität bei einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion schneller und stärker ansteigt als nach einer

kompatiblen Interaktion. Dies ließ eine Beteiligung der LOXs an dem schnellen Zelltod während der HR vermuten (Slusarenko et al., 1991). In transgenen Tabakpflanzen, die eine LOX-Antisense exprimieren, konnte die inkompatible Pflanze-Pathogen-Interaktion unterdrückt werden. Dies unterstreicht die Relevanz von LOXs bei der Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene (Rancé et al., 1998).

Die LOX wird auf Transkript und/oder Protein Ebene nach Infektion mit Elicitoren (Rickauer et al., 1990; Bostock et al., 1992; Fournier et al., 1993; Bohland et al., 1997; Rustérucci et al., 1999; Göbel et al., 2001; Cacas et al., 2005), pilzlichen Pathogenen (Lupu et al., 1980; Ocampo et al., 1986), Bakterien (Keppler und Novacky, 1987; Melan et al., 1993; Fidantsef et al., 1999; Kolomiets et al., 2000; Marmey et al., 2007) und Viren (Avdiushko et al., 1993) induziert. Doch auch Organismen wie Insekten induzieren durch ihren Fraßschaden LOXs (Stotz et al., 2000).

1.7 Metabolite und weitere Enzyme des LOX-Reaktionsweges

LOXs bilden als Schlüsselenzym des Octadecanoid Stoffwechselweges die Produkte 9- bzw. 13- Hydroperoxide aus den Fettsäuren (FS) Linolsäure (LA) bzw. α -Linolensäure (LE) (Abb. 2 und Abb. 3), die als Substrat für nachfolgende konkurrierende Stoffwechselwege dienen können (Gardner, 1991; Blée, 1998; Feussner und Wasternack, 2002). Zu den bisher beschriebenen Metabolisierungsrouten zählen die Stoffwechselwege der Peroxygenase (POX), der 9- bzw. 13-Allenoxid-Synthase (AOS), der 9- bzw. 13-Hydroperoxid-Lyase (HPL), der 9- bzw. 13-Divenylether-Synthase (DES) sowie die weniger gut charakterisierten Reaktionswege der Reduktase- und Epoxy-Alkohol-Synthase (EAS) (Feussner und Wasternack, 2002). Darüber hinaus kann LOX, wie bereits in Kap. 1.6.1 unter Sekundärreaktionen beschrieben, vorhandene Hydroperoxide ein weiteres Mal zu z. B. 9- oder 13-Ketooctadecatriensäuren metabolisieren (Abb. 4). Die genannten Reaktionswege werden zusammen mit der physiologischen Bedeutung ihrer Metabolite, nachfolgend beschrieben und sind in Abb. 4 vereinfacht, ausgehend von α -Linolensäure als Substrat, dargestellt.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass ein Teil der Fettsäuren Linol- und Linolensäure jedoch auch durch eine α -Dioxygenase (α -DOX) u. a. zu (2R)-Hydroperoxyoctadecatriensäure metabolisiert (Abb. 4; Hamberg et al., 1999; Saffert et al., 2000; Hamberg et al., 2005; Velloso et al., 2007) oder via Radikal-

vermittelter Autoxidation zu Phytoprostanen, Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen, umgewandelt werden können (Parchmann und Mueller, 1998; Imbusch und Mueller, 2000). So zeigen Studien die Akkumulation von freien und veresterten F1-Phytoprostanen in mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infizierten *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn Col-0 (Grun et al., 2007). Darüber hinaus wurde in transgenen *Arabidopsis thaliana* α -DOX1 histochemisch in epidermalen Zellen der Wurzel nachgewiesen und α -DOX2 in den Wurzeln und im Blattgewebe (Vellosillo et al., 2007).

1.7.1 Der Reduktase Weg

In dem bisher weniger gut charakterisierten Hydroperoxid-Reduktase Weg erfolgt eine POX-unabhängige Reduktion der Lipidhydroperoxide in ihre korrespondierenden Hydroxide wie z. B. der (9S)- bzw. 13(S)-Hydroxyoctadecatriensäure (Abb. 4; Feussner und Wasternack, 2002).

1.7.2 Der Epoxy-Alkohol-Synthase Weg

Die Epoxy-Alkohol-Synthase (EAS) katalysiert die intramolekulare Umlagerung der Lipid-Hydroperoxide. In Kartoffel-Blättern werden 95% der Linolsäure durch eine 9-LOX zu 9-Hydroperoxiden umgesetzt und anschließend durch EAS zu Epoxy-Alkoholen, mit antifungizider Wirkung, metabolisiert (Hamberg, 1999). Ausgehend von α -Linolensäure können durch EAS die folgenden Produkte gebildet werden 11, 12-epoxy-(13S)-Hydroxyoctadecadiensäure und 9, 10-epoxy-(13S)-Hydroxyoctadecadiensäure, sowie (10S, 11S)-epoxy-(9S)-Hydroxyoctadecadiensäure und (12R, 13S)-epoxy-(9S)-Hydroxyoctadecadiensäure (Abb. 4). Die Epoxygruppen können anschließend zu Hydroxygruppen durch die Epoxidhydrolase (EH; EC 3.3.2.3) hydrolysiert werden, so dass Mono-, Di- und Trihydroxyfettsäuren, wie z. B. (11S, 12S, 13S)-Trihydroxyoctadecadiensäure und (9S, 10S, 13S)-Trihydroxyoctadecadiensäure, sowie (9S, 12S, 13S)-Trihydroxyoctadecadiensäure und (9S, 10S, 11S)-Trihydroxyoctadecadiensäure entstehen (Abb. 4; Blée, 1996; Blée, 1998). Auf die physiologische Bedeutung der Epoxidhydrolasen wird nachfolgend in Kap. 1.7.3 nochmals eingegangen.

1.7.3 Der Peroxygenase Weg

Peroxygenase (POX), auch als Epoxygenase bezeichnet, ist ein vorrangig in Mikrosomenfraktionen beobachtetes Häm-Protein. Es reagiert mit den

Fettsäurehydroperoxiden nach der heterolytischen Sauerstoff-Sauerstoff Spaltung entweder intra- oder intermolekular. Bei der intramolekularen Reaktion wird ein Sauerstofftransfer innerhalb der 9- bzw. 13-Hydroperoxide katalysiert und es entstehen Epoxyalkohole. Die intermolekulare Reaktion zeichnet sich durch den direkten Transfer von Sauerstoff aus einem Hydroperoxid auf ein weiteres Akzeptormolekül (z. B. ungesättigte Fettsäuren, aromatische Verbindungen) aus. Dies wird auch als Kooxidations-Reaktion der POX bezeichnet und es entstehen Mono- und Diepoxyde (Blée, 1998), wie (12R, 13S)-Epoxyoctadecadiensäure und (9R, 10S)-Epoxyoctadecadiensäure (Abb. 4). Die Epoxygruppen können anschließend zu Hydroxygruppen durch die Epoxidhydrolase (EH; EC 3.3.2.3) hydrolysiert werden, so dass Mono-, Di- und Trihydroxyfettsäuren entstehen (Kap. 1.7.2; Blée, 1996; Blée, 1998). Auch das Aldehyd (3Z)-Alkenal kann als Substrat für POX dienen und wird zu 4-Hydroxy-(2E)-Alkenal umgesetzt (Katamura und Gardner, 1996), wobei andere Autoren hierin jedoch einen nicht-enzymatischen Prozess sehen (Noordermeer et al., 2000).

Newman et al. (2005) geben eine Übersicht über die ubiquitär verbreiteten Epoxidhydrolasen. In Pflanzen werden EHs als Mono- oder Dimere Proteine beschrieben, die im Cytosol oder den Glyoxysomen vorkommen können. EHs existieren hauptsächlich in löslicher Form wobei auch wenige Mikrosomen-asoziierte Formen beschrieben wurden. Als Substrat werden hauptsächlich Hydroxy-/Epoxyfettsäuren genannt. EHs wurden bisher aus verschiedenen Pflanzenspezies isoliert u. a. aus Tabak (Guo et al., 1998), Sojabohnen (Arahira et al., 2000) und Zitrus (Gomi et al., 2003) wobei mehrere Isoformen vorkommen können (Newman et al., 2005). Ihre Enzymaktivität und Substratspezifität wurde auch anhand rekombinanter Proteine untersucht (Summerer et al., 2002). EHs werden u. a. durch Pathogene in Tabak und Zitrus induziert (Guo et al., 1998; Gomi et al., 2003).

Physiologische Bedeutung der Metabolite des POX-Weges

POX wird als ein Schlüsselenzym bei der Synthese der Kutikula beschrieben vornehmlich bei den Pflanzen, die hierzu C18-Monomere verwenden. Bei Mais (*Zea mays* var. LG11) führte die Inhibition der POX zu einer veränderten Kutikula und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Pilzbefall (*Cochliobulus heterostrophus*) (Lequeu et al., 2003). Die nach Stresseinwirkung durch POX gebildeten Epoxide werden als toxische Verbindungen eingestuft, die u. a. aufgrund ihrer Reaktivität mit Nukleinsäuren Mutationen auslösen können. Sie besitzen antifungizide Eigenschaften und haben Bedeutung als Vorstufe der Kutin-Synthese (Blée, 1996).

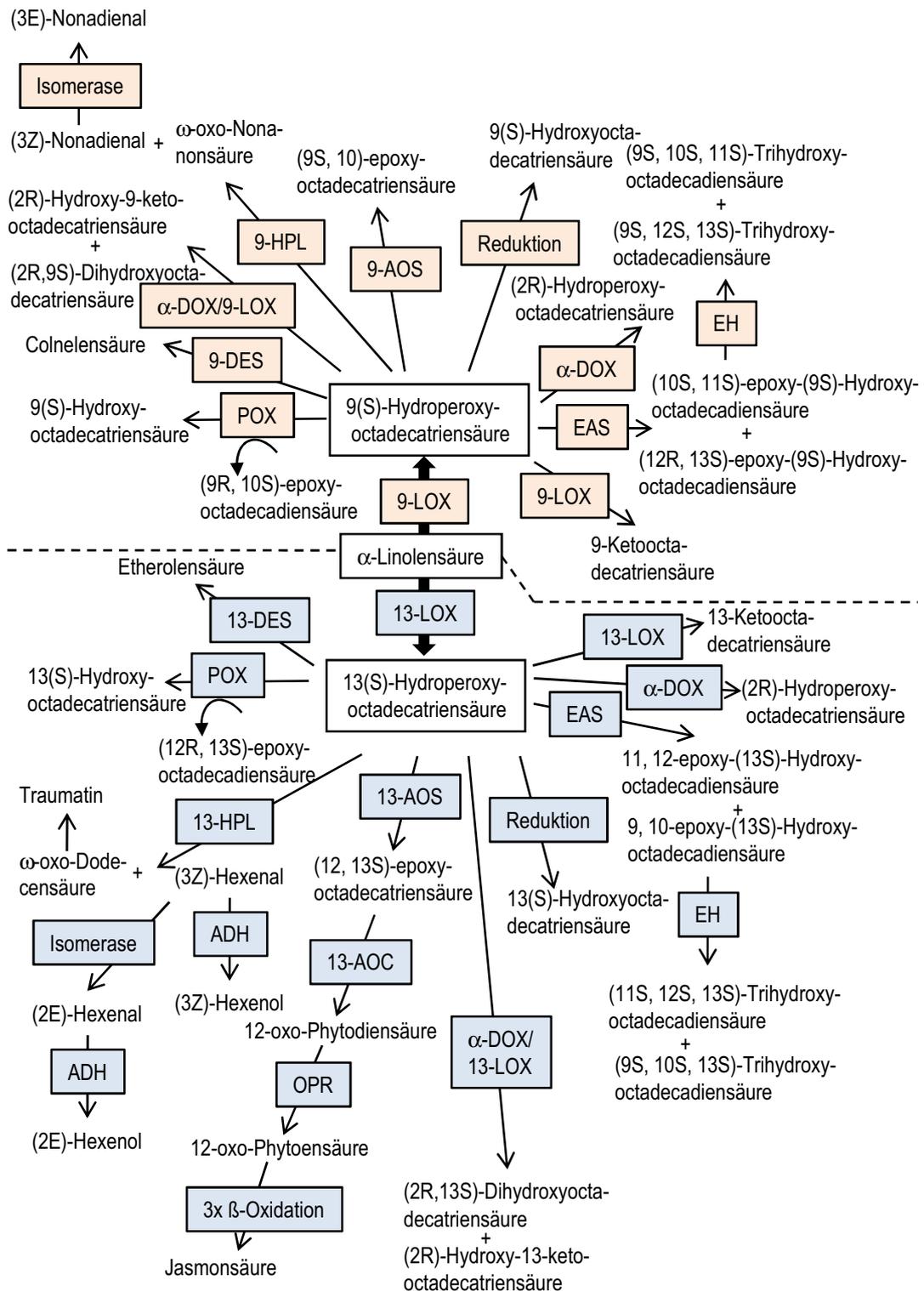


Abb. 4 Der Lipoxygenase (LOX) Weg ausgehend von α -Linolensäure als Substrat (Darstellung verändert nach Feussner und Wasternack, 2002). Erläuterungen im Text.

Die physiologische Funktion der EHs in Pflanzen ist noch nicht vollständig geklärt und neben einer Beteiligung an der Abwehrantwort gegen Pathogene wird auch eine am Entwicklungsprozeß diskutiert (Newman et al., 2005). So wurden EHs im Meristem nachgewiesen was die Autoren als mögliche Beteiligung an entwicklungsspezifischen Prozessen werteten (Stapleton et al., 1994). Desweiteren wird die Entgiftung der im POX Weg gebildeten reaktiven Epoxide diskutiert. Auch eine Beteiligung an der Verstärkung bzw. Wiederherstellung beschädigter Kutikula, die eine Barriere gegen Pathogene darstellt, wird angenommen (Blée, 1996; Guo et al., 1998; Newman et al., 2005). Zudem bilden sie in Kartoffelblättern Trihydroxy-Oxylipine, die toxisch auf Pathogene wirken (Hamberg, 1999).

1.7.4 Der Divenylether-Synthase Weg

Die 9-Divenylether-Synthase (DES; CYP74D) bildet aus Lipidhydroperoxiden Colnel (CA)- oder Colnelensäure (CnA) (Grechkin, 1998; Hamberg, 2000). Belegt wurde dies auch durch die reduzierte Bildung von CA und CnA bei transgenen Kartoffelpflanzen, die ein RNA Interferenz Konstrukt der 9-DES exprimieren (Eschen-Lippold et al., 2007). CA und CnA akkumulieren in Tabak, Tomate und Kartoffel nach Pathogeninfektion und zeigen antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *Phytophthora infestans* und *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* (Ppn 0) (Weber et al., 1999; Itoh und Howe, 2001; Stumpe et al., 2001; Göbel et al., 2003; Fammartino et al., 2007). Eine 9-/13-DES wurde darüber hinaus kürzlich in *Allium sativum* beschrieben (Stumpe et al., 2008), fehlt jedoch im Genom von *A. thaliana*. Die Umsetzung von (13S)-Hydroperoxylinolensäure durch eine 13-DES führt zu Etherolensäure (Abb. 4). Dies ist ein Beispiel, dass nicht alle LOX-Weg Enzyme in unterschiedlichen Pflanzenspezies gleichermaßen vorkommen (Blée, 2002). Colnelensäure ist zudem ein potenter Inhibitor von LOX aus Kartoffel und scheint daher eine regulatorische Funktion zu erfüllen (Corey et al., 1987). Neuere Untersuchungen mit Tabak zeigen, dass es nach Pathogeninfektion zu einer lokalen und transienten Transkriptakkumulation von 9-DES (*NtDES1*) kommt, die zusammen mit der gleichsam exprimierten 9-LOX (*NtLOX1*) zu wirken scheint. Beide Enzyme wurden im Cytosol detektiert (Fammartino et al., 2007).

1.7.5 Der Allenoxid-Synthase Weg (Jasmonat-Kaskade)

Die Allenoxid-Synthase (AOS; EC 4.2.1.92; CYP74 A), früher auch als Hydroperoxid-Dehydrase bzw. Isomerase bezeichnet (Grechkin, 1998), dehydriert

13- und/ oder 9-Hydroperoxyfettsäuren zu den instabilen Allenoxiden wie z. B. (12, 13S)- bzw (9S, 10)-Epoxyoctadecatriensäure (Abb. 4; Vick und Zimmermann, 1987b; Schaller, 2001; Stumpe et al., 2006). Die Intermediate für die biologisch aktive Jasmonsäure entstehen jedoch spezifisch nur aus der Dehydratation von 13(S)-Hydroperoxylinolensäure (Abb. 4; Ziegler et al., 2001). In *Arabidopsis* und Tomate sind die AOSs in den Chloroplasten lokalisiert (Laudert et al., 1996; Howe et al., 2000; Sivasankar et al., 2000). Auch in transgenen Kartoffelpflanzen sorgte das Transitpeptid, das an ein aus Flax stammendes AOS Gen gebunden war, für die Direktion zu den Chloroplasten (Harms et al., 1995). Ebenso wurde die Sequenz für das Chloroplasten Signalpeptid bei *GmAOS1* und *GmAOS2* aus Sojabohne nachgewiesen. Nach Expression in *Escherichia coli* bevorzugten beide Enzyme 13-Linol- bzw. 13-Linolensäurehydroperoxide als Substrat (Kongrit et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde jedoch bei neueren Untersuchungen mit Kartoffel eine 9-AOS (*StAOS3*) nachgewiesen, die bevorzugt 9-Hydroperoxylinolsäure umsetzt und histochemisch in Amylo- und Leukoplasten lokalisiert wurde. Transkripte dieser *StAOS3* wurden hauptsächlich in unterirdischen Organen wie Wurzeln und Knollen detektiert, aber nicht in Blättern (Stumpe et al., 2006).

AOS (CYP74 A) gehört zur CYP74 Familie, einem atypischen Mitglied der P450-Monooxygenasen. Das Enzym braucht weder molekularen Sauerstoff, noch NADPH abhängige Cytochrom-P450-Reduktase für seine enzymatische Aktivität und weist eine geringe Affinität zu Kohlenstoffmonoxid (CO) auf (Laudert et al., 1996; Blée, 1998). Induziert wird AOS auf Transkriptebene u. a. durch Verwundung, Herbivorenbefall oder exogen appliziertes Sorbitol bzw. Glukose (Harms et al., 1998; Laudert und Weiler, 1998; Howe et al., 2000; Sivasankar et al., 2000; Ziegler et al., 2001). Diese Ergebnisse legen für AOS eine wichtige regulatorische Rolle bei der Biosynthese von Jasmonsäure nahe. In nachfolgenden Reaktionen können die Allenoxide spontan zu α - und γ -Ketolen zerfallen, zu racemischen cis-12-oxo-Phyto(di)ensäure zyklisieren oder sie werden durch Allenoxid-Cyclase (AOC; EC 5.3.99.6; Chloroplast) zu enantiomeren cyclischen fünf-Keton-Ringen 12-oxo-Phyto(di)ensäure (cis(+)-OPDA) umgesetzt (Abb. 4; Blée, 1998; Hofmann et al., 2006). Für diese Umsetzung zu OPDA wird z. B. für *Arabidopsis thaliana* eine AOS-AOC2 gekoppelte Reaktion vermutet (Hofmann et al., 2006). AOC wurde aus Weizen (Maucher et al., 2004), Reis (Agrawal et al., 2003); Tomate (Hause et al., 2000; Ziegler et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (AOC1 –4) (Stenzel et al. 2003;

Stenzel et al. 2003b) und Maiskörnern isoliert und bei letzteren als lösliches dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 47 kD bestimmt (Ziegler et al., 1997). Hofmann et al. (2006) hingegen charakterisierte bei neueren Untersuchungen zur Aufklärung der Kristallstruktur die AOC2 als trimeres Protein bei *Arabidopsis thaliana*. Es wird der Proteinfamilie Lipocalin zugeschrieben, die den Transport kleiner hydrophober Moleküle vollbringt. AOC wurde immunhistochemisch in den Chloroplasten nachgewiesen und ein N-terminales Transitpeptid detektiert (Stenzel et al. 2003; Stenzel et al. 2003b; Ziegler et al., 1997).

Durch Reduktion der von Linolensäure abgeleiteten 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) durch das zytosolische Flavoprotein 12-oxo-PDA- Δ ¹⁰-Reduktase (OPR) (Schaller und Weiler, 1997; Schaller et al., 1998) und Verkürzung der Kohlenstoffseitenkette durch dreimalige β -Oxidation entsteht die biologisch aktive instabile (+)-7-iso-Jasmonsäure (JA), die zu dem stabileren Stereoisomer (-)-JA epimerisiert (Abb. 4; Wasternack und Parthier, 1997). In früheren Studien wurde angenommen, dass OPDA aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert und hier durch die OPR reduziert wird (Schaller und Weiler, 1997; Schaller et al., 1998; Schaller, 2001). Neuere immunohistochemische Untersuchungen wiesen jedoch bei Tomaten und *Arabidopsis* OPR-Proteine und -Aktivität nur in Peroxisomen nach (Strassner et al., 2002). Wie OPDA aus den Chloroplasten in die Peroxisomen transportiert wird bzw. in welchem Zellkompartiment die β -Oxidation letztlich stattfindet ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Von den OPR1- OPR3 aus *A. thaliana*, setzte nur OPR3 das Substrat (9S, 13S-12-OPDA) am effektivsten und mit der größten Spezifität um (Schaller et al., 2000). Bei Kristallstrukturanalysen wurde die OPR3 aus Tomate als selbstinhibierendes Dimer beschrieben, wodurch möglicherweise eine Inaktivierung erfolgt (Breithaupt et al., 2006). Phylogenetische Stammbaumanalysen geben eine Übersicht über OPRs in verschiedenen Pflanzenspezies und deren zelluläre Lokalisation (Agrawal et al., 2004; Zhang et al., 2007). Allein für Reis wurden bisher 13 OPRs identifiziert wobei ihre physiologische Funktion erst bei wenigen aufgeklärt wurde (Agrawal et al., 2004). So konnte für *A. thaliana* und Fuchsschwanzgras gezeigt werden, dass abiotische Stressoren wie osmotischer Stress, UV-C und Kältestress zu einer transienten OPR mRNA Induktion führen (Biesgen und Weiler, 1999; Zhang et al., 2007). Die gebildete JA kann über wenigstens acht verschiedene Wege weitermetabolisiert werden zu z. B. Methyljasmonat (MeJa), Aminosäurekonjugaten, Glukoseestern oder hydroxylierten JA Derivaten, die

zusammenfassend als Jasmonate (auch: Oxylipinsignatur) bezeichnet werden (Übersichten in: Sembdner und Parthier, 1993; Wasternack und Parthier, 1997; Wasternack et al., 2006; Wasternack, 2007).

Physiologische Bedeutung der Metabolite des Allenoxid-Synthase Weges

Zu den wohl am besten untersuchten Verbindungen des AOS-Wegs zählen die Jasmonsäure und ihre Derivate. Methyljasmonat, von Demole et al. (1962) ursprünglich als Duftkomponente des ätherischen Öls von *Jasminum grandiflorum* L. isoliert, gewann zusammen mit den anderen Jasmonaten auch aus pflanzenphysiologischer Sicht als Signalstoff an Bedeutung. Sie sind an der Regulation vielfältiger Wachstums- und Entwicklungsprozesse beteiligt und werden daher als Phytohormone bezeichnet. Die zunehmende Anzahl verfügbarer Mutanten hauptsächlich in *Arabidopsis thaliana*, ermöglicht heute detaillierte Analysen über die Biosynthese von Jasmonaten, beteiligter Enzyme, Produkte sowie ihrer Regulation (Übersicht in: Delker et al., 2006; Wasternack, 2007).

Jasmonate gelten als zentrales Signalelement von biotischem und abiotischem Stress und induzieren Gene, die eine entscheidende Rolle bei Wund- und Abwehrreaktion spielen (Farmer und Ryan, 1992; Sembdner und Parthier, 1993; Wasternack und Parthier, 1997; León et al., 2001; Wasternack et al., 2006; Wasternack, 2007). Zu den prominenten Vertretern JA-regulierter Gene (JRGs; engl.: *jasmonateresponsive genes*) gehören die Proteinase Inhibitor II (*Pin2*) in Tomate und Kartoffel (Farmer und Ryan, 1990; Pena-Cortés, et al., 1995), Thionin (*Thi2.1*) und Defensin (*Pdf1.2*), dessen Genprodukten antimikrobielle Wirkungen zugesprochen werden (Penninckx et al., 1996). Bei der JA-regulierten Genexpression können sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte mit Phytohormonen anderer Signalwege wie z. B. dem Ethylen oder der Salicylsäure auftreten. Diese Wechselwirkungen können zu einer gezielten pflanzlichen Abwehr beitragen (Lorenzo und Solano et al., 2005). So beschreiben Penninckx et al. (1998), dass die JA-induzierte *Pdf1.2* Genexpression synergistisch mit Ethylen erfolgt. Diese synergistische Regulation (Jasmonsäure + Ethylen) wird auch für den Transkriptionsfaktor ERF1 (engl.: *ethylene response factor*) bei *A. thaliana* dargestellt (Lorenzo et al., 2003). Eine Übersicht von JRGs findet sich u. a. bei Creelman und Mullet (1997) und Wasternack und Parthier (1997). Neuere Daten zu JRGs, die mittels DNA Array Technologie erworben wurden, beschreiben u. a. Sasaki et al. (2001) und Jung et al. (2007). Darüber hinaus sind Jasmonate an der

Induktion der Blattseneszenz beteiligt, die sich durch den Abbau von Chlorophyll und Rubisco, einer Zunahme von Proteasen und Peroxidasen und der *de novo* Synthese von Proteinen, sog. Jasmonat-induzierter Proteine (JIPs), auszeichnet (Übersicht: Sembdner und Parthier, 1993; Creelman und Mullet, 1997; Weiler, 1997). Man vermutet, dass bei der wundinduzierten Expression der JIP Gene Protein Kinasen eine Rolle spielen (Seo et al., 1999; León et al., 2001). Vieler dieser JIPs tragen zur biochemischen und mechanischen pflanzlichen Abwehr durch Bildung von z. B. Proteinaseinhibitoren (PIs), Phytoalexinsynthese oder Quervernetzung von Zellwandkomponenten (Lignin) bei (Farmer und Ryan, 1990; 1992; Weiler et al., 1998). Auch LOXs zählen zu den JIPs (Rosahl, 1996). Doch auch für Jasmonsäurevorstufen, wie dem zyklischen 12-Oxo-PDA-Methylester, wird eine Signalwirkung diskutiert. Für diese Verbindung zeigte sich in Versuchen zur Rankenkrümmung von *Bryonia dioica* eine stärkere Wirkung als für Methyljasmonat selbst (Weiler et al., 1993; Weiler et al., 1998; Weiler, 1997; Laudert et al., 1996; Stelmach et al., 1998) und induzierte exogen appliziert Diterpenoide-Verbindungen in Lima Bohnen (Koch et al., 1999). Auch mit Hilfe von Mutanten wurde gezeigt, dass OPDA als eigenständiges Signalmolekül angesehen werden kann. So bildet die JA-Biosynthesemutante *opr3* aufgrund eines Defekts im OPDA-Reduktase-Gen JA in nur sehr geringen Konzentrationen. *A. thaliana opr3* Mutanten zeigten jedoch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* (Raacke et al., 2006). Neuere Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass der 13-LOX-Weg verstärkt durch das Avirulenzprotein AvrRpm1 aus *Pseudomonas syringae* während der HR bei transgenen *Arabidopsis thaliana* AvrRpm1/Col-0 induziert wurde. Hierbei akkumulierten JA, OPDA und dnOPDA, wobei letztere mit einem neu identifizierten Galaktolipid, mit dem Trivialnamen Arabidopside E, verestert waren. Arabidopside E inhibierte das Wachstum von *P. syringae* DC3000 *in vitro* im Vergleich zur Kontrolle um 60 % (Andersson et al., 2006). Bei Pflanzen unter Ozonstress wird Jasmonaten eine negativ regulierende Funktion bei der Ausbreitung von Zelltod zugeschrieben (Overmyer et al., 2000; Kanna et al., 2003; Overmyer et al., 2003; Tuominen et al., 2004, Kangasjärvi et al., 2005). Die *Arabidopsis* Mutanten *jar1* (engl.: *jasmonat-resitant*) und *coi1* (engl.: *coronatine-insensitive*) sowie die im JA-Biosyntheseweg gestörten Mutanten *fad3*, *fad7* und *fad8* (engl.: *fatty acid desaturase*) zeigten erhöhte Ozonsensitivität. Die Läsionenbildung wurde bei Tabak bzw. *Arabidopsis* Pflanzen durch Applikation von

Jasmonaten vor einer Ozonbehandlung vermindert und nach der Ozonbehandlung in ihrer Ausbreitung eingeschränkt (Örvar et al., 1997; Overmyer et al., 2000; Rao et al., 2000; Kanna et al., 2003; Overmyer et al., 2003).

1.7.6 Der Hydroperoxid-Lyase Weg

Hydroperoxid-Lyase (HPL; CYP74B und CYP74C) katalysiert die heterolytische Spaltung von Lipidhydroperoxiden zu Oxosäuren und kurzkettigen Aldehyden (C₆-C₉) wobei letztere auch als „flüchtige Phytoalexine“ bezeichnet werden (Blée und Joyard, 1996; Blée, 1998; Matsui, 1998). Der molekulare Mechanismus ist noch nicht genau bekannt. Bei Versuchen mit rekombinanten HPLs aus *Cucumis melo L.* und *Medicago sativa* wird aber eine Isomerase Funktion beschrieben, die eine homolytische Neuordnung der Lipidhydroperoxide und die nachfolgende Bildung kurzlebiger Hemiacetale bewirkt, deren Zerfall zu den flüchtigen C₆- und C₉-Verbindungen führt (Grechkin et al., 2006). Aus 13-Hydroperoxylinol- bzw. -linolensäure entstehen C₆- Aldehyde (Hexanale bzw. Hexenale) und C₁₂-Oxo-Säuren und aus den entsprechenden 9-Hydroperoxylipiden C₉- Aldehyde (Nonanale bzw. Nonadienale) und C₉-Oxo-Säuren (Abb. 4; Grechkin, 1998). Der Blattaldehyd (E)-2-Hexenal und der Blattalkohol (Z)-3-Hexenol sind zusammen mit sechs weiteren C₆-VOCs für den charakteristischen „frischen grünen Geruch“ vieler Früchte, Gemüse und Blätter verantwortlich (Hatanaka, 1999).

HPL (Hem-Protein) aus *Alfalfa* wurde mittels Elektronen Spin Resonanzspektroskopie (EPR) als ein Cytochrom P450 Enzym klassifiziert, das weder molekularen Sauerstoff noch eine NADPH-anhängige Cytochrom P₄₅₀-Reduktase für die Reaktion benötigt. HPLs sind überwiegend membrangebundene Enzyme (Grechkin, 1998; Noordermeer et al., 2001), wobei einige z. B. die HPL aus *A. thaliana* ein chloroplastidäres Transitpeptid trägt (Bate et al., 1998), das HPL aus Tomate fehlt (Froehlich et al., 2001). HPLs weisen eine ~38% ige Aminosäuresequenzhomologie zu AOS (CYP74 A) auf und gehören als CYP74 B Subfamilie ebenfalls zur CYP 74 Familie (Nelson, 1999). Neben HPLs, die 13-LOOHs bevorzugen (CYP 74 B), wurden HPLs, die sowohl 13- als auch 9-LOOHs als Substrat akzeptieren als CYP74 C eingestuft (Stumpe et al., 2001). HPL wurde u. a. aus *Arabidopsis thaliana* (Bate et al., 1998), Tomaten (Howe et al., 2000; Suurmeijer et al., 2000) und Sonnenblume (Itoh und Vick, 1999) isoliert und gereinigt.

Die C₆- und C₉-Primärprodukte der HPL können nachfolgend auf drei Arten umgewandelt werden. Es kann eine spontane allylische Isomerisierung der 3(Z)-Alkenale zu 2(E)-Alkenalen erfolgen. So entsteht aus 3(Z)-Hexenal der „Blattaldehyd“ 2(E)-Hexenal (Grechkin, 1998). Diese Isomerisierung wird in den meisten Pflanzen durch eine Isomerase, die die cis-3-Enale in trans-2 Isomere konvertiert, katalysiert (Abb. 4; Galliard und Chan, 1980). Die gebildeten Aldehyde können anschließend durch eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH; Alkohol:NAD⁺-Oxidoreduktase; EC 1.1.1.1) zu ihren korrespondierenden Alkoholen reduziert werden (Abb. 4; Blée, 1998; Feussner und Wasternack, 2002). Diese können anschließend direkt emittiert oder weiter verestert werden, wie z. B. (Z)-3-Hexenol in (Z)-3-Hexenylacetat durch eine Acetyl-Transferase (Hatanaka et al., 1987; D’Auria et al., 2007).

Physiologische Bedeutung der Metabolite des Hydroperoxid-Lyase Weges

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die im HPL Weg gebildeten Verbindungen biologisch aktiv sind. So identifizierten Zimmermann und Coudron (1979) die als Traumatin bekannte 12-Oxo-10(E)-Dodecensäure als Wundhormon, das die Zellteilung um verwundetes Gewebe und damit die Bildung eines schützenden Kallus, anregen kann.

Die flüchtigen C₆- und C₉- Aldehyde sind nach Verletzung von Pflanzengewebe unter den ersten Verbindungen die freigesetzt werden (Hatanaka et al., 1987; Myung et al., 2006). Sie können das Wachstum vieler Bakterien und Pilze inhibieren und so zur Pathogenabwehr beitragen (Major et al., 1960; Zeringue und McCormick, 1989; Croft et al., 1993; Deng et al., 1993). So wird die Hyphenbildung von *Botrytis cinerea* und *Fusarium oxysporum* ganz oder teilweise verhindert (Matsui et al., 2006). Die C₉- Aldehyde (2E)-Nonenal and (2E, 6Z)-nonadienal zeigten darüber hinaus einen stark inhibierenden Effekt auf das Wachstum von *Aspergillus carbonarius* bei unreifen Mandeln (Mita et al., 2007). Neueste 2-D-Gelelektrophorese Untersuchungen zeigen, dass die Applikation von trans-2-Hexenal (C₆-Aldehyd), die Zusammensetzung der Proteine bei *Botrytis cinerea* verändert. Dies wird auch als Basis im Hinblick auf die Entwicklung und den Einsatz biologischer Anti-Pilzmittel bei Obst und Gemüse diskutiert (Myung et al., 2007). Auch Pflanzen gegenüber können C₆-Aldehyde toxisch wirken und hemmen u. a. die Keimung von Sojabohnen (Gardner et al., 1990) und das Pollenwachstum (Hamilton-Kemp et al., 1991). Sie werden auch als Signalmoleküle wie z. B. (Z)-3-

Hexenylacetat diskutiert, die Pflanzen nach Insektenbefall emittieren (Übersicht bei: Paré und Tumlinson, 1999; D'Auria et al., 2007) und damit die Fraßfeinde der Herbivoren anlocken (Dicke et al., 1999; Shiojiri et al., 2006). Auch an der Expression von Abwehrgenen sind sie beteiligt. So führte exogen appliziertes trans-2-Hexenal zu einer Induktion der Gene des Phenylpropanoid Synthese Weges wie Phenylammoniumlyase (PAL) und Chalconsynthase (CHS) (Bate und Rothstein, 1998). Ferner wurde eine Förderung der Produktion von Phytoalexinen in verletzten Baumwoll-Pflanzen beschrieben (Zeringue, 1992). Darüber hinaus konnte unter akutem Ozonstress die vermehrte Emission kurzkettiger (C_6) flüchtiger Blattaldehyde und – alkohole bei der ozonsensitiven Tabak Varietät cv. Bel W3 detektiert werden (Heiden et al., 1999a; 1999b).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Wie bisher dargestellt induziert Ozon bei ozonsensitiven Pflanzen die Ausbildung von Nekrosen, die ultrastrukturelle Veränderungen von Membranen der Zellorganellen implizieren. Diese Membranlipide oder die hieraus abgeleiteten freien ungesättigten Fettsäuren können als Substrat im LOX-Weg zu flüchtigen kurzkettigen C_6 -Verbindungen metabolisiert werden, wie sie Heiden et al. (1999a; 1999b) unter Ozonstress nachwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb erstmals die Bedeutung des LOX-Wegs bei der Ozonempfindlichkeit von Tabakpflanzen zu untersuchen. Hierzu wurde das für Ozonexperimente gut charakterisiertes Modellsystem bestehend aus der ozonsensitiven Varietät *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und der ozontoleranten Varietät cv. Bel B zu Untersuchungen verwandt. Ergänzende Untersuchungen wurden mit den transgenen Sorten *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi.nc-Nah-G, *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC und *Arabidopsis thaliana* Bgl2 GUS sowie dem Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Col-0 durchgeführt.

Im Fokus stand hierbei die Frage nach der Induktion der LOX auf Enzym- und Transkriptebene in Abhängigkeit von der Zeit, der Sensitivität der Tabakvarietät sowie der an der Ozonantwort beteiligten Signalelemente wie Jasmonsäure (JA), Salicylsäure (SA) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Darüber hinaus sollten Enzyme verschiedener Biosynthesewege, die sich aus Produkten des LOX-Wegs ableiten, näher analysiert werden. Hierzu gehören u. a. die Enzyme Hydroperoxid-Lyase (HPL) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH), die Teil des Biosynthesewegs, der nach

Ozonexposition emittierten flüchtigen organischen C₆-Verbindungen sind. Außerdem sollten die Enzyme Allenoxid-Cyclase (AOC) und 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR) als Teil der Jasmonsäurebiosynthese näher analysiert und mit dem Auftreten der JA in Bezug gesetzt werden. Ergänzend sollte die Epoxidhydrolase (EH) untersucht werden, die die Epoxygruppen, der z. B. im EAS- oder POX-Weg gebildeten Epoxy- und Hydroxyepoxyfettsäuren, zu Dihydroxygruppen hydrolysieren kann.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Firma; Sitz
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik; Gehrden
Elektrophorese Einheit: Easy Cast Electrophoresis System B2/B1A	Owl Scientific; Inc. Woburn; MA USA
Brutschrank, Typ BK 3108	Ehret; Emmendingen
Trockenschrank	Heraeus; Hanau
Kreisschüttler	Janke & Kunkel, IKA-Werk; Staufen
Magnet-Rührer: IKAMAG RTC basic	IKA Werke GmbH; Staufen
Mikrowelle: Whirlpool AVM401	Whirlpool u. Bauknecht; Schorndorf
Milli-Q, Academic Gradient 10	Millipore; Eschborn
pH-Meter, 15	Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Photometer, UVIKON XL	Bio-Tek Instruments GmbH; Neufahrn
Power Supply: a) PAC 1000; b) PAC 300	Bio-Rad GmbH; München
Rotationsverdampfer: Concentrator 5301	Eppendorf; Hamburg
Schüttler: BioDancer	New Brunswick Scientific; Nürtingen
Sterilbank	Bleymehl Reinraumtechnik; Inden
Tischautoklav	Systemec; Wettengel
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf; Hamburg
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene; Heidelberg
Waage a) PG 503-S Delta Range, b) PB3002-S	Mettler-Toledo; Giessen
Wasserbad: a) GFL - 1083; b) Julabo F12;	a) GFL; Burgwedel b) Labora GmbH; Mannheim
Wasserstrahlpumpe	RAND GmbH+Co; Wertheim/Main

2.2 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden, falls nicht gesondert angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Biorad (München), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Merck AG (Darmstadt), Pharmacia Biotech (Freiburg), Roth (Karlsruhe) und Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. 4-Nitroblautetrazolium Chlorid (NBT) und x-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure) wurden von der Firma Loewe Biochemica GmbH (Sauerlach) bezogen.

2.2.2 Enzyme

Die Enzyme stammten von den Firmen Amersham Life Science (Braunschweig), Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), NEB Biolabs (Schwalbach) und Pharmacia Biotech (Freiburg).

2.2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und nach Erhalt zu 100 μM in sterilem doppelt destilliertem Wasser gelöst. Sie fanden als Primer in PCR Reaktionen Verwendung und sind in Kap. 2.10.7 gesondert aufgeführt.

2.3 Verbrauchsmaterial

Einmalküvetten	Brand GmbH und co KG, Wertheim
Sterifilter 0,2 μM	Gelman Sciences; Pall, USA
Einmalspritzen	BRAUN; Melsungen
Einmalspitzen	Gilson; Bad Camberg
Falkons Reaktionsgefäße	BdBioscience; San Jose, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf GmbH; Hamburg
Petrischalen	Greiner GmbH; Nürtingen
Whatman Papier 3MM	Biometra GmbH, Göttingen

2.4 Bakterienstamm

Alle Klonierungsarbeiten wurden mit dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α (GibcoBRL, Eggenstein) durchgeführt.

2.4.1 Anzucht, Ausplattierung und Lagerung

Soweit nicht anders angegeben wurde nach den Vorschriften von Sambrook et al. (1989) gearbeitet.

Die Anzucht von *E. coli* Kulturen erfolgte in LB Medium, dem bei Bedarf Antibiotikum (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt wurde.

Das Ausplattieren erfolgte auf Standard-I-Nähragarplatten (\varnothing 9 cm) mit Antibiotikum (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.4.2 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach den Vorschriften von Inoue et al. (1990). Im Fall einer zusätzlichen Blau-Weiß-Selektion wurden nach den Vorschriften von Sambrook et al. (1989) gearbeitet. Hierbei wurde vor dem

Ausplattieren auf den Standard-I-Nähragarplatten 0,01 % X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid) in N, N'-Dimethylformamid und 0,02 % IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) in sterilfiltriertem Wasser verteilt und getrocknet.

2.5 Pflanzenmaterial

2.5.1 Herkunft und Anzucht

2.5.1.1 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand)

Die Samen der Sorte *Arabidopsis thaliana* (L.) Ökotyp Columbia (Col-0) wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC) bezogen.

Samen der transgenen Sorte *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC mit genetischem Columbia Hintergrund wurde von Prof. Anders B. Jensen (Institut der Molekularbiologie, Universität Kopenhagen, Dänemark) freundlicher Weise zu Verfügung gestellt. Sie wurden wie folgt konstruiert: Ein 1.8 kbp 5' *upstream* Fragment des LOX2 Gens, dass für eine chloroplastidäre LOX kodiert (Acc. Nr: L23968; Bell und Mullet, 1993; Bell et al, 1995) wurde mit dem Reporter gen β -Glukuronidase (GUS) aus *E. coli* sowie mit dem Reporter gen Luciferase (FLUC) aus der Feuerfliege fusioniert und *Arabidopsis* Col-0 damit stabil transformiert (Jensen et al., 2002).

Parameter	Anzuchtbedingungen
Medium	1:5 (v/v) Perlit (Peligran G) Einheitserde Typ ED 73; Werkverband e. V.
Temperatur	20/17°C (Tag/Nacht)
Licht-/ Dunkelphase	12 h/8 h
Lichtintensität	350 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$
Lichtquelle	10 Halogenmetall dampflampen Osram Powerstar HQI 250 W/D
relative Feuchte	60 % (Tag/Nacht)

Arabidopsis thaliana Bgl2/GUS wurde freundlicher Weise von Priv. Doz. Dr. Martina Schraudner überlassen. Sie besitzen ein chimäres Reporter Gen, das sich aus der 5'untranslatierten Region des *Arabidopsis* PR-Proteins β -1, 3-Glucanase (BGL2) und der codierenden Region von β -Glucuronidase (GUS) zusammensetzt (Cao et al., 1994).

Die Anzucht erfolgte in einem Klimaschrank (Percival SCIENTIFIC I-36L4X CLF, analytische Laborgeräte GmbH; Emersacker) unter folgenden Bedingungen:

2.5.1.2 *Nicotiana tabacum* L. (Tabak)

Die Samen von *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel B wurden von dem Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (BioP) des GSF Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF; Neuherberg) bezogen.

Der transgene *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi.nc Nah-G trägt die codierende Sequenz einer Salicylat Hydroxylase (Nah-G) aus dem Bakterium *Pseudomonas putida* vor dem genetischen Hintergrund von *N. tabacum* L. xanthi.nc. Die Salicylat Hydroxylase wandelt Salicylsäure (SA) zu Catechol um, so dass diese Pflanzen kein SA akkumulieren können (Gaffney et al., 1993). Die Pflanzen wurden freundlicherweise von Dr. John Ryals (Ciba-Geigy Corp.) zur Verfügung gestellt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese Pflanzen als *Nicotiana tabacum* cv. Nah-G, *N. tabacum* cv. Nah-G oder Tabak cv. Nah-G bezeichnet.

Die in das Medium (s. u.) ausgesäten Tabakpflanzen wurden von der Keimung bis etwa eine Woche nach Ausbildung der Kotyledonen, in einer Anzuchtschale mit Kunststoffhaube gehalten. Hiernach erfolgte das Pikieren in PE-Einzeltöpfe (4 x 4 cm, 6 cm hoch). Nach weiteren 16 Tagen wurden die Setzlinge in Töpfe (Ø 14 cm) pikiert und in Pflanzschalen gestellt. Während des gesamten Zeitraumes wurde für eine ausreichende Befeuchtung der Pflanzen, durch Bewässerung mit deionisiertem Wasser gesorgt.

Die Keim- und Anzuchtbedingungen waren im Einzelnen wie nachfolgend aufgeführt:

Parameter	Anzuchtbedingungen
Medium	1:5 (v/v) Perlit (Peligran G) Einheitserde Typ ED 73; Werkverband e. V.
Temperatur	20°C / 17°C (Tag/Nacht)
Licht-/ Dunkelphase	(Start: 08:00 Uhr) 12 h / 12 h
Lichtintensität	300 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$
Lichtquelle	10 Halogenmetaldampflampen Osram Powerstar HQI 400 W/D, Fa. Osram
relative Feuchte	60 % (Tag/Nacht)

Wenn nicht anders angegeben waren die Pflanzen bei Einsatz in die Versuche zwischen fünf und sechs Wochen alt.

2.6 Behandlungsvarianten der Pflanzen

2.6.1 Ozonbehandlung der Pflanzen

2.6.1.1 Große Expositionsküvetten (Vegatron)

Die Expositionskammer besteht aus zwei miteinander verbundenen zylindrischen Abschlusshauben (1,5 m x 1 m) aus Glas (DURAN[®], Borosilikat Glas, Fa. Schott) mit einem Volumen von 1450 L und ist am Boden mit einer PTFE (Poly-Tetra-Fluor-Ethylen) Platte abgedichtet. Die Platte enthält 7 widerverschraubbare Bohrungen, durch die die Pflanzen vor Ozonbehandlung in die Kammer gestellt werden konnten. An den Seiten der Kammer sind in verschiedenen Höhen Öffnungen angebracht, die die Möglichkeit bieten, Messsonden oder Gasleitungen durchzuführen (Abb. 5). Im oberen Teil der Glashaube sorgt ein mit 150 U x min⁻¹ angetriebener PTFE-Ventilator für die homogene Durchmischung der Luft. Damit wird gewährleistet, dass die Konzentration von Spurengasen in der Kammer denen am Ausgang der Kammer entspricht. Der gesamte Aufbau befindet sich einem temperaturkontrollierten Klimaraum (Hühren).

Die in der Kammer herrschende Luftfeuchte wird entweder durch die Transpiration der Pflanzen oder wenn nötig über ein mit Milli-Q-Wasser (Millipore SA) gefülltes Glasgefäß, durch den ein Teilstrom der zugeführten Luft geleitet wird, geregelt. Die relative Luftfeuchte von 60 % - 80 % kann so über einen längeren Zeitraum konstant eingestellt werden. Die CO₂-Konzentration der pflanzenversorgenden Luft entsprach der zugeführten Aussenluft zwischen 330 ppm und 400 ppm.

Die Kammer wird mit durch einen adsorptiven Lufttrockner (KEA 70, Ecosorb, Zander) vorgereinigter Außenluft durchströmt. Der Fluss wurde über thermische Massenflußregler (MFC, Brooks Instruments) auf 100 L/min konstant gehalten. Für Expositionen mit definierten Ozon-Mengen wurde ein Teilstrom der Kammereingangsluft abgezweigt und durch ein Quarzglasrohr geleitet. Mit Hilfe einer Quecksilber (HG)-Dampflampe (PENRAY; $\lambda = 189 \text{ nm}$) wurde der Luftsauerstoff photolysiert und das gebildete Ozon der Eingangsluft wieder zudosiert. Über die Leistung der Lampe bzw. durch teilweise Abdeckung der strahlungsaktiven Oberfläche der HG-Dampflampe konnten unterschiedliche Ozonkonzentrationen erzeugt werden. Möglicherweise gebildete Peroxiradikale wurden hinter der Lampe durch Quarzglaswolle zerstört. Die Ozonkonzentration wurde durch wechselseitiges Messen am Ein- und Ausgang der Kammer über UV-

Absorption bestimmt (1008-RS, Dasibi bzw. TE 49, Thermo Environmental Instruments).

Licht wird mit 12 Gasentladungslampen (HQI 400 W/D, OSRAM) erzeugt, die zum Schutz vor Überhitzung IR-Filter (IR3, OptoChem) vorgeschaltet haben. Die zeitprogrammierbare Ansteuerung (8:00 bis 20:00 Uhr) der einzelnen Lampen ermöglicht die Simulation von Dämmerphasen. In der Volllichtphase wurde auf halber Sprosshöhe eine Photonenflußdichte von $400 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ erreicht.

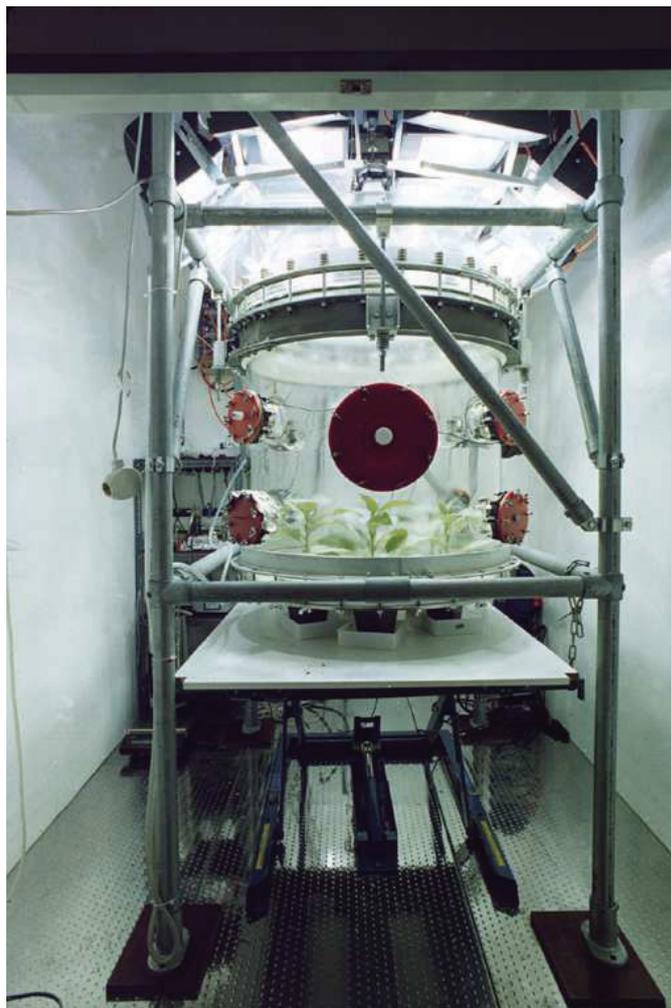


Abb. 5 Große Expositions-küvette (Vegatron).

Die routinemäßige Erfassung aller Messdaten wie Temperatur, CO_2 , O_3 , NO , NO_2 ect. erfolgte über ein Computerprogramm (Visual Designer, Intelligent Instrumentation) und wurde automatisch in Textdateien abgespeichert. Die Klimabedingungen waren mit denen der Anzucht vergleichbar.

2.6.1.2 Kleine Expositions-küvette

Da sich die großen Expositions-küvetten zur Behandlung von *Arabidopsis thaliana* aufgrund ihrer geringen Größe als nicht geeignet erwiesen wurde eine neue kleinere Expositions-küvette von der hauseigenen Werkstatt angefertigt. Diese besteht aus einem 70 cm x 110 cm x 110 cm Rechteck aus Plexiglas, in dessen Innenraum zusätzlich eine perforierte Plexiglasplatte im oberen und unteren Teil angebracht war. Das Luftzuleitungsrohr mit integriertem PTFE-Ventilator mündete über der Lochplatte.



Abb. 6 Kleine Expositions-kammern.

Der weitere instrumentelle Aufbau einschließlich Datenerfassung entsprach dem des Vegatrons mit dem Unterschied, dass hier die Ozonkonzentration über ein computergesteuertes Magnetventil am Massenstromregler (Schwellenwertprinzip) der Kammereingangsluft zudosiert wurde. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche

Konzentrationsbestimmung über die auf Pflanzenhöhe abgezogene Abluft, die der Analytikeinheit (CSI 3100, Fa. Columbia Scientific Instruments, USA) zugeleitet wurde. Auch dieser Aufbau befand sich in einem Klimaraum. Die Klimabedingungen waren mit denen der Anzucht vergleichbar.

2.6.1.3 Durchführung der Ozonbehandlung der Pflanzen

Tabakpflanzen wurden 5 h mit 150 ppb (150 nl l^{-1} bzw. $300 \mu\text{g/m}^3$) Ozon in der großen Expositionsküvette (Kap. 2.6.1.1, Abb. 5) und *Arabidopsis*-pflanzen 8 h mit 300 ppb (300 nl l^{-1} bzw. $600 \mu\text{g/m}^3$) Ozon in der kleinen Expositionsküvette (Kap. 2.6.1.2, Abb. 6) behandelt. Die höhere Ozonkonzentration wurde gewählt, da Vorversuche ergaben, dass niedrigere Ozonkonzentrationen von 100 ppb – 150 ppb zu keinen sichtbaren Schäden bei *Arabidopsis*-pflanzen führten. Die Ozonkonzentration wird im Verlauf dieser Arbeit weiterhin mit ppb angegeben. Nach der fünfstündigen Ozonbehandlung wurden die Pflanzen in ozonfreier Luft, bis zu Versuchsende weiterkultiviert. Die Kontrollpflanzen wurden die gesamte Zeit in Reinluft gehalten.

Abweichungen in der Ozonkonzentration (ppb) für die Untersuchung von Dosiswirkungen sowie die jeweilige Versuchsdauer sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

2.6.2 Verwundungsexperiment bei Tabak

Variante I.

An 3 etwa 4 Wochen alten Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurde jeweils 10x mit einer stumpfen Pinzette quer zu den Blattadern, das Blatt Nr. 3 verwundet. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte nach 12 h (Kap. 2.8).

Variante II.

Durchführung wie Variante I. mit der Änderung, dass anstelle der Pinzette mit einer Nadel die Blätter jeweils 30-mal gleichmäßig über die Blattspreite verteilt perforiert wurden. Die Ernte erfolgte nach 12 h wie in Kap. 2.8 beschrieben.

2.6.3 Exposition mit Methyljasmonat

Die Methyljasmonat (MeJa; Sigma) Konzentrationsangaben sind theoretische Werte, da das kommerzielle MeJa nur 5-10 % des biologisch aktiven Isomers enthält (Rickauer et al., 1997).

Stocklösung MeJa: $10,85 \mu\text{l}$ Methyljasmonat (Sigma) + $500 \mu\text{l}$ Methanol (MeOH).

Tabak

Drei mittelalte Blätter von Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurden mit dem Skalpell abgeschnitten und sofort in ein Glas mit deionisiertem Wasser gestellt. Diese Anordnung kam in einen Exsikkatortopf. Auf den Boden des Topfes wurde eine Petrischale (\varnothing 5 cm) gestellt, die einen Wattebausch mit einer 7,5 μM Methyljasmonatlösung (MeJa in MeOH) enthielt. Der Exsikkator wurde gasdicht verschlossen und die Blätter 5 h inkubiert. Anschließend wurden die Blätter bis zur Ernte nach 12 h in Reinluft weiterkultiviert. In entsprechender Weise wurde mit den Kontrollen verfahren, die entsprechend nur Methanol erhielten. Die Ernte erfolgte wie in Kap. 2.8 beschrieben.

Arabidopsis thaliana

In einen Exsikkator wurden je fünf Pflanzen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC kreisförmig angeordnet und mittig auf den Topfboden eine Petrischale (\varnothing 5 cm) mit Wattebausch eingesetzt. Hierin pipettierte man die unten angegebene Konzentration Methyljasmonat in Methanol (Abb. 7).

Die Kontrolle erhielt entsprechend nur Methanol ohne MeJa.

Die Exsikkatoren wurden anschließend luftdicht mit einem Deckel verschlossen und wie folgt inkubiert:

MeJa [μM]	Inkubationsdauer [h]
7,5	24
7,5	5
0,1	24
0,1	5
0 (Kontrolle)	24

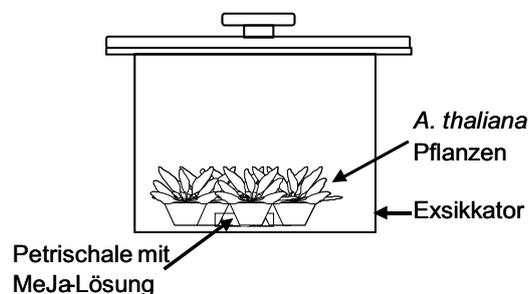


Abb. 7 Versuchsanordnung der Methyljasmonat-Behandlung von *A. thaliana*.

Die Pflanzen, die 5 h mit MeJa inkubiert wurden, wurden bis zu Versuchsende nach 24 h in Reinfluft ohne MeJa weiterkultiviert. Nach 24 h wurden die Pflanzen direkt über dem Boden abgeschnitten und für spektrofluorimetrische GUS Bestimmungen (Kap. 2.9.3), wie in Kap. 2.8 beschrieben, geerntet. Die histochemische Bestimmung der GUS-Aktivität erfolgte sofort wie in Kap. 2.9.3 beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Kap. 3.15.3 dargestellt.

2.6.4 Behandlung von Tabak mit Wasserstoffperoxid

2.6.4.1 Stängelapplikation

3 mittelalte Blätter von Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurden mit dem Skalpell abgeschnitten und sofort in ein Glas mit 2 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gestellt. Kontrollen kamen in ein Glas mit deionisiertem Wasser. Nach 12 h wurden die Blätter geerntet (Kap. 2.8).

2.6.4.2 Infiltration

In 3 mittelalte Blätter von Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurden je 10 ml 2 mM H_2O_2 infiltriert. Dies erfolgte verteilt über die gesamte Blattspreite hinweg durch Aufdrücken des stumpfen Endes einer Einmalspritze auf die Blattfläche. Die Blätter wurden bis zur Ernte (Kap. 2.8) nach 12 h an den Pflanzen belassen. Die Kontrollen wurden in gleicher Weise mit deionisiertem Wasser behandelt.

2.7 Bonitur von Blattschäden

Tabak

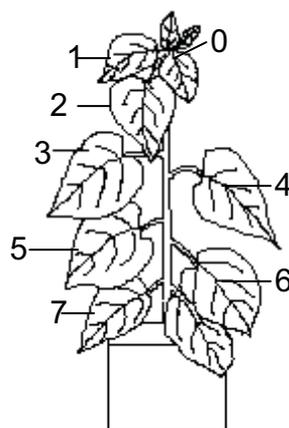


Abb. 8 Definition der Blattnummern an einer Tabakpflanze.

Die Bonitur der nekrotischen Blattschäden erfolgte 24 h nach Start der Ozonbehandlung prozentual zur Gesamtblattfläche. Zu diesem Zeitpunkt waren die bifacialen Nekrosen bereits voll entwickelt. Die Blätter der Tabakpflanzen wurden ausgehend vom Vegetationspunkt von oben nach unten durchnummeriert. Hierbei wurde das jüngste Blatt < 8 cm als Blatt Nr. 0 definiert und alle folgenden Blätter enthielten mit zunehmendem physiologischen Alter aufsteigende Nummern (Abb. 8).

Arabidopsis thaliana

Die Bonitur der Blattschäden bei den *Arabidopsis* Varietäten erfolgte 24 h nach Start der achtstündigen Ozonbehandlung mit 150 ppb bzw. 300 ppb. Bei einer Ozonbehandlung für 8 h mit 150 ppb wurden bei keiner *Arabidopsis thaliana* Varietät (Col-0, LOX2 und Bgl2) makroskopisch sichtbare Schäden festgestellt (Daten nicht dargestellt).

Bei einer Ozonbehandlung für 8 h mit 300 ppb waren kleine punktförmige Nekrosen erkennbar. Die computergestützte Auswertung dieser Schäden wurde wie folgt vorgenommen.

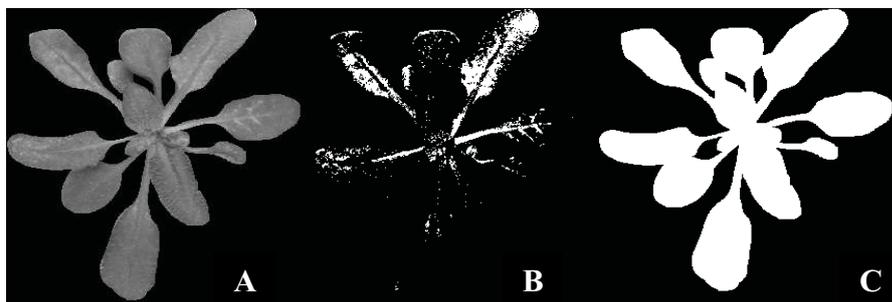


Abb. 9 Einzelne Bildsequenzen zur Auswertung der Blattschäden bei *Arabidopsis thaliana* Varietäten. Dargestellt ist eine typische Bildsequenz nach Extraktion des Rotkanals für *A. thaliana* LOX2. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm ZEISS KS400 release (Carl Zeiss Vision GmbH, Halbergmoos). Erklärung erfolgt im Text.

Die Pflanzen wurden 24 h nach Start der Ozonbehandlung fotografiert und die Pflanzenkonturen des digitalisierten Bildes mit dem Computerprogramm Image View (MS Office) ausgeschnitten. Diese Bild wurde nach ZEISS KS400 release (Carl Zeiss Vision GmbH, Halbergmoos) kopiert. Zunächst wurde der Schwellenwert auf 2 min und 254 max. gesetzt, um den weißen Hintergrund in schwarz (schwarz wird als 0 erkannt) umzuwandeln (Abb. 9). Von diesem Bild wurde der Rotkanal extrahiert, da hierdurch die Schäden als helle Punkte besonders gut zu erkennen waren und

bei dem visuell auf 198 gesetzten Schwellenwert besonders gut hervortraten (Abb. 9 A).

Man erhielt hiernach ein sog. Maskenbild, worauf die Blattnekrosen als weiße Punkte zu erkennen waren (= Fläche der Schäden) (Abb. 9 B). Ein zweites Maskenbild, bei dem die Pflanze komplett weiß erscheint, wurde erstellt (= Gesamte Blattfläche der Pflanze) (Abb. 9 C). Die Pixel der beiden Maskenbilder wurden mit dem Computer bestimmt und gegeneinander verrechnet. Das Ergebnis entsprach dem Anteil an Blattschäden im Vergleich zur Gesamtblattfläche und wurde prozentual dargestellt (Kap. 3.15.1). Pro Varietät wurden drei ozonbehandelte (300 ppb, 8 h) Pflanzen ausgewertet.

2.8 Ernte des Blattmaterials

Tabak

Blatt Nr. 3 wurde von je drei Tabakpflanzen gleicher Behandlung bzw. unbehandelten Kontrollpflanzen nach Entfernen der Mittelrippe in Aluminiumtüten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in Szintillationsgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Versuche zur gewebespezifischen Expression der Lipoxygenase wurde zeitgleich mit Blatt Nr. 3 auch Blatt Nr. 0, wie oben beschrieben, geerntet.

Arabidopsis thaliana

Die Pflanzen wurden mit einem scharfen Skalpell direkt unterhalb der Blattrosette abgeschnitten und je fünf Pflanzen einer Behandlung gepoolt. Einfrieren und Aufbewahrung erfolgte wie zuvor für Tabak beschrieben.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Dreifachbestimmung nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein.

(Eichgerade: $1\ \mu\text{g} - 15\ \mu\text{g}$ BSA, $\lambda = 595\ \text{nm}$)

2.9.2 Messung der Lipoxygenase Aktivität

Tabakpflanzen der Varietät Bel W3 wurden wie unter 2.6.1.3 beschrieben mit Ozon behandelt und nach 24 h geerntet (Kap. 2.8). Dieser Erntezeitpunkt wurde gewählt, da hier eine hohe LOX Enzymaktivität erwartet wurde. In Vorversuchen wurden die

Proben spektrophotometrisch nach dem Protokoll von Rancé et al. (1998), die ebenfalls gestressten Tabak als Versuchspflanze verwendeten (*Pseudomonas syringae* infiziert), auf ihre LOX Aktivität untersucht. Hierbei war jedoch keine LOX Aktivität nachweisbar.

Auch die im Anschluss daran durchgeführten LOX-Enzymtests nach Ocampo et al. (1986) und Mauch et al. (1997), führten zu keinem LOX-Aktivitäts-Nachweis.

Diese Ergebnisse gaben Veranlassung den LOX-Enzymtest für Ozon-behandelte Tabakpflanzen var. Bel W3 neu zu etablieren. Zunächst wurde der Einfluss des verwendeten Extraktionspuffers auf die LOX Aktivität hin überprüft (Kap.2.9.2.1).

2.9.2.1 Optimierung des Extraktionspuffers

Ausgehend von dem bei Rancé, et al. (1998) beschriebenen Extraktionspuffer wurde die Optimierung durchgeführt. Unter Beibehaltung der Extraktionsbedingungen wurden die Zusammensetzung und der pH-Wert des Puffers variiert, um die optimale Stabilität der Lipoxygenase während der Extraktion zu erhalten. Die Begründungen der einzelnen Modifikationen sind im Ergebnisteil in Kapitel 3.2.1 dargestellt. Die hieraus resultierende Zusammensetzung des Extraktionspuffers ist wie folgt:

Zusammensetzung des Extraktionspuffers:

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 10 % (v/v) Glycerin
- 0,5 M NaCl (Natriumchlorid)
- 0,1 % Tween-20

Da der Extraktionspuffer keinerlei Schutzsubstanzen gegen Oxidationsprozesse enthielt, sollte im Folgenden der Einfluss von DTT, EDTA und PVPP auf die LOX Aktivität getestet werden. Die in der Literatur angegebenen Substanzen (Tab. 2) wurden dem o. g. Extraktionspuffer einzeln zugesetzt. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze ohne Schutzsubstanzen (Tab. 2).

Tab. 2 Schutzsubstanzen gegen Oxidationsprozesse

Testsubstanz	Literaturquelle
5 mM DTT	Rancé , et al. 1998
1 mM EDTA	Ocampo et al. 1986
PVPP (Spatelspitze)	Mauch et al. 1997
ohne Zusatz	/

Durchführung:

Tabak wurde 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt (Kap. 2.6.1.3) und nach 24 h geerntet (Kap.2.8). Hieraus wurden unter jeweiligem Zusatz der Substanzen in Tab. 2 die Rohextrakte wie in Kap. 2.9.2.2 hergestellt. Analysiert wurden pro Untersuchungsvariante je drei parallel aufgeschlossene Extrakte. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der LOX Aktivität nach der in Kap. 2.9.2.7 angegebenen Methode mit Linolsäure als Substrat bei pH 8.0.

Die Ergebnisse sind in Kap. 3.2.1 dargestellt. Die höchste LOX Aktivität wurde mit Extraktionspuffer ohne Zusatz von DTT, EDTA oder PVPP gemessen (Abb. 19).

2.9.2.2 Gewinnung des Rohextrakts

Die bei -80°C gelagerten Blattproben (Kap. 2.8) wurden á 500 mg in einen vorgekühlten (4°C) Mörser eingewogen und mit 1 ml optimiertem Extraktionspuffer (Kap. 2.9.2.1 und 3.2.1) auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde in eiskalte Eppendorfgefäße überführt und bei 10.000 x g 10 min, 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf Eis gehalten und für Enzymaktivitäts- (Kap. 2.9.2) und Proteinbestimmungen (Kap. 2.9.1) verwandt.

2.9.2.3 Bestimmung des optimalen pH-Wertes von Lipoxygenase

Der optimale pH-Wert von Lipoxygenase mit Linol- und α -Linolensäure als Substrat, wurde in unterschiedlichen Puffersystemen mit sich überlappenden pH-Werten, bestimmt. Hierfür wurden Tabak Homogenate (24 h, 150 ppb O₃) wie in Kapitel 2.9.2.2 hergestellt und die LOX Aktivität mit der unter Kap. 2.9.2.7 beschriebenen Methode gemessen.

In einem Bereich von 0 mM - 100 mM des Reaktionspuffers (Natrium-Phosphatpuffer) wiesen Barone et al. (1999) bei einer Ionenstärke von 50 mM die höchste LOX Aktivität nach. Es wurde daher der Natrium-Phosphatpuffer mit dieser Ionenstärke verwandt.

Verwendete Puffersysteme:

pH Bereich	Puffer
4.0 – 6.0	0,5 M Natrium-Citrat (McIlvaine)
6.0 – 8.0	0,5 M Natrium-Phosphat
8.0 – 10.0	0,1 M Clark und Lubs

Die Ergebnisse der Bestimmung des optimalen pH-Wertes von Lipoxygenase sind in Kapitel 3.2.3 dargestellt.

Vorversuche zur Überprüfung der Änderung des pH-Wertes im Reaktionsansatz nach Zugabe von Rohextrakt, ergaben eine minimale Abweichung von 0,01 pH Einheiten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der pH-Wert des Reaktionspuffers dem pH-Wert im Reaktionsansatz entspricht.

2.9.2.4 Kontrollversuche zum Einfluss des pH-Wertes auf Substrat oder Rohextrakt

Aufgrund von Oxidationsprozessen sollte der Einfluss des pH-Wertes des Reaktionspuffers auf das Substrat (Linolsäure) bzw. das Rohextrakt im Ansatz untersucht werden. Es wurden daher entweder 20 μ l Linolsäure oder 20 μ l Rohextrakt im Ansatz nach der in Kap. 2.9.2.3 beschriebenen Methode analysiert.

Die Ergebnisse sind in Kap. 3.2.3 dargestellt.

2.9.2.5 Bestimmung von K_m und V_{max}

Homogenate von Tabakblättern (24 h O_3) wurden wie unter Kap. 2.9.2.2 beschrieben hergestellt und hierin die LOX Aktivität bei zunehmender Substratkonzentration für Linol- bzw. α -Linolensäure (0,01 mM - 0,22 mM) nach der unter Kap. 2.9.2.7 beschriebenen Methode in Natriumphosphat Puffer (pH 8.0 bzw. pH 7.0) aus drei Extraktionen 3 fach bestimmt. Die Mittelwerte der spezifischen Aktivität der Lipxygenase wurde gegen die Substratkonzentration mit Hilfe des Programms SigmaPlot, Enzymkinetik-Modul (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) aufgetragen. Der K_m -Wert (Michaelis-Konstante) und V_{max} -Wert (Maximalgeschwindigkeit; alle Bindungsstellen am Enzym sind mit Substrat gesättigt) für das entsprechende Substrat wurden computergestützt durch Angleichen der gemessenen Aktivitäten an die resultierende Michaelis-Menten Gleichung berechnet. Der K_m -Wert wurde im Rohextrakt mit Linolsäure als Substrat mit 0,04 mM bei einer V_{max} von 0,45 nkat/mg Protein bestimmt und mit Linolensäure wurde ein K_m -Wert von 0,02 mM bei V_{max} von 0,30 nkat/mg Protein bestimmt. Da die Konstanten aus einem Rohextrakt bestimmt wurden, sind sie nur als Näherungswert zu betrachten. Mögliche Isozyme oder Konkurrenzreaktionen bleiben unberücksichtigt. Hughes et al. (1998) beschreiben, dass schon die Herstellung der Substrate, ihre Löslichkeit im Puffer und damit ihre Zugänglichkeit in der Substrattasche des Enzyms, einen Einfluss auf die K_m - und V_{max} -Werte haben können. Beispielhaft für LOX mit Linolsäure als Substrat ist das Michaelis-Menten-Diagramm in Abb. 10 dargestellt.

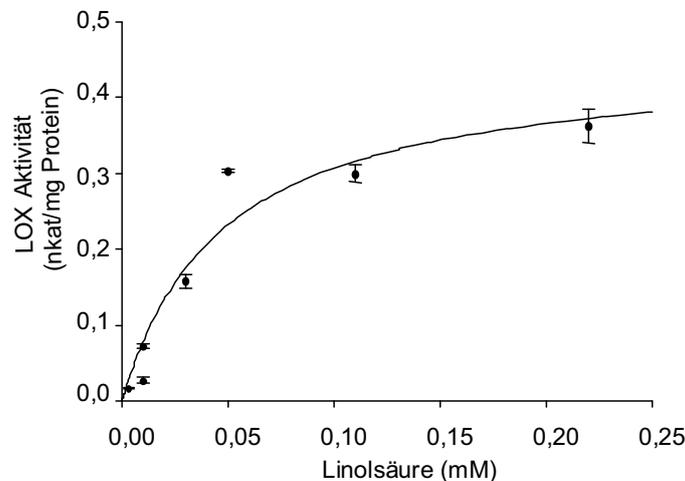


Abb. 10 Abhängigkeit der Lipoxygenase Aktivität von der Linolsäurekonzentration im Testansatz. Das Michaelis-Menten Diagramm wurde computergestützt mit dem Enzymkinetik-Modul SigmaPlot (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

2.9.2.6 Lipoxygenase Aktivität in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen

Drei Rohextrakte wurden extrahiert (Kapitel 2.9.2.2), aliquotiert und unter den folgenden Lagerungsbedingungen aufbewahrt:

Art der Behandlung	Zeitpunkt der Messung
a) frisch extrahiertes Homogenat	sofort
b) Homogenat nach 3,5 h auf Eis	3,5 h
c) Homogenat über Nacht bei 4°C im Kühlschrank	24 h
d) Homogenat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt	24 h

Die LOX Aktivität wurde nach den angegebenen Zeitpunkten a) bis d) wie in Kapitel 2.9.2.7 beschrieben gemessen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Aufschlüssen mit Dreifachbestimmung dar. Die Maximalwerte der Aktivitätsbestimmung wurden gleich 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Kapitel 3.2.4 gezeigt.

2.9.2.7 Durchführung der Messung

Die während der Lipoxygenase-Reaktion aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit cis, cis-1, 4-Pentadien-Struktur entstehenden Fettsäurehydroperoxide enthalten ein System konjugierter Doppelbindungen, welche eine Extinktionsänderung bei 234 nm bewirken. Diese kann spektrophotometrisch gemessen werden.

Die Lipoxygenase-Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 30°C in Halbmikro-Küvetten (Quarzglas Suprasila, Helma Optik GmbH, Jena). Diese Temperatur wurde von der Internationalen Vereinigung der Biochemie als Standardtemperatur empfohlen (Holme und Peck, 1998).

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und über einen Zeitraum von 5 min bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt.

Der Test-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

a) mit Linolsäure	b) mit Linolensäure
900 µl Reaktions-Puffer	910 µl Reaktions-Puffer
20 µl Linolsäure-Substrat	10 µl Linolensäure-Substrat
10 µl Enzymlösung	10 µl Enzymlösung

Reaktions-Puffer:

Die Messungen wurden wie jeweils bei den Versuchen angegeben mit auf 30°C vorgewärmten Reaktions-Puffer durchgeführt.

a) 0,5 M Natrium-Phosphatpuffer pH 8.0 bzw. 7.0

b) 0,5 M Natrium-Citrat Puffer pH 5.0

Zusammensetzung des Substrats:

Die Herstellung der Substratlösung erfolgte verändert nach Grossman und Zakut (1979) in folgender Weise:

20 µl Linolsäure wurden mit 38,4 µl Tween-20 und 2 ml Methanol im Spitzkolben gemischt und im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 25,6 ml 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer aufgenommen und mit einigen Tropfen 1 M NaOH (Natriumhydroxid) auf pH 9.0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert geht die Fettsäure gut in Lösung, so dass eine homogene Verteilung erreicht wird. Die Lösung wurde anschließend in Eppendorfgefäße aliquotiert und zur Vermeidung von Autoxidation mit Argon (Linde AG, München) überschichtet. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff (Linde AG, München) schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

In gleicher Weise wurden Substratlösungen unter Verwendung von α -Linolensäure, die im weiteren Text nur als Linolensäure bezeichnet wird, hergestellt.

Kontrollen:

Als Kontrolle wurde bei jeder Messung Enzymlösung, die zuvor 10 min im Wasserbad bei 100°C abgekocht wurde, mit dem jeweiligen Substrat bei optimalem pH-Wert, analysiert. Hierbei wurde in keiner Probe LOX-Aktivität festgestellt. Als Referenz diente Puffer mit Substratlösung.

Wenn nicht anders angegeben wurden drei Extraktionen parallel vermessen.

Berechnung der Lipoxygenase-Aktivität:

Die Berechnung der LOX Aktivität erfolgte in Anlehnung an Ocampo et al. (1986).

Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als die Menge an Enzym, die eine Extinktionsänderung von $0,001 \text{ min}^{-1}$ (Umsatz von $1 \text{ } \mu\text{mol}$ Substrat $\times \text{min}^{-1}$) bei 234 nm bewirkt. Dies entspricht einer katalytischen Aktivität von 0,667 nkat bei einem molaren Extinktionskoeffizienten für die Fettsäurehydroperoxide von $25.000 \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm errechnet sich die Volumenaktivität der LOX nach folgender Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \Delta E * 0,667 * V/v \text{ [nkatal/ml]}$$

ΔE = Extinktionsänderung pro Minute

V = Gesamtvolumen des Testansatz [ml]

v = Volumen der Enzymlösung [ml]

katal = mol/s

Division durch die Proteinkonzentration der eingesetzten Enzymlösung ergibt die spezifische Enzymaktivität [nkatal/ mg Protein].

2.9.2.8 Inhibitor Versuche

Rohextrakte mittelalter Tabakblätter (24 h O_3) wurden wie in Kapitel 2.9.2.2 beschrieben hergestellt. Zu je 10 μl Rohextrakt in Natriumphosphatpuffer pH 8.0 wurden die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen (s. u.) zugegeben und 5 min bei 30°C im Wasserbad (Precitherm PFV, Labora) inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 20 μl Linolensäure gestartet und wie unter Kap. 2.9.2.7 beschrieben verfolgt. Der Gesamtansatz betrug jeweils 930 μl .

Kontrollen wurden mit der gleichen Konzentration des jeweiligen Lösungsmittels ohne Inhibitoren vorinkubiert und vermessen (Kap. 2.9.2.7).

Die spezifische LOX Aktivität wurde für Proben und Kontrollen berechnet und als Prozent [%] Aktivität der Kontrolle ausgedrückt. Das Resultat ist im Ergebnisteil in Abb. 24 dargestellt.

Inhibitoren:

Quercitin Stocklösung verändert nach: Römpp, (1995); Watanabe und Sakai (1998)

1 mM Quercitin in 200 µl 0,5 M NaOH vorgelöst ad 200 ml Morpholinoethansulfonsäure (MES) pH 5.4 Konzentration: 0 µM - 50 µM in 10er Schritten

Esculetin Stocklösung nach: Watanabe und Sakai (1998)

1 mM Esculetin in 200 µl DMSO vorgelöst ad 200 ml 1 mM MES pH 5.4

Konzentration: 0 µM - 40 µM in 10er Schritten

trans-Resveratrol Stocklösung nach: Fan und Mattheis (2001)

10 mM trans-Resveratrol Dihydrat in Ethanol (96 %)

Konzentration: 0 µM - 150 µM in 30er Schritten

N-Propylgallat Stocklösung nach: Fournier et al. (1993)

20 mM N-Propylgallat in Ethanol (96 %)

Konzentration: 0 µM - 30 µM in 10er Schritten

2.9.3 Bestimmung der β -Glukuronidase (GUS) Aktivität

Das ursprünglich aus *E. coli* stammende β -Glukuronidase Gen (GUS) kodiert für eine Hydrolase, die β -Glukuronide spaltet. In Pflanzen ist die Hintergrundaktivität von GUS entweder sehr niedrig oder gar nicht detektierbar (Jefferson et al., 1987).

Zur Kontrolle wurde im Vorfeld die endogene Enzymaktivität von Wildtyp-Pflanzen *A. thaliana* Col-0 untersucht. Es wurde keine Hintergrund-Aktivität festgestellt.

Nachgewiesene GUS Expression ist somit spezifischer Natur.

Die in dieser Arbeit eingesetzten transgenen Pflanzen:

a) *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC

b) *A. thaliana* Bgl2/GUS

2.9.3.1 Histochemischer Nachweis

Die β -Glukuronidase katalysiert die oxidative Dimerisierung des synthetischen Substrats X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronid) wobei ein unlöslicher blauer Farbstoff entsteht. Er fällt im Gewebe aus und lässt damit Rückschlüsse auf die Aktivität des jeweiligen Promotors vor dem GUS Gen zu.

In situ Färbung:

Es wurden Blätter oder ganze Pflanzen der entsprechenden *A. thaliana* Varietät (Col-0, LOX2 oder Bgl2) in Petrischalen mit colorigener Substratlösung gegeben und in einem Exsikkator 2-3-mal für 10 min unter Vakuum (200 mbar, Chemie-Membranpumpe MZ2CE Vakuumbrand GmbH; Wertheim) infiltriert. Bei langsamem Druckausgleich konnte die Infiltration durch eine Dunkelfärbung der Blätter verfolgt werden. Das Pflanzenmaterial wurde samt Substratlösung in Falcon Röhrchen überführt und ü. N. bei 37° C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach folgte ein Entfärben zuerst in 70 % Ethanol und anschließend mehrfach in 96 % technischem (tech.) Ethanol. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur Photodokumentation in 96 % tech. Ethanol bei 4° C aufbewahrt.

Colorigene Substratlösung (nach Prof. A. B. Jensen, mündl. Mitteilung)

1 mg/ml X-Gluc (vorgelöst in 1 ml DMSO)

0,5 % Triton X –100

0,5 mM Natriumhexacyanaoferrat-(II)

0,5 mM Natriumhexacyanaoferrat-(III)

1 mM EDTA

100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0

2.9.3.2 Spektrofluorimetrischer GUS-Aktivitätstest

Eine Quantifizierung der β -Glucuronidase Aktivität transgener Pflanzen erfolgte unter fluorometrischer Messung der enzymatischen Hydrolyse des Substrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glukuronid (MUG) zu dem fluoreszierenden Produkt Methylumbelliferin.

Gewinnung des Rohextrakts

Für den Aufschluss der in flüssigem Stickstoff homogenisierten *A. thaliana* Proben (Kap. 2.8) wurden 50 mg Blattmaterial mit 500 μ l Lyse-Puffer extrahiert.

Lyse-Puffer (verändert nach Jefferson et al., 1987):

50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.0

10 mM EDTA

0,1 % (v/v) Triton X-100 (Serva)

10 mM β -Mercaptoethanol (jeweils frisch zugesetzt)

Das Homogenat wurde 10 min bei 10.000 x g, 4°C, zentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt für den spektrofluorimetrischen GUS-Aktivitätstest (Kap. 2.9.3.2) und Proteinbestimmungen (Kap. 2.9.1) verwendet.

Durchführung der Messung

Die GUS-Reaktion wurde in 1/2-Küvetten (Brand, Wertheim) durch Zugabe von 250 µl Enzymrohextrakt zu 2750 µl auf 37°C vorgewärmten Reaktionspuffer (1 mM MUG in Lysepuffer) gestartet.

Die entstehende Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 365 nm, Emissionswellenlänge: 455 nm) wurde in einem Spektrofluorimeter (Cary Eclipse- single cell peltier, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) bei 37°C verfolgt und war in dem Messbereich (10 min) stets linear. Es wurde die Extinktionsänderung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) der Probe bestimmt und unter Einbezug einer 4-Mu (4-Methylumbelliferin) Eichgeraden und der gemessenen Proteinkonzentration die GUS Aktivität in pmol 4-MU/ min x µg Protein errechnet.

2.10 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methoden durchgeführt.

2.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.10.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen erfolgte mit TRIZOL (GibcoBRL, Eggenstein) nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Gesamt-RNA wurde in doppelt autoklaviertem Wasser resuspendiert (10 µl/ 100 mg eingesetztem Blattmaterial) und die Konzentration bestimmt (Kap. 2.10.2). Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.10.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenzellen

Die Isolierung von Nukleinsäuren aus Pflanzen erfolgte verändert nach der N- Cetyl-N, N, N, -trimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode von Doyle und Doyle (1990).

Durchführung:

Je 10 g gemörserte unbehandelte Tabak-Blätter (Bel W3, Bel B, Nah-G) (Kap. 2.8) wurden in auf -20 °C vorgekühlte 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Das Material sollte nicht auftauen, um eine Degradierung der DNA durch DNasen zu vermeiden. Anschließend wurden 20 ml auf 65°C vorgewärmte 2 %- CTAB-Lösung (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 % PCP 40 (Polyvenylpyrrolidon) und frisch zugesetztes 100 mM β-Mercaptoethanol (0,7 % (v/v)) hinzugegeben und für 90 min bei 65°C im Wass erbad (GFL; Burgwedel) unter

leichtem Schütteln inkubiert. Die danach auf Raumtemperatur abgekühlte Suspensionsmischung wurde mit 1 Volumen Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) vorsichtig ausgeschüttelt. Im Anschluss erfolgte bei Raumtemperatur eine 10 min Zentrifugation bei 3900 x g. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Falconröhrchen überführt.

Die wässrige Phase wurde insgesamt 3 x erneut mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 1/100 Volumen RNase A (Roche) (10 mg/ml in Tris-Cl pH 7.4 nach: Sambrook et al., 1989) der klaren wässrigen Phase zugegeben und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2/3 Volumen eiskaltem Isopropanol und 10 min kreisförmiges Schütteln. Die DNA wurde 5 min mit 3900 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit 76 % Ethanol und 0,2 M Na-Acetat versetzt und 15 min auf Eis gehalten. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 3900 x g bei Raumtemperatur. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gereinigt, 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei Raumtemperatur und 3900 x g abzentrifugiert. Die ausgefällte DNA wurde 20 min luftgetrocknet und anschließend in 2 ml TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter Kap. 2.10.2 beschrieben.

2.10.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

- a) nach Birnboim und Doly (1979) (alkalische Lyse)
- b) Reine Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gewonnen.
- c) Größere Ansätze (Midis, ~ 50 ml) wurden mit dem Nucleobond AX (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers gewonnen.

2.10.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur selektiven Aufreinigung einer anhand eines DNA-Längenstandards ausgewählten DNA-Bande, wurde diese mit einem Skalpell aus dem präparativen Agarosegel (2.10.8.1) herausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellerprotokolls isoliert. Die Elution erfolgte in sterilem Wasser.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte spektrophotometrisch in Halbmikro-Quarzküvetten (Quarzglas Suprasil, Helma Optik GmbH, Jena) nach Sambrook et al. (1989) bei 260 nm. Die Reinheit der Präparationen wurde durch den Quotienten 260 nm/ 280 nm ermittelt.

2.10.3 Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.10.3.1 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA-Erststrangsynthese)

Mit Hilfe der Reversen Transkriptasen ist es möglich, zu mRNA komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Die cDNA repräsentiert die Sequenz transkribierter Gene ohne Introns. Es wurde eine cDNA-Erststrang Synthese verändert nach Maier und Heck (1999) durchgeführt.

Der RT-Ansatz zur cDNA-Erststrangsynthese hatte folgende Zusammensetzung (Σ 20 μ l): 2 μ g Gesamt RNA, 2,5 U/ μ l MuLv Reverse Transkriptase (Promega), 1 x Puffer MuLv (Promega), 10 ng/ μ l Obligo dt. (15), 1 mM Dantes (jedes) ad steriles Wasser.

Die isolierte gesamt RNA (Kap. 2.10.1.1) wurde vor dem Einsetzen in den RT-Ansatz 5 min bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur, 60 min bei 42°C und 5 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert und auf Eis abgekühlt. Der RT-Ansatz wurde als Template für die nachfolgende Polymerase Kettenreaktion (PCR, engl.: *Polymerase Chain Reaktion*) (Kap. 2.10.4) verwendet.

2.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer Gensequenzen erfolgte mittels PCR. Als Ausgangsmatrize diente entweder RT cDNA (Kap. 2.10.4.1) oder isolierte cDNA Fragmente bzw. Plasmide (Kap. 2.10.4.2). Die Amplifikation der spezifischen Sequenzen erfolgte mit 35 Zyklen (95°C: 1 min, Hybridisierungstemperatur: Primer- $T_m - 5^\circ\text{C}$ bis 10 °C: 1 min und 72 °C: 1,5 min) in einem Thermocycler (Robo Cycler Gradient 96, Fa. Stratagene, Heidelberg). Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) mit ihren entsprechenden T_m -Werten sind in Kapitel 2.10.7 aufgelistet.

2.10.4.1 PCR mit Reverse Transkriptase Ansatz

Als Matrize diente hierbei der unter Kap. 2.10.3.1 hergestellte RT-Ansatz.

Die RT-PCR-Reaktion hatte verändert nach Maier und Heck (1999) folgende Endkonzentration (Σ 50 μ l): 10 μ l RT-Ansatz (Kap. 2.10.3.1), 0,2 mM Dantes, 50 mU/ μ l Taq-DNA-Polymerase, 1 X Taq-Puffer, 10 X conc., 1 μ M genspezifische Primer (Kap. 2.10.7) ad steriles Wasser.

2.10.4.2 PCR mit cDNA Fragmenten oder isolierten Plasmiden

Die PCR Ansätze hatten folgende Zusammensetzung (Σ 100 μ l): 0,1-100 ng Template (isolierte cDNA Fragmente oder Plasmide), 0,2 mM Dantes (jedes), 50 mU/ μ l Taq-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim), 1 X Taq-Puffer, je 1 μ M Primer (5'-3' und 3'-5') ad steriles Wasser.

2.10.5 Relative Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion

Die Relative RT-PCR wurde mit dem Kit: QuantumRNA™ 18S Internal Standards (Fa. Ambion, Austin) nach Angaben des Herstellerprotokolls in einem Thermocycler (Robo Cycler Gradient 96, Fa. Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Die spezifischen Primer für 18S rRNA und Competimere wurden vom Hersteller mitgeliefert. Die 18S Competimere sind an ihrem 3'-Ende so modifiziert, das die DNA Polymerase blockiert wird. Hierdurch wird die Amplifizierung der 18S cDNA reduziert, ohne das die Primer limitierend werden. Die notwendigen Vorversuche zu Ermittlung der richtigen PCR Zyklenzahl und dem richtigen 18S Primer zu Competimer Verhältnis wurden ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 und Abb. 12 dargestellt.

Vorversuche:

a) Die Anzahl der PCR-Zyklen sollten im linearen Bereich des spezifischen Lipoxygenase Amplifikationsproduktes (471 bp) liegen.

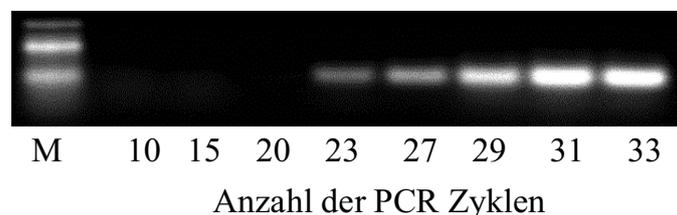


Abb. 11 Ermittlung des linearen Bereichs zur Amplifizierung des Lipoxygenase Fragments (471 bp) mittels PCR. Die Ansätze wurden auf einem 1 % Agarose Gel in TAE Puffer aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. M entspricht dem 100 bp Marker (Biolabs).

Hierzu wurde eine PCR durchgeführt und die Ansätze 10, 15, 20, 23, 27, 29, 31 oder 33 Zyklen lang amplifiziert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der PCR Ansätze auf einem 1 % Agarosegel in TAE Puffer und die Färbung mit Ethidiumbromid (Abb. 11). Die Signalintensitäten der ethidiumbromidgefärbten Banden wurden mit dem Computerprogramm HEROLAB quantifiziert und gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Als Ergebnis wurde ein linearer Bereich von 23 – 29 Zyklen ermittelt.

Die RT-PCR wurde daher mit 24 Zyklen durchgeführt.

b) Bei ungefähr gleichen Signalintensitäten von 18S rRNA und LOX Amplifikat, ist das richtige Verhältnis von 18S Primern : 18S Competimeren. Die RT-PCR wurde mit 24 Zyklen nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt. Hieraus wurde ersichtlich, dass das beste 18S Primer : 18S Competimer Verhältnis 3:7 beträgt (Abb. 12).



Abb. 12 Test des richtigen 18S: Competimer Verhältnis. LOX: spezif. Lipoxygenase (471 bp). 18S rRNA: 18S rRNA Amplicon. M: 100 bp Marker (Biolabs). Pro PCR Ansatz waren enthalten: A) nur 18S Primer und 18S Competimere im Verhältnis 3:7. B) – E): Verhältnis von 18S Primern zu 18S Competimeren bei gleichzeitigem Vorhandensein von spezifischen LOX Primern: B) 4:6, C) 3:7, D) 2:8, E) 1:9. F) nur spezifische LOX Primer. K) Verhältnis von 18S Primern zu 18S Competimeren (3:7) bei gleichzeitigem Vorhandensein von spezifischen LOX Primern ohne cDNA Template. Die PCR wurde mit 24 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55° C durchgeführt, die Ansätze auf einem 1 % Agarose Gel in TAE Puffer aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Durchführung der RT-PCR

Die verwendete cDNA wurde nach der in Kapitel 2.10.3.1 beschriebenen Methode hergestellt. Die relative RT-PCR mit spezifischen LOX Primern (Kap. 2.10.7) wurde mit 24 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55° C mit einem 18S rRNA : Competimer Verhältnis von 3:7 nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abb. 29 dargestellt.

Die zur Kontrolle durchgeführte PCR mit genomischer DNA und den spezifischen LOX-Primern ergab keine Amplifikationsprodukte (Daten nicht gezeigt). Eine Verunreinigung durch genomische DNA wurde damit ausgeschlossen.

2.10.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Alle Klonierungsarbeiten der RT-PCR Fragmente (Kap. 2.10.4) wurden mit dem Vektor pGEM-T (Promega, Madison; USA) nach Angaben des Hersteller Protokolls durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen (*E. coli* DH5 α) (Kap. 2.4.2) transformiert, die Zellen angezogen und ausplattiert (Kap. 2.4.1).

Die Bakterienkolonien wurden auf Insertion des DNA-Fragments in die Plasmide entweder über a) Restriktion oder b) mittels Kolonie-PCR getestet.

a) Restriktion

Die Isolierung von Fragmenten aus Plasmid DNA (2.10.1.3) erfolgte nach Angaben des jeweiligen Enzym-Herstellers mit x ng Plasmid- DNA mit 1/10 Vol. Restriktionsendonuklease in einem vom Produzenten mitgelieferten Puffer.

b) Kolonie-PCR

Eine PCR (Kap. 2.10.4.2) wurde durchgeführt mit spezifischen Primern für das Fragment (oder mit den das Fragment flankierenden T7 und SP6 Primern des Vektors), wobei ein Teilabstrich je eines Klons pro PCR Reaktionsgefäß das Template im PCR Ansatz ersetzte.

Das Resultat von a) bzw. b) wurde auf einem 1 % Agarose Gel in TAE Puffer aufgetrennt, Ethidiumbromid gefärbt und die Fragmentlänge anhand des mitgeführten Größenmarkers beurteilt. Aus Plasmiden, die das erwartete PCR Fragment enthielten, wurde die Orientierung und Sequenz des DNA-Fragments durch Auftrags-Sequenzierung der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bestimmt (2.10.10). Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte computergestützt wie in Kap. 2.10.21 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 dargestellt.

2.10.7 Verwendete Primer

Die in dieser Arbeit für PCR Reaktionen verwendeten spezifischen Primer (5'-3' Orientierung) sind zusammen mit ihrer Schmelztemperatur in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3 Für PCR Reaktionen verwendete genspezifische Primer mit ihrer Schmelztemperatur (T_m). Die Zugangsnummer (engl.: *accession number*) entspricht der Nukleotidsequenz der Primersynthese.

Gen	Primersequenz (5'-3' Orientierung) P1 (Start) = 5'-Primer; P2 (Ende)= 3'-Primer T_m : Schmelztemperatur der Primer [°C]	<i>accession number</i>
12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase	P1(468): GATTTTCAGCCCAATGGAGA P2(1003): GCCTTCCTCATCGGTACAAG T_m : 57	AJ242551
Hydroperoxide Lyase	P1(955): AAGCAGGGCACAACAGAGT P2(1458): CTCCCAGTTTGTGGACCATT T_m : 57	AF230372
Allenoxid-Cyclase	P1(54): CTGTTTCCTCAGCCTCTGCT P2(615): TGCTGCAATTTCACTTGACC T_m : 57	AJ272026
Epoxidhydrolase	P1(295): CATTCAAGGACCTTGTCGAT P2(844): AGGGCGTAATCCTTCTCTCC T_m : 57	U57350.1
Lipoxygenase	P1(2129): CTTGGTGGCCTAAAATGCAG P2(2599): GAAGAGCAAGGTGTATGGAA T_m : 57	X84040.1
Lipoxygenase (Volllänge)	P1 (12): TTTCTTTTCGTTTTCTTGGAAGG P2 (2634): AATTCCTTTGCCAGTAAGTC T_m : 54	X84040.1
basische β 1, 3-Glucanase	P1 (252): TGGGAATGAAATCAGCCCTG P2 (943): TGTCCTTCCAAACACCACAGAGA T_m : 58	M20620
Alkohol-Dehydrogenase	P1 (209): GAAGCTGGAGGAATTGTGGA P2 (719): CACCAAACCTTCTTGGCATCA T_m : 56	X81853.1
basische Chitinase	P1 (20): CCTCGGCAGAACAAATGTGGT P2 (407): TCTGGTGCTGTTGCCCATC T_m : 59	M15173
Ribosomale 18S rRNA	P1(1142): AGGAATTGACGGAAGGGCAC P2(1454): TGGACATCTAAGGGCATCACA T_m : 58	AJ236016.1

Die Zugangsnummer (engl.: *accession number*) bezeichnet die Nukleotidsequenz aus der die Primer computergestützt (Kap. 2.10.21) abgeleitet wurden. Die entsprechende Genbezeichnung ist im Anhang 1) dargestellt. Die 5' Start- und 3' Endpunkte der Primer sind angegeben.

Die kommerziell angebotenen pGEM-T spezifischen Primer SP6 und T7 sind nicht extra aufgeführt und wurden über MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.10.8 Gelelektrophorese

2.10.8.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA Proben wurden vor der Elektrophorese mit 0,1 Vol. 10x DNA-Ladepuffer (0,25 % Bromphenol Blau, 0,25 % Xylene Cyanol, 50 % Glycerin) versetzt. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung (~5 Volt (V)/Zentimeter (cm)) erfolgte in Agarosegelen mit 0,8 % - 1,5 % Agarose in 1x TAE (40 mM TRIS/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA; pH 8.5) und 1x TAE als Laufpuffer oder bei genomischer DNA für Southern Analysen in 1x TBE (89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8.0) mit 1x TBE als Laufpuffer. Danach wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt.

2.10.8.2 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Allgemeines:

Soweit zulässig wurden alle Gefäße und verwendete Lösungen vor Gebrauch autoklaviert. Glasgeräte wurden mindestens 4 Stunden bei 180°C gebacken und sonstige Geräte wie Gelkammern, Wannen und Pinzetten 10 Minuten mit 3 % H₂O₂ behandelt und anschließend mit doppeltdestilliertem-Wasser gespült.

Verwendete Chemikalien und Lösungen:

10x Mops: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA; pH 7.0

Formaldehydgel-Ladepuffer: 50 % Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.25 % Bromphenolblau und 0,25 % Xylene Cyanol FF

Durchführung:

Vor dem Gelauftrag wurden je Probe 15 µg Gesamt-RNA (Kap. 2.10.1.1) in Lösepuffer (Σ 21,5 µl: 0,46 Vol. 1x MOPS, 0,16 Vol. 37 %iges Formaldehyd, 0,09 Vol. Formaldehydgel-Ladepuffer, 0,46 Vol. Formamid) 15 min bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Ebenso wurde mit dem Größenmarker (20 ng/ Spur) Digoxigenin-markierter RNA-Längenstandard II (Roche, Mannheim) verfahren. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben bis zum Gelauftrag auf Eis gehalten.

Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Agarose-Formaldehyd-Gel (1,3 % Agarose, 0,1 Vol. 10x MOPS, 0,17 Vol. 37 %iges Formaldehyd) in 1x MOPS als Laufpuffer für 4 h bei 3 V/ cm.

2.10.9 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zum Nachweis von Isoenzymen der Lipoxygenase wurden Proteinextrakte aus ozonbehandelten und unbehandelten Tabak Pflanzen (Kap. 2.6.1.3 und 2.8) auf

anionischen nativen Polyacrylamidgelen (nativ PAGE) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte verändert nach der Methode von Husson et al. (1998) in einer Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, München).

Durchführung:

250 mg Blattmaterial wurden mit 0,5 ml auf 4°C vorgekühltem und optimierten Protein-Extraktionspuffer (Kap. 2.9.2.1) in einem eiskalten Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein kaltes Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 10.000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für Bradfordbestimmungen (2.9.1) und zum Gelauftrag verwendet.

Vor dem Gelauftrag wurden pro Spur in 1X Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 10 % Glycerol (v/v), 0,1 % Bromphenolblau) eingesetzt:

50 µg Protein des Überstandes

negativ Kontrolle: 50 µg BSA, als nicht enzymatisch aktives Enzym

positiv Kontrolle: 30 µg LOX (Sigma), als enzymatisch aktives Enzym

Zur Kontrolle der Auftrennung wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (Bio-Rad, München) mitgeführt.

Zusammensetzung der Gele:

Lösung	anionisch	
	Trenngel 10 % (pH 8.8)	Sammelgel 4 % (pH 6.8)
Bis-Acrylamid Lsg. (30 %)	3,35 ml	1,3 ml
Puffer	2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
Wasser	4,2 ml	6,2 ml
APS 10 % (w/v)	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in 1X TRIS-Glycin-Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin pH 8.3) für 105 min bei 30 mA konstant Strom, wobei die Gelapparatur in einer Wanne mit Eis stand.

2.10.9.1 Nachweis der Lipoxygenase Aktivität mittels in-Gel Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine (Kap. 2.10.9) wurden die Gele für 15 min bei RT gewässert und anschließend in einer Substrat/Färbelösung mit Linol- oder Linolensäure ü. N. bei RT inkubiert. Der Nachweis der LOX Aktivität

beruht nach Heydeck und Schewe (1985) durch die LOX katalysierte Umwandlung der Fettsäuren in ihre korrespondierenden Hydroperoxide und dadurch hervorgerufener Oxidation des in der Lösung vorliegenden Farbstoffes o-Dianisidindihydrochlorid, der als unlöslicher brauner Niederschlag im Gel ausfällt. Unspezifische Oxidation wurde durch Zugabe von Kaliumcyanid ausgeschlossen. Die LOX Aktivität wurde in Form brauner Banden im Gel detektierbar. Der Nachweis der Enzymaktivität mittels in-Gel Färbung wird auch als *native staining* (engl.) bezeichnet.

Substrat/Färbelösung, verändert nach Verhue und Francke (1972):

$3,5 \times 10^{-3}$ M Linolsäure oder Linolensäure wurden mit 0,02 % (w/v) o-Dianisidindihydrochlorid (aus 1 % Stocklsg. in EtOH) in 15 % (v/v) EtOH_{abs.} unter Rühren vorgelöst. Anschließend wurde mit 10^{-3} M Kaliumcyanid (KCN) und dem entsprechenden Puffer (a oder b) auf 100 ml aufgefüllt.

verwendeter Puffer:

a) 0,05 M Natrium Phosphat Puffer pH 8.0 bei Linolsäure als Substrat

b) 0,05 M Natrium Phosphat Puffer pH 7.0 bei Linolensäure als Substrat

Das Ergebnis wurde digital dokumentiert und ist in Kap. 3.5 dargestellt.

2.10.10 DNA-Sequenzierung

Auftragssequenzierungen wurden von der Firma MWG BIOTECH (Ebersberg) durchgeführt.

2.10.11 Digoxigeninmarkierung von cDNA-Fragmenten

Für die Northern-Experimente wurden die Sonden durch eine PCR (Kap. 2.10.3.1) mit spezifischen Primern (Kap. 2.10.7) mittels PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) mit DIG-11-dUTP nach den Angaben des Herstellers markiert. Es wurden pro Reaktion jeweils 100 pg gelreine fragmententhaltende Plasmid-DNA oder 20 ng gelreine cDNA-Fragmente eingesetzt.

Für die Southern-Analyse (Kap. 2.10.19) wurde die Sonde in gleicher Weise hergestellt, aber zusätzlich der 10x DIG MIX um 1:1 mit 10x Dantes vor dem Einsetzen verdünnt. Dies war aufgrund der Länge der *N. tabacum* LOX Sonde von 2,63 Kb notwendig.

Die Ansätze wurden nach der PCR Reaktion über Microcon Filter (Amicon PCR Centrifugal Filter, Fa. MILLIPORE, Eschborn) nach Herstellerangaben gereinigt und mit 20 µl sterilem Wasser eluiert.

Die Markierungseffizienz der Sonden wurde mit einem Aliquot neben einem gleichem Aliquot unmarkierter Fragmente auf Agarosegelen (Kap. 2.10.8.1) überprüft.

2.10.12 Herstellung genspezifischer Sonden

Die für die Northern und Dot Blot Experimente benötigten genspezifischen Sonden wurden auf folgende Weise erhalten:

Tabak cv. Bel W3 wurde 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt (Kap. 2.6.1.3) und nach 8 h bzw. 24 h Blatt Nr. 3 geerntet (Kap.2.8). Hieraus wurde die gesamte mRNA isoliert (Kap. 2.10.1.1), anschließend die cDNA synthetisiert (Kap. 2.10.3.1) und mit Hilfe der spezifischen Primer (Kap. 2.10.7) Teilsequenzen der gewünschten Gene amplifiziert (Kap. 2.10.4.2).

Aus nach 8 h geerntetem Blattmaterial ließen sich die PCR Fragmente für OPR, AOC, EH, LOX, LOX (Volllänge), ADH, Glc, Chn und rRNA amplifizieren. Aus nach 24 h geerntetem Blattmaterial ließ sich das PCR Fragmente für HPL vermehren. Die Nukleotidsequenzen der amplifizierten Gensonden für Northern Blot Analysen der LOX-Weg Enzyme sind im Anhang und die Ergebnisse nach Sequenzvergleichen in Tab. 5 im Kapitel 3.6 dargestellt.

Gelreine PCR-Fragmente dieser Nukleotidsequenzen wurden kloniert (Kap. 2.10.6) und anschließend digoxigeninmarkiert (Kap. 2.10.11).

2.10.13 RNA-Transferblot (Northern Blot)

Zur Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden Northern Blot-Analysen nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Hierbei wurden nach der Trennung der Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Kap. 2.10.8.2), die Gele 20 min in sterilem Wasser inkubiert (Ausschwemmen des Formaldehyds) und anschließend die Gesamt-RNA von der Gelmatrix über Kapillarkräfte (ü. N., RT) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) transferiert. Der verwendete Transferpuffer war 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumacetat; pH 7.0). Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, FA. Stratagene, Heidelberg) mit der Membran quervernetzt und luftgetrocknet. Die Lagerung der Northern-Blots erfolgte bis zu ihrer Hybridisierung (Kap. 2.10.14) in Folie verschweißt bei -20°C.

Die in dieser Arbeit gezeigten Blots stellen für LOX, HPL, AOC, Glc und EH je ein repräsentatives Ergebnis von zwei bis vier Wiederholungen aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen dar.

Erste Versuche repräsentieren Northern Blots mit OPR, ADH und Chn.

2.10.14 Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Für den RNA und DNA Nachweis wurden DIG-markierte Sonden (Kap. 2.10.11) verwendet. Je 15 ng Sonde/ ml DigEASYHYB (Roche) wurden 10 min bei 95°C denaturiert und der Hybridisierungslösung zugegeben.

Die Prehybridisierung erfolgte 1 h bei 50°C mit Dig EASYHYB (Roche) nach Herstellerangaben unter Schütteln im Wasserbad.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für den RNA Nachweis bei 50°C und für den DNA Nachweis bei 42°C in DigEASYHYB (Roche) mit 15 ng denaturierter Sonde (s. o.) pro ml DigEASYHYB (Roche) unter Schütteln im Wasserbad. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zuerst 2 mal je 5 min in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur und anschließend 2 mal je 15 min in 0,3 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 50°C für den DNA Nachweis und bei 55° C für den RNA Nachweis, gewaschen. Zum Nachweis der markierten Sonden wurde im Anschluss eine Immunologische Chemolumineszenz-Detektion (Kap. 2.10.15) durchgeführt.

2.10.15 Immunologische Chemielumineszenz-Detektion

Die Immunologische Chemolumineszenz-Detektion der markierten Sonden nach Roche (2000) erfolgte nach den Angaben des Hersteller Protokolls mit CDP^{STAR} als Substrat. Die Aufnahme der Hybridisierungssignale erfolgte über eine CCD Kamera in einer Luminescent Imager Apperatur (Luminescent Image Analyser LAS-1000, Fa. Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt).

2.10.16 Rehybridisierung der Membran

Die noch feuchte Membran wurde nach den Angaben des Hersteller Protokolls (Roche, 2000) rehybridisiert und bis zur erneuten Hybridisierung in 2x SSC bei 4°C aufbewahrt.

2.10.17 Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Die Quantifizierung der aufgezeichneten Hybridisierungssignale (2.10.15) erfolgte mit dem Auswertungsprogrammen AIDA 2.0 bzw. HEROLAB E.A.S.Y Win32 (HEROLAB GmbH, Wiesloch). Alle gezeigten Gele und Blots wurden digital bearbeitet, inhaltlich aber nicht verändert.

Bei der relativen RT-PCR (Kap. 2.10.5) wurden die Quotienten aus den spezifischen LOX Hybridisierungssignalen (Ozon und Kontrolle) mit den entsprechenden Hybridisierungssignalen für die 18 S rRNA Sonde pro Zeitpunkt gebildet.

Bei den Northern Blots (Kap. 2.10.13) wurde pro Zeitpunkt der Quotient (Q) aus den relativen (rel.) Hybridisierungssignalen für Ozon durch die rel. Hybridisierungssignale der Kontrolle gebildet. $Q (O_3/K) = 1$: keine Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle; $Q (O_3/K) > 1$ = Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle; $Q (O_3/K) < 1$ Repression gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

2.10.18 Restriktion genomischer DNA

Pro Restriktions-Ansatz wurden 20 µg genomische DNA (Kap. 2.10.1.2) mit 10 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 50 µl ü. N. bei 37°C im Wasserbad in den mitgelieferten Puffern nach Angaben des Herstellerprotokolls inkubiert. Die hierfür notwendige Restriktionsanalyse wurde zuvor mit dem Programm DNAMAN Version 4.15 (Lynnon BioSoft, Quebec Canada) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass sie innerhalb der LOX cDNA Sonde (2,63 Kb) jeweils eine Schnittstelle wie folgt besaßen:

Enzym	Position der Schnittstelle
BamHI	1245
NdeI	1965
PstI	2366

Die Auftrennung der restringierten genomischen DNA erfolgte in einem 0,8 % Agarosegel (Kap. 2.10.8.1).

2.10.19 DNA-Transferblot (Southern-Blot)

Nach der Gelelektrophorese (Kap. 2.10.8.1) der restringierten genomischen DNA (Kap. 2.10.18) wurde die DNA im Gel vor dem Transfer 20 min in 250 mM HCl depurinert, 2 x 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert und anschließend 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH 7.5) neutralisiert. Nach 10 min Equilibrierung in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumacetat; pH 7.0) erfolgte die Übertragung der DNA Fragmente aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mittels Kapillartransfer nach der gleichen Methode wie unter Kapitel 2.10.13 für den Northern Blot beschrieben.

2.10.20 Dot-Blot

Gesamt-RNA (Kap. 2.10.1.1) wurde pro Well mit 6x SSPE in 1:5 Formaldehyd (37 %) auf 2 µg/150µl verdünnt und 15 min bei 65°C denaturiert. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und mit 300 µl eiskaltem 15X SSPE versetzt. Die positive Nylonmembran (Hybond N⁺, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde 10 min in 12X SSPE inkubiert, in die Dot-Blot Apparatur (Bio-Dot Microfiltration Apparatus, Bio-Rad GmbH; München) eingespannt und zweimal mit je 0,5 ml/Well 12X SSPE gespült. Anschließend wurden die vorbereitete 450 µl RNA-Lösungen/Well geladen und zweimal mit je 0,5 ml/Well 12X SSPE gespült. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, FA. Stratagene, Heidelberg) mit der Membran quervernetzt, getrocknet und bis zur Hybridisierung (Kap. 2.10.14) bei -20°C gelagert.

20x SSPE: 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA; pH 7.4

2.10.21 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzrecherchen und -vergleiche erfolgten mit den vom *National Center for Biotechnological Information* (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> angebotenen Programmen, wie a) *nucleotide blast* (Algorithmus: blstn) oder b) *Align* (bl2seq). Hierfür und für das Design der Primer-Oligonukleotide wurden auch das Programm: DNAMAN Version 4.15 (Lynnon BioSoft, Quebec, Canada), sowie das Programm Primer3, das vom Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/tools/software.html>) angeboten wird, verwandt.

2.11 Histochemischer Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies

Tabak

Die Blattspitzen von mittelalten Tabak Bel W3 Blättern zeigten nach Ozonbehandlung Nekrosen (Abb. 17). Dieser Bereich wurde daher zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Ozonbehandlung (Kap. 2.6.1.3) abgetrennt (0 h, 3 h, 8 h und 24 h) und eine Hälfte mit NBT (4-Nitroblau Tetrazolium) und die andere Hälfte mit DAB (3, 3'-Diaminobenzidin) infiltriert. Ebenso wurde mit unbehandelten Kontrollen verfahren.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde in Tabakblättern mit 3, 3'-Diaminobenzidin (DAB) nachgewiesen. In dem Pflanzengewebe wird DAB durch eine Peroxidase vermittelte Reaktion mit H₂O₂ polymerisiert und fällt als braunes Präzipitat an den Orten der H₂O₂ Bildung aus (Thordal-Christensen et al., 1997).

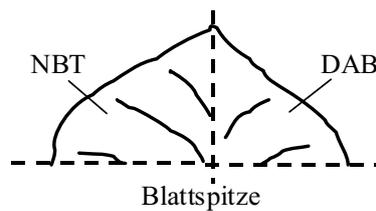


Abb. 13 Blattbereich zur Infiltration von DAB oder NBT zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies.

2.11.1 DAB (3, 3'-Diaminobenzidin)

Durchführung:

Das Pflanzenmaterial wurde in einem Exsikkator unter Vakuum (Chemie-Membranpumpe MZ2CE, Vakuumbrand GmbH; Wertheim) bei 200 mbar für 10 min mit Puffer (10 mM MES (Sigma) pH 6.5, 0,1 % (w/v) DAB) infiltriert. Durch das angelegte Vakuum wurde die Luft aus dem Interzellularraum abgegeben und beim langsamen Druckausgleich durch den Puffer ersetzt. Der Vorgang wurde wiederholt, bis man eine vollständige Infiltration durch eine Dunkelfärbung der Blätter erkennen konnte (2-3-mal). Danach wurde das infiltrierte Material 45 min im Licht inkubiert und anschließend in 96 % tech. Ethanol, unter mehrfachem Wechseln der Lösung, entfärbt und fotografisch dokumentiert.

Mit den Kontrollen wurde analog verfahren, aber ohne Zusatz von DAB im Puffer.

2.11.2 NBT (4-Nitroblau Tetrazolium)

Mit 4-Nitroblau Tetrazolium (NBT) lassen sich nach Doke und Ohashi (1988) Superoxid Radikale ($O_2^{\cdot-}$) nachweisen. Es entstand ein unlöslicher blauer Niederschlag von Formazan an den Orten der Superoxid Radikale, der nach dem Bleichen in Alkohol deutlich sichtbar wurde.

Durchführung:

Das Infiltrieren der NBT-Lösung (0,1 % (w/v) NBT, 10 mM Natriumazid, 50 mM Kaliumphosphat pH 6.4) erfolgte wie zuvor für DAB (Kap. 2.11.1) beschrieben. Die Inkubation erfolgte für 45 min im Dunkeln. Hierzu wurden die Petrischalen in Alufolie gewickelt. Das Entfärben in Alkohol und die fotografische Dokumentation erfolgte analog zu Kap. 2.11.1.

Mit den Kontrollen wurde analog, ohne Zusatz von NBT im Puffer, verfahren.

2.12 HPLC der LOX Reaktionsprodukte

Aus ozonbehandelten (5 h, 150 ppb O_3) Tabakpflanzen cv. Bel W3 bzw. unbehandelten Kontrollen wurden nach 0, 5, 8, 12, 24, 32 und 48 Stunden Homogenate extrahiert (Kap. 2.9.2.2). Hiervon wurden je 10 μ l mit 900 μ l 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0 und 20 μ l Linolsäure (6,5 mM) für 1 min bei RT in 1 ml Injektionsvials inkubiert. Anschließend wurden von der klaren Lösung 30 μ l auf die HPLC-Säule (HPLC, engl.: *high performance liquid chromatography*) injiziert. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden jeweils drei Extraktionen analysiert.

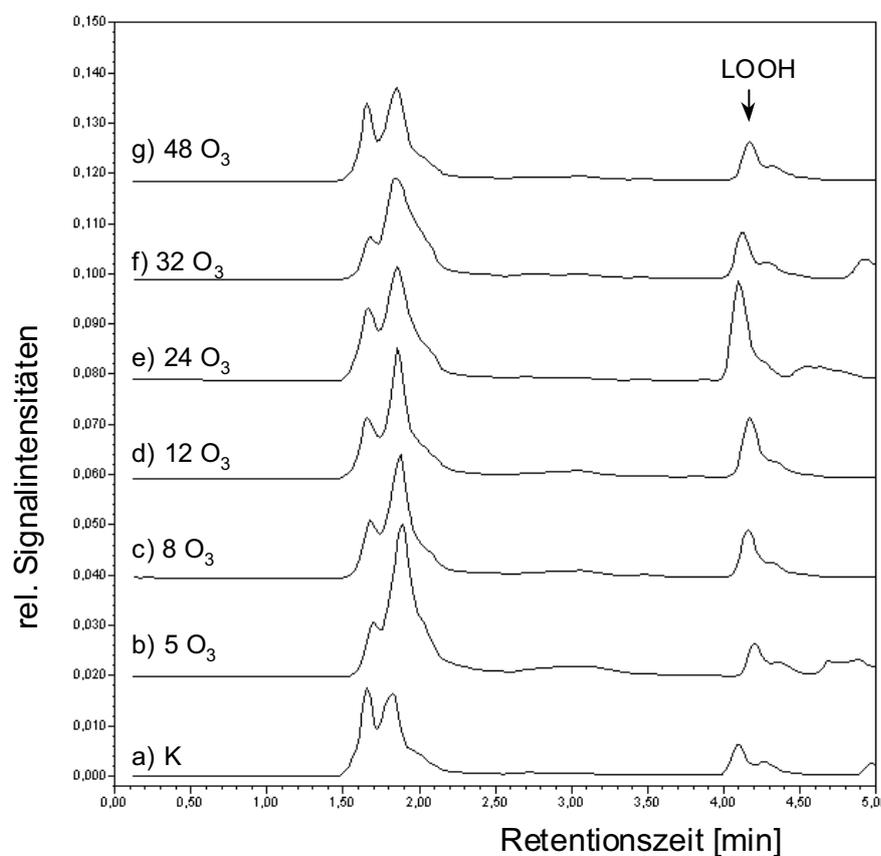


Abb. 14 Typische Chromatogramme bei 235 nm nach einer LOX Reaktion. Dargestellt ist die Null-Kontrolle (a) und je ein Chromatogramm von einer LOX Reaktion nach Ozon mit den angegebenen Zeiten (b-g). Der Pfeil verweist auf das entstandene Lipidhydroperoxid (LOOH). Die jeweiligen Flächen wurden mit dem Programm Millennium³² (Version 3.2; WATERS Corp.) manuell integriert und verrechnet.

Die HPLC-Analysen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Helmut Kneifel (Forschungszentrum Jülich). Die Trennung erfolgte mit einer HPLC-Anlage mit Steuerung durch Millennium (WATERS Corp.) mit einer Pumpe 6000A

(Lösungsmittel A: 0,1 % H_3PO_4 in Reinstwasser) und M515 (Lösungsmittel B: Acetonitril, gradient grade). Die Trennung erfolgte isokratisch (80 % Lösungsmittel B und 20 % Lösungsmittel A) Säule: ODS-1, CS-Langerwehe, 250x4 mm, Se. Nr. 23606-99, mit Vorsäule. Injektion: WISP 710 (WATERS); Detektor: PDA 996 WATERS.

Nach der Trennung wurden die Lipidhydroperoxide bei einer Wellenlänge von 235 nm bestimmt und die Fläche der Peaks mit dem Programm Millennium³² (Version 3.2; WATERS Corp.) manuell integriert und berechnet. In Abb. 14 ist für jeden Untersuchungszeitpunkt exemplarisch ein typisches Chromatogramm abgebildet. Der Pfeil verweist auf das entstehende Lipidhydroperoxid (LOOH). Darüber hinaus wurde als Kontrolle zuvor die Identität des Lipidhydroperoxids wie unter Kap. 2.12.1 beschrieben, untersucht. Andere Peaks wurden nicht weiter bestimmt. Das Ergebnis ist in Kapitel 3.4 und Abb. 26 dargestellt.

2.12.1 Reduktion der Linolsäurehydroperoxide mittels Natriumborhydrid

Lipidhydroperoxide (LOOH) können durch Zugabe von Natriumborhydrid (NaBH_4) zu ihren entsprechenden Hydroxyverbindungen (LOH) reduziert werden (Wu et al., 1995; Omar et al., 2003). Die Identität der mittels HPLC bestimmten Lipidhydroperoxide (Abb. 14, LOOH) wurde indirekt im Vergleich mit einem externen Lipidhydroxid (LOH) Standard (13S, 9Z, 11E)-13-hydroxy-9,11-octadecadiensäure (13 [S]-HODE; Sigma) wie folgt überprüft.

Mit der in Kap. 2.12 beschriebenen HPLC Methode wurden 5 μl des Standards 13-(S)-Hydroxyoctadeca-9Z, 11 E-Diensäure (13 [S]-HODE, Sigma) aufgetrennt. Das Ergebnis zeigt, dass der Standard (LOH) bei einer Retentionszeit von 4,04 min eluierte (Abb. 15 a) Standard). Als Vergleichsprobe wurde nach 24 h aus Blatt 3 ozonbehandelter (150 ppb, 5 h) Tabakpflanzen ein LOX enthaltendes Rohextrakt (RE) hergestellt (Kap. 2.9.2.2). Hiervon wurden 10 μl mit 900 μl Natriumphosphatpuffer pH 8.0 und 20 μl Linolsäure (6,5 mM) für 3 min bei RT inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden 30 μl auf die HPLC Säule injiziert und unter den gleichen Trennbedingungen wie zuvor beschrieben (Kap. 2.12) analysiert. Das Resultat ist in Abb. 15 c) RE dargestellt und zeigt dass der LOOH Peak bei einer Retentionszeit von 3,82 min eluierte. Der verbleibende Reaktionsansatz (s. o.) wurde mit einer Spatelspitze Natriumborhydrid (NaBH_4) versetzt. Die Reduktion der Lipidhydroperoxide erfolgte für 5 min unter leichtem Schütteln. Die Reaktion wurde

mit 60 μl Phosphorsäure (10 % v/v) beendet, die das überschüssige Natriumborhydrid in Natriumphosphat und Wasserstoff (H_2) umwandelt. Nach Beendigung der Gasentwicklung (H_2), wurden 30 μl des Gemisches auf die Säule injiziert und unter den o. g. Bedingungen aufgetrennt. Das Resultat zeigt, dass nach Zugabe von Natriumborhydrid zu dem LOX (RE) Reaktionsansatz der Peak bei 3,82 min kleiner wurde und der Peak bei 4,05 min an Intensität zunahm (Abb. 15 b) RE + NaBH_4). Die Retentionszeit des zweiten Peaks war somit vergleichbar mit der des

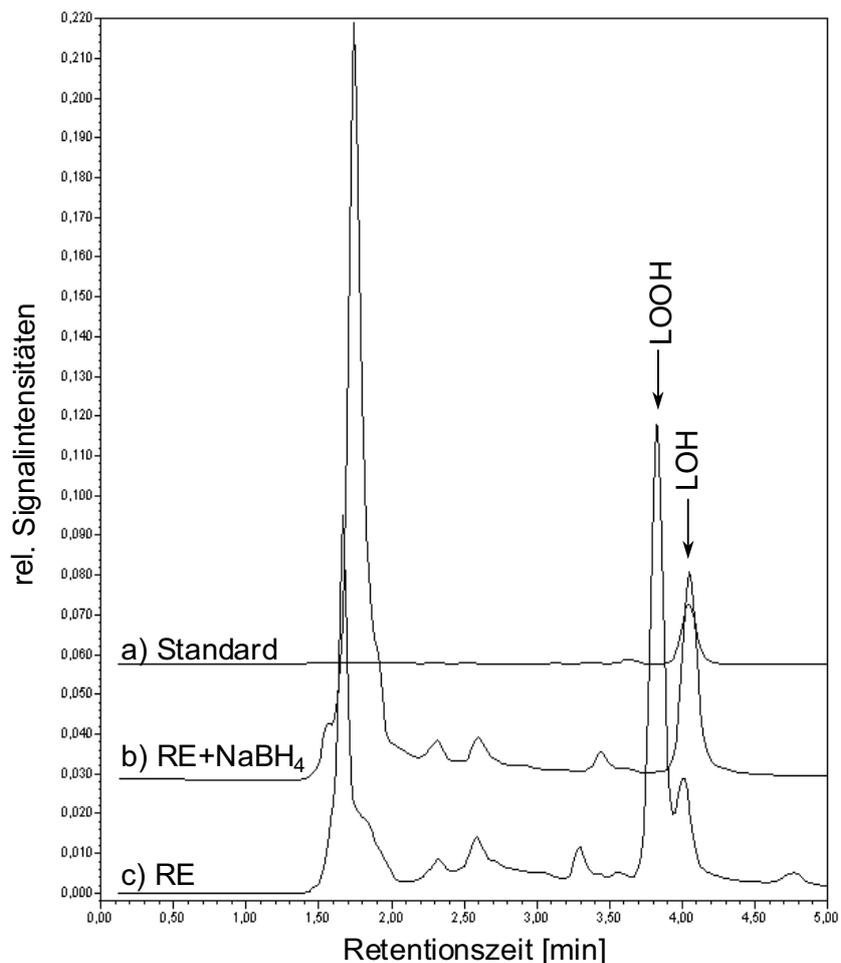


Abb. 15 HPLC-Chromatogramme der Linolsäurehydroperoxide und Linolsäurehydroxide. a) Standard 13 S- HODE (Sigma), b) und c) Reaktionsprodukte von ozoninduzierter Tabak cv. Bel W3 LOX mit Linolsäure bei pH 8.0 b) mit Reduktion mittels NaBH_4 und c) ohne Reduktion. Die Chromatogramme wurden bei E 235 nm aufgenommen (Kap. 2.12). Es wurden pro Ansatz je drei separate Analysen durchgeführt. Dargestellt ist je ein repräsentatives Chromatogramm.

Standards (4,04 min). Hieraus wurde geschlossen, dass es sich um das Linolsäurehydroxid (LOH) handelte und folglich der verkleinerte vorangegangene Peak das Linolsäurehydroperoxid (LOOH) darstellte. Die Bildung der Lipidhydroperoxide in dem Ansatz Rohextrakt (RE) mit Linolsäure konnte somit gezielt mittels HPLC bestimmt werden (Abb. 14 und Abb. 26). Diese Methode erlaubte jedoch keine Aussage über Positionsisomere 9- und/oder 13-LOOH.

2.13 Bestimmung des endogenen Jasmonsäure- und Salicylsäuregehalts

Tabakpflanzen der Varietät Bel W3 wurden wie unter Kap. 2.6.1.3 beschrieben mit bzw. ohne Ozon behandelt. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 28 h, 32 h und 48 h nach Start der Behandlung erfolgte die Ernte des Blattmaterials (Kap. 2.8). Aus zwei unabhängigen Experimenten wurde pro Erntezeitpunkt der endogene Jasmonsäure- (JA) und Salicylsäuregehalt (SA) aus 2 parallelen Proben wie folgt bestimmt.

Durchführung:

Je 400 mg feingemörsertes tiefgefrorenes Blattmaterial (Kap. 2.8) wurde mit 1 ml "¹³C₂-trans-JA-Standard" (30 pmol in Methanol) in einem Eppendorfgefäß vermischt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 x g, RT abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese wässrige Phase wurde bis zur Trocknung im Rotationsverdampfer eingengt.

Der "¹³C₂-trans-JA-Standard" wurde freundlicher Weise von Dr. Axel Müller (Abteilung Pflanzenphysiologie, Ruhr Universität-Bochum) zur Verfügung gestellt.

Die Proben wurden im Anschluss mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) auf ihren endogenen Gehalt an freier JA bzw. freier SA (Dr. Axel Müller, Abteilung Pflanzenphysiologie, Ruhr Universität-Bochum in Anlehnung an Müller et al., 2002) analysiert.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand typischer Fragmentierungsmuster. Als interner Standard zur Quantifizierung wurde "¹³C₂-trans-JA-Standard" verwendet. Da für Salicylsäure kein interner Standard mitgeführt wurde, konnte hier keine Quantifizierung vorgenommen werden. Stattdessen wurden die Signalintensitäten der SA Peaks bestimmt und die größte Intensität gleich 100 % gesetzt.

Die Quantifizierung des endogenen JA-Gehaltes erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Signalstärke-A}}{\text{Signalstärke-B}} \times \frac{30 \text{ pmol C}}{0,4 \text{ g FG}} = \text{endogener JA-Gehalt [pmol/g FG]}$$

A = endogene JA C = eingesetzte Menge ¹³C-JA-Standard

B = ^{13}C -JA-Standard FG = eingesetzte Menge Blattmaterial

Durch den internen " $^{13}\text{C}_2$ -trans-JA-Standard" werden mögliche Schwankungen bei der Extraktion ausgeglichen.

Die Ergebnisse sind in Kap. 3.13, Abb. 39 und Abb. 40 dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Läsionenbildung bei ozonbehandelten *Nicotiana tabacum* L. Varietäten

Läsionenbildung bei ozonexponierten Pflanzen wurde wiederholt in der Literatur beschrieben (Langebartels et al., 1991; Örvar et al., 1997). Das Schadbild hängt jedoch sehr von der Ozonkonzentration und den vorherrschenden Umgebungsparametern ab, so dass für eine Korrelation zu weiteren Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit die genaue Bonitur der Nekrosen unerlässlich war.

Das Auftreten des Schadbildes bei Tabakpflanzen der Varietäten cv. Bel W3, cv. Bel B und cv. xanthi.nc Nah-G (weiterhin nur mit Nah-G bezeichnet) wurde nach einem akuten Ozonpuls (5 h, 150 ppb) und Weiterkultivierung in ozonfreier Luft (Kapitel 2.6.1.3) über zwei Tage nach Beginn der Ozonexposition bonitiert (Kap. 2.7). Die Blätter der drei ozonbehandelten Varietäten blieben zunächst noch grün ohne sichtbare Schädigungen. Bei den vollentwickelten mittelalten (Nr. 3) und alten Blättern (bis Nr. 7) traten nach 3 h bis 5 h silbrig glänzende Bereiche auf, die sich im weiteren Verlauf (5 h - 10 h) dunkel verfärbten und nach Rich (1964) als "water soaked areas" (plasmolysiert) bezeichnet werden. Bei der ozonunempfindlichen Sorte cv. Bel B bildeten sich diese silbrig glänzenden Stellen anschließend (nach ca. 5 h - 8 h) wieder zurück. Bei diesem Pflanzenmaterial traten auch nachfolgend (12 h - 48 h) an keinem der Blätter Nekrosen auf. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da die verwendete Ozonkonzentration (5 h, 150 ppb) unterhalb der für Tabak cv. Bel B von Langebartels et al. (1991) ermittelten Schadschwelle von 350 ppb Ozon lag. Abb. 17 zeigt die typischen Schadbilder für ein mittelaltes Blatt (Nr. 3) 24 h nach Ozonexposition (5 h, 150 ppb). Bei den Tabak Varietäten cv. Bel W3 und cv. Nah-G entwickelten sich aus den „water soaked areas“ nach 12 h - 48 h Nekrosen.

Für Tabak cv. Bel W3 wurde auch beschrieben, dass Nekrosen ab einer Schadschwelle von 150 ppb Ozon auftreten (Langebartels et al., 1991). Die Entwicklung der Nekrosen in Abhängigkeit vom Blattalter ist für cv. Bel W3 und cv. Nah-G als Prozent Blattschäden zur Gesamtblattfläche in Abb. 16 dargestellt. Die nach 24 h vollausgebildeten Nekrosen waren bifacial, pergamentartig braun und scharf gegen das gesunde Blattgewebe abgegrenzt. Sie entwickelten ein in Abhängigkeit vom Blattalter, typisches Muster. So war das jüngste Blatt nahe am Vegetationspunkt Nr. 0 (Kap. 2.7, Abb. 8) immer symptomfrei. Die noch nicht voll

entwickelten Blätter Nr. 1 und 2 wiesen kleine punktförmige Nekrosen (5 %-15 %) an den Blattspitzen und entlang der Seitenränder auf. Bei den mittelalten Blättern (Nr. 3 und 4) war bei cv. Bel W3 eine Verteilung kleinerer Nekrosen mit einem Schädigungsgrad von 33 % bzw. 50 %, über die Blattfläche zu erkennen, die an den ozonempfindlichen Spitzen besonders ausgeprägt waren (Abb. 16 und Abb. 17, A). Bei Tabak Nah-G traten die Nekrosen bevorzugt entlang den Blattadern auf und waren insgesamt großflächiger (Abb. 17, B), mit einer höheren Gesamtschädigung von 60 % bzw. 76 % (Abb. 16). Die älteren Blätter 5 bis 7 entwickelten größere Nekrosen (86 % bis 76 %) zwischen den Leitbündelbereichen, wobei der punktförmige Charakter bei cv. Bel W3 erhalten blieb. Bei Nah-G nekrotisierte hier das Gewebe entlang der Blattadern (76 %) (Abb. 17).

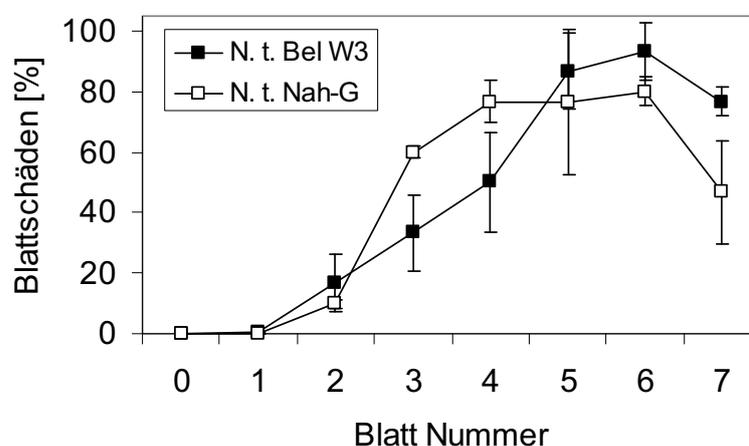


Abb. 16 Ozoninduzierte Blattschäden bei *N. tabacum* cv. Bel W3 und *N. tabacum* cv. xanthi.nc Nah-G 24 h nach Beginn der Ozonbehandlung (150 ppb O₃, 5 h). Die Läsionen sind als Prozent der Blattfläche dargestellt. Blatt 0 ist das erste Blatt am Vegetationspunkt < 8 cm. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 3).

Aufgrund des Verteilungsmusters der Nekrosen bei den mittelalten Blättern (Nr. 3 und Nr. 4) bei *N. tabacum* cv. Bel W3 wurde, wenn nicht anders angegeben, für nachfolgende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen Blatt Nr. 3 verwendet. Um eine Vergleichbarkeit des physiologischen Blattalters zu gewährleisten, wurde auch bei *N. tabacum* cv. Bel B und *N. tabacum* cv. xanthi.nc Nah-G Blatt Nr. 3 als Probenmaterial eingesetzt (Abb. 17).

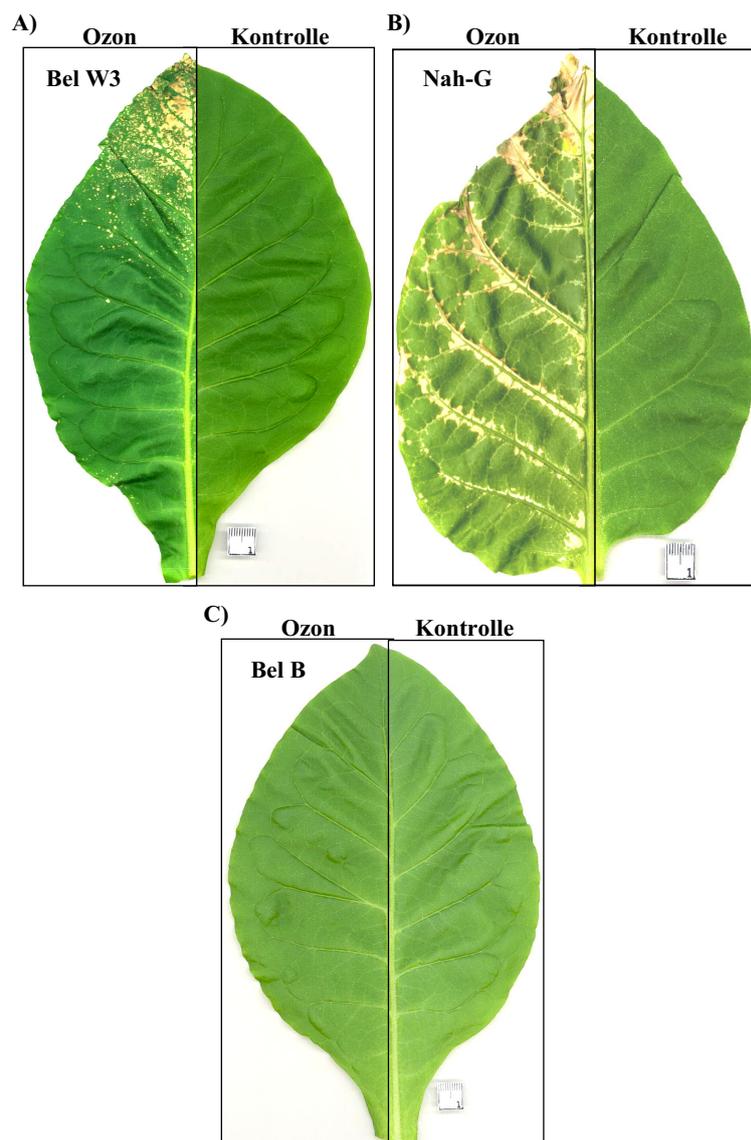


Abb. 17 Typisches Schadbild eines Tabakblattes mittleren Alters (Blatt Nr. 3) von A) cv. Bel W3, B) cv. xanthi.nc Nah-G und C) cv. Bel B, 24 h nach Beginn der Ozonbehandlung (150 ppb O_3 , 5 h) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

3.1.1 Abhängigkeit des Nekrotisierungsgrades von der Ozonkonzentration

Bei dieser Untersuchung sollte die Korrelation zwischen einer Verdopplung der Ozonkonzentration von 150 ppb auf 300 ppb mit dem Ausmaß der Läsionenbildung ermittelt werden. Pflanzen der ozonsensitiven Varietät cv. Bel W3 wurden in den Expositions-kammern (Kapitel 2.6.1.1) 5 h mit je 150 ppb oder mit 300 ppb Ozon behandelt und anschließend unter ozonfreien Bedingungen weiterkultiviert.

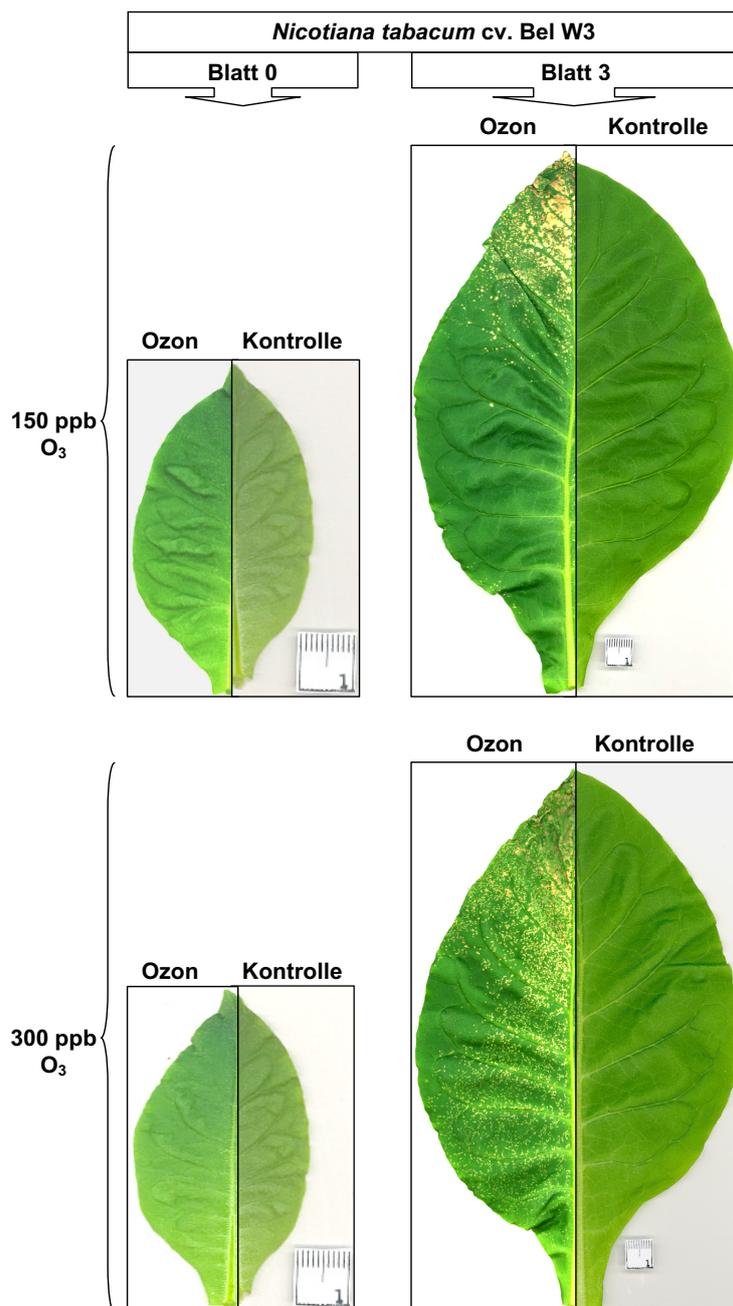


Abb. 18 Nekrotisierungsgrad der vegetativ jungen Blätter Nr. 0 und der vegetativ mittelalten Blätter Nr. 3 bei *N. tabacum* L. cv. Bel W3 in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration. Die Blätter wurden einen Tag nach Start einer fünfstündigen Behandlung mit 150 ppb oder 300 ppb Ozon bzw. bei konstant in Reinluft gehaltenen Kontrollen photographiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen wobei zur besseren Übersicht pro Experiment je eine behandelte und eine unbehandelte Blatthälfte nebeneinander dargestellt sind. (Größenmarker = 1 cm)

Kontrollpflanzen wurden keiner Ozonbehandlung ausgesetzt. 24 h nach dieser Behandlung wurden die Nekrosen für Blatt Nr. 0 und Blatt Nr. 3 visuell bonitiert (Kap. 2.7). Diese Blätter wurden ausgewählt, da unter Standardbedingungen (150 ppb O₃, 5 h) bei dem jüngsten Blatt 0 keine und bei dem entwicklungsbedingt mittelaltem Blatt Nr. 3 eine Verteilung der Schäden über die Blattspreite beobachtet wurde (Abb. 16 und Abb. 17). Die Ergebnisse in Tab. 4 und Abb. 18 zeigen, dass es bei dem vegetativ jüngsten Blatt Nr. 0 weder unter der Standardbehandlung (150 ppb O₃, 5 h) noch nach einer Verdopplung der Ozonkonzentration auf 300 ppb (5 h) zu einer Schadausbildung kam.

Im Gegensatz dazu konnte bezüglich der Nekrosenentwicklung bei dem vegetativ mittelalten Tabakblatt Blatt Nr. 3 eine deutliche Korrelation der Schadzunahme mit einer Erhöhung der Ozonkonzentration (300 ppb O₃, 5 h) festgestellt werden. Bei einer Ozonexposition unter Standardbedingungen erhielt man eine Nekrosenentwicklung von durchschnittlich 37 %, die nach Verdopplung der Ozonkonzentration (300 ppb O₃, 5 h) um das 1,5 fache zunahm (57 %) (Tab. 4 und Abb. 18). Am Muster der Schadausbildung sieht man, dass es unter Standardbedingungen (150 ppb O₃) bei dem mittelalten Tabakblatt Nr. 3 zu einer punktförmigen Verteilung der Nekrosen über die gesamte Blattfläche kam (Abb. 18 und Kapitel 3.1, Abb. 17).

Tab. 4 Abhängigkeit der Nekrosenentwicklung bei *N. tabacum* L. cv. Bel W3 von der Ozonkonzentration. Die Läsionen sind als Prozent der Blattfläche für Blatt Nr. 0 (das erste Blatt am Vegetationspunkt < 8 cm) und Blatt Nr. 3 dargestellt. Die Bonitur erfolgte 24 h nach Beginn der Ozonexposition mit 150 ppb oder 300 ppb für 5 h. Dargestellt sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (n = 3).

Blatt Nr.	Ozon [ppb]	Nekrosen [%]	Stabwn
0	0	0	0
3	0	0	0
0	150	0	0
3	150	37	9
0	300	0	0
3	300	57	5

Dieses Verteilungsmuster der Nekrosen blieb auch bei der Verdopplung der Ozonkonzentration auf 300 ppb O₃ erhalten. Lediglich an der Spitze des Blattes, die am ozonempfindlichsten ist, traten die Läsionen als eine größere Fläche auf (Abb. 18).

3.2 Etablierung des Lipoxygenase Enzymtests für *N. tabacum* L. cv. Bel W3

Die Anpassung von Pflanzen an biotische und abiotische Umweltbedingungen wird oft begleitet von Lipidperoxidationen (Weichert et al., 1999). Diese können das Ergebnis einer Autoxidation (Porter, 1986) oder eines kontrollierten enzymkatalysierten Schrittes sein, wie ihn die Lipoxygenase (LOX) Reaktion vermittelt (Kap. 1.5.1; Blée, 1998). Hierbei werden die in den Pflanzenmembranen vorkommenden ungesättigten Fettsäuren wie Linol- und α - Linolensäure zu ihren Hydroperoxiden oxidiert, die wiederum als Vorläufer einer Vielzahl von Metaboliten mit physiologischer Wirkung dienen (Kap. 1.6). Erhöhte Lipidperoxidation und die Ausbildung von Nekrosen bei ozonsensitiven Pflanzen wurden nach Ozonexposition beobachtet (Guderian, 1985; Heath und Taylor, 1997) und die Entstehung flüchtiger kurzkettiger C₆-Verbindungen hier im Institut nachgewiesen (Heiden et al., 1999a; 1999b).

Um herauszufinden in wieweit diese Lipidperoxidation bei Pflanzen als eine spezifische enzymkatalysierte Reaktion auf Ozon verstanden werden kann, wurde in dieser Arbeit der Einfluss des abiotischen Stressors Ozon (150 ppb, 5 h) auf den zeitlichen Verlauf der Enzyminduktion von Lipoxygenase und somit auf eine kontrollierte Oxidation von Fettsäuren bei *N. tabacum* L. cv. Bel W3 untersucht. Hierfür wurden Vorversuche zur LOX Aktivitätsbestimmung durchgeführt, die auf den in der ausgewählten Literatur beschriebenen Methoden nach Ocampo et al. (1986), Rancé et al. (1998) und Mauch et al. (1997) basierten (Kapitel 2.9.2). Bei direkter Anwendung dieser Methoden konnte in dem hier untersuchten Pflanze/Stress System jedoch keine LOX Aktivität nachgewiesen werden. Für den Nachweis von Lipoxygenase Aktivität in ozonbehandeltem Tabak musste daher zunächst ein geeignetes Testsystem ausgearbeitet werden.

3.2.1 Optimierung des Extraktionspuffers

Als eine Ursache zunächst fehlender Enzymaktivität wurde ein LOX Aktivitätsverlust während der Extraktion vermutet. Hierfür wurde ausgehend von der bei Rancé et al.

(1998) beschriebenen Extraktionsmethode eine Optimierung des Extraktionspuffers vorgenommen.

Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 7.5 erhöht, da nach Theimer (1983) hier eine Protonenkonzentration vorliegt, die die Funktion vieler Zellenkonstituenten stärkt. Zusätzlich wurde der Extraktionspuffer mit 10 % Glycerin komplettiert da Price (1992) beschrieb, dass viele Enzyme bei Verdünnung an Stabilität verlieren, was durch einen Zusatz von 10-50 % Glycerin verhindert werden kann. Zu einer größeren Homogenität des Aufschlusses tragen nicht ionische Detergenzien wie Tween-20 bei, da sie die natürlichen Membranstrukturen zerstören (Price, 1992) und sich hierdurch zudem mögliche membranassoziierte LOX (Vianello et al., 1995) leichter ablösen ließen. Es wurden dem Extraktionspuffer daher 0,1% Tween-20 zugesetzt. Diese Konzentration liegt deutlich unter der für Tween-20 vom Hersteller (Roche) beschriebenen kritischen Micellenkonzentration (CMC) von 6 %. Nach Zusatz von anorganischen Kationen wie KCl (Kaliumchlorid), LiCl (Lithiumchlorid) und NaCl (Natriumchlorid) mit Konzentrationen bis zu 1 M zeigte sich die größte Steigerung der katalytischen Aktivität der LOX Domäne nach Zusatz von 0,5 M NaCl (Boutaud und Brash, 1999), so dass dem Aufschlusspuffer dieses Salz entsprechend (NaCl 0,5 M) zugesetzt wurde. Mit diesem optimierten Puffer wurde der Einfluss verschiedener Schutzsubstanzen auf die LOX Aktivität getestet, da Oxidationsprozesse oder Schwermetallionen enzymkatalysierte Reaktionen beeinträchtigen können. Es wurden die Verbindungen DTT, EDTA und PVPP dem Extraktionspuffer einzeln zugesetzt und verschiedene Homogenate hergestellt. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze ohne Schutzsubstanzen (Kap. 2.9.2.1 und Tab. 2). Aus den unterschiedlichen Homogenaten wurde die LOX Aktivität bestimmt (Abb. 19).

Die höchste LOX Aktivität (0,15 nkat/mg Protein) wurde bei Verwendung von Extraktionspuffer ohne jeden Zusatz von Schutzsubstanzen ermittelt. Der Zusatz von EDTA zeigte nur eine geringe Auswirkung auf die LOX Aktivität (0,13 nkat/mg Protein). Eine deutliche Verminderung der LOX Aktivität um 31 % wurde nach Zugabe von PVPP (0,09 nkat/mg Protein) oder DTT (0,07 nkat/mg Protein) analysiert (Abb. 19).

PVPP wird oft zum Schutz gegen Phenole eingesetzt, die über Amino- und Sulfhydrylgruppen kovalent mit Proteinen interagieren können und diese dadurch denaturieren (Loomis, 1974). Möglicherweise wurden auch LOX Proteine an PVPP

adsorbiert, was zu der verminderten Aktivität führte. DTT enthält eine Thiolgruppe mit reduzierender Kapazität, die Schutz gegen Oxidationsprozesse bieten soll (Price, 1992). Als eine Ursache der geringeren LOX Aktivität mit DDT wäre es denkbar, dass DTT die aktivierte LOX Form zur inaktiven Form reduzierte (Kap. 1.6.1).

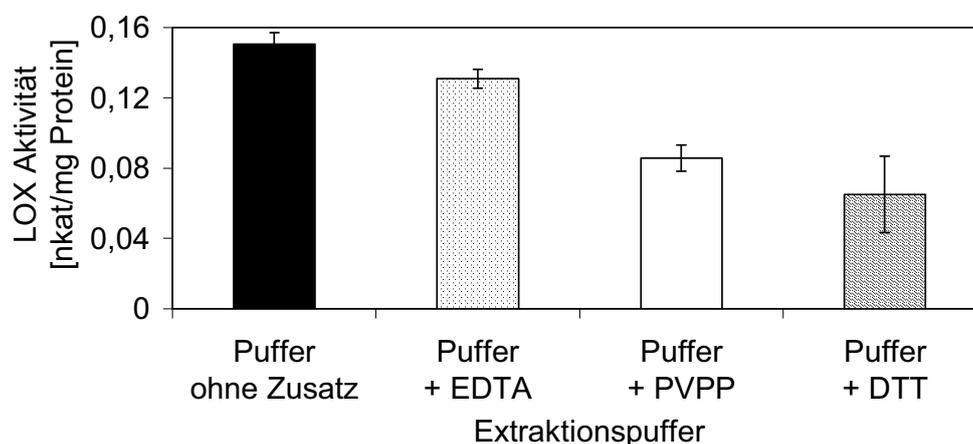


Abb. 19 LOX Aktivität in Abhängigkeit vorhandener Schutzsubstanzen im Extraktionspuffer. Der Extraktionspuffer (Kap. 2.9.2.1) wurde entweder ohne Zusatz belassen oder es wurden jeweils 5 mM DTT, 1 mM EDTA oder 1 Spatelspitze PVPP hinzugegeben. Die Extraktion erfolgte aus Blattmaterial, das 24 h nach 5 h Ozonbehandlung (150 ppb) geerntet wurde. Die Messungen wurden mit Linolsäure als Substrat in Natrium-Phosphatpuffer pH 8.0. vorgenommen (Kap. 2.9.2.7). Dargestellt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Aufschlüssen mit ihren Standardabweichungen.

Aufgrund der Ergebnisse wurde auf eine weitere Anreicherung von Lipoxygenase verzichtet, da auch Price (1992) Enzymmessungen in Pflanzenrohextrakten als geeignet charakterisieren, um Flüsse durch Stoffwechselwege zu ermitteln und Informationen über ihre Regulation zu erhalten. Als Resultat dieser Untersuchungen wurde der optimierte Extraktionspuffer ohne Zusatz von Schutzsubstanzen für alle weiteren Messungen der LOX Aktivität verwandt (Kap. 2.9.2.1).

3.2.2 Abhängigkeit der LOX Aktivität von der eingesetzten Enzymmenge

Die LOX Aktivität aus 24 h nach einer fünfstündigen Ozonexposition geernteten Tabakblättern cv. Bel W3 wurde mit unterschiedlichen Mengen Rohextrakt (2.9.2.2) im Testansatz unter Standardbedingungen (Kapitel 2.9.2.7) mit Linolsäure als Substrat vermessen.

Das Ergebnis in Abb. 20 zeigt die Produktbildung ($\Delta E_{234\text{nm}}/\text{min}$) in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Rohextrakts. Für alle weiteren Messungen wurden 10 μl Rohextrakt eingesetzt, um konstante Bedingungen zu gewährleisten.

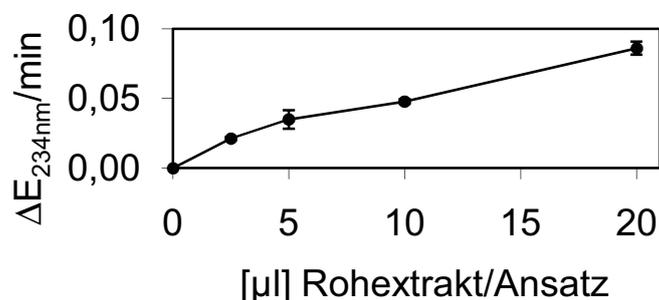


Abb. 20 Lipoxygenase Aktivität von Tabak cv. Bel W3. Blattproben wurden 24 h nach einer fünfstündigen Ozonbehandlung (150 ppb) geerntet und hieraus Rohextrakte hergestellt (Kap. 2.9.2.2). Die LOX Aktivität wurde mit 0, 2,5, 5, 10 und 20 μl Homogenat mit Linolsäure als Substrat in Natriumphosphatpuffer pH 8.0 gemessen (Kap. 2.9.2.7). Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

3.2.3 Bestimmung des optimalen pH-Wertes für Lipoxygenase

Ozonbehandelter Tabak cv. Bel W3 (5 h, 150 ppb) wurde nach 24 h geerntet (Kap. 2.8) und hieraus Enzymrohextrakte hergestellt (Kap. 2.9.2.2). Mit diesen Homogenaten wurde der optimale pH-Wert für die Lipoxygenase Reaktion zwischen pH 4.0 bis pH 10.0 (Kapitel 2.9.2.3) mit Linol- oder Linolensäure als Substrat bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellt. Die Kontrollexperimente zu Oxidationsprozessen mit a) nur Linolensäure oder b) nur Rohextrakt zeigten ein identisches Verhalten wie weiter unten für Linolsäure beschrieben und sind daher nicht noch einmal gesondert dargestellt.

Fettsäuren, die in diesem Test die Substrate bilden, neigen zu Autoxidation (Kap. 1.5.1). Dies wurde in dem Kontrollexperiment mit Linolsäure ohne Anwesenheit von LOX-Rohextrakt bei pH-Werten < 6.5 nachgewiesen. Wesentlich stärkere Lipidhydroperoxidbildung ($0,19 E_{234\text{nm}}/\text{min}$) zeigten auch die Kontrollen mit nur LOX-Rohextrakt ohne zusätzliche Linolsäure (Abb. 21). Als Ursache wird hierbei jedoch vermutet, dass die während des Extraktionsverfahrens nicht abgetrennten Lipide zum einen autoxidieren s. o. und zusätzlich durch LOX enzymatisch umgesetzt werden.

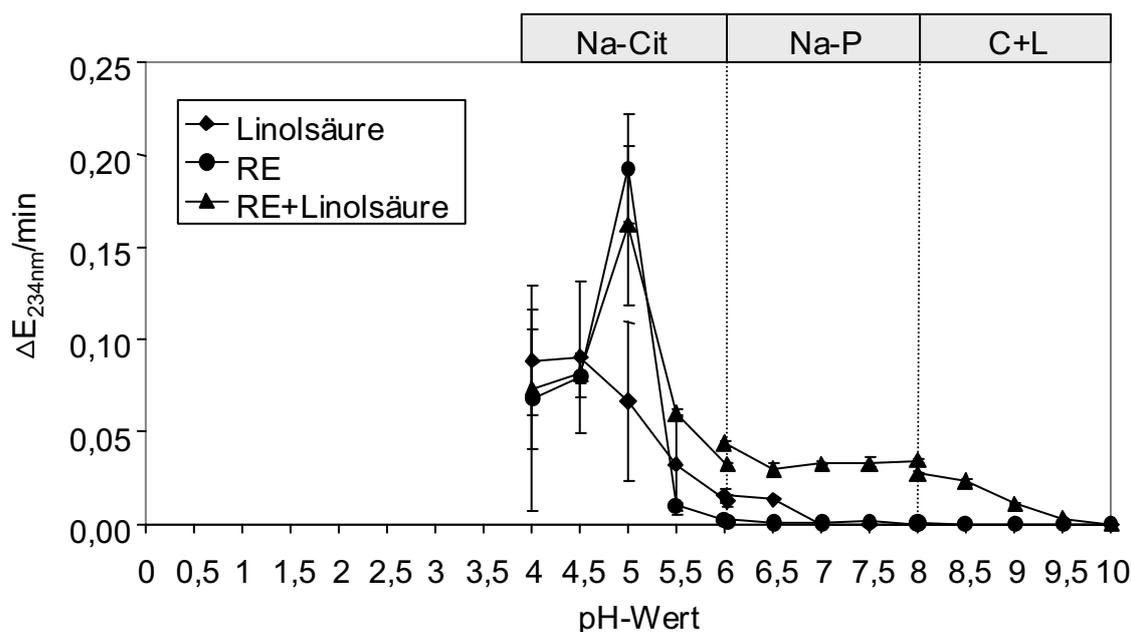


Abb. 21 Akkumulation der Linolsäurehydroperoxide in Abhängigkeit vom pH-Wert. Mit Rohextrakt und Substrat (\blacktriangle), mit Substrat (\blacklozenge) und mit Rohextrakt (\bullet) im Testansatz. Die sich überlappenden Puffersysteme sind (Na-Cit) Natriumcitrat, (Na-P) Natrium-Phosphat und (C+L) Clark und Lubs im pH-Wert Bereich von 4.0 bis 10.0. Dargestellt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

Der optimale pH-Wert für LOX wurde aus der Aktivitätskurve Rohextrakt mit Linolsäure bestimmt (Abb. 21). Es waren zwei Aktivitätsoptima zu erkennen. Das erste wurde in dem Überlappungsbereich der Puffer bei pH 8.0 im Natrium-Phosphat Puffer ermittelt und das zweite im sauren pH Bereich im Natrium-Citrat Puffer bei pH 5.0.

Anhand der durchgeführten Kontrollen kann die Produktbildung bei pH 8.0 eindeutig auf die Aktivität der LOX zurückgeführt werden (Abb. 21). Bei dem Optimum von pH 5.0 zeigten die Kontrollen, dass die Testansätze a) Rohextrakt oder b) Rohextrakt mit Linolsäure ca. die 3 fache Menge an Hydroperoxiden bildeten wie autoxydierte Linolsäure alleine (Abb. 21). Es wird daher auch bei diesem sauren pH Optimum von einer teilweise enzymkatalysierten Reaktion ausgegangen. In parallel durchgeführten Experimenten mit abgekochtem Rohextrakt ohne Substrat (Kap. 2.9.2.7) konnte bei pH 5.0 keine Lipidhydroperoxidbildung festgestellt werden. Eine mögliche Zerstörung der Lipide durch die Erhitzung ist jedoch nicht auszuschließen.

Zur weiteren Absicherung dieser Ergebnisse wurden daher LOX-Inhibitorversuche durchgeführt (siehe Kap. 3.3).

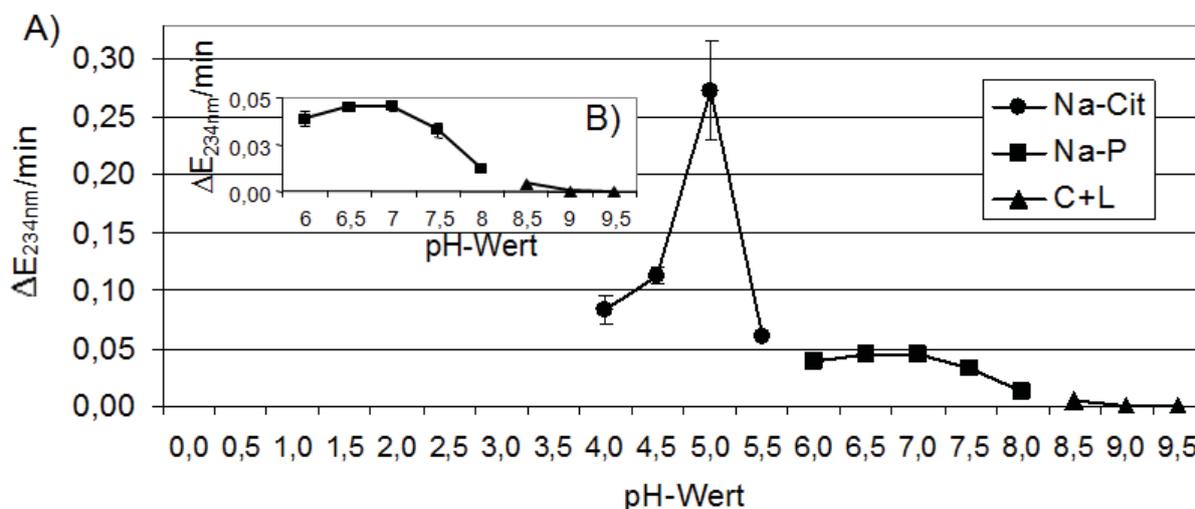


Abb. 22 Lipooxygenase Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert mit Linolensäure als Substrat A). Die Puffersysteme sind (Na-Cit) Natriumcitrat, (Na-P) Natrium-Phosphat und (C+L) Clark und Lubs im pH-Wert Bereich von 4.0 bis 9.5. B) stellt eine Ausschnittsvergrößerung von A) dar. Dargestellt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung aus drei unabhängigen Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

Mit Linolensäure als Substrat zeigte die Lipooxygenase ebenfalls zwei pH-Wert Optima. Das erste bei pH 5.0 und das zweite bei pH 7.0 (Abb. 22 A und B). Zur besseren Übersicht ist der pH-Wert Bereich zwischen pH 6.0 bis pH 9.5 in einer Ausschnittsvergrößerung (Abb. 22 B) dargestellt. Das LOX Aktivitätsoptimum im neutralen pH-Wert Bereich bei pH 7.0 ließ aufgrund der Kontrollen auf spezifische LOX Aktivität schließen. Bei pH 5.0 gelten die gleichen Interpretationen wie bereits zuvor für Linolsäure ausgeführt.

Versucht man die LOX bei ozonbehandeltem Tabak aufgrund der hier ermittelten Aktivitätsoptima bestimmten Zellkompartimenten zuzuordnen, so kommen nach Elstner (1990) und Rausch (1999) mit einem pH-Wert zwischen 7.0 –8.0 u. a. die Chloroplasten und das Zytosol und im sauren pH Bereich von 5.0 die Vakuole oder nach Dietz (1997) der Apoplast mit einem pH-Wert von 5–7 in Frage.

In diesen Zellkompartimenten wurden auch bei anderen Pflanzenspezies LOX nachgewiesen (Kap. 1.6.2).

3.2.4 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Enzymaktivität von LOX

Die Lagerung von Rohextrakt würde zu einer Erleichterung der LOX Aktivitätsmessungen führen. Zunächst wurde daher der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der LOX untersucht.

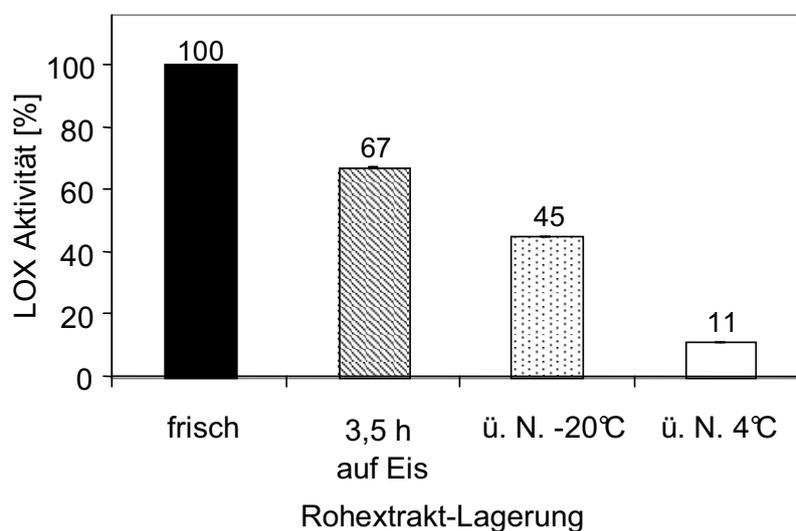


Abb. 23 LOX Aktivität in Abhängigkeit von der Lagerung. Die aufgeschlossenen Rohextrakte wurden frisch + sofort, nach 3,5 h auf Eis, nach 24 h bei 4°C und nach Schockgefrieren und 24 h bei -20°C gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Aufschlüssen mit je drei parallelen Messungen und ihren Standardabweichungen. Die größte Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse in Abb. 23 zeigen, dass 100 % LOX Aktivität nur in frisch hergestellten und sofort gemessenen Rohextrakten erreicht wurde. Schon nach 3,5 h auf Eis nahm die Aktivität um 33 % ab. Bei Lagerung des Homogenats über Nacht im Kühlschrank bei 4°C sank die Aktivität innerhalb von 24 h um 89 %. Auch nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lagerung (24 h) bei -20°C fiel die LOX Aktivität um mehr als die Hälfte (55 %) ab.

Zusammenfassend kann formuliert werden, dass eine längere Lagerung der Rohextrakte ohne Aktivitätsverlust nicht möglich war. Für weitere Messungen wurden die Homogenate frisch hergestellt und direkt zur Messung eingesetzt.

3.3 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die LOX Aktivität

In Kapitel 3.2 wurde die Aktivität der Tabak Lipxygenase im Rohextrakt nachgewiesen. Es ergaben sich mit Linolsäure als Substrat die zwei pH-Wert

Optima 5.0 und 8.0. Hierbei konnte anhand der Kontrollen die Linolsäurehydroperoxidbildung bei pH 8.0 eindeutig auf eine LOX Reaktion zurückgeführt werden. In dem sauren pH Bereich waren auch Autoxidationsprozesse der Fettsäure sowie Fettsäurehydroperoxidbildung mit ausschließlich Rohextrakt im Ansatz zu beobachten (Kap. 3.2.3 und Abb. 21).

Mit Inhibitorversuchen sollte daher zusätzlich gezeigt werden, dass ein Teil der Lipidhydroperoxidbildung auf eine LOX katalysierte Reaktion zurückzuführen ist, wie aufgrund von Kontrollversuchen vermutet wurde (Kap. 3.2.3 und Abb. 21). Hierzu wurden verschiedene in der Literatur als LOX Inhibitoren beschriebene Substanzen zur Hemmung des Enzyms eingesetzt (Fan und Mattheis, 2001; Fournier et al., 1993).

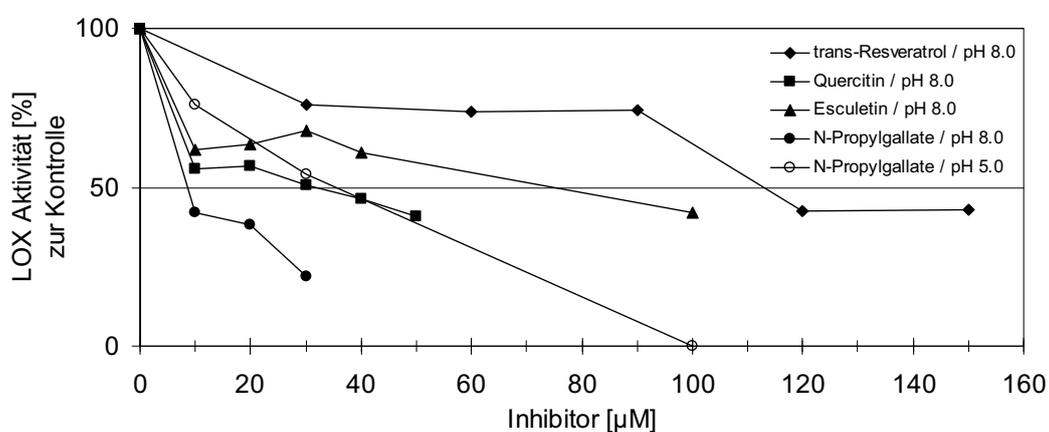


Abb. 24 Inhibition der ozoninduzierten LOX Aktivität in Tabak cv. Bel W3 Rohextrakten. Blattproben wurden 5 h mit Ozon (150 ppb) behandelt, in Reinluft weiterkultiviert und nach 24 h extrahiert. Die LOX Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Linolsäure bei pH 8.0 oder pH 5.0 wie in Kapitel 2.9.2.2 und 2.9.2.7 beschrieben. Kontrollen ohne Inhibitorzusatz wurden gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Extraktionen dar.

Für den Wirkmechanismus der Inhibitoren beschrieben Maccarrone et al. (1995) folgende Möglichkeiten. LOX Inhibitoren können zum einen an eine andere (nicht die aktive Seite) des Enzyms binden und durch z. B. Konformationsänderungen im Enzym eine Reaktion unterbinden oder sie verhindern die Entstehung der aktiven Fe(III) Form der LOX. Es ist auch möglich, dass sie das katalytisch aktive Eisenatom (Fe^{3+}) in eine inaktive Form (Fe^{2+}) durch freie Radikalmetabolite umwandeln und dadurch die LOX Reaktion inhibieren.

Der potenteste LOX Inhibitor wurde zunächst bei pH 8.0 eingesetzt, da hier die LOX Aktivität spezifisch war (Kap. 3.2.3). N-Propylgallat erwies sich als effektivster Inhibitor. Bei einer Konzentration von 10 μM waren bereits 50 % der LOX Aktivität inhibiert (Abb. 24). Auch Quercetin, ein in Baumrinden weit verbreitetes Glykosid mit enzymhemmenden Eigenschaften (Römpp, 1995), zeigte mit einem IC_{50} von 30 μM eine deutliche Inhibition. Im Gegensatz dazu kam es mit Esculetin, einem Cumarinderivat (6, 7-Dihydroxycumarin; Römpp, 1995) und trans-Resveratrol, das von Fan und Mattheis (2001) als wirksamster LOX Inhibitor beschrieben wurde, nur bei Einsatz hoher Konzentrationen von 118 μM und 78 μM zu einer LOX Inhibition um ca. 50 % (Abb. 24).

Der wirksamste LOX Inhibitor bei pH 8.0 das n-Propylgallat wurde zur Hemmung der LOX Aktivität bei pH 5.0 eingesetzt (Kap. 2.9.2.8). Hierbei wurde der IC_{50} bei einer Konzentration von 35 μM erreicht (Abb. 24). Es wird angenommen, dass die verringerte Bildung von Lipidhydroperoxiden bei pH 5.0 durch die Hemmung der LOX Aktivität erfolgte und unterstützt damit die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3.

3.4 Zeitverlauf der Lipoxygenase Aktivität nach Ozonbehandlung bei Tabak

Zu den Zeiten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 28 h, 32 h und 48 h nach Beginn einer fünfständigen Ozonbehandlung (150 ppb O_3) wurden mittelalte Tabakblätter der Varietät cv. Bel W3 geerntet. Entsprechend wurde mit unbehandelten Kontrollen verfahren (Kap. 2.6.1.3 und 2.8). In den hieraus gewonnenen Rohextrakten wurde photometrisch die Lipoxygenase Aktivität mittels des etablierten Testsystems (Kap. 3.2) bestimmt (Kap. 2.9.2.7). Zur Kontrolle wurde die LOX Aktivität durch Messung der Lipidhydroperoxide mittels HPLC analysiert (Kap. 2.12).

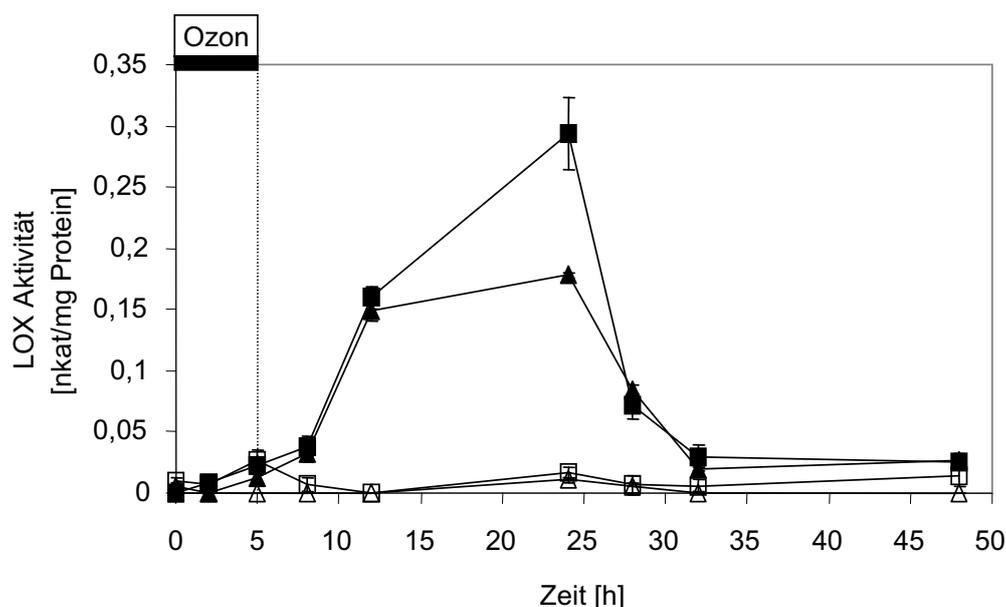
In Abb. 25 A) ist der Zeitverlauf der photometrisch ermittelten LOX Aktivität im neutral-basischen pH-Wert Bereich (pH 7.0 und pH 8.0) dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass es in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 gegenüber unbehandelten Kontrollpflanzen zu einer transienten LOX Aktivität zwischen 5 h und 32 h kam. Die ozoninduzierte LOX Aktivität zeigt mit Ausnahme der Werte nach 24 h sowohl mit Linolsäure als auch mit Linolensäure als Substrat einen identischen Kurvenverlauf. So war die LOX Aktivität verglichen mit Kontrollpflanzen nach 8 h bereits 3 fach erhöht. In den folgenden 4 h nahm die Aktivität weiter stark zu und erreichte nach 12 h eine 15 fache Steigerung. Das LOX Aktivitätsmaximum wurde nach 24 h erreicht. Hier zeigte die LOX eine Substratpräferenz für Linolsäure (LOX

Aktivität: 0,29 nkat/mg Protein) gegenüber Linolensäure (LOX Aktivität: 0,17 nkat /mg Protein). Möglicher Weise wurde zu diesem Zeitpunkt eine weitere Isoform aktiviert, mit einer Substratpräferenz für Linolsäure. Im Folgenden nahm die LOX-Aktivität ab und hatte nach 32 h das Niveau der LOX Aktivität aus Kontrollpflanzen erreicht. Hieran schloss sich erneut ein leichter Anstieg nach 48 h an. Der Kurvenverlauf der Kontrollpflanzen zeigte einen leichten Tagesgang der LOX Aktivität da zu Beginn der Messungen 0 h nach 24 h und 48 h eine leichte Erhöhung, vor allem mit Linolensäure als Substrat, gemessen wurde. Hierfür könnte eine Beteiligung der LOX an normalen physiologischen Prozessen, wie bereits in der Einleitung (Kap 1.6.3) beschrieben, verantwortlich sein.

Bei den photometrisch bestimmten LOX Aktivitäten im sauren pH-Wert Bereich von pH 5.0 (Abb. 25 B) wurde mit Linolensäure als Substrat sowohl bei ozonbehandelten wie auch unbehandelten Kontrollpflanzen eine hohe LOX Aktivität in Relation zu den LOX Aktivitäten mit Linolsäure als Substrat festgestellt. Dies wird zum Teil auf die höhere Autoxidation von Linolensäure zurückgeführt. Im zeitlichen Verlauf zeigten zunächst die Kontrollpflanzen nach 2 h und 5 h eine stärkere Produktbildung als die ozonbehandelten Pflanzen. Dies ließe auf eine Repression oder Inhibition der LOX schließen oder ist ein Hinweis auf höherer Autoxidation der Fettsäure. Nach 8 h stieg die LOX Aktivität jedoch 1,2 fach über den Kontrollwert an und hatte nach 12 h mit 2,8 nkat/mg Protein (2,4 fach) ihr Maximum erreicht. Die Aktivität war danach bis 24 h rückläufig (1,9 nkat/mg Protein) und stieg nochmals kontinuierlich bis auf 2,2 nkat/ mg Protein nach 48 h an.

Die Tabak cv. Bel W3 LOX Aktivität mit Linolsäure als Substrat bei pH 5.0 zeigte zeitlich gesehen eine vergleichbare transiente Ozoninduktion wie zuvor für pH 8.0 beschrieben. Auch hier wurde die stärkste ozoninduzierte LOX Aktivität zwischen 12 h (2,8 fache gegenüber Kontrolle) und 24 h (2,6 fach gegenüber Kontrolle) erreicht. Im Anschluss sank die LOX Aktivität und war nach 32 h fast auf das Niveau der LOX Aktivität in Kontrollpflanzen zurückgefallen.

A) pH 7.0 / pH 8.0



B) pH 5.0

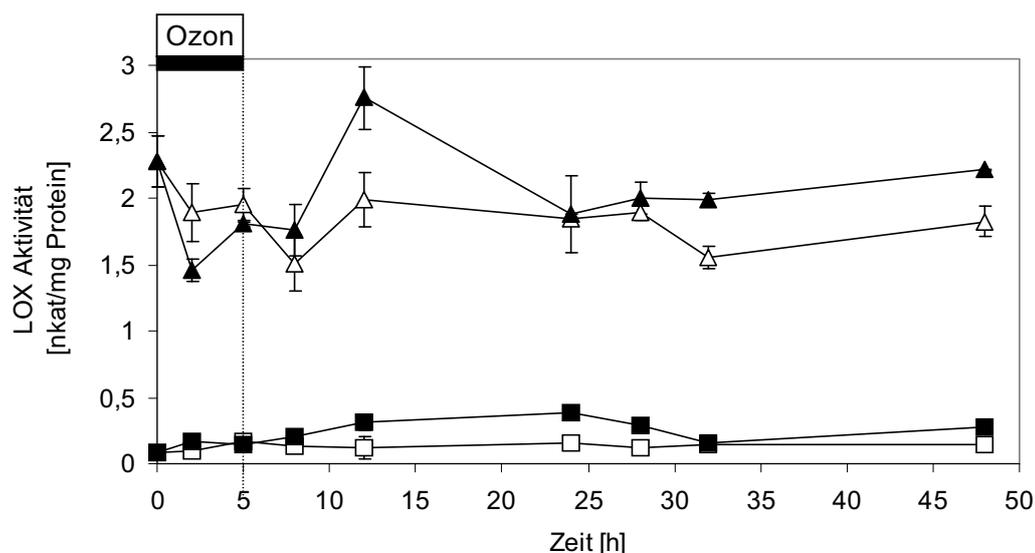


Abb. 25 Ozoninduzierte Tabak Lipoxygenase Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurden 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert (geschlossene Symbole). Kontrollpflanzen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten (offene Symbole). Die LOX Aktivitätsbestimmungen erfolgten nach den angegebenen Zeitpunkten in A) mit Linol- (■, □) bei pH 8.0 oder mit Linolensäure (▲, Δ) bei pH 7.0 wie in Kapitel 2.9.2.2 und 2.9.2.7 beschrieben. B) zeigt die entsprechenden Messungen bei pH 5.0. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen dar.

Die LOX zeigte in Kontrollpflanzen nur geringe Aktivität wobei auch hier, genau wie im neutral basischen pH Bereich, phasische Aktivitätsmaxima nach 24 h und 48 h festzustellen waren.

Die bei jedem Versuch durchgeführten Kontrollen mit gekochten Rohextrakten zeigten keinerlei LOX Aktivität.

Die zeitabhängige Aktivierung der LOX in *N. tabacum* L. cv. Bel W3 nach Ozonexposition wurde unabhängig durch HPLC Untersuchungen (Kap. 2.12) bestätigt. Die HPLC Ergebnisse in Abb. 26 zeigen analog zu Abb. 25 A) die ozoninduzierte transiente Akkumulation der Linolsäurehydroperoxide bei pH 8.0. Der zeitliche Verlauf der ozoninduzierten LOX Aktivität bei Tabak cv. Bel W3 war in beiden Experimenten vergleichbar.

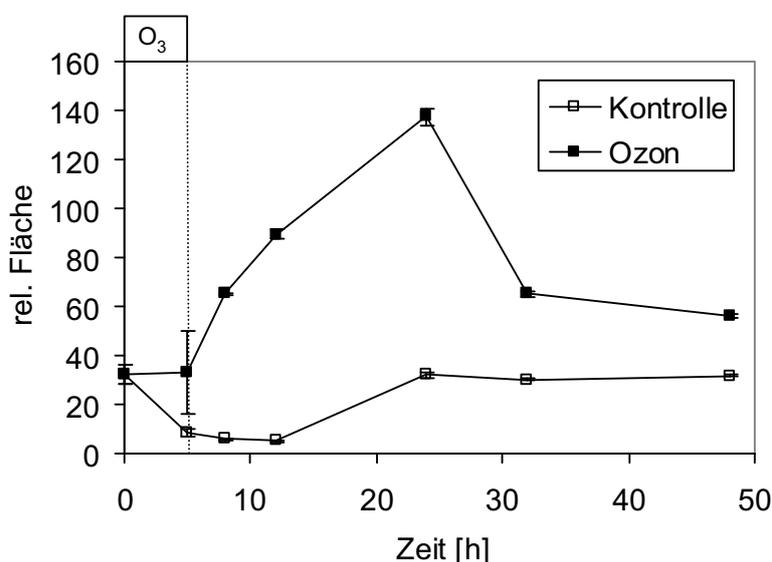


Abb. 26 Zeitverlauf der ozoninduzierten *N. tabacum* L. cv. Bel W3 Lipoxygenase Aktivität bestimmt durch HPLC. Tabakpflanzen cv. Bel W3 wurden 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert (geschlossene Symbole). Kontrollpflanzen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten (offene Symbole). Die LOX Aktivität wurde nach den angegebenen Zeitpunkten mit Linolsäure bei pH 8.0 bestimmt. Aufgetragen sind die bei $E_{235\text{nm}}$ ermittelten relativen Peakflächen der Linolsäurehydroperoxide. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

3.5 Nachweis ozoninduzierter Isoformen der Tabak Lipoxygenase

Isoenzyme beschreiben Proteine, die innerhalb eines Organismus existieren und trotz genetisch determinierter Unterschiede in der Primärsequenz identische enzymatische Kapazitäten besitzen.

In der Familie der Lipoxygenasen gibt es verschiedene Isoformen, die anfänglich aufgrund der unterschiedlichen pH-Wert Optima (Galliard und Chan, 1980; Siedow, 1991) und später aufgrund von ähnlichen Aminosäuresequenzen (Shibata et al., 1994) klassifiziert wurden (vgl. Kap. 1.6). Die auch in dieser Arbeit festgestellten unterschiedlichen pH-Wert Optima für LOX (Kap. 3.2.3), gaben Veranlassung die Lipoxygenase Aktivität unter nativen Bedingungen auf Polyacrylamidgelen nachzuweisen, um so Hinweise auf mögliche Isoformen zu erhalten. Verglichen wurde der Zeitpunkt 24 h nach Start der Ozonbehandlung (150 ppb, 5 h) mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollpflanzen bei Tabak cv. Bel W3, da zu diesem Zeitpunkt zuvor die höchste ozoninduzierte LOX Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 25).

Das Ergebnis in Abb. 27 I und II Spur A zeigt eindeutig, dass in Tabak cv. Bel W3 ozoninduzierte LOX Aktivität in Form von je zwei spezifischen Banden nachgewiesen werden konnte (Pfeile). Unspezifische Oxidationsprozesse waren durch Zugabe von Kaliumzyanid ausgeschlossen worden. Die LOX Aktivitätsbanden traten sowohl bei pH 8.0 und Linolsäure (Abb. 27 I) als auch bei pH 7.0 und Linolensäure (Abb. 27 II) auf. Die nachgewiesenen LOXs Aktivitätsbanden können auf zwei oder mehr LOX Isoformen hinweisen.

In unbehandelten Kontrollpflanzen wurde bei pH 7.0 und Linolensäure keine LOX Aktivität detektiert (Abb. 27 II, Spur B) wohingegen bei pH 8.0 und Linolsäure zwei schwache Banden auf LOX Aktivität hindeuteten (Abb. 27 I, Spur B). Dies steht in Übereinstimmung zu dem photometrischen Test, mit dem geringe LOX Aktivität auch in unbehandelten Kontrollpflanzen nachgewiesen wurde (Abb. 25 a). In diesem Versuch diente gereinigte Soja LOX (Sigma) als Positivkontrolle und zeigte eine starke Aktivität (Abb. 27 I und II, Spur C). Die enzymatisch nicht aktive Negativkontrolle in Form von BSA zeigte keine Aktivität (Abb. 27 I und II, Spur D).

Versuche unter sauren Bedingungen im Natrium-Citrat-Puffer bei pH 5.0 und Linol- oder Linolensäure als Substrat führten zu milchig-weißen Proteinbanden und keinerlei Farbreaktion. Außerdem kam es möglicherweise zur Entstehung von Blausäure aufgrund des enthaltenen Kaliumzyanids (Prof. Kneifel, mündl. Mitteilung)

und hierdurch gegebenenfalls zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität. Auf die Darstellung wurde verzichtet.

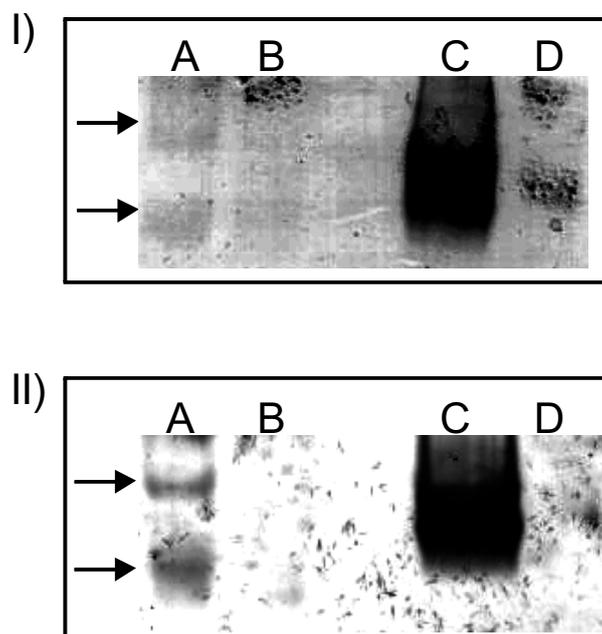


Abb. 27 Native PAGE mit in-Gel Färbung zum Nachweis von ozoninduzierten Lipoxygenase Isoenzymen in Tabak cv. Bel W3. Die Blätter wurden A) 24 h nach Start einer Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) oder B) von unbehandelten Kontrollpflanzen geerntet. C) Positive Kontrolle: Gereinigte Soja LOX (Sigma). D) Negativ Kontrolle: BSA. Die LOX Reaktion erfolgte in 50 mM Natriumphosphatpuffer I) pH 8.0 und Linolsäure und II) pH 7.0 und Linolensäure als Substrat nach der in Kapitel 2.10.9 vorgestellten Methode. Die Pfeile verweisen auf die LOX Aktivität in Form von spezifisch angefärbten Banden. Es wurden in den Spuren A), B) und D) je 50 μg und in Spur C) 8 μg Protein aufgetragen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten.

3.6 Klonierung von genspezifischen Sonden für LOX, OPR, AOC, EH, ADH, HPL, Glc und Chn

Zur Klärung der Frage, ob die ozoninduzierte LOX Aktivität, sowie verschiedene Enzyme des LOX-Wegs auf Transkriptebene reguliert werden, wurden entsprechende Northern Blot Analysen durchgeführt. Hier diente die ozoninduzierte mRNA Expression der PR-Proteine basische β -1,3-Glucanase und basische Chitinase als Positivkontrolle. Dazu war es zunächst notwendig die entsprechenden cDNA Sonden zu erzeugen.

Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit waren die Nukleotidsequenzen von *Nicotiana tabacum* L. 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR), Hydroperoxid-Lyase (HPL) und Allenoxid-Cyclase (AOC) nicht publiziert. Die genspezifischen Primer dieser Enzyme wurden daher von bekannten Nukleotidsequenzen aus Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) abgeleitet, da diese ebenfalls zur Familie der *Solanaceae*n gehören. Alle weiteren Primer wurden aus publizierten Nukleotidequenzen von *Nicotiana tabacum* L. Varietäten der entsprechenden Enzyme abgeleitet (Kap. 2.10.7 und Kap. 2.10.21).

Tab. 5 Genspezifische cDNA Sonden aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3. Dargestellt sind die spezifischen cDNA Gensonden, sowie die Sequenzen [Acc. Nr.], die nach Sequenzvergleichen auf Nukleotidebene (Kap. 2.10.21 a)) die höchste Homologie ergaben. Die cDNA Fragmente wurden durch RT-PCR mit spezifischen Primern erzeugt (Kap. 2.10.12). Hierfür wurde RNA eingesetzt, die 8 h oder 24 h nach Start einer Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb O₃) aus Blattmaterial (Nr. 3) isoliert worden war (Kap. 2.10.1.1).

cDNA Gensonde	Homologie [%]
OPR (12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase)	85 % [AJ242551.1] <i>Lycopersicon esculentum</i> mRNA for 12-oxophytodienoate reductase (opr gene)
HPL (Hydroperoxid-Lyase)	100 % [AF230372.1] <i>Lycopersicon esculentum</i> fatty acid hydroperoxide lyase (HPL) mRNA, complete cds
AOC (Allenoxid-Cyclase)	95 % [AJ308487.1] <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for allene oxide cyclase (aoc gene)
EH (Epoxidhydrolase)	96 % [U57350.1] <i>Nicotiana tabacum</i> epoxide hydrolase mRNA, complete cds
LOX (Lipoxygenase)	99 % [X84040.1] <i>N.tabacum</i> mRNA for lipoxygenase
LOX(full) (Lipoxygenase)	98 % [X84040.1] <i>N.tabacum</i> mRNA for lipoxygenase
ADH (Alkohol-Dehydrogenase)	96 % [X81853.1] <i>N.tabacum</i> mRNA for alcohol dehydrogenase
Glc (basische β 1, 3-Glucanase)	100 % [M20620.1] <i>N.tabacum</i> beta-1,3-glucanase mRNA, clone pGL43
Chn (basische Chitinase)	100 % [M15173.1] Tobacco (<i>N.tabacum</i>) endochitinase mRNA, partial cds
18S rRNA (rRNA) (Ribosomale 18S rRNA)	99 % [AJ23601.1] <i>Nicotiana tabacum</i> 18S rRNA gene.

Mit spezifischen Primern wurden mittels RT-PCR cDNA Fragmente erzeugt (Kap. 2.10.7). Für die cDNA Synthese wurde RNA eingesetzt, die aus ozonbehandeltem

Blattmaterial (Nr. 3) isoliert worden war (Kap. 2.10.1.1). Die cDNA Gensonden für OPR, AOC, EH, LOX, LOX (Volllänge), ADH, Glc, Chn und 18S rRNA konnten aus mittelalten Blättern (Nr. 3), die 8 h nach Start der Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) von Tabak cv. Bel W3 geerntet wurden amplifizieren werden. Das cDNA Fragment für HPL ließ sich aus 24 h nach Start der Ozonbehandlung geerntetem Blattmaterial vermehren.

In Tab. 5 sind die spezifischen cDNA Gensonden, sowie die Sequenzen [Acc. Nr.], die nach Sequenzvergleichen (2.10.21, a) auf Nukleotidebene die höchste Homologie ergaben, dargestellt. Diese cDNA Fragmente wurden in nachfolgenden Northern und Southern Analysen als spezifische Gensonden eingesetzt. Die Nukleotidsequenzen der amplifizierten Gensonden für Northern Blot Analysen der LOX-Weg Enzyme sind im Anhang 2) abgebildet. Die Überprüfung der Gensonden mittels Datenbankrecherchen (Kap. 2.10.21) nach Sequenzvergleichen auf Nukleotidebene ergab, dass bis auf die AOC Gensonde, alle klonierten LOX-Weg Gensonden die höchste Homologie zu der Nukleotidsequenz aufwiesen, aus der auch die Primer abgeleitet wurden. Die Primer für die AOC Gensonde wurden aus einer AOC Sequenz aus Tomate abgeleitet [Acc. Nr.: AJ272026], zu der sie eine Homologie von 86 % aufwies. Die größere Homologie von 95 % wurde zu einer nach Erzeugung der Gensonden veröffentlichten AOC Sequenz [Acc. Nr.: AJ308487.1] aus Tabak nachgewiesen, was die Identität bestärkte. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammenfassend dargestellt.

Aufgrund der Homologie von 100 % zu einer HPL aus Tomate (Tab. 5) und der Homologie von 90 % zu einer HPL aus *N. attenuata* (Acc.: AJ44400), die beide aufgrund phylogenetischer Studien als 13-HPL (CYP74B) eingestuft wurden (Chehab et al., 2006; -2007), wird angenommen, dass es sich auch bei dem aus ozonbehandeltem- Tabak cv. Bel W3 isolierten HPL cDNA Fragment (Tab. 5) um ein 13-HPL spezifisches Fragment handeln könnte. Darüber hinaus stellen Fammartino et al. (2007) dar, dass bisher noch keine 9-HPL aus *Solanaceae*n beschrieben wurden. Dies ist in sofern interessant, da bei Tabak cv. Bel W3 unter Ozonstress von Heiden et al. (1999a) auch nur flüchtige C₆-VOCs aus dem 13-HPL Weg nachgewiesen wurden und keine C₉-VOCs aus dem 9-HPL Weg (Abb. 4). Ein weiterer Zusammenhang wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (Kap. 4.4).

Die Untersuchungen der LOX Aktivität (Kap. 3.4 und Kap. 3.5) hatten Hinweise auf mögliche LOX Isoformen ergeben, wobei man 9-und/oder 13-LOX Isoformen

vermuten kann (Abb. 4). Wie in Tab. 5 dargestellt, zeigten die in dieser Arbeit aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 klonierten LOXs Sonden die größte Homologie

A)	717					
		0				
GhLOX1	DSCTIIIVVA	SALHAAVNFG	QYPYAGYLPN	RPTISRFRMP	EKGTPEYTEL	
Arabido LOX4	SVITTIWLA	SAQHAALNFG	QYPYGGYVPN	RPPLMRRLIP	DESDPEFTSF	
Soybean LOX1	EVCLIIWIA	SALHAAVNFG	QYPYGGGLIMN	RPTASRRLLP	EKGTPEYEEM	
Tobacco LOX1	DSCTIWIWA	SALHAAVNFG	QYPYAGYLPN	RPTLSRNFMP	EPGSPEYEEL	
Barley LOXA	KACTTIWIG	SALHAAVNFG	QYPYAGFLPN	RPTVSRFRMP	EPGTEEYAEEL	
Cucumber LOX	ESCTTIWIA	SALHAAVNFG	QYPYGGYILN	RPTTSRFRMP	EVGTAEYKEL	
B) LOX	DSCTIWIWA	SALHAAVNFG	QYPYAGYLPN	RPTLSRNFMP	EPGSPEYEEL	

Abb. 28 Aminosäuresequenzvergleich der LOX A) Sequenzvergleich verändert nach Marmey et al. (2007). Die Sequenzen sind in der Genbank mit folgenden Zugangsnummern gelistet: Cotton *GhLOX1* (DQ861284): *Gossypium hirsutum*; *Arabidopsis thaliana* L. LOX4 (NP_177396.1), Soybean LOX1 (J02795): *Glycine max.* (L.) Merr, Tobacco LOX1 (X84040): *Nicotiana tabacum* L., Barley, LOXA (L35931): *Hordeum distichum* L., Cucumber LOX (X92890): *Cucumis sativus* L. B) Aminosäureteilsequenz der in dieser Arbeit nach 24 h aus ozonbehandeltem (5 h; 150 ppb O₃) Tabak cv. Bel W3 isolierten LOX cDNA Sonde (471 bp). ♦ = Konserviertes Histidin; + = Aminosäuren, die in allen dargestellten Pflanzenspezies vorkommen; 0 = Histidin, das für die Bindung von Eisen erforderlich ist (für *GhLOX1* an Position: 717).

von 99 % (Fragment: 471 bp) bzw. 98 % (Fragment: 2632 bp) zu der, durch Zellwandfragmente aus *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* (*Ppn*) induzierten LOX aus *N. tabacum* L. cv. Wisconsin 38 Zellkultur (Acc. Nr.: X84040; Véronési et al., 1995). Diese Elicitor-induzierte LOX aus Tabak (Acc. Nr.: X84040) wurde von Marmey et al. (2007) nach einem Modell von Hornung et al. (1999) aufgrund der Aminosäuren Tyrosin/Valin an der Position 584 als 9-LOX klassifiziert (Tab. 5, 0 und Abb. 28). Darüber hinaus wurde diese LOX (Acc. Nr.: X84040) auch nach phylogenetischen Stammbaumanalysen als 9-LOX bzw. Typ 1 9-LOX eingruppiert (Tab. 6; Nemchenko et al., 2006; Lang und Feussner, 2007). Es wurde daher von der in dieser Arbeit für Northern Blot Analysen eingesetzten LOX cDNA Sonde (471 bp) aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 die Aminosäuresequenz abgeleitet (Kap. 2.10.21) und mit den Daten von Marmey et al. (2007) verglichen (Abb. 28). Hier zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz der ozoninduzierten Tabak

cv. Bel W3 LOX cDNA Sonde (diese Arbeit) ausserhalb der von Marmey et al. (2007) als 9-LOX bestimmende Position 584 lag, so dass hierüber keine weitere Aussage getroffen werden konnte. Jedoch umfasste ein Teil der Aminosäuresequenz der LOX cDNA Gensonde (Abb. 28, B) einen von Marmey et al. (2007) dargestellten, in vielen Pflanzenspezies vorkommenden wichtigen konservierten Bereich u. a. ein Histidin, das für die Bindung von Eisen erforderlich ist und war zu diesem 100 % homolog (Abb. 28).

Tab. 6 Homologie der LOX cDNA Sonde (471 bp) aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 zu bekannten 9- oder 13-LOX Sequenzen. Dargestellt ist die Homologie [%] zu dem jeweiligen Gen mit Acc. Nr. und Bezeichnung nach Sequenzvergleichen auf Nukleotidebene (Kap. 2.10.21 a) und b)), sowie ihre Eingruppierung in 9- oder 13-LOX anhand phylogenetischer Stammbaumanalysen nach Referenzen von A: Lang und Feussner, 2007; B: Zhang et al., 2006; C: Nemchenko et al., 2006; D: Marmey et al., 2007. 0 = keine signifikante Übereinstimmung, # = nicht dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

Gen [Acc. Nr.] Bezeichnung	Homologie [%]	Eingruppierung in 9- oder 13-LOX			
		A	B	C	D
LOX1 [X84040] <i>N.tabacum</i> mRNA for Lipoxygenase	99 %	9	#	9	#
TomLoxE [AY008278] <i>Lycopersicon esculentum</i> lipoxygenase mRNA, complete cds	89 %	#	9	#	#
TomLoxB [U09025] <i>Lycopersicon esculentum</i> lipoxygenase (loxB) mRNA, complete cds	83 %	#	9	#	9
NaLox1a [AY254345] <i>Nicotiana attenuata</i> lipoxygenase (Lox1a) mRNA, complete cds	81 %	#	9	#	#
NaLox3 [AY254349] <i>Nicotiana attenuata</i> lipoxygenase (Lox3) mRNA, complete cds	0	#	13	13	#
TomLoxC [U37839.1] <i>Lycopersicon esculentum</i> lipoxygenase (loxC) mRNA, complete cds	0	#	13	#	13
TomLoxD [U37840.1] <i>Lycopersicon esculentum</i> lipoxygenase (loxD) mRNA, complete cds	0	#	13	#	13

Aufgrund der bisherigen Daten kann man vermuten, dass die aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 isolierte LOX cDNA Sonde (471 bp), ein 9-LOX spezifisches Fragment darstellen könnte. Zur weiteren Absicherung wurden Sequenzvergleiche

mit einigen bekannten 13-LOX Sequenzen aus Tabak und Tomate auf Nukleotidebene durchgeführt (Kap. 2.10.21, Align). Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt und zeigen, dass es weder mit der, aufgrund phylogenetischer Stammbaumanalysen von Zhang et al. (2006) und Nemchenko et al. (2006) als 13-LOX eingruppierten NaLox3 [Acc. Nr.: AY254349] aus Tabak, noch mit denen von Zhang et al. (2006) und Marmey et al. (2007) als 13-LOX eingruppierten TomLoxC [Acc. Nr.: U37839.1] bzw. TomLoxD [Acc. Nr.: U37840.1] aus Tomate eine signifikante Sequenzübereinstimmung gab. Demgegenüber wurden Homologien von 89 % zu TomLoxE [AY008278] und 83 % zu TomLoxB [U09025] aus Tomate, sowie 81 % zu NaLox1a [AY254345] aus *Nicotiana attenuata* festgestellt, die alle als 9-LOX eingruppiert wurden.

Aufgrund der Ergebnisse anhand der Sequenzvergleiche und Literaturdaten kann man daher annehmen, dass es sich bei dem 8 h nach einer Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb O₃) aus Tabak cv. Bel W3 isolierten LOX cDNA Fragments (471bp), wahrscheinlich um eine 9-LOX spezifisches Fragment handelt, dass in Northern Blot Analysen möglicherweise vornehmlich 9-LOX Transkripte detektiert.

3.7 Ozonvermittelte Induktion von Lipoxygenase auf Transkriptebene

Nachdem ozoninduzierte Enzymaktivität der Tabak Lipoxygenase nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.4), sollte in nachfolgenden Experimenten der Einfluss von Ozon auf die transkriptionelle Regulation der LOX untersucht werden.

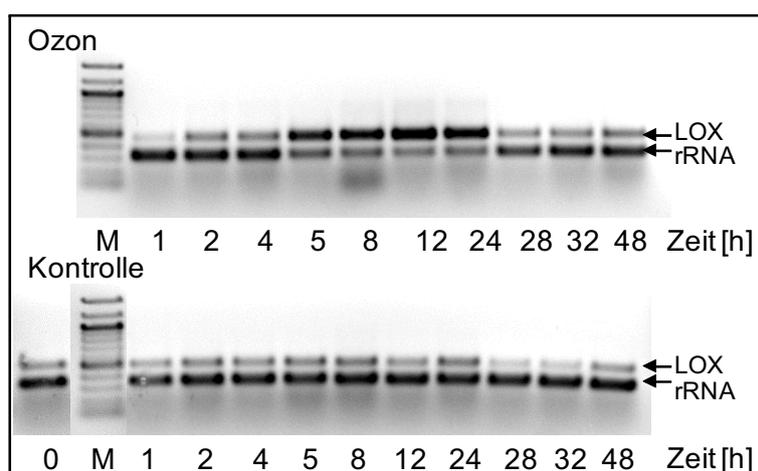
Hierfür wurde aus Tabak cv. Bel W3 nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 28 h, 32 h und 48 h nach einer fünfstündigen Ozonbehandlung mit anschließender Weiterkultivierung in ozonfreier Luft, die Gesamt mRNA isoliert (Kap. 2.10.1.1) und anschließend mit der relativen Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (Kap. 2.10.5) auf LOX Transkriptakkumulation hin untersucht. Parallel wurden unbehandelte Kontrollpflanzen analysiert.

3.7.1 RT-PCR zum Zeitverlauf der Lipoxygenase Transkriptakkumulation

Die RT-PCR Analysen zeigen deutlich, dass es nur in ozonbehandelten Proben zu einer vermehrten transienten Akkumulation von LOX Transkripten zwischen 5 h und 24 h kam (Abb. 29 A). Zu allen weiteren Zeitpunkten dieser Proben, sowie über den gesamten Untersuchungszeitraum bei den unbehandelten Kontrollpflanzen wurde nur eine geringe konstitutive Expression der LOX mRNA festgestellt (Abb. 29 A). Ein Sequenzvergleich (Kap. 2.10.21, a) der beiden spezifischen LOX Primer (P1 und

P2; Kap. 2.10.7) ergab für beide eine Homologie von 100 % (20/20 Identität) zu der 9-LOX Sequenz (Acc. Nr. X84040, Tab. 5) aus der sie abgeleitet wurden. Ein ebenfalls mit diesen Primern amplifiziertes LOX cDNA Fragment (471 bp) zeigte hierzu eine Homologie von 99 % (Tab. 5). Darüber hinaus zeigte P1(20mer) eine Homologie von 100 % (20/20 Identität) zu LOX aus anderen Pflanzenspezies (Acc. Nr.: S76063.1; 56139.1; AY028297.1; AY607693.1; AP009604.1. Die genauen Bezeichnungen sind der Datenbank NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> zu entnehmen). Demgegenüber zeigte P2(20mer) nur eine 18/18 Identität (Homologie 100 %) zu LOX aus *Apium graveolens* var. Dulce (Acc. Nr. AY607693.1). Zusätzliche Sequenzvergleiche (Kap. 2.10.21, b) zu bekannten 13-LOXs (Acc. Nr.: AY254349, U37839.1 und U37840.1, siehe (Tab. 6), ergaben keine signifikante Übereinstimmung. Aufgrund der Sequenzvergleiche wird angenommen, dass mit den eingesetzten Primern spezifisch LOX cDNA Fragmente, möglicherweise zu der 9-LOX (Acc. Nr. X84040) homolog, amplifiziert wurden (Abb. 29). Dennoch kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Primer möglicherweise auch LOX Isoformen detektierten. Hier könnte in nachfolgenden Arbeiten die Sequenzierung aller amplifizierten LOX Transkripte Aufklärung bringen. Um eine detailliertere Aussage über die Quantität der LOX mRNA zu den untersuchten Zeitpunkten nach Start der Ozonexposition treffen zu können, wurde im gleichen Reaktionsansatz die konstitutiv exprimierte 18S rRNA mit amplifiziert und die Signalintensitäten (LOX/18S rRNA) pro Zeitpunkt dividiert. Das Ergebnis ist in Abb. 29 B) dargestellt. Eine Amplifizierung von Verunreinigungen durch genomische DNA kann ausgeschlossen werden, da PCR Analysen mit den gleichen LOX-Primern und genomischer DNA kein Amplifikationsprodukte erbrachten (Daten nicht gezeigt). Die LOX Transkriptmenge blieb bis zum Versuchende nach 48 h um das 1,2 fache gegenüber den Kontrollen erhöht. Bei den Kontrollpflanzen war ein leichter Tagesgang zu erkennen, mit Peaks zu Beginn, nach 24 h und 48 h.

A)



B)

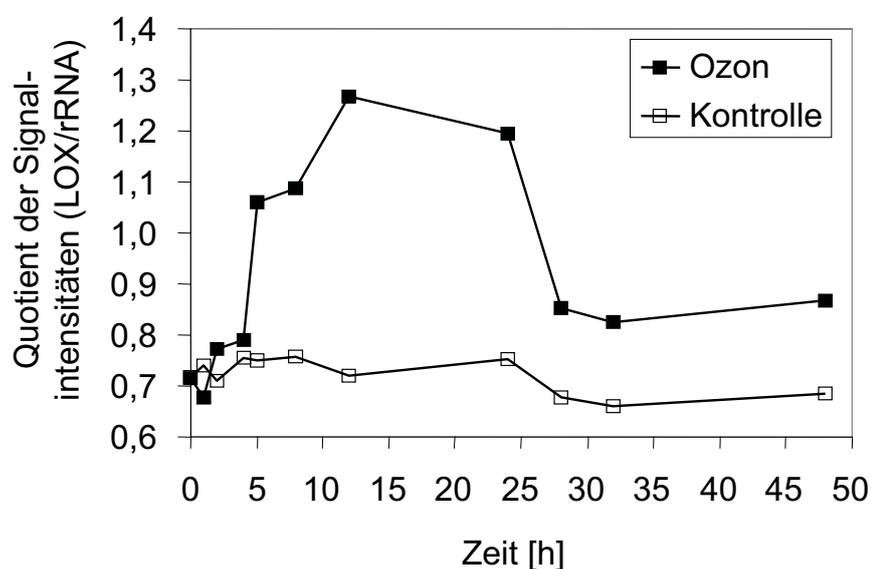


Abb. 29 RT-PCR Analyse zur Quantifizierung ozoninduzierter LOX mRNA aus Tabak cv. Bel W3. Ozon: Tabakpflanzen wurden 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt und weiter in Schadstoff freier Luft kultiviert. Kontrollen: Kontrollpflanzen blieben konstant in Schadstoff freier Luft. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Start der Behandlung wurde die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.10.1.1), spezifische LOX cDNA amplifiziert (Kap. 2.10.5) und auf einem 1,3 % mit Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel analysiert. Konstitutiv exprimierte mRNA für 18S rRNA (rRNA) wurde parallel amplifiziert und diente als Kontrolle für die RT-PCR Bedingungen (A) und zur Berechnung des Quotienten der mRNA Signalintensitäten LOX/18S rRNA (B). Die relativen Signalintensitäten jeder Bande wurden mit dem Computerprogramm AIDA2.0 bestimmt. Die gebildeten Quotienten wurden in Abhängigkeit zur Zeit für ozonbehandelte (■) und unbehandelte (□) Pflanzen aufgetragen (B).

3.8 Dosisabhängige Ozoninduktion der Lipoxygenase bei Tabak cv. Bel W3 in Abhängigkeit vom Blattalter

Eine Induktion der Tabak Lipoxygenase in vegetativ mittelalten Blättern (Blatt Nr. 3) durch Ozon (5 h, 150 ppb) wurde in den Kapiteln 3.4, 3.5 und 3.7.1 beschrieben. Da diese Blätter unter den genannten Bedingungen Nekrosen aufwiesen (Kapitel 3.1, Abb. 17) ergaben sich hieraus zwei Fragen. 1. Wird die LOX auch in ungeschädigten entwicklungsphysiologisch jungen Blättern (Blatt Nr. 0) (Kapitel 3.1, Abb. 18) unter Standardbedingungen durch Ozon induziert oder nur in Blättern, die auch Nekrosen aufweisen? 2. Welchen Einfluss hat die Konzentration des Ozons auf die Induktion der LOX auf Protein und Transkriptebene?

Für die folgenden Northern Blot Experimente wurde Blattmaterial von Blatt Nr. 0 und Blatt Nr. 3, 24 h nach einer fünfstündigen Ozonexposition mit a) 150 ppb oder b) 300 ppb, geerntet. Als Vergleich dienten Blatt Nr. 0 und Blatt Nr. 3 von unbehandelten (0 ppb Ozon) Kontrollpflanzen (Kap. 2.6.1.3, Kap. 2.8 und Kap. 2.10.13).

3.8.1 Nachweis auf Transkriptebene

Am auffälligsten war, dass es ausschließlich in den mittelalten Blättern (Nr. 3) von Tabak cv. Bel W3 (Abb. 30 A) und nur nach erfolgter Ozonbehandlung (150 bzw. 300 ppb), zu einer LOX Transkript Akkumulation kam (Abb. 30 C). Es konnte bei einer Verdopplung der Ozonkonzentration (300 ppb) (Abb. 30 B) auch eine Verdopplung der LOX Transkriptmenge mit den korrespondierenden relativen Signalintensitäten von 1,2 auf 2,4 festgestellt werden (Abb. 30 C und E). Weder in Kontrollpflanzen noch in den ozonbehandelten (150 bzw. 300 ppb) jungen Tabakblättern (Blatt Nr. 0) konnte eine Akkumulation von LOX Transkripten festgestellt werden (Abb. 30).

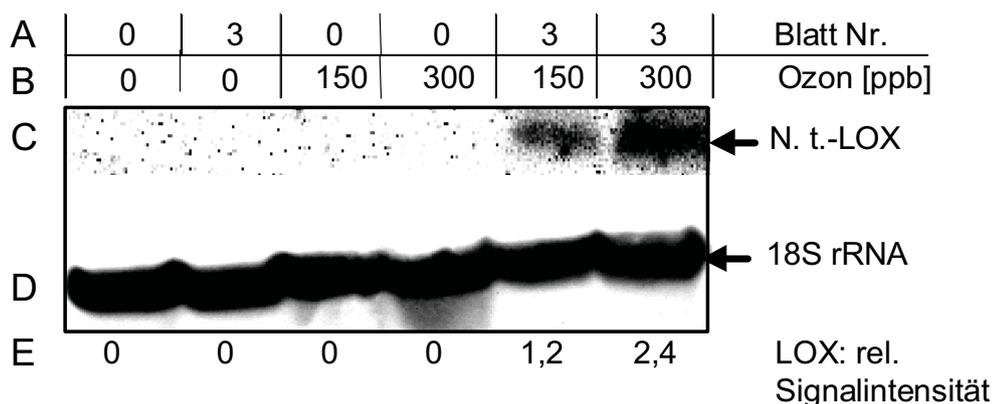


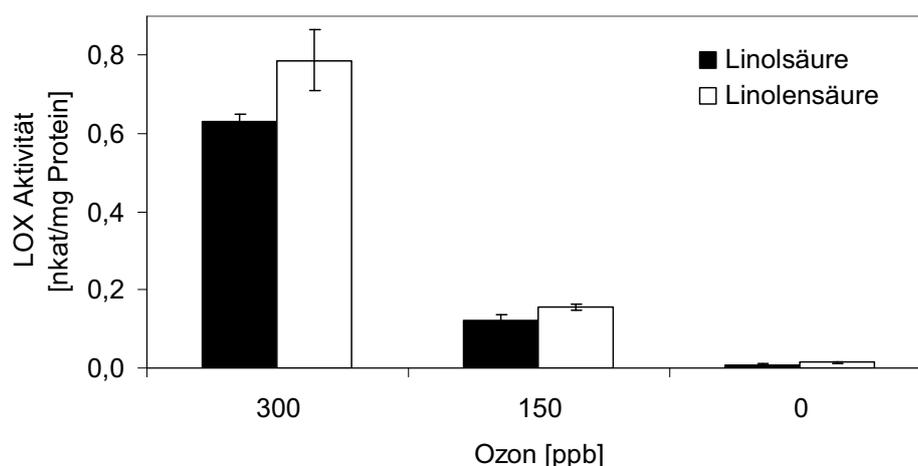
Abb. 30 Northern Blot Analyse ozoninduzierter Lipoxygenase mRNA im Blattgewebe von Tabak cv. Bel W3. Tabakpflanzen wurden 5 h mit 150 ppb bzw. 300 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Kontrollpflanzen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten. Nach 24 h wurden Blatt Nr. 0 und Nr. 3 geerntet. A) Darstellung des untersuchten Blattes (Nr. 0 = junges Blatt bzw. Nr. 3 = mittelaltes Blatt). B) Eingesetzte Ozonkonzentration (5 h). C) Akkumulationsmuster der Tabak Lipoxygenase mRNA. D) Transkriptmenge der rRNA als Kontrolle zur Gleichbeladung des Gels. E) Computergestützte (AIDA2.0) Ermittlung der rel. Signalintensitäten der LOX Transkriptmenge. Pro Spur wurden je 15 µg gesamt RNA aufgetragen und mit einer LOX-DIG-cDNA Sonde (471 bp) hybridisiert. Nach dem Entfernen der Sonde wurde erneut mit einer 18S DIG-cDNA Sonde (312 bp) hybridisiert (Kap. 2.10.12 und Kap. 2.10.13).

3.8.2 Nachweis auf Proteinebene

Die Messung der LOX Aktivität erfolgte in mittelalten Blättern Nr. 3. Die LOX Aktivität (2.9.2.7) in Tabak Rohextrakten (2.9.2.2) bei pH 5.0 und Linolsäure als Substrat, zeigte eine Grundaktivität von 0,58 nkat/mg Protein, die nach einer Standard Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) um das 1,7 fache auf 0,98 nkat/mg Protein anstieg. Bei Verdopplung der Standard-Ozonkonzentration auf 300 ppb (5 h) stieg die LOX Aktivität im Vergleich um das 1,3 fache auf 1,28 nkat/mg Protein an (Abb. 31, B) (LOX Aktivitätszunahme gegenüber der Kontrolle: 2,2 fach).

Bei Analysen mit Linolensäure als Substrat konnte nach der Standard Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) keine Erhöhung der LOX Aktivität beobachtet werden. Eine Verdopplung der Ozonkonzentration auf 300 ppb (5 h) führte jedoch zu einer 1,5 fachen Steigerung der LOX Aktivität gegenüber dem Wert bei 150 ppb

A) pH 7.0 / pH 8.0



B) pH 5.0

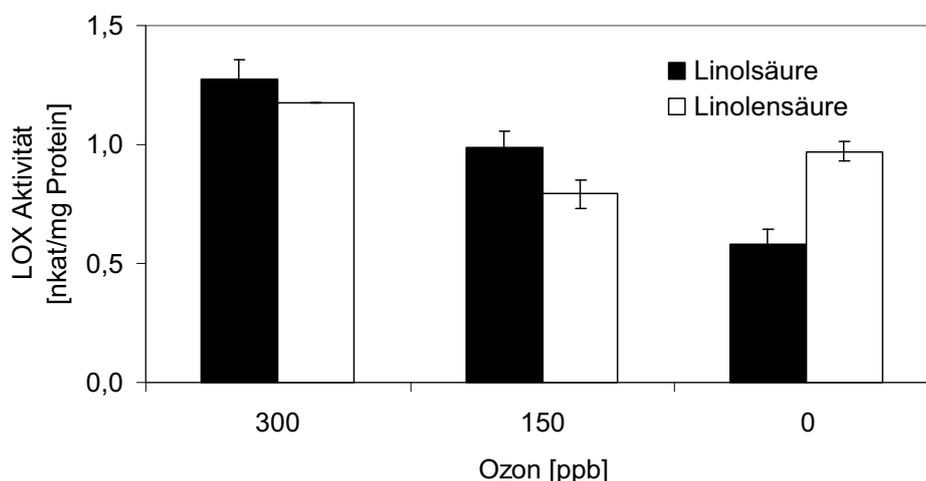


Abb. 31 Dosis abhängige Ozoninduktion der Lipoxygenase Aktivität in mittelalten *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 Blättern. Tabakpflanzen wurden 5 h mit 150 ppb bzw. 300 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Kontrollpflanzen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten. Nach 24 h wurde Blatt Nr. 3 geerntet und die Proteine extrahiert. Die LOX Aktivitätsbestimmungen in den Rohextrakten erfolgten in A) mit Linol- bei pH 8.0 und mit Linolensäure bei pH 7.0 wie in Kapitel 2.9.2.2 und 2.9.2.7 beschrieben. B) zeigt die entsprechenden Analysen mit Linol- bzw. Linolensäure bei pH 5.0. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen dar.

Ozon (Abb. 31, B). Nach Ozonexposition war eine leichte Substratpräferenz für Linolsäure zu erkennen (Abb. 31, B).

Bei pH 7.0 mit Linolensäure (LE) bzw. pH 8.0 mit Linolsäure (LA) als Substrat konnte eine Präferenz für Linolensäure festgestellt werden (Abb. 31, A). In

Kontrollpflanzen wurde jeweils nur eine geringe LOX Aktivität von 0,01 nkat/mg Protein nachgewiesen.

Die Standard Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) induzierte die LOX Aktivität bei Tabak cv. Bel W3 im Vergleich zu den Kontrollen um das 12,2 fache mit LA und das 15,6 fache mit LE. Eine Verdopplung der Ozonkonzentration auf 300 ppb (5 h) bewirkte eine weitere deutliche Erhöhung der LOX Aktivität um jeweils das 5 fache. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wurde die LOX Aktivität durch Ozon (300 ppb, 5 h) mit LA um das 63 fache und mit LE um das 79 fache induziert.

3.9 Southern Blot Analyse der LOX bei den Tabak Varietäten cv. Bel W3, cv. Bel B und cv. xanthi.nc-Nah-G

Die Southern Blot Analysen (Kap. 2.10.14, 2.10.19 und 2.10.1.2) wurden von *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3, - cv. Bel B und - cv. xanthi.nc Nah-G durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob Hinweise auf mehrere LOX Genkopien erhalten werden und ob sich die drei Tabak Varietäten hinsichtlich des Hybridisierungsmusters unterscheiden. Das Ergebnis (Abb. 32) zeigt das Hybridisierungsmuster nach Restriktion genomischer DNA mit den Restriktionsendonukleasen PstI, Bam H1 und NdeI, die innerhalb der verwandten LOX cDNA Sonde (2,6 kb) jeweils einmal schneiden. In jedem Ansatz wurden mehrere stärker und schwächer markierte DNA Fragmente detektiert, die die Existenz mehrerer LOX Genkopien vermuten lassen. Dieses Muster war bei den drei untersuchten Tabak Spezies identisch und ließ keine Hinweise auf genetische Unterschiede hinsichtlich des LOX Gens erkennen. Sequenzvergleiche mit der verwandten LOX cDNA Sonde (2,6 kb) ergaben eine Homologie von 98 % zu der beschriebenen Nukleotidsequenz der Elicitor-induzierten LOX aus *Nicotiana tabacum* L. Wisconsin 38 (GenBank Nr.: X84040), aus der auch die Primer abgeleitet wurden (Kap. 3.6). Das Ergebnis (Abb. 32) ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Véronési et al. (1996), die mit einer Tabak LOX cDNA Sonde (GenBank Nr.: X84040) in Southern Analysen von genomischer DNA aus Tabakzellkulturen (*N. tabacum* L. cv. Wisconsin 38) ebenfalls mehrere Fragmente detektierten und aufgrund dessen auf mindestens zwei Genkopien der LOX schlossen. Die Menge der in dieser Arbeit detektierten Fragmente läßt jedoch auf mehr als zwei Gene für LOXs schließen. Die von Véronési et al. (1996) dargestellte Tabak LOX (GenBank Nr.: X84040) wurde bei phylogenetischen

Stammbaumanalysen aufgrund von Protein- und Strukturvergleichen sowie durch die Existenz der Aminosäuren Thyrosin/Valin um die Position 584 in der Literatur als 9-LOX beschrieben (Kap. 1.6.1 und Kap. 3.6; Hornung et al., 1999; Liavonchanka und Feussner, 2006; Marmey et al., 2007). Aufgrund der bereits zuvor beschriebenen Homologien zu dieser Tabak LOX (GenBank Nr.: X84040), kann man vermuten, dass es sich auch bei den in dieser Arbeit aus ozonbehandeltem (5 h, 150 ppb O₃) Tabak cv. Bel W3 klonierten LOX cDNA Sonden (Kap. 3.6) um 9-LOXs handeln könnte. Funktionelle Enzymanalysen könnten in nachfolgenden Arbeiten zur Aufklärung beitragen.

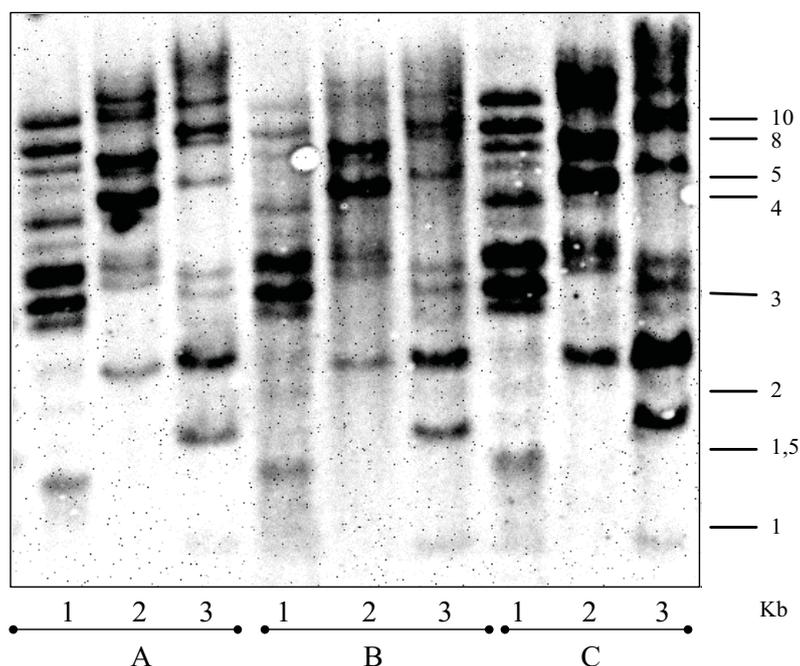


Abb. 32 Southern Blot Analyse genomischer LOX DNA von Tabak A) cv. Nah-G, B) cv. Bel B und C) cv. Bel W3. Je 20 µg gesamt DNA (A-C) pro Ansatz wurden mit 1) PstI, 2) Bam H1 und 3) NdeI restringiert. Die DNA wurde auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin markierten Tabak LOX cDNA (2,6 Kb) hybridisiert (Kap.2.10.12 und 2.10.19).

3.10 Northern Blot Analysen von Lipoxygenase ozonbehandelter *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3, cv. Bel B und cv. xanthi.nc-Nah-G

In dem ozonsensitiven *N. tabacum* L. cv. Bel W3 konnte nach Ozonbehandlung in nekrotisiertem Blattgewebe eine Induktion der LOX auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden, nicht aber in nekrosenfreien Blättern (Kap. 3.8.1, Kap. 3.8.2 und Abb. 18). Diese Korrelation zwischen dem Auftreten von

Nekrosen und LOX mRNA Akkumulation sollte daher vergleichend bei der ozonunempfindlichen Tabak Varietät Bel B, die nach Standard-Ozonbehandlung an keinem Blatt Nekrosenbildung zeigte (Abb. 17), näher untersucht werden.

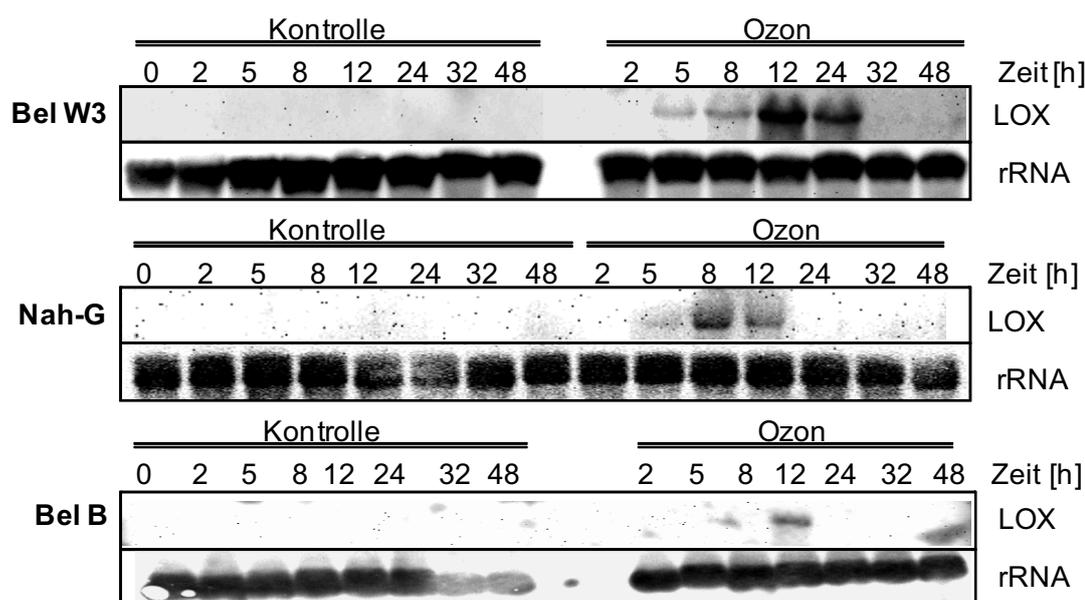
Zur Klärung dieser Fragestellung wurde von beiden Tabak Varietäten nach den Zeiten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h und 48 h Stunden nach einer fünfstündigen Ozonbehandlung mit anschließender Weiterkultivierung in ozonfreier Luft die Gesamt-mRNA wie unter 2.10.1.1 isoliert, Northern Blot Analysen unterzogen und mit einer digoxigenin-markierten LOX cDNA Sonde (471 bp) hybridisiert. Parallel wurden unbehandelte Kontrollpflanzen analysiert (Kap. 2.10.13, 2.10.14 und 2.10.15).

Die Northern Blot Analysen zeigten, dass Ozon die LOX mRNA bei Tabak cv. Bel W3 ab 5 h zunehmend induzierte. Besonders stark war die Induktion zwischen 8 h und 12 h. Nach 12 h wurde das Maximum erreicht ($Q = 21,8$). Danach sank die Induktion wieder ab. In unbehandelten Kontrollpflanzen wurde keine LOX mRNA Induktion festgestellt (Abb. 33 A und B). An dieser Stelle wird auf die RT-PCR Analysen verwiesen, die gleiche Ergebnisse für ozonbehandelte Pflanzen ergaben, aber auch sichtbare LOX Transkripte in den Kontrollen zeigten (Kap.3.7.1, Abb. 29). Diese Diskrepanz wird damit begründet, dass die bei den Kontrollen vorliegende LOX Transkriptmengen mittels RT-PCR amplifiziert und dadurch nachweisbar wurden. Im Gegensatz dazu fiel bei den Northern Blot Analysen die gleiche LOX Transkriptmenge in den Kontrollen möglicherweise unter die sichtbare Nachweisgrenze.

Bei der ozonunempfindlichen Tabak Varietät Bel B konnte eine schwache Induktion der LOX mRNA zum Zeitpunkt 12 h nach Start der Ozonbehandlung nachgewiesen werden ($Q = 4,4$), obwohl die Blätter keinen sichtbaren Zelltod zeigten. Unbehandelte Kontrollpflanzen zeigten keine LOX mRNA Akkumulation (Abb. 33 A und B, Abb. 17).

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die ozoninduzierte transiente LOX mRNA Expression in Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) SA abhängig ist. Denn Studien von Pasqualini et al. (2002) hatten ergeben, dass der Gehalt an freier Salicylsäure nach Ozonexposition in Tabak cv. Bel W3 in der Konzentration höher und im zeitlichen Auftreten deutlich verändert war gegenüber der ozonunempfindlichen Varietät Bel B. Zudem konnte in Gerste (*Hordeum vulgare*) die Induktion der LOX durch Salicylsäure (SA) ausgelöst werden (Hause et al., 1999).

A)



B)

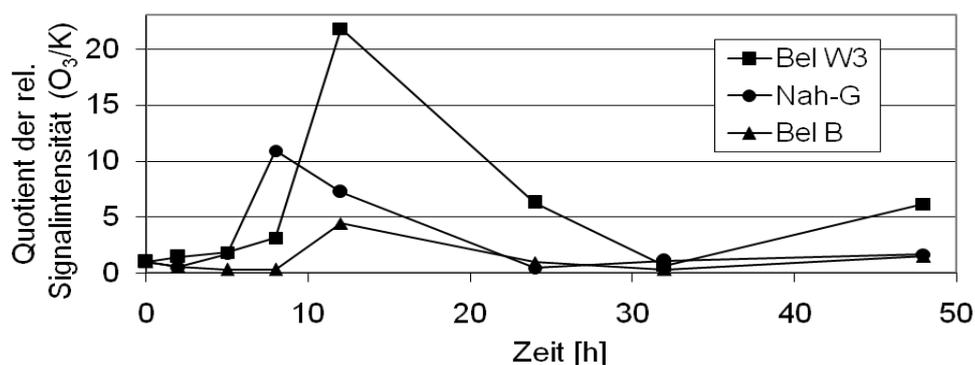


Abb. 33 Nachweis ozoninduzierter LOX mRNA in ozonbehandelten oder unbehandelten Tabakpflanzen cv. Bel W3, cv. Nah-G und cv. Bel B mittels Northern Blot Analyse. A) Nach Start der Ozonexposition (5 h, 150 ppb O_3) und Weiterkultivierung in ozonfreier Luft wurden mittelalte Blätter (Nr. 3) zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Aus der hieraus isolierten Gesamt-RNA wurden pro Spur 15 μ g aufgetragen. Mit unbehandelten Kontrollen wurde entsprechend verfahren. Die Hybridisierung erfolgte mit einer digoxigeninmarkierten LOX cDNA-Sonde (471 bp). Zur Kontrolle der Gleichbeladung des Gels wurde nach Entfernen der LOX Sonde mit 18 S rRNA (312 bp) nachhybridisiert (Kap.2.10.12 und 2.10.19). B) Die relativen LOX Hybridisierungssignale wurden computergestützt aufgenommen (AIDA2.0) und der Quotient der rel. Hybridisierungssignale aus Ozon/Kontrolle pro Zeitpunkt dargestellt.

Für diese Untersuchung wurden Tabak Nah-G Pflanzen, die das bakterielle Salicylat Hydroxylase Gen exprimieren und somit kontinuierlich Salicylsäure abbauen (Delaney et al., 1994), verwandt. Behandlung, Erntezeitpunkte und Northern Blot Analysen wurden analog zu Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B durchgeführt.

In den transgenen cv. Nah-G Tabakpflanzen, die deutliche Nekrosen entwickelten (Abb. 17), wurde die ozoninduzierte Akkumulation von LOX mRNA zwischen 5 h und 12 h nachgewiesen, mit einem Maximum nach 8 h (Q = 10,9). Nach 24 h war keine LOX mRNA mehr nachweisbar. Unbehandelte Kontrollpflanzen zeigten keine LOX mRNA Induktion (Abb. 33 A und B).

3.11 Einfluss von Methyljasmonat, Verwundung und Wasserstoffperoxid auf die Induktion der Lipoxygenase und β -1, 3-Glucanase mRNA

Mit den in dieser Untersuchung durchgeführten Verwundungsexperimenten sollte ausgeschlossen werden, dass die ozoninduzierte LOX mRNA Akkumulation (Kap. 3.7.1, 3.8 und 3.10) eine reine Verwundungsreaktion, als mögliche Reaktion auf z. B. die Ernte des Blattmaterials, darstellt.

Weiterhin zeigte sich bei Betrachtung der zeitlichen Auflösung der ozoninduzierten LOX Transkripte in Tabak cv. Bel W3 (Kap.3.7.1 und 3.10), dass diese parallel zu dem von Schraudner et al. (1998) nachgewiesenem zweiten oxidativen Burst in Tabak cv. Bel W3 auftraten. Der Einfluss von H₂O₂ auf die Induktion der LOX sollte daher näher untersucht werden. Es wurde bei der Applikation von H₂O₂ eine Konzentration von 2 mM gewählt, da hierbei der Zelltod weniger als 5 % beträgt (Levine et al., 1994; Neill et al., 1999). Methyljasmonat diente in diesen Experimenten als Positivkontrolle, da in Tabakzellkulturen eine LOX Induktion durch exogene MeJa Applikation nachgewiesen wurde (Véronési et al., 1996). Darüber hinaus wurde basische β -1, 3- Glucanase als stressinduzierbares PR-Protein zur Überprüfung der Experimente verwandt.

Aufgrund der unterschiedlichen Ozoninduktion der LOX Transkripte in Tabak cv. Bel W3 und Tabak Nah-G, wurde die Wirkung von Salicylsäure als weiteres Phytohormon ebenfalls mittels Northern Blot Analysen untersucht. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine LOX mRNA Induktion durch exogene SA-Applikation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) (siehe Kap. 3.13).

Mittelalte Blätter (Nr. 3) von Tabak cv. Bel W3 wurden jeweils mit unterschiedlichen abiotischen Stressoren behandelt. Hierzu zählten die Verwundung mit der Pinzette

oder Nadel (Kap. 2.6.2), die Exposition mit exogenem Methyljasmonat (MeJa) (Kap. 2.6.3) und die Applikation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) über Injektion in den Blattapoplasten oder Aufnahme über den Blattstil (Kap. 2.6.4). Die Ernte erfolgte 12 h nach Start der Behandlungen, da dies der Zeitpunkt höchster LOX Transkriptakkumulation bei Ozonbehandlung (5 h 150 ppb) war (Abb. 33).

LOX mRNA wurde wie erwartet durch Methyljasmonat induziert, nicht aber durch Verwundung oder durch Wasserstoffperoxid (Abb. 34, LOX). In den Kontrollen waren keine LOX Transkripte festzustellen.



Abb. 34 Northern Blot Analyse der Lipoxygenase (LOX) und der basischen β -1,3-Glucanase (Glc) mRNA im Blattgewebe von Tabak cv. Bel W3 nach Applikation verschiedener Stressoren. A und B Exposition mit MeJa: A) Kontrolle (5 h, 0 μ M MeJa); B) 5 h 7,5 μ M MeJa; C-E Verwundung: C) Unverwundet; D) Perforation mit der Nadel; E) Verwundung mit der Pinzette; F-I Behandlung mit H_2O_2 : F) abgeschnittene Blätter in Wasser oder G) in 2 mM H_2O_2 . H) Infiltration mit Wasser oder I) mit 2 mM H_2O_2 in den Blatt Apoplasten. Alle Applikationen wurden mit mittelalten Blättern (Nr. 3) durchgeführt und 12 h nach Start des Experiments geerntet. Die genaue Durchführung der Behandlungen ist in Kap. 2.6.2, 2.6.3 und 2.6.4 dargestellt. Es wurden je 10 μ g gesamt RNA aufgetragen und mit einer DIG- LOX cDNA Sonde (471 bp) hybridisiert. Nach Entfernung der Sonde wurde erneut mit einer DIG-Glc cDNA Sonde (974 bp) und zur Kontrolle der Gleichbeladung des Gels erneut mit einer DIG-18S rRNA Sonde hybridisiert (Kap. 2.10.12 und 2.10.19).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch bei Verwundungsexperimenten mit Kartoffelblättern keine Induktion der 9-LOX mRNA (POTLX-3) nachgewiesen (Kolomiets et al., 2000). Ebenso wurde in *Nicotiana tabacum* L. die *Nt*LOX1 (9-LOX) nicht durch Verwundung induziert (Fammartino et al., 2007).

Die mRNA von basischer β -1,3-Glucanase konnte 12 h nach Start MeJa Behandlung und nach Applikation von 2 mM H_2O_2 , jedoch nur bei Applikation über

den Blattstil, im Blattgewebe von Tabak Bel W3 nachgewiesen werden (Abb. 34, Glc). Bei Kontrollblättern sowie Injektion von H_2O_2 in den Apoplasten bzw. Verwundung mit Pinzette oder Nadel, erfolgte keine basische Glucanase mRNA Akkumulation.

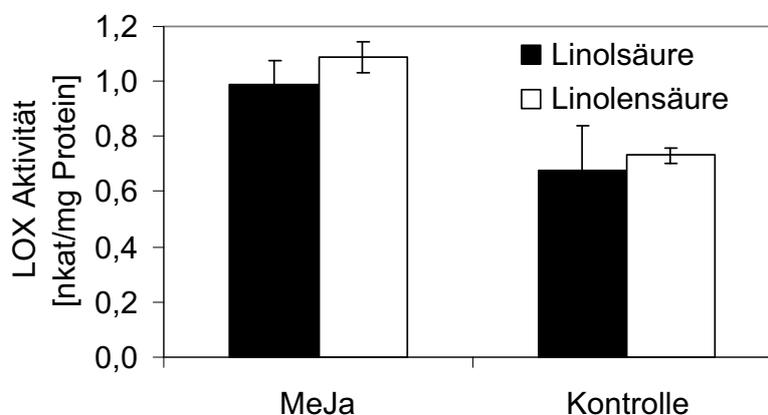
Eine makroskopische Schädigung der Blätter, die nicht von der Verwundung herrührte, war nach 12 h nicht feststellbar. Auch Marmey et al. (2007) fanden nach SA oder MeJa Behandlung bei 10 Tage alten Baumwollpflanzen keine HR ähnlichen Symptome.

3.11.1 Methyljasmonat induzierte Lipoxygenase Aktivität

Da bei den Methyljasmonat behandelten Blättern LOXs Transkripte nachzuweisen waren (Kap. 3.11), wurde aus den gleichen Proben auch die LOX Aktivität bestimmt. Die LOX Aktivität, gemessen im sauren pH Bereich von 5.0, wurde sowohl mit Linol- als auch mit Linolensäure als Substrat jeweils um das 1,5 fache gegenüber unbehandelten Kontrollen induziert. (Abb. 35, A).

Wesentlich stärker, um das 5,8 fache, induzierte Methyljasmonat die LOX Aktivität bei einem pH-Wert von 8.0 und mit Linolsäure als Substrat im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Bei pH 7.0 und Linolensäure wurde eine 4,2 fache Steigerung der LOX Aktivität gegenüber den unbehandelten Kontrollen nachgewiesen (Abb. 35, B).

A) pH 5.0



B) pH 7.0 bzw. pH 8.0

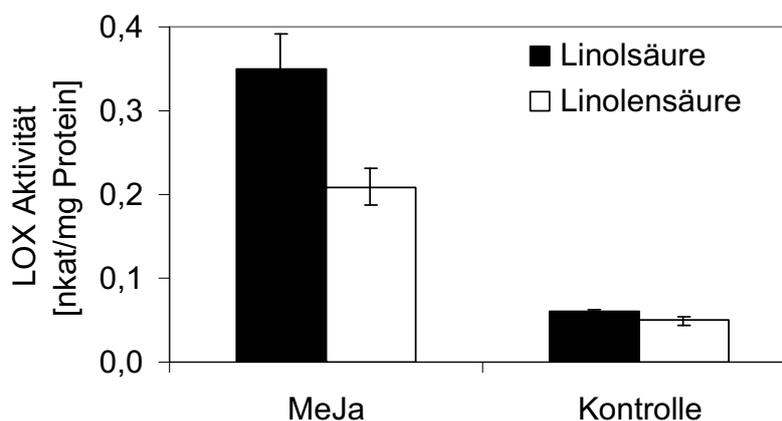


Abb. 35 Methyljasmonat induzierte Lipoxygenase Aktivität in mittelalten Tabak Blättern cv. Bel W3. Tabak Blätter (Nr. 3) wurden 5 h in einem Exsikkator mit Methyljasmonat ($7,5 \mu\text{M}$) bzw. die Kontrollen ohne MeJa behandelt und anschließend bis zur Ernte nach 12 h in Reinluft weiterkultiviert (Kap. 2.6.3). Die LOX Aktivitätsbestimmungen in den Rohextrakten erfolgten in A) Mit Linol- (■) und Linolensäure (□) bei pH 5.0 sowie in B) mit Linolsäure (■) bei pH 8.0 und mit Linolensäure (□) bei pH 7.0 wie in Kapitel 2.9.2.2 und 2.9.2.7 beschrieben. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen dar.

3.12 Zeitverlauf der ozoninduzierten LOX-Weg Enzyme HPL, EH, AOC, OPR und ADH sowie der Chn und Glc auf Transkriptebene bei Tabakpflanzen

Die durch ozoninduzierte LOXs (diese Arbeit) synthetisierten Lipidhydroperoxide bilden das Substrat für wenigstens sieben unterschiedliche Enzymfamilien (Abb. 4). In diesen Signalwegen erfolgt die Umsetzung der Hydroperoxide in spezifischen Reaktionen zu Signalsubstanzen wie flüchtigen Blattalkoholen, Jasmonaten und antimikrobiellen Verbindungen, um nur einige wichtige zu nennen (Kap. 1.6; Feussner und Wasternack, 2002; Liavonchanka und Feussner, 2006; Wasternack, 2007). Es wurde daher im folgenden untersucht, welchen Einfluss Ozon auf die mRNA Transkriptakkumulation der folgenden Enzyme des LOX-Signalweges wie Epoxidhydrolase (EH), 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR), Allenoxid-Cyclase (AOC), Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Hydroperoxid-Lyase (HPL) hat (Einleitung Kap. 1.6; Abb. 4).

Nach einem fünfstündigen Ozonpuls mit 150 ppb (Kap.2.6.1.3) wurden daher mittelalte Tabakblätter (Nr. 3) von je drei Pflanzen des ozonsensitiven Tabak cv. Bel W3, der ozontoleranten Varietät cv. Bel B und der transgenen Tabaklinie cv. xanthi.nc-Nah-G, die in ihrer Salicylsäure Akkumulation stark eingeschränkt ist, nach 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h und 48 h geerntet (Kap. 2.8). Ebenso wurde mit in Reinluft gehaltenen Kontrollen verfahren. Mit diesen Proben wurden Northern bzw. Dot Blot Analysen durchgeführt wobei die Erntezeitpunkte bei letzteren durch Probenahme nach 4 h, 6 h, 10 h, 18 h, 30 h und 36 h ergänzt wurden.

Als interne Kontrollen für die Ozonbehandlung dienten basische β -1,3-Glucanase und basische Chitinase, da von diesen PR-Proteinen bereits gezeigt wurde, dass es zu einer mRNA Akkumulation in Tabak nach Standard-Ozonbehandlung kommt (Ernst et al., 1992; Schraudner et al., 1992; Janzik et al., 2005).

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen sind im folgenden für Tabak cv. Bel W3 in Kapitel 3.12.1 und Abbildung Abb. 36, für Tabak cv. Bel B in Kapitel 3.12.2 und Abbildung Abb. 37 und für Tabak cv. xanthi.nc-Nah-G in Kapitel 3.12.3 und Abbildung Abb. 38 beschrieben.

3.12.1 *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3

Hydroperoxid-Lyase

Bei unbehandelten Tabakpflanzen wurde für die HPL eine konstitutive Expression der mRNA nachgewiesen. Hierbei war die Signalintensität besonders am späten

Nachmittag (16:00 Uhr) hoch, was den Zeitpunkten 8 h und 32 h entspricht. Nach Ozonexposition kam es zu einer Induktion nach 2 h danach fiel die Induktion ab. Eine erneute und besonders starke Ozoninduktion erfolgte ab 32 h wobei das Maximum bei 48 h erreicht wurde (Abb. 36, HPL).

Es ist anzunehmen, dass im HPL Stoffwechselweg die flüchtigen C₆- und C₉-Alkohole und -Aldehyde gebildet werden, von denen die kurzkettigen C₆- VOCs bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 detektiert wurden (Heiden, 1999a; Heiden et al., 1999b). Hierauf wird in der Diskussion (Kap. 4) näher eingegangen.

Epoxidhydrolase

Die Epoxidhydrolase mRNA wurde durch Ozon in Tabak cv. Bel W3 transient zwischen 5 h und 24 h induziert. In Kontrollpflanzen kam es zu keiner Expression der EH mRNA. Die maximale Induktion gegenüber den unbehandelten Kontrollen wurde zum Ende der Ozonexposition nach 5 h nachgewiesen. Anschließend sank die Induktion langsam ab, wobei sie zwischen 8 h und 12 h in etwa gleich stark war. Am nächsten Morgen (24 h) war die EH nur noch schwach induziert und ab 32 h nicht mehr nachweisbar (Abb. 36, EH).

Allenoxid-Cyclase

Die Untersuchungen ergaben, dass die Transkripte der AOC konstitutiv in allen Kontrollen akkumulierten. Unter Ozonstress wurde die AOC mRNA am deutlichsten zwischen 2 h - 24 h und 48 h induziert, wobei die stärkste Induktion nach 5 h nachgewiesen wurde, die danach langsam abnahm (Abb. 36, AOC).

12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase

Die OPR mRNA war in ersten Versuchen in allen Kontrollen schwach konstitutiv exprimiert wobei die Expression in den Morgenstunden (0 h, 24 h und 48 h) jeweils am stärksten war. Ozonbehandlung hatte eine starke Induktion der OPR mRNA zwischen 5 h und 12 h mit einem Maximum nach 8 h zur Folge (Abb. 36, OPR).

Basische Chitinase

Für Chn wurden in den Kontrollen keine mRNA Hybridisierungssignale beobachtet. Durch Ozon wurde Chn ab 2 h induziert. Die stärkste Induktion wurde nach 12 h und 24 h nachgewiesen (Abb. 36, Chn).

Basische β -1,3-Glucanase

Für Glc wurden keine Transkripte in unbehandelten Kontrollen nachgewiesen. Nach Ozonexposition wurde die Glc mRNA Expression ab 5 h bis zu Versuchsende nach 48 h induziert. Die stärkste Induktion wurde nach 12 h und 24 h nachgewiesen (Abb. 36, Glc).

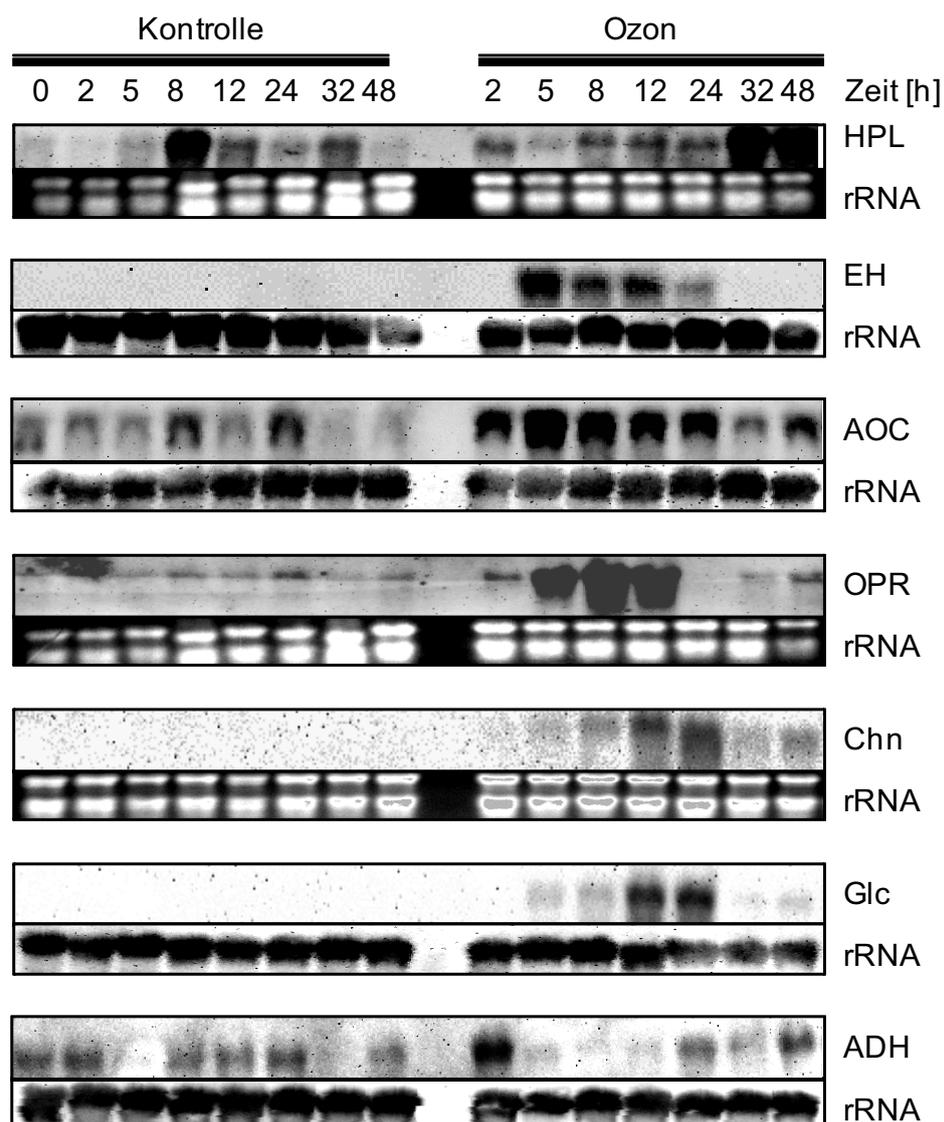


Abb. 36 Northern Blot Analysen von EH, OPR, ADH, AOC, HPL, Glc und Chn in Tabak cv. Bel W3 mit und ohne Ozonbehandlung (5 h 150 ppb). Aus Blattproben (Nr. 3) wurden nach den angegebenen Zeitpunkten, nach einer fünfstündigen Ozonexposition (150 ppb) und Weiterkultivierung in ozonfreier Luft die gesamt RNA isoliert. Mit unbehandelten Kontrollen wurde entsprechend verfahren. Die Hybridisierung mit Digoxigeninmarkierten cDNA-Sonden erfolgte mit: EH) Epoxidhydrolase, OPR) 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase, ADH) Alkohol-Dehydrogenase, AOC) Allenoxidzyklase, HPL) Hydroperoxid-Lyase, Chn) basische Chitinase, Glc) basische β -1,3-Glucanase. Die RNA Beladungsmenge (rRNA) wurde entweder durch erneutes hybridisieren mit einer 18 S DIG-cDNA Sonde oder durch die rRNA Banden im Ethidiumbromid-gefärbten Gel (invers dargestellt) sichtbar. Pro Spur wurden 15 μ g gesamt RNA aufgetragen (Kap.2.10.12 und 2.10.19).

Alkohol-Dehydrogenase

Die erste Untersuchung ergab für die ADH mRNA eine konstitutive Transkriptakkumulation bei Kontrollpflanzen. Ozon induzierte die ADH Transkripte nach 2 h und nach 48 h (Abb. 36, ADH).

3.12.2 *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel B

Hydroperoxid-Lyase

Die HPL mRNA Transkripte zeigten im Zeitverlauf bei den Kontrollen eine konstitutive Expression. Hierbei waren die Signalintensitäten nach 8 h und 32 h besonders ausgeprägt. Durch Ozon wurde die HPL mRNA leicht nach 8 h und stärker zum Zeitpunkt 32 h induziert (Abb. 37, HPL).

Epoxidhydrolase

In Kontrollpflanzen der ozontoleranten Tabak Varietät cv. Bel B kam es zu keiner EH mRNA Akkumulation. Im Gegensatz dazu induzierte Ozon die EH mRNA Expression transient zwischen 5 h und 24 h. Hierbei nahm die Expression der EH mRNA ab 5 h zu und erreichte die stärkste Induktion mit einem deutlichen Maximum nach 12 h. Nach 24 h konnte nur noch eine schwache Expression detektiert werden (Abb. 37, EH).

Allenoxid-Cyclase

Bei der AOC kam es auch in den Kontrollen zu einer deutlichen konstitutiven mRNA Akkumulation. Der Einfluß von Ozon auf die AOC mRNA Induktion war gering und zeigte nur nach 32 h und 48 h eine Zunahme (Abb. 37, AOC).

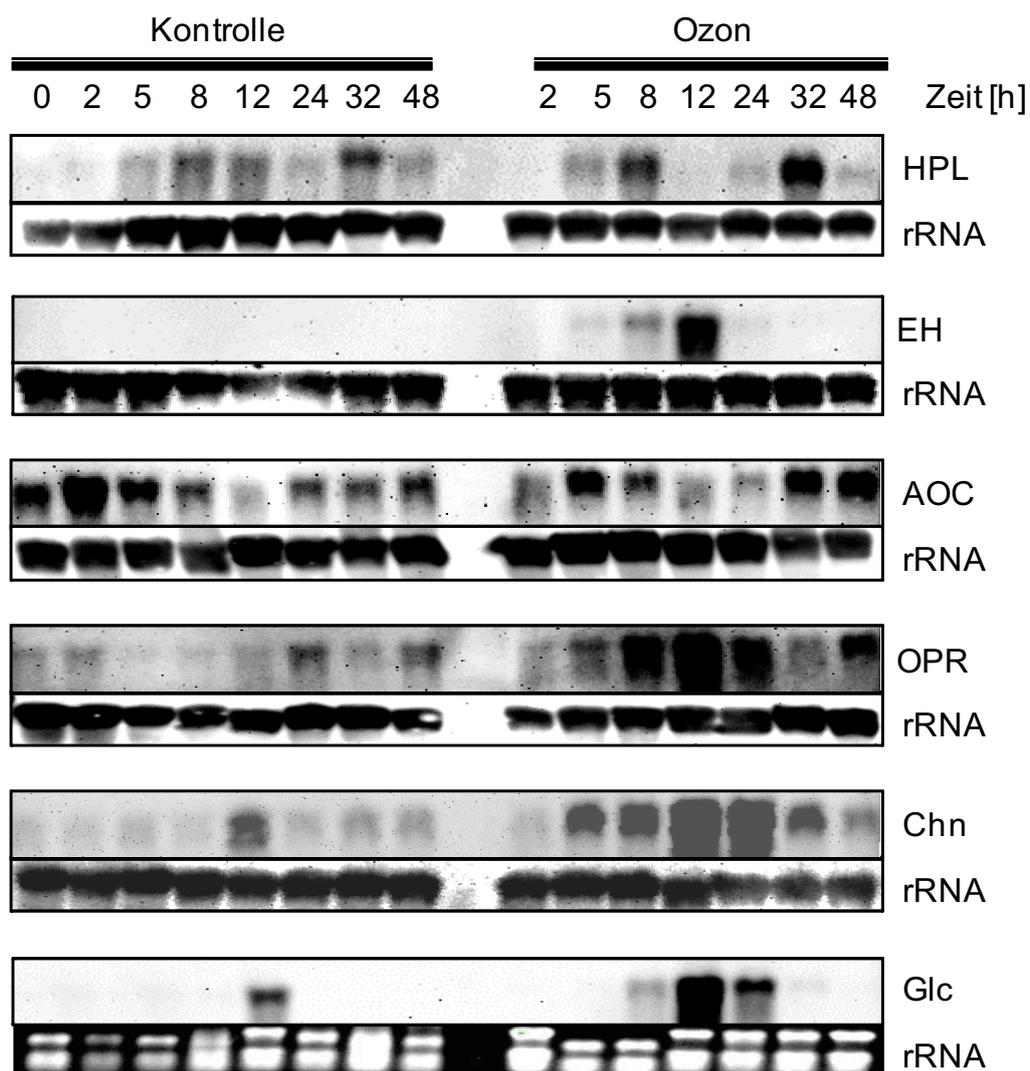
12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase

Die OPR mRNA zeigte eine geringe konstitutive Akkumulation in den Kontrollen, wobei einem Tagesgang folgend zu Beginn, nach 24 h und 48 h die stärkste Expression zu erkennen war. Ozon induzierte die OPR Transkripte ab 2 h. Die stärkste Ozoninduktion wurde zwischen 8 h und 24 h nachgewiesen, mit einem deutlichen Maximum nach 12 h (Abb. 37, OPR).

Basische Chitinase

Die Chn mRNA war in den Kontrollen konstitutiv exprimiert. Eine Ozoninduktion der Chn mRNA erfolgte ab 2 h. Die stärkste Induktion wurde zwischen 5 h und 32 h nachgewiesen, wobei das Maximum deutlich bei 12 h und 24 h lag (Abb. 37, Chn).

A)



B)

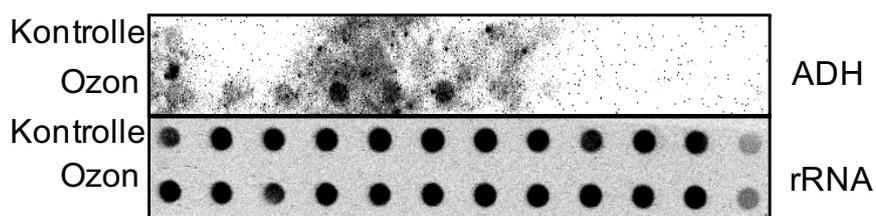


Abb. 37 Northern Blot Analysen von EH, OPR, AOC, HPL, Glc und Chn in Tabak cv. Bel B mit und ohne Ozonbehandlung (5 h 150 ppb). Die Legende von A) entspricht der in Abb. 36. B) zeigt einen Dot Blot, der analog zu A) mit einer DIG markierten ADH cDNA Sonde hybridisiert wurde (Kap. 2.10.12 und 2.10.20). Pro Dot wurden 2 μ g gesamt RNA aufgetragen.

Basische β -1,3-Glucanase

Glucanase zeigte in den Kontrollen nach 8 h eine Induktion der mRNA. Ozon induzierte die Glc Transkriptexpression am deutlichsten zwischen 8 h und 24 h. Hierbei war die stärkste Ozoninduktion nach 12 h nachweisbar (Abb. 37, Glc).

Alkohol-Dehydrogenase

Eine erste Analyse der ADH Genexpression mittels Dot Blot, ergab eine schwache Induktion der mRNA durch Ozon zwischen 2 h und 12 h, wobei die Induktion am stärksten zwischen 6 h und 10 h war (Abb. 37, ADH).

3.12.3 *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi.nc-Nah-G

Hydroperoxid-Lyase

Die HPL Transkripte waren in den Kontrollen konstitutiv exprimiert. Nach 2 h und 5 h war eine schwache Induktion zu erkennen. Ab 8 h wurde eine höhere Signalintensität bei den Kontrollen nachgewiesen, als bei den ozonbehandelten Pflanzen (Abb. 38, HPL).

Epoxidhydrolase

In Experimenten mit Tabak Nah-G konnten ausschließlich in ozonbehandelten Pflanzen EH mRNA Transkripte nachgewiesen werden. Die EH mRNA Expression wurde nach Ozonexposition transient zwischen 5 h und 24 h induziert. Besonders stark induziert wurde sie ab 5 h zunehmend wobei das Maximum nach 12 h erreicht wurde. Am nächsten Morgen (24 h) waren die ozoninduzierten EH mRNA Transkripte nur noch schwach nachzuweisen (Abb. 38, EH).

Allenoxid-Cyclase

Die Analysen der AOC mRNA Transkripte ergaben eine konstitutive Expression in den Kontrollpflanzen. Ozon induzierte die AOC mRNA deutlich nach 5 h. Nach 8 h und 12 h war noch eine schwache Induktion festzustellen, die danach abnahm (Abb. 38, AOC).

12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase

Hybridisierungssignale der OPR mRNA waren nur in ozonexponierten Nah-G Pflanzen nachzuweisen. Die ausgeprägteste Induktion der OPR mRNA erfolgte transient zwischen 5 h und 24 h mit einem Maximum nach 12 h. Danach sank sie wieder stark ab (32 h) und stieg nach 48 h nochmals leicht an (Abb. 38, OPR).

Basische Chitinase

Chn zeigte in unbehandelten Tabakpflanzen eine konstitutive Expression der mRNA. Es kam nach Ozonexposition zu einer starken Induktion der Chn mRNA Transkripte zwischen 8 h und 24 h mit einem deutlichen Maximum nach 12 h (Abb. 38, Chn).

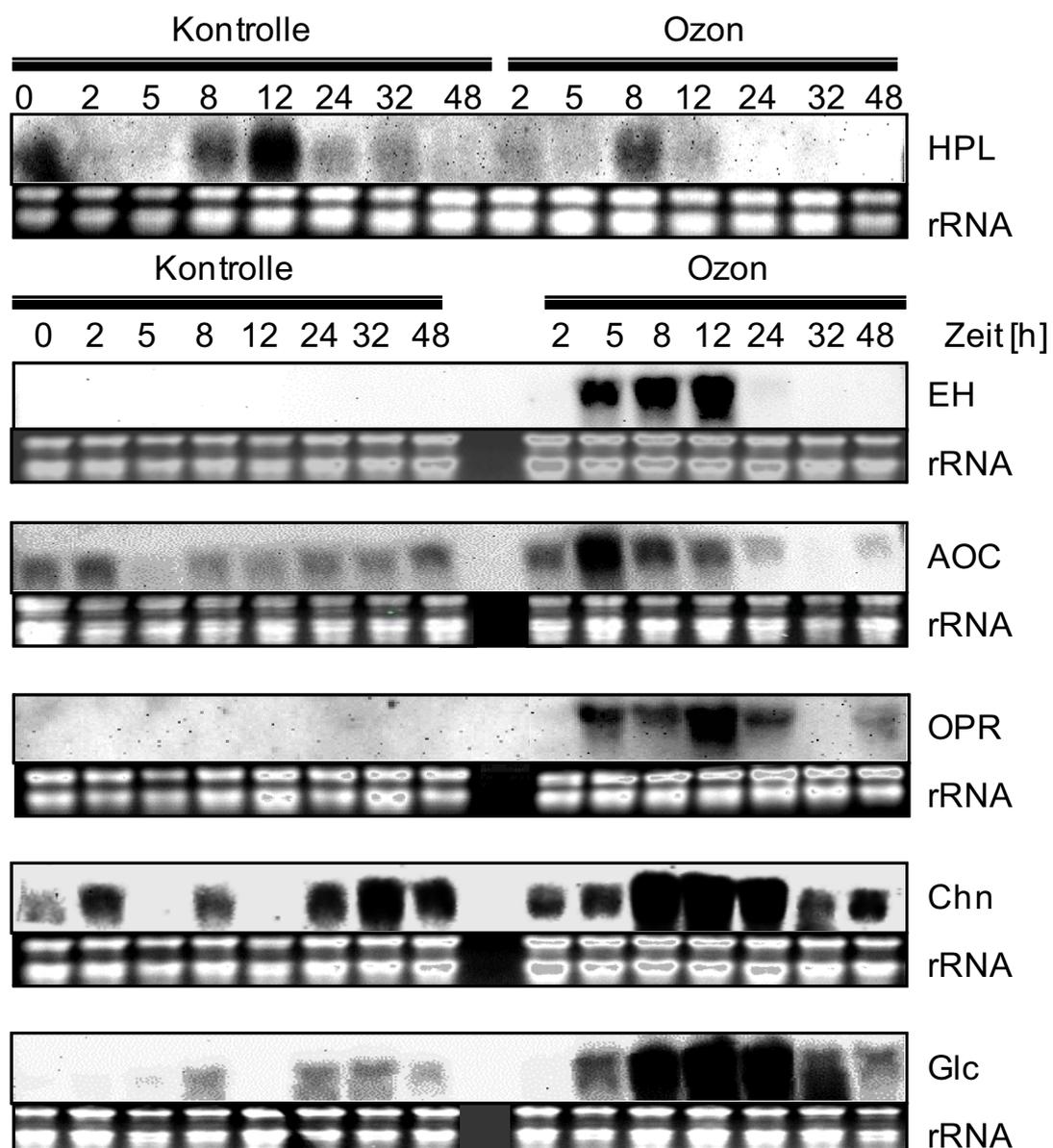


Abb. 38 Northern Blot Analysen von EH, OPR, AOC, HPL, Glc und Chn in Tabak cv. xanthi.nc-Nah-G mit und ohne Ozonbehandlung (5 h 150 ppb). Die Legende entspricht der in Abb. 36.

Basische β -1,3-Glucanase

In unbehandelten Kontrollen konnte eine schwache Expression der Glc mRNA zu allen Zeitpunkten beobachtet werden. Ozonexposition führte zu einer Induktion der

Glc Transkriptakkumulation ab 5 h wobei es zu einer besonders starken Induktion zwischen 8 h und 24 h kam, mit einem Maximum nach 12 h (Abb. 38, Glc).

3.13 Bestimmung des endogenen Jasmonsäure- und Salicylsäuregehalts in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3

Jasmonsäure

In den bisher dargestellten Analysen wurde bereits die zeitabhängige mRNA Induktion von LOX, AOC und OPR, beides Enzyme des AOS Weges, in ozonbehand-

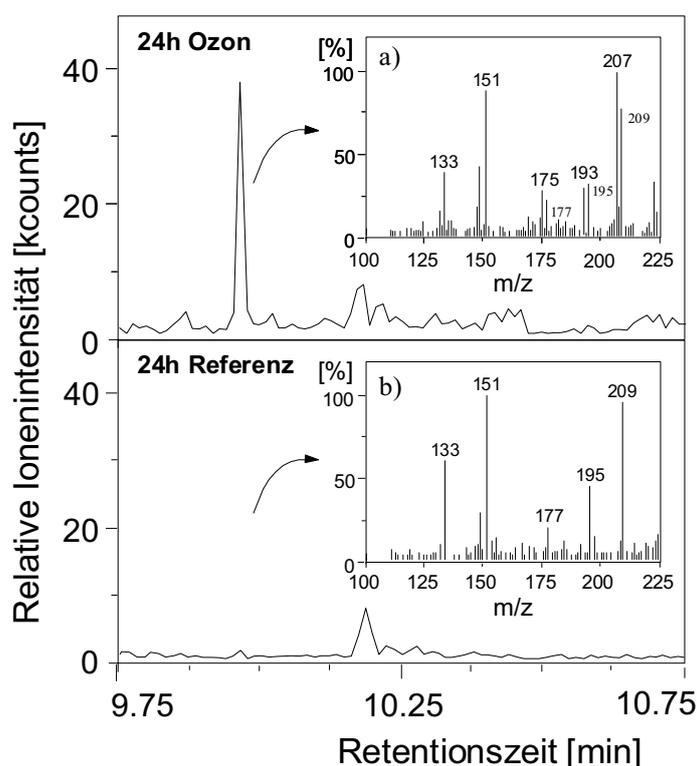


Abb. 39 GC-MS Analyse der endogenen freien Jasmonsäure in *N. tabacum* L. cv. Bel W3 mit und ohne Ozonbehandlung. Dargestellt ist die Analyse zum Zeitpunkt 24 h nach Start der Ozonbehandlung (5 h 150 ppb Ozon) und Weiterkultivierung in ozonfreier Luft bzw. unbehandelter Referenzpflanzen. Die Peaks bei m/z: 177, 195, und 209 stellen die Isotopenpeaks des internen ^{13}C -JA Standard dar.

deltem Tabak cv. Bel W3 gezeigt (Kap. 3.7.1, 3.10 und 3.12.1). Die Jasmonsäure stellt das Endprodukt des AOS Signalweges dar und kann zu weiteren Metaboliten u. a. glykosyliert oder zu flüchtigem Methyljasmonat (MeJa) methyliert werden (Kap. 1.7.5; Sembdner und Parthier, 1993; Wasternack, 2007). Dass Methyljasmonat

selbst in der Lage ist LOX zu induzieren, konnte darüber hinaus in dieser Arbeit gezeigt werden (Kap. 3.11).

Mittels GC-MS sollte daher untersucht werden, ob und wenn ja in welcher zeitlichen Auflösung es zu einer endogenen Jasmonsäure Akkumulation in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 kommt.

In Abb. 39 ist das typische Fragmentierungsmuster des Methyljasmonats zu erkennen (Fragmente mit $m/z = 133, 151, 175, 193$ und 207). Die zur Quantifizierung herangezogenen Isotopenpeaks des internen Standards wurden bei $m/z = 177, 195$ und 209 detektiert. Quantifiziert wurde anhand der Peaks bei $m/z = 207$ bzw. 209 .

Tab. 7 Gehalt endogener freier Jasmonsäure in Tabak cv. Bel W3 mit und ohne Ozonbehandlung. Nach 5 h 150 ppb Ozon wurden die Pflanzen in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Start der Ozonbehandlung erfolgte die JA Analyse mittels GC-MS. Unbehandelte Kontrollen wurden entsprechend behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit zwei Parallelproben und ihren Standardabweichungen. (n. d. = nicht detektierbar).

Zeit [h]	endogener Jasmonsäuregehalt [pmol/g FG]		
	Kontrolle	Ozon	Stabwn
0	n. d.	n. d.	-
2	n. d.	n. d.	-
5	n. d.	n. d.	-
8	n. d.	n. d.	-
12	n. d.	n. d.	-
24	n. d.	62,8	12,6
28	n. d.	n. d.	-
32	n. d.	n. d.	-
48	n. d.	n. d.	-

Die Nachweisgrenze für endogene Jasmonsäure lag bei 20 pmol/g Frischgewicht. Um die Zeitabhängigkeit der JA-Akkumulation in *N. tabacum* L. cv. Bel W3 zu bestimmen, wurden die Pflanzen 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt (Kap.2.6.1.3) und die Blätter zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 28 h, 32 h und 48 h nach Start der Behandlung geerntet (Kap. 2.8). Anschließend erfolgte die Bestimmung des endogenen Jasmonsäuregehalts mittels GC-MS (Kap. 2.13). Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tab. 7 angegeben. Es konnte lediglich 24 h

nach Start der Ozonbehandlung eine signifikante Akkumulation freier JA nachgewiesen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten erfolgte keine ozoninduzierte JA Akkumulation oder lag der Gehalt der freien JA unterhalb des Detektionslimits.

Salicylsäure

Salicylsäure spielt eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Pathogenabwehr (Durner et al., 1997) und den Reaktionen auf abiotischen Stress wie UV und Ozon (Yalpani et al., 1994). In dieser Arbeit wurde in Kap. 3.10 ein Unterschied in der ozoninduzierten LOX Transkriptaktivierung zwischen Tabak cv. Bel W3, der SA akkumulieren kann und Tabak cv. Nah-G, der in der Fähigkeit SA zu akkumulieren beeinträchtigt ist, gezeigt. Es sollte daher untersucht werden, ob und in welcher zeitlichen Auflösung freie SA nach Ozonbehandlung in Tabak cv. Bel W3 auftritt. Hierzu wurde freie Salicylsäure mittels GC-MS aus den oben beschriebenen Proben für die JA Analyse mitbestimmt. Eine absolute Quantifizierung konnte wegen eines fehlenden isotonenmarkierten internen Standards nicht durchgeführt werden. Es sind daher nur relative Salicylsäuregehalte, bezogen auf die höchste gemessene Konzentration (100 %) angegeben (Abb. 40).

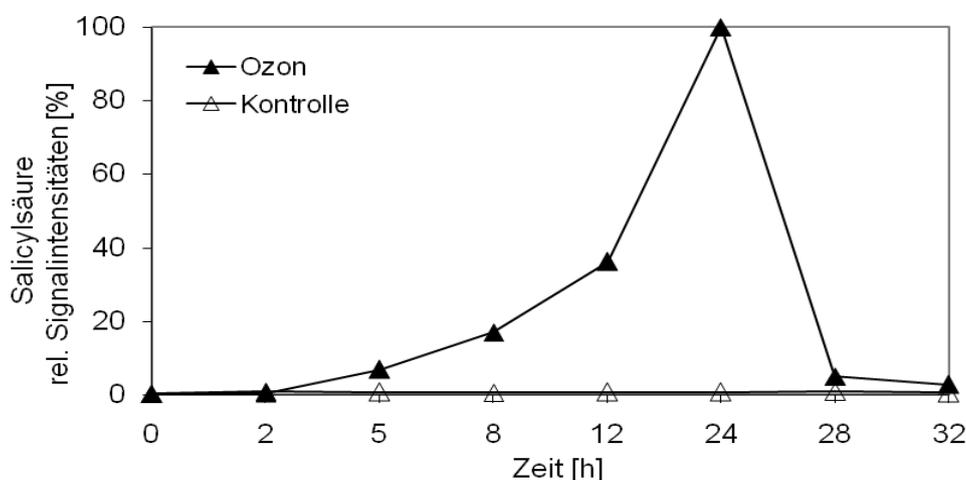


Abb. 40 Gehalt an endogener freier Salicylsäure in Tabak cv. Bel W3 nach Ozonbehandlung. Die Pflanzen wurden 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Kontrollpflanzen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten. Mittelalte Blätter (Nr. 3) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und der SA Gehalt mittels GC-MS bestimmt. Die Mittelwerte der rel. Signalintensitäten aus zwei unabhängigen Ansätzen wurden in Prozent zum höchsten Salicylsäuregehalt (100 %) dargestellt.

Zum Zeitpunkt 5 h nach Start der Ozonbehandlung begann die SA zu akkumulieren (7 %). Bei Weiterkultivierung in ozonfreier Luft stieg der SA Gehalt weiter stark an und erreichte nach 12 h bereits die 5,1 fache Menge. Das Maximum (100 %) wurde nach 24 h erreicht. Innerhalb der nächsten vier Stunden fiel der SA Gehalt auffällig stark ab und betrug nach 28 h nur noch 5 %. In Kontrollpflanzen wurde keine SA nachgewiesen (Abb. 40).

Aufgrund der erzielten Daten wurde ein erster Vorversuch unternommen, die direkte Wirkung von SA auf die LOX mRNA Induktion zu testen. Hierzu wurden Northern Blot Analysen von in 2 mM SA Lösung gestellten und nach den gleichen Zeiten wie die SA-Bestimmung geernteten Tabak cv. Bel W3 Blättern durchgeführt. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine LOX mRNA Induktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch in Tabakzellkultur wurde nach SA Behandlung (12 h, 100 μ M SA) keine LOX mRNA induziert (Véronési et al., 1996). Auf die möglichen Gründe für die ausbleibende Induktion der Tabak LOX mRNA durch SA wird in Kap. 4.8 nochmals eingegangen.

3.14 Ozoninduktion reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Burst)

In den vorigen Kapiteln wurde die Induktion der LOX durch Ozon in Tabak cv. Bel W3 nachgewiesen, die enzymatisch Lipide peroxidieren kann. Studien von Schraudner et al. (1998) und Pasqualini et al. (2003) konnten darüber hinaus zeigen, dass Ozon (5 h, 150 μ g O₃) bei ozonsensitiven Pflanzen wie Tabak cv. Bel W3 einen biphasischen oxidativen Burst (H₂O₂) im Apoplasten induziert, der Ähnlichkeit zeigte mit dem während einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion. Einem frühen (3 h) schwächerem H₂O₂ Burst folgte ein stärkerer nach 8 h (Schraudner et al., 1998) bzw. 12 h (Pasqualini et al., 2003). Die während des oxidativen Burst gebildeten ROS sind in der Lage ungesättigte Fettsäuren auf nicht-enzymatischem Wege zu Hydroperoxyfettsäuren (LOOHs) zu peroxidieren (Kap. 1.5.1). H₂O₂ kann zwar nicht direkt die Peroxidation der Lipide einleiten, wohl aber die OH-Radikale, die möglicherweise aus H₂O₂ über die Fenton-Reaktion gebildet werden (Tab. 1; Elstner, 1990). So wurde eine biphasische nicht-enzymatische Bildung von Hydroperoxyfettsäuren während einer inkompatiblen Interaktion in mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infizierten *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn Col-0, in Form reduzierter Hydroxyfettsäuren (12OH-/16OH-FS), nachgewiesen (Grun et al., 2007). Die 12OH-/16OH-Fettsäuren gelten als Marker

für eine nicht-enzymatische Bildung, da diese nicht durch LOX gebildet werden (Berger et al., 2001). Die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren (LOOHs) können wiederum als Substrat für weitere Enzyme des LOX-Wegs fungieren (Kap. 1.7). ROS können darüber hinaus auch zu einer Induktion der LOX führen. Dies wurde von Maccarrone et al. (2000) für H_2O_2 in den Protoplasten von Linsenwurzeln gezeigt. In dieser Arbeit konnte dies jedoch mittels ersten Northern Blot Analysen nicht bestätigt werden, da H_2O_2 nicht zu einer Expression der LOX Gene nach 12 h in Tabak cv. Bel W3 führte (Kap. 3.11). Hierbei scheint jedoch die H_2O_2 Konzentration von Bedeutung zu sein, auf die in Kap. 4.3 eingegangen wird.

Mit diesen Versuchen sollte daher analysiert werden, ob die ozoninduzierte LOX Genexpression und -Aktivität bei dem nekrosenbildenden Tabak cv. Bel W3 (Kap.3.1, Abb. 17; Kap. 3.10), begleitet war von einer ROS Induktion.

3.14.1 Histochemische Lokalisation von H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ in ozonbehandelten *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3

Nach Start Ozonbehandlung mit 150 ppb Ozon (5 h) wurden nach 0 h, 3 h, 8 h und 24 h die Blattspitze von je 3 mittelalten Blättern (Nr. 3) gleicher Behandlung abgetrennt und eine Hälfte mit NBT und die andere Hälfte mit DAB infiltriert. Die Blattspitze wurde gewählt, da hier nach Ozonbehandlung verstärkt Nekrosen auftraten (Kap. 3.1, Abb. 17). Ebenso wurde mit unbehandelten Kontrollen verfahren (Kap. 2.11).

Das Ergebnis dargestellt in Abb. 41 zeigt, dass zu Beginn der Behandlung (nicht abgebildet) sowie in allen unbehandelten Tabak cv. Bel W3 (K) keine Akkumulation von H_2O_2 mittels DAB Färbung (Kap. 2.11.1) nachgewiesen werden konnte.

3 h nach Start der Ozonbehandlung wurde nur eine vereinzelte schwache H_2O_2 Ansammlung detektiert, wohingegen 8 h nach Start der Ozonbehandlung eine stärkere H_2O_2 Ansammlung als unregelmäßig geformte, intensiv dunkelbraune Flecken nachgewiesen werden konnte (Abb. 41). Diese traten in den Bereichen auf, wo auch Nekrosen bonitiert wurden (Abb. 17). Das Auftreten eines schwachen H_2O_2 Burst, 3 h nach Start Ozonbehandlung sowie eines stärkeren nach 8 h, deckt sich somit mit den Ergebnissen von Schraudner et al. (1998). Nach 24 h waren die ozoninduzierten Nekrosen bereits vollständig ausgebildet (Abb. 17). Die zu diesem Zeitpunkt DAB-gefärbten Blattspitzen zeigten lediglich an den Rändern der Nekrosen eine Braunfärbung (Abb. 41).

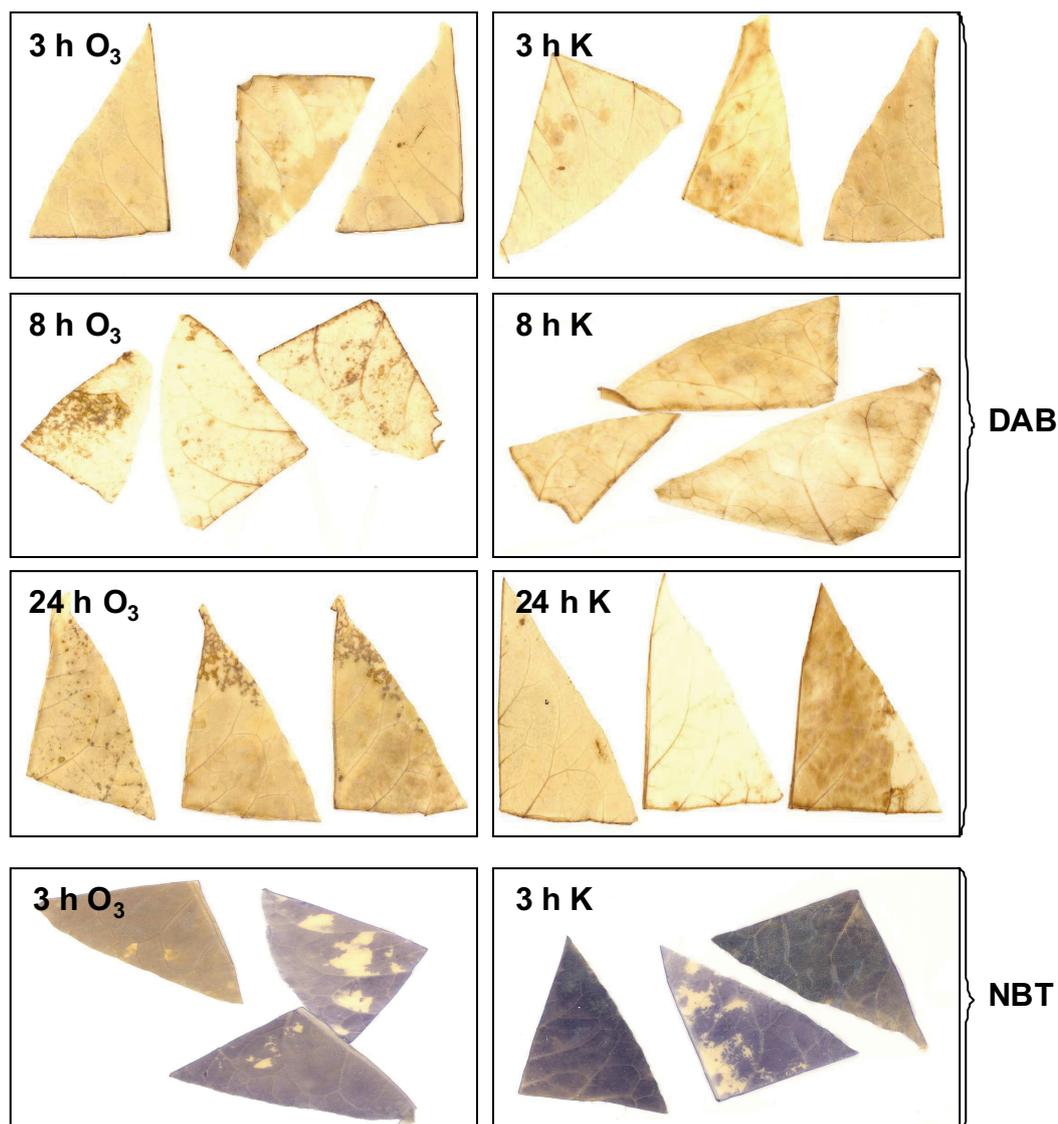


Abb. 41 Histochemischer Nachweis von H_2O_2 und $\text{O}_2^{*\cdot}$ in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3. Die Pflanzen wurden 5 h mit 150 ppb Ozon behandelt und anschließend in Reinluft weiterkultiviert. Kontrollen wurden ausschließlich in Reinluft gehalten. Die Blattspitzen von je drei ozonbehandelten Pflanzen (O_3) bzw. Kontrollen (K) wurden nach 3 h, 8 h und 24 h mit DAB gefärbt. Die NBT Färbung ist exemplarisch für den Zeitpunkt 3 h ozonbehandelte (O_3) oder unbehandelte Pflanzen (K) dargestellt.

Die Akkumulation von $\text{O}_2^{*\cdot}$ wurde mittels NBT untersucht (Doke und Ohashi, 1988; Jabs et al., 1996). Hierbei wurde eine diffuse Blaufärbung der Blätter sowohl bei ozonbehandelten wie auch bei unbehandelten Pflanzen beobachtet. Diese trat bei allen untersuchten Zeitpunkten auf, so dass keine signifikanten Unterschiede

festzustellen waren. Ein typisches Ergebnis ist in Abb. 41 repräsentativ für den Zeitpunkt 3 h nach Start der Ozonbehandlung bzw. für die Kontrolle dargestellt.

3.15 Induktion der β -Glukuronidase Aktivität unter der Kontrolle von LOX2- oder Bgl2-Promotoren in *A. thaliana* durch Ozon oder Methyljasmonat

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die Induktion der LOX durch Ozon oder Methyljasmonat in Tabak. Hierbei wurde auch die Existenz möglicher Isozyme nachgewiesen, die jedoch keinem bestimmten Zellkompartiment zugeordnet werden konnten.

Mit der transgenen *Arabidopsis thaliana* LOX2, die ein Lipoxygenase-GUS/FLUC Fusionsgen enthält (Jensen et al., 2002), wurde hier ein System verwandt mit dem nun gezielt der Einfluss von Ozon oder Methyljasmonat auf die im Chloroplasten lokalisierte Lipoxygenase histochemisch sichtbar gemacht werden konnte. Zur Unterstützung der histochemischen Lokalisation der β -Glukuronidase (GUS) Expression unter dem LOX2 Promotor und um den Zeitverlauf zu verifizieren, wurden zusätzlich spektrofluorometrische GUS Aktivitäts Messungen vorgenommen. Die ozoninduzierte Abwehr wurde wie zuvor bei Tabak (diese Arbeit Kap. 3.12; Schraudner et al., 1992) mit dem Markergen Glucanase verfolgt. Hierfür wurde die ozoninduzierte β -Glukuronidase Expression unter dem β -1, 3-Glucanase Promotor bei transgenen *Arabidopsis thaliana* Bgl2/GUS (Cao et al., 1994) histochemisch analysiert.

Zunächst wurden vergleichende Bonituren nach Ozonbehandlung bei den transgenen Pflanzen *A. thaliana* LOX2 bzw. -Bgl2 und dem Wildtyp *A. thaliana* Col-0 durchgeführt.

3.15.1 Entwicklung der Nekrosen bei ozonbehandelten *A. thaliana* Varietäten

Nach einer Behandlung mit 300 ppb Ozon für 8 h wurde der Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Col-0 sowie die transgenen Pflanzen, *Arabidopsis thaliana* LOX2 und -Bgl2 in ozonfreier Luft weiterkultiviert, nach 24 h bonitiert und fotografiert (Abb. 42). Ebenso wurde mit den Kontrollpflanzen verfahren, die über den gesamten Zeitraum in ozonfreier Luft gehalten wurden.

Der in der Literatur als ozonunempfindlich beschriebene Wildtyp Columbia (Col-0) (Sharma und Davis, 1997), der auch den Hintergrund der transgenen *A. thaliana* LOX2 und -Bgl2 darstellt, wies nach 24 h Ozonexposition mit 300 ppb geringe Blattschäden auf. Diese waren als sehr kleine punktförmige Nekrosen über die

Blattspreite verteilt und entlang der Leitbündel zu erkennen (Abb. 42). Die Kontrollen waren symptomfrei (Abb. 42). Diese Symptome der Blattschädigung wurden auch bei *Arabidopsis thaliana* LOX2 und -Bgl2 beobachtet (Abb. 42). Die Kontrollen waren auch hier symptomfrei (Abb. 42).

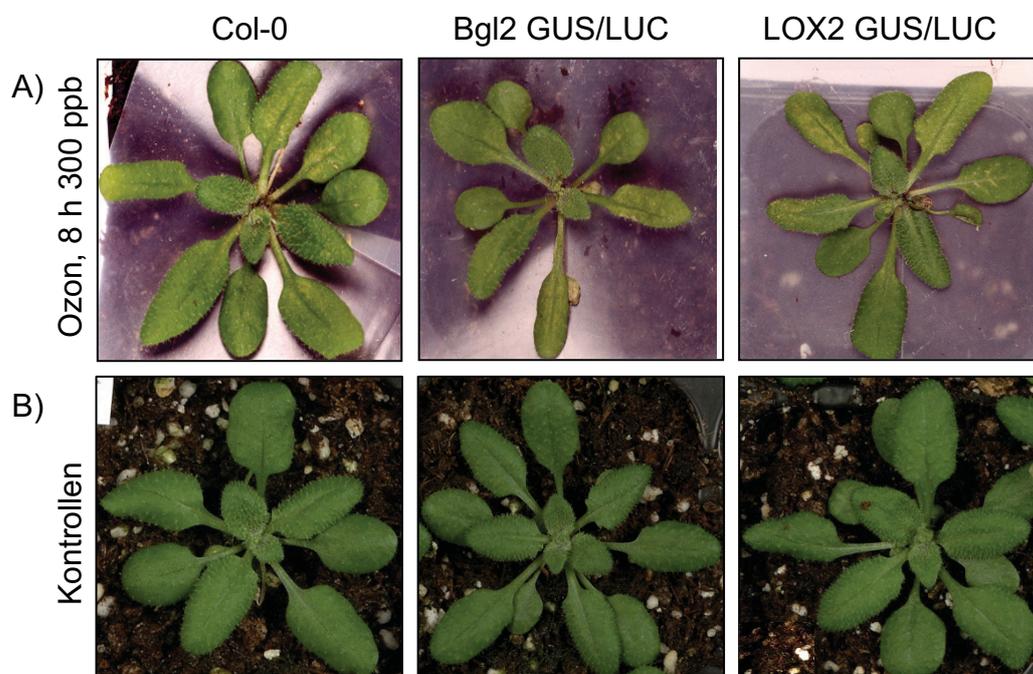


Abb. 42 Schadbild von *Arabidopsis thaliana* Col-0 sowie den transgenen *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC und *Arabidopsis thaliana* Bgl2/GUS. Die Aufnahme entstand 24 h nach A) achtstündiger Ozonexposition mit 300 ppb und anschließender Weiterkultivierung in ozonfreier Luft und B) von 24 h in Reinluft gehaltenen Kontrollpflanzen.

Die Blattschäden der drei unterschiedlichen *A. thaliana* Pflanzen wurden computergestützt als Prozent Schäden zur Gesamtblattfläche berechnet (Kap. 2.7) und sind in Abb. 43 dargestellt. Es ist aus der Abbildung zu erkennen, dass die Ozonbehandlung sowohl bei dem Wildtyp *A. thaliana* Col-0, als auch bei den transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC und -Bgl2 GUS zum Zelltod von ~15 % der Gesamtblattfläche führt. Dies zeigt, dass die Insertion von Fremd-DNA (LOX2 GUS/FLUC bzw. Bgl2/GUS) keinen Einfluss auf die Nekrosenbildung hatte.

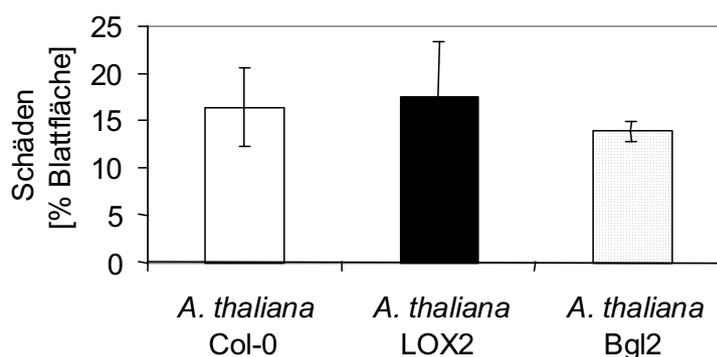


Abb. 43 Ozoninduzierte Blattschäden bei *Arabidopsis thaliana* Col-0, -LOX2 GUS/FLUC und -Bgl2/GUS 24 h nach Beginn der Ozonbehandlung mit 300 ppb für 8 h. Die Läsionen sind als Prozent der Gesamtblattfläche dargestellt und wurden mit dem Computerprogramm ZEISS KS400 release (Carl Zeiss Vision GmbH, Halbergmoos) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen von jeweils drei Pflanzen pro Behandlung.

3.15.2 Ozoninduktion der β -Glukuronidase unter dem LOX2 bzw. Bgl2 Promotor

Je 6 transgene *A. thaliana* LOX2-GUS/FLUC wurden 8 h mit 300 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Kontrollen wurden konstant in ozonfreier Luft gehalten. Nach 0, 1, 2, 5, 8, 12, 24, 28 und 36 Stunden nach Start der Exposition wurden die Pflanzen analysiert. Die eine Hälfte der Pflanzen wurde für histochemische GUS Untersuchungen verwendet und die andere wurde für GUS Aktivitätsmessungen eingesetzt (Kap. 2.9.3).

Zur Kontrolle der erfolgreichen Ozonbehandlung wurden je 6 transgene *A. thaliana* Bgl2/GUS in gleicher Weise behandelt (8 h, 300 ppb O₃). Die histochemische Untersuchung der β -Glukuronidase Expression erfolgte 0 h, 3 h, 8 h und 24 h nach Start der Ozonexposition.

3.15.2.1 Histochemische Lokalisation der GUS Expression

Die Auswertung der histochemischen GUS Aktivität für *A. thaliana* LOX2-GUS/FLUC ergab, dass sich zwischen den Zeitpunkten 0 h bis 8 h nach Start Ozonexposition nur an vereinzelt Blättern pro Pflanze GUS Aktivität unter der Kontrolle des LOX2 Promotors in Form von blauem Farbniederschlag zeigte. Die Quantifizierung der GUS Aktivität unter dem ozoninduzierten LOX2 Promotor erfolgte daher mit parallel durchgeführten Bestimmungen der Enzymaktivität (Kap. 3.15.2.2). Es war auffällig,

dass die histochemisch nachgewiesene GUS Aktivität immer in Form von punktförmigen blauen Bereichen zu beobachten war. Zur Verdeutlichung dieses Induktionsmusters wurde der Zeitpunkt mit der stärksten GUS Expression, 28 h nach Start Ozonexposition, ausgewählt und in Abb. 44 dargestellt.

Wie aus Abb. 44 zu erkennen ist waren es hauptsächlich punktförmige, blaugefärbte Bereiche. Diese waren unregelmäßig über die Blattspreiten verteilt. Um diese intensiv blau gefärbten Punkte gab es heller gefärbte Regionen. Es liegt die Vermutung nahe, dass die GUS Aktivität in den Bereichen späterer Nekrosen entstand, da diese auch punktförmig verteilt waren (Abb. 42). Ein Unterschied in der Induktion des LOX2 Promotors zwischen eher jungen nachwachsenden Blättern der inneren Rosette oder älteren Blättern der äußeren Rosette konnte nicht festgestellt werden. Bei den Kontrollen war histochemisch zu keinem Zeitpunkt GUS Aktivität nachweisbar (Abb. 44).

Die erfolgreiche Ozonbehandlung wurde darüber hinaus durch die Ozoninduktion der Glucanase (GUS Expression unter dem Bgl2 Promotor) bei *Arabidopsis thaliana* wie folgt nachgewiesen. Nach 3 h wurde eine geringe Induktion der GUS Expression in den Blattadern beobachtet, zu der nach 8 h kleinere punktförmige Expressionen in den Interkostalfeldern hinzukamen. Nach 24 h waren die Blätter deutlich in und um die Blattadern intensiv blau gefärbt wobei einige Blätter hellere Bereiche an den Blatträndern aufwiesen. Die unbehandelten Kontrollpflanzen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Induktion der GUS via Bgl2 Promotor. Auf die Bestimmung der GUS Enzymaktivität wurde daher verzichtet und für die Darstellung der Zeitpunkt mit der stärksten GUS Expression, 24 h nach Start Ozonexposition, ausgewählt und exemplarisch in Abb. 44 dargestellt.

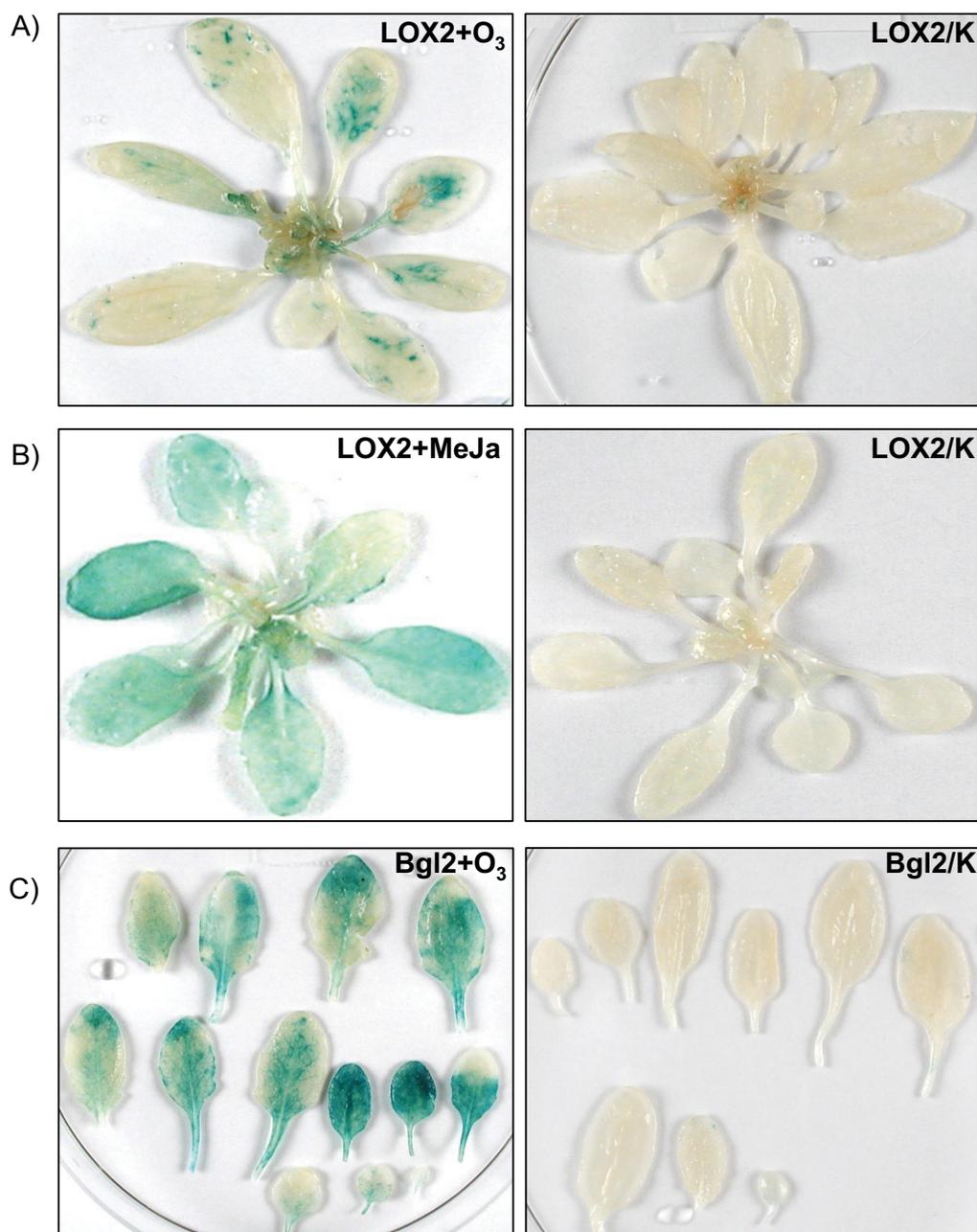


Abb. 44 Histochemischer Nachweis der LOX2- bzw. Bgl2-Induktion, anhand der Glukuronidase Aktivität, nach Ozonexposition bei (A) *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC und (C) *Arabidopsis thaliana* Bgl2/GUS oder nach Behandlung mit Methyljasmonat bei (B) *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC. Die Pflanzen wurden 8 h mit 300 ppb Ozon behandelt und anschließend in ozonfreier Luft weiterkultiviert. Die MeJa (7,5 μ M) Behandlung erfolgte für 24 h. Kontrollen wurden ausschließlich in Ozon- oder MeJa-freier Luft gehalten. Die Ernte der Pflanzen und nachfolgende histochemische Färbung ü. N. erfolgte für A) nach 28 h und für B) und C) nach 24 h. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild pro Behandlungsvariante mit Kontrolle.

3.15.2.2 GUS Aktivitäts Bestimmung

Nach Ozonbehandlung kam es in *Arabidopsis thaliana* LOX2 Pflanzen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu einer eindeutigen Induktion der GUS Aktivität vermittelt durch den LOX2 Promotor. Diese zeigte einen biphasischen Charakter mit Maximalwerten nach 1 h und 28 h. Die LOX2 (GUS) Aktivität stieg in ozonbehandelten Pflanzen gegenüber unbehandelten Kontrollpflanzen nach 1 h direkt an, zeigte jedoch hier die meiste Streuung. Die LOX2 (GUS) Aktivität sank anschließend wieder ab und hatte nach 8 h erneut den Kontrollwert erreicht. Ab diesem Zeitpunkt war eine kontinuierliche LOX2 (GUS) Aktivitätszunahme in den ozonexponierten *Arabidopsis* Pflanzen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu verzeichnen. Nach 24 h und 28 h war die LOX2 (GUS)-Induktion ozonbehandelter Pflanzen gegenüber unbehandelten jeweils 8 fach. Nach dem Maximum bei 28 h fiel die Aktivität steil ab und erreichte nach 36 h noch die 2 fache Aktivität gegenüber den Kontrollen (Abb. 45).

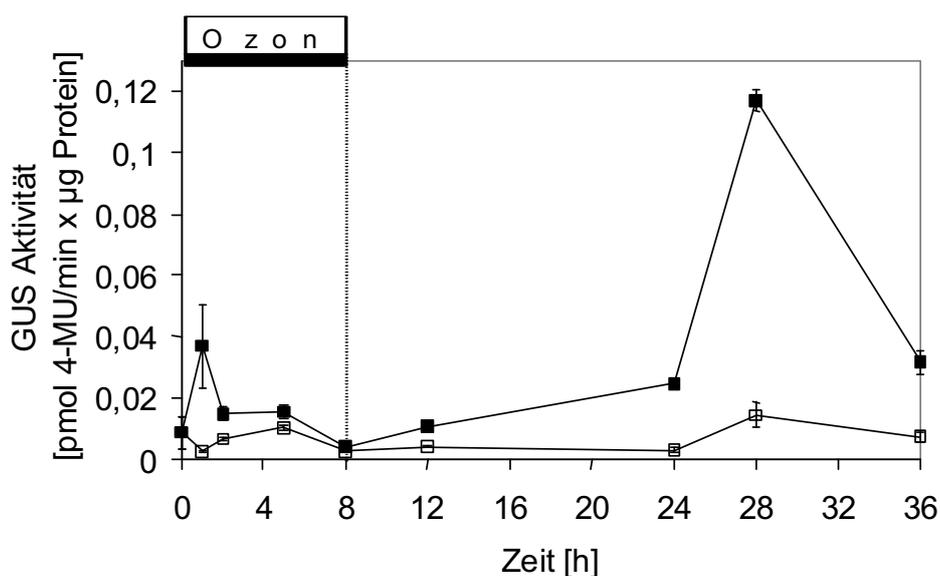


Abb. 45 Ozoninduktion der GUS Aktivität via LOX2 Promotor von *A. thaliana*. *A. thaliana* LOX2 Pflanzen wurden 8 h mit 300 ppb Ozon behandelt (■) bzw. in Reinluft gehalten (□) und zu den angegebenen Zeitpunkten die GUS Aktivität mittels Fluoreszenzphotometrie untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

3.15.3 Induktion der GUS durch Methyljasmonat unter dem LOX2 Promotor

Methyljasmonat ist wie Ozon ein gasförmiger Effektor für Signalinduktionen in der Pflanze (Farmer und Ryan, 1990; Wasternack, 2007). Beide gelangen bei exogener Applikation von außen über die Stomata mit dem Gaswechsel in das Blattinnere.

Es ist bekannt, dass Methyljasmonat Lipoxygenasen in *A. thaliana* (Melan et al., 1993), *N. tabacum* L. cv. Bel W3 (diese Arbeit, Kap. 3.11) und zahlreichen anderen Pflanzenspezies induziert. Methyljasmonat wurde daher in dieser Arbeit als Positivkontrolle im Vergleich zu Ozon für die Induktion der chloroplastidären Lipoxygenase verwandt (Kap. 2.6.3). Die Ergebnisse der histochemischen Verteilung der LOX2 (GUS) Expression und die LOX2 (GUS) Aktivität nach Behandlung mit MeJa sind in Kap. 3.15.3.1 und 3.15.3.2 dargestellt.

3.15.3.1 Histochemische Lokalisation der LOX2 (GUS) Aktivität

Methyljasmonat induzierte die GUS Aktivität unter dem LOX2-Promotor in transgenen *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC. Sichtbar wurde dies bei allen Behandlungsvarianten als eine deutliche Verteilung der LOX2 (GUS)-Expression (Blaufärbung) über die gesamte Blattfläche hinweg.

Tab. 8 Histochemischer Vergleich der GUS Expression via LOX2 Promotor in *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC nach Methyljasmonatbehandlung. GUS-Expression (Farbintensität): - = 0, + = sehr schwach, ++ = schwach, +++ = mittel und ++++ = stark

Konzentration MeJa	Inkubationsdauer [h]	GUS-Expression
7,5 μ M	24	++++
7,5 μ M	5	+++
0,1 μ M	24	++
0,1 μ M	5	+
0 μ M, Kontrolle	24	-

Bei den unterschiedlichen Behandlungsvarianten änderte sich nicht das Verteilungsmuster, sondern nur die Intensität der LOX2 (GUS)-Expression ausgedrückt als Farbintensität. So nahm bei gleicher MeJa Behandlung (0,1 μ M bzw. 7,5 μ M) die Farbintensität mit der Verlängerung der Inkubationsdauer von 5 h auf 24 h deutlich zu. Die Kontrollen blieben dagegen ohne LOX2 (GUS)-Expression. Darüber hinaus wurde bei gleichen Inkubationszeiten (5 h bzw. 24 h) mit der höheren MeJa Konzentration auch eine stärkere LOX2 (GUS) Expression erreicht

(Tab. 8). Die stärkste Induktion der LOX2 (GUS)-Expression wurde nach 24 h Exposition mit Methyljasmonat (7,5 μ M) nachgewiesen (Tab. 8) und ist in Abb. 44 zusammen mit einer Kontrolle exemplarisch dargestellt.

3.15.3.2 GUS Aktivitäts Bestimmung

Die Induktion der LOX2 (GUS) Aktivität war zum einen von der MeJa-Konzentration und zum anderen bei gleicher Konzentration von der Expositionsdauer abhängig (Abb. 46).

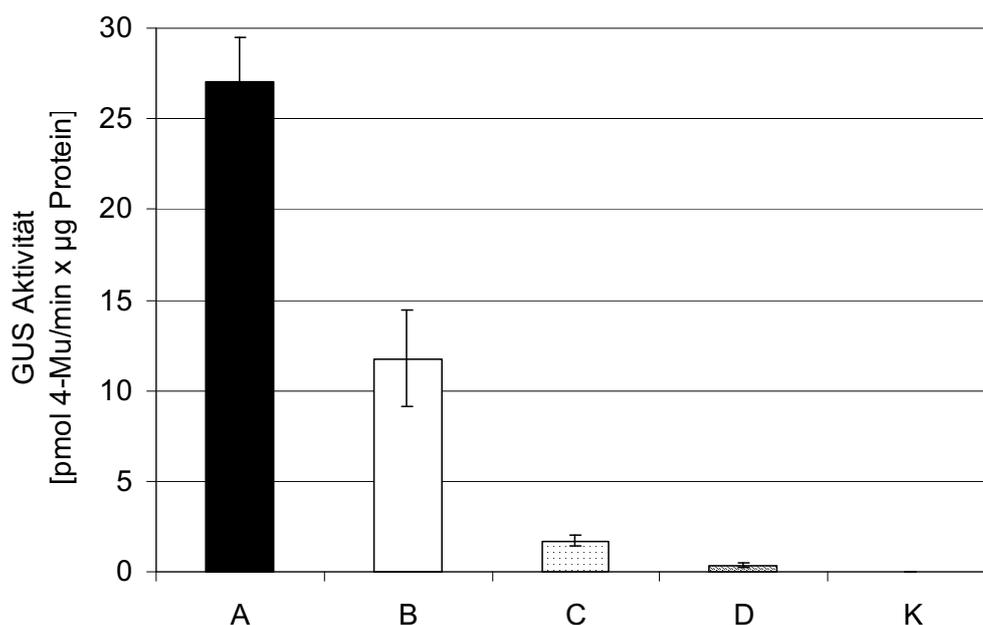


Abb. 46 Vergleich der LOX2 Aktivität bei transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC nach Behandlung mit Methyljasmonat. Je drei Pflanzen wurden in einem Exsikkator wie folgt behandelt: Inkubationszeit 24 h: A) 7,5 μ M MeJa bzw. C) 0,1 μ M MeJa. Inkubationszeit 5 h mit anschließender Weiterkultivierung in MeJa freier Luft: B) 7,5 μ M MeJa bzw. D) 0,1 μ M MeJa; K) Kontrollen wurden 24 h ohne MeJa inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Extraktionen mit ihren Standardabweichungen.

Bei gleicher Expositionsdauer von 24 h und einer Erhöhung der Konzentration von 0,1 μ M MeJa auf 7,5 μ M MeJa stieg die GUS Aktivität unter dem LOX2 Promotor um das 15,7fache an (Abb. 46 A und C). Bei der kürzeren Expositionszeit von jeweils 5 h stieg die GUS Aktivität unter dem LOX2 Promotor bei Erhöhung der MeJa Konzentration von 0,1 μ M auf 7,5 μ M um das 33fache an (Abb. 46 B und D). Kontrollpflanzen zeigten keine LOX2 (GUS) Aktivität (Abb. 46 K). Bei einer Konzentration von 0,1 μ M bzw. 7,5 μ M MeJa und einer Verlängerung der

Inkubationsdauer von 5 h auf 24 h, stieg die LOX2 (GUS) Aktivität um das 4,8fache (Abb. 46 C und D) bzw. um das 2,3fache an (Abb. 46 A und B). Die LOX2 (GUS) Aktivität korrelierte positiv mit der histochemischen GUS Expression unter dem LOX2 Promotor (3.15.3.1, Tab. 8 und Abb. 44).

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass Ozon die LOX2 Aktivität in den Chloroplasten transgener *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC induziert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass sich das Expressionsmuster der LOX2 (GUS) Aktivität nach Ozonbehandlung deutlich von dem nach Behandlung mit Methyljasmonat unterscheidet.

4. Diskussion

Troposphärische Ozonkonzentrationen verzeichneten in den letzten Jahrzehnten weltweit eine Zunahme um das drei- bis vierfache, wobei Spitzenkonzentrationen von 100 - 400 nL/L in industriereichen Regionen erreicht wurden (Kley et al., 1999). Diese Konzentrationen reichen aus, um beträchtlichen Schaden und Produktionsverluste bei Wild-, Zier- und Anbaupflanzen hervorzurufen. Die Schäden äußern sich bei sensitiven Pflanzen als HR-ähnliche Läsionen und/oder chlorotische Symptome (Sandermann, 1996; Übersicht: Kangasjärvi, 2005). Aus ökonomischer Sicht entsteht durch die Ertrageinbußen ein erheblicher finanzieller Verlust. Von einigen Autoren wird Lipidperoxidation als die biochemische Basis der phytotoxischen Wirkung akuter Ozonexposition (150-300 ppb für 4-6 h) angesehen (Heath und Taylor, 1997). Die Ursachen hierfür können neben unspezifischen autoxidativen Mechanismen, spezifische enzymatische Prozesse katalysiert durch u. a. Lipoxygenasen (LOXs) sein (Kap. 1.5.1). LOXs dioxygenieren neben frei vorliegenden ungesättigten Fettsäuren auch veresterte Fettsäuren der Biomembranen und tragen auf diese Art zur Zerstörung des Blattgewebes, der Bildung von Nekrosen, dem Abbau oxidationsanfälliger Fettsäuren und zur Synthese von flüchtigen kurzkettigen Aldehyden und Alkoholen (C₆ und C₉) sowie nichtflüchtigen Metaboliten bei (Kap. 1.6; Grechkin, 1998; Maccarrone et al., 2001). Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von akutem Ozonstress auf den LOX-Reaktionsweg in den *Nicotiana tabacum* L. Varietäten Bel W3 und Bel B, sowie dem transgenen *N. tabacum* L. xanthi-nc Nah-G untersucht. Hierzu wurde die Ozoninduktion von Lipoxygenase auf Enzym- und Transkriptebene, sowie der Transkripte weiterer Enzyme des LOX-Reaktionsweges analysiert. Die erzielten Daten werden im Folgenden in Korrelation gesetzt mit den unter Ozonstress nachgewiesenen Emissionen einer Reihe flüchtiger Metabolite des LOX-Reaktionsweges (Heiden et al., 1999a; - 1999b; - 2003) sowie der Nekrosenentwicklung.

Mit der ozonsensitiven Varietät *N. tabacum* L. cv. Bel W3 und der ozontoleranten Varietät *N. tabacum* L. cv. Bel B stand in dieser Arbeit ein etabliertes Modellsystem zur Verfügung mit dem die Nekrosenentwicklung und die Aktivierung der Abwehrgene basische β -1,3-Glucanase und basische Chitinase unter akutem Ozonstress bereits gezeigt wurden (Langebartels et al., 1991; Schraudner et al., 1992; Ernst et al., 1992; Janzik et al., 2005). Eine erfolgreiche Ozonbehandlung

konnte somit anhand der Transkriptakkumulation der PR Proteine basische β -1, 3-Glucanase und basische Chitinase zwischen 5 h und 24 h verfolgt werden (Kap. 3.12.1; Abb. 36 und Kap. 3.12.2; Abb. 37). Dieses definierte System lieferte die Grundlage, um eine Korrelation zwischen der Nekrosenentwicklung und der Induktion der LOX, als Maß der spezifischen Lipidperoxidation nach Ozonbehandlung, herstellen zu können. Hierfür war eine genaue Charakterisierung des Schadbildes der ozonbehandelten Pflanzen notwendig. Für diesen Vergleich musste jedoch zunächst der LOX-Enzymaktivitätstest etabliert werden.

4.1 Optimierung des Lipoxygenase Enzymaktivitätstest

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Enzymtest etabliert werden, der eindeutig LOX Aktivitäten bei Tabak cv. Bel W3 bestimmt. Im sauren pH-Wert Bereich (pH 5.0) waren diese Aktivitäten jedoch teilweise von autoxidativen Prozessen begleitet (Kap. 3.2). Dass ein Teil der Lipidhydroperoxide im sauren pH Bereich (pH 5.0) dennoch auf eine LOX katalysierte Reaktion zurückzuführen ist, wurde anhand von Inhibitorversuchen bestätigt. Der effektivste Inhibitor bei pH 8.0 (eindeutig da hier keine Autoxidation) war N-Propylgallat, der bei einer Konzentration von 10 μ M die LOX Aktivität um über 50 % inhibierte. Bei gleicher Konzentration (10 μ M) aber pH 5.0 inhibierte N-Propylgallat die LOX Aktivität um 24 % (Kap. 3.3; Abb. 24). Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Nachweis von Bostock et al. (1992), die Arachidonsäure-induzierte LOX Aktivität in Kartoffel ebenfalls im sauren pH Bereich (pH 5.5) durch N-Propylgallat inhibieren konnten. Die LOX hemmenden Eigenschaften der verwandten Inhibitoren wurden in der Literatur häufig zitiert und überlagern sich mit ihrer Funktion als Radikalfänger (Fournier et al., 1993; Groot und Rauen, 1998; Pinto et al., 1999; Fan und Mattheis, 2001). Eine mögliche Erklärung für Lipidhydroperoxidbildung durch Autoxidationsprozesse im sauren pH Bereich geben Belitz und Grosch (1987), die beschreiben, dass das Superoxidradikal (O_2^*) unter physiologischen Bedingungen als Anion (O_2^-) vorliegt im sauren pH Bereich jedoch das Perhydroxyradikal (HO_2^*) dominiert, dessen radikalischer Charakter durch H^+ -Abstraktion die Lipidperoxidation einleiten kann. Ein indirekter Nachweis für die Bildung von Lipidhydroperoxiden im Messansatz mit Rohextrakt und Linolsäure wurde durch die HPLC Analyse der Produkte nach Reduktion mittels Natriumborhydrid erbracht (Abb. 15). Das Resultat stimmt mit den Untersuchungen von Gardner et al. (1993) überein, die mittels GC/MS und IR (Infrarot) Spektrum

nachwiesen, dass das Hauptprodukt des mit NaBH₄ reduzierten Linolsäurehydroperoxid ((13S, 9Z, 11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure) zu 75 % das Linolsäurehydroxid ((13S, 9Z, 11E)-13-hydroxy-9,11-octadecadiensäure) war.

Für die ozoninduzierte LOX Aktivität aus Tabak cv. Bel W3 wurden biphasische pH-Wert Optima nachgewiesen, die für Linolsäure bei pH 5.0 und pH 8.0 und für Linolensäure bei pH 5.0 und pH 7.0 lagen (Kap. 3.2.3; Abb. 21 und Abb. 22). Die beiden pH-Wert Optima waren erste Hinweise auf unterschiedliche LOX Isoformen, wie z. B. 9- und/oder 13-LOX (Abb. 4). Unterschiedliche LOX Isoformen konnten durch nachfolgende Analysen mittels NATIVE PAGE sowie Southern Blot Analysen bestätigt werden (Kap. 3.5; Abb. 27 und Kap. 3.9; Abb. 32). Auch in SDS-PAGE Analysen angereinigter Elicitor-induzierter LOX (Elicitor: *P. parasitica* Tuck var. *Nicotianae*) aus *N. tabacum* L. cv. Wisconsin 38 Zellkultur, detektierten Fournier et al. (1993) eine Doppelbande, aufgrund dessen sie zwei mögliche LOX Isoformen vermuteten. Saure pH-Wert Optima im Bereich pH 4 - pH 5,5 zeigten, um nur einige zu nennen, auch LOX aus *Arabidopsis* (Zhuang et al., 1996), Sojabohne (Baracat-Pereira et al., 2001), die Fraktion der Chloroplastenhüllmembran von Spinat (Blée und Joyard, 1996), rekombinante Rlox1 aus Rosenblüten (Fukuchi-Mizuti et al., 2000) und die mikrosomale sowie lösliche Fraktion aus Kartoffel (Bostock et al., 1992). Darüber hinaus zeigte die LOX1 aus Kartoffelknollen die höchste Aktivität bei pH 5.0 (53%) und pH 6.0 (100%). Die Reaktionsprodukte der rekombinant exprimierten LOX1 waren zu 96 % 9-Linolenhydroperoxide. LOX1 wurde somit als 9-LOX klassifiziert (Royo et al., 1996). Der pH-Wert in Vakuolen und Lysosomen ist ungefähr pH 5.0 und auch im Inneren der Thylakoidlumen kann während der Photosynthese der pH-Wert auf 4.5 abfallen (Rausch, 1999). Das Vorkommen von LOXs in diesen Zellkompartimenten wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt. So konnte in neuen Studien mittels GFP-Fusionsproteinen und Immunodetektion zwei 13-LOX (LOX-H1 und LOX-H3) u. a. in den Thylakoidmembranen von Kartoffel nachgewiesen werden (Farmaki et al., 2007). Darüber hinaus herrscht im Apoplasten ein pH-Wert von 5–7 (Dietz, 1997). Eine an die Membran assoziierte apoplastische LOX wurde z. B. in *Phaseolus vulgaris* L. charakterisiert (Sicilia et al., 2005). In der Vakuole von Embryo Kotyledonen aus *Glycine max* L. wurden mehrere LOX Isoformen (LOX4 und/oder LOX5) nachgewiesen, die durch Auxin, nicht jedoch durch Absicinsäure, Methyljasmonat oder Jasmonsäure induziert werden konnten (Wang et al., 1999). Man kann

aufgrund des hier nachgewiesenen sauren pH-Wert Optimum von pH 5.0 vermuten, dass auch eine ozoninduzierte LOXs bei Tabak cv. Bel W3 in den zuvor beschriebenen Zellkompartimenten lokalisiert sein könnte.

Das zweite pH-Wert Optimum der ozoninduzierten Tabak cv. Bel W3 LOX Aktivität (diese Arbeit) lag mit 7.0 bzw. 8.0 im neutralen bis leicht basischem pH Bereich in welchem Fettsäuren in ihrer deprotonierten Form vorliegen und leichter löslich sind. In der Pflanze findet man einen pH-Wert von 8.0 bei Licht im Stroma der Chloroplasten und pH-Werte um 7.0 im Cytosol (Elstner, 1990). Dies wäre ein Hinweis auf das Vorkommen von Tabak LOX mit den pH Optima 7-8 im Stroma der Chloroplasten und/oder im Cytosol. Farmaki et al. (2007) wiesen zwei 13-LOXs (LOX-H1 und LOX-H3) u. a. im Stroma von Chloroplasten bei Kartoffeln nach. Die Ozoninduktion chloroplastidärer LOXs wird später in einem anderen Zusammenhang ausführlicher diskutiert (Kap. 4.5). Es wurde darüber hinaus beschrieben, dass in *Solanaceae* 9-LOX im Cytosol und 13-LOX in Plastiden lokalisiert sind (Feussner und Wasternack, 2002). Den Nachweis cytosolischer LOX erbrachten Fammartino et al. (2007) in neueren Studien. Sie konnten zeigen, dass das Fusionsprotein bestehend aus einer Tabak 9-LOX (*Nt*LOX1; Acc. Nr. X84040) und einem Cyanfluoreszenzprotein (CFP) nach der Transformation in Tabakblätter (*Nicotiana tabacum* L. Isolinie: 46-8.) transient im Cytoplasma exprimiert wurde. Zu der Nukleotidsequenz dieser 9-LOX aus Tabak (Acc. Nr. X84040) war das in dieser Arbeit aus ozonbehandeltem (5 h, 150 ppb O₃) Tabak cv. Bel W3 isolierte LOX cDNA Fragment (471bp) 99 % homolog (Kap. 3.6). Aufgrund der Sequenzhomologie (Kap. 3.6) sowie der Daten von Fammartino et al. (2007) ist es denkbar, dass das nachgewiesene LOX pH-Wert Optima pH 7/ pH 8 bei Tabak cv. Bel W3 (Kap. 3.2.3) möglicherweise u. a. auf eine exprimierte ozoninduzierte cytosolische 9-LOX Aktivität zurückzuführen ist. Auch die an die Plasmamembran (Plasmalemma) gebundene LOX aus Soja zeigt ein alkalisches pH Optimum von 7.5-10 (Fornaroli et al., 1999). Da in dieser Arbeit dem Extraktionspuffer Tween-20 zugesetzt wurde (Kap. 2.9.2.1) könnte für die LOX Aktivität im alkalischen auch eine partiell freigesetzte Plasmamembran-assoziierte Tabak LOX Isoform verantwortlich sein. Einige Autoren vermuten auch den Transfer löslicher LOX via Vesikel zu den Membranen wodurch sie leichter die Fettsäuren katalysieren könnten (Loiseau et al., 2001). Allgemein werden zahlreiche LOX Isoformen mit unterschiedlichen pH-Wert-Optima beschrieben, oft verbunden mit differenzierter subzellulärer Lokalisation und

verschiedenen Substratpräferenzen (Siedow 1991; Loiseau et al., 2001) u. a. in Saubohnen (Clemente et al., 2000), Sojabohnen (Busto et al., 1999; Fischer et al., 1999), Gerste (*Hordeum vulgare* L.) (Wu et al., 1997) und *Arabidopsis thaliana* (Melan et al., 1993; Bell und Mullet, 1993). Sie können durch die unterschiedlichsten biotischen und abiotischen Signale induziert werden (Kap. 1.6) und lassen unabhängige Funktionen vermuten (Dubbs und Grimes, 2000).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Test zum Nachweis der Lipoxygenase Aktivität mit Rohextrakten aus ozonbehandelten *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 als Grundlage für weitere Analysen in dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden konnte.

4.2 Korrelation von Nekrosen mit LOX Genexpression und LOX Aktivität sowie C₆-Emissionen bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3

In mittelalten Blättern (Nr. 3) von Tabak cv. Bel W3 korrelierte nach Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) und anschließender Weiterkultivierung in ozonfreier Luft die LOX mRNA Genexpression und parallel auch die LOX Aktivität, eindeutig mit der Nekrosenentwicklung, was ein deutlicher Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation der LOX ist (Abb. 16, Abb. 25, Abb. 26, Abb. 29 und Abb. 33). Die hierbei eingesetzten unterschiedlichen Nachweismethoden, Northern Blot und RT-PCR für den Nachweis der LOX Expression auf Transkriptebene, sowie HPLC und photometrischer Enzymtest für die Bestimmung der LOX Aktivität, erbrachten jeweils übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 29, Abb. 33, Abb. 25 und Abb. 26). Darüber hinaus wurde eine gute Übereinstimmung zwischen der nachgewiesenen LOX Aktivität (Abb. 25, Abb. 26), die sowohl auf 9-LOX als auch auf 13-LOX Aktivität zurückzuführen sein könnte und den von Heiden et al. (1999a; 1999b; 2003) nachgewiesenen C₆-Emissionen beobachtet. Diese C₆-Emissionen (Tab. 9) leiten sich von 13-Lipidhydroperoxiden ab und waren daher ein indirekter Hinweis auf die Ozoninduktion einer 13-LOX bei Tabak cv. Bel W3. Die C₆-Emissionen werden jedoch im Hinblick auf ihre Entstehung im 13-HPL Zweig des LOX-Wegs an anderer Stelle gesondert diskutiert (Kap. 4.4).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig die Induktion der Lipoxygenase durch akuten Ozonstress bei ozonsensitivem Tabak cv. Bel W3 und im Unterschied hierzu bei dem ozontoleranten Tabak cv. Bel B. Zur besseren Übersicht sind diese

Ergebnisse zusammenfassend in Tab. 9 dargestellt und werden nachfolgend diskutiert.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war nur eine LOX cDNA in *Nicotiana tabacum* L. bekannt, die aus Zellsuspensionskulturen von Tabak, nach Behandlung mit einem pilzlichen Elicitor aus der Zellwand von *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* (Verursacher der Blattfleckenkrankheit), isoliert worden war (Acc. Nr.: X84040; Véronési et al., 1995). Hieraus wurden die Primer u. a. zur Herstellung des genspezifischen LOX cDNA Fragments (471 bp) abgeleitet, das als Gensonde bei Northern Blot Analysen eingesetzt wurde. Durchgeführte Sequenzvergleiche auf Nukleotidebene ergaben, dass die in dieser Arbeit aus ozonbehandeltem (5 h, 150 ppb O₃) Tabak cv. Bel W3 erzeugte LOX Gensonde (471 bp) die höchste Homologie (99 %) zu vorgenannter Elicitor-induzierter LOX1 aus Tabak (Acc. Nr.: X84040) zeigte. Diese Elicitor-induzierter LOX1 aus Tabak (Acc. Nr.: X84040) wurde in phylogenetischen Stammbaumanalysen als 9-LOX klassifiziert (Nemchenko et al., 2006; Lang und Feussner, 2007). Die nächst höheren Homologien wurden ebenfalls zu 9-LOX aus Tomate [Acc. Nr.: AY008278 (89 %) und U09025 (83 %)] und aus *Nicotiana attenuata* [Acc. Nr.: AY254345 (81 %)] erzielt. Sequenzvergleiche zu einigen 13-LOX aus Tabak und Tomate ergaben darüber hinaus keine signifikanten Übereinstimmungen (Kap. 3.6). Auch in neueren Untersuchungen von Marmey et al. (2007) wurde o. g. Elicitor-induzierte LOX aus *N. tabacum* (Acc. Nr.: X84040) aufgrund des Vorkommens der Aminosäuren Thyrosin/Valin an der Position 584 als 9-LOX beschrieben (Kap. 1.6.1). Die Position der LOX Sonde (diese Arbeit) lag ausserhalb des für 9- oder 13-LOX bestimmenden Bereichs, so dass hierüber keine direkten Rückschlüsse gezogen werden konnten. Die kodierende Aminosäuresequenz der LOX Sonde wies jedoch typische hochkonservierte Aminosäuren der LOX aus anderen Pflanzenspezies auf, was ihre Identität bestätigte (Abb. 28). Aufgrund der Sequenzvergleiche kann man vermuten, dass mit der in dieser Arbeit eingesetzten LOX Gensonde (471 bp) möglicherweise vornehmlich 9-LOX Transkripte bei Tabak nachgewiesen wurden. Auf der anderen Seite sprechen der Nachweis von JA (diese Arbeit) und die C₆-Emissionen (Heiden et al., 1999a, -b) bei Tabak cv. Bel W3 für die Ozoninduktion einer 13-LOX. Man kann daher annehmen, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene LOX Aktivität auf 9-LOX und/oder 13-LOX Aktivität zurückzuführen sein könnte.

So wird eine Beteiligung von Jasmonsäure an der Abwehrantwort ozonempfindlicher Pflanzen auf Ozon allgemein akzeptiert und Jasmonsäure aus dem 13-LOX-Weg u. a. eine Funktion bei der Eindämmung Ozon-induzierter Läsionen durch die Aktivierung antioxidativer Schutzenzyme zugesprochen (Overmyer et al., 2000, Kanna et al. 2003; Overmyer et al., 2003). Auf diesen Zusammenhang wird in Kap. 4.6 nochmals eingegangen. In der Literatur werden mittlerweile Hypothesen über diskrete 9- oder 13-LOX-Wege diskutiert, wobei der 9-LOXs Weg vornehmlich in Verbindung mit HR und Zelltod gebracht wird und der 13-LOXs Weg über die JA Biosynthese in Verbindung mit der Aktivierung von Schutzfunktionen. So wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass bei *Solanaceae*n während der HR bei einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion, hauptsächlich der 9-LOX-Weg induziert wurde (Rustérucci et al., 1999; Göbel et al., 2001; Montillet et al., 2004; Cacas et al., 2005). Darüber hinaus wurde in mit Cryptogein infiziertem Tabak die Induktion der 9-LOX Aktivität und die damit verbundene Akkumulation der 9-Lipidhydroperoxide als nicht nur notwendig (Rustérucci et al., 1999), sondern als ausreichend (Cacas et al., 2005) zur Ausprägung des HR ähnlichen Zelltod beschrieben. In Übereinstimmung hierzu zeigte die transiente Ozon-induzierte LOX Aktivität und LOX mRNA Expression, sowie die Nekrosenentwicklung bei Tabak cv. Bel W3 (dieser Arbeit), große Ähnlichkeit zu einer transienten Pathogen-induzierten LOX Aktivität und LOX mRNA Expression während einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion. So wurde gleichzeitig mit dem Auftreten der Resistenzantwort und Nekrosen, eine transiente LOX Induktion auch während der HR u. a. bei mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* infizierten *Phaseolus vulgaris* (Slusarenko et al., 1993), mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* infizierten Kartoffeln cv. Superior (9-LOX, POTLX-3 mRNA: 6 h–18 h; Kolomiets et al., 2000) sowie in mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* infizierten Blättern von *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. MoneyMaker nachgewiesen (Koch et al., 1992). Einen zu der Ozon-induzierten LOX Aktivität bei Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) vergleichbaren Zeitverlauf, zeigte auch die LOX Aktivität während der HR bei mit GP66 Elicitor-behandelten Zellsuspensionskultur von Platanen (Alami et al., 1999), bei Elicitor-behandelter Zellsuspensionskultur von Tabak (9-LOX, Acc. Nr. X84040; Rickauer et al., 1990; Fournier et al., 1993), bei mit *P. syringae* pv. *maculicola* infizierten Kartoffeln (9-LOX; Stumpe et al., 2001), bei Chitin- bzw. Chitosan-behandelten Weizenpflanzen (Bohland et al., 1997), sowie bei mit *Xanthomonas campestris*

pathovar malvacearum Linie 18 infizierter Baumwolle (9-LOX; Marmey et al., 2007). Der Zeitverlauf, der ozoninduzierten LOX bei Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) unterscheidet sich somit deutlich von dem Zeitverlauf bei einer kompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion, bei der eine verstärkte LOX Aktivität häufig erst ab 24 h nachgewiesen wurde (Koch et al., 1992; Fournier et al., 1993; Stumpe et al., 2001). Darüber hinaus unterscheidet sich auch die transiente Wund-induzierte LOX Aktivität, die oft sehr schnell (0,5 h – 2 h) erfolgte, wie u. a. für Tomate (Heitz et al., 1997) und Kartoffel (StLOX3; Royo et al. 1996) gezeigt wurde. Das LOX eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Abwehr während der HR zukommt wurde weiterhin mit Hilfe transgener Tabakpflanzen, die eine 9-LOX Antisense exprimierten, gezeigt. Diese Pflanzen zeigten nicht nur eine extreme Reduktion der LOX Aktivität nach Elicitor und Pathogeninfektion, sondern auch einen kompatiblen Phänotyp mit stark verminderter Läsionenbildung (Rancé et al., 1998). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Ozon in ozonsensitivem Tabak cv. Bel W3 den LOX-Weg in ähnlicher Weise induziert, wie es zuvor für die inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktionen während der HR beschrieben wurde. Darüber hinaus bestärkt die Korrelation der Ergebnisse dieser Arbeit mit den beschriebenen Literaturdaten die Anschauung anderer Autoren (Kangasjärvi et al., 1994, -2005; Sandermann et al., 1998), dass Ozon als flüchtiger Elicitor fungiert, der pflanzliche Verteidigungsantworten auslöst, wie sie bei der HR beobachtet werden. Darüber hinaus kann man aufgrund der oben dargestellten Sequenzähnlichkeiten zu anderen 9-LOXs vermuten, dass auch bei Tabak cv. Bel W3 unter Ozonstress, vornehmlich die Induktion des 9-LOX-Wegs zu HR-ähnlichem Zelltod beigetragen haben könnte. Gleichzeitig induzierte Ozon (5 h, 150 ppb O₃) bei der ozontoleranten Tabak Varietät Bel B keine Nekrosen (Abb. 17) und es wurde nur nach 12 h eine schwache Genexpression der LOX mRNA nachgewiesen (Abb. 33 und Tab. 9). Unter der zuvor beschriebenen Annahme einer transkriptionellen Regulation der Ozon-induzierten LOX bei Tabak, war die Menge möglicherweise gebildeter 9-Lipidhydroperoxide, wie sie Rustérucci et al. (1999) zur Ausprägung des HR ähnlichen Zelltod für notwendig halten, bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B gegebenenfalls zu gering. Möglicherweise erfüllte die nachgewiesene ozoninduzierte LOX mRNA in Tabak cv. Bel B auch eine andere Funktion als in cv. Bel W3. Darüber hinaus wurden bei Tabak cv. Bel B auch keine signifikanten Mengen an C₆-Emissionen nachgewiesen (Tab. 9). Das kann zum einen bedeuten,

dass keine 13-LOX induziert wurde oder das möglicherweise gebildete 13-Lipidhydroperoxide nicht im HPL Weg zu C₆-VOCs umgesetzt wurden.

Im Einzelnen dargestellt waren mittelalte Blätter von Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3 in ihrer Nekrosenentwicklung unterschiedlich. Der in dieser Arbeit unter Standardbedingungen (5 h, 150 ppb O₃) beobachtete zeitliche Verlauf der Nekrosenentwicklung bei Tabak cv. Bel W3 war vergleichbar mit den Ergebnissen von Langebartels et al. (1991). Er steht im Verhältnis zu der Blattentwicklung, die bei jungen Blättern von der Basis zur Spitze verläuft und erst bei älteren Blättern abgeschlossen ist (Bobrov Glater et al., 1962). Die Interzellularen haben sich bei mittelalten Blättern entsprechend entwickelt (Langebartels et al., 1991; Schraudner et al., 1992) und erlauben eine größere Verteilung der über die Stomata aufgenommenen Menge an Ozon. Da der Gaseintritt über die Stomata reguliert wird kann man auch unterschiedliche stomatäre Leitfähigkeiten nicht nur bei jungen und alten Blättern, sondern auch bei ozonsensitiven- bzw. toleranten Pflanzen als Ursache für die Schadausprägung vermuten. Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B zeigen jedoch keine Unterschiede in der stomatären Leitfähigkeit oder der Anzahl bzw. Verteilung der Stomata auf Blattunter bzw. -oberseite (Kerner, 1990). Neueste Studien mit *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia (Col-0) bzw. cv. *Landsberg erecta* (Ler) zeigten auch, dass der Ausgangswert der stomatären Leitfähigkeit 9 - 12 Minuten nach Start einer Ozonbehandlung mit 150 ppb um 60 % – 70 % abnahm, dieser jedoch noch während der Behandlung nach 30 – 40 Minuten zurückgewonnen wurde (Kollist et al., 2007). Die unterschiedliche Ozonsensitivität lässt sich somit nicht mit morphologischen Unterschieden begründen.

Auch die verschieden starke Expression antioxidativer Schutzenzyme, die ROS und Lipidhydroperoxide entgiften (Kap. 1.2; beschrieben in Sharma und Davis, 1997) scheinen aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse nicht allein für die unterschiedliche Ozonsensitivität verantwortlich zu sein. So war u. a. das Niveau an Enzymaktivitäten und nachweisbaren Transkripten von Ascorbat Peroxidase (APX) und Glutathion Reduktase (GR) sowie der Metabolite Ascorbinsäure und reduziertem Glutathion in unbehandelten ozontoleranten Tabak cv. Bel B höher als in unbehandelten ozonsensitiven Tabak cv. Bel W3. Die Autoren machten diese stärkere Grundausstattung an Antioxidativen Enzymen und Metaboliten bei Tabak cv. Bel B

Tab. 9 Übersicht des Zeitverlaufs der ozoninduzierten Nekrosenbildung, der Akkumulation von LOX mRNA, SA, JA, H₂O₂, O₂*⁻ und der LOX-Aktivität (diese Arbeit) sowie einiger Emissionen (C₆, C₉, MeJa, JA, MeSa) verändert nach Heiden et al. (1999a) bei *N. tabacum* L. cv. Bel B und cv. Bel W3. (WSA: *water soaked area*; n. a.: nicht analysiert; MeSA: Methylsalicylat; SA: Salicylsäure; MeJa: Methyljasmonat; JA: Jasmonsäure).

--- = null, + = schwach, ++ = mittel, +++ = stark, ++++ = sehr stark

Tabak		Zeit nach Start der Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb)				
Varietät	Resonanz	0 - 5 h	8 h	12 h	24 h	32 - 48 h
Bel B	Nekrosen	Glanz	---	---	---	---
	LOX mRNA (Northern)	---	---	+	---	---
Bel W3	Nekrosen	Glanz	---	WSA	++++	ausgebildet
	LOX mRNA (Northern)	+	++	++++	+++	---
	LOX mRNA (RT-PCR)	+	++	++++	+++	---
	LOX Aktivität (UV-VIS)	+	++	+++	++++	++
	LOX Aktivität (HPLC)	+	++	+++	++++	++
	SA	+	++	+++	++++	+
	JA	---	---	---	++++	---
	H ₂ O ₂ (DAB Nachweis)	---	(3 h) ++	n. a.	++++	n. a.
	O ₂ * ⁻ (NBT Nachweis)	---	---	---	---	---
Tabak		Zeit nach Start der Ozonbehandlung (5 h, 175 ppb) (verändert nach: Heiden et al., 1999a)				
Varietät	Emission	0 - 5 h	8 h	12 h	24 h	32 - 48 h
Bel B	C ₆ oder C ₉	---	---	---	---	---
	MeJa oder JA	---	---	---	---	---
	MeSa	+	+	+	+++	---
Bel W3	C ₉	---	---	---	---	---
	E-2-Hexen-1-al	---	---	+	++	++++
	Z-3-Hexenylacetat	---	+	++++	++	++++
	MeJa oder JA	---	---	---	---	---
	MeSa-Emission	---	---	+	++++	+

für die höhere Ozontoleranz verantwortlich. Direkt nach einer Ozonbehandlung (5 h, 150 ppb) war die GR Aktivität jedoch in beiden Kultivaren unverändert und stieg nur bei Tabak cv. Bel W3, der Nekrosen entwickelte, nach 24 h leicht an (Pasqualini et al., 2001). Für die Ausprägung des Zelltods werden daher eher, wie zuvor bereits beschrieben, reaktive Lipidhydroperoxide diskutiert (Rustérucchi et al., 1999; Cacas et al., 2005).

Zunächst entstanden bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B zwischen 3 h - 5 h nach Start der Ozonbehandlung als "Glanz" bezeichnete silbrige Stellen auf der Blattoberseite, die sich jedoch bei cv. Bel B wieder zurückbildeten und es kam hier zu keiner weiteren Schadausprägung. In diesem Zeitraum setzte die Induktion der LOX auf Gen- und Proteinebene bereits bei Tabak cv. Bel W3 ein, nicht jedoch bei Tabak cv. Bel B oder unbehandelten Kontrollpflanzen (Tab. 9). Bei Tabak cv. Bel W3 zeigte die Induktion der LOX mRNA und -Aktivität nach 12 h einen sprunghaften Anstieg, der begleitet war von der Ausbildung der "water soaked areas" (WSA) (Tab. 9, Abb. 25, Abb. 29 und Abb. 33). Bei Tabak cv. Bel B erfolgte hingegen, wie bereits dargestellt, nur nach 12 h eine schwache LOX mRNA Expression. Schon Heath (1980; 1987) machten den Zusammenbruch der Membranen (Lipidperoxidation) und den daraus resultierenden Verlust an Elektrolyten (Kap. 1.1.2) für die WSAs verantwortlich. Hierbei ist eine Beteiligung der LOX denkbar, wie sie Maccarrone et al. (1994) *in vitro* an isolierten Membranen gezeigt haben. Hierfür spricht auch, dass zu dem Zeitpunkt 24 h nach Ozonstart die Nekrosen voll entwickelt waren und sowohl die LOX mRNA Akkumulation als auch die LOX Aktivität danach stark absanken (Tab. 9). Das zeitlich längere LOX Aktivitätsmaximum im Gegensatz zur LOX mRNA Expression, könnte darin begründet sein, dass, wie zuvor bereits beschrieben, die LOX cDNA Gensonde möglicherweise hauptsächlich 9-LOX mRNA detektiert und evtl. parallel vorliegende 13-LOX mRNA nicht erfasst, wobei die LOX Aktivität auf 9- und/ oder 13-LOX zurückzuführen sein könnte. Letztere Hypothese wird durch die durchgeführten Southern Blot Analysen (Abb. 32), die aufgrund des Hybridisierungsmusters ebenfalls auf mehrere LOX-Genkopien schließen lassen, unterstützt. Auch Véronési et al. (1996) detektierten in Southern Analysen mit genomischer DNA aus Tabakzellkulturen (*N. tabacum* L. cv. Wisconsin 38) mehrere Fragmente aufgrund dessen sie auf eine LOX Genfamilie in Tabak schlossen. Den entscheidenden Hinweis auf verschiedene LOX Isoformen lieferte in dieser Arbeit die anschließend für den Zeitpunkt 24 h nach Start der Ozonbehandlung bei *N.*

tabacum L. cv. Bel W3 durchgeführte in-Gel Färbung nach NATIVE PAGE Analysen. Hier waren im neutral/basischen pH-Wert Bereich sowohl mit Linol- wie auch mit Linolensäure als Substrat eindeutig zwei LOX-Aktivitätsbanden zu erkennen, die auf zwei oder mehr LOX Isoformen hindeuten (Abb. 27). Aussagen über die genaue Anzahl und das Molekulargewicht von Tabak LOXs Isoformen könnten in fortführenden Arbeiten mit Hilfe spezifischer Tabak LOX Antikörper mittels Western Blot Analysen ermittelt werden. Darüber hinaus könnte mittels Proteinfunktionsstudien untersucht werden, ob es sich um 9-LOX oder 13-LOX handelt und diese phylogenetisch eingruppiert werden. Im Gegensatz zu Tabak stellten Kolomiets et al. (2001) in Kartoffel, die ebenfalls zur Familie der *Solanaceae* gehören, in einem phylogenetischen Stammbaum nach Aminosäuresequenzvergleichen 13 LOX Isoformen dar. Die Homologie einer 9-LOX (POTLX-1) zu anderen 9-LOX war ~80 %, wohingegen die Homologie zu 13-LOX (LOX-H1 und LOX-H3) nur ~60 % betrug. Neuere Sequenzinformationen ermöglichten phylogenetische Stammbaumanalysen von 9- bzw. 13-LOXs zahlreicher Pflanzenspezies (Übersichten: Schaller, 2001; Zhang et al., 2006; Nemchenko et al., 2006; Lang und Feussner, 2007; Marmey et al., 2007).

Man kann vermuten, dass die nachgewiesenen Tabak LOX Isoformen unterschiedliche Funktionen erfüllen. So bleibt trotz der zeitlich guten Korrelation der ozoninduzierten LOXs mit den entstehenden Nekrosen bei Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) die Frage bestehen, ob LOXs bei ozonexponierten Pflanzen die Lipidperoxidation einleiten oder aber in Folge von Membranschädigungen nachträglich aktiviert werden. Für die erste Hypothese, dass LOX die Lipidperoxidation initiieren werden zwei Mechanismen vorgeschlagen. Erstens könnte LOX veresterte Fettsäuren der Membranen direkt metabolisieren wie es Maccarrone et al. (1994) *in vitro* mit LOX2 an isolierten Membranen aus Soja beobachteten. Hierbei nahm die Präferenz für die Fettsäuren aus den Membranen in der Reihenfolge: Chloroplast, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran und Mitochondrium zu. Auch für eine an der Membran von Lipidkörpern in Ölsaaten lokalisierte 13-LOX konnte gezeigt werden, dass sie veresterte Polyenfettsäuren in Triacylglycerine und Phospholipide oxygenierte (Feussner und Wasternack, 1998). Zweitens kann es während der LOX Reaktion selbst zur Generierung freier Sauerstoffradikale wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) kommen (Lynch und Thompson, 1984; Thompson et al.,

1987; Pastore et al., 2000) und LOX somit indirekt durch Radikalbildung als Katalysator der Autoxidation wirken (Siedow, 1991). So nahm durch einen spezifischen LOX Inhibitor die LOX Aktivität parallel zu dem sich bildenden (O_2^*) Gehalt ab (Lynch und Thompson, 1984). Eine nachträgliche Aktivierung der LOX beschreiben hingegen Keppler und Novacky (1987), die vermuteten, dass die durch Superoxid-Radikale initiierte Lipidperoxidation zu einer Freisetzung von Fettsäuren führt, die wiederum eine LOX Aktivierung bewirken. Sie hatten festgestellt, dass die Lipidperoxidation während Bakterien induzierter HR (Kap. 1.4.1) in Tabak-Zellkulturen reduziert werden konnte, wenn mit den Bakterien gleichzeitig SOD infiltriert wurde. Auf eine mögliche nicht-enzymatische Lipidperoxidation wird in Kap. 4.3 nochmals eingegangen.

Bei der Nekrosenentwicklung fiel in Abhängigkeit vom Blattalter auf, dass bei Tabak cv. Bel W3 die physiologisch jüngsten Blätter Nr. 0 schadfrei blieben. Dies war auch dann der Fall wenn, wie in einem weiteren Teil dieser Arbeit untersucht, die Ozonkonzentration von 150 ppb auf 300 ppb verdoppelt wurde. Die fehlende Schadausprägung korrelierte mit den Ergebnissen der LOX mRNA Expression nach 24 h, die in Blatt 0 bei keiner der Ozonkonzentrationen zu beobachten war (Abb. 18 und Abb. 30). Die nachfolgenden jungen Blätter Nr. 1 und Nr. 2 zeigten nur an den Blattspitzen Nekrosen. Diese erreichten bei mittelalten Blättern Nr. 3 und Nr. 4 bereits eine homogene Verteilung über die Blattspreite (Abb. 18). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei diesen mittelalten Tabak cv. Bel W3 Blättern (Nr. 3) eine Verdopplung der Ozonkonzentration bei gleichbleibender Expositionszeit (5 h) von 150 ppb auf 300 ppb eine annähernde Verdopplung der Nekrosen zur Folge hatte und einherging mit einer Verdopplung der LOX mRNA Akkumulation (Abb. 18 und Abb. 30). Die 9- und/oder 13-LOX Aktivität bei einem pH-Wert von 7.0 bzw. 8.0 mit Linol- oder Linolensäure stieg hierbei jeweils um das 5 fache. Im sauren pH-Wert Bereich von 5.0 nahm die LOX Aktivität um das 1,3 fache mit Linol- und das 1,5fache mit Linolensäure zu (Abb. 31 A und B). Es wird angenommen, dass die geringe LOX Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Kontrollen im sauren pH-Wert Bereich von 5.0 eher im Zusammenhang mit den bereits diskutierten und beschriebenen Autoxidativen Prozessen (Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 25) zu sehen ist, denn die unbehandelten Kontrollen zeigten ebenfalls eine hohen Hintergrund an Lipidhydroperoxiden. Die Steigerung der LOX mRNA Expression und LOX Aktivität, sowie die Ausbreitung der Nekrosen nach erhöhter Ozonkonzentration, könnte, wie

bereits zuvor diskutiert, im Zusammenhang mit möglicherweise erhöhten Konzentrationen an reaktiven 9-Lipidhydroperoxiden stehen. Parallel wird jedoch aufgrund des Nachweises von JA nach 24 h (Kap. 4.6) auch die Induktion einer 13-LOX Aktivität vermutet, wobei diese möglicherweise andere Funktionen übernimmt. Dass Ozon in Pflanzen zur Induktion chloroplastidärer LOX führen kann, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden und wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (Kap. 4.5). Geht man davon aus, dass wie zuvor diskutiert, die Stomata bei jungen Blättern noch nicht richtig entwickelt sind, so kann man aufgrund dieses Experiments rückschließen, dass die Induktion der LOX durch Ozon bei Tabak cv. Bel W3 eine lokale Reaktion am Ozonwirkungsort darstellt. Übereinstimmend fanden auch Fammartino et al. (2007) das *Nt*LOX1 in Tabak nur lokal in mit *Ppn* 0 infizierten Blättern, Stengeln oder Wurzeln exprimiert wurde. Darüber hinaus wiesen sie das überexprimierte *Nt*LOX1-GFP bei transgenem Tabak im Cytosol nach. Zu dieser 9-LOX (*Nt*LOX1; Acc. Nr.: X84040) zeigte das LOX cDNA Fragment (471 bp) die bereits diskutierte größte Homologie (Kap. 3.6).

Im Einklang mit dieser Arbeit zeigten Maccarrone et al. (1992) bei ozonbehandelten Setzlingen von Sojabohnen, eine Induktion der LOX-1 mRNA und eine Zunahme des LOX-1 Proteingehalts, sowie die Induktion der LOX-1 und LOX-2 Aktivität, wobei hier jedoch nur die Zeit bis 5 h nach Start Ozonexposition betrachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde keine Ozon-induzierte Veränderung der LOX1 mRNA in Blättern von *Arabidopsis thaliana* festgestellt (Sharma und Davis, 1994). Neuere DNA Microarray Studien zeigten bei *Arabidopsis thaliana* cv. Col-0 (6 h, 300 ppb O₃) nach 3 h eine ca. 3 fache Induktion der mRNA einer 9-LOX (Acc. Nr.: At3g22400, LOX5) und einer 13-LOX (Acc. Nr.: At1g72520, LOX4), wohingegen nach 12 h kein Unterschied mehr zu Kontrollen festzustellen war. Andere Zeitpunkte wurden in diesen Studien nicht analysiert (Tosti et al., 2006). Im Unterschied hierzu konnte in dieser Arbeit bei Untersuchungen mit ozonbehandelten (8 h, 300 ppb O₃) transgenen *Arabidopsis thaliana* LOX2, die Induktion chloroplastidärer LOX2 über einen längeren Zeitraum gezeigt werden (Kap. 3.15.2). Dies wird im Zusammenhang mit der Jasmonsäurebiosynthese in Kap. 4.5 gesondert diskutiert.

In dieser Arbeit war bei der im Vergleich zu Northern Blot Untersuchungen sensitiveren RT-PCR Analyse, bei Tabak cv. Bel W3 auch in unbehandelten Kontrollen eine geringe Menge an LOX Transkripten zu beobachten, die einen Tagesgang aufwies. Bei den RT-PCR Analysen kann man nicht ganz ausschließen,

dass die Primer verschiedene LOX Isoenzyme detektieren, wobei die Sequenzvergleiche mit den eingesetzten Primern für eine Detektion von möglichen 9-LOX cDNA Fragmenten (471 bp) sprechen (Kap. 3.7.1). Eine Amplifizierung von Verunreinigungen durch genomische DNA kann ausgeschlossen werden, da PCR Analysen mit den gleichen LOX-Primern und genomischer DNA keine Amplifikationsprodukte erbrachten (Daten nicht gezeigt). In Korrelation mit den Ergebnissen der RT-PCR Analysen zeigten die LOXs Enzym-Aktivitäten, für die sowohl 9-LOX- als auch 13-LOX-Aktivität in Frage kommt, in unbehandelten Kontrollen ebenfalls eine geringe konstitutive Aktivität mit Tagesgang, die in ozonbehandelten Pflanzen durch Ozon transient induziert wurde (Abb. 25 und Abb. 29). Es wird vermutet, dass dieser konstitutive Hintergrund in den Kontrollen im Zusammenhang mit kontinuierlich stattfindenden Um- und Abbauprozessen der Biomembranen steht. Hatanaka (1999) fanden zudem, dass Licht ein externer Stimulus für LOX aus Zellkultur von *Alfalfa* darstellte und ihre Aktivität im Licht jeweils höher als in Dunkelheit war. Dies könnte eine weitere Erklärung für den LOX Aktivitätsverlauf in den Kontrollen sein, der möglicherweise durch den lichtbedingten pH Wechsel (Photosynthese) in den Chloroplasten erfolgte. Bestätigt werden o. g. Vermutungen durch neuere Studien von Nemchenko et al. (2006), die eine zirkardiane Expression, hier einer 13-LOX mRNA, in Maispflanzen (*ZmLOX10*) zeigen konnten.

4.3 Korrelation zwischen Ozon-induzierter LOX Aktivität und reaktiven Sauerstoffspezies mit der Hypersensitiven Reaktion

Als ein charakteristisches Merkmal für die HR wird eine schnelle und transiente Bildung großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben, die als "oxidativer Burst" bezeichnet wird (Kap. 1.4.1; Lamb und Dixon, 1997). Dieser wird in der inkompatiblen Pflanze-Pathogen Wechselwirkung in zwei Phasen unterteilt. Die erste schwächere Phase wird als eine unspezifische biologische Reaktion angesehen, da sie auch bei kompatiblen nicht-HR verursachenden Interaktionen auftritt. Die zweite Phase des oxidativen Bursts wurde in früheren Studien für das Absterben der Pflanzenzellen (Signalfunktion) während der HR verantwortlich gemacht. Sie wird als eine Art „Programmierter Zelltod“ in Pflanzen angesehen und als eine aktive Reaktion (Bildung) der Pflanzenzelle diskutiert (Kap. 1.4.2; Levine et al., 1994; Greenberg, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Lamb und Dixon,

1997; Pasqualini et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigten andere Autoren, dass ROS alleine nicht ausreichend für den Hypersensitiven Zelltod sind (Baker und Orlandi, 1995; Glazener et al., 1996; Jalloul et al., 2002). Andere Studien zeigten vielmehr, dass die Lipoxygenase vermittelte Oxidation von Lipiden sowie die gebildeten Produkte einen wesentlichen Faktor während der HR darstellen. So hatte die Inhibition der LOX, die Inhibition des lokalen Zelltods zur Folge und umgekehrt führte die Aktivierung der LOX zu vermehrtem Zelltod (Rustérucci et al., 1999; Jalloul et al., 2002). Darüber hinaus induzierten exogen applizierte 9- und 13-Lipidhydro(per)oxide Zelltod und DNA Fragmentation in den Protoplasten aus Linsenwurzeln, sowie die Expression des Abwehrgens PR1b in Weizen (Weichert et al., 1999; Maccarrone et al., 2000). Demzufolge kommen möglicherweise als Induktor der LOX Aktivität (diese Arbeit) auch die während der HR gebildeten ROS selbst in Frage. So zeigten Maccarrone et al. (2000) anhand von Protoplasten aus Linsenwurzeln das die LOX Aktivität durch H_2O_2 induziert werden konnte. Als ein charakteristisches Merkmal des Zelltods wurde hierbei die DNA Fragmentierung, die auch ein typisches Verhalten bei Apoptose ist, beschrieben. In dieser Arbeit wurde daher bei Tabak cv. Bel W3 nach Ozonexposition (5 h, 150 ppb) der zeitliche Verlauf der ROS-Bildung (H_2O_2 , O_2^{*-}) sowie ihr Verteilungsmuster im Hinblick auf die nachgewiesene LOX Induktion und Lipidperoxidation/Nekrosen untersucht. Hierzu wurde das Blattmaterial nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mit den Nachweisreagenzien DAB für H_2O_2 bzw. NBT für O_2^{*-} gefärbt.

Die Akkumulation von Superoxidradikalen (O_2^{*-}) ergab eine diffuse Blaufärbung der gesamten Blattfläche sowohl bei ozonbehandelten wie auch bei unbehandelten Tabak cv. Bel W3 zu allen Zeitpunkten. Es waren keine signifikanten Unterschiede und keine Korrelation mit einer LOX Induktion oder Nekrosenbildung festzustellen (Tab. 9 und Abb. 41). Aufgrund des fehlenden Unterschieds zwischen Kontrollen und ozonbehandelten Tabakpflanzen (Abb. 41) scheint der möglichen Generierung von Superoxidanionen (O_2^{*-}) während der LOX Reaktion in Tabak wie sie Lynch und Thompson (1984) beschrieben, keine größere Bedeutung zuzukommen. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen von Schraudner et al. (1998) und Wohlgemuth et al. (2002), die ebenfalls nur eine diffuse schwache Akkumulation von O_2^{*-} bei ozonbehandeltem Tabak oder Tomaten fanden, die nicht mit auftretenden Nekrosen korrelierte. Dementgegen fanden Rossetti und Bonati (2001) eine mit NBT nachgewiesene Akkumulation von Superoxidanionen in Tabak cv. Bel

W3 und cv. Bel B zwischen 6 h – 26 h nach Start der Ozonbehandlung (2 h, 200 ppb O₃) und einen zweiten Peak nach 50 h nur bei cv. Bel W3. Das vergleichbare Auftreten von Superoxidanionen in Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B, macht eine Rolle bei der Nekrosenentwicklung, die nur bei cv. Bel W3 auftritt, daher unwahrscheinlich. Superoxid war jedoch bei verschiedenen ozonbehandelten *Arabidopsis thaliana* Varietäten, sowie bei *M. sylvestris* und *Rumex crispus* die Haupt- bzw. alleinige Komponente der ROS Akkumulation und korrelierte mit dem Zelltod. In der ozonsensitiven *Arabidopsis* Mutante *rcd1* (engl.: *radical induced cell death*) ging die Akkumulation von O₂^{*-} der Ausbreitung der Läsionen voran. Beides konnte durch den Einsatz von DPI (Diphenyliodonium; Hemmstoff Flavin-haltiger Oxydase wie NADPH-Oxydase) verringert werden (Overmyer et al., 2000; Wohlgemuth et al., 2002). Auch bei mit Tabakringspotvirus-infizierten *Vigna unguiculata* blieben die der O₂^{*-} zugeschriebenen Induktion von HR ähnlichen Nekrosen nach Infiltration mit SOD oder TIRON aus (El-Moshaty Beleid et al., 1993). In ähnlicher Weise konnte bereits andere Pathogen-induzierte ROS Bildung verringert werden (Levin et al., 1994; Jabs et al., 1996; Sagi und Fluhr, 2001). Die Autoren schlossen hieraus, dass es sich um eine enzymkatalysierte ROS Bildung handelt. In Untersuchungen anderer Autoren konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Akkumulation von O₂^{*-} und auftretendem Zelltod nachgewiesen werden. Infiltration von O₂^{*-} generierenden Systemen in *Arabidopsis* ergab keine Läsionen und Elicitor-behandelte Tabakzellkultur zeigte nach DPI Behandlung zwar verringerte ROS Bildung, aber gleich starke Ausprägung des Zelltod (Jabs et al., 1996; Dorey et al., 1999). Zur Klärung der Rolle von Superoxid bedarf es daher weiterer Untersuchungen.

Der Nachweis von H₂O₂ zeigte bei ozonbehandelten Tabakpflanzen cv. Bel W3 nach 3 h nur eine vereinzelte und schwache Induktion, nach 8 h jedoch unregelmäßig geformte, intensiv dunkelbraune Flecken, die aufgrund ihres Musters den Schluss nahe legten in den Bereichen gebildet zu werden, in denen später die Nekrosen entstehen (Abb. 17, Abb. 41 und Tab. 9). Diese Färbung zeigte sich nach 24 h als ringförmiges Muster um die Nekrosen herum. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Wohlgemuth et al. (2002), die bei ozonbehandelten Tabak und Tomaten ebenfalls eine Korrelation zwischen DAB gefärbten Bereichen und Nekrosen feststellten. In Übereinstimmung mit o. g. Ergebnissen wurde DAB nachgewiesene H₂O₂ Akkumulation bei Ozon behandeltem Tabak cv. Bel W3 auch zwischen 8 h –

48 h (2 h, 200 ppb O₃) von Rossetti und Bonatti (2001) bzw. Maxima nach 3 h und nach 12 h (5 h, 150 ppb O₃) von Pasqualini et al. (2003) dokumentiert. Für eine ozoninduzierte enzymkatalysierte H₂O₂ Bildung bei Tabak cv. Bel W3 spricht die Reduktion der DAB Färbung durch DPI (Schraudner et al., 1998). Der Nachweis von H₂O₂ nach 8 h (diese Arbeit) fällt zeitlich somit in den von Schraudner et al. (1998) und Pasqualini et al. (2003) im Apoplastenwasser (interzelluläre Waschflüssigkeit) von ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 detektierten zweiten oxidativem Burst. Subzellulär wurde die H₂O₂ Akkumulation extrazellulär in der Zellwand und im Apoplastenwasser der Palisadenparenchymzellen bei ozonbehandelten Tabak Bel W3 bzw. Birkenblättern nachgewiesen, bei letzteren auch an der Plasmamembran (Pellinen et al., 1999; Wohlgemuth et al., 2002). Für die enzymatische Bildung von ROS wurden verschiedene Enzyme wie NAD(P)H Oxydase, Apoplastische Peroxidase, Diamin- und Polyamin Oxydase und Oxalat Oxydase vorgeschlagen (Bestwick et al., 1998; Übersicht bei: Bolwell et al., 2002; Langebartels et al., 2002). Im Gegensatz zu dem ozonsensitiven Tabak cv. Bel W3 wurden in dem ozontoleranten Tabak cv. Bel B nach akuter Ozonexposition keine eindeutigen DAB-Färbungen oder der zweite oxidative Burst nachgewiesen (Schraudner et al., 1998; Rossetti und Bonatti, 2001; Wohlgemuth et al., 2002).

Setzt man die Ergebnisse, die in dieser Arbeit gezeigte Induktion der LOX durch Ozon und die Akkumulation von H₂O₂ bei Tabak cv. Bel W3 in zeitliche Beziehung zueinander (Tab. 9), so wäre auch eine Verstärkung der Induktion der LOX durch extra-/intrazelluläres H₂O₂ denkbar, da diese Verbindung im Gegensatz zu O₂^{*} frei über Membranen diffundieren kann. In einem weiteren Versuchsansatz wurde daher H₂O₂ (2 mM) exogen bei mittelalten Blättern von Tabak cv. Bel W3 appliziert. Es wurden jedoch keine LOX Transkripte mit Hilfe von Northern Blot Analysen nach 12 h nachgewiesen (Abb. 34) und auch keine Ausbildung von Nekrosen. Dies Ergebnis war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Orozco-Cárdenas und Mitarbeitern (2001), die ebenfalls nach der Applikation von Glucose plus Glucose Oxydase zur Produktion von H₂O₂ über den Stängel von Tomatenpflanzen, keine LOX Transkripte nachweisen konnten. Wie nachfolgend dargestellt, bleibt es jedoch zu bedenken, dass die Konzentration von H₂O₂ sehr entscheidend für die Geninduktion ist und die extern zugegebene Konzentration innerhalb der Pflanze durch das Antioxidative Schutzsystem (z. B. Katalase) möglicherweise schnell verändert wird. So zeigten Maccarrone et al. (2000) eine Induktion der LOX Aktivität

begleitet von erhöhter LOX Transkriptmenge durch Pulsapplikation von 1 mM H₂O₂ für 10 Minuten in Kulturen von Linsenwurzelprotoplasten. Wohingegen die gleiche Konzentration an H₂O₂ bei Tabakzellkulturen keine Lipidperoxidation (MDA-Gehalt) auslösten (Anderson et al., 1998). Sublethale H₂O₂ Konzentrationen werden bei der ozoninduzierten HR als Signal für die Expression von Abwehrgenen beschrieben (Chamnongpol et al., 1998; Rao und Davis, 1999). So induzierten niedrige H₂O₂ Konzentrationen (2-5 nM) die LOX aus Sonnenblumen Protoplasten wohingegen diese bei höherer Konzentration ausblieb (Vianello et al., 1995). Eine erhöhte Bildung von Abwehrgenen konnte auch bei transgenen Kartoffelpflanzen, die konstitutiv eine Glucose Oxydase aus Bakterien und damit eine schwache Bildung von H₂O₂ zeigten, nachgewiesen werden (Wu et al., 1995). Hohe Konzentrationen sind jedoch für Pflanzenzellen toxisch und führen zum Zelltod (Van Breusegem et al., 2001) wie es in einem Modell von Tenhaken et al. (1995) dargestellt wurde. Demzufolge war die in dieser Arbeit verwandte H₂O₂ Konzentration möglicherweise zu hoch, um LOX zu induzieren.

Neben der diskutierten Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen der ozoninduzierten LOX sowie der Akkumulation von H₂O₂ bei Tabak cv. Bel W3, besteht darüber hinaus jedoch auch die Chance, dass die ozoninduzierten ROS selbst, ungesättigte Fettsäuren auf nicht-enzymatischem Wege oxidieren (siehe Einleitung, Kap. 1.5.1). Neuere Untersuchungen gehen mittlerweile von einem Zusammenspiel enzymatischer und nicht-enzymatischer Bildung von Lipidhydroperoxiden bei der inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion aus, die zur HR beitragen. Da zu letzterer die ozoninduzierte LOX und Nekrosenentwicklung bei Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) eine große Ähnlichkeit zeigte, wäre dieses Zusammenwirken auch hier denkbar. So zeigten Göbel et al. (2003), dass im Vergleich zum Wildtyp die mit *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* infizierten 9-LOX-Antisense Kartoffelpflanzen eine reduzierte Bildung von 9-LOX Produkten aufwiesen, dies jedoch durch eine verstärkte Akkumulation von 13-LOX Produkten und einer erhöhten Akkumulation nicht-enzymatisch entstandener 12- und 16-Hydroxyoctadecatriensäuren ausgeglichen wurde. Sowohl die transgenen 9-LOX-Antisense Kartoffelpflanzen, als auch die nicht-transgenen Kartoffelpflanzen zeigten einen identischen Phänotyp (Nekrosenbildung). In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf mögliche autoxidative Prozesse bei den LOX Aktivitätsmessungen bei einem pH-Wert von 5.0 (Abb. 21). Ob es zu solch einem Prozess, möglicherweise

durch eine pH-Wert Änderung, die ausgelöst wurde durch die bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 nachgewiesene ROS Akkumulation kommt, bliebe in nachfolgenden Arbeiten zu untersuchen. Dies könnte mit neueren Analysemethoden erfolgen, die die Untersuchung der Regio- und Enantiomerelektivität der Fettsäurederivate und damit die Unterscheidung zwischen Autoxidationsprodukten und Metaboliten der LOX-Reaktion zuließen. Nach Stressapplikation kann man daher anhand der Reaktionsprodukte eine Aussage darüber treffen, ob und in welchem Ausmaß der 9- und/oder 13-LOX-Weg induziert wurde (Göbel et al., 2003; Montillet et al., 2004; 2005). Als Marker für eine nicht-enzymatische Bildung gelten 12-OH- bzw. 16-OH-Fettsäuren, da diese nicht durch LOX erzeugt werden. Ihre Akkumulation nach Induktion durch biotischen (Pathogene) oder abiotischen (Schwermetalle, Starklicht) Stress, konnte in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden. Allgemein wurde für diese Untersuchungen der Begriff des "oxylipin profiling" geprägt (Berger et al., 2001; Montillet et al., 2004; Montillet et al., 2005; Grun et al., 2007). Hierbei wurden jedoch auch Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenspezies während der HR festgestellt. So besteht die Hypothese, dass während der HR bei *Brassicaceae*n wie *Arabidopsis thaliana* besonders der 13-LOX-Weg aktiviert wurde, wohingegen, wie bereits dargestellt, während der HR bei *Solanaceae*n wie Tabak oder Kartoffel hauptsächlich der 9-LOX-Weg induziert wurde (Göbel et al., 2003; Montillet et al., 2004, -2005; Cacas et al., 2005; Andersson et al., 2006). In Übereinstimmung hierzu wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Ozon eine 13-LOX in transgenen *A. thaliana* LOX2 induzierte (Abb. 44). Wie in Kap. 4.2 beschrieben, wird die nach Ozonbehandlung auf Transkriptebene induzierte LOX bei Tabak cv. Bel W3 aufgrund der Sequenzvergleiche eher als mögliche 9-LOX diskutiert, wohingegen aufgrund der gezeigten JA Akkumulation, bei der nachgewiesenen LOX Aktivität 9-LOX und/oder 13-LOX Aktivität vermutet wurden (Tab. 9). Es wäre interessant zu bestimmen, in welchem Verhältnis Ozon den 9- und/oder 13-LOX-Weg bei Tabak cv. Bel W3 induziert hat und ob auch nicht-enzymatisch gebildete Lipidperoxidationsprodukte unter diesen Bedingungen auftreten.

4.4 Ozoninduktion von HPL- und ADH-Transkripten im Vergleich mit den Emissionen flüchtiger kurzkettiger Aldehyde und Alkohole bei Tabak

Wie Eingangs bereits erwähnt wurden bei den Tabakkultivaren cv. Bel W3 und cv. Bel B unter Ozonstress die Emissionen einer Reihe flüchtiger kurzkettiger C₆-Metabolite des LOX-Reaktionsweges nachgewiesen (Heiden et al., 1999a; 1999b; 2003). Als enzymatische Quelle dieser flüchtigen kurzkettigen C₆-Aldehyde und C₆-Alkohole wird der 13-HPL Zweig des LOX-Weges angesehen (Kap. 1.7.6; Abb. 4; Feussner und Wasternack, 2002), der vorhandene 13-Lipidhydroperoxide umsetzt, die enzymatisch durch eine 13-LOX gebildet werden (Abb. 3, Abb. 4; Kap. 1.7.6). In dieser Arbeit wurde die Induktion der LOX Aktivität (13-LOX und/oder 9-LOX) durch Ozon bei Tabak cv. Bel W3 gezeigt (Abb. 25). Dies impliziert die Existenz der zur Bildung von C₆-VOCs notwendigen 13-Lipidhydroperoxide. Vor diesem Hintergrund wurde ergänzend zu LOXs der Einfluss von Ozon auf die Expression der Transkripte von HPL und mit ersten Analysen auch von ADH bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B untersucht (Abb. 36 und Abb. 37). In guter Übereinstimmung handelt es sich bei der in dieser Arbeit amplifizierten HPL Sequenz aus ozonbehandeltem *N. tabacum* cv. Bel W3, aufgrund der Sequenzvergleiche (Kap. 3.6) höchstwahrscheinlich um eine 13-HPL. Darüber hinaus wurde bisher noch keine 9-HPL aus *Solanaceae*n beschrieben (Fammartino et al., 2007). In unbehandeltem Tabak cv. Bel W3 wurde eine geringe Grundinduktion der LOX Aktivität in den Morgenstunden (0 h, 24 h, 48 h) festgestellt (Abb. 25; Abb. 29). Auch die HPL- und ADH mRNA war hier zu allen Zeitpunkten exprimiert (Abb. 36). Dies korreliert mit der vorhandenen, aber sehr geringen Emission der C₆-Metabolite in unbehandelten Kontrollpflanzen vor Beginn der Ozonbehandlung (Heiden et al., 1999a). Auch in anderen unbehandelten Pflanzenspezies wie Kartoffel wurden HPL Proteine in den Blättern (Farmaki et al., 2007) nachgewiesen bzw. OsHPL-2 Transkripte in unbehandeltem Reis (Chehab et al., 2006). Nach Ozonexposition wurden in Tabak cv. Bel W3 neben der LOX- auch die HPL- und die ADH-mRNA nach 2 h exprimiert (Abb. 36). Im Anschluss kam es zu einem Anstieg der Emissionen von (Z)-3-Hexenylacetat sowie in geringerer Konzentration von (E)-2-Hexenal (Tab. 9, Heiden et al., 1999a). Übereinstimmend wurde bei einem Verwundungsexperiment mit Reis eine von drei HPL Isoformen (OsHPL3) nach 2 h im Blatt induziert, gefolgt von einem 5- bis 10 fachen Anstieg

von Hexenal und Hexanal Emissionen, was auf eine 13-HPL hindeutete (Chehab et al., 2006). Zum Zeitpunkt 24 h nach fünfständiger Ozonbehandlung (120-170 ppb) wurde in Tabak cv. Bel W3 zudem die folgenden C₆-Emissionen nachgewiesen: (Z)-3-Hexenal, Z-3-Hexen-1-ol, (E)-2-Hexen-1-al, 1-Hexanol, (Z)-3-Hexen-1-al sowie (Z)-3-Hexenylacetat. Hierbei wurde Z-3-Hexen-1-ol deutlich am stärksten emittiert (Heiden et al., 1999b). Der Nachweis einer erneuten stärkeren Ozoninduktion der HPL mRNA ab 32 h (Abb. 36) stand in Korrelation zu den Emissionen von (Z)-3-Hexenylacetat und (E)-2-Hexenal (Tab. 9, Heiden et al., 1999a). Im Gegensatz dazu erfolgte die Emission von (Z)-3-Hexenylacetat nach Verwundung innerhalb nur weniger Minuten (4,5 min) in *A. thaliana* Ler. Dies korrelierte hier jedoch nicht mit den HPL1 Transkripten, die nach 3 h das Maximum erreichten (D'Auria et al., 2007). Für die Bildung von Hexenolen aus Hexenalen ist die ADH verantwortlich (Abb. 4, Kap. 1.7.6). Die ADH mRNA Expression war jedoch nur gering (Abb. 36). Möglicherweise war auf Enzymebene für die Bildung von 3-Hexen-1-ol (Heiden et al., 1999b) jedoch hinreichend ADH vorhanden. Bei der Untersuchung der ADH Expression handelt es sich um erste Hinweise, die in fortführenden Arbeiten weiter analysiert werden sollten.

Die Studien anderer Autoren zur Regulation der ADH zeigten, dass in *Arabidopsis thaliana* Mutanten, die keine ADH exprimieren dennoch geringe Hexenol Emissionen (~60 %) detektiert wurden, die die Autoren auf nicht unterdrückte ADH Isoformen zurückführten (Bate et al., 1998). In diesen Experimenten hatte die erhöhte Akkumulation von Aldehyden (10x mehr Hexenal Emission als WT) keinen Einfluss auf die mRNA von LOX und AOS oder die Hexenal Emission. Dafür war die HPL Aktivität und HPL mRNA in den Mutanten um 50 % gegenüber dem WT erhöht (Bate et al., 1998). Speirs et al. (1998) zeigte, dass transgene Tomaten, die ADH überexprimierten höhere Konzentrationen an Hexanol emittierten als WT Pflanzen wobei die Aldehydkonzentration jedoch unverändert war.

Ein indirekter Hinweis darauf, dass Ozon in Tabak cv. Bel W3 eine 13-LOX induziert haben muss, ist dass sich alle nachgewiesenen flüchtigen C₆-Metaboliten auf 13-Linolensäurehydroperoxide (Hexenale/-ole) und in sehr geringen Mengen auch auf 13-Linolsäurehydroperoxide (Hexanale/-ole) zurückführen lassen. Es wurden keine signifikanten Mengen an C₉-Aldehyden oder -Alkoholen mittels der verwandten GC-MS Methode detektiert (Tab. 9, Heiden et al., 1999a; - 1999b). Dies steht in Übereinstimmung mit der bereits dargestellten Sequenzhomologie (13-HPL)

sowie dem bisher fehlenden Nachweis von 9-HPL in *Solanaceae*n (Kap. 3.6, Fammartino et al., 2007). Dass Pflanzen mehr Hexenale (aus Linolensäurehydroperoxiden) als Hexanale (aus Linolsäurehydroperoxiden) emittieren, fanden auch Hatanaka et al. (1983) und Zhuang et al. (1992). Als eine Ursache hierfür beschrieben Itoh und Vick (1999) bei Sonnenblumen eine 10fach höhere Substratspezifität der HPL für Linolen- im Gegensatz zu Linolsäurehydroperoxiden. Chehab und Mitarbeiter (2006) fanden in Reis zudem eine im Chloroplasten lokalisierte wundinduzierbare HPL (OsHPL3), die rekombinant exprimiert ausschließlich 13-Linolensäurehydroperoxide umsetzt und keine 13-Linolsäurehydroperoxide. Die am stärksten emittierte Verbindung nach Verwundung war in diesen Untersuchungen (E)-2-Hexenal. Bei Tabak wurde nach Verwundung (Z)-3-Hexen-1-ol 15 fach stärker emittiert als (Z)-3-Hexenal und kein Hexenal (Wang et al., 1999). Auch während der HR nach der inkompatiblen Interaktion von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infiziertem Pfeffer waren die Emissionen von 3-Hexen-1-ol am stärksten (Buonaurio und Servili, 1999). Der Substratpool an Linol- bzw. Linolensäure der LOXs ist demnach mit entscheidend für das C₆-Emissionsprofil. So ist Linolensäure zudem die am häufigsten in grünen Blättern vorkommende ungesättigte Fettsäure (Gunstone et al., 1994). In dieser Arbeit zeigte die ozoninduzierte LOX Aktivität keine eindeutige Substratpräferenz. Nur zum Zeitpunkt 24 h nach Start der Ozonbehandlung war die LOX Aktivität mit Linolensäure erhöht (Abb. 25 und Abb. 31). Dies korreliert mit den Ergebnissen des JA Gehalts, der ebenfalls nach 24 h erhöht war (Kap. 4.6) und ist ein weiterer Hinweis auf die Ozoninduktion einer 13-LOX. Variationen in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der C₆-VOCs, wie sie Heiden et al. (1999a) beschreiben, sind jedoch möglich und wurden auch nach Verletzung von Pflanzen durch Insekten oder Mikroorganismen beobachtet (Takabayashi et al., 1991).

Die bisher in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse weisen auf die Induktion einer 13-LOX durch Ozonbehandlung bei Tabak cv. Bel W3 hin. In den vorigen Kapiteln deuteten die Ergebnisse hingegen auf die Induktion einer 9-LOX durch Ozon bei Tabak cv. Bel W3. Hierfür sprach sowohl die Sequenzhomologie zu 9-LOX (Kap. 3.6 und Kap. 4.2), als auch der ähnliche Zeitverlauf, der LOX mRNA Expression und -Aktivität (9- und/oder 13-LOX) (Tab. 9), im Vergleich zu der LOX Induktion nach einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion während der HR. Diese wurde bei *Solanaceae*n vornehmlich als 9-LOX charakterisiert (vgl. Kap. 4.2 und Kap. 4.3). Es

wäre daher denkbar, dass Ozon eine 13- und/oder eine 9-LOX induziert, wobei die 9-Lipidhydroperoxide jedoch nicht zu flüchtigen C₉-VOCs weiter metabolisiert werden, sondern möglicherweise zu bisher bei ozonbehandeltem Tabak noch nicht näher untersuchten Produkten, wie z. B. Colnel- und Colnelensäure, die Fammartino et al. (2007) bei pathogeninfiziertem Tabak nachwiesen. Weber et al (1999) wiesen darüber hinaus eine weitere Umsetzung von 9-LOOHs durch eine 9-DES in pilzinfizierten Kartoffeln nach, was ebenfalls das Fehlen von C₉-VOCs erklären könnte. Auch eine bevorzugte Umsetzung von 9-Lipidhydroperoxiden durch eine EAS oder POX zu 9-Epoxy(hydroxy)-Verbindungen wäre denkbar (Hamberg et al., 1999; Blée, 2002), worauf in Kap. 4.7 nochmals näher eingegangen wird. Darüber hinaus könnte auch eine Substratspezifität der HPL für 13-Lipidhydroperoxide verantwortlich sein. Hierfür spricht auch, dass die in dieser Arbeit klonierte *N. tabacum* HPL eine Homologie von 100 % zu der HPL aus Tomate (Acc.: AF230372) und 90 % Homologie zu der HPL aus *N. attenuata* (Acc.: AJ44400) aufweist (Kap. 3.6), die aufgrund phylogenetischer Studien beide als 13-HPL (CYP74B) eingestuft wurden (Chehab et al., 2006). Eine 9-HPL, die 9-LOX Produkte metabolisiert wurde bisher noch nicht bei *Solanaceae*n beschrieben (Fammartino et al., 2007). So zeigte die HPL aus Soja Blättern und Tomaten nur eine geringe Reaktivität mit 9-Lipidhydroperoxiden jedoch eine hohe Reaktivität mit 13-Lipidhydroperoxiden (Gardner et al., 1991; Suurmeijer et al., 2000).

In unbehandeltem Tabak cv. Bel B war die HPL konstitutiv exprimiert und wurde durch Ozon nur nach 32 h deutlich induziert. Die ADH-Transkripte wurden durch Ozon gering wischen 6 h und 10 h induziert (Abb. 37). Auch waren die 7 h und 24 h nach Start der Ozonbehandlung gemessenen C₆-Emissionen genauso gering wie zu Beginn der Behandlung (Heiden et al., 1999a; Heiden et al., 1999b). Möglicherweise wurde in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B keine 13-LOX, als limitierender Schritt der C₆-VOCs Synthese, induziert oder gebildete 13-Lipidhydroperoxide in anderen LOX-Wegen z. B. der JA-Biosynthese, metabolisiert. In nachfolgenden Arbeiten könnte als Hinweis z. B. der Gehalt an JA in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B untersucht werden. Wie zuvor beschrieben werden vornehmlich 9-Lipidhydroperoxide für HR-ähnlichen Zelltod verantwortlich gemacht (Rustérucci et al., 1999; Cacas et al., 2005) und Jasmonate, die sich von 13-Lipidhydroperoxiden ableiten, eine negativ regulierende Funktion bei der Ausbreitung von ozoninduziertem Zelltod zugeschrieben (Overmyer et al., 2000; Kanna et al., 2003;

Overmyer et al., 2003; Tuominen et al., 2004, Kangasjärvi et al., 2005). Dies korreliert mit dem Resultat, dass bei cv. Bel B nur nach 12 h schwache Akkumulationen ozoninduzierter vornehmlich 9-LOX mRNA (Kap. 3.6 und Kap. 4.2) nachgewiesen werden konnten, die deutlich geringer waren im Vergleich mit cv. Bel W3 und darüber hinaus auch kein sichtbarer Zelltod detektiert wurde (Abb. 17 und Abb. 30). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es in transgenen Kartoffelpflanzen, die durch Kosuppression die im Chloroplasten lokalisierte 13-LOX (LOX-H1) nicht mehr exprimierten, auch deutlich verminderte C₆-Emissionen im Vergleich zum Wildtyp zeigten (5 % weniger Hexanal, 2 % weniger E2-Hexenal und 3 % weniger Z3-Hexenol) (Léon et al., 2001) und in neueren Studien 1.200 fach weniger 2-E-Hexenal (Salas et al., 2005). Umgekehrt fanden Hause et al. (2000) eine Zunahme von 2-E-Hexenal um 50 % in transgenen Tabakpflanzen, die eine 13-LOX aus Gurken Lipidkörpern exprimierten. Es wird vermutet, dass anfallende für die Pflanzenzellen toxische LOOHs direkt u. a. durch den HPL Weg entgiftet werden und dies umso mehr je mehr gebildet wurden. Dass HPL für die Entgiftung von LOOHs eine wichtige Rolle spielen, zeigten auch Griffith et al. (2000), die bei Antisense HPL Kartoffelpflanzen eine Erhöhung des LOOH Spiegels um 38 % fanden und Salas et al. (2005), die eine Abnahme der 2-E-Hexenal Emission um das 400 fache gegenüber dem Wildtyp feststellten. In *A. thaliana* war darüber hinaus die Emission von Z-3-Hexenal in mit *Botrytis cinerea* infizierten oder durch Insektenfraß (*Pirys rapea*) geschädigten Antisense-HPL Pflanzen gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert (Shiojiri et al., 2006). In dieser Arbeit wurde eine gute Korrelation zwischen der Induktion der LOX Aktivität (Tab. 8) und nachfolgenden C₆-Emissionen bei Tabak cv. Bel W3 gefunden (Heiden et al., 1999a; Heiden et al., 1999b). In Tomate wurde dagegen eine Differenz zwischen den spezifischen Enzymaktivitäten von LOX, HPL und ADH und der Menge an gebildeten C₆- und C₉-VOCs gemessen (Yilmaz et al., 2001). Darüber hinaus wurden in verwundeten *A. thaliana* (L.) Heynh cv. Ler die HPL Transkripte nach der Detektion der C₆-VOCs induziert (D'Auria et al., 2007). Die Abstimmung des LOX-/HPL-Wegs scheint sehr komplex und man weiß noch wenig über die Regulation der selbigen. Neuere Studien von Chehab et al. (2006, -2007) mit Reis und *A. thaliana* zeigten, dass je nach Pflanzenspezies die Menge an HPL-Isoenzymen und Reaktionsprodukten (C₆-VOCs) deutlich variieren kann. Bei Reis wurden drei HPL Isoformen nachgewiesen (OsHPL1 - OsHPL3). Die Enzyme OsHPL1 und OsHPL2 akzeptierten 9- und 13-

Lipidhydroperoxide als Substrat und ihre mRNA wurde in Wurzeln, Stengeln und Blättern exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde OsHPL3 mRNA nur in Blättern exprimiert und setzte enzymatisch ausschließlich 13-Lipidhydroperoxide um. Auch wurde bei transgenen *A. thaliana*, die eine Reis HPL (OsHPL1) in Blättern und Wurzeln überexprimierten, die Bildung von E-2-Hexenal nur im Blatt nachgewiesen und nicht in der Wurzel. Die Autoren schlossen hieraus, dass die Bildung der C₆-VOCs möglicherweise auch gewebespezifisch reguliert sein könnte.

Weiterführend wird diskutiert, dass die räumliche Trennung verschiedener LOX-Weg Enzyme innerhalb der Chloroplasten, schon zu verschiedenen Metaboliten führen könnte. Hinweise geben GFP-Fusionsstudien bei Kartoffel, die LOX-H1, LOX-H3 und AOC im Stroma und im Thylokoiden der Chloroplasten nachwiesen, wohingegen AOS und 13-HPL eher an die Thylakoidenmembran assoziiert vorlagen. Die Autoren vermuteten, dass die durch eine LOX-H1 generierten 13-Lipidhydroperoxide durch eine 13-HPL und die durch eine LOX-H3 gebildeten 13-Lipidhydroperoxide durch eine 13-AOS weiter metabolisiert werden könnten (Farmaki et al., 2007). Diese Hypothese könnte auch für ozonbehandelten Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) gelten, da neben den Hinweisen auf vorhandene LOX Isoformen (Abb. 27) auch JA Akkumulation und C₆-Emissionen nachgewiesen wurden (Tab. 9). Dass ein Zusammenhang zwischen der Entstehung flüchtiger VOCs und der HPL aus Chloroplasten besteht, wurde bereits zuvor u. a. bei Versuchen mit Tomaten, Erbsen- und Spinatblättern, isolierten Tee-Chloroplasten, sowie der Mikrosomenfraktion einer Anzahl von Früchten, beschrieben (Hatanaka et al., 1983; Hatanaka et al., 1987; Blée und Joyard, 1996; Vick und Zimmermann, 1987b; Matsui, 1998; Froehlich et al., 2001). Neben HPL und LOX sind auch ADH-Isoenzyme im Chloroplasten vertreten, so dass die räumliche Nähe zueinander die Entstehung flüchtiger C₆-Alkohole möglicherweise begünstigt (Blée und Joyard, 1996). Ergänzend zu den vorliegenden Ergebnissen (diese Arbeit) könnten in nachfolgenden Studien bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 HPL- und ADH-Enzymaktivitätsmessungen, verbunden mit Produktanalysen, durchgeführt werden, um weitere Hinweise zu erhalten.

Auf die möglichen Funktionen dieser flüchtigen C₆-Blatt-Aldehyde bzw. -Alkohole, wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (Kap. 1.7.6). Am besten ist ihre Bedeutung bei der Abwehr von Pathogenen untersucht, deren Ausbreitung sie durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften verhindern (Major et al., 1960; Zeringue und

McCormick, 1989; Croft et al., 1993; Deng et al., 1993; Slusarenko, 1996; Matsui et al., 2006; Shiojiri et al., 2006). Hierbei zeigten ungesättigte VOCs eine effektivere Wirkung als gesättigte (Deng et al., 1993). Unter Ozonstress kann man eine prophylaktische Aktivierung von Schutzgenen in benachbarten nicht geschädigten Zellen durch C₆-VOCs vermuten, um z. B. einer möglichen Pathogenbesiedlung über geschädigtes Gewebe, entgegenzuwirken. So förderten C₆-C₁₀ Alkenale die Produktion von Phytoalexinen (u. a. Scopoletin) in verwundeten Baumwoll-Pflanzen (Zeringue, 1992). Darüber hinaus induzierte exogen appliziertes trans-2-Hexenal PAL und CHS, Gene des Phenylpropanoid Synthese Weges in Tomaten, jedoch nicht PR1- bzw. PR2-Proteine oder Thionine (Bate und Rothstein, 1998; Sivasankar et al., 2000). Die Verbindungen werden daher auch als flüchtige Phytoalexine bezeichnet (Croft et al., 1993). Möglicherweise haben die nachgewiesenen C₆-Aldehyde (Tab. 9) auch bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 zur Induktion von Abwehrgenen beigetragen. Dies ließe sich durch z. B. exogene Applikation in nachfolgenden Arbeiten testen. Durch Ozon konnte die mRNA Induktion der Abwehrgene basische Chitinase und basische β -1,3-Glucanase bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B, der keine signifikanten C₆-Emissionen zeigte, nachgewiesen werden (Abb. 36 und Abb. 37). Es wird daher keine Beteiligung der C₆-VOCs an der mRNA Expression von Chn und Glc angenommen.

Die Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsel-Wegs durch C₆-Emissionen könnte zu gesteigerter Ligninsynthese beitragen und so indirekt an der Verstärkung der Zellwände während der Läsionenbildung beteiligt sein. Bei Tabak cv. Bel W3 wurde beispielsweise eine scharfe Abgrenzung zwischen nekrotisiertem und intaktem Gewebe der Blätter beobachtet (Abb. 17). Dies wird auf ozoninduzierte Verbindungen wie Lignin, Phenole und Anthocyane zurückgeführt wobei letztere als autofluoreszierende Ringe um die Läsionen herum in Tabak (Schraudner et al., 1992; Pasqualini et al., 2003) und Pappel (Strohm et al., 1999) zu beobachten waren. Dass Ozon einige Enzyme der Ligninbiosynthese wie Cinnamylalkoholdehydrogenase oder PR2 induzierte, zeigten auch D'Haese et al. (2006) mittels Microarray bei *A. thaliana*, wobei hier die Expositionsdauer 2 Tage (8 h, 150 ppb O₃) betrug. Anthocyan-Bildung wurde in Soja Keimlingen auch durch MeJa-Behandlung induziert, einer weiteren flüchtigen Verbindung des LOX-Wegs (Franceschi und Grimes, 1991) auf die an anderer Stelle näher eingegangen wird.

Neben diesen "biologisch aktiven Eigenschaften" kann man auch regulatorische Funktionen der VOCs in Abstimmung mit den anderen LOX-Wegen vermuten. Eine indirekte Funktion der C₆-VOCs könnte darin bestehen, die Signalkaskade des Oxylipid Synthese Wegs zu JA und ihren Derivaten durch Abfangen ihrer Substrate zu unterbinden (Ventilfunktion) und Jasmonat vermittelte Genexpressionen/-repressionen damit zu stoppen oder im Umkehrfall zu fördern.

So induziert MeJa die 13-HPL, was die Synthese von biologisch aktiven Hexanal fördert und die Synthese hin zu JA und MeJa abnehmen ließ (Avdiushko et al., 1995). Exogen appliziertes trans-2-Hexenal wiederum induzierte LOX (positives feedback) und stellte damit die Synthese der LOOH Vorläufermoleküle sicher (Bate und Rothstein, 1998). In anderen Untersuchungen wurde die HPL durch 1 mM 2-E-Hexenal vollständig inhibiert (Suurmeijer et al., 2000). Diese Produkthemmung könnte die Umleitung der LOOHs in andere Synthese-Wege beschleunigen. Es ist denkbar, dass die beschriebenen Wechselwirkungen auch bei Pflanzen unter Ozonbelastung zum tragen kommen.

Wie zuvor beschrieben, scheint die HPL Aktivität eng mit den Chloroplasten verknüpft zu sein und wurde bei Kartoffel ausschließlich dort exprimiert (Farmaki et al., 2007). Zusätzlich führte die Kosuppression der im Chloroplasten lokalisierten 13-LOX (LOX-H1) zu deutlich verminderter C₆-Emission (Léon et al., 2001). Es stellte sich daher in dieser Arbeit die Frage, ob Ozon LOXs in den Chloroplasten induzieren kann und die C₆-Emissionen (Heiden et al., 1999a; - 1999b; - 2003) ihren Ursprung in diesem Zellkompartiment haben könnten.

4.5 Ozon- und Methyljasmonat-Induktion chloroplastidärer LOX2 bei transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC in Korrelation zu Nekrosen

Für diese Untersuchung stand mit der transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC ein Modellorganismus zur Verfügung (Jensen et al., 2002) mit dem die Aktivierung des LOX2 Promotors anhand der GUS-Aktivität sichtbar gemacht werden konnte. *A. thaliana* LOX2 wird als im Chloroplasten lokalisiert beschrieben (Bell und Mullet, 1993; Bell et al., 1995). Ein kurzer Ozonpuls (8 h; 300 ppb O₃) führte bei den Pflanzen zu punktförmiger Induktionen der GUS-Aktivität via LOX2-Promotor auf einzelnen Blättern, wohingegen unbehandelte Kontrollen keine LOX2 Aktivität zeigten (Abb. 44). Die punktförmige LOX2 Induktion zeigte Ähnlichkeit mit den ozoninduzierten Nekrosen (Abb. 42) und lässt eine Beteiligung hieran vermuten. Die

zeitliche Auflösung der LOX2 Induktion nach Ozonbehandlung ergab steigende GUS Aktivitäten ab 8 h mit einem Maximum nach 28 h und anschließender Abnahme (Abb. 45). Die zuvor bei Tabak cv. Bel W3 aufgestellte Hypothese das Ozon auch eine chloroplastidäre LOX induzieren kann, konnte hier bei der transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC bestätigt werden. Eine nicht-chloroplastidäre LOX1 mRNA wurde hingegen in *A. thaliana* nicht durch Ozon induziert (Sharma und Davis, 1997). Eine Induktion chloroplastidärer LOX kann bei *A. thaliana* darüber hinaus auch durch Methyljasmonat, Pathogene und Absisinsäure (ABA) erfolgen (Bell und Mullet, 1993; Melan et al., 1993; Sasaki et al., 2001). In transgenen *A. thaliana* LOX2 GUS/FLUC zeigte ABA (100 μ M) jedoch keine Aktivierung der LOX2 (Jensen et al., 2002). Das hydrophobe und wie Ozon volatile MeJa diente bei diesen Versuchen als Positivkontrolle. Es wurde eine dosisabhängige MeJa-Induktion der chloroplastidären LOX2 beobachtet (Abb. 46). Auch Koo et al. (2007) fanden eine Induktion der LOX2 mRNA nach Applikation von 0,1 mM MeJa für 6 h bzw. 24 h in *A. thaliana* Col-0, wobei diese durch gleichzeitige Applikation von 0,1 mM bzw. 1 mM SA, deutlich verringert wurde. Ergebnisse mit Tabak Zellkulturen zeigten darüber hinaus ebenfalls eine dosisabhängige MeJa-Induktion der LOX (Véronési et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit induzierte über die Gasphase appliziertes MeJa auch in Tabak cv. Bel W3 die LOX auf Transkript- und Proteinebene. Hierbei war auffällig, dass im sauren (5.0) pH Bereich keine erhöhte LOX Aktivität gegenüber den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden konnte, wohl aber bei pH 7 und pH 8 (Abb. 34 und Abb. 35) was im Einklang steht mit der zuvor diskutierten Aktivierung einer chloroplastidären LOX. Eine gezielte Induktion chloroplastidärer LOX durch MeJa wurde auch transient in Tomatenblättern (Heitz et al., 1997) sowie bei Weizen und Reis nachgewiesen (Feussner et al., 1995a; Vörös et al., 1998; Schaffrath et al., 2000). Übereinstimmend ließen sich die in der Vakuole lokalisierten LOX4 und LOX5 aus Sojakeimlingen nicht durch MeJa induzieren sondern nur durch Auxin (Wang et al., 1999). Im Gegensatz dazu induzierte MeJa bei Baumwolle die 9-LOX- und 13-LOX Aktivität im Verhältnis 77/23 (Marmey et al., 2007), obwohl bislang keine plastidäre 9-LOX bekannt ist (Liavonchanka und Feussner, 2006). Dies bedeutet, dass MeJa auch nicht-chloroplastidäre LOX induzieren kann. Im Gegensatz zu MeJa induzierte Ozon die LOX Aktivität bei Tabak cv. Bel W3 sowohl im sauren (5.0) als auch im basischen (7.0 - 8.0) pH Bereich (Abb. 31). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass

Ozon in Tabak cv. Bel W3 mehr LOX Isoformen durch verschiedene und/oder sich überlappende Reaktionskaskaden aktiviert als exogen appliziertes MeJa alleine, so dass noch andere Signalmoleküle an der Induktion der LOX Aktivität beteiligt sein müssen. Möglicherweise ist auch ein anderes Jasmonat als MeJa an der Induktion von LOX unter Ozonstress beteiligt, da Zadra et al. (2006) keine Veränderung der endogenen MeJa Konzentration bei ozonbehandelten (5 h, 200 bbp O₃) Tomaten feststellten. Auch in Weizen wurden unterschiedliche LOX Isoformen nach MeJa oder Elicitorbehandlung (Pgt; *Puccinia graminis P. sp. tritici* Erikss. & Henn.) induziert (Bohland et al., 1997). Darüber hinaus wurden LOXs durch MeJa auch in Sojabohne (Grimes et al., 1992), *Arabidopsis* (Bell et al., 1995; Melan et al., 1993, Stotz et al., 2000), Weizen (Feussner et al., 1995a), *Phaseolus vulgaris* L. (Porta et al., 1999) und Tomate (Heitz et al., 1997) induziert. Eine Übersicht über MeJa-responsive Gene bei *Arabidopsis thaliana* geben Sasaki et al. (2001), die mittels Macroarray 2880 cDNA Klone testeten. MeJa bewirkte hier u. a. die Induktion der Transkripte von LOX2, AOS, OPR1 und OPR3, d. h. eine positive Feedback Induktion der JA Biosynthesegene. Eine solche Aktivierung konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden und wird nachfolgend diskutiert.

In dieser Arbeit zeigten die histochemischen Ergebnisse MeJa-behandelter *Arabidopsis* Pflanzen (Abb. 44) im Gegensatz zu der punktförmigen Aktivierung der GUS via LOX2 Promotor nach Ozonbehandlung (s. o.), eine gleichmäßige Aktivitätsverteilung der LOX/GUS über die gesamte Blattspreite hinweg. Dieses Induktionsmuster nach MeJA Behandlung fanden auch Jensen et al. (2002) wobei genauere Untersuchungen die GUS Aktivität unter dem LOX2 Promotor im Mesophyll und vaskulären Gewebe nachwiesen. Der Transport von MeJa erfolgt, wie neuere Studien mit Radioisotop ¹¹C-markiertem MeJa exogen und nur lokal an einem Tabakblatt appliziert zeigten, sowohl im Phloem- als auch im Xylemstrom (Thorpe et al., 2007). Man kann annehmen, dass Jasmonate an der ozoninduzierten punktförmigen Verteilung der LOX2-GUS Aktivität beteiligt sein könnten. Dann lassen die unterschiedlichen Induktionsmuster des LOX2 Promotors in *Arabidopsis* LOX2 GUS/FLUC durch Ozon oder MeJa vermuten, dass als Reaktion auf akuten Ozonstress Jasmonate (z. B. JA oder MeJa) nur lokal in der nächsten Umgebung von Nekrosen in ausreichender Konzentration gebildet werden und dadurch die LOX Aktivität nur in angrenzenden Nachbarzellen induziert wird. Da die stärkste Ozoninduktion der LOX2-GUS Aktivität (Abb. 45 und Abb. 44) zu einem späten

Zeitpunkt (28 h) erfolgte, wäre es desweiteren umgekehrt denkbar, dass die lokale Aktivierung der LOX2 durch Ozon zu Jasmonaten führt, die wiederum zu einer Induktion von Schutzsubstanzen zur Abgrenzung des gesunden Gewebes und somit zu einer Terminierung der Läsionen beiträgt. In guter Übereinstimmung hierzu war in Tabak cv. Bel W3 nur zum Zeitpunkt 24 h nach Start einer fünfstündigen Ozonbehandlung Jasmonsäure nachweisbar (Tab. 7). Hierauf wird in einem späteren Abschnitt nochmals eingegangen. Passend zu der schwachen *A. thaliana* LOX2 Induktion durch Ozon bis nach 24 h (Abb. 45) in dieser Arbeit, fanden Overmyer et al. (2005) ebenfalls nur eine geringe Akkumulation freier JA in ozonbehandelten *A. thaliana* Col-0 (6 h, 300 ppb O₃), wohingegen im Vergleich bei der ozonsensitiven Mutante *A. thaliana rcd1* (engl.: *radical-induced cell death1*) eine deutliche Akkumulation freier JA zwischen 5 h und 24 h nachgewiesen wurde. Es wurde darüber hinaus angenommen, dass eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber JA zu einer herabgesetzten Terminierung der Läsionen führt, was auch durch die höhere Ozonsensitivität der Doppelmutante *A. thaliana rcd1 jar1* (*jar1*, engl.: *jasmonat resistant*) bestätigt werden konnte (Overmyer et al., 2005). Eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber JA zeigte auch die *A. thaliana* L. cv. Ws-2 Mutante *oji1* (Ozon-sensitiv und JA-insensitiv 1), die ebenfalls eine stärkere Läsionenbildung nach Ozonexposition zeigte als der Wildtyp. Als Ursache hierfür vermuteten die Autoren eine JA-vermittelte Unterdrückung der ozoninduzierten Ethylenemission, von der angenommen wird, die Läsionenbildung zu fördern (Kanna et al., 2003). Den Nachweis, dass MeJa nur in direkter Umgebung verletzter Regionen gebildet wurde, erbrachten u. a. Kenton et al. (1999) bei Tabakblättern. Auch verwundete Tomatenpflanzen akkumulierten OPDA und JA nur lokal und nicht systemisch (Strassner et al., 2002). Histochemisch wurde darüber hinaus bei transgenen *A. thaliana* gezeigt, dass JA und OPDA die AOS nur lokal am Applikationsort induzieren und nicht systemisch (Kubigsteltig et al., 1999).

Die Ergebnisse zeigen, dass Ozon in *Arabidopsis* zur Induktion chloroplastidärer LOX2 führt. Diese kann Lipidhydroperoxide plastidären Ursprungs bilden, die weiter durch im Chloroplasten lokalisierte HPLs metabolisiert werden können (Kap. 1.7.6). Die gemessenen C₆-Emissionen bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 (Heiden et al., 1999a; 1999b) könnten somit sowohl cytosolischen als auch plastidären Ursprungs sein.

4.6 Korrelation zwischen Ozon-induzierten Transkripten von AOC und OPR mit dem endogenen Gehalt an freier Jasmonsäure bei Tabak

Die detektierten flüchtigen C₆-Metabolite in Tabak Bel W3 zeigten alle in ihrem zeitlichen Verlauf einen transienten Emissionseinbruch um die 24 h nach Start Ozonbehandlung (Heiden et al., 1999a). Da zu diesem Zeitpunkt die höchste LOXs Aktivität nachgewiesen wurde (Abb. 25) und somit angenommen werden kann, dass ausreichend Substrat (Fettsäurehydroperoxide) für die HPL vorlag, wird der Emissionseinbruch dadurch erklärt, dass der Großteil der Fettsäurehydroperoxide zu diesem Zeitpunkt nicht in den HPL-Weg fließt und in die C₆-VOCs gespalten wird, sondern in einen oder mehrere der fünf konkurrierenden Stoffwechselwege (Kap. 1.6; Abb. 4). Die physiologische Kontrolle, welche die LOOHs in den einen oder anderen Metabolismusweg dirigiert, ist bisher nicht bekannt. Ein möglicher Mechanismus könnte die Aktivierung der Enzyme durch die Änderung des pH-Wertes in ihrer Mikroumgebung sein, z. B. durch die Zerstörung der Zellkompartimentierung (Membranen/Nekrosen) nach Ozonexposition. Die Regulation könnte auch durch die Blockierung des HPL-Weges durch Produkt- (1 mM 2 E-Hexenal; Suurmeijer et al., 2000) oder Substrathemmung (Linolensäurehydroperoxide; Hatanaka et al., 1983) erfolgen. Desweiteren könnte das Konzentrationsverhältnis einzelner LOX-Weg Metabolite zueinander, anstelle einer Absolutkonzentration bestimmter Metaboliten, zu einer Aktivierung bestimmter Enzyme des LOX-Weges führen. Der Nachweis der LOX Aktivität über die Bildung von Linol- und Linolensäurehydroperoxiden war in dieser Arbeit zum Zeitpunkt 12 h bis 24 h nach Ozonexposition am höchsten (Abb. 25 und Tab. 9). Dies führte aufgrund der verminderten C₆-Emissionen nach 24 h (Tab. 9 und Heiden et al., 1999a) zu der Annahme, dass es im weiteren Verlauf des LOX-Weges zur Produktion anderer Signalmoleküle wie z. B. Jasmonsäure (JA) kommt, die zur Abwehrantwort der Pflanze auf Ozon beitragen könnten (Kap. 1.7.5). JA ist als interzellulärer sekundärer Botenstoff bekannt, der eine Vielzahl von Abwehrantworten bei Pflanze-Pathogen Wechselwirkungen hervorruft (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Wasternack, 2007).

Als ein Endprodukt des AOS Weges wurde in diesem Zusammenhang zu unterschiedlichen Zeiten aus den Blättern von Tabak cv. Bel W3 nach Ozonexposition (5 h, 150 ppb) der Gehalt an freier Jasmonsäure (JA) mittels GC-MS bestimmt. Freie JA wurde ausschließlich in Blättern, die 24 h nach Start der

Ozonbehandlung geerntet wurden nachgewiesen (Tab. 7 und Tab. 9). Dies korreliert exakt mit dem Einbruch bei den C₆-Emissionen, die sich ebenfalls von 13-Lipidhydroperoxiden ableiten (Tab. 9). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei Tabak cv. Bel W3 24 h nach Start der Ozonbehandlung die möglicherweise durch eine 13-LOX gebildeten LOOHs in den in den Chloroplasten lokalisierten AOS-Weg weiter metabolisiert wurden (Kap 1.7.5). Auch bei *Arabidopsis* und hybriden Pappelklonen induzierte Ozon einen Anstieg des JA Gehalts und der Transkripte des JA Markergens PDF1.2 (Koch et al., 2000; Rao et al., 2000; Rao et al., 2002; Kanna et al., 2003). In ozonbehandelten Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. New Yorker (5 h, 200 ppb O₃) stieg der Gehalt an Jasmonsäure im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, 11 h nach Start der Ozonbehandlung an (13 fach) und erreichte nach 14 h das Maximum, wohingegen die endogene Konzentration an Methyljasmonat unverändert blieb (Zadra et al., 2006). Dieser zeitlich frühere Ozon-induzierte Anstieg von JA im Vergleich zu den Daten der vorliegenden Arbeit (Tab. 7 und Tab. 9), ist neben der Verwendung verschiedener Pflanzenspezies möglicherweise auch in der höheren Ozonkonzentration begründet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden bei anderen Untersuchungen mit ozonbehandelten Tomaten (cv. Pearson; 4 h, 200 ppb O₃) Transkripte des JA Markergens PINII (Proteinase Inhibitor II) ebenfalls nur nach 24 h induziert (Castagna et al., 2007).

Die in dieser Arbeit untersuchte mRNA Expression der Allenoxid-Cyclase (AOC) und 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR), sollte erste Hinweise darauf geben, welche Veränderungen Ozon in Richtung Jasmonsäure Biosynthese auf Transkriptebene hervorruft. Die Ergebnisse für AOC und OPR, die mit ozonbehandeltem Tabak cv. xanthii.nc Nah-G erzielt wurden, werden in Kapitel 4.8 im Hinblick auf die Korrelation mit SA, gesondert diskutiert. AOC wurde bei Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3 unterschiedlich stark konstitutiv auch in unbehandelten Kontrollen exprimiert (Abb. 36 und Abb. 37). Diese konstitutive AOC Genexpression fanden Castagna et al. (2007) auch in unbehandelten Tomatenblättern des Wildtyp cv. Pearson. Ozon induzierte AOC bei Tabak cv. Bel W3 am stärksten zwischen 2 h und 24 h mit einem Maximum nach 5 h (Abb. 36). Im Unterschied dazu war bei Tabak cv. Bel B die AOC Induktion gegenüber den Kontrollen gering und stieg nur ab 32 h an. Im Vergleich hierzu wurden in ozonbehandelten (4 h, 200 ppb O₃) Tomaten AOC Transkripte bei cv. Pearson zwischen 5 h zunehmend bis 24 h

induziert (Castagna et al., 2007). Auch die OPR mRNA wurde in unbehandelten Kontrollen in beiden Tabak Kultivaren konstitutiv exprimiert (Abb. 36 und Abb. 37). Die Induktion der OPR Genexpression erfolgte nach Ozonbehandlung bei Tabak cv. Bel B am deutlichsten zwischen 8 h und 24 h mit einem Maximum nach 12 h (Abb. 37) und bei Tabak cv. Bel W3 am stärksten zwischen 5 h und 12 h mit einem Maximum nach 8 h. Die Akkumulation der OPR Transkripte war somit nicht in direkter Übereinstimmung mit der JA Akkumulation nach 24 h bei Tabak cv. Bel W3. Das Vorliegen von OPR auf Enzymebene zu diesem Zeitpunkt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Diskrepanz zwischen dem Auftreten von JA Akkumulation und Transkripten der JA Biosynthesegene fanden hingegen auch andere Autoren, was nachfolgend dargestellt wird.

Ozon (6 h 200 ppb O₃) induzierte OPR3 mRNA auch in *A. thaliana* cv. Wassilewskija (Wildtyp) nach 3 h und 6 h, wohingegen diese Induktion bei OPR3 Knockout-Mutanten (Hintergrund: *A. thaliana* cv. Wassilewskija) ausblieb. Die OPR3 Knockout-Mutanten waren ozonsensitiver im Vergleich zum Wildtyp. Diese erhöhte Ozonsensitivität führten die Autoren aufgrund des unterbrochenen JA-Biosynthesewegs, auf eine fehlende Transkriptinduktion antioxidativer Schutzenzyme, durch ozoninduzierte Jasmonate, zurück. Sie konnten zeigen, dass in den *opr3*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Ozon nicht die mRNA von Gammaglutamylcysteinsynthetase1 (GSH1), Dehydroascorbatreductase (DHAR) und GDP-Mannosepyrophosphorylase (VTC1) induzierte. Transkripte dieser drei Enzyme wurden jedoch durch Behandlung mit JA (200 µM) induziert. Die JA Biosynthese scheint somit für die Ozontoleranz notwendig (Sasaki-Sekimoto et al., 2005).

Zusammengenommen induzierte Ozon in dieser Arbeit AOC und OPR auf Transkriptebene bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B wie beschrieben zu unterschiedlichen Zeiten und Intensitäten. Bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 akkumulierte die JA (24 h, Tab. 7) deutlich nach der Transkripterhöhung von AOC (5 h max.) und OPR (8 h max.). Dass eine Transkriptinduktion von AOC nicht von einer JA Akkumulation begleitet sein muss, fanden auch Stenzel et al. (2003a) bei verwundeten Tomatenpflanzen. So zeigten konstitutiv AOC mRNA und Protein überexprimierende transgene Tomatenpflanzen keinen veränderten JA oder OPDA Gehalt verglichen mit dem Wildtyp. Erst nach Verwundung wiesen AOCsense Tomaten im Vergleich zum Wildtyp einen etwa doppelten Gehalt an JA auf.

JA Akkumulation wurde ebenfalls während der HR bei mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas* DC3000/avrRpt2 infizierten *A. thaliana* cv. Col-0 nachgewiesen. Wurde jedoch die Genexpression von LOX2 in transgenen *A. thaliana* S-12 unterdrückt, so blieb die pathogeninduzierte JA Akkumulation aus. Die Autoren schlossen hieraus, dass LOX2 für die pathogeninduzierte JA Akkumulation notwendig ist. Dies wurde als ein Hinweis darauf gewertet, dass JA Biosynthese u. a. durch Substratverfügbarkeit reguliert wird (Spoel et al., 2003). Die bereits dargestellte Vergleichbarkeit von Pathogen- und Ozon-induzierter HR legen die Vermutung nahe, dass die JA Biosynthese in Reaktion auf Ozon ebenfalls über die Substratverfügbarkeit reguliert werden könnte.

Darüber hinaus kann in Pflanzen ein racemisches Gemisch von 12-Oxo-PDA auch durch spontane Zyclisierung des Allenoxids entstehen (Hamberg und Gardner, 1992), so dass die Aktivierung der AOC zur Bildung von Jasmonsäure zudem nicht zwingend erforderlich wäre. Wie zuvor schon erwähnt, kann es auch bei der JA Synthese zu einer Beeinflussung der Produkte der verschiedenen LOX-Wege untereinander kommen. So inhibiert (+/-)-cis-12,13- Epoxy-9-(Z)-Oktadecensäure des POX Weges kompetitiv die AOC (Ziegler et al., 1997). Dies wäre auch bei den Versuchen dieser Arbeit denkbar, da Ozon zu einer deutlichen Induktion der mRNA des Epoxysäuren hydrolysierenden Enzyms EH führte (siehe Kap. 4.7). Darüber hinaus fanden Feussner und Wasternack (2002) keine Korrelation zwischen der Konzentration von Jasmonaten und untersuchten Enzymen der JA-Biosynthese. Sie beschreiben dass die konstitutive Expression einer AOS, als Eingangsenzym der JA Biosynthese, nicht von einem Anstieg der JA Konzentration begleitet war. Ebenso erfolgte eine JA Akkumulation bereits vor der Expression von Transkripten des AOS Weges in *Nicotiana attenuata* nach Verwundung durch *M. sexta* (Ziegler et al., 2001). Die Regulation der JA Biosynthese scheint daher sehr komplex und nicht nur auf der Ebene der Transkription zu erfolgen. Gut korrelierte in dieser Arbeit jedoch die höchste Aktivität des Schlüsselenzyms LOX mit der nachgewiesenen JA Akkumulation 24 h nach Start der Ozonexposition (Abb. 25, Tab. 7 und Tab. 9).

Neben Ozon (diese Arbeit) induzierten auch Elicitor- oder Pathogenbehandlung (biotischer Stress) eine transiente JA Akkumulation in Tabak, die parallel zu der LOX Aktivität war (Rickauer et al., 1997; Alami et al., 1999). Wie in dieser Arbeit bereits in Kap. 4.5 bei der Ozon-induzierten LOX2 transgener *Arabidopsis thaliana* vermutet, könnte auch in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 die Akkumulation von

JA (24h, Tab. 7) nur lokal in der Nähe von Nekrosen stattgefunden haben und somit eine Rolle in der Nekrosenentwicklung spielen.

Auch andere Autoren vermuteten bereits, dass JA oder andere Jasmonate zur Beendigung der Fortpflanzung des Zelltod durch ROS oder Lipidhydroperoxide beitragen, sowie eine Funktion bei der Eindämmung Ozon-induzierter Läsionen einnehmen (Overmyer et al., 2000, Kanna et al. 2003; Overmyer et al., 2003). Neben der Induktion von JIPs, die u. a. an der Quervernetzung von Zellwandkomponenten beteiligt sein können (Kap. 1.7.5), wäre eine weitere Möglichkeit die Induktion von Enzymen zum Schutz gegen oxidativen Stress wie z. B. des Ascorbat/Glutathion Metabolismus. Hierzu wurden bereits zuvor die Ergebnisse von Sasaki-Sekimoto et al. (2005) diskutiert, die einen funktionierenden JA Biosyntheseweg zur Ozoninduktion von GSH1, DHAR und VTC1 in *A. thaliana* für notwendig halten. Pasqualini et al. (1999) fanden nach Ozonexposition hingegen eine Abnahme der Aktivität der Glutathion Reduktase in Tabak cv. Bel W3 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um 25 %, im Gegensatz hierzu ließ sich jedoch zytosolische Glutathion Reduktase (gr1) durch exogenes MeJa und JA in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und Zellkultur induzieren (Xiang und Oliver, 1998). Die Akkumulation von JA bei Tabak cv. Bel W3 nach 24 h könnte eine Induktion von Enzymen zum Schutz gegen oxidativen Stress bewirkt haben. Für die Entgiftung von Lipidhydroperoxiden könnte auch die HPL eine Rolle spielen (Ventilfunktion; Kap. 4.4) und darüber hinaus könnten die Endprodukte des LOX-Wegs JA und ihre Derivate konzentrationsabhängig auf die einzelnen Wege zurückwirken (feedback). Tatsächlich ließ sich die HPL Aktivität durch MeJa zwar nicht in *Arabidopsis thaliana* induzieren (Bate et al., 1998) wurde aber in Tabak und Gurke induziert (Avdiushko et al., 1995). Auch führte die Applikation verdünnter JA über den Stängel frisch geschnittener *P. lunatus* zu eine starke Emission der Produkte des HPL Zweigs (3Z)-Hexen-1ylacetate und (2E)-hex-1ylacetate (Hopke et al., 1994). Es wäre also denkbar, dass der erneute C₆-Emissionsanstieg ab 24 h (Tab. 9 und Heiden et al., 1999a) auf die vorausgegangene endogene Erhöhung freier JA (Tab. 7) zurückzuführen ist wobei diese möglicherweise zu der Induktion der HPL mRNA ab 24 h in Tabak cv. Bel W3 (Abb. 36) beigetragen hat.

Für eine Schutzfunktion der Jasmonate spricht auch das Tabak cv. Bel W3, der vor einer Ozonexposition 24 h mit MeJA (100 µl) oder 18 h mit JA-haltiger Lanolinpaste behandelt wurde, weniger Läsionen zeigte als unbehandelter (Örvar et al., 1997).

Auch der Ozon-tolerante Pappel Klon NE-245 zeigte nach der MeJa Vorbehandlung nach Ozonexposition weniger Nekrosen, wohingegen diese Reduktion bei dem JA-insensitiven Pappel Klon NE-388, der keine JA erkennt, ausblieb (Koch et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse fanden auch Kanna et al. (2003) nach Vorbehandlung mit MeJa und anschließender Ozonexposition (6 h 200 ppb O₃) bei *A. thaliana* L. Niedrige MeJa Konzentrationen (10 µM) verminderten die ozoninduzierte Läsionenbildung bei Wildtyppflanzen, jedoch nicht bei der JA-insensitiven *A. thaliana* Mutante *oji1*, die um den gleichen Effekt zu erzielen, mit einer höheren MeJa Konzentration (100 µM) vorbehandelt werden musste.

Es wäre interessant in nachfolgenden Arbeiten den Gehalt an freier JA in den beiden Tabakvarietäten nach akutem Ozonstress mit empfindlicheren Methoden zu untersuchen.

4.7 Ozoninduktion der EH mRNA bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B

Der Einfluss von Ozon (5 h, 150 ppb O₃) auf den EAS- und POX-Zweig des LOX-Wegs wurde in dieser Arbeit anhand der mRNA Expression von Epoxidhydrolase (EH) bei Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B untersucht (Abb. 36 und Abb. 37). EH ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym, das als mikrosomale oder lösliche Form vorkommt und die Oxiranringe von Epoxiden zu den entsprechenden Mono-, Di- oder Trihydroxyfettsäuren hydriert (Kap. 1.7.3; Abb. 4; Blée, 1996; Blée, 1998; Newman et al., 2005). In Tabak cv. Bel W3 kam es nach Ozonbehandlung zu einer transienten Induktion der EH mRNA zwischen 5 h und 24 h (Abb. 36). Die Expression war zu Beginn (5 h) am stärksten und zeigte hier eine Doppelbande. Hiernach sank die Expression kontinuierlich und war nach 24 h nur noch halb so stark. Die Doppelbande läßt auf eine möglicherweise zeitgleich exprimierte Isoform schließen. Dass innerhalb einer Pflanzenspezies verschiedene EH Isoformen vorliegen können beschrieben Newmann et al. (2005) in einer Übersicht. Auch bei Tabak cv. Bel B wurde eine transiente Induktion der EH mRNA zwischen 5 h und 24 h nachgewiesen (Abb. 37). Hier nahm die EH mRNA Expression jedoch erst ab 5 h langsam zu und erreicht nach 12 h ihr Maximum. Nach 24 h war die Expression nur noch sehr schwach zu erkennen. Bei beiden Varietäten kam es in unbehandelten Kontrollen zu keiner EH mRNA Akkumulation. Dies ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Gomi et al. (2003), die ebenfalls ausschließlich in, mit dem nicht-pathogenen Pilz *Alternaria alternat*, infizierten Blättern bei Zitrus eine Induktion

der *RlemEH* nachweisen konnten. Hierbei wurde die *RlemEH* nach Applikation der *Alternaria alternata* Linie SH20 nach 6 h am stärksten exprimiert und nahm dann kontinuierlich bis nach 24 h ab. Der Zeitverlauf der EH Expression war hierbei vergleichbar mit der ozoninduzierten EH mRNA Expression in Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit Abb. 36). Nach Ozonexposition zeigte Tabak cv. Bel B eine LOX mRNA Expression nach 12 h. Die Oxylipine, die als Substrat in den ESA- und/oder POX-/ EH- Zweig fließen, könnten somit zu diesem Zeitpunkt aus einer LOX katalysierten Reaktion stammen. Ebenso verhält es sich bei dem Tabak cv. Bel W3, der deutliche LOX Aktivitäten zeigte (Tab. 9 und Abb. 25).

Für die EH der POX-/EH Kaskade bei Tabak unter Ozonstress lassen sich sowohl eine Beteiligung an der Biosynthese der Kutikula als auch gegensätzlich eine Entgiftungsfunktion toxischer Epoxyverbindungen, auch aus dem EAS-Weg, vermuten. Die Biosynthese der Kutikula ist zwar noch nicht vollständig geklärt, aber man vermutet das die POX-/EH Kaskade eine Funktion bei der Synthese der enthaltenen C18-Cutin-Monomeren einnimmt, die z. B. nach Verletzungen in der Zellwand akkumulieren (Kolattukudy, 1984; Blée und Schuber 1993; Blée, 1996; 1998). Die bei Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3 durch Ozon transient induzierte EH mRNA könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Enzym hier an einer Wiederherstellung/Verstärkung der Kutikula beteiligt ist. Umgekehrt könnten durch die Zerstörung bzw. dem Umbau der Kutikula nach Ozonstress auch Kutinmonomere frei werden. Diese elektrophilen Epoxyverbindungen haben toxische Eigenschaften und können durch die Reaktion mit den nukleophilen Enden von Proteinen und Nukleinsäuren zu Mutationen führen (Blée, 1996). Die durch Ozon induzierte EH könnte bei Tabak auch eine Entgiftungsfunktion einnehmen, wie sie von Blée (1996) vorgeschlagen wurde. Nach Guo et al. (1998) wäre es auch denkbar, dass die nun weniger toxischen Mono-, Di- oder Trihydroxyfettsäuren als Signal zur Aktivierung weiterer Schutzgene dienen. Auch wirken Trihydroxy-Oxylipine in Kartoffelblättern toxisch auf Pathogene (Hamberg, 1999) und dienen so der Abwehr.

An der Induktion der EH mRNA können verschiedene Signalmoleküle beteiligt sein. So wurde die EH mRNA in Tabak durch TMV sowie Injektion von SA und INA (Guo et al., 1998) und durch exogen appliziertes MeJa in Kartoffelblättern (Stapleton et al., 1994) oder Zitrusblättern (Gomi et al., 2003) induziert. Darüber hinaus wurden bei der Untersuchung zum Einfluss flüchtigen C₆-Verbindungen auf die *RlemEH*

mRNA Expression, Zitrusblätter 6 h mit Hexanal/-ol, cis-3-Hexenol oder trans-2-Hexenol/-ol behandelt. Nur cis-3-Hexenol (*RlemEH* mRNA: ab 6 h, nach 24 h max.) und trans-2-Hexenol (*RlemEH* mRNA: ab 6 h max., nach 24 h nur schwach) induzierten die *RlemEH* mRNA (Gomi et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurden weder mikrosomale noch lösliche EH nach Behandlung mit 1 mM MeJa in *Vitita sativa* Sämlingen induziert (Pinot et al., 1998). In dieser Arbeit wird bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B und cv. Bel W3 SA jedoch als direkter oder indirekter Induktor der EH ausgeschlossen, da es auch bei Tabak Nah-G, die keine SA akkumulieren kann, im gleichen Zeitraum zur stärksten EH Induktion kam (Abb. 38 und Kap. 4.8). Auch die ozoninduzierte Akumulation freier JA bei Tabak cv. Bel W3 korreliert nicht mit der EH mRNA Expression (Abb. 36 und Tab. 7). Es müssen also andere Signale bei der ozoninduzierten EH mRNA Akumulation beteiligt gewesen sein.

4.8 Verflechtung von LOX-Weg und SA bei der Ozonantwort von Tabak

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass Salicylsäure (SA) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Abwehrgenen während der pflanzlichen Schutzantwort gegenüber biotischem- oder abiotischem Stress spielt (Kap. 1.4). Die Beteiligung von SA und ihrer Konjugate an der Signaltransduktion, die nach solchen Ereignissen zu Reaktionen wie der Ausprägung lokaler- (LAR) oder systemisch erworbener Resistenz (SAR), dem oxidativen Burst während der HR sowie der Induktion von PR-Proteinen (SAR Markergene) führt, wird allgemein akzeptiert (Malamy und Klessig, 1992; Hunt et al., 1996; Ryals et al., 1996; Durner et al., 1997; Klessig et al., 1998; Thulke und Conrath, 1998; Rao und Davis, 1999).

Da auch LOX zu den Abwehrgenen gerechnet wird stellte sich die Frage, ob bei Tabak cv. Bel W3 nach akutem Ozonstress eine Korrelation zwischen der nachgewiesenen LOX Aktivität (Abb. 25) und dem endogenen Gehalt an freier SA besteht. Daher wurde in dieser Arbeit der endogene Gehalt an freier SA bei mittelalten Blättern ozonbehandelter (5 h, 150 ppb) *N. tabacum* cv. Bel W3 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der Exposition mittels GC-MS bestimmt. Das Ergebnis zeigte, dass bei Tabak cv. Bel W3 ein akuter Ozonpuls (5 h, 150 ppb O₃) zu einem endogenen transienten Konzentrationsanstieg freier SA zwischen 2 h und 28 h führte mit einem Maximalwert bei 24 h (Abb. 40). Der Konzentrationsanstieg freier SA verläuft eindeutig parallel zu der nachgewiesenen LOX Aktivität (Tab. 9,

Abb. 25 A und B mit LA). Eine sehr gute Korrelation ist auch mit den von Heiden et al. (1999a) gemessenen transienten Emissionen zwischen 15 h und 24 h an Methylsalicylat, dem Methylester der Salicylsäure festzustellen. Sowohl die LOX Aktivität und der Gehalt freier SA (diese Arbeit) als auch die MeSa Emissionen (Heiden et al., 1999a; Heiden et al., 1999b) fielen in den Zeitraum der Nekrosenentstehung, sanken jedoch nach der vollständigen Ausbildung der selbigen (24 h) stark ab und erreichten in etwa das Niveau von unbehandelten Kontrollpflanzen (Tab. 9). In unbehandelten Kontrollpflanzen wurde kein Gehalt an freier SA nachgewiesen (Abb. 40). In Übereinstimmung hiermit wiesen Beauchamp et al. (2005) bei unbehandelten Kontrollen auch keine Emissionen an Methylsalicylat in Tabak nach. Dass Methylsalicylat aus induzierter Salicylsäure gebildet wird, zeigten Shulaev et al. (1997) anhand von ^{14}C -Markierungsexperimenten in TMV behandeltem Tabak. Es ist daher anzunehmen, dass die Emissionen von MeSa (Heiden et al., 1999a) aus der in dieser Arbeit nachgewiesenen ozoninduzierten freien SA (Abb. 40) gebildet wurden. Eine Korrelation zwischen endogenem Gehalt an SA und MeSa fanden auch Seskar et al. (1998) bei TMV infiziertem Tabak. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde bei *Arabidopsis thaliana* (Sharma et al., 1996; Rao et al., 2002) und Tabak (Yalpani et al., 1994; Pasqualini et al., 2002; Ogawa et al., 2005) ebenfalls eine ozoninduzierte SA Akkumulation nachgewiesen. Pasqualini et al. (2002) fanden bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 (3 h, 200 ppb O_3) freie SA Akkumulation mit einem Maximalwert nach 10 h, der nach 27 h bereits stark reduziert war. In dieser Untersuchung erfolgte zwischen diesen Zeiten keine weitere Messung, so dass ein zeitgleicher Maximalwert wie in der vorliegenden Arbeit z. B. nach 24 h nicht ausgeschlossen werden kann. Der totale- und glykolysierte Gehalt an ozoninduzierter SA in Tabak cv. Bel W3 war hierbei ca. doppelt so hoch wie in Tabak cv. Bel B.

Die nachgewiesene Korrelation zwischen dem Anstieg des endogenen SA Gehalts und der LOX Aktivität (diese Arbeit) in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 führte zu der Vermutung, dass die ozoninduzierte LOX Aktivierung SA als Signalstoff benötigt oder umgekehrt die LOX Aktivität für die SA Synthese notwendig ist. Ein erster Vorversuch wurde hierzu mit Northern Blot Analysen von in 2 mM SA Lösung gestellten und nach den gleichen Zeiten wie die SA-Bestimmung erfolgte geernteten Tabak cv. Bel W3 Blättern durchgeführt. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine LOX mRNA Induktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In

Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen erfolgte keine LOX mRNA Induktion in Tabak Zellkulturen nach 12 h Inkubation mit exogener SA (100 μ M) (Véronési et al., 1996). Auch in *Arabidopsis* führte die SA Applikation nicht zur Induktion von LOX2 (Stotz et al., 2000) sondern reduzierte die Expression der LOX2 mRNA sogar (Bell und Mullet, 1993). Auch die MeJa (0,1 mM) induzierte LOX2 mRNA Akkumulation wurde durch gleichzeitige Applikation von SA (1 mM) in *A. thaliana* Col-0 unterdrückt (Koo et al., 2007). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen induzierte SA oder das Analogon 2,6- Dichloroisonicotinsäure (INA) LOX in Gurke und Weizen. Bei Gurke lag der Schwellenwert bei 1 mM SA, höhere Konzentrationen führten zu keiner LOX-Induktion (Feussner et al., 1997; Weichert et al., 1999). Auch Marmey et al. (2007) konnten eine SA Induktion der GhLOX1 in Kotyledonen von Baumwolle zeigen. Eine Konzentrationsreihe (0 μ M - 500 μ M) ergab die höchste LOX Aktivität bei 50 μ M SA. Hiermit behandelte Pflanzen zeigten eine LOX mRNA Induktion zwischen 8 h - 15 h und die höchste LOX Aktivität zwischen 18 h - 24 h. Mittels Chiral-HPLC wurde darüber hinaus gezeigt, dass SA eine 9-LOX induzierte.

Möglicherweise war die in dieser Arbeit in den Vorversuchen verwandte Konzentration von 2 mM SA zu hoch, um zu einer LOX-Geninduktion zu führen. In nachfolgenden Analysen könnte dies anhand einer Konzentrationsreihe geklärt werden.

SA scheint wie ROS eine duale Rolle einzunehmen, niedrige Konzentrationen induzieren Abwehrgene wie z. B. Gluthathion-S-Transferase, die an der Detoxifikation von Lipidhydroperoxiden beteiligt ist, hohe Konzentrationen führen zu einer Potenzierung des Zelltod (Shirasu et al., 1997; Alvarez, 2000). So war auch in ozonexponierten *Arabidopsis* Pflanzen der SA Anstieg von der Akkumulation der GST1-mRNA begleitet (Sharma et al., 1996). In Tabakzellen war 1 mM SA zytotoxisch und führte zum Absterben der Zellen wohingegen niedrigere Konzentrationen PR-1 Gene induzierten (Anderson et al., 1998). Eine Konzentrationsabhängigkeit der SA Wirkung fanden auch Rao und Davis (1999), die zeigten, dass das SA-vermittelte Antioxidative Schutzsystem nach Ozonbehandlung in *Arabidopsis* Nah-G (sehr wenig/ kein SA) deutlich reduziert war. Hohe SA Konzentrationen wie sie in der SA hyperakkumulierenden *A. thaliana* Cvi-0 vorkommen, führten über die Induktion der HR zum Zelltod.

Eine weitere Methode den Einfluss von SA auf die ozoninduzierte LOX zu analysieren erfolgte mit Hilfe transgener Tabakpflanzen (Nah-G), die eine bakterielle

Salicylat Hydroxylase exprimieren und dadurch fortlaufend gebildetes SA zu Catechol abbauen (Delaney et al., 1994; Friedrich et al., 1995). In Übereinstimmung hierzu wurden in ozonbehandeltem Tabak Nah-G auch keine MeSa Emissionen detektiert (Priv. Doz. Dr. Wildt, pers. Mitteilung). Für SA wird diskutiert, dass es eine wesentliche Rolle bei der Induktion der HR in Reaktion auf Ozon spielt (Overmyer et al., 2003; Kangasjärvi et al., 2005). So konnte in Tabak cv. Bel W3 parallel zur SA Akkumulation (Abb. 40) die Ausprägung von punktförmigen, begrenzten Nekrosen nachgewiesen werden (Abb. 17). Es wird angenommen, dass bei solchen Pflanzen die Läsionen ein SA-abhängiger HR-ähnlicher Zelltod darstellt, eine Form des PCD, dessen Marker DNA-Fragmentation ist (Chen et al., 1995). Das Ozon die morphologischen Charakteristika des PCD induziert, fanden auch Pasqualini et al. (2003) und Overmyer et al. (2005) (siehe Einleitung Kap. 1.4.2). Im Gegensatz dazu entwickelten Nah-G Pflanzen, die kein SA akkumulieren nach akutem Ozonstress großflächige Nekrosen entlang der Blattadern (Abb. 17), die hier auf ozoninduzierten toxischen Zelltod zurückgeführt werden, wie nachfolgend beschrieben. Auch *Arabidopsis* Nah-G waren empfindlicher gegenüber Ozon im Vergleich zum Wildtyp und entwickelten mehr Nekrosen und Chlorosen (Sharma und Davis, 1997; Rao und Davis, 1999). Die Autoren führten dies darauf zurück, dass die SA-abhängige Aktivierung von Abwehrgenen in Nah-G Pflanzen gestört ist, der Redox-Status der Pflanzenzelle nicht aufrechterhalten werden kann und zu toxischem Zelltod führt. Auch TMV behandelte transgener Tabak Nah-G zeigte größere Läsionen als der nichttransgene Wildtyp (Gaffney et al., 1993). Nach Pathogenbefall bilden Tabak Nah-G keine HR oder SAR aus (Delaney et al., 1994). Toxischer Zelltod wurde auch für die Ozon-induzierten Läsionen bei hybriden Pappelklonen NE-388 beschrieben, die in der Perzeption von SA und JA gestört waren (Koch et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigten *Arabidopsis* Nah-G nach Salz- oder osmotischem Stress (NaCl bzw. Mannitol) sowie Tabak Nah-G nach chronischer Ozonbehandlung (5 Tage je 4 h 250 ppb O₃) im Vergleich zum WT weniger Nekrosen. Die Autoren vermuten, dass es aufgrund fehlender SA nicht zu einer ROS vermittelten Potenzierung des Zelltods kam (Örvar et al., 1997; Borsani et al., 2001). Aufgrund zahlreicher Studien wurde ein Modell des Zelltod für Pflanzen nach Pathogeninfektion oder Ozonexposition entwickelt, bei dem SA die Wirkung von ROS amplifiziert und den Zelltod mit initiiert (selbstamplifizierender Zelltodzyklus) (Overmyer et al., 2003; Kangasjärvi et al., 2005).

Wie zuvor beschrieben korrelierte bei Tabak cv. Bel W3 nach einem akuten Ozonpuls (5 h, 150 ppb O₃) die SA Akkumulation mit der LOX Aktivität (Abb. 40 und Abb. 25 A und B mit LA) und auch mit der LOX mRNA Akkumulation (Abb. 29 und Abb. 33). Sollte die ozoninduzierte LOX mRNA Expression SA-abhängig sein, würde man erwarten, dass diese Genexpression bei ozonbehandelten Tabak Nah-G ausbleibt. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass Ozon auch in Tabak Nah-G LOX mRNA transient induzierte (Abb. 33). Allerdings war im Vergleich zu dem SA akkumulierenden Tabak cv. Bel W3 die LOX mRNA deutlich schwächer induziert und in einem früheren (5 h, 8 h max. und 12 h) und kürzerem Zeitraum (Abb. 33). Hieraus kann man schließen, dass ozoninduzierte LOX bei Tabak cv. Bel W3 nicht ausschließlich SA-abhängig ist sondern andere Signale zur Induktion beitragen müssen bzw. mögliche LOX Isoformen (z. B. 9-LOX / 13-LOX) unterschiedlich aktiviert werden. Hierfür spricht auch, dass bei dem im Vergleich wenig SA akkumulierenden ozonbehandeltem Tabak cv. Bel B (Pasqualini et al., 2002), der keine Nekrosen ausbildete die LOX nur nach 12 h schwach induziert wurde (Abb. 17 und Abb. 33). Eine transiente Induktion der 9-LOX, sowohl in Tabak cv. Xanthi nc. Nah-G als auch im Wildtyp (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN), fanden Dhondt et al. (2002) nach Infiltration mit β -Megaspermin (50 nM). Begleitet wurde diese 9-LOX mRNA Induktion jeweils von einer transienten Akkumulation von OPDA (24 h max.) und JA (18 h max.), jedoch ausschließlich in unmittelbarer Umgebung zur Infiltrationsstelle. In weiter entfernter Zone blieb diese Akkumulation aus. Infiltration von 0,1 mM SA führte zu keiner 9-LOX mRNA Induktion.

Einige Autoren vermuten, dass SA allgemein mit eisenhaltigen ROS entgiftenden Enzymen wie Katalase, Aconitase, aber auch Lipoxygenase und Ascorbat-Peroxidase oder dem identifizierten Salicylsäure bindende Protein SABP2 interagieren und diese dadurch in ihrer katalytischen Aktivität einschränken. Dies wird als eine mögliche Ursache für erhöhte ROS- insbesondere H₂O₂-Akkumulation bei Pflanzen unter abiotischem oder biotischem Stress angesehen (Chen et al., 1995; Ruffer et al., 1995; Rao et al., 1997; Bueno et al., 2001; Kumar und Klessig, 2003). Eine Inhibition der LOX durch SA kann bei ozonbehandelten Tabak cv. Bel W3 jedoch aufgrund der hier erzielten Daten ausgeschlossen werden, da mit steigendem SA Gehalt auch die LOX Aktivität parallel zunahm (Abb. 25 und Abb. 40). Parallel zu dem steigenden Gehalt an freier SA bei ozonbehandelten Tabak cv. Bel W3 konnte nach 8 h und 24 h auch eine erhöhte Ansammlung von H₂O₂ mittels

DAB festgestellt werden (Tab. 9 und Abb. 41). ROS als Induktor der LOX Aktivität wurde bereits in einem anderen Zusammenhang diskutiert. Eine weitere Möglichkeit die sich im Zusammenhang mit SA ergibt, ist die Hypothese einiger Autoren, die vermuten, dass SA-Radikale die Lipidperoxidation initiieren, wie es durch exogene Zugabe von SA in Tabak Zellsuspensionskulturen gezeigt wurde (Durner und Klessig, 1996; Durner et al., 1997; Anderson et al., 1998). Hierbei wurde jedoch keine LOX Aktivität bestimmt. Die in dieser Arbeit erzielten Daten mit ozonbehandeltem Tabak Nah-G, von dem angenommen wird, dass er keine SA-Radikale bilden kann, weisen jedoch eher auf eine Beteiligung der induzierten LOX hin. Für die mögliche Beziehung zwischen SA und der Produktion von ROS sind bei der HR und SAR verschiedene Modelle aufgestellt worden (Hunt et al., 1996; Ryals et al., 1996; Delaney, 1994). So kann es durch SA nicht nur zu erhöhter ROS Akkumulation kommen (s. o.), sondern hohe ROS Konzentrationen können umgekehrt die Biosynthese von SA auslösen (León et al., 1995; Hunt et al., 1996; Enyedi, 1999; Overmyer et al., 2003).

Welche Rolle Salicylsäure bei der Regulation des Octadecanoid Biosynthesewegs bei Pflanzen unter Ozonstress spielt ist noch unklar. In dieser Arbeit wurde mit Northern Experimenten nachgewiesen, dass die zum LOX-Weg zählenden Enzyme EH, HPL, AOC und OPR eine transiente mRNA Induktion durch Ozon in Nah-G exprimierenden Tabakpflanzen zeigen (Abb. 38). Für AOC (5 h max.) und HPL (8 h max.), die auch in unbehandelten Kontrollen exprimiert wurden, war die mRNA Induktion insgesamt gering bzw. bei HPL zwischen 12 h - 48 h in Kontrollen höher als in ozonbehandelten Pflanzen (Abb. 38). Fehlende Salicylsäure als Induktor der ozoninduzierten HPL Genexpression wird jedoch ausgeschlossen, da in Tabak cv. Bel W3 die stärkste HPL mRNA Expression ab 32 h erfolgte (Abb. 36), einem Zeitpunkt bei dem die ozoninduzierte transiente Akkumulation von SA bereits wieder auf das Niveau von Kontrollpflanzen abgesunken war (Abb. 40). Die EH mRNA Expression war zu den Zeitpunkten 5 h, 8 h und 12 h (max.) nach Start der Ozonexposition stark induziert und auch deutlich stärker im Vergleich zu Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B (Abb. 36, Abb. 37 und Abb. 38). SA oder hierdurch beeinflusste Verbindungen scheinen demnach eine eher hemmende Wirkung auf die EH mRNA Expression zu haben. Hierfür spricht auch, dass in ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 die EH mRNA Expression in dem Maße abnimmt wie die SA Akkumulation zunimmt (Abb. 36 und Abb. 40). Eine negative Wirkung hatten SA und

Aspirin auch auf die Expression der AOC mRNA jedoch ohne Auswirkung auf die Aktivität von AOC oder auch AOS (Pena-Cortés et al., 1993; Ziegler et al., 1997; Harms et al., 1998; Sivasankar et al., 2000). Ozon induzierte in dieser Arbeit die AOC mRNA in Tabak Nah-G jedoch in einem kürzerem Zeitraum (5 h - 12 h) im Vergleich zu Tabak cv. Bel W3 (2 h- 24 h) (Abb. 36 und Abb. 38). Man könnte daher vermuten, dass SA die ozoninduzierte Akkumulation der AOC mRNA positiv beeinflusst. Auch in Reis wurde die AOC durch SA induziert (Agrawal et al., 2003). Die OPR mRNA Expression durch Ozon in Tabak Nah-G war im Vergleich zu Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B schwächer, zeigte jedoch einen ähnlichen Zeitverlauf (5 h - 24 h und erneut nach 32 h). Auffällig war, dass unbehandelte Tabak Nah-G im Vergleich zu Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B, keine OPR mRNA Akkumulation zeigten (Abb. 36, Abb. 37 und Abb. 38).

Guo et al. (1998) sprechen von der gleichzeitigen Existenz eines sowohl SA-abhängigen als auch SA-unabhängigen Signalwegs der Enzyminduktion wie sie sie z. B. für die EH-1 mRNA Expression beschreiben. So ließ sich ähnlich der SA unabhängigen Induktion der EH durch Ozon in Tabak Nah-G (diese Arbeit) auch in TMV infizierten Tabak Nah-G eine SA-unabhängige, lokale und systemische EH mRNA Induktion nachweisen, wobei exogen zugegebene SA ebenfalls die EH-1 mRNA induzierte (Guo et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde in *A. thaliana* die AOS durch SA auf Transkript- und Proteinebene induziert, was von steigendem OPDA nicht jedoch JA Gehalt begleitet war (Laudert und Weiler, 1998; Kubigsteltig et al., 1999). Dies kann als ein Hinweis auf verschiedene Regulationswege bei unterschiedlichen Pflanzen betrachtet werden.

Ozoninduzierte SA Akkumulation begleitete auch die ozoninduzierte mRNA Induktion der in dieser Arbeit als Kontrolle einer erfolgreichen Ozonbehandlung verwandten PR-Proteine basische Glucanase und -Chitinase in Tabak cv. Bel W3 (Abb. 38). Die Induktion dieser beiden Gene fanden auch Schraudner et al. (1992) und Ernst et al. (1992) bei ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3 und cv. Bel B. Da diese PR Transkripte jedoch auch in ozonbehandelten Tabak Nah-G, die keine SA akkumulieren induziert waren (diese Arbeit), scheint SA nicht entscheidend für die Signaltransduktion zur Expression der basischen PR Transkripte bei Tabak unter akutem Ozonstress zu sein.

Diese Salicylsäure-unabhängige Induktion basischer Glucanase und Chitinase wurde auch in *Erwinia carotovora*-infiziertem *N. tabacum* xanthi-nc transgen Nah-G

nachgewiesen. Darüber hinaus führte die externe Zugabe von SA alleine nicht zu einer Induktion dieser basischen PR-Proteine in Tabak var. Petit Havana SR1 (Vidal et al., 1997). In Übereinstimmung hierzu beschreiben Niki et al. (1998) basische PR Proteine als nicht durch SA induzierbar. Saure PR-Proteine hingegen wie saure Chitinase und PR1a waren durch SA bzw. SA abhängiges H₂O₂ sowie UV-B induzierbar (Neuenschwander et al., 1995; Hunt et al., 1996; Vidal et al., 1997; Yamakawa et al., 1998). Demzufolge müssen andere Signalmoleküle an der ozoninduzierten Expression basischer PR Proteine beteiligt sein. Hierfür wäre Ethylen als eine der ersten Antworten auf Ozon in Tabak cv. Bel W3 (Langebartels et al., 1991) denkbar, da Ernst et al. (1999) in der Promotoregion der basischen β -1,3-Glucanase eine Ethylen-responsive Region fanden. Bestätigt wurde dies durch Promotorstudien der basischen Klasse I β -1,3-Glucanase B Gens (GLB) bei transgenen *Nicotiana tabacum* cv. Havana 425. Hierbei wurde die Ethylenantwort durch 1-Methylcyclopropene (1-MCP) inhibiert, worauf hin die Ozon-induzierte Promotoraktivität der basischen β -1,3-Glucanase ausblieb (Grimmig et al., 2003). Mutanten, die in der Ethylen- (*ein2*) oder JA-Antwort (*coi1*) gestört sind, zeigen keine Aktivierung dieser PR-Gene durch die jeweiligen Phytohormone. Stärkste Induktion wurde jedoch durch die kombinierte Gabe von Ethylen und JA erzielt (Lorenzo et al., 2003). In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich basische Glucanase auch durch Methyljasmonat und H₂O₂ in Tabak Bel W3 induzieren ließ (Abb. 34). Unterstützt wird das Ergebnis durch Rickauer et al. (1997), die Transkripte von Glucanase und Chitinase durch MeJa in Tabakzellkultur induzieren konnten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Ozon neben basischer Glucanase und -Chitinase, die Transkripte der untersuchten LOX-Weg Enzyme LOX, HPL, EH, AOC und OPR, auch in SA defizienten Tabak Nah-G Pflanzen induzierte.

4.9 Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von akutem Ozonstress auf den LOX-Weg insbesondere bei der ozonsensitiven Tabak Varietät Bel W3, der ozontoleranten Varietät Bel B, sowie den transgenen Pflanzen *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi.nc-Nah-G und *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC untersucht.

Zusammenfassend konnte erstmals mittels Northern Blot Analysen gezeigt werden, dass die mRNA Transkripte der untersuchten Enzyme des LOX-Wegs LOX, HPL, EH, AOC, OPR und ADH bei allen drei Tabakvarietäten während der pflanzlichen Abwehrantwort auf Ozon (5 h, 150 ppb O₃) transient verstärkt exprimiert werden. Hierbei unterschieden sich die jeweiligen mRNA Akkumulationen sowohl zeitlich, als auch in ihrer Intensität je nach untersuchter Tabakvarietät voneinander (Abb. 36, 37 und 38).

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag bei der Analyse der LOX, für die gezeigt werden konnte, dass die LOX mRNA ausschließlich ozoninduzierbar ist und je nach Tabakvarietät weitestgehend mit den auftretenden Nekrosen korreliert (Abb. 17 und Abb. 33). Dies konnte histochemisch auch bei ozonbehandelten *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC gezeigt werden (Abb. 45).

Die größte Sequenzhomologie (99 %) zeigte die LOX Gensonde (471 bp) aus ozonbehandeltem Tabak cv. Bel W3, zu der Elicitor-induzierten LOX1 aus Tabak (Acc. Nr.: X84040; Véronési et al., 1995), die als 9-LOX beschrieben wird. Dagegen wurde bei Sequenzvergleichen mit 13-LOX aus u. a. *Nicotiana attenuata* (Acc. Nr.: AY254349) und *Lycopersicon esculentum* (Acc. Nr.: U37839.1, U37840.1) keine signifikante Übereinstimmung gefunden. Es wird daher angenommen, dass in dieser Arbeit hauptsächlich LOX mRNA, die für 9-LOX Genprodukte kodiert, bei Tabak nachgewiesen wurde. Parallel zu der ozoninduzierten LOX mRNA wurde für Tabak cv. Bel W3 auch die ozoninduzierte LOX Aktivität nachgewiesen (Abb. 25). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Ozon die LOX mRNA nicht in schadfreien jungen Blättern induzierte, sondern nur lokal in geschädigten mittelalten Blättern, die Nekrosen bildeten, wobei dies in Korrelation zur applizierten Ozondosis stand (Abb. 18, 30 und 31). Die im Enzymtest mit ozoninduzierter LOX nachgewiesenen unterschiedlichen pH-Wert Optima, Aktivitätsbanden (NATIVE PAGE) sowie die Southern Analysen, gaben Hinweise auf vorhandene LOX Isoformen (Abb. 21, 22, 27 und 32). Anzeichen für die Ozoninduktion einer 13-LOX gab der Nachweis der ozoninduzierten Akkumulation endogener JA nach 24 h (Tab. 6), sowie die von Heiden et al. (1999a; 1999b) unter vergleichbaren Bedingungen detektierten C₆-Emissionen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten derzeitige Modelle über die pflanzliche Abwehrantwort auf Ozon, wie sie z. B. von Kangasjärvi et al. (2005) aufgestellt wurden, weiter ausgebaut werden und helfen die Grundmechanismen des LOX-

Wegs unter Ozon zu verstehen. Zudem lässt sich eine große Ähnlichkeit feststellen zwischen der Entwicklung von Nekrosen und der Ozon-induzierten transienten LOX mRNA und LOX Aktivität bei ozonempfindlichem Tabak cv. Bel W3 (diese Arbeit) und der Pathogen-induzierten LOX mRNA und LOX Aktivität bei einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion während der HR (Fournier et al., 1993; Véronési et al., 1995; Véronési et al., 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit über den Ozon-induzierten LOX-Weg, bestärken somit die Beschreibungen der Autoren, die anhand anderer Untersuchungen in früheren Studien gewonnen wurden, dass akuter Ozonstress in ozonsensitiven Pflanzen, wie z. B. bei Tabak cv. Bel W3, ähnliche Reaktionen auslösen, wie bei Pflanzen während einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen Interaktion. Aufgrund dessen wird für beide Abwehrreaktionen ein gemeinsamer Mechanismus der Signaltransduktion diskutiert (Kangasjärvi et al. 1994; Berger et al., 2001; Rao & Davis 2001; Langebartels et al. 2002a, 2002b; Pellinen et al. 2002; Overmyer, Brosche & Kangasjärvi 2003). Die praktische Umsetzung von Erkenntnissen aus der Ozonwirkungsforschung könnte u. a. in der Landwirtschaft erfolgen, wo sie dazu beitragen könnten Ertragssteigerung zu erzielen oder Ernteverluste vorzubeugen. So werden flüchtige C₆- und C₉-Aldehyde aus dem LOX-Weg, die viele Bakterien und Pilze inhibieren können (Croft et al., 1993; Deng et al., 1993; Matsui et al., 2006; Mita et al., 2007), bereits als biologische Alternative bei der Entwicklung und dem Einsatz von Fungiziden bei Obst und Gemüse diskutiert (Myung et al., 2007). Es wäre attraktiv in nachfolgenden Studien weitere Nutzpflanzen wie Tomate oder Kartoffel, die wie Tabak ebenfalls zur Familie der *Solanaceae* gehören, hinsichtlich der Induktion der LOX-Weg Gene durch Ozon vergleichend zu untersuchen.

Darüber hinaus sind einige Ansatzpunkte für weiterführende Experimente ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, in den vorangegangenen Abschnitten bereits vorgeschlagen worden. So könnten Western Blot Analysen mit spezifischen LOX-Antikörpern zur Charakterisierung der Ozon-induzierten LOX Isoformen durchgeführt werden und Enzymaktivitätsmessungen der untersuchten LOX-Weg Gene, um weitere Aussagen über ihre Regulation unter Ozon zu erhalten. Interessant wäre es auch die ozoninduzierten Enzyme des LOX-Wegs zu isolieren, rekombinant zu exprimieren und die gebildeten Produkte z. B. mittels HPLC-MS zu analysieren. Hierfür würden sich z. B. die Reaktionsprodukte der exklusiv durch

Ozon induzierbaren Epoxidhydrolase anbieten, um diese näher charakterisieren zu können.

Von besonders großem Interesse wäre es in nachfolgenden Arbeiten zu untersuchen, in welchem Verhältnis sich die in dieser Arbeit nachgewiesene Ozon-induzierte Tabak LOX Aktivitäten auf eine 9- und/oder 13-LOX zurückführen lassen. Darüber hinaus könnte weiter aufgeklärt werden, ob und in welchem Ausmaß, auch ein möglicherweise ROS-abhängiger Bildungsweg zu der im Rahmen der Abwehrantwort auf Ozon nachgewiesenen Lipidhydroperoxidation beiträgt. Die in den letzten Jahren verbesserten HPLC Methoden und die Identifizierung verlässlicher Marker für eine nicht-enzymatische Bildung von Hydroxyfettsäuren (12-OH- bzw. 16-OH-FS) (Montillet et al. 2004; -2005; Mueller et al., 2006; Grun et al., 2007) könnten helfen diese Fragestellungen aufzuklären.

In diesem Zusammenhang könnten weitere Untersuchungen mit transgenen Pflanzen, die in der Biosynthese und/oder Perzeption bzw. Signaltransduktion der Signalstoffe JA, SA oder Ethylen defekt sind (Übersicht für JA u. a bei Delker et al. 2006), wichtige Informationen liefern, welche Rolle diese Phytohormone für den LOX-Weg bei der Ozonantwort spielen.

Die Nukleotidteilsequenz (471 bp) der ozoninduzierten Tabak cv. Bel W3 LOX, zeigte die größte Homologie (99 %) zu der Elicitor-induzierten LOX1 aus Tabak (Véronési et al., 1995). Es wäre daher naheliegend in weiteren Arbeiten zunächst analoge Ozonversuche durchzuführen, jedoch unter Verwendung von transgenem Tabak, bei dem die Expression von *NtLOX1* mRNA entweder unterdrückt (Rancé et al., 1998) oder überexprimiert (Mène-Saffrané et al., 2003) wurde. Mit Gen- und Produktanalysen könnten mögliche Auswirkungen auf den LOX-Weg analysiert werden.

5. Zusammenfassung

Der Luftschadstoff Ozon kann gravierende Schäden bei Pflanzen durch Veränderungen von biochemischen und physiologischen Prozessen verursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ozon (5 h, 150 ppb O₃) auf den Lipoxygenase (LOX) Weg bei den unterschiedlich ozonsensitiven *Nicotiana tabacum* L. Varietäten Bel W3 und Bel B, sowie dem transgenen *Nicotiana tabacum* L. xanthi.nc-Nah-G untersucht.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die unterschiedliche Ozonsensitivität der Tabakpflanzen, die sich in der unterschiedlichen Nekrosenbildung bei physiologisch mittelalten Blättern widerspiegelte, mit einer transienten Ozoninduktion der LOX auf transkriptioneller Ebene sowie auf Aktivitätsebene korreliert. Dabei wurden Hinweise gefunden, dass sowohl 9- als auch 13-LOX induziert werden. Die Hinweise für die 9-LOX Induktion ergaben sich aus der Sequenzhomologie der verwandten LOX cDNA Sonde, zu einer bekannten Elicitor-induzierbaren LOX in Tabak, die als 9-LOX beschrieben wird.

Der ozontolerante Tabak cv. Bel B entwickelte nach fünfstündiger Ozonbehandlung (150 ppb O₃) keine Nekrosen und die LOX mRNA Akkumulation erfolgte nur zum Zeitpunkt 12 h nach Start der Applikation mit sehr schwacher Expression. Dagegen führte die gleiche Ozonbehandlung bei dem ozonempfindlichen Tabak cv. Bel W3 zur Ausbildung von deutlichen Nekrosen (12 h - 32 h) in physiologisch mittelalten Blättern. Das Auftreten sichtbarer Blattschäden war stets mit einer deutlich verstärkten, transienten Akkumulation von LOX mRNA (5 h - 24 h; mit einem Maximum nach 12 h), sowie mit einer erhöhten, transienten LOX Enzymaktivität (5 h-32 h; mit einem Maximum nach 24 h) verbunden. Dieser Zusammenhang wurde anhand von Dosis-Wirkungsexperimenten bestätigt. In jungen schadfreien Blättern wurde dagegen keine LOX mRNA Expression durch Ozon induziert. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der Induktion der LOX um eine lokale Abwehrreaktion handelt und die Regulation auf Transkriptionsebene erfolgt.

Bei der in den Chloroplasten lokalisierten 13-LOX handelt es sich um ein Enzym der Jasmonsäure (JA)-Biosynthese. Die Induktion einer 13-LOX durch Ozon konnte hier erstmalig anhand transgener *Arabidopsis thaliana* LOX2-GUS/FLUC histochemisch und enzymatisch bestätigt werden. Dass JA eine Rolle in der durch Ozon induzierten Signalkaskade spielt, ist allgemein akzeptiert. Ergänzend wurde in dieser

Arbeit mittels GC-MS Analysen gezeigt, dass freie endogene JA in Tabak cv. Bel W3 24 h nach Start der Ozonapplikation akkumuliert. Neben JA spielt auch Salicylsäure (SA) eine wesentliche Rolle bei der Abwehrantwort auf Ozon. Hier konnte nachgewiesen werden, dass Ozon die LOX mRNA auch bei dem SA-defizienten Tabak cv. Nah-G induziert (5 h- 12 h). Eine rein SA-abhängige Induktion der LOX durch Ozon bei Tabak wird demnach ausgeschlossen.

Auf Aktivitätsebene konnte ein biphasisches pH-Optimum, mit Linol- oder Linolensäure als Substrat, für die durch Ozon induzierten LOXs bei Tabak cv. Bel W3 nachgewiesen werden. Darüber hinaus, wurden erstmals zwei ozoninduzierte LOX Aktivitätsbanden bei Tabak cv. Bel W3 durch in-Gel Färbung mit NATIVE PAGE Analysen nachgewiesen, was ebenfalls für die Induktion verschiedener LOX-Isoformen, wie z. B. der 9- und 13-LOX spricht.

Zusätzlich wurden die zum LOX-Weg zählenden Enzyme Hydroperoxide Lyase (HPL), Epoxidhydrolase (EH), Allenoxid-Cyclase (AOC) und 12-oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR) hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Ozonabwehr bei Tabak mittels Northern Blot Analysen untersucht. Die Genexpression der an der JA-Biosynthese beteiligten Enzyme AOC und OPR wurde in allen Tabak Varietäten deutlich induziert, wobei die Induktion in dem ozonsensitiven Tabak cv. Bel W3 früher erfolgte. Eine deutliche Ozoninduktion der HPL, die Teil der Biosynthese von flüchtigen kurzkettigen C₆-Verbindungen wie E-2-Hexenal und Z-3-Hexenylacetat ist, wurde für Tabak cv. Bel W3 nach 32 h und 48 h nachgewiesen, wohingegen diese bei der ozontoleranten Varietät Bel B schwächer und nur nach 32 h erfolgte. Darüber hinaus wurde eine streng ozonabhängige Genexpression der EH, die Epoxy-Reaktionsprodukte des EAS- oder POX-Wegs hydrolysieren kann, bei allen Tabak Varietäten differentiell zwischen 5 h - 12 h nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit anhand der ozoninduzierten Genexpression der untersuchten LOX-Weg Enzyme bei verschiedenen Tabakkultivaren, die Aktivierung des LOX-Wegs durch Ozon gezeigt werden. Diese Arbeit liefert hiermit einen weiteren wichtigen Beitrag zum Verständnis der physiologischen Prozesse der Ozonantwort in Pflanzen.

6. Abstract

The air pollutant ozone can cause serious damages by alteration of biochemical and physiological processes in plants.

The present study investigates the influence of ozone (5 h, 150 ppb O₃) on the lipoxygenase (LOX) pathway of the different *Nicotiana tabacum* L. cultivars Bel W3 and Bel B, as well as of the transgenic *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi.nc-Nah-G.

For the first time it has been shown, that the differences in the ozone sensitivity of the tobacco cultivars, which were reflected in different foliar lesion formation of fully expanded leaves, correlated with a transient ozone-induced LOX transcript accumulation and LOX enzyme activity. Hence, these results pointed to an induction of both 9- and 13-LOX. The nucleotide sequence homology of the utilized LOX probe to an elicitor-induced LOX from tobacco, which is described as 9-LOX, indicated a 9-LOX induction.

The ozone treatment (5 h, 150 ppb O₃) did not induce foliar lesions in the ozone tolerant tobacco cultivar Bel B. In accordance, only a slight LOX transcript accumulation was observed after 12 h, only. In contrast, an equal ozone treatment resulted in marked foliar lesion formation (12 h- 32 h) of physiologically medium aged leaves in the ozone sensitive tobacco cultivar Bel W3. Visible leaf damage was always related with an enhanced, transient accumulation of LOX mRNA (5 h - 24 h) and LOX enzyme activity (5 h - 32 h), reaching a maximum after 12 or 24 h, respectively. This was confirmed with dose effect experiments. In contrast, LOX mRNA expression was not induced by ozone in young intact leaves. These results provide a strong indication for a local defence reaction of the ozone-induced LOX, which is regulated at the transcript level.

The chloroplast-located 13-LOX is an enzyme of the jasmonic acid (JA) biosynthesis pathway. For the first time, the ozone-induction of a 13-LOX could be confirmed histochemically and enzymatically with transgenic *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC. Nowadays, there is a general agreement on the involvement of JA in the ozone-induced signalling. Using GC-MS analysis, this work did further show that free endogenous JA accumulates 24 h after the onset of the ozone treatment in tobacco cv. Bel W3. Furthermore salicylic acid (SA) also plays an essential role for the defence reaction to ozone. Further, this study demonstrated an ozone induction of LOX mRNA transcripts in the SA-deficient tobacco cv. Nah-G (5 h- 12 h), too. A

strictly SA-dependent induction of the ozone-induced LOX in tobacco can therefore be excluded.

Using linoleic- or linolenic acid, biphasic pH optima of the ozone-induced LOX activity were observed in tobacco cv. Bel W3. For the first time, two bands reflecting ozone-induced LOX activity were detected in tobacco cv. Bel W3 by native staining, which may also indicate different LOX isoforms, like 9- and/or 13-LOX.

Furthermore, transcript accumulation of hydroperoxide lyase (HPL), epoxide hydrolase (EH), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxophytodienoic acid reductase (OPR) belonging to the LOX pathway, were investigated in terms of their involvement in the defense reaction to ozone in tobacco. It could be shown, that transcripts of the enzymes AOC and OPR, leading to JA biosynthesis, were markedly induced by ozone within all tobacco cultivars. The ozone-sensitive tobacco cv. Bel W3 exhibited the most rapid response. Furthermore, ozone induced in tobacco cv. Bel W3 after 32 h and 48 h, a remarkable increase of gene expression of the HPL, an essential enzyme leading to the synthesis of C₆ volatile organic compounds like E-2-Hexenal and Z-3-Hexenylacetat. In contrast, the ozone-induction of HPL transcript accumulation was in general weaker in the ozone tolerant tobacco cultivar Bel B, and appeared only after 32 h.

Epoxydized fatty acids derived from the EAS- or POX pathway can be hydrolyzed by the EH. Here, it is shown, that the differential EH gene expression (5 h - 12 h) in all tobacco cultivars was strictly ozone dependent.

In conclusion, the differential gene expression of the LOX pathway enzymes, examined in this work within the different tobacco cultivars, revealed the activation of the LOX pathway through ozone, and contributes to a better understanding of the ozone induced answers in plants.

7. Literaturverzeichnis

- Adams RM, Glycer JD, McCarl BA** (1988) 20. The NCLAN economic assessment: Approach, findings and implications. *In: Assessment of crop loss from air pollutants*. Heck, W. W., Taylor, O. C., Tingey, D. T. (Eds.) Elsevier Applied Science, London, 1988:473-504.
- Agrawal GK, Jwa N-S, Agrawal SK, Tamogami S, Iwahashi H, Rakwal R** (2003) Cloning of novel rice allene oxide cyclase (OsAOC): mRNA expression and comparative analysis with allene oxide synthase (OsAOS) gene provides insight into the transcriptional regulation of octadecanoid pathway biosynthetic genes in rice. *Plant Sci* **164**:979-992.
- Agrawal GK, Tamogami S, Han O, Iwahashi H, Rakwal R** (2004) Rice octadecanoid pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **317**:1–15.
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjärvi J** (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* **40**:512–522.
- Alami I, Jouy N, Clerivet A** (1999) The lipoxygenase pathway is involved in elicitor-induced phytoalexin accumulation in plane tree (*Platanus acerifolia*) cell-suspension cultures. *J Phytopathol* **147**:515-519.
- Al-Khalifa AS** (1996) Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *J Agric Food Chem* **44**:964-966.
- Alscher R, Donahue JL, Cramer CL** (1998) Molecular response to reactive oxygen species: Multifaceted changes in gene expression. *In: Responses of plant metabolism to air pollution and global change*. De Kok, L. J., Stulen, I. (Eds.), Backhuys Publishers, Leiden, NL, 233-240.
- Alvarez ME** (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* **44**:429-442.
- An L, Feng H, Tang X, Wang X** (2000) Change in microsomal membrane properties in spring wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photobiology B. Biology* **57**:60-65.
- Anderson DM, Chen Z, Klessig DF** (1998) Possible Involvement of Lipid Peroxidation in Salicylic Acid-Mediated induction of PR-1 Gene expression. *Phytochemistry* **47**:555-566.
- Anderson JM** (1989) Membrane-derived fatty acids as precursors to second messengers. *In: Boss, W. F. and Morré, D. J. (Eds), Second messengers in plant growth and development*, Alan, R. Liss, Inc., New York, 181-212.
- Andersson MX, Hamberg M, Kourtchenko O, Brunnström Å, McPhail KL, Gerwick WH, Göbel C, Feussner I, Ellerström M** (2006) Oxylin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **281**:31528-31537.
- Aono, M M., Ando M, Nakajima N, Kubo A, Kondo N, Tanaka K, Saji H** (1998) Response to photooxidative stress of transgenic tobacco plants with altered activities of antioxidant enzymes. *In: Responses of plant metabolism to air pollution and global change*. De Kok, L. J., Stulen, I. (Eds.), Backhuys Publishers, Leiden, NL, 269-272.
- Apostol I, Heinstejn PF, Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* **90**:109-116.

- Arahira M, Nong VH, Udaka K, Fukazawa C** (2000) Purification molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Eur J Biochem* **267**:2649-2657.
- Aydiushko S, Croft KPC, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D** (1995) Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and arabidopsis. *Plant Physiol* **109**:1227-1230.
- Aydiushko S, Ye XS, Hildebrand DF, Kuc J** (1993) Induction of lipoxygenase activity in immunized cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**:83-95.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S** (1981) Lipoxygenases from soybeans. In: *Methods in Enzymology*. Lowenstein, J. M. (Ed.), Vol 71, Lipids, Part C, 441-451 **71**:441-451.
- Aziz A, Larher F** (1998) Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. *Plant Physiol* **153**:754-762.
- Baker JC, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**:299-321.
- Baracat-Pereira MC, Oliveira MGdA, Barros EGd, Moreira MA, Santoro MM** (2001) Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: Presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiol* **39**:91-98.
- Barone SR, Briante R, D'Auria S, Febbraio F, Vaccaro C, Giudice LD, Borrelli GM, Fonzo ND, Nucci R** (1999) Purification and characterization of a Lipoxygenase enzyme from durum wheat semolina. *J Agric Food Chem* **47**:1924-1931.
- Bate NJ, Riley JCM, Thompson JE, Rothstein SJ** (1998) Quantitative and qualitative differences in C-6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **104**:97-104.
- Bate NJ, Rothstein SJ** (1998) C₆-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J* **16**:561-569.
- Bate NJ, Sivasankar S, Moxon C, Riley JMC, Thompson JE, Rothstein SJ** (1998) Molecular characterization of an arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol* **117**:1393-1400.
- Battistelli A, Pasqualini S, Moscatello S, Ederli L, Proietti S, Antonielli M** (2001) Effects of short term ozone fumigation on carbohydrates in darkened tobacco leaves. *Plant Physiol* **39**:539-543.
- Beauchamp J, Wisthaler A, Hansel A, Kleist E, Miebach M, Niinemets Ü, Schurr U, Wildt J** (2005) Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant Cell Environ* **28**:1334-1343.
- Belitz H-D, Grosch W, (Eds.)** (1987) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 3. überarb. Auflage, Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg.
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:8675-8679.
- Bell E, Mullet JE** (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* **103**:1133-1137.
- Berger S, Weichert H, Porzel A, Wasternack C, Kuhn H, Feussner I** (2001) Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochim Biophys Acta* **1533**:266-276.
- Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW** (1998) Localized Changes in Peroxidase Activity Accompany Hydrogen Peroxide Generation during the Development of a Nonhost Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiol* **118**:1067-1078.

- Biesgen C, Weiler EW** (1999) Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10, 11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **208**:155-165.
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
- Black VJ, Black CR, Roberts JA, Stewart CA** (2000) Impact of ozone on the reproductive development of plants. *New Phytol* **147**:421-447.
- Blée E** (1996) Chapter 8. Phytooxylipins: The Peroxygenase pathway. *In*: Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes. G. Piazza (Ed.). AOC Press, Champaign, Illinois, 1996. pp:138-161.
- Blée E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**:33-72.
- Blée E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**:315-22.
- Blée E, Joyard J** (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol* **110**:445-454.
- Blée E, Schuber F** (1993) Biosynthesis of cutin monomers: involvement of lipoxygenase/poroxygenase pathway. *Plant J* **4**:113-123.
- Bobrov Glater R, Solberg RA, Scott FM** (1962) A developmental study of leaves of *Nicotiana glutinosa* as related to their smog-sensitivity. *Am J Bot* **49**:945-970.
- Bohland C, Balkenhohl T, Loers G, Feussner I, Grambow H** (1997) Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **114**:679-685.
- Bolwell** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**:1367-1376.
- Borrell A, Carbonell L, Farrás R, Puig-Parellada P, Tiburcio AF** (1997) Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* **99**:385-390.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA** (2001) Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiol* **126**:1024-1030.
- Bostock RM, Yamamoto H, Choi D, Ricker KE, Ward BL** (1992) Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic acid. *Plant Physiol* **100**:1448-1456.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* **140**:103-125.
- Boutaud O, Brash A** (1999) Purification and Catalytic Activities of the Two Domains of the Allene Oxide Synthase-Lipoxygenase Fusion Protein of the Coral *Plexaura homomalla*. *J Biol Chem* **274**:33764-33770.
- Bowler C, Fluhr R** (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci* **5**:241-245.
- Bowles DJ** (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**:873-907.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brash AR** (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **274**:23679-23682.
- Braune W, Leman A, Tauber H** (1987) 5. Aufl. Pflanzenanatomisches Praktikum. Fischer Verl., Stuttgart; New York, 1987.

- Breithaupt C, Kurzbauer R, Lilie H, Schaller A, Strassner J, Huber R, Macheroux P, Clausen T** (2006) Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:14337–14342.
- Bueno P, Soto MJ, Rodríguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP** (2001) Time course of Lipoxygenase; antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol* **152**:91-96.
- Bueno P, Varela J, Giménez-Gallego G, Del Río LA** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase: Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol* **108**:1151-1160.
- Buonaurio R, Servili M** (1999) Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**:155-169.
- Busto MD, Apenten RKO, Robinson DS, Wu Z, Casey R, Hughes RK** (1999) Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. *Food Chem* **65**:323-329.
- Cacas J-L, Vaillau F, Davoine C, Ennar N, Agnel J-P, Tronchet M, Ponchet M, Blein J-P, Roby D, Triabtaphylides C, Montillet J-L** (2005) The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Environ* **28**:1367–1378.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**:1583-1592.
- Chameides WL** (1989) The chemistry of ozone deposition to plant leaves: Role of ascorbic acid. *Environ Sci Technol* **23**: 595-600.
- Chameides WL, Kasibhatla PS, Yienger J, Levy HI** (1994) Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. *Science* **264**.
- Chamngpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Jr. HS, Montagu MV, Inzé D, Camp WV** (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**.
- Castagna A, Ederli L, Pasqualini S, Mensuali-Sodi A, Baldan B, Donnini S, Ranieri A** (2007) The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. *New Phytol* **174**:342–356.
- Chehab EW, Perea JV, Gopalan B, Theg S, Dehesh K** (2007) Oxylinin Pathway in Rice and *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**:43-51.
- Chehab EW, Raman G, Walley JW, Perea JV, Banu G, Theg S, Dehesh K** (2006) Rice Hydroperoxide Lyase with Unique Expression Patterns Generate Distinct Aldehyde Signatures in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**:121–134.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig D** (1995) Induction, Modification, and Transduction of the Salicylic Acid Signal in Plant Defense Responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:4134-4137.
- Clemente A, Olias R, Olias JM** (2000) Purification and characterization of broad bean lipoxygenase isoenzymes. *J Agric Food Chem* **48**:1070-1075.
- Corey EJ, Nagata R, Wright SW** (1987) Biomimetic total synthesis of coloneleic acid and its function as a lipoxygenase inhibitor. *Tetrahedron Lett* **28**:4917-4920.
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:355-381.

- Croft KPC, Jüttner F, Slusarenko AJ** (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 KPC, Voisey GR, Slusarenko AJ** (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. *phaseiocola*. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**:49-62.
- Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T** (2000) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.) American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA.
- Cucurou C, Battioni JP, Daniel R, Mansuy D** (1991) Peroxidase-like activity of lipoxygenases: different substrate specificity of potato 5-lipoxygenase and soybean 15-lipoxygenase and particular affinity of vitamin E derivatives for the 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Acta* **1081**:99-105.
- D'Auria JC, Pichersky E, Schaub A, Hansel A, Gershenzon J** (2007) Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**:194–207.
- D'Haese D, Horemans N, Coen WD, Guisez Y** (2006) Identification of late O₃-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* by cDNA microarray analysis. *Physiol Plant* **128**:70–79.
- Dangl J, Dietrich RA, Richberg MH** (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**:1793-1807.
- Darrall NM** (1989) The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant Cell Environ* **12**:1-30.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Montagu MV, Inzé D, Breusegem FV** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**:779-795.
- Delaney T, Uknes S, Vernoij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward EWB, Ryals JA** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**:1247-1250.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**:585-588.
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C** (2006) Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – Enzymes, Products, Regulation. *Plant Biol* **8**:297–306.
- Demole E, Lederer E, Mercier D** (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**:675-685.
- Deng W, Hamilton-Kemp T, Nielsen M, Andersen RA, Collins GB, Hildebrand DF** (1993) Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *J Agric Food Chem* **41**:506-510.
- Dicke M, Gols R, Ludeking D, Posthumus M** (1999) Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting lant volatiles in lima bean plants. *J Chem Ecol* **25**:1907-1922.
- Dietz K-J** (1997) V. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. In: Progress in Botany, Vol 58. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997:221-254.
- Doke N, Ohashi Y** (1988) Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol* **32**:163-175.

- Dhondt S, Gouzerh G, Iler AM, Legrand M, Heitz T** (2002) Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *The Plant Journal* **32**:749–762.
- Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S** (1999) Hydrogen Peroxide from the Oxidative Burst Is Neither Necessary Nor Sufficient for Hypersensitive Cell Death Induction, Phenylalanine Ammonia Lyase Stimulation, Salicylic Acid Accumulation, or Scopoletin Consumption in Cultured Tobacco Cells Treated with Elicitin. *Plant Physiol* **121**:163-172.
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13-15.
- Dubbs WE, Grimes HD** (2000) Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiol* **123**:1269-1279.
- Durner J, Klessig DF** (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J Biol Chem* **271**:28492-28501.
- Durner J, Shah J, Klessig DF** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**:266-274.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:10328-10333.
- El-Moshaty Beleid FI, Pike S, Novacky A, Sehgal O** (1993) Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol* **43**:109-119.
- Elstner EFE** (Eds.)(1990) Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin. Mannheim, Wien, Zürich: Bi Wissenschaftsverlag, 1990.
- Enyedi AJ** (1999) Induction of Salicylic Acid Biosynthesis and Systemic Acquired Resistance using the Active Oxygen Species Generator Rose Bengal. *Plant Physiol* **154**:106-112.
- Ernst D, Bodemann A, Schmelzer E, Langebartels C, Sanderman HJ** (1996) β -1, 3- glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 after ozone fumigation. *Plant Physiol* **148**:215-221.
- Ernst D, Grimmig B, Heidenreich B, Schubert R, Sandermann H** (1999) Ozone-induced genes: mechanisms and biotechnological applications. In: Plant Responses to Environmental Stress. M.F. Smallwood, C.M. Calvert, D.J. Bowles (Eds). BIOS Scientific Publishers, Oxford pp: 33-41.
- Ernst D, Schraudner M, Langebartels C, Sandermann Jr. H** (1992) Ozone-induced changes of mRNA levels of β -1,3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' protein 1b in tobacco plants. *Plant Mol Biol* **20**:673-682.
- Eschen-Lippold L, Rothe G, Stumpe M, Göbel C, Feussner v, Rosahl S** (2007) Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry* **68**:797–801.
- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, Knight MR** (2005) ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant J* **41**:615–626.
- Fammartino A, Cardinale F, Göbel C, Méne-Saffrane L, Fournier JI, Feussner I, Tugay M-TE** (2007) Characterization of a Divinyl Ether Biosynthetic Pathway Specifically Associated with Pathogenesis in Tobacco1[W][OA]. *Plant Physiol* **143**:378–388.
- Fan X, Mattheis JP** (2001) Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by trans-resveratrol. *J Food Sci* **66**:200-203.
- FAO** (1998) FAOSTAT. <http://apps.fao.org>.

- Farmaki T, Sanmartín M, Jiménez P, Paneque M, Sanz C, Vancanney G, León J, Sánchez-Serrano JJ** (2007) Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J Exp Bot* **58**:555–568.
- Farmer EE, Ryan CA** (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:7713-7716.
- Farmer EE, Ryan CA** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**:129-134.
- Feussner I** (2000) Oxidation von Polyenfettsäuren durch Lipoxygenasen. Kumulative Habilitationsschrift. Math. Nat. Tech. Fak. Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg, 2000.
- Feussner I, Fritz IG, Hause B, Ullrich WR, Wasternack C** (1997) Induction of a new lipoxygenase form in cucumber leaves by salicylic acid or 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Bot Acta* **110**:1-8.
- Feussner I, Hause B, Vörös K, Parthier B, Wasternack C** (1995a) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant J* **7**:949-957.
- Feussner I, Kindl H** (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett* **298**:223-225.
- Feussner I, Kühn H** (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *FEBS Lett* **367**:12-14.
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**:268-273.
- Feussner I, Wasternack C** (1998) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids¹). *Fett-Lipid* **100**:146-152.
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The Lipoxygenase Pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**:275-97.
- Fidantsef A, Stout M, Thaler J, Duffey S, Bostock R** (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **54**:97-114.
- Fischer AM, Dubbs WE, Baker RA, Fuller MA, Stephenson LC, Grimes HD** (1999) Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *Plant J* **19**:543-554.
- Fornaroli S, Petrusa E, Braidot E, Vianello A, Macrì F** (1999) Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. *Plant Sci* **145**:1-10.
- Fournier J, Pouenat M, Rickauer M, Rabinovitch-Chable H, Rigaud M, Esquerre-Tugaye M** (1993) Purification and characterization of elicitor-induced lipoxygenase in tobacco cells. *Plant J* **3**:63-70.
- Foyer CH** (1998) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Monograph 34, J. G. Scandalios (Eds.), North Carolina State University, Raleigh. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997:587-621.
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* **28**:1056–1071.
- Franceschi VR, Grimes HD** (1991) Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:6745-6749.

- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* **29**:959-968.
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA** (2001) Tomato Allene Oxide Synthase and Fatty Acid Hydroperoxide Lyase, Two Cytochrome P450s Involved in Oxylin Metabolism, Are Targeted to Different Membranes of Chloroplast Envelope. *Plant Physiol* **125**:306-317.
- Fukuchi-Mizutani M, K.Ishiguro, T.Nakayama, Utsunomiya Y, Tanaka Y, Kusumi T, Ueda T** (2000) Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. *Plant Sci* **160**:129-137.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward EWB, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**:754-756.
- Galliard T, Chan HW-S** (1980) Lipoxygenases. In: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise, Academic Press, Inc., New York **4**:131-157.
- Gardner CD, Sherrier DJ, Kardailsky IV, Brewin NJ** (1996) Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea podules: Identification of lipoxygenase in the lumen of infection threads. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**:282-289.
- Gardner HW** (1989) Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochem Biophys Acta* **1001**:274-281.
- Gardner HW** (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochem Biophys Acta* **1084**:221-239.
- Gardner HW, Dornbos DL, Desjardins JuAE** (1990) Hexanal, trans-2-Hexenal, and trans-2-Nonenal Inhibit Soybean, *Glycine max*, Seed Germination. *J Agric Food Chem* **38**:1316-1320.
- Gardner HW, 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.
- Gardner HW, Simpson TD, M. H** (1993) Transformation of Fatty Acid Hydroperoxides by Alkali and Characterization of Products. *Lipids* **28**:487-495.
- Gardner HW, Weisleder D, Plattner RD** (1991) Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissue of soybean, *Glycine max*. *Plant Physiol* **97**:1059-1072.
- Gechev TS, Hille J** (2006) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* **168**:17-20.
- Glazener JA, Orandi E, Baker CJ** (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol* **110**:759-763.
- Göbel C, Feussner I, Rosahl S** (2003) Lipid Peroxidation during the Hypersensitive Response in Potato in the Absence of 9-Lipoxygenases. *J Biol Chem* **278**:52834-52840.
- 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.
- Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H, Soyano T, Sasabe M, Machida Y, Mitsuhashi I, Ohashi Y, Seo S** (2005) A Mitogen-activated Protein Kinase NtMPK4 Activated by SIPKK is Required for Jasmonic Acid Signaling and Involved in Ozone Tolerance via Stomatal Movement in Tobacco. *Plant Cell Physiol*. **46**:1902-1914.

- Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K** (2003) Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). *Plant Mol Biol* **53**:189–199.
- Goodman RN, Novacky AJ** (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Grantz DA, Farrer JF** (2000) Ozone inhibits phloem loading from a transport pool: compartmental efflux analysis in Pima cotton. *Plant Physiol* **27**:859–868.
- Grechkin A** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**:317–352.
- Grechkin AN, Brühlmann F, Mukhtarova LS, Gogolev YV, Hamberg M** (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals. *Biochem Biophys Acta* **1761**:1419–1428.
- Grechkin AN, Kuramshin RA, Safonova EY, Yefremov YA, Latypov SK, Ilyasov AV, Tarchevsky IA** (1991) Double hydroperoxidation of α -linolenic acid by potato tuber lipoxygenase. *Biochem Biophys Acta* **1081**:79–84.
- Greenberg JT** (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:12094–12097.
- Greenberg JT, Guo DF, Klessig DF, Ausubel FM** (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**:551–563.
- Griffiths G, Leverentz M, Silkowski H, Gill N, Sanchez-Serrano JJ** (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J Exp Bot* **51**:1363–1370.
- Grignon C, Sentenac H** (1991) pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**:103–128.
- Grimes HD, Koetje DS, Franceschi VR** (1992) Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiol* **100**:433–443.
- Grimmig B, Gonzalez-Perez MN, Leubner-Metzger G, Vögeli-Lange R, Jr. FM, Hain R, Penuelas J, Heidenreich B, Langebartels C, Ernst D, Jr. HS** (2003) Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling. *Plant Mol Biol* **51**:599–607.
- Groot Hd, Rauen U** (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* **12**:249–55.
- Grossman S, Zakut R** (1979) Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Methods Biochem. Anal.* **25**:303–329.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**:507–516.
- Grun C, Berger S, Matthes D, Mueller MJ** (2007) Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Functional Plant Biology* **34**:65–71.
- Guderian R** (1985) Air pollution by phytochemical oxidants: Formation, transport, control and effects on plants. Guderian, R. (Ed.), Springer, Berlin, 1985.
- Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB** (1994) The Lipid Handbook. 2nd Edn., Chapman & Hall, London.
- Guo A, Durner J, Klessig DF** (1998) Characterization of a tobacco epoxide hydrolase gene induced during the resistance response to TMV. *Plant J* **15**:647–656.
- 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, Gardner HW** (1992) Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochem Biophys Acta* **1165**:1-18.
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ, Castresana C** (2005) α -Dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:169-174.
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C** (1999) α -oxidation of fatty acids in higher plants - Identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**:24503-24513.
- Hamilton-Kemp TR, Loughrin JH, Archbold DD, Anderson RA, Hildebrand DF** (1991) Inhibition of pollen germination by volatile compounds including 2-hexenal and 3-hexenal. *J Agric Food Chem* **39**:952-956.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**:1773-1791.
- Harms K, Atzorn R, Brash A, Kühn H, Wasternack C, Willmitzer L, Peña-Cortés H** (1995) Expression of an allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell* **7**:1645-1654.
- Harms K, Ramirez I, Peña-Cortés H** (1998) Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in Flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol* **118**:1057-1065.
- Hatanaka A** (1999) Biosynthesis of so-called "green odor" emitted by green leaves. *In: Comprehensive natural products chemistry*, Barton, D. S., Nakanishi, K. (Eds). Vol. 1, Pergamon:83-113.
- Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J** (1987) Biosynthetic pathway for C₆-aldehydes formation from linolenic acid in greenleaves. *Chem Phys Lipids* **44**:341-361.
- Hatanaka A, Sekiya J, Kajiwara T** (1983) Linolenic acid and its 13-hydroperoxide inhibit hexanal formation from linoleic acid in plant tissues. *J Agric Food Chem* **31**:176-178.
- Hause B, Hertel SC, Klaus D, Wasternack C** (1999) Cultivar-specific expression of the jasmonate-induced protein of 23 kDa (JIP-23) occurs in *Hordeum vulgare* L. by jasmonates but not during seed germination. *Plant Biol* **1**:83-89.
- Hause B, Weichert H, Hohne M, Kindl H, Feussner I** (2000) Expression of cucumber lipid-body lipooxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipooxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta* **210**:708-714.
- Heagle AS** (1989) Ozone and crop yield. *Annu Rev Phytopathol* **27**:397-423.
- Heath RL** (1980) Initial events in injury to plants by air-pollutants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**:395-431.
- Heath RL** (1987) The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Rec Adv Phytochem* **21**:29-54.
- Heath RL, Taylor GE** (1997) Physiological processes and plant responses to ozone exposure. *In: Forest decline and ozone*, Sandermann, H., Wellburn, A. R., Heath, R. L. (Eds.). Ecol. Studies, Vol. 127, Springer-Verlag, Berlin, 317-368.
- Heggstad HE** (1991) Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut* **74**:264-291.
- Heggstad HE, Menser HA** (1962) Leaf spot -sensitive tobacco strain Bel W3: A biological indicator of ozone. *Phytopathol* **52**:735 (abstract).
- Heggstad HE, Middleton HA** (1959) Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science* **129**.

- Heiden AC, Hoffmann T, Kahl J, Kley D, Klockow D, Langebartels C, Mehlhorn H, Sandermann H, Schraudner M, Schuh G, Wildt J** (1999b) Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecol Appl* **9**:1160-1167.
- Heiden AC, Kobel K, Langebartels C, Schuh-Thomas G, Wildt J** (2003) Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants Part I: Emissions from lipoxygenase activity. *Journal of Atmospheric Chemistry* **45**:143-172.
- Heiden AC, Kobel K, Wildt J** (1999a) Einfluß verschiedener Streßfaktoren auf die Emission pflanzlicher flüchtiger organischer Verbindungen. Berichte des Forschungszentrums Jülich; 3622. D 464 (Dissertation Universität-GH Duisburg). Forschungszentrums Jülich GmbH; Zentralbibliothek.
- Heidenreich B, Haberer G, Mayer K, Sandermann H, Ernst D** (2005) cDNA array analysis of mercury- and ozone-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 45-51.
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA** (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **114**:1085-1093.
- Heldt HW** (1996) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Heydeck D, Schewe T** (1985) Improved procedure for the detection of activity of lipoxygenases on electropherograms. *Biomed Biochem Acta* **44**:1261-1263.
- Hildebrand DF** (1989) Lipoxygenases. *Physiol Plant* **76**:249-253.
- Hofmann E, Zerbe P, Schaller F** (2006) The Crystal Structure of *Arabidopsis thaliana* Allene Oxide Cyclase: Insights into the Oxylipin Cyclization Reaction. *Plant Cell* **18**:3201–3217.
- Hogg N, Kalyanaraman B** (1999) Nitric Oxide and Lipid Peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1411**:378-384.
- Holme DJ, Peck H** (1998) Analytical Biochemistry, 3rd edition, Longman Scientific and Technical, New York.
- Hopke J, Donath J, Blechert S, Boland W** (1994) Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Lett* **352**:146-150.
- Hornung E, Walther M, Kühn H, Feussner I** (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4192-4197.
- Howe GA, Lee GI, Itoh A, Li L, DeRocher AE** (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.
- Hu J, Kulkarni AP** (1998) Lipoxygenase-mediated demethylation of pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **61**:145-153.
- Hughes RK, Wu Z, Robinson DS, Hardy D, West SI, Fairhurst SA, Casey R** (1998) Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms. *Biochem J* **333**:33-43.
- Hunt MD, Neuenschwander UH, Delaney TP, Weymann KB, Friedrich LB, Lawton KA, Steiner HY, Ryals JA** (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research-a review. *Gene* **179**:89-95.
- Husson F, Pagot Y, Kermasha S, Belin JM** (1998) *Fusarium proliferatum*: induction and intracellular location of a lipoxygenase. *Enzyme and Microbial Technology* **23**:42-48.
- Ievenish G** (1992) Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. *Plant Sci* **82**:155-159.

- Imbusch R, Mueller MJ** (2000) Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F1 (Phytprostanes F1) in Plants. *Plant Physiol* **124**:1293-1304.
- Itoh A, Howe GA** (2001) Molecular Cloning of a Divinyl Ether Synthase. Identification as a CYP74 Cytochrome P-450. *J Biol Chem* **276**:3620–3627.
- Itoh A, Vick BA** (1999) The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. *Biochem Biophys Acta* **1436**:531-540.
- Izaguirre MM, Scopel AL, Baldwin IT, Ballare CL** (2003) Convergent Responses to Stress. Solar Ultraviolet-B Radiation and *Manduca sexta* Herbivory Elicit Overlapping Transcriptional Responses in Field-Grown Plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiol* **132**:1755–1767.
- Jabs T** (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* **57**:231-245.
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**:1853-1856.
- Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL** (1996) 2. Lipid oxidation in biological and food systems. In: Food Antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. Food Science and Technology, 71. (Eds.) Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K.. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetse K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphyllides C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M** (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenase during the hypersensitive reaction. *Plant J* **32**:1-12.
- Janzik I, Preiskowski S, Kneifel H** (2005) Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3). *Planta* **223**:20–27.
- Jefferson RA, Kavanagh A, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**:3901-3907.
- Jensen AB, Raventos D, Mundy J** (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J* **29**:595-606.
- Jolivet P, Bergeron E** (1988) Production of hydroperoxides and oxoenes during the oxidation of linoleic and linolenic acids by wheat foliar lipoxygenase. *Plant Physiol* **26**:55-63.
- Jung C, Yeu SY, Koo YJ, Kim M, Choi YD, Cheong J-J** (2007) Transcript Profile of Transgenic *Arabidopsis* Constitutively producing Methyl jasmonate. *J Plant Biol* **50**:12-17.
- Kandath PK, Ranf S, Pancholi SS, Jayanty S, Walla MD, Miller W, Howe GA, Lincoln DE, Stratmann JW** (2007) Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:12205–12210.
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environ* **28**:1021–1036.
- Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R** (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ* **17**:783-794.
- Kanna M, Tamaoki M, Kubo A, Nakajima N, Rakwal R, Agrawal GK, Tamogami S, Ioki M, Ogawa D, Saji H, Aono M** (2003) Isolation of an ozonesensitive and jasmonate-semi-insensitive *Arabidopsis* mutant (*oji1*). *Plant Cell Physiol* **44**:1301-1310.

- Katamura H, Gardner HW** (1996) Oxygenation of (3Z)-alkenal to (2E)-4-hydroxy-2-alkenal in soybean seed (*Glycine max.* L.). *Biochem Biophys Acta* **1303**:83-91.
- Kausch K, Handa A** (1997) Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. *Plant Physiol* **113**:1041-1050.
- Kawano T, Muto S** (2000) Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J Exp Bot* **51**:685-693.
- Keitel A, Arndt U** (1983) Ozoninduzierte Turgeszenzverluste bei Tabak (*N. tabacum* var. Bel W3) -ein Hinweis auf schnelle Permeabilitätsveränderungen der Zellmembranen. *Angew Bot* **57**:193-204.
- Kenton P, Mur LA, Atzorn R, Wasternack C, Draper J** (1999) Jasmonic acid accumulates during the tobacco hypersensitive response (HR) and is restricted to HR lesions. *Mol Plant-Microbe Interact* **112**:74-78.
- Keppler LD, Novacky A** (1987) The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**:233-245.
- Kerner K** (1990) Biochemische und physiologische Untersuchungen zur unterschiedlichen Ozontoleranz der Tabaksorten (*Nicotiana tabacum* L.) Bel B und Bel W3. Dissertation LMU München, 1990.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C** (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu Rev Phytopathol* **32**:439-459.
- Kiba A, Takata O, Ohnishi K, Hikichi Y** (2006) Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. *Planta* **224**:981-994.
- Klessig DF, Durner J, Shah J, Yang Y** (1998) Chapter Seven: Salicylic acid-mediated signals transduction in plant disease resistance. In: Al. Re (ed) *Phytochemical signals and plant-microbe interactions*. Plenum Press, New York.
- Kley D, Kleinmann M, Sanderman H, Krupa S** (1999) Photochemical oxidants: state of the science. *Environ Pollut* **100**:19-42.
- Kliebenstein DJ, Monde R-A, Last RL** (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol* **118**:637-650.
- Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Vergne P, Sifakis N, Sanz MJ, Rasmussene S, Ro-Poulsene H, Ribas Á, Penuelas J, Kambezidis H, Heg S, Garrec JP, Calatayud V** (2006) Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* **40**:7437-7448.
- Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko AJ** (1992) A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic *pseudomonads*. *Plant Physiol* **99**:571-576.
- Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M** (2000) Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* **123**:487-496.
- 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.
- Kolattukudy PE** (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can J Bot* **62**:2918-2933.

- Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämmad H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjaärvi J, Kollist H** (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**:796–803.
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, Braun EJ, Hannapel DJ** (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol* **124**:1121-1130.
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M, Gladon RJ** (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**:613-626.
- Kombrink E, Somssich IE** (1995) Defense responses of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research (incorporating Advances in Plant Pathology)*, Andrews, J.H., Tommerup, I. C. (Eds), Academic Press, London, UK, Vol 21, 1-34.
- Kondo Y, Hashidoko Y, Mizutani J** (1995) An enzymatic formation of 13-oxo-9, 11-dienoic acid from 13-hydroperoxylinolenic acid by a homolytic hydroperoxide lyase in elicitor-treated soybean cotyledons. *Biochem Biophys Acta* **1255**:9-15.
- Kondratyev KY, Varotsos CA** (2001) Global tropospheric ozone dynamics. *Environ Sci Pollut Res Int* **8**:57-62.
- Kongrit D, al MJe** (2007) Molecular cloning and functional expression of Soybean Allene Oxide Synthase. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:419-498.
- Koo YJ, Kim MA, Kim EH, Song oT, Jung C, Moon J-K, Kim J-H, Seo HS, Song SI, Kim J-K, Lee JS, Cheong J-J, Choi YD** (2007) Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **64**:1–15.
- Krupa SV, Grünhage L, Jäger H-J, Nosal M, Manning WJ, Legge AH, Hanewald K** (1995) Ambient ozone (O₃) and diverse crop response: A unified view of cause and effect. *Environ Pollut* **87**:119-126.
- Kubicka E, Gabska J, Jedrychowski L, Czyz B** (2000) Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. *Int J Food Sci Nutr* **51**:301-304.
- Kubigsteltig I, Laudert D, Weiler EW** (1999) Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**:463-471.
- Kuhn H, Thiele BJ** (1999) The diversity of the lipoxygenase family. *FEBS Lett* **449**:7-11.
- Kumar D, Klessig DF** (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:16101-16106.
- Laisk A, Kull O, Moldau H** (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol* **90**:1163-1167.
- Lam E, Pontier D, Pozo Od** (1999) Die and let live -programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**:502-507.
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:251-75.
- Lang I, Feussner I** (2007) Oxylipin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102). *Phytochemistry* **68**:1120–1127.
- Langebartels C, Ernst D, Heller W, Lütz C, Payer H-D, Sandermann Jr. H** (1997) Ozone responses of trees: Results from controlled chamber exposures at the GSF Phytotron. In: *Forest decline and ozone*, Sandermann, H., Wellburn, A. R., Heath, R. L. (Eds.). *Ecol. Studies*, Vol. 127, Springer-Verlag, Berlin, 163 -192.

- Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann HJ** (1991) Biochemical plant responses to ozone: I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **95**:882-889.
- Langebartels C, Wohlgenuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol* **40**:567-575.
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler EW** (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* **31**:323-335.
- Laudert D, Weiler EW** (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* **15**:675-684.
- Lendzian KJ** (1987) Aufnahme und Zellphysiologische Wirkung von Luftschadstoffen. *Naturwissenschaften* **74**:282-288.
- León J, Lawton MA, Raskin I** (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **108**:1673-1678.
- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ** (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* **52**:1-9.
- Léon J, Royo J, Vancanneyt G, Sanz C, Silkowski H, Griffiths G, Sanchez-Serrano JJ** (2001) Lipoxygenase H1 Gene Silencing Reveals a Specific Role in Supplying Fatty Acid Hydroperoxides for Aliphatic Aldehyde Production. *J Biol Chem* **277**:416-423.
- Lequeu J, Fauconnier M-L, Chammai A, Bronner R, Blée E** (2003) Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. *Plant J* **36**:155-64.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**:583-593.
- Liavonchanka A, Feussner I** (2006) Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Plant Physiol* **163**:348-357.
- Loiseau J, Vu BL, Macherel M-H, Le Deunff Y** (2001) Seed lipoxygenases: occurrence and functions. *Seed Sci Res* **11**:199-211.
- Loomis WD** (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Meth. Enzymology* **31**:528-544.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* **15**:165-178.
- Lorenzo O, Solano R** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol*:532-540.
- Low PS, Merida JR** (1996) The oxidative burst in the plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**:533-542.
- Lupu R, Grossmann S, Cohen Y** (1980) The involvement of lipoxygenase and antioxidants in pathogenesis of powdery mildew on tobacco plants. *Physiol Plant Pathol* **16**:241-248.
- Luwe MWF, Takahama U, Heber U** (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* **101**:969-976.
- Lynch DV, Thompson JE** (1984) Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescencing plant tissue. *FEBS Lett* **173**:251-254.
- Maccarrone M, Van Zadelhoff G, Veldink GA, Vliegthart JFG, Finazzi-Agro A** (2000) Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by

- oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry* **267**:5078-5084.
- Maccarrone M, Melino G, Finazzi-Agro A** (2001) Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**:776-784.
- Maccarrone M, van Aarle PGM, Veldink GA, Vliegthart JFG** (1994) *In vitro* oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. *Biochem Biophys Acta* **1190**.
- Maccarrone M, Veldink GA, Vliegthart JFG** (1992) Thermal injury and ozone stress affect soybean lipoxygenases expression. *FEBS Lett* **309**:225-230.
- Maccarrone M, Veldink GA, Vliegthart JFG, Agrò AF** (1995) Inhibition of Soybean Lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants. *Lipids* **30**:51-54.
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P** (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **29**:1357–1371.
- Maier J, Heck I** (1999) Molekularbiologische Methoden für die Pflanzenbiochemie. PCR- vom Gen zum Klon. Versuchsanleitung für Biochemiker und Biologen, Praktikum-Wintersemester 1998/99, Universität Tübingen, Institut für Pflanzenbiochemie, 1-16.
- Major RT, Marchini P, Sproston T** (1960) Isolation from *Ginkgo biloba* L. of an inhibitor of fungus growth. *J Biol Chem* **235**:3298-3299.
- Malamy J, Klessig DF** (1992) Salicylic acid and plant defense resistance. *Plant J* **2**:643-654.
- Maréchal E, Block MA, Dorne A-J, Douce R, Joyard J** (1997) Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiol Plant* **100**:65-77.
- Marmey P, Jalloul A, Alhambia M, Assigbetse K, Cacas J-L, Voloudakis AE, Champion A, Clerivet A, Montillet J-L, Nicole M** (2007) The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol* **45**:596-606.
- Martinez C, Baccou J-C, Bresson E, Baissac Y, Daniel J-F, Jalloul A, Montillet J-L, Geiger J-P, Assigbetsé K, Nicole M** (2000) Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiol* **122**:757-766.
- Matsui K** (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belgian Journal of Botany* **131**:50-62.
- Matsui K, Minami A, Hornung E, Shibata H, Kishimoto K, Ahnert V, Kindl H, Kajiwara T, Feussner I** (2006) Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry* **67**:649–657.
- Mauch F, Kmecl A, Schaffrath U, Volrath S, Görlach J, Ward E, Ryals J, Dudler R** (1997) Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiol* **114**:1561-1566.
- Mauch F, Staehelin LA** (1989) Functional implication of the subcellular localization of Ethylene-induced Chitinase and β -1, 3 Glucanase in bean leaves. *Plant Physiol* **88**:936-942.
- Maucher H, Stenzel I, Miersch O, Stein N, Prasad M, Zierold U, Schweizer P, Dorer C, Hause B, Wasternack C** (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ-specific expression. *Phytochem.* **65**:801-11.

- McCrary JK, Andersen CP** (2000) The effect of ozone on below-ground carbon allocation in wheat. *Environ Pollut* **107**:465-472.
- Melan MA, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **101**:441-450.
- Mène-Saffrané L, Esquerré-Tugayé M-T, Fournier J** (2003) Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Molecular Breeding* **12**:271-282.
- Middleton JT, Kendrick JB, Schwalm HW** (1950) Injury to herbaceous plants by smog or air pollution. *Plant Dis Rep* **34**:245-252.
- Miller JD, Arteca RN, Pell EJ** (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **120**:1015-1024.
- Mita G, Fasano P, Domenico SD, Perrone G, Epifani F, Iannacone R, Casey R, Santino A** (2007) 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/*Aspergillus carbonarius* interaction. *J Exp Bot* **58**:1803–1811.
- Mittler R, Lam E** (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol Biol* **34**:209-221.
- Möder W, Anegg S, Thomas G, Langebartels C, Sandermann HJ** (1999) Signal molecules in ozone activation of stress proteins in plants. In: Plant responses to environmental stress. Smallwood M. F., Calvert C. M., Bowles D. J., (Eds) BIOS, Oxford, 1999, Scientific Publishers, pp. 43-49.
- Montillet J-L, Cacas J-L, Garnier L, Montané M-H, Douki T, Bessoule J-J, Polkowska-Kowalczyk L, Maciejewska U, Agnel J-P, Vial A, Triantaphylidés C** (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant J* **40**:439–451.
- Montillet J-L, Chamnongpol S, Rustérucci C, Dat J, Cotte Bvd, Agnel J-P, Battesti C, Inzé D, Breusegem FV, Triantaphylides C** (2005) Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. *Plant Physiol* **138**:1516–1526.
- Morris PC** (2001) MAP kinase signal transduction pathway in plants. *New Phytol* **151**:67-89.
- Mudd JB** (1996) Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: In: Plant response to air pollution (Yunus, M. und Iqbal, M. (Eds.), J. Wiley, New York, 1996.
- Müller A, Duchting P, Weiler EW** (2002) A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**:44-56.
- Mueller MJ** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant* **100**:653-663.
- Mueller MJ, Mène-Saffrané L, Grun C, Karg K, Farmer EE** (2006) Oxylipin analysis methods. *The Plant Journal* **45**:472-489.
- Murphy JJ, Delucchi MA, McCubbin DR, Kim HJ** (1999) The cost of crop damage caused by ozone air pollution from motor vehicles. *Journal of Environmental Management* **55**:273-289.
- Myung K, Hamilton-Kemp TR, Archbold DD** (2006) Biosynthesis of trans-2-Hexenal in Response to Wounding in Strawberry Fruit. *J Agric Food Chem* **54**:1442-1448.
- Myung K, Hamilton-Kemp TR, Archbold DD** (2007) Interaction with and Effects on the Profile of Proteins of *Botrytis cinerea* by C₆ Aldehydes. *J Agric Food Chem* **55**: 2182-2188.

- Nali C, Ferretti M, Pellegrini M, Lorenzini G** (2000) Monitoring and biomonitoring of surface ozone in Florence, Italy. *Environ Monit Assess* **69**:159-174.
- Narvel JM, Fehr WR, Welke GA** (1998) Agronomic and seed traits of soybean lines lacking seed lipoxygenases. *Crop Sci* **38**:926-928.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock J** (1999) H₂O₂ signalling in plant cells. In: Plant responses to environmental stress. Smallwood M. F., Calvert C. M., Bowles D. J., (Eds) Oxford: BIOS Scientific Publishers, pp. 59-64.
- Nelson DR** (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**:1-10.
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M** (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Bot* **57**:3767–3779.
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J** (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* **8**:227-233.
- Newman JW, Morisseau C, Hammock BD** (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **44**:1-51.
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y** (1998) Antagonist effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wound mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* **39**:500-507.
- Noordermeer MA, Feussner I, Kolbe A, Veldink GA, Vliegthart JFG** (2000) Oxygenation of (3Z)-alkenals to 4-hydroxy-(2E)-alkenals in plant extracts: A nonenzymatic process. *Biochem Biophys Res Commun* **277**:112-116.
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JFG** (2001) Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Lett* **489**:229-232.
- Nuñez A, Foglia TA, Savary BJ, Piazza GJ** (2000) Anaerobic lipoxygenase activity from *Chlorella pyrenoidosa* responsible for the cleavage of the 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Eur J Lipid Sci and Tech* **102**:181-188.
- Ocampo CA, Moerschbacher B, Grambow HJ** (1986) Increased lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with virulent rust fungi or treated with fungal elicitor. *Z Naturforsch* **41c**:559-563.
- Ogawa D, Nakajima N, Sano T, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kamada H, Saji H** (2005) Regulation of Salicylic Acid Synthesis in Ozone-exposed Tobacco and Arabidopsis. *Phyton-Annales Rei Botanicae* **45**:169-175.
- Ogawa D, Nakajima N, Sano T, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kanna M, Ioki M, Kamada H, Saji H** (2005) Salicylic Acid Accumulation Under O₃-Exposure is Regulated by Ethylene in Tobacco Plants. *Plant Cell Physiol* **46**:1062–1072.
- Olbrich M, Betz G, Gerstner E, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D** (2005) Transcriptome Analysis of Ozone-Responsive Genes in Leaves of European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biol* **7**:670–676.
- Omar MNB, Hamilton RJ, Moynihan A** (2003) Stereoselective preparations of epoxy-, fluoro- and related derivatives of ricinoleic and 13(S)-hydroxyoctadeca-9(Z), 11(E)-dienoic acid. *Arkivoc* **vii**:190-199.
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **13**:179-191.
- Örvar BL, McPherson J, Ellis BE** (1997) Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J* **11**:203-212.

- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**:335-342.
- Overmyer K, Brosche M, Pellinen R, Kuittinen T, Tuominen H, Ahlfors R, Keinänen M, Saarma M, Scheel D, Kangasjärvi J** (2005) Ozone-Induced Programmed Cell Death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 Mutant. *Plant Physiol* **137**:1092–1104.
- Overmyer K, Tuominena H, Kettunena R, Betz C, Langebartels C, Jr. HS, Kangasjärvi J** (2000) Ozone-sensitive arabidopsis *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* **12**:1849-1862.
- Parchmann S, Mueller MJ** (1998) Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from α -linolenic acid in plants. *J Biol Chem* **273**:32650-32655.
- Paré PW, Tumlinson JH** (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* **121**:325-332.
- Pasqualini S, Batnini P, Ederli L, Antonielli M** (1999) Responses of the xanthophyll cycle pool and ascorbate-gluthation cycle to ozone stress in two tobacco cultivars. *Free Rad Res* **31**:67-73.
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Torre GD, Ferranti F** (2003) Ozone-Induced Cell Death in Tobacco Cultivar Bel W3 Plants. The Role of Programmed Cell Death in Lesion Formation. *Plant Physiol* **133**:1122–1134.
- Pasqualini S, Torre GD, Ferranti F, Ederli L, Piccioni C, Reale L, Antonielli M** (2002) Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. *Physiol Plant* **115**:204-212.
- Pasqualini S, Bartini P, Ederli L, Porceddu A, Piccioni C, De Marchis F, Antonielli M** (2001) Effects of short term ozone fumigation on tobacco plants: response of scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant Cell Environ* **24**:245-252.
- Pastore D, Trono D, Padalino L, Simone S, Valenti D, Fonzo ND, Passarella S** (2000) Inhibition by -Tocopherol and L-Ascorbate of Linoleate Hydroperoxidation and -Carotene Bleaching. *J Cereal Sci* **31**:41-54.
- Pell EJ, Schlaghauser CD, Arteca RN** (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanism of action and reaction. *Physiol Plant* **100**:264-273.
- Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J** (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* **20**:349-356.
- Pena-Cortés HT, Albrecht TA, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**:123-128.
- Pena-Cortés HT, Fisahn J, Willmitzer L** (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:4106-4113.
- Pellinen RI, Korhonen M-S, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjärvi J** (2002) Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch. *Plant Physiol* **130**: 549–560.
- Pena-Cortés HT, Albrecht TA, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**:123-128.
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, Samblanx GWD, Buchala A, Metraux JP, Manners JM, Broekaert WF** (1996) Pathogen-induced systemic

activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**:2309-2323.

Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF (1998) Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:2103-2113.

Pinot F, Benveniste I, Salaün J-P, Durst F (1998) Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxyde hydrolase activities in *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiol* **118**:1481-1486.

Pinto MC, GarciaBarrado JA, Macias P (1999) Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem* **47**:4842-4846.

Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiol* **130**:15-21.

Porta H, Rueda-Benitez P, Campos F, ColmeneroFlores JM, Colorado JM, Carmona MJ, Covarrubias AA, RochaSosa M (1999) Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol* **40**:850-858.

Porter NA (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res* **19**:262-268.

Prescott AG, John P (1996) Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. *Plant Physiol* **47**:245-271.

Preston EM, Tingey DT (1988) 3. The NCLAN program for crop loss assessment. *In: Assessment of crop loss from air pollutants*. Heck, W. W. et al. (Eds.) Elsevier Applied Science, London, 1988.

Price NC (1992) Technique for enzyme extraction *In: Enzyme assays. A practical approach*. Eisenthal, R. Danson, M. J. (Eds.), Oxford University Press, New York, 255-273.

Pryor WA, Uppu RM (1993) A kinetic model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. *J Biol Chem* **268**:3120-3126.

Raacke I, Mueller MJ, Berger S (2006) Defects in Allene Oxide Synthase and 12-Oxa-Phytodienoic Acid Reductase Alter the Resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* **154**:740-744.

Rancé I, Fournier J, Esquerre-Tugaye M (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.

Rao CV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**:1633-1646.

Rao M, Paliyath G, Ormrod D, Murr D, Watkins C (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol* **115**:137-49.

Rao MV, Davis KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Cell* **17**:603-614.

Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**:682-690.

Rao MV, Lee H-I, Davis KR (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J* **32**:447-456.

- Rao VM, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **110**:125-136.
- Rausch T** (1999) Wenn Pflanzen in Stress geraten. http://www.uni-heidelberg.de/uni/presse/RuCa1_99/rausch.htm.
- Reich PB** (1987) Quantifying plant response to ozone: A unifying theory. *Tree Physiol* **3**:63-91.
- Reich PB, Amundsen RG** (1985) Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science* **230**:566-570.
- Rich S** (1964) Ozone damage to plants. *Annu Rev Plant Pathol* **7**.
- Richter K, Knoche R, Schoenemeyer T, Smiatek G, Steinbrecher R** (1998) Originalarbeiten: Sommersmog. Abschätzung biogener Kohlenwasserstoff-Emissionen. *Z Umweltchem Ökotox* **10**:319-325.
- Rickauer M, Brodschelm W, Bottin A, Veronesi C, Grimal H** (1997) The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta* **202**:155-162.
- Rickauer M, Fournier J, Esquerre-Tugaye MT** (1989) Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol* **90**:1065-1070.
- Rickauer M, Fournier J, Pouenat M, Berthelon É, Bottin A, Esquerre-Tugaye M** (1990) Early changes in ethylene synthesis and lipoxygenase activity during defense induction in tobacco cells. *Plant Physiol* **28**:647-653.
- Roche** (2000) Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics GmbH, 2000, Mannheim.
- Rohila JS, Yang Y** (2007) Rice Mitogen-activated Protein Kinase Gene Family and Its Role in Biotic and Abiotic Stress Response. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**:751-759.
- Römpf** (1995) CD Chemie Lexikon-Version 1.0. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- Rosahl S** (1996) Lipoxygenases in plants-Their role in development and stress response. *Z Naturforsch* **51c**:123-138.
- Rossetti S, Bonatti PM** (2001) *In situ* histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol* **39**:433-442.
- Royo J, Vancanneyt G, Perez A, Sanz C, Stoermann K, Rosahl S, Sanchez-Serrano 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.
- Ruffer M, Steipe B, Zenk MH** (1995) Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett* **377**:175-180.
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès 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.
- Ryals JA, Neuenschwander M, Willitis MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**:1809-1819.
- Ryerson TB, Trainer M, Holloway JS, Parrish DD, Huey LG, Sueper DT, Frost GJ, Donnelly SG, Schauffler S, Atlas EL, Kuster WC, Goldan PD, Hübler G, Meagher**

- JF, Fehsenfeld FC** (2001) Observations of ozone formation in power plant plumes and implications for ozone control strategies. *Science* **292**:719-23.
- Saffert A, Hartmann-Schreier J, Schön A, Schreier P** (2000) A dual function of α -dioxygenase-peroxidase and NAD⁺ oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing α -oxidation of fatty acids in plants. *Plant Physiol* **123**:1545-1552.
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH Oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**:1281-1290.
- Saitanis CJ, Karandinos MG** (2001) Instrumental recording and biomonitoring of ambient ozone in the Greek countryside. *Chemosphere* **44**: 813-821.
- Saitanis CJ, Riga-Karandinos AN, Karandinos MG** (2001) Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* **42**:945-953.
- Salas JJ, García-Gonzalez DL, Aparicio RN** (2006) Volatile Compound Biosynthesis by Green Leaves from an *Arabidopsis thaliana* Hydroperoxide Lyase Knockout Mutant. *J Agric Food Chem* **54**:8199-8205.
- Salas JJ, Sánchez C, García-González DL, Aparicio R** (2005) Impact of the Suppression of Lipoyxygenase and Hydroperoxide Lyase on the Quality of the Green Odor in Green Leaves. *J Agric Food Chem* **53**:1648-1655.
- Salch YP, Grove MJ, Takamura H, Gardner HW** (1995) Characterization of a C-5, 13-cleaving enzyme of 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid by soybean seed. *Plant Physiol* **108**:1211-1218.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuel MA, Miles GP, Ellis BE** (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J* **22**:376-376.
- Sandermann H, Ernst D, Heller W, Langebartels C** (1998) Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci* **3**:47-50.
- Sandermann HJ** (1996) Ozone and plant health. *Annu Rev Phytopathol* **34**:347-366.
- Saravitz D, Siedow J** (1996) The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant Physiol* **110**:287-299.
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya K-i, Ohta H, Tabata S** (2001) Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in *Arabidopsis* by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. *DNA Res* **8**:153-161.
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K-i, Shibata D, Ohta H** (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**:653-668.
- Scandalios JG** (1993) Oxygene stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**:7-12.
- Schaffrath U, Zabbai F, Dudler R** (2000) Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur J Biochem* **267**:5935-5942.
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot* **52**:11-23.

- Schaller F, Biesgen C, Müssig C, Altmann T, Weiler EW** (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**:979-984.
- Schaller F, Hennig P, Weiler EW** (1998) 12-Oxophytodienoate-10,11-Reductase: Occurrence of Two Isoenzymes of Different Specificity against Stereoisomers of 12-Oxophytodienoic Acid. *Plant Physiol* **118**:1345-1351.
- Schaller F, Weiler EW** (1997) Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants 12-Oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur J Biochem* **245**:294-299.
- Schraudner M, Ernst D, Langebartels C, Sandermann HJ** (1992) III. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **99**:1321-1328.
- Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H** (1997) Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol Plant* **100**:274-280.
- Schraudner M, Moeder W, Wiese C, Van Camp W, Inzé D, Langebartels C, Sandermann HJ** (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J* **16**:235-245.
- Sembdner G, Parthier B** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**:569-589.
- Seo S, Sano H, Ohashi Y** (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**:289-298.
- Seskar M, Shulaev V, Raskin I** (1998) Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol* **116**:387-392.
- Sharma YK, Davis KR** (1994) Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **105**:1089-1096.
- Sharma YK, Davis KR** (1997) The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Rad Biol Med* **23**:480-488.
- Sharma YK, León J, I.Raskin, Davis KR** (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:5099-5104.
- Shibata D, Slusarenko AJ, Casey R, Hildebrand D, Bell E** (1994) Lipoxygenases. *Plant Mol Biol Rep* **12**:41-42.
- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Matsui K, Takabayashi J** (2006) Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:16672–16676.
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar V, Dixon R, Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**:261-270.
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I** (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**:718-721.
- Sicilia F, Mattei B, Cervone F, Bellincampi D, De Lorenzo G** (2005) Characterization of a membrane-associated apoplastic lipoxygenase in *Phaseolus vulgaris* L.. *Biochem Biophys Acta* **1748**:9-19.
- Siedow JN** (1991) Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**:145-188.
- Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A, (Eds.)** (1991) Strasburger Lehrbuch der Botanik. 33. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Sivasankar S, Sheldrick B, Rothstein SJ** (2000) Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol* **122**:1335-1342.
- Slusarenko AJ** (1996) Chapter 10. The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. *In: Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes*. G. J. Piazza (ed.), AOSC Press: 176-196.
- Slusarenko AJ, Croft KP, Voisey CR** (1991) Biochemical molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *In: Smith, C. J. (Eds). Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen-Interactions*, Calendon Press, Oxford:127-143.
- Slusarenko AJ, Meier BM, Croft KPC** (1993) Lipoxygenase in plant disease. *In: Mechanisms of plant defense responses*. Fritig, B., Legrand, M. (Eds.), Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1993, pp:211-220.
- Song F, Goodman RN** (2001) Activity of nitric oxide is dependend on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signalling pathway in Tobacco systemic aquired resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**:1458-1462.
- Speirs J, Lee E, Holt K, Yong-Duk K, Steele Scott N, Loveys B, Schuch W** (1998) Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol* **117**:1047-1058.
- Spiteller G** (2003) Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypotheses* **60**:69-83.
- Spiteller G, Kern W, Spiteller P** (1999) Investigation of aldehydic lipid peroxidation products by gas chromatography - massspectrometry. *J Chromatogr A* **843**:29-98.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Pelt JAV, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K, Loon LCV, Dong X, Pieterse CMJ** (2003) *NPR1* Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell* **15**:760-770.
- Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, Gabarino JE, Friedman M, Hammock BD, Belknap WR** (1994) Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *Plant J* **6**:251-258.
- Staswick PE, Lehman CC** (1999) Jasmonic acid -signaled responses in plants. *In: Induced plant defenses against pathogens and herbivores*; A. Agrawal, S. Tuzun and E. Bent (Eds.), American Phytopathological Society Press, Minnesota, 117-136.
- Stelmach BA, Müller A, Hennig P, Laudert D, Andert L, Weiler EW** (1998) Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signaling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* **47**:539-546.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**:895-911.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003b) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**:895-911.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux Jp** (1997) Systemic aquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**:235-270.
- Stockwell WR, Kramm G, Scheel H-E, Mohnen VA, Seiler W** (1997) Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. *In: Forest decline and ozone: A comparison of controlled chamber and field experiments*. Sandermann, H., Wellburn, A. R., Heath, R. L. (Eds.), Ecol. Studies, Vol. 127. Berlin, Springer-Verlag, 1-38.

- Stotz HU, Pittendrigh BR, Kroymann J, Weniger K, Fritsche J, Bauke A, Mitchell-Olds T** (2000) Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against egyptian cotton worm but not Diamondback Moth. *Plant Physiol* **124**:1007-1018.
- Strassner J, Schaller F, Frick BU, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductase reveals different roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* **32**:585-601.
- Strohm M, Eiblmeier M, Langebartels C, Jouanin L, Polle A, Sandermann H, Rennenberg H** (1999) Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* P. *alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *J Exp Bot* **50**:365-374.
- Stumpe M, Carsjens J-G, Göbel C, Feussner I** (2008) Divinyl ether synthesis in garlic bulbs*. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/ern010:1-9.
- Stumpe M, Göbel C, Demchenko K, Hoffmann M, Klösigen RB, Pawlowski K, Feussner I** (2006) Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J* **47**:883–896.
- Stumpe M, Kandzia R, Göbel C, Rosahl S, Feussner I** (2001) A pathogene-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett* **507**:371-376.
- Summerer S, Hanano A, Utsumi S, Arand M, Schuber F, Blée E** (2002) Stereochemical features of the hydrolysis of 9,10-epoxystearic acid catalysed by plant and mammalian epoxide hydrolases. *Biochem J* **366**:471-80.
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B, Mackerness SA-H** (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ* **21**:685-694.
- Suurmeijer CNSP, Perez-Gilabert M, van Unen DJ, van der Hijden HTWM, Veldink GA, Vliegenthart JFG** (2000) Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochemistry* **53**:177-185.
- Takabayashi J, Dicke M, Posthumus MA** (1991) Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology* **2**:1-6.
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2007) The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3–MPK6 Is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**:805–818.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:4158-4163.
- Terp N, Brandt A** (2000) Lipoxygenases in early *Brassica napus* germination. *Biochem Soc Trans* **28**:823-833.
- Thalmair M, Bauw G, Thiel S, Döhring T, Langebartels C, Sanderman HJ** (1996) Ozone and ultraviolet b effects on the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *Plant Physiol* **148**:222-228.
- Theimer RR** (1983) Methods for plant tissues. In: Methods of enzymatic analysis. Vol. II. Samples, reagents, assessment of results, Bergmeyer, H. U. Graßel, M. (Eds.), 3. ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 73-83.

- Thompson JE, Paliyath G, Brown JH, Duxbury CL** (1987) The involvement of activated oxygen in membrane deterioration during senescence. *In: Plant senescence: Its Biochemistry and Physiology*; W. W. Thomson, E. A. Nothnagel, and R. C. Huffaker (Eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: 146-155.
- Thordal-Christensen H, Zhang H, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular lokalisation of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**:1187-1194.
- Thorpe MR, Ferrieri AP, Herth MM, Ferrieri RA** (2007) ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* **226**:541-551.
- Thulke O, Conrath U** (1998) Salicylic acid has dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J* **14**:35-42.
- Tosti N, Pasqualini S, Borgogni A, Ederli L, Falistocco E, Crispi S, Paolocci F** (2006) Gene expression profiles of O₃-treated *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* **29**:1686-1702.
- Tranbarger TJ, Franceschi VR, Hildebrand DF, Grimes HD** (1991) The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell* **3**:973-987.
- Tuomainen J, Betz C, Kangasjärvi J, Ernst D, Yin Z-H, Langebartels C, Sandermann H** (1997) Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J* **12**:1151-1162.
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant J* **39**:59-69.
- UBA** (2001) <http://www.umweltbundesamt.de>.
- Uknes S, Morris S, Vernooij B, Ryals J** (1996) The role of benzoic acid derivatives in systemic acquired resistance. *In: Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions*, Romeo JT (Eds.), Plenum Press, New York: 253-263.
- Vahala J, Ruonala R, Keinänen M, Tuominen H, Kangasjärvi J** (2003) Ethylene Insensitivity Modulates Ozone-Induced Cell Death in Birch. *Plant Physiol* **123**:185-195.
- Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inzé D** (2001) The role of active oxygene species in plant signal transduction. *Plant Sci* **161**:405-414.
- Van Loon LC, Van Strien EA** (1999) The families of pathogen-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**:85-97.
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH** (1998) Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol* **117**:1103-1114.
- Vellosillo T, nez MM, pez MAL, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846.
- Verhue WM, Francke A** (1972) The heterogeneity of soybean lipoxygenase. *Biochem Biophys Acta* **285**:43-53.
- Véronési C, Fournier J, M. R, M. M, Esquerre-Tugaye MT** (1995) Nucleotide sequence of an elicitor induced tobacco lipoxygenase cDNA (GenBank X84040). *Plant Physiol* **108**:1342-1342.

- Véronési C, Fournier J, Rickauer M, Pouénat M-L, Esquerre-Tugaye M-T** (1995) Cloning of an elicitor-induced lipoxygenase cDNA from tobacco. *In: Plant Lipid Metabolism. Proceedings of the eleventh international meeting on plant lipids, held in Paris, France, June 26-July 1, 1994.* Kader, J.-C., Mazliak, P. (Eds) *Dordrecht, Kluwer, 1995.*
- Véronési C, Pouenat ML, Rickauer M, EsquerreTugaye MT** (1999) Regulation of tobacco lipoxygenase by methyl jasmonate and fatty acids. *Comptes Rendus de L Academie Des Sciences Serie III. Sciences de La Vie. Life Sciences* **322**:491-497.
- Véronési C, Rickauer M, Fournier J, Pouenat M** (1996) Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol* **112**:997-1004.
- Vianello A, Braidot E, Bassi G, Macrí F** (1995) Lipoxygenase activity on the plasmalemma of sunflower protoplasts and its modulation. *Biochem Biophys Acta* **1255**:57-62.
- Vick BA, Zimmermann DC** (1987b) Pathway of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol* **85**:1073-1078.
- Vidal S, Ponce de Leon I, Denecke J, Palva ET** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *Plant J* **11**:115-123.
- Vörös K, Feussner I, Kühn H, Lee J, Graner A, Löbler M, Parthier B, Wasternack C** (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur J Biochem* **251**:36-44.
- Wang C, Croft KPC, Järlfors U, Hildebrand DF** (1999) Subcellular Localization Studies Indicate That Lipoxygenases 1 to 6 Are Not Involved in Lipid Mobilization during Soybean Germination. *Plant Physiol* **120**:227-236.
- Wang CX, Jarlfors U, Hildebrand DF** (1999) Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipoxygenases. *Plant Sci* **148**:147-153.
- Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG** (1996) Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* **8**:375-391.
- Wardale DA, Lambert EA** (1980) Lipoxygenase from cucumber fruit: Localization and properties. *Phytochemistry* **19**:1013-1016.
- WASTERNAK C** (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot*:1–17.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O** (2006) The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. *Plant Physiol* **163**:297–306.
- Wasternack K, Parthier B** (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci* **2**:302-306.
- Watanabe T, Sakai S** (1998) Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Planta* **206**:570-576.
- Weber H, Chételat A, Caldelari D, Farmer EE** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight–diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**:485-494.
- 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.
- Weiler E, Laudert D, Schaller F, Stelmach B, Hennig P** (1998) Chapter Ten. Fatty Acid-Derived Signaling Molecules in their Interaction of Plants with their

- Environment. *In: Recent advances in phytochemistry. Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions.* Romeo, JT; Downum, KR; Verpoorte, R (Eds.) Plenum Press, New York, 1998 (32): V-VII. *In.*
- Weiler EW** (1997) Octadecanoid-Mediated Signal Transduction in Higher Plants. *Naturwissenschaften* **84**:340-349.
- Weiler EW, Albrecht TA, Groth B, Xia Z-Q, Luxem M, Liß H, Andert L, Spengler P** (1993) Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* **32**:591-600.
- Wellburn FAM, Wellburn AR** (1996) Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant Cell Environ* **19**:754-760.
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**:449-455.
- Wieser G, Havranek WM, Loidoldt-Nagele M, Kronfuß G, Polle A** (1998) Responses of Photosynthesis, Carbohydrates and Antioxidants in Needles of Norway Spruce to Slow and Rapid Changes in Ozone. *Bot Acta* **111**:35-41.
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel H-J, Overmyer K, Kangasjärvi J, Sandermann H, Langebartels C** (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ* **25**:717-726.
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**:681-692.
- Wu Y, Schwarz PB, Doehlert DC, Dahleen LS, Horsley RD** (1997) Rapid Separation and Genotypic Variability of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Lipoxygenase Isoenzymes. *J Cereal Sci* **25**:49-56.
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM** (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7**:1357-1368.
- Xiang C, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:1539-1550.
- Yalpani N, Enyedi J, León J, Raskin I** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**:372-376.
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y** (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **118**:1213-1222.
- Yilmaz E, Tandon KS, Scott JW, Baldwin EA, Shewfelt RL** (2001) Absence of clear relationship between lipid pathway enzymes and volatile compounds in fresh tomatoes. *Plant Physiol* **158**:1111-1116.
- Zadra C, Borgogni A, Marucchini C** (2006) Quantification of Jasmonic Acid by SPME in Tomato Plants Stressed by Ozone. *J Agric Food Chem* **54**:9317-9321.
- Zeringue HJ, Jr.** (1992) Effects of C₆-C₁₀ alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochemistry* **31**:2305-2308.
- Zeringue HJ, McCormick SP** (1989) Relationship between cotton leaf-derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. *J Am Oil Chem Soc* **66**:581-585.
- Zhang B, Chen K, Bowen J, Allan A, Espley R, Karunairetnam S, Ferguson I** (2006) Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J Exp Bot* **57**:3825-3836.

- Zhang J-P, Liu T-S, Zheng J, Jin Z, Zhu Y, Guo J-F, Wang G-Y** (2007) Cloning and characterization of a putative 12-oxophytodienoic acid reductase cDNA induced by osmotic stress in roots of foxtail millet. *DNA Seq* **18**:138–144.
- Zhang S, Klessig DF** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**:520-527.
- Zhuang H, Hamilton-Kemp TR, Andersen RA, Hildebrand DF** (1992) Developmental Change in C₆-Aldehyde Formation by Soybean Leaves. *Plant Physiol* **100**:80-87.
- Zhuang H, Hamilton-Kemp TR, Andersen RA, Hildebrand DF** (1996) The impact of alteration of polyunsaturated fatty acids levels on C₆-aldehyde formation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol* **111**:805-812.
- Ziegler J, Hamberg M, Miersch O, Parthier B** (1997) Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiol* **114**:565-573.
- Ziegler J, Keinänen M, Baldwin IT** (2001) Herbivore induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* **58**:729-738.
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai. M, Wasternack C** (2000) Molecular cloning of Allene Oxid Cyclase. *J Biol Chem* **275**:19132-19138.
- Zimmermann DC, Coudron CA** (1979) Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecanoic acid. *Plant Physiol* **63**:536-541.

c) AOC (Allenoxid-Cyclase):

CTGTTTCCTCAGCCTCTGCTGCTCTTAGAACAATTTCTTCCTCTGCTAAGCTAAC
 CTCTAGCTTTCCAACACTACTGCTTCTCAAAGATCAGACCTTTTAACTCCCT
 AACCCCTAATTTCCAATCTCTTAACTCAGCACCTCCACTAGCGTCCAAGTC
 ATTTTACTGCAAGAGTCAGAGCAGCTCAACTGATTCCACTACAATAAAGTTCA
 AGAACTTAGTGTCTACGAGCTCAATGAGCGTGACCGTGGTAGCCCTGCTTATC
 TTCGCTTGAGCCAAAAGTCTGTCAATTCCTTGGAGATCTTGTCCCCTTTAGCA
 ACAAACTATATACCGGAGACCTAAAGAAGAGAATTGGAATAACAGCAGGACTCT
 GCATTTTGATCAAACACGAAGAGGAAAAGAAAGGGGATCGATATGAAGCTATTT
 ACAGCTTCTACTTCGGCGATTATGGTCACATCGCCGTTGAGGGATCGTACTTGA
 CTTACGAGGACACTTATCTTGCAGTTACCGGTGGATCCGGCATCTTTGCTGGG
 GTTCCGGTCAAGTGAAATTGCAGCA

d) LOX (Lipoxygenase):

GAAGAGCAAGGTGTATGGAACTTTAACAGGACCCGACCTGTTCTTCCATTTCTC
 ATCGACATTCATCTGCATAATCTGATCCTCGATATCACTCAGCTTCTTTCCAAC
 CTCGCAAAGCTGAAAGTGGTTCTTGATCCTTTGTCCATTCAGGTGATTCCCTT
 TGCCCGAGGTAAAGTGTATCCGAAGAATGCCTTGACAAGGTCTCTATGAGGGA
 AATGCCAAGCAGTGTCTGCAGCTGAGGAGTGATTGTTTTGAGGAATACCTTATC
 CGGATTTGTCTTGAGCTCTTCATACTCAGGACTTCCTGGCTCTGGCATGAAATT
 TCGGCTTAATGTAGGGCGATTAGGGAGATAACCAGCATAAGGGTATTGCCCGA
 AATTGACTGCTGCATGAAGTGTGAAGCTATCCATATTGTGATGGTGAAGAGT
 CTATCAATTCTTGCACCTGTCTGCATTTAGGCCACCAAG

e) EH (Epoxid-Hydrolase):

CATTCAGGGACCTTGTCGATGACCTTCTGGACATGCTTGATTCATTAGGCATCC
 ATCAGGTTTTTCTTGTGGGGAAGGATTTTGAGGCTCGAGTAGCTTACCATTTTG
 CACTCGTACACCCTGATAGAGTTTCAGCAGTTGTAACACTAGGTGTGCCTTTTC
 TTCTCACCGGTCCAGAAACATTTCTCGAGATCTCATTCCCAATGGGTTCTATA
 TGTTGAGATGGCAGGGACCAGGGCGAGCTGAAAAGGACTTTGGGCGTTTTGAT
 ACGAAAGCAGTAGTTAAGAACATAATACTATGTTCTCTGGAAGTGAATTGCCAA
 TTGCAAAGATGATGAGGAAATAATGGATTTGGTTGATCCTTCTGCTCCACTGC
 CTGACTGGTTCACAGAAGAAGATCTTGCAAACACTACGCATCTCTTTATGAAAAGT
 CAAGTTTCCGAACAGCATTGCAGGTGCCCTTACAGGGCTTGGCTAGAAGAATA
 TGGAGTTAAAGATATCAAAGTCAAGGTTCCCTGTTTGCTTGTAATGGGAGAGAA
GGATTACGCCCT

f) ADH (Alkoholdehydrogenase):

GAAGCTGGAGGAATTGTGGAGTGTAGGTGAAGGTGTTACAGATCTCCAACCAG
 GAGACCATGTTCTTCTGTGTTCACTGGTGAATGCCAGCAGTGTGACACTGT
 AAATCAGAGGAAAGCAACATGTGTGACCTCCTTAGAATAAACACAGACAGGGG
 AGTTATGATCCATGATGGTCAGACAAGATTCTCAAAGATGGCAAGCCAATATA
 TCACTTTGTTGGAACCTTCCACCTTAGTGAATACACCGTTGTCCATTCTGGATG
 CGTCGCCAAGATTGATCCACAGGCACCACTTGACAAAGTTTGTGTTCTGAGTN
 GTGGGATATCAACAGGACTTGGTGCAACTCTGAATGTTGCCAAACTACCAAAG
 GTTCTACTGTAGCTATTTTTGGCTTGGGAGCTGTTGGCCTTGCTGCTGCTGAAG
 GAGCTAGGATTGCTGGGGCTTCTAGGATCATTGGCATTGATTTGAATCCCAGC
 AGGTTCAATGATGCCAAGAAGTTTGGTG

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen herzlichsten Dank aussprechen, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau Jun. Prof. Dr. Ingar Janzik für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und Ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Ihre konstruktive Hilfe in vielen Belangen hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Werner Hummel und Frau Prof. Dr. Margarete Baier für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Priv. Doz. Dr. Martina Schraudner für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema „Ozon und Pflanzen“.

Den Mitgliedern des ehemaligen Instituts für Chemie und Dynamik der Geosphäre (ICG-6) für die Arbeitsgruppen-übergreifende Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Nicht zu vergessen die über den Laboralltag hinaus entstandenen Freundschaften.

Priv. Doz. Dr. Wildt, Dr. Kleist, Dr. Heiden, Herrn Kobel, Herrn Strube und Herrn Aversch für ihre Diskussionsbereitschaft zum Thema „VOCs“ sowie der praktischen Hilfe rund um die kleine und große Expositions-kammer hinsichtlich der Kontrolle von Messinstrumenten, Geräten und Computern.

Dr. Peter Klauth für die Hilfen und Tips bei der digitalen Bildauswertung in stets unterhaltsamer Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Helmut Kneifel für die Durchführung und vielen hilfreichen Ratschläge bei den HPLC Messungen sowie den interessanten Gesprächen auch über das Thema Chemie hinaus. An dieser Stelle sei auch Frau Edelgard Schölgens für ihre unterstützende Mithilfe gedankt.

Prof. Dr. Anders B. Jensen (Institut der Molekularbiologie, Universität Kopenhagen, DK) für die Überlassung der transgenen *Arabidopsis thaliana* LOX2 GUS/FLUC.

Herrn Dr. Axel Müller (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum) für die Überlassung des Jasmonsäure Standards und die Möglichkeit der JA-Bestimmung mittels GC-MS.

Meiner ehemaligen Arbeitsgruppe im ICG-6 für das angenehme Arbeitsklima im Labor und Büro sowie die motivierenden Gespräche: Clarissa Bucher, Brigitte Schauff, Birgit Süßenbach und Dr. Rolf Hecker. Mein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Andrea Neuwohner, Sabine Preiskowski und Sonja Reinartz für ihre engagierte und freundschaftliche Zusammenarbeit. Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihr „Know-how“ kamen weit über die Aufzucht und Pflege der Versuchspflanzen und die geduldige Unterstützung bei der Aufarbeitung großer Mengen Blattmaterials hinaus, zum Einsatz.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für Ihren kontinuierlichen Beistand.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Freundinnen und Freunde

- Marko, Robert, Kathrin, Alex, Kirsten & Norbert, Carmen & Eike, Christiane & Joaquim, Barbara & Andreas, Ulrike & Klaus, Rolf & Steffi, Karl & Heike, Marlies & Peter, Silvia & Uli, Stephe & Pete und an meinen Coach Toni -

nicht nur für hilfreiches Korrekturlesen, sondern besonders für die vielfältige Unterstützung während dieser Zeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Köln, den 27.05.2008

(Britta Engelhardt)