

**Charakterisierung einer potenziellen Bindestelle
für Jasmonate in *Glycine max* L.
und
jasmonatinduzierte Calciumantworten
in *Nicotiana tabacum* L.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Agnes Walter
März 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Ebel
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Scheer
Sondergutachter: PD Dr. A. Mithöfer

Tag der Einreichung der Dissertation: 21. März 2007
Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2007

Folgende Publikation ist aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Walter, A., Mazars, C., Maitrejean, M., Hopke, J., Ranjeva, R., Boland, W., and Mithöfer, A. (2007) Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of Ca²⁺ signals in the nucleus and the cytosol of plant cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4783-4785

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
A Zusammenfassung.....	1
B Einleitung.....	3
1. Jasmonate als Regulatoren physiologischer Prozesse.....	3
2. Biosynthese von Jasmonaten und anderen Oxylipinen.....	4
3. Synthetische Jasmonat-Analoga.....	7
4. Welche Jasmonate sind als Signalmoleküle aktiv?.....	8
5. Signaltransduktion durch Jasmonate.....	10
6. Calcium als „second messenger“.....	12
7. Die Aequorin-Technik.....	14
8. Aufgabenstellung.....	15
C Material.....	16
1. Saatgut.....	16
2. Pflanzen.....	16
3. Zellsuspensionskulturen.....	16
4. Radiochemikalien.....	16
5. Chemikalien.....	17
6. Enzyme.....	18
7. „Kits“ für molekularbiologische Arbeiten.....	18
8. Verbrauchsmaterialien.....	18
9. Geräte und Zubehör.....	19
10. Software.....	19
D Methoden.....	20
1 Allgemeine und biochemische Methoden.....	20
1.1. Pflanzenanzucht und Haltung der Zellsuspensionskulturen.....	20

1.2.	Präparationstechniken.....	20
1.2.1.	Aufarbeitung von Pflanzenmaterial und Zellsuspensionen durch differentielle Zentrifugation.....	20
	– Zellwandfraktion (3800 x g-Fraktion).....	20
	– Membranfraktion (Mikrosomen) und lösliches Protein.....	21
1.2.2.	Präparation von Protoplasten und Protoplastenmembranen.....	21
	– Protoplastenisolierung aus Sojabohnenzellen (SH 63).....	21
	– Membranisolierung aus SH 63-Protoplasten.....	21
1.2.3.	Präparation von Zellkernen.....	21
1.3.	Analyse der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	22
1.3.1.	IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindungstest.....	22
	– Standardbindungstest.....	22
	– Bindungstest zur IC ₅₀ -Bestimmung.....	22
	– Bindungstest zur K _d -Bestimmung.....	23
1.3.2.	Bestimmung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung unter dem Einfluss strukturmodifizierender Behandlungen der 3800 x g-Fraktion.....	23
1.3.2.1.	Physikalische und chemische Behandlungen der 3800 x g-Fraktion.....	23
	– Hitzebehandlung.....	23
	– Solubilisierung mit SDS.....	23
	– Extraktion mit Na ₂ CO ₃ /NaBH ₄	24
	– Extraktion mit KOH/H ₃ BO ₃ /NaBH ₄	24
	– Reduktion mit DTT.....	24
	– Oxidation mit Natriumperiodat.....	24
1.3.2.2.	Enzymatische Behandlung der 3800 x g-Fraktion.....	24
	– Abbau von Proteinen.....	24
	– Abbau von Lipiden.....	25
	– Abbau von Kohlenhydraten.....	25
1.3.3.	IndAz[¹⁴ C]IleMe-Extraktion aus dem Bindungsansatz für die chromatographische Analyse.....	25
1.4.	¹²⁵ I-HG-APEA-Bindungstest.....	26
1.5.	Proteinbestimmung.....	26
1.6.	Fluoreszenzmikroskopie.....	26
1.7.	Messung von intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen.....	26
	– in vivo Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung in BY-2-Zellen.....	26

–	in vivo Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung in Sojabohne 6.6.12-Zellen.....	27
–	in vitro Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung.....	27
1.8.	Untersuchung der Aufnahme und Stabilität von Indanoyl-Isoleucin- Konjugaten in BY-2-Zellen.....	27
–	Bestimmung der Aufnahme von IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴ C]IleMe.....	27
–	Extraktion des aufgenommenen IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴ C]IleMe aus BY-2-Zellen für die chromatographische Analyse.....	28
1.9.	Alkalische Hydrolyse von IndEt-IleMe.....	28
1.10.	Dünnschichtchromatographie.....	29
2.	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.1.	Induktion der Genexpression in BY-2-Zellen.....	29
2.2.	RNA-Extraktion.....	30
2.3.	cDNA-Synthese.....	30
2.4.	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	30
2.5.	Agarosegel-Elektrophorese.....	31
2.6.	Reinigung von qRT-PCR-Produkten durch Gel-Extraktion.....	32
2.7.	DNA-Fällung.....	32
2.8.	Klonierung von qRT-PCR-Produkten.....	32
–	pSTBlue-1-NtTub.....	32
–	pSC-A-NtODC.....	32
2.9.	Präparation von Plasmid-DNA.....	33
2.10.	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	33
2.11.	Sequenzierung.....	33
E	Ergebnisse.....	34
I.	Charakterisierung einer potenziellen Bindestelle für Jasmonate in Sojabohne (<i>Glycine max</i> L.).....	34
1.	Lokalisierung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	35
1.1.	Verteilung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle in fraktionierten Sojabohnewurzeln....	35
1.2.	Organspezifische Verteilung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	36
1.3.	Intrazelluläre Lokalisierung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	36
2.	Abhängigkeit der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung vom Entwicklungszustand des Organismus.....	39
3.	Vorkommen der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle in anderen Pflanzenarten.....	40

4.	Biochemische Charakterisierung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	40
4.1.	Grundlegende biochemische Charakteristika der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	41
4.2.	Kompetitionsanalyse mit Jasmonaten und synthetischen Analoga.....	46
4.3.	Stabilität von IndAz[¹⁴ C]IleMe in Gegenwart der 3800 x g-Fraktion.....	47
4.4.	Untersuchung der chemischen Natur der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	49
4.4.1.	Prüfung auf Proteinartigkeit der Bindestelle.....	50
4.4.2.	Prüfung auf Kohlenhydratartigkeit der Bindestelle.....	52
4.4.3.	Prüfung auf Lipidartigkeit der Bindestelle.....	54
4.4.4.	Prüfung auf Ligninartigkeit der Bindestelle.....	56
5.	Zwischenbewertung der Ergebnisse.....	56
II.	Jasmonatinduzierte Calciumantworten in <i>Nicotiana tabacum</i> L. BY-2-Zellen.....	58
1.	Induktion von spezifischen Calciumsignaturen durch verschiedene Oxylipine.....	58
1.1.	Jasmonsäure.....	58
1.2.	Methyljasmonat.....	60
1.3.	12-Oxophytodiensäure.....	61
1.4.	Phytoprostan B ₁ Typ II.....	63
2.	Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Jasmonaten und synthetischen Jasmonat-Analoga bei der Induktion von Calciumantworten.....	64
2.1.	Aktivitätsprofil I: OPDA.....	64
2.2.	Aktivitätsprofil II: JA und Ind.....	65
2.3.	Aktivitätsprofil III: Isoleucin-Konjugate von JA und Ind.....	66
2.4.	Bedeutung der Carboxylgruppe für die Aktivität der Induktoren.....	69
3.	Pharmakologische Charakterisierung der Calciumantworten in Cytosol und Zellkern.....	71
3.1.	Herkunft des Calciums für die Antworten im Cytosol.....	71
3.2.	Abhängigkeit der Calciumantworten im Zellkern von extrazellulärem Calcium.....	74
3.3.	Einfluss von Rutheniumrot auf die Calciumantworten im Zellkern.....	77
4.	Aufnahme und Stabilität von Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen.....	78
4.1.	Aufnahme von 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen.....	79
4.2.	Stabilität von 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen.....	81
5.	Genexpressionsstudien in BY-2-Zellen mit Jasmonaten und synthetischen Analoga.....	83

F	Diskussion	88
1.	Die Suche nach einem Jasmonatrezeptor.....	88
1.1.	Der Radioligand.....	88
1.2.	Die Spezifität und Affinität der Bindestelle.....	90
1.3.	Die Überprüfung des COI1-Proteins als Bindestelle für IndAz[¹⁴ C]IleMe.....	91
2.	Die potenzielle Jasmonat-Bindestelle.....	91
2.1.	Die Lokalisierung der Bindestelle in der Wurzel.....	92
2.2.	Die Lokalisierung der Bindestelle in der Zellwand.....	92
2.3.	Die chemische Natur der Bindestelle.....	95
2.4.	Die unbekannt Funktion der Bindestelle.....	97
3.	Die fehlende Bindungsaktivität von BY-2-Zellen.....	98
4.	Die Übertragung von Phytohormonsignalen durch Calcium.....	99
5.	Die calciuminduzierende Aktivität der Jasmonate und Analoga.....	100
5.1.	Der Unterschied zwischen JA und MeJA.....	100
5.2.	Der Unterschied zwischen Cyclopentanonen und Cyclopentenonen.....	102
5.3.	Die Isoleucin-Konjugate der Jasmonsäure.....	104
5.4.	Die synthetischen Indanoyl-Isoleucin-Konjugate.....	105
6.	Die Bedingungen für die Induktion von Calciumantworten.....	107
7.	Ausblick.....	110
G	Literaturverzeichnis	111

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1	Biosynthese der Jasmonate.....	5
Abb. 2	Struktur von Phytoprostan B ₁ Typ II.....	7
Abb. 3	Strukturen der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate.....	8
Abb. 4	Biolumineszenz des Aequorins bei Reaktion mit Ca ²⁺	15
Abb. 5	Verteilung der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung in fraktionierten Sojabohnewurzeln.....	35
Abb. 6	Verteilung der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung in verschiedenen Organen der Sojabohne.....	36
Abb. 7	Intrazelluläre Lokalisierung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindestelle.....	38
Abb. 8	Altersabhängigkeit der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung.....	39
Abb. 9	Charakteristische Parameter der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung an die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln (I).....	41
Abb. 10	Charakteristische Parameter der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung an die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln (II).....	43
Abb. 11	Kompetition der spezifischen IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung durch Jasmonate und synthetische Analoga.....	46
Abb. 12	Dünnschichtchromatographie von Extrakten der 3800 x g-Fraktion und des Bindungspuffers nach Inkubation mit IndAz[¹⁴ C]IleMe.....	48
Abb. 13	Einfluss von proteinverändernden Behandlungen der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung.....	51
Abb. 14	Einfluss von kohlenhydratverändernden Behandlungen der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung.....	53
Abb. 15	Einfluss von Lipase-Behandlung der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung.....	55
Abb. 16	Bestimmung der IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung an Björkman-Lignin aus <i>Fagus silvatica</i>	55
Abb. 17	JA-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	59
Abb. 18	Wirkung von MeJA auf die Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	60

Abb. 19	OPDA-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	62
Abb. 20	PPB ₁ -induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	63
Abb. 21	Struktur-Aktivitätsvergleich von Jasmonaten und Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in Cytosol und Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	65
Abb. 22	IndEt-IleMe-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration im Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	69
Abb. 23	Untersuchung der Bedeutung der freien Carboxylgruppe für die Induktion der Calciumantwort im Zellkern von Tabak-BY-2-Zellen.....	70
Abb. 24	Inhibition der cytosolischen Calciumantworten auf OPDA, JA und Ind durch La ³⁺	72
Abb. 25	Inhibition der cytosolischen Calciumantworten auf OPDA, JA und Ind durch Rutheniumrot.....	73
Abb. 26	Inhibition der Calciumantworten auf ODPDA, JA und Ind im Zellkern durch La ³⁺	75
Abb. 27	Inhibition der Calciumantwort auf IndEt-IleMe im Zellkern durch La ³⁺	76
Abb. 28	Inhibition der Calciumantworten auf ODPDA, JA, Ind und IndEt-IleMe im Zellkern durch Rutheniumrot.....	78
Abb. 29	Aufnahme von IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴ C]IleMe in BY-2-Zellen.....	80
Abb. 30	Dünnschichtchromatographie von Extrakten der intakten und lysierten BY-2-Zellen sowie des Inkubationspuffers nach Behandlung mit IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴ C]IleMe.....	82
Abb. 31	Induktion der ODC-Expression in BY-2-Zellen unter den Versuchsbedingungen für die Calciummessung.....	84
Abb. 32	Induktion der ODC-Expression in BY-2-Zellen unter Versuchsbedingungen, die keine Induktion von Calciumantworten erlauben.....	86

Tabellen

Tab. 1	Programm für die quantitative real-time PCR.....	31
Tab. 2	IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung in verschiedenen Pflanzenarten.....	40

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
AHK	<i>Arabidopsis</i> Histidin-Kinase
AUX/IAA	auxinregulierte Proteine
axr	auxin-resistent
β -Glucan	(1,3)-(1,6)-Hepta- β -glucosid
B_{max}	maximale Anzahl der Bindestellen
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
BY-2	bright yellow 2
BY-2 _{cyt/nuc}	BY-2-Zellen, die Apoaequorin im Cytosol bzw. Zellkern exprimieren
$[Ca^{2+}]_{cyt/nuc}$	Calciumkonzentration im Cytosol bzw. Zellkern
cADPR	cyclische ADP-Ribose
cDNA	komplementäre DNA
CDTA	Cyclohexandiamin-tetraessigsäure
CeSA	Cellulose-Synthase
cev	constitutive expression of vegetative storage protein
Chn	Endochitinase
CICR	calcium-induced calcium release
coi	coronatine-insensitive
CP-23	Cysteinprotease 23
CSN	COP9-Signalosom
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EAS	5- <i>epi</i> -Aristolochin-Synthase
EC ₅₀	Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt
EcoRI	<i>E. coli</i> -Restriktionsendonuclease I
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-tetraessigsäure
eli	ectopic lignin
ERF	ethylene response factor
etr	ethylene resistant
FDA	Fluorescein-diacetat
GA	Gibberellin
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GID	Gibberellin-insensitive dwarf
Glc	Glucose
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HeLa	Henrietta Lacks (humane Epithelzellen)
HG-APEA	2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugat des Hepta- β -glucosids
13-HPOT	13-Hydroperoxyoctadecatriensäure
Hyp	Hydroxyprolin
IAA	Indol-3-essigsäure
IC ₅₀	Konzentration, die zur halbmaximalen Inhibition führt
Ile(Me)	Isoleucin(methylester)
Ind	1-Oxoindan-4-carbonsäure

IndAz-Ile(Me)	6-Azido-1-oxoindanoyl-L-isoleucin(methylester)
IndEt-Ile(Me)	6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isoleucin(methylester)
IndEt-IleMe*	IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴ C]IleMe (30 Bq/nmol)
Ind-Ile(Me)	1-Oxoindanoyl-L-isoleucin(methylester)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JA	Jasmonsäure
jai	jasmonate-insensitive
JA-Ile(Me)	Jasmonoyl-L-isoleucin(methylester)
jar	jasmonate-resistant
jin	jasmonate-insensitive
JMT	JA-Methyltransferase
JNO	3-(Nitro-methyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon
JR	jasmonate-responsive
K _D	Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Konstante
K' _n	intrinsischen Dissoziationskonstanten n Bindestellen
K _s	Konzentration, bei der die Hälfte der Bindestellen besetzt ist
LRR	leucine-rich-repeat
L&S	Linsmaier&Skoog
LTP	Lipidtransferprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MeJA	Methyljasmonat
MeOPDA	12-Oxophytodiensäuremethylester
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MJE	MeJA-Esterase
mpk	mitogen-activated protein kinase
NaAc	Natriumacetat
NAADP	Nicotinsäure-adenin-dinucleotidphosphat
n _H	Hill-Koeffizient
nod	nodulation
NPR	nonexpressor of PR
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OPDA	12-Oxophytodiensäure
opr	OPDA-Reduktase
ORCA	octadecanoid-responsive <i>Catharanthus</i> AP2-domain protein
PCV	packed cell volume
PEI	Polyethylenimin
PIN	Proteinase-Inhibitor
pK _s	Säureexponent
PPB ₁	Phytoprostan B ₁ Typ II
PR	pathogenesis-related
PRK	pollen-specific receptor-like kinase
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
R _f	Retention factor
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RR	Rutheniumrot
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
SA	Salicylsäure
SAR	systemic acquired resistance
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

SH63	Sojabohne Harosoy 63
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
THF	Tetrahydrofuran
TIR	transport inhibitor response
TNS	2-p-Toluidino-6-naphthalensulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TRP	transient receptor potential
Tub	γ -Tubulin
U	unit
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WAK	wall-associated kinase
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

A Zusammenfassung

Jasmonate sind Phytohormone mit vielfältiger Wirkung in Entwicklung und Stressmanagement der Pflanzen. Über die Perzeption und Transduktion der Jasmonatsignale ist bisher kaum etwas bekannt.

Unter Verwendung des synthetischen Jasmonat-Analogons 6-Azido-1-oxoindanoyl [^{14}C]isoleucinmethylester (IndAz [^{14}C]IleMe) als Radioligand wurde eine spezifische Bindestelle in Sojabohne (*Glycine max*) biochemisch charakterisiert, in der Erwartung, eine Bindestelle für Jasmonate zu beschreiben.

Die IndAz [^{14}C]IleMe-Bindung erwies sich als spezifisch, saturierbar und reversibel. Da es sich aber um eine niedrigaffine Bindestelle handelt und die Affinität verschiedener Jasmonate und synthetischer Indanoyl-Isoleucin-Konjugate nicht mit deren biologischer Aktivität in Sojabohne korreliert, dürfte es sich bei der IndAz [^{14}C]IleMe-Bindestelle nicht um einen Jasmonatrezeptor handeln. Sowohl bei Jasmonaten als auch bei Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten wurden Methylester gegenüber den entsprechenden freien Säuren bevorzugt gebunden.

Ein Enzym, das den Liganden umsetzt, scheint nicht vorzuliegen, da die IndAz [^{14}C]IleMe-Bindung kein pH-Optimum aufwies und keine Umsetzung des Liganden beobachtet wurde. Mit fortschreitendem Alter der Pflanze nahm die Bindungsaktivität zu. Die IndAz [^{14}C]IleMe-Bindestelle kommt in verschiedenen höheren Pflanzenarten vor, war hauptsächlich in der Wurzel nachweisbar und wurde in der Zellwand lokalisiert. Da die Bindestelle weder mit Salzen noch mit Detergenzien extrahiert werden konnte, gegenüber Proteinase K, DTT, Periodat, Lipase, Cellulase, Hemicellulase, Pectinase und Pectolyase resistent und zu 50 % hitzestabil war, wird vermutet, dass ein in der Zellwand fest verankertes Protein vorliegt.

Zu den intrazellulären Signalvermittlern von Pflanzen gehört Calcium, nicht nur im Cytosol, sondern auch im Zellkern. In transgenen *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen wurden mit Hilfe des Photoproteins Aequorin erstmals jasmonatinduzierte Änderungen der Calciumkonzentration in beiden Kompartimenten gezeigt. Auch ein Vertreter aus der Gruppe der Phytoprostane, Phytoprostan B₁ Typ II, löste Ca²⁺-Antworten in Cytosol und Zellkern aus.

JA und OPDA induzierten unterschiedliche Calciumsignaturen, die sich jeweils aus einer cytosolischen Ca^{2+} -Antwort gefolgt von einem Ca^{2+} -Signal im Zellkern zusammensetzten. Die Unterschiede in Form, Höhe und Kinetik der einzelnen Antworten lassen auf zwei verschiedene Signaltransduktionswege bei JA und OPDA schließen.

MeJA war in beiden Kompartimenten inaktiv und demonstriert dadurch, dass MeJA nicht immer, wie häufig angenommen wird, wie JA wirkt.

Durch das Isoleucin-Konjugat der JA (JA-Ile) wurde eine dritte Calciumsignatur ausgelöst, die sich von der JA-induzierten Calciumsignatur durch das Fehlen der JA-ähnlichen cytosolischen Calciumantwort unterscheidet. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Unterscheidung von JA- und JA-Ile-Signalen möglicherweise auf Ebene des Calciums stattfindet. Eine Struktur-Aktivitätsanalyse mit Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten bestätigte, dass die Konjugation mit Isoleucin zur Veränderung der Calciumsignatur führt. Die unkonjugierte 1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind) verhielt sich wie JA, das Konjugat Ind-Ile wie JA-Ile. Ferner wurde gezeigt, dass für die Induktion der Calciumantworten eine freie, negativ geladene Carboxylgruppe unerlässlich ist. Neben MeJA erwiesen sich JA-IleMe, Ind-IleMe und 3-(Nitro-methyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon als inaktiv.

6-substituierte Indanoyl-Isoleucin-Konjugate zeichnen sich durch verstärkte biologische Aktivität aus. Tatsächlich verlieh der Ethyl-Substituent dem IndEt-IleMe Ca^{2+} -induzierende Aktivität im Zellkern. Bei den freien Säuren Ind-Ile und IndEt-Ile wurde aber keine Aktivitätssteigerung durch Substitution festgestellt.

Die Untersuchung der Expression einiger JA-responsiver Gene zeigte, dass unter den Versuchsbedingungen, die die Induktion von Ca^{2+} -Antworten ermöglichten, keine jasmonat-induzierte Genexpression erfolgte. Sollten die beschriebenen Ca^{2+} -Signale die Expression bestimmter Gene vermitteln, ist eine ausgewählte Gruppe von Genen zu erwarten, deren Expression eventuell einen besonderen physiologischen Zustand der Zellen erfordert.

B Einleitung

Der Blütenduft des Jasmins (*Jasminum grandiflorum*) gehört zu den am häufigsten verwendeten Düften in der Parfümherstellung. Die charakteristische Duftkomponente ist Methyljasmonat, ein Produkt des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, das erstmals aus Jasminöl isoliert wurde (Demole et al., 1962). Bald wurden für kommerzielle Zwecke Pflanzenextrakte durch synthetisches Methyljasmonat und billigere Analoga ersetzt, die heute einen prominenten Platz in der Parfümerie einnehmen.

1. Jasmonate als Regulatoren physiologischer Prozesse

Im späteren Verlauf kam mit der Entdeckung ihrer biologischen Aktivität in Pflanzen die zentrale physiologische Rolle der Jasmonate ans Licht. Im Jahr 1980 wurde Methyljasmonat (MeJA) als seneszenzfördernder Faktor im Wermut (*Artemisia absinthium*) beschrieben (Ueda und Kato, 1980), ein Jahr später erschienen Berichte über die wachstumshemmende Aktivität von Jasmonsäure (JA) (Yamane et al., 1981; Dathe et al., 1981), die in vielen, wenn nicht allen höheren Pflanzen vorkommt (Sembdner und Parthier, 1993). Es folgte eine Fülle von Arbeiten über physiologische Wirkungen von MeJA und JA, die zur Aufnahme der Jasmonate in die Reihe der Phytohormone führten. Zahlreiche Übersichtsartikel geben Auskunft über die Beteiligung der Jasmonate an pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen wie Samenkeimung, Wurzelwachstum, Knollenbildung, Rankenkrümmung, Pollenproduktion, Fruchtreifung, Seneszenz und Abscission sowie an Reaktionen auf abiotischen und biotischen Stress, darunter Trockenheit, UV-Licht, Hitze, Kälte, Ozon, osmotischer Stress, Verwundung, Insektenfraß und Pathogenbefall (Devoto und Turner, 2004; Sembdner und Parthier, 1993; Creelman und Mullet, 1997).

Pflanzenzellen antworten auf diese Reize – im Fall von biotischem Stress auch auf die entsprechenden Elicitoren – mit einer transienten Akkumulation von JA (Gundlach et al., 1992; Kramell et al., 2000; Ziegler et al., 2001), in deren Folge die jeweils für den Stimulus typischen zellulären Reaktionen auftreten, um der Pflanze zur Anpassung an die veränderten Bedingungen zu verhelfen. Diese Reaktionen können in Abwesenheit des Reizes auch durch exogene Verabreichung von JA oder MeJA ausgelöst werden. Das Spektrum der jasmonatinduzierten zellulären Antworten umfasst die Produktion von Substanzen verschiedenster chemischer Klassen, beispielsweise Alkaloide (Blechert et al., 1995; Zhang et al., 1997), Isoprenoide (Krumm et al., 1995; Mandujano-Chávez et al., 2000), Produkte

des Phenylpropanstoffwechsels (Ellard-Ivey und Douglas, 1996; Fliegmann et al., 2003), Ascorbinsäure (Wolucka et al., 2005) und Proteine (Farmer und Ryan, 1992; Laudert und Weiler, 1998). Bei den sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich häufig um Phytoalexine, das sind antimikrobielle Produkte mit direkter Wirkung auf den Krankheitserreger, oder um Substanzen der indirekten chemischen Abwehr, etwa um flüchtige Stoffe zur Anlockung von Fraßfeinden der Schädlinge (Farmer, 1997). Viele jasmonatinduzierte Proteine stellen Biosyntheseenzyme sekundärer Pflanzenstoffe oder PR-Proteine (pathogenesis-related proteins) dar. Dem gesamten Geschehen liegt die Aktivierung der Expression zahlreicher Gene zugrunde (Stintzi et al., 2001; Goossens et al., 2003).

Der Methylester der Jasmonsäure ist von besonderer Bedeutung, weil es sich um eine flüchtige Substanz handelt, die auch der Kommunikation zwischen Pflanzen dient. Farmer und Ryan (1990) zeigten, dass die Synthese von Proteinase-Inhibitoren, die eine Antwort der Pflanze auf Verwundung ist, in unverwundeten Pflanzen sowohl durch gasförmiges MeJA als auch durch benachbarte verwundete Pflanzen ausgelöst wird.

Die Kombination von JA-Akkumulation infolge exogener oder endogener Stimuli und Induzierbarkeit der reizspezifischen zellulären Antworten durch Applikation von Jasmonaten legt nahe, dass dieselben als zelluläre Signalvermittler zu betrachten sind. Die Erkenntnisse der physiologischen Zusammenhänge wurden durch eine Reihe von Mutanten bestätigt und erweitert, die durch Defekte in der JA-Biosynthese oder der JA-Signaltransduktion die Rolle und Regulation des Jasmonatwegs entschlüsseln helfen (Devoto und Turner, 2004). Einige, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, sollen an geeigneter Stelle besprochen werden.

2. Biosynthese von Jasmonaten und anderen Oxylipinen

Bei der Akkumulation von JA in der Zelle handelt es sich, zumindest in einigen Fällen, beispielsweise bei Verwundung oder Elicitorbehandlung, nicht um die Freisetzung vorrätiger JA, sondern es findet *de novo* Synthese statt, da exogen verabreichte Linolensäure, das Ausgangsmolekül der JA-Biosynthese, ebenfalls jasmonatinduzierte Reaktionen auslösen kann (Véronési et al., 1996; Zhang et al., 2004) und Inhibitoren der JA-Biosynthese diese Reaktionen blockieren (Ellard-Ivey und Douglas, 1996; Rickauer et al., 1997).

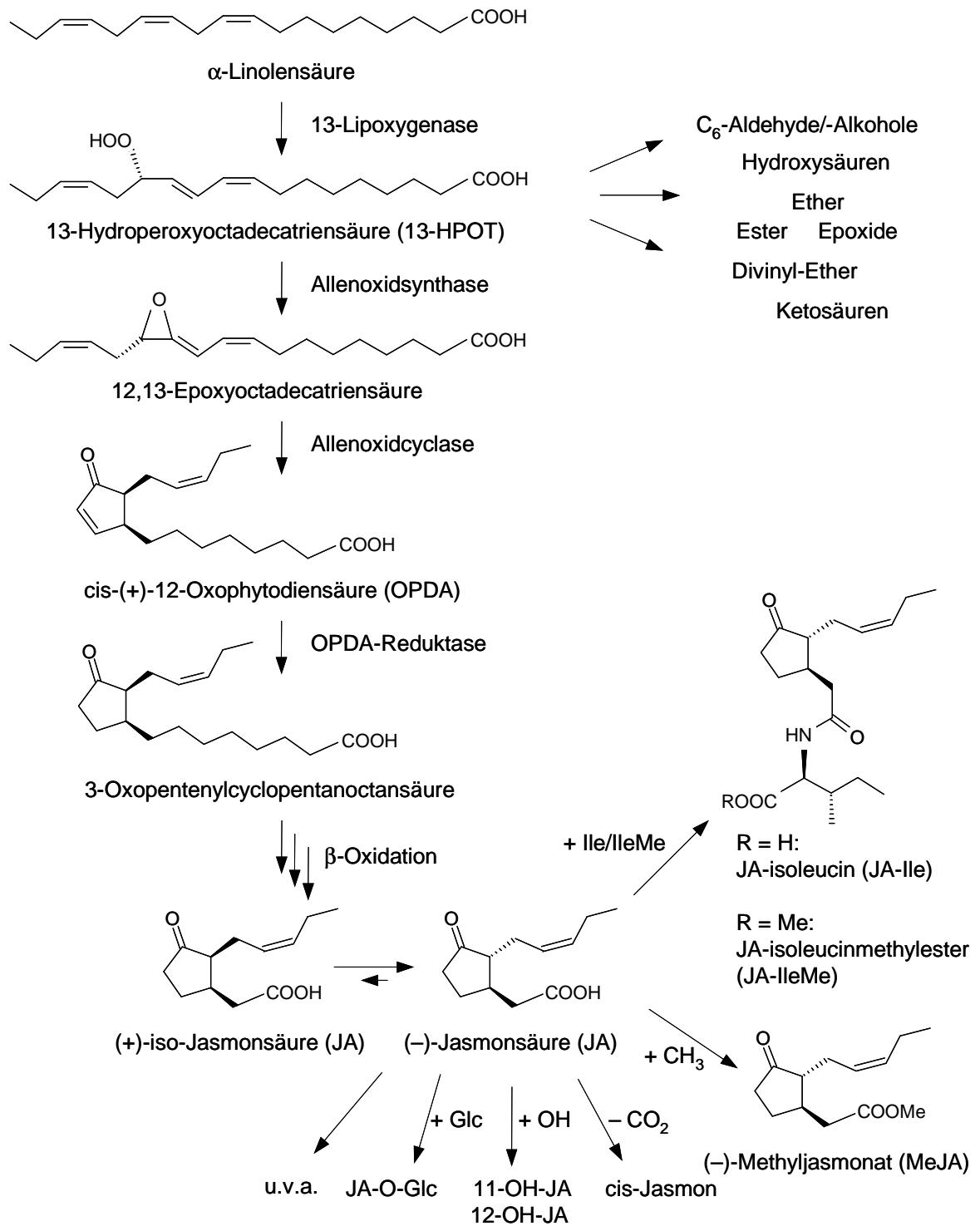


Abb. 1: Biosynthese der Jasmonate

Die Jasmonatbiosynthese beginnt in Plastiden mit der Freisetzung von α -Linolensäure aus Membranlipiden. Peroxidation durch eine 13-Lipoxygenase führt zur Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT), einem zentralen Molekül für die Bildung verschiedener Oxylipine. Wird 13-HPOT durch die Enzyme Allenoxidsynthase und Allenoxidcyclase umgesetzt, entsteht über 12,13-Epoxyoctadecatriensäure die 12-Oxophytodiensäure (OPDA), die aus Plastiden in Peroxisomen importiert wird. Dort reduziert eine OPDA-Reduktase die Doppelbindung des Fünfrings, und drei β -Oxidationszyklen verkürzen die Seiten-

kette. Das Produkt (+)-iso-Jasmonsäure epimerisiert zur stabileren (-)-Jasmonsäure (JA), die verschiedene Modifikationen erfahren kann, darunter Konjugation mit Aminosäuren, Decarboxylierung, Veresterung, Glykosylierung der Carboxylgruppe, Hydroxylierung der Pentenyl-Seitenkette und viele andere, die hier nicht gezeigt sind (nach Wasternack et al., 2006).

Jasmonate sind Produkte der Lipidperoxidation und gehören daher zu den „Oxylipinen“, einer sehr vielfältigen Gruppe von Substanzen, die durch Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehen. Die Biosynthese (Abb. 1) beginnt mit der Insertion von O₂ an Position 13 von α -Linolensäure, einer C₁₈-Verbindung, die mit allen aus ihr entstehenden C₁₈-Produkten unter der Bezeichnung „Octadecanoide“ zusammengefasst wird. Katalysiert wird die Oxidation von α -Linolensäure durch eine 13-Lipoxygenase. Die entstehende 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT) dient als Substrat für mehrere Enzyme zur Bildung unterschiedlicher Oxylipine, darunter C₆-Aldehyde, Alkohole, Ester, Hydroxysäuren, Ketosäuren, Divinylether und Epoxide. Viele dieser Oxylipine sind an der direkten oder indirekten Abwehr von Herbivoren und Pathogenen beteiligt (Halitschke et al., 2004; Blee, 2002). Der Weg zur Bildung der Jasmonate wird eingeschlagen (Vick und Zimmerman, 1984), wenn 13-HPOT durch das Enzym Allenoxid-Synthase zur instabilen 12,13-Epoxyoctadecatriensäure und anschließend durch die Allenoxid-Cyclase zur cis-(+)-12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgesetzt wird. Die Reduktion der Doppelbindung des Fünfrings durch eine OPDA-Reduktase führt zur 3-Oxopentenylcyclopentanoctansäure, die in drei β -Oxidationszyklen zum vorläufigen Endprodukt (+)-iso-Jasmonsäure umgeformt wird. Durch Epimerisierung entsteht die stabilere (-)-Jasmonsäure mit trans-Konfiguration am Fünfring.

An der Jasmonatbiosynthese sind zwei Zellkompartimente beteiligt (Schaller, 2001). Die α -Linolensäure stammt wahrscheinlich aus der plastidären Hüllmembran, wo sie vor oder nach der Insertion des Sauerstoffs durch Phospholipasen freigesetzt wird. Alle folgenden Reaktionen bis zur Bildung von OPDA finden in Plastiden statt. OPDA wird aus den Plastiden exportiert und in Peroxisomen importiert, wo die Biosynthese der Jasmonsäure abgeschlossen wird. Entgegen früheren Annahmen findet die Reduktion von OPDA nicht im Cytosol, sondern in Peroxisomen statt (Strassner et al., 2002).

Jasmonsäure kann verschiedene Modifikationen erfahren, wodurch eine Vielfalt von Jasmonsäurederivaten entsteht (Abb. 1), die zusammen mit den biologisch aktiven biosynthetischen Vorstufen kollektiv als „Jasmonate“ bezeichnet werden. Nur einige Beispiele seien genannt: Durch Methylierung der Carboxylgruppe entsteht Methyljasmonat, durch

Decarboxylierung cis-Jasmon, wie MeJA ein flüchtiger Stoff, der an der Anlockung von Insekten und der Abwehr von Herbivoren beteiligt ist (Birkett et al., 2000). Durch Hydroxylierung der Pentenyl-Seitenkette werden 11-OH-JA oder 12-OH-JA gebildet, die 12-OH- oder die Carboxylgruppe kann glykosyliert werden (Wasternack et al., 2006), oder es erfolgt die Konjugation von JA mit Aminosäuren (Staswick und Tiryaki, 2004). Bei vielen Jasmonaten hat die Untersuchung ihrer physiologischen Relevanz gerade erst begonnen.

Neben der enzymatischen Bildung von Oxylipinen gibt es den nichtenzymatischen Weg, auf dem, ausgehend von α -Linolensäure, über freie Radikale eine weitere Gruppe von Oxylipinen entsteht – die noch nicht lange bekannten Phytoprostane (Müller, 2004). Sie gehören zu den pentacyclischen Octadecanoiden (Abb. 2), kommen in vielen, wenn nicht allen Pflanzen vor und lösen wie Jasmonate Abwehrreaktionen aus (Thoma et al., 2004).

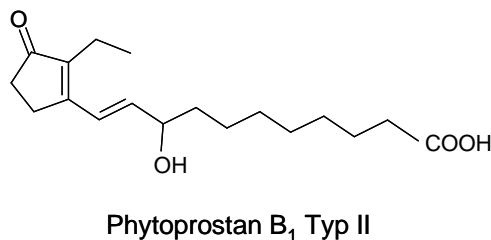


Abb. 2: Struktur von Phytoprostan B₁ Typ II

Phytoprostane sind pentacyclische Octadecanoide, die durch Radikalkettenreaktion aus α -Linolensäure entstehen und eine strukturell sehr variable Gruppe von Oxylipinen darstellen. Stellvertretend ist hier die Struktur von Phytoprostan B₁ Typ II gezeigt.

3. Synthetische Jasmonat-Analoga

Die biologische Aktivität verschiedener Jasmonate wird durch synthetische Indanoyl-Isoleucin-Konjugate nachgeahmt (Mithöfer et al., 2005). Das Grundgerüst dieser Verbindungen bildet die 1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind), die durch eine Amidbindung mit der Aminosäure Isoleucin verknüpft ist (Krumm et al., 1995) (Abb. 3A und B). Strukturelle Modifikationen wie Methylierung der Aminosäure oder Substitution des Indanons an Position 6 (Schüler et al., 2001) ergeben eine Gruppe von Substanzen, die sich für verschiedene Anwendungen eignet. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Indanoyl-Isoleucin-Konjugate für Struktur-Aktivitätsanalysen verwendet (Abb. 3B) und der 6-Azido-1-oxoindanoyl-isoleucinmethylester (Schüler et al., 1999) mit radioaktiv markierter Aminosäure für Bindungsstudien eingesetzt (Abb. 3C).

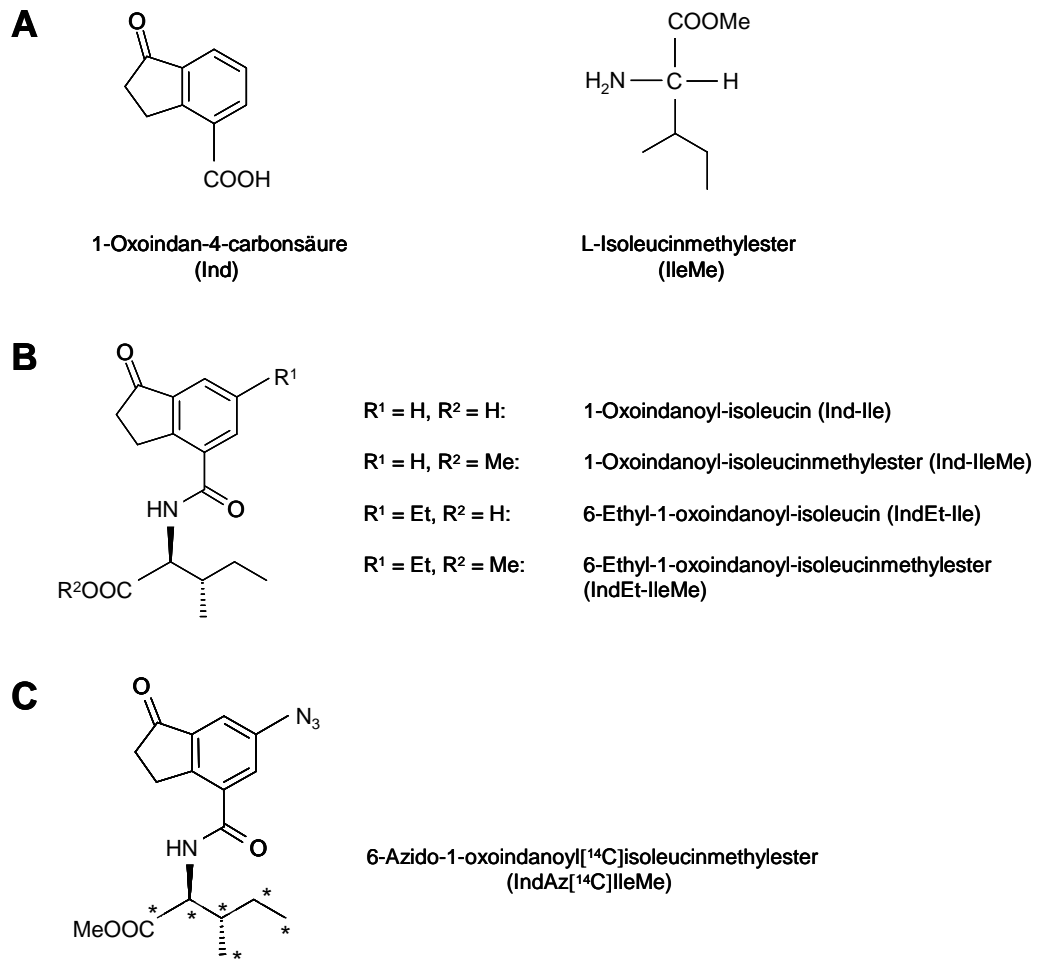


Abb. 3: Strukturen der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate

Die Bausteine 1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind) und L-Isoleucinmethylester (IleMe) (A) sind im Indanoyl-Isoleucin-Konjugat durch eine Peptidbindung verknüpft. Die Konjugate liegen als freie Säuren oder Methylester sowie C6-substituiert oder unsubstituiert vor (B). Im 6-Azido-1-oxoindanoyl[¹⁴C]isoleucinmethylester (IndAz[¹⁴C]IleMe) ist die Aminosäure mit dem Kohlenstoffisotop ¹⁴C (*) markiert (C).

4. Welche Jasmonate sind als Signalmoleküle aktiv?

Die Vielfalt der Jasmonate wirft die Frage auf, ob die ebenfalls vielfältigen jasmonat-induzierten Antworten durch ein und dasselbe endogene Signalmolekül (JA) ausgelöst werden, oder ob es mehrere Signalvermittler gibt, und wenn ja, ob diese gleiche oder unterschiedliche Funktionen ausüben, und bei welchen JA-Derivaten es sich um Metaboliten ohne biologische Aktivität handelt.

Der Durchbruch gelang mit der Entdeckung der eigenständigen Signalwirkung von OPDA (Weiler et al., 1994). Zahlreiche Arbeiten beschreiben unterschiedliche Aktivitäten von OPDA und JA. Beispielsweise führt in *Bryonia dioica* ein mechanischer Stimulus zur Akkumulation von OPDA, gefolgt von der Krümmung der Ranke, die ebenfalls durch den exogen verabreichten Methyl ester von OPDA (MeOPDA) ausgelöst wird, während der endogene JA-Spiegel unverändert bleibt und exogenes MeJA bedeutend weniger aktiv ist (Blechert et al., 1999). Umgekehrt wird die Nikotinproduktion in *Nicotiana sylvestris* durch externes MeJA stärker induziert als durch MeOPDA (Zhang et al., 1997). Limabohnenpflanzen (*Phaseolus lunatus*) antworten auf die Applikation von JA bzw. OPDA mit der Emission einer Mischung von Duftstoffen unterschiedlicher Zusammensetzung (Koch et al., 1999). In Sojabohne (*Glycine max*)-Zellkulturen bewirkt die Behandlung mit OPDA eine wesentlich stärkere Akkumulation von Phytoalexinen als die Behandlung mit JA (Fliegmann et al., 2003). Schließlich konnten mit der *Arabidopsis*-Mutante *opr3* die OPDA- und JA-Effekte *in vivo* unterschieden werden (Stintzi et al., 2001). Der *opr3*-Mutante fehlt das funktionelle Gen für die OPDA-Reduktase 3, wodurch die Jasmonatbiosynthese bei OPDA endet und keine Jasmonsäure gebildet wird. Es wurde gezeigt, dass OPDA in Abwesenheit von JA die Genexpression reguliert und Resistenz gegen Insekten und Pathogene bewirkt. Daneben illustriert die *opr3*-Mutante die exklusive Notwendigkeit von JA für bestimmte Prozesse wie zum Beispiel die Pollenentwicklung. In den männlich sterilen Mutanten wird die Fertilität durch Applikation von JA, nicht aber OPDA, wiederhergestellt (Stintzi und Browse, 2000). Unterstützt durch Struktur-Aktivitätsanalysen mit chemisch modifizierten Jasmonaten und synthetischen Analoga (Blechert et al., 1999; Krumm et al., 1995; Zhang et al., 1997) führten diese Beobachtungen zur Unterteilung der Jasmonate in zwei Gruppen, nämlich die JA-ähnlichen Cyclopentanone und die OPDA-ähnlichen Cyclopentenone (Weber, 2002; Farmer et al., 2003), die unterschiedliche, zum Teil aber auch überlappende biologische Aktivität aufweisen (Stintzi et al., 2001; Kramell et al., 2000).

Methyljasmonat wird häufig als Transportform der Jasmonsäure betrachtet, um nach Hydrolyse in der Zelle JA als Signalmolekül freizusetzen (Weiler, 1997). Ein entsprechendes Enzym für die Hydrolyse von MeJA wurde in Tomate (*Lycopersicon esculentum*) identifiziert (Stuhlfelder et al., 2004). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass MeJA *per se* eine Rolle bei der Transduktion von Signalen spielt. Erste Hinweise dafür lieferte die Klonierung einer JA-Methyltransferase (JMT) aus *Arabidopsis*, die JA zu MeJA umformt (Seo et al., 2001). Die Überexpression dieser JMT in *Arabidopsis* führte zu einem erhöhten endogenen MeJA-Spiegel bei unverändertem JA-Gehalt, konstitutiver Expression von JA-induzierbaren Genen und verstärkter Resistenz gegen Pilzbefall (Seo et al., 2001).

Unter den zahlreichen weniger gut beschriebenen JA-Derivaten haben die JA-Aminosäure-Konjugate in den vergangenen Jahren einige Aufmerksamkeit erfahren. JA wird in der Pflanze vorzugsweise mit Isoleucin, Leucin oder Valin konjugiert (Sembdner und Parthier, 1993). Zunächst wurde vermutet, es könnte sich bei diesen Konjugaten um Speicherformen handeln, aus denen bei Bedarf JA durch Hydrolyse freigesetzt wird, wie es bei Aminosäure-Konjugaten mit dem Auxin Indol-3-essigsäure der Fall ist (Normanly, 1997). Da aber JA-Aminosäure-Konjugate in osmotisch gestressten Gerstenblättern und bei der Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in Gerstenwurzeln akkumulieren (Kramell et al., 1995; Hause et al., 2002) und die exogene Applikation von JA-Ile die Expression von Genen in Gerste und die Synthese von Phytoalexinen in Reis induziert (Kramell et al., 2000; Tamogami et al., 1997), wurde die Möglichkeit der biologischen Aktivität von JA-Aminosäure-Konjugaten ins Auge gefasst. Wieder war es ein genetischer Ansatz, der überzeugende Daten für die eigenständige Signalwirkung eines Mitglieds der Jasmonatfamilie lieferte. Die JA-insensitive *Arabidopsis*-Mutante *jar1-1* ist aufgrund der defekten JA-Aminosäure-Synthase JAR1 nicht in der Lage, Isoleucin mit Jasmonsäure zu konjugieren, ein Vorgang, der für die Hemmung des Wurzelwachstums durch JA und wahrscheinlich auch andere JA-induzierte Reaktionen nötig ist (Staswick und Tiryaki, 2004).

Da die verschiedenen Jasmonate offenbar jeweils eigenständige biologische Aktivität besitzen, hat sich das Konzept der „Oxylipin-Signatur“ etabliert (Weber et al., 1997), nach dem zelluläre Prozesse nicht durch ein einzelnes Signalmolekül (JA), sondern eher durch das Zusammenspiel einer komplexen, dynamischen Mischung von biologisch aktiven Fettsäure-Derivaten reguliert werden.

5. Signaltransduktion durch Jasmonate

Über die Wirkungen der Oxylipine auf molekularer Ebene ist wenig bekannt. Es ist anzunehmen, dass die Signalmoleküle mit Rezeptoren in der Zelle interagieren, um Signaltransduktionskaskaden in Gang zu setzen, die zu spezifischen zellulären Reaktionen führen, meist über Regulation der Genexpression. Trotz intensiver Bemühungen, die eine Reihe von JA-insensitiven *Arabidopsis*-Mutaten hervorgebracht haben (*coi1*, *jar1*, *jai1/jin1*), ist es bisher nicht gelungen, einen Jasmonatrezeptor zu identifizieren (Devoto und Turner, 2004).

Vereinzelt wurde über die Mitwirkung von klassischen Komponenten der Signaltransduktion an der Vermittlung von Jasmonatsignalen berichtet. In Schließzellen von *Arabidopsis* induziert MeJA die Akkumulation von H₂O₂, die zum Schließen der Stomata führt (Suhita

et al., 2004). In Tomatenblättern, wo reaktive Sauerstoffspezies bei Verwundung Abwehrgene aktivieren oder zur Ausbildung der SAR („systemic acquired resistance“) beitragen, wird die systemische Produktion von H_2O_2 durch MeJA ausgelöst (Orozco-Cardenas und Ryan, 1999).

Calcium wurde in drei Studien aufgrund pharmakologischer Daten als potenzieller Vermittler des Jasmonatsignals vorgeschlagen: In *Arabidopsis* wird die JA-induzierte Expression des *JR1*-Gens durch einen Calmodulininhibitor blockiert (Leon et al., 1998), in Tabak führt der Einsatz von Calciumkanalinhibitoren zur Unterdrückung der JA-induzierten Aktivität einer sauren Phosphatase (Kenton et al., 1999), und ebenfalls in Tabak wird das Schließen der Stomata, ausgelöst durch MeJA, durch extrazelluläres Calcium positiv beeinflusst, während Inhibitoren für Calciumkanäle oder Calmodulin die Bewegung der Schließzellen unterbinden (Suhita et al., 2003). Nur eine Arbeit berichtet bisher über die Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen nach Jasmonatbehandlung von *Arabidopsis*-Blattgewebe sowie die Blockierung sowohl des Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegs als auch der JA-induzierten Expression des *JR1*-Gens durch Calciumkanalinhibitoren (Sun et al., 2006b).

Für die Beteiligung von Protein(de-)phosphorylierungen an der Weiterleitung von Jasmonatsignalen lagen zunächst nur indirekte Hinweise vor, etwa die MeJA-induzierte Expression von Proteinkinasen in *Arabidopsis* (Schenk et al., 2000) oder die Blockierung von jasmonatinduzierten zellulären Reaktionen durch Proteinkinase- bzw. Phosphataseinhibitoren (Menke et al., 1999; Suhita et al., 2004; Rojo et al., 1998). Die *Arabidopsis*-Mutante *mpk4* demonstrierte schließlich, dass es sich bei der MAP-Kinase 4 um einen zentralen Regulator handelt. Durch Wirkung auf die regulatorischen Proteine PAD4 und EDS1 aktiviert MPK4 die jasmonat- und ethylenabhängige Genexpression und hemmt gleichzeitig die Salicylsäure (SA)-Signaltransduktion (Brodersen et al., 2006).

Je mehr Komponenten der Jasmonat-Signaltransduktion identifiziert werden, desto stärker wird die Vernetzung mit den Signalsystemen anderer Phytohormone sichtbar (Devoto und Turner, 2004). Am weitesten ist die Charakterisierung der Jasmonat-Signaltransduktion auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren fortgeschritten. Schon früh wurden in jasmonatinduzierten Genen Promotorregionen identifiziert, die für die Empfindlichkeit gegenüber Jasmonaten verantwortlich sind (Creelman und Mullet, 1997). Inzwischen kennt man mehrere Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine. Einige Beispiele mögen einen Überblick geben: ORCAs vermitteln die MeJA-induzierte Expression von Genen des Alkaloidstoffwechsels in *Catharanthus roseus* (Memelink et al., 2001). ERF1 aktiviert Gene für die Pathogenabwehr nach Induktion durch Jasmonat und Ethylen in

Arabidopsis (Lorenzo et al., 2003) und hemmt die Expression JA-induzierter Gene für die systemische Antwort auf Verwundung, während AtMYC2, kodiert von *JIN1*, antagonistisch zu ERF1 wirkt (Lorenzo et al., 2004). Über AtMYC2 ist auch Abscisinsäure (ABA) an der negativen Regulation von PR-Genen beteiligt (Anderson et al., 2004). Weitere jasmonat-induzierte MYC- und MYB-Transkriptionsfaktoren für unterschiedliche Gene wurden in Tomate, Tabak und Reis identifiziert (Boter et al., 2004; Galis et al., 2006; Lee et al., 2001). Die antagonistische Wirkung von JA- und SA-Signalen wird durch das Protein NPR1 und den Transkriptionsfaktor WRKY70 reguliert, der SA-induzierte Gene aktiviert und JA-induzierte Gene reprimiert (Li et al., 2004).

Fast alle JA-induzierten Antworten erfordern das F-box-Protein COI1, das ein Bestandteil des Multiproteinkomplexes SCF^{COI1} ist (Devoto et al., 2002). SCF-Komplexe sind E3-Ubiquitin-Ligasen, die Ubiquitinmoleküle auf spezifische Proteine übertragen, um sie dem proteolytischen Abbau im 26 S-Proteasom zuzuführen. COI1 interagiert mit dem COP9-Signalosom (CSN), das Homologie zur 19 S-Untereinheit des 26 S-Proteasoms aufweist, und sowohl COI1 als auch CSN sind für die Modulation der Genexpression durch JA notwendig (Feng et al., 2003). SCF-Komplexe sind auch Bestandteile der Signaltransduktionskaskaden von Ethylen, Gibberellinsäure und Auxin (Bishopp et al., 2006), vermutlich immer mit der Funktion, regulatorische Proteine abzubauen, wie das Beispiel des Auxins zeigt. Der Auxin-Rezeptor TIR1, ein mit COI1 nahe verwandtes F-box-Protein, geht bei Auxin-Bindung eine stabile Interaktion mit AUX/IAA-Proteinen ein, die als Repressoren von Transkriptionsfaktoren die Expression auxininduzierter Gene verhindern. TIR1/Auxin verknüpft die AUX/IAA-Repressoren mit einem SCF-Komplex, um durch Ubiquitinierung und Abbau im 26 S-Proteasom die Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Genexpression freizugeben (Woodward und Bartel, 2005). Es ist anzunehmen, dass die Signaltransduktionssysteme der verschiedenen Phytohormone auch auf der Ebene des E3-vermittelten Proteinabbaus vernetzt sind. Das Protein AXR1 stellt eine mögliche Verbindung zwischen verschiedenen SCF-Komplexen dar, da es die Aktivität des SCF^{TIR1}-Komplexes reguliert und darüber hinaus auch in der JA- und Ethylen-Signaltransduktion eine Rolle spielt (Devoto und Turner, 2004).

6. Calcium als „second messenger“

Die Pflanzenzelle bedient sich verschiedener „second messenger“, um Reize nach der Perzeption als intrazelluläre Informationen weiterzuleiten. Zu diesen Botenstoffen gehören cyclische Nucleotide, reaktive Sauerstoffspezies, Lipide, Protonen und allen voran Calcium

(Sanders et al., 2002). Abiotischer Stress, Elicitoren und Hormone verschiedenster Art lösen Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration aus (Lecourieux et al., 2006).

Eine aufwändige Ausstattung ermöglicht der Zelle das Hervorbringen sowie die Decodierung von Calciumsignalen. Erste Voraussetzung für das Entstehen der Signale ist eine niedrige cytosolische Calciumkonzentration, üblicherweise zwischen 100 und 200 nM, die durch Ca^{2+} -ATPasen, Ca^{2+} -Transporter und Ca^{2+} -bindende Proteine aufrechterhalten wird (Sanders et al., 1999). Als wichtigste Calciumspeicher dienen Apoplast, Endoplasmatisches Reticulum und Vakuole, deren Ca^{2+} -Konzentrationen um etwa vier Zehnerpotenzen höher liegen als die des Cytosols (Pineros und Tester, 1997). Dieser Gradient ermöglicht den schnellen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration durch vorübergehendes Öffnen von Calciumkanälen, die entweder spannungsabhängig sind oder durch Liganden wie Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), cyclische ADP-Ribose (cADPR) oder Nicotinsäureadenin-dinucleotidphosphat (NAADP) aktiviert werden (Hetherington und Brownlee, 2004). Die konzertierte Aktion von Calciumkanälen und Calciumpumpen bestimmt die Höhe, Dauer, Form und im Fall von Oszillationen die Frequenz des Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegs, dessen Dynamik zusätzlich durch Ca^{2+} -bindende Proteine beeinflusst werden kann (Sanders et al., 1999). Das Signal wird von Calciumsensoren erfasst, darunter Calmodulin, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen oder Phosphatasen, die nach Aktivierung durch Calciumbindung die Aktivität bzw. Funktion anderer Proteine oder die Genexpression regulieren (Reddy und Reddy, 2004).

Wie kann ein einfacher Botenstoff wie Ca^{2+} bei der Vielzahl von unterschiedlichen Reizen eine spezifische Signalübertragung gewährleisten? In Schließzellen beispielsweise lösen die Phytohormone ABA und Auxin jeweils einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration aus, haben aber entgegengesetzte Wirkung auf die Bewegung der Schließzellen; ABA führt zum Schließen, Auxin zur Öffnung der Stomata (Irving et al., 1992). Grundsätzlich ist zu beachten, dass Calcium mit anderen Signalübertragungswegen regulatorisch vernetzt ist (Sanders et al., 2002). In den letzten Jahren ist aber auch deutlich geworden, dass Ca^{2+} -Signale reizspezifische Muster mit räumlich-zeitlichen Charakteristika aufweisen, sogenannte „Calciumsignaturen“ (McAinsh und Hetherington, 1998), die spezifische zelluläre Antworten auslösen (Dolmetsch et al., 1997; Allen et al., 2001). Mit der Calciumsignatur muss die subzelluläre Verteilung der Calciumsensoren übereinstimmen, damit die Übertragung des Signals erfolgen kann (Trewavas und Malho, 1997). Ein wichtiger Aspekt, der dem Ca^{2+} -Signaltransduktionssystem zusätzlich Komplexität verleiht, ist die Lokalisierung von Ca^{2+} -Signalen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Neben

dem Cytosol können Zellkern (van der Luit et al., 1999), Mitochondrien (Logan und Knight, 2003) und Chloroplasten (Johnson et al., 1995) eigene Calciumsignale generieren und zu einer kompartmentübergreifenden Calciumsignatur der gesamten Zelle beitragen.

Der Zellkern ist als Ort der Genexpression von besonderer Bedeutung für die Ausbildung von Anpassungsreaktionen der Zelle und hat daher bezüglich seiner Calcium-Homöostase große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Als Calciumspeicher dient die Kernhülle, die mit dem Endoplasmatischen Reticulum in Verbindung steht und verschiedene Calciumkanäle besitzt, wie in tierischen Zellen gezeigt wurde (Malviya und Rogue, 1998). Ferner wurden Calmodulin, Calmodulin-bindende Proteine, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen und andere Ca^{2+} -Sensoren im Zellkern nachgewiesen, die Einfluss auf die Genexpression nehmen (Dong et al., 2002; Szymanski et al., 1996; Yang und Poovaiah, 2002; Li et al., 1991). Isolierte pflanzliche Zellkerne können Ca^{2+} in einem ATP-abhängigen Prozess aufnehmen (Bunney et al., 2000) und antworten auf unterschiedliche Reize mit spezifischen Calciumkonzentrationsänderungen im Nucleoplasma (Pauly et al., 2000; Xiong et al., 2004). Da der Durchmesser der Kernporen die freie Diffusion von Ca^{2+} erlauben müsste, wurde lange die Möglichkeit diskutiert, dass Calciumsignale im Nucleoplasma nur diffusionsbedingte Auswirkungen von cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen wären. Der Streit ist noch nicht ausgestanden, aber die Mehrheit der Daten spricht für die Autonomie des Zellkerns bei der Erzeugung von Calciumsignalen, die zur Regulation der Genexpression beitragen (van der Luit et al., 1999; Hardingham et al., 1997).

7. Die Aequorin-Technik

Eine häufig benutzte, weil sehr spezifische Methode zur Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen ist die Aequorin-Technik. Sie bedient sich des Ca^{2+} -sensitiven Photoproteins Aequorin, das aus dem Apoprotein Apoaequorin mit drei EF-Händen und der prosthetischen Gruppe Coelenterazin besteht. Wenn alle drei Ca^{2+} -Bindestellen besetzt sind, erfährt das Protein eine Konformationsänderung, in deren Folge es als Oxygenase auf Coelenterazin wirkt. Die Oxidation formt Coelenterazin zum angeregten Coelenteramid um, das bei der Rückkehr in den Grundzustand blaues Licht der Wellenlänge 469 nm emittiert (Kendall und Badminton, 1998) (Abb. 4).

Durch Transformation von Pflanzen oder Zellsuspensionskulturen mit Apoaequorin-cDNA, die mit geeigneten Transitsequenzen für den Import des Proteins in verschiedene Zellorganellen versehen werden kann, wird Apoaequorin gezielt in diesen Zellkompartimenten

exprimiert, wo nach Rekonstitution des Photoproteins mit Coelenterazin Änderungen der Calciumkonzentration anhand der Lumineszenz verfolgt werden können (Brini et al., 1999).

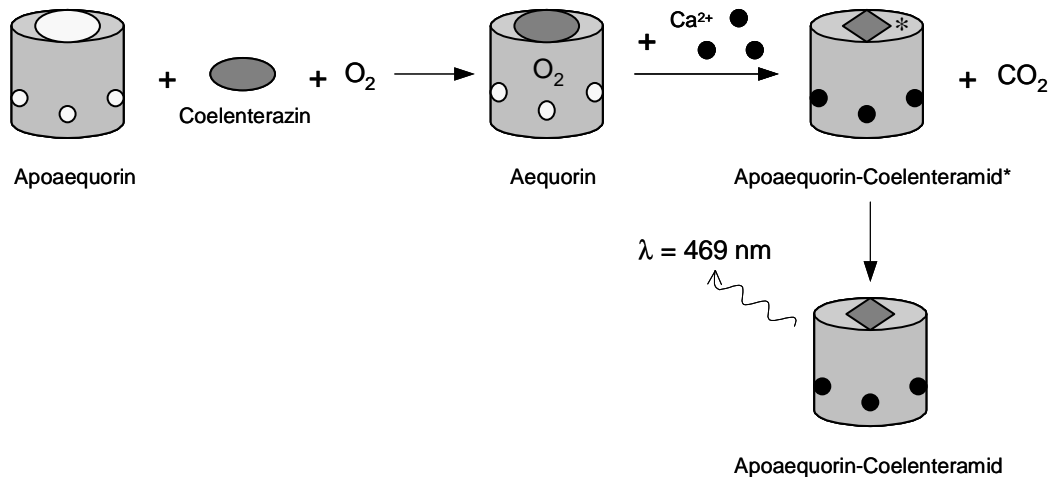


Abb. 4: Biolumineszenz des Aequorins bei Reaktion mit Ca^{2+}

Apoaequorin verbindet sich in Gegenwart von molekularem Sauerstoff spontan mit der prosthetischen Gruppe Coelenterazin zum Photoprotein Aequorin. Durch die Bindung von Ca^{2+} an die drei EF-Hände des Aequorins wird über eine Konformationsänderung des Proteins Coelenterazin unter Bildung von CO_2 zum angeregten Coelenteramid (*) umgesetzt. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Licht der Wellenlänge 469 nm emittiert (nach Kendall und Badminton, 1998).

8. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische Charakterisierung einer potenziellen Bindestelle für Jasmonate, die bei vorläufigen Bindungsstudien mit dem Radioligand 6-Azido-1-oxoindanoyl[^{14}C]isoleucinmethylester in Sojabohnenwurzeln gefunden worden war (Konstantinidis, unveröffentlicht). Es sollte untersucht werden, ob es sich bei dieser Bindestelle möglicherweise um einen Rezeptor für Jasmonate handeln könnte.

Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob Jasmonate Calciumkonzentrationsänderungen im Cytosol und Zellkern von Pflanzenzellen induzieren. Es wurden transformierte *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen verwendet, die Apoaequorin konstitutiv in diesen Kompartimenten exprimieren (Pauly et al., 2001). Durch Einsatz verschiedener Jasmonate sowie synthetischer Indanoyl-Isoleucin-Konjugate sollten die Ca^{2+} -Antworten charakterisiert und insbesondere strukturelle Erfordernisse für deren Induktion identifiziert werden.

Außerdem sollte eine molekularbiologische Analyse über etwaige calciumvermittelte Regulation der Genexpression Aufschluss geben.

C Material

1. Saatgut

Sojabohne, *Glycine max* L. cv. Cresir

Pioneer, Buxtehude

Medicago truncatula Gaertn. cv. Jemalong A17

Dr. J.M. Prospero, Montpellier,
Frankreich

2. Pflanzen

Tabak, *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana

Prof. R.G. Herrmann, München

Arabidopsis thaliana (Ökotyp Columbia)

Prof. D. Leister, München

Kartoffel, *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree

Dr. S. Rosahl, Halle

(wt und coi1-Mutante)

3. Zellsuspensionskulturen

Die Sojabohne-Zellkultur *Glycine max* L. cv. Harosoy 63 (SH 63) war in der Arbeitsgruppe vorhanden (Hille et al., 1982).

Transformierte Tabakzellen *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2, die Apoaquorin konstitutiv im Cytosol (BY-2_{cyt}) bzw. Zellkern (BY-2_{nuc}) exprimieren, wurden von Dr. C. Mazars, Toulouse, Frankreich, zur Verfügung gestellt (Pauly et al., 2001).

Die transformierte Sojabohne-Zelllinie 6.6.12, die Apoaquorin konstitutiv im Cytosol exprimiert, war in der Arbeitsgruppe verfügbar (Mithöfer et al., 1999).

4. Radiochemikalien

6-Azido-1-oxoindanoyl [¹⁴C]isoleucinmethylester (IndAz [¹⁴C]IleMe) mit einer spezifischen Radioaktivität von 10 GBq/mmol wurde von Lacomed, Nuclear Research Institute, Prag, Tschechische Republik, bezogen.

¹²⁵I-markiertes 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugat des Hepta-β-glucosids (¹²⁵I-HG-APEA) war in der Arbeitsgruppe vorhanden (Cosio et al., 1990).

5. Chemikalien

Alle üblichen Laborchemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Roth, Serva, Boehringer, Merck und Sigma bezogen. Außerdem wurden verwendet:

Agarose peqGOLD universal	PEQLAB, Erlangen
Cellulose mikrokristallin	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	Uptima (Interchim), Montluçon, Frankreich
Fluorescein-diacetat	Serva, Heidelberg
Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Isoleucinmethylester	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(±)-Jasmonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(-)-Jasmonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lanthanchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Linsmaier&Skoog basal salt mixture	Duchefa, Haarlem, Niederlande
(±)-Methyljasmonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ninhydrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Random primers	Invitrogen, Karlsruhe
Roti [®] -Quant	Roth, Karlsruhe
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Rutheniumrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
tRNA R-4251 Type XXI from <i>E.coli</i> strain W	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

(±)-cis-12-Oxophytodiensäure wurde von Prof. C. Wasternack, Halle, zur Verfügung gestellt.

1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind), 1-Oxoindanoyl-L-isoleucin (Ind-Ile), 1-Oxoindanoyl-L-isoleucinmethylester (Ind-IleMe), Jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile), Jasmonoyl-L-isoleucinmethylester (JA-IleMe) (Krumm et al., 1995), sowie 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isoleucin (IndEt-Ile), 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isoleucinmethylester (IndEt-IleMe) (Schüler et al., 2001), 3-(Nitro-methyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon (Hopke, 1997) und Phytoprostan B₁ Typ II (Schmidt und Boland, 2007) wurden vom MPI für Chemische Ökologie, Jena, bereitgestellt.

Verzweigtes (1,3)-(1,6)-Hepta- β -glucosid (β -Glucan), isoliert aus der Zellwand des Oomyceten *Phytophthora sojae*, war in der Arbeitsgruppe vorhanden (Cosio et al., 1990).

Björkman-Lignin aus Buchenholz (*Fagus silvatica*) wurde von Prof. H. Nimz, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt (Lüdemann und Nimz, 1974).

6. Enzyme

Cellulase Onozuka RS	Yakult Honsha, Tokio, Japan
Easy-A [®] High-Fidelity PCR Cloning Enzyme	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
EcoRI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Hemicellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipase aus Schweinepankreas	Fluka (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Mazerozym	Serva, Heidelberg
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Pectolyase aus <i>Aspergillus japonicus</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pectinase	Roth, Karlsruhe
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Boehringer, Mannheim
RNasin [®] Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim

7. „Kits“ für molekularbiologische Arbeiten

Fast Start DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche, Mannheim
Novagen Perfectly Blunt Cloning Kit	Novagen, Darmstadt
PCR clean-up NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
StrataClone TM PCR Cloning Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

8. Verbrauchsmaterialien

DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
GF/B Glasfaserfilter, Ø 25 mm	Whatman, Dassel

Vermiculit Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhövel

9. Geräte und Zubehör

Neben der üblichen Laborausstattung wurden verwendet:

β-Zähler LS 6500, Beckman Coulter	Beckman, Krefeld
Berthold Sirius Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
γ-Zähler Cobra™ II	PerkinElmer, Rodgau-Jügelshheim
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan mit Filtersätzen 487901 und 487917 CCD-Kamera	Zeiss, Jena Photometrics, Tucson, USA
Kühlzentrifugen: 3K18 mit Rotoren 12154-H und 11133 RC-5B und RC-5B Plus mit Rotoren GS-3, SS-34, HB-4	Sigma, München Sorvall, Hanau
LightCycler® Version 3.5	Roche, Mannheim
PCR Thermocycler UNOII	Biometra, Göttingen
Phosphoimager FLA-3000 mit Imaging plate BAS-TR2025	Fujifilm, Düsseldorf Raytest, Straubenhardt
Phytokammer	Weiss Klimatechnik, Reiskirchen
Spektrophotometer Ultrospec 3000	Amersham, Freiburg
Waring Blender HGB55E	Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande

10. Software

Zusätzlich zu den üblichen Programmen wurden verwendet:

Aida Advanced Image Data Analyzer 3.52	Raytest, Straubenhardt
Sigma Plot 8.0	Jandel Scientific, Erkrath

D Methoden

1. Allgemeine und biochemische Methoden

1.1. Pflanzenanzucht und Haltung der Zellsuspensionskulturen

Sojabohne- und *Medicago truncatula*-Pflanzen wurden in Vermiculit drei bis fünf Wochen in einer Klimakammer bei einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 h/8 h und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % angezogen. Die Tagestemperatur betrug 26°C, die Nachttemperatur 22°C.

Die Kultivierung der Sojabohne-Zellsuspension *Glycine max* L. cv. Harosoy 63 (SH63) erfolgte wie beschrieben (Hille et al., 1982).

Transformierte Tabakzellen *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2, die Apoaequorin konstitutiv im Cytosol bzw. Zellkern exprimieren, wurden gemäß Pauly et al. (2001) kultiviert.

1.2. Präparationstechniken

1.2.1. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial und Zellsuspensionen durch differentielle Zentrifugation

– Zellwandfraktion (3800 x g-Fraktion)

Die zu untersuchenden Pflanzenteile – Wurzeln, Hypokotyl, Stängel, Blätter – wurden in einem Mixer mit eiskaltem Homogenisationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 250 mM Saccharose) aufgeschlossen. *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial wurde der geringen Menge wegen in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert und anschließend in Homogenisationspuffer aufgenommen. Ebenso wurden Zellen aus Suspensionskulturen auf Filterpapier trockengesaugt und in flüssigem Stickstoff aufgearbeitet. Alle folgenden Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach Filtration des Homogenats durch vier Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze (Porengröße 75 µm) wurde das Filtrat zentrifugiert (3800 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand für die Mikrosomenpräparation aufgehoben. Der Zentrifugationsniederschlag, der neben Zelltrümmern vor allem aus Zellwandmaterial bestand und im Folgenden als

3800 x g-Fraktion bezeichnet wird, wurde mit einem Potter-Homogenisator in Bindungspuffer (Methoden 1.3.1.) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

– *Membranfraktion (Mikrosomen) und lösliches Protein*

Der Überstand aus der 3800 x g-Zentrifugation wurde 30 min bei 37000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag, bestehend aus mikrosomalen Membranen, wurde mit einem Potter-Homogenisator in Bindungspuffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde ebenfalls bei -80°C eingefroren.

1.2.2. Präparation von Protoplasten und Protoplastenmembranen

– *Protoplastenisolierung aus Sojabohnenzellen (SH 63)*

Die Isolierung von Protoplasten erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von Cosio et al. (1988). Zellen einer 10 Tage alten SH 63-Suspensionskultur wurden auf Filterpapier trockengesaugt, 8 g Zellen in 20 ml Enzym-Medium (10 mM MES/KOH, pH 5,6, 0,25 M CaCl_2 , 1 % (w/v) Onozuka RS Cellulase, 0,1 % (w/v) Pectolyase, 0,1 % (w/v) Mazerozym, 1 % (w/v) BSA) resuspendiert und 4 h im Dunkeln bei 32°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde durch Nylongaze (Porengröße $75\ \mu\text{m}$) filtriert, die Protoplasten durch Zentrifugation (80 x g, 5 min, 4°C) in einem Ausschwingrotor sedimentiert und durch Flotation in 10 mM MES/KOH, pH 5,6, 10 mM CaCl_2 und 0,5 M Saccharose bei 80 x g, 5 min und 4°C gereinigt. Nach zweimaligem Waschen (80 x g, 5 min und 4°C) mit 10 mM Tris/HCl, pH 7, 10 mM MgCl_2 und 0,24 M NaCl wurden die Protoplasten entweder für die mikroskopische Analyse (Methoden 1.6.) oder für die Membranisolierung verwendet.

– *Membranisolierung aus SH 63-Protoplasten*

Protoplasten aus 10 Tage alten Sojabohnenzellen wurden in Lysepuffer (5 mM Tris/HCl, pH 8, 30 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT) durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Durch Zentrifugation (29000 x g, 5 min, 4°C) wurden die Membranen isoliert, in Bindungspuffer (Methoden 1.3.1.) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

1.2.3. Präparation von Zellkernen

Die Isolierung von Zellkernen aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen erfolgte wie bei Xiong et al. (2004) beschrieben.

1.3. Analyse der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

1.3.1. IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindungstest

– *Standardbindungstest*

Zur Ermittlung der spezifischen Bindung des Radioliganden 6-Azido-1-oxoindanoyl[¹⁴C]isoleucinmethylester (spez. Aktivität 10 GBq/mmol) an die Fraktionen der Pflanzen- bzw. Zellaufarbeitung (Methoden 1.2.) wurden in Dreifachbestimmung je 50 µg Protein in 200 µl Bindungspuffer (5 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT) mit 0,1 µM IndAz[¹⁴C]IleMe 2,5 h bei 8°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Parallelansätzen mit einem 1000fachen Überschuss an 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucinmethylester (IndEt-IleMe) bestimmt. Nach der Inkubation wurde der nicht gebundene Radioligand durch Filtration der Ansätze über GF/B Glasfaserfilter abgetrennt; handelte es sich um lösliche Proteine, wurden die Filter vorher 1 h mit 0,33 % (v/v) PEI imprägniert. PEI ist ein kationisches Polymer, das die Glasfaserfilter mit einer positiv geladenen Schicht überzieht, um negativ geladene Proteine aufzufangen (Bruns et al., 1983). Die Proben auf den Filtern wurden mit 7 ml Wasser gespült, mit 4 ml Szintillationscocktail versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler durch 2-minütige Messung bestimmt.

Zum Schutz des photolabilen IndAz[¹⁴C]IleMe wurde der Bindungstest bei Rotlicht durchgeführt. Mit Ausnahme der IC₅₀- und K_d-Bestimmung wurde die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung immer durch den Standardbindungstest ermittelt.

– *Bindungstest zur IC₅₀-Bestimmung*

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Radioligandbindung von der Konkretorkonzentration erforderte einen bis zu 10000fachen Überschuss an nichtmarkiertem Ligand. Bei dieser hohen IndEt-IleMe-Konzentration erzwang die begrenzte Löslichkeit des Liganden in Wasser den Zusatz von MeOH als Lösungsvermittler, weshalb die Bindungsansätze zur IC₅₀-Bestimmung einen Lösungsmittelanteil von 2,3 % gegenüber 0,2 % Lösungsmittel im Standardbindungstest enthielten. Die Bindung der Liganden wurde durch die erhöhte MeOH-Konzentration jedoch nicht beeinträchtigt. IndEt-IleMe und alle anderen Konkretoren waren in DMSO gelöst.

– *Bindungstest zur K_d -Bestimmung*

Die IndAz[^{14}C]IleMe-Stammlösung (60 μM) war zu wenig konzentriert für die zur K_d -Bestimmung nötigen Radioligandkonzentrationen. Daher wurde die Stammlösung im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet, in einem geeigneten Volumen MeOH rückgelöst und die Unversehrtheit des Radioliganden durch Dünnschichtchromatographie (Methoden 1.10.) überprüft.

Auch hier erlaubte die eingeschränkte Löslichkeit der Liganden in wässriger Lösung die Durchführung des Bindungstests unter Standardbedingungen nicht. Zur Verdrängung von IndAz[^{14}C]IleMe konnte nur ein 100facher IndEt-IleMe-Überschuß eingesetzt werden, und der Lösungsmittelanteil im Ansatz betrug 4,3 %.

1.3.2. Bestimmung der IndAz[^{14}C]IleMe-Bindung unter dem Einfluss strukturmodifizierender Behandlungen der 3800 x g-Fraktion

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln (Methoden 1.2.1.) wurde in Aliquots mit einem Proteingehalt von je 50 μg verschiedenen Behandlungen unterzogen, um anschließend im Standardbindungstest (Methoden 1.3.1.) die Auswirkung auf die spezifische IndAz[^{14}C]IleMe-Bindung zu ermitteln.

1.3.2.1. Physikalische und chemische Behandlungen der 3800 x g-Fraktion

– *Hitzebehandlung*

Die 3800 x g-Fraktion wurde zur Hitzedenaturierung der Zellwandproteine 15 min in Bindungspuffer (Methoden 1.3.1.) gekocht.

– *Solubilisierung mit SDS*

Die 3800 x g-Fraktion wurde 1 h bei RT unter Schütteln mit 4 % SDS in 50 mM NaAc, pH 6,5, extrahiert, um die Zellwandproteine zu solubilisieren. Nach 5 min Zentrifugation bei 16000 x g und RT wurde der Überstand entfernt und das Zellwandmaterial in Bindungspuffer resuspendiert.

- *Extraktion mit Na₂CO₃/NaBH₄*

Die Behandlung der 3800 x g-Fraktion mit 50 mM Na₂CO₃ und 20 mM NaBH₄ erfolgte über Nacht bei 8°C, wobei vor allem Pektin extrahiert werden sollte (Ryden und Selvendran, 1990). Nach Zentrifugation der Suspension (16000 x g, 5 min, RT) wurde der Niederschlag in Bindungspuffer zunächst gewaschen (16000 x g, 5 min, RT) und dann resuspendiert.

- *Extraktion mit KOH/H₃BO₃/NaBH₄*

Hemicellulosen wurden mit 4 M KOH, 4 % H₃BO₃ und 20 mM NaBH₄ extrahiert (Ryden und Selvendran, 1990); Inkubation und Zentrifugationen erfolgten wie bei Na₂CO₃/NaBH₄ beschrieben.

- *Reduktion mit DTT*

Zur Spaltung von Cystein-Disulfidbrücken wurde die 3800 x g-Fraktion mit 50 mM DTT in 50 mM NaAc, pH 6,5, behandelt; nach 1 h Inkubation bei RT wurde 5 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert und der Niederschlag in Bindungspuffer resuspendiert.

- *Oxidation mit Natriumperiodat*

Die 3800 x g-Fraktion wurde mit 20 mM NaIO₄ in 0,1 M NaAc, pH 5,2, bei RT oder auf Eis 20 min bis 1 h inkubiert, um in Kohlenhydraten C-C-Bindungen mit benachbarten OH-Gruppen zu spalten (McManus, 1956). Anschließend wurde das Zellwandmaterial durch Zentrifugation (16000 x g, 5 min, RT) vom Überstand getrennt und in Bindungspuffer resuspendiert.

1.3.2.2. Enzymatische Behandlung der 3800 x g-Fraktion

- *Abbau von Proteinen*

Proteinase K wurde für jedes Experiment frisch in Wasser gelöst und in Endkonzentrationen von 0,1 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt, um während einer einstündigen Inkubation in Bindungspuffer (Methoden 1.3.1.) bei 37°C Zellwandproteine der 3800 x g-Fraktion zu verdauen. Für Kontrollansätze wurde das Enzym vor der Verwendung durch 15 min Kochen denaturiert.

– *Abbau von Lipiden*

Lipase wurde in 10 mM Tris/HCl, pH 8 und 0,15 M NaCl gelöst und in Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die 3800 x g-Fraktion wurde in 100 μl Reaktionspuffer (1 mM Tris/HCl, pH 8, 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl_2) mit 9 U bzw. 18 U Lipase pro Ansatz 1 h bei 37°C verdaut. Die Kontrolle enthielt 18 U hitzedena turiertes Enzym (vgl. Proteinase K). Nach 5 min Zentrifugation bei 16000 x g und RT wurde der Niederschlag in Bindungspuffer resuspendiert.

– *Abbau von Kohlenhydraten*

Die verschiedenen Gruppen von Zellwandpolysacchariden in der 3800 x g-Fraktion wurden in Einzeltests mit 1 % (w/v) Pectinase, 1 % (w/v) Pectolyase, 1,5 % (w/v) Hemicellulase oder 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka RS verdaut. Der Reaktionspuffer bestand aus 10 mM MES/KOH, pH 5,6, 0,25 mM CaCl_2 und 1 % BSA. Die Ansätze sowie die Kontrollen mit denaturiertem Enzym (vgl. Proteinase K) wurden 3 h bei 37°C inkubiert, dann zentrifugiert (16000 x g, 5 min, RT) und die Niederschläge in Bindungspuffer resuspendiert.

1.3.3. IndAz[^{14}C]IleMe-Extraktion aus dem Bindungsansatz für die chromatographische Analyse

Ein Aliquot der 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln mit einem Proteingehalt von 200 μg wurde mit 15 μM IndAz[^{14}C]IleMe in Bindungspuffer (Methoden 1.3.1.) bei 8°C inkubiert. Nach 2,5 h wurde das Zellwandmaterial mit dem gebundenen Radioligand durch Zentrifugation (16000 x g, 5 min, RT) vom freien IndAz[^{14}C]IleMe im Überstand getrennt. Der Zentrifugationsniederschlag wurde ohne resuspendiert zu werden mit Bindungspuffer gewaschen (16000 x g, 1 min, RT), um eventuell an der Gefäßwand haftendes IndAz[^{14}C]IleMe zu entfernen. Der gebundene Radioligand wurde mit 200 μl MeOH 20 min unter Schütteln extrahiert, nach Zentrifugation (16000 x g, 5 min, RT) die flüssige Phase abgenommen und im Stickstoffstrom auf ca. 10 μl eingeeengt, um durch Dünnschichtchromatographie (Methoden 1.10.) analysiert zu werden.

Der Überstand des Bindungsansatzes, der freien Radioligand enthielt, wurde mit 200 μl Chloroform 20 min unter Schütteln extrahiert, die Mischung zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (16000 x g, 2 min, RT) und die obere wässrige Phase verworfen. Nachdem sich das Chloroform bei RT verflüchtigt hatte, wurde der Rückstand der organischen Phase für die chromatographische Analyse in wenig MeOH aufgenommen.

1.4. ¹²⁵I-HG-APEA-Bindungstest

Die Ermittlung der spezifischen Bindung des ¹²⁵I-markierten 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugats des Hepta- β -glucosids aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* an Membranpräparationen aus Sojabohnenwurzeln bzw. Zellkulturprotoplasten ist in Mithöfer und Ebel (1999) beschrieben.

1.5. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen von 3800 x g-Fraktion, Mikrosomen und löslicher Fraktion wurden nach Bradford (1976) bestimmt.

1.6. Fluoreszenzmikroskopie

Protoplasten (Methoden 1.2.2.) und 3800 x g-Fraktion (Methoden 1.2.1.) aus der Sojabohne-Zellsuspensionskultur wurden mit 0,1 % (w/v) Calcofluor gefärbt. Zur Überprüfung der Vitalität wurde ein Aliquot der Protoplastenpräparation mit 0,01 % (w/v) Fluoresceindiacetat (FDA) inkubiert.

Die FDA-Färbung wurde im Fluoreszenzmikroskop mit dem Filtersatz 487917 (Anregungsfilter BP 485/20, Farbteiler FT 510, Sperrfilter BP 515-565) sichtbar gemacht. Für die Calcofluor-Fluoreszenz der Zellwand wurde der Filtersatz 487901 (Anregungsfilter BP 365/12, Farbteiler FT 395, Sperrfilter LP 397) verwendet. Das Mikroskop war mit einer CCD-Kamera für die Dokumentation ausgestattet.

1.7. Messung von intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen

- *in vivo Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung in BY-2-Zellen*

Nicotiana tabacum BY-2-Zellen einer 12 bis 15 Tage alten Suspensionskultur, die sich in der beginnenden bis späten stationären Phase befand, wurden mit dem 20fachen Volumen BY-2-Puffer, bestehend aus 2 mM MES-KOH, pH 5,8, 175 mM Mannitol, 0,5 mM K₂SO₄ und 0,5 mM CaCl₂, gewaschen (180 x g, 5 min, RT) und im gleichen Puffer mit 20 % PCV (packed cell volume) resuspendiert. Die Rekonstitution des Aequorins erfolgte durch mindestens 3 h Inkubation der Zellen mit 2 μ M Coelenterazin im Dunkeln auf einem Schüttler. Für Calciummessungen wurden je 100 μ l dieser Zellsuspension in einer Luminometerküvette mit 0,5 bis 1 μ l Effektorlösung (Jasmonate und synthetische Jasmonat-Analoga in

EtOH oder DMSO) bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels versetzt. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden die Zellen vor der Zugabe des Effektors 5 min mit dem Inhibitor im Dunkeln inkubiert. Effektor- und Inhibitorkonzentrationen sowie die Lösungsmittel sind den Abbildungen zu entnehmen. Die Lumineszenz wurde pro Sekunde in einem Luminometer gemessen. Am Ende jedes Experiments wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl 100 mM CaCl₂, 10 % (v/v) Ethanol und 2 % (v/v) Nonidet P-40 lysiert, um das verbliebene Aequorin zu entladen. Die resultierende Lichtemission wurde verwendet, um die Lumineszenz zu jedem Zeitpunkt der Messung in die entsprechende Calciumkonzentration umzurechnen. Die Kalibrierung des cytosolischen Calciums erfolgte wie bei Knight et al. (1996) beschrieben; die Calciumkonzentration im Zellkern wurde nach van der Luit et al. (1999) berechnet.

- *in vivo Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung in Sojabohne 6.6.12-Zellen*

Sojabohne 6.6.12-Zellen wurden in B5-Medium (Hille et al., 1982) auf einem Schüttler mit 2 µM Coelenterazin mindestens 3 h im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte wie für BY-2-Zellen beschrieben.

- *in vitro Aequorin-Rekonstitution und Lumineszenzmessung*

Um mögliche Nebeneffekte der für die Calciummessungen verwendeten Substanzen auf die Aequorinlumineszenz festzustellen, wurde Apoaequorin aus transformierten BY-2-Zellen extrahiert, Aequorin durch Inkubation mit Coelenterazin rekonstituiert und die Lumineszenz in Anwesenheit und Abwesenheit der jeweiligen Substanz verglichen. Die Vorgehensweise ist in Mithöfer und Mazars (2002) beschrieben.

1.8. Untersuchung der Aufnahme und Stabilität von Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen

- *Bestimmung der Aufnahme von IndEt-IleMe/IndAz [¹⁴C]IleMe*

Für die Aufnahmestudien wurde eine 0,1 M Lösung aus IndEt-IleMe/IndAz [¹⁴C]IleMe (30 Bq/nmol) in DMSO hergestellt, der IndAz [¹⁴C]IleMe-Anteil betrug 0,3 %. Zum Schutz der photolabilen Azido-Verbindung wurden die Versuche bei Rotlicht durchgeführt.

BY-2-Zellen einer 12 bis 15 Tage alten Kultur wurden wie für die Calciummessung mit BY-2-Puffer gewaschen (Methoden 1.7.). Je 100 µl Zellsuspension mit 20 % PCV wurden mit bis zu 1 µl IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe-Lösung versetzt und 5 min bis 1 h bei RT inkubiert. Die IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe-Konzentrationen sind in den Abbildungen angegeben.

Als Kontrolle wurden 100 µl Zellsuspension mit 900 µl 10 % EtOH gemischt, um die Zellen zu lysieren. Das Zellmaterial wurde dann zweimal mit 900 µl BY-2-Puffer gewaschen, wobei nach jeder Zentrifugation (16000 x g, 2 min, RT) nur 900 µl des Überstands abgenommen wurden, um den sehr lockeren Zentrifugationsniederschlag vollständig zu erhalten. Die resultierende Suspension lysierter Zellen wurde wie für intakte Zellen beschrieben behandelt.

Nach der Inkubation wurde freies IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe durch Filtration über GF/B Glasfaserfilter entfernt, das Zellmaterial mit 5 ml BY-2-Puffer gewaschen und die gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Menge des aufgenommenen IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe wurde ermittelt, indem die an lysierte Zellen gebundene Radioaktivität von der Gesamtradioaktivität der intakten Zellen subtrahiert wurde.

- *Extraktion des aufgenommenen IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe aus BY-2-Zellen für die chromatographische Analyse*

Intakte und lysierte Zellen wurden nach der Inkubation mit IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe (30 Bq/nmol) nicht filtriert, sondern zentrifugiert (16000 x g, 2 min, RT), der Überstand abgenommen, nicht verworfen und das Zellmaterial mit 900 µl BY-2-Puffer gewaschen (16000 x g, 2 min, RT). Der Niederschlag wurde mit 200 µl MeOH 20 min unter Schütteln extrahiert, die unlöslichen Zellreste durch Zentrifugation (16000 x g, 2 min, RT) entfernt und der MeOH-Überstand im Speed-Vac-Konzentrator eingeengt, um durch Dünnschichtchromatographie (Methoden 1.10.) analysiert zu werden.

Der Überstand des Versuchsansatzes wurde 20 min mit 200 µl Chloroform unter Schütteln extrahiert, anschließend zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (16000 x g, 2 min, RT) und die obere wässrige Phase verworfen. Nachdem sich das Chloroform bei RT verflüchtigt hatte, wurde der Rückstand der organischen Phase für die chromatographische Analyse in wenig MeOH aufgenommen.

1.9. Alkalische Hydrolyse von IndEt-IleMe

Zu einer Lösung von 1,66 mg bzw. 5 µmol 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucinmethylester (IndEt-IleMe) in 53,5 µl THF wurden 10,7 µl einer wässrigen 3,5 M LiOH-Lösung gegeben.

Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei RT geschüttelt, dann durch Zugabe von 27,6 µl einer wässrigen 5 % HCl-Lösung angesäuert und zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (16000 x g, 1 min, RT). Die wässrige Phase wurde mit 300 µl Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Speed-Vac-Konzentrator entfernt, um das Reaktionsprodukt in MeOH aufzunehmen. Durch präparative Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄-Platte mit dem Laufmittel Chloroform/MeOH 4/1 wurde das Produkt mit einem R_f-Wert von ca. 0,57 vom verbliebenen Edukt IndEt-IleMe (R_f = 0,88) getrennt, mit MeOH eluiert, im Speed-Vac-Konzentrator eingengt und durch GC-MS als 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucin (IndEt-Ile) identifiziert. Die GC-MS-Analyse wurde am MPI für Chemische Ökologie, Jena, durchgeführt.

1.10. Dünnschichtchromatographie

Die Stabilität von IndAz[¹⁴C]IleMe und IndEt-IleMe während verschiedener Versuche wurde durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten überprüft. Als Referenzen dienten neben den Ausgangssubstanzen der kommerziell erhältliche L-Isoleucinmethylester und IndEt-Ile (Methoden 1.9.). Als Laufmittel wurde Chloroform/MeOH im Verhältnis 4/1 verwendet.

IndEt-IleMe und IndEt-Ile konnten auf der DC-Platte direkt durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. L-Isoleucinmethylester gehört zu den Substanzen, die keine Interferenz mit der Fluoreszenz der DC-Platte zeigen und musste daher mit Ninhydrin-Reagenz nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Platte mit 0,25 % (w/v) Ninhydrin in EtOH besprüht und 10 min bei 110°C inkubiert. Der Radioligand IndAz[¹⁴C]IleMe wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Nach mindestens 4-tägiger Exposition der Dünnschichtplatte gegen eine BAS-TR2025 Imaging Plate wurde diese in einem FLA-3000 Phosphorimager gelesen.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1. Induktion der Genexpression in BY-2-Zellen

BY-2-Zellen in verschiedenen Wachstumsphasen wurden wie für die Calciummessung mit BY-2-Puffer gewaschen und mit Coelenterazin mindestens 3 h inkubiert (Methoden 1.7.) oder nach Goossens et al. (2003) in frischem Linsmaier&Skoog Medium ohne 2,4-D 10fach verdünnt und 12 h im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die

Induktion der Genexpression durch Zugabe von Jasmonaten oder synthetischen Jasmonat-Analoga bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln; die Endkonzentrationen sind in den Abbildungen angegeben. Bei den Experimenten mit BY-2-Puffer war das Volumen der Suspension so gering, dass die dreistündige Inkubation im Dunkeln ohne Schütteln erfolgen musste. Bei den Experimenten mit L&S-Medium wurden größere Ansätze verwendet, die im Dunkeln geschüttelt wurden. Vor der Zugabe des Induktors sowie 3, 6 und 9 h danach wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert (16000 x g, 1 min, RT) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2. RNA-Extraktion

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus BY-2-Zellen wurde der RNeasy® Plant Mini Kit von QIAGEN verwendet, wobei mit dem dazu vorgesehenen RNase-Free DNase Set von QIAGEN eine „on-column“ DNase-Behandlung der RNA durchgeführt wurde, um DNA-freie RNA zu erhalten. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

2.3. cDNA-Synthese

0,7 µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung von 40 ng „Random Primers“ (Invitrogen), 20 U RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega) und 100 U M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) in einem Volumen von 10 µl gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Abweichend vom empfohlenen Protokoll wurde die RNA in Wasser 5 min bei 65°C und anschließend 3 min bei 90°C denaturiert, bevor alle übrigen Komponenten zugegeben wurden. Auch das Programm zur Synthese der cDNA wurde modifiziert (15 min bei 25°C, 90 min bei 37°C, 5 min bei 90°C).

2.4. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die cDNA wurde 20fach in Wasser verdünnt und mit 10 ng/µl tRNA versetzt. Für die qRT-PCR wurden 2 µl dieser Verdünnung (entsprechend 7 ng revers transkribierte RNA) eingesetzt. Der 20 µl-Reaktionsansatz enthielt außerdem den LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Reaction Mix (Roche) und je 500 nM „forward“ (for) und „reverse“ (rev) Primers“. Für die Ornithin-Decarboxylase (D89984) wurde das Primerpaar ODC_for (5'-ATTCCACATCGGTAGCG-3') und ODC_rev (5'-ATTCACCCCTCACTCT-3') verwendet, als interner Standard diente γ -Tubulin (AB051679) mit Tub_for (5'-GGAACGCCTGCATATTAC-3') und Tub_rev (5'-CTGAAGGAGCCTTCTCAT-3'). Für die Endochitinase (M15173)

wurden Chn_for (5'-AGGAAAGGGATTCTACAGT-3') und Chn_rev (5'-GGGCCTCGTCCG AAATA-3'), für die 5-*epi*-Aristolochen-Synthase (L04680) EAS_for (5'-GAGTCGAGACCCG ATT-3') und EAS_rev (5'-ACTGTACCGTAAGCATCA-3') und für die Cysteinprotease CP-23 (AB032168) CP23_for (5'-GGTTAGGCCCGTTAGT-3') und CP23_rev (5'-CGACAGGG TAGGATGC-3') verwendet.

	Temperatur	Zeit	Temperaturübergang	Detektion
Denaturierung	95°C	10 min	-	NONE
Amplifikation	95°C	0 sec	20°C/sec	NONE
	49°C	7 sec	20°C/sec	NONE
	72°C	19 sec	20°C/sec	NONE
	79°C	5 sec	20°C/sec	SINGLE
Schmelzkurve	95°C	20 sec	20°C/sec	NONE
	79°C	30 sec	20°C/sec	NONE
	95°C	0 sec	0,3°C/sec	STEP
Kühlung	40°C	10 sec	20°C/sec	NONE

Tab. 1: Programm für die quantitative real-time PCR

Auf die Denaturierung der DNA folgten 45 PCR-Zyklen zur Amplifikation des DNA-Abschnitts. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen (SINGLE). Zur Aufzeichnung der Schmelzkurve des PCR-Produkts wurde die DNA denaturiert und bei 79°C renaturiert, um anschließend schrittweise auf 95°C erhitzt zu werden, wobei nach jeder Temperaturerhöhung die Fluoreszenz gemessen wurde (STEP).

Die qRT-PCR wurde in einem LightCycler® Version 3.5 (Roche) mit dem in Tabelle 1 angegebenen Programm durchgeführt. Anschließend wurden die qRT-PCR-Produkte mit je 2 µl Auftragspuffer (Methoden 2.5.) versetzt und durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Zur Quantifizierung wurden Eichgeraden aus 20 fg bis 2 pg Plasmid-DNA der klonierten PCR-Produkte (Methoden 2.8.) erstellt und in jedem Experiment ein entsprechender Plasmid-Standard für die Kalibrierung eingesetzt. Alle Plasmid-DNA-Verdünnungen enthielten wie die cDNA-Proben 10 ng/µl tRNA.

2.5. Agarosegel-Elektrophorese

Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol. Auftragspuffer (30 % (v/v) Glycerin, 10x TAE, 2,5 mg/ml Orange G) versetzt und in einem Agarosegel, bestehend aus

1,5 % (w/v) Agarose und 1x TAE (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,11 % (v/v) Essigsäure), aufgetrennt; der Laufpuffer 1x TAE enthielt Ethidiumbromid.

2.6. Reinigung von qRT-PCR-Produkten durch Gel-Extraktion

Die Banden der qRT-PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA mit dem PCR clean-up NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert und anschließend durch Fällung (Methoden 2.7.) konzentriert.

2.7. DNA-Fällung

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2, und 2,5 Vol. 100 % EtOH 1 h bei –80°C gefällt, zentrifugiert (29700 x g, 15 min, 4°C), die DNA mit 75 % EtOH gewaschen (29700 x g, 5 min, 4°C), getrocknet und in 5 µl Wasser gelöst. Die Ausbeute wurde durch Agarosegel-Elektrophorese (Methoden 2.5.) abgeschätzt.

2.8. Klonierung von qRT-PCR-Produkten

– *pSTBlue-1-NtTub*

Das gereinigte und konzentrierte γ -Tubulin-Fragment (253 bp) wurde unter Verwendung des Perfectly Blunt Cloning Kits (Novagen) dem Protokoll des Herstellers folgend in den Vektor pSTBlue-1 kloniert.

– *pSC-A-NtODC*

Für die Klonierung des ODC-Fragments (302 bp) wurde der StrataClone[™] PCR Cloning Kit (Stratagene) verwendet. Dieses System verlangt ein PCR-Produkt, das mit dem Easy-A[®] High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) hergestellt wurde. Die Easy-A[®] High-Fidelity PCR wurde mit dem ODC-Primerpaar (Methoden 2.4.) und BY-2-cDNA (Methoden 2.3.) nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom empfohlenen Protokoll wurde die MgCl₂-Konzentration auf 2,5 mM erhöht. Das Programm setzte sich aus 3 min bei 94°C und 30 Zyklen mit 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 50°C und 45 sec bei 72°C zusammen. Das PCR-Produkt wurde ohne Aufreinigung unter Verwendung des StrataClone[™] PCR Cloning Kit (Stratagene) in den Vektor pSC-A kloniert.

2.9. Präparation von Plasmid-DNA

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Zellen wurden der QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) und der QIAGEN Plasmid Midi Kit den Empfehlungen des Herstellers entsprechend verwendet. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

2.10. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA-Präparationen (Methoden 2.9.) wurden durch Restriktion mit EcoRI überprüft. Beide Vektoren, pSTBlue-1 (Novagen) und pSC-A (Stratagene), besaßen für dieses Restriktionsenzym Schnittstellen auf beiden Seiten der Klonierungsstelle. Der Restriktionsansatz enthielt 0,2 µg Plasmid-DNA, 3 U EcoRI und den zugehörigen Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die DNA durch Agarosegel-Elektrophorese (Methoden 2.5.) aufgetrennt.

2.11. Sequenzierung

Plasmid-DNA (0,5 µg) wurde mit 5 pmol eines geeigneten Primers in einem Gesamtvolumen von 8 µl zur Sequenzierung gegeben. Für pSTBlue-1-NtTub wurden die Primer des T7-Promotors (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') und des SP6-Promotors (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'), für pSC-A-NtODC der T7- (s.o.) und der M13 Reverse-Primer (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung wurde von der AG Prof. D. Leister, LMU München, durchgeführt.

E Ergebnisse

I. Charakterisierung einer potenziellen Bindestelle für Jasmonate in Sojabohne (*Glycine max* L.)

Obwohl Jasmonate – insbesondere JA und MeJA – in ihrer Eigenschaft als Phytohormone seit 25 Jahren intensiv studiert werden, ist bis heute kein entsprechender Rezeptor gefunden worden. Aufgrund der lipophilen bzw. flüchtigen Natur von JA und MeJA waren der biochemischen Rezeptorsuche von vornherein Schwierigkeiten prophezeit worden (Creelman and Mullet, 1997). Die Entwicklung der synthetischen Indanoyl-Isoleucin-Konjugate als wirkungsvolle Jasmonat-Analoga eröffnete die Möglichkeit, in einem biochemischen Ansatz nach spezifischen Bindestellen für Jasmonate zu suchen (Mithöfer et al., 2005). Als Radioligand wurde 6-Azido-1-oxoindanoyl-[¹⁴C]isoleucinmethylester (IndAz-[¹⁴C]IleMe) (Abb. 3C) entworfen, der als photolabile Azido-Verbindung die Identifizierung einer spezifischen Bindestelle durch Photoaffinitätsmarkierung ermöglichen sollte (Schüler et al., 1999). Nachdem in einer vorläufigen Bindungsstudie eine spezifische Bindestelle für IndAz-[¹⁴C]IleMe in Sojabohnewurzeln gefunden worden war (K. Konstantinidis, unveröffentlicht), wird nun eine umfassende biochemische Analyse dieser Bindestelle vorgelegt.

Von K. Konstantinidis (unveröffentlicht) waren bereits die Assoziationskinetik der IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindung mit halbmaximaler Belegung der Bindestellen nach etwa 30 min, die Dissoziationskinetik mit halbmaximaler Verdrängung des Radioliganden nach 15 min sowie das Temperaturoptimum der Bindung bei 8°C ermittelt worden. Außerdem hatten sich die beiden 6-substituierten Konjugate 6-Azido-1-oxoindanoyl-isoleucinmethylester (Abb. 3C) und 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucinmethylester (IndEt-IleMe) (Abb. 3B), die bis auf den Substituenten an Position 6 übereinstimmende Strukturen besitzen, als gleichwertige Kompetitoren für die Verdrängung des Radioliganden erwiesen.

Wegen mangelnder Verfügbarkeit des nichtmarkierten IndAz-IleMe wurde in der vorliegenden Arbeit IndEt-IleMe als Kompetitor eingesetzt.

1. Lokalisierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Das Vorkommen der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in Sojabohne wurde sowohl in verschiedenen Pflanzenorganen als auch auf zellulärer Ebene untersucht, wobei das geeignete Material für weiterführende Analysen ausgewählt werden sollte.

1.1. Verteilung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in fraktionierten Sojabohnewurzeln

Die differenzielle Zentrifugation eines Sojabohnewurzel-Homogenats lieferte im ersten Schritt eine Fraktion, die aufgrund der g-Zahl „3800 x g-Fraktion“ genannt wurde und vermutlich in erster Linie Zelltrümmer, Zellwandbruchstücke und Zellkerne enthielt (Hall and Moore, 1983). In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde bei 37000 x g in Gegenwart von 30 mM MgCl₂ ein Niederschlag mikrosomaler Membranen erhalten. Der verbleibende Überstand enthielt lösliche Proteine.

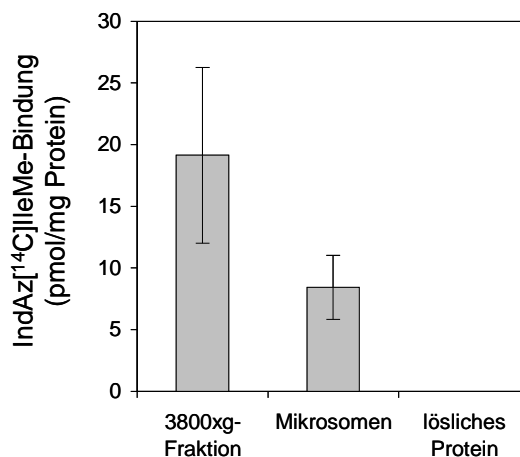


Abb. 5: Verteilung der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in fraktionierten Sojabohnewurzeln

Durch differenzielle Zentrifugation eines Sojabohnewurzel-Homogenats wurden drei Fraktionen erhalten: 3800 x g-Fraktion, Mikrosomen und lösliche Proteine. Die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung wurde hier wie in allen weiteren Experimenten mit 0,1 µM IndAz[¹⁴C]IleMe und einem 1000fachen Überschuss an IndEt-IleMe bestimmt (n = 3).

Zur Ermittlung der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in den drei Fraktionen wurde der Standardbindungstest mit einer Radioligandkonzentration von 0,1 µM und einem 1000-fachen Überschuss an nichtmarkiertem IndEt-IleMe durchgeführt. Der Standardbindungstest wurde auch in allen folgenden Experimenten verwendet, sofern nicht anders

angegeben. Die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung wird entweder auf die Proteinmenge bezogen oder als relativer Wert in Prozent angegeben.

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln zeigte mit $19,1 \pm 7,1$ pmol/mg ($n = 3$) die höchste spezifische Bindung, während in Mikrosomen nur $8,4 \pm 2,6$ pmol/mg ($n = 3$) und bei löslichen Proteinen keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 5). Damit wurde die 3800 x g-Fraktion zur Präparation der Wahl für alle weiteren Experimente.

1.2. Organspezifische Verteilung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle wurde in der 3800 x g-Fraktion aller untersuchten Organe der Sojabohne gefunden. Allerdings war die Bindungsaktivität in den grünen Pflanzenteilen – Hypokotyl, Kotyledonen, Stängel, Blätter – mit ca. 1 pmol/mg ($n = 3$) sehr niedrig, verglichen mit der spezifischen Bindung von $19,1 \pm 7,1$ pmol/mg ($n = 3$) in Wurzeln (Abb. 6). Daher wurde für alle folgenden Experimente Wurzelmaterial verwendet.

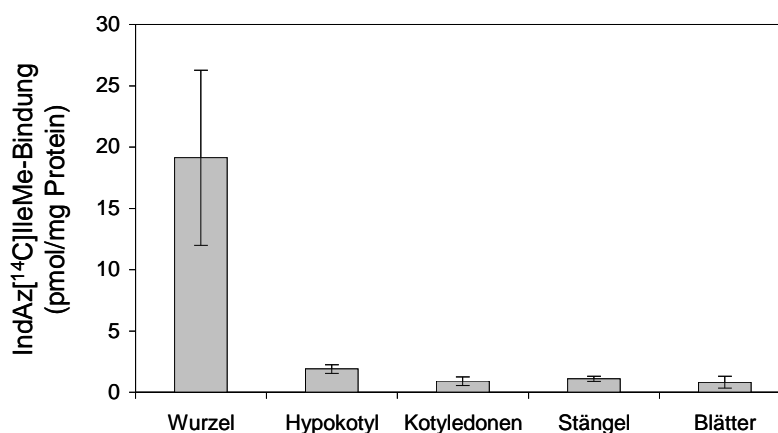


Abb. 6: Verteilung der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in verschiedenen Organen der Sojabohne

Drei Wochen alte Sojabohnepflanzen wurden in Wurzel, Hypokotyl, Kotyledonen, Stängel und Blätter zerlegt. Es wurde jeweils eine 3800 x g-Fraktion präpariert und die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt. Die gezeigten Werte stellen das Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

1.3. Intrazelluläre Lokalisierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Die Konzentration der Bindungsaktivität in der 3800 x g-Fraktion (Abb. 5) ließ erwarten, dass die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle entweder im Zellkern oder in der Zellwand zu finden

sein würde. Da die Isolation von Zellkernen aus Sojabohnewurzeln aufgrund starker Zellwandkontamination nicht möglich war, wurde der Weg über die Protoplastierung gewählt, um den Sitz der Bindestelle zu bestimmen. Aber auch die Präparation von Protoplasten aus Sojabohnewurzeln erwies sich als unmöglich, weshalb auf die Sojabohne-Zellsuspensionskultur *Glycine max* L. cv. Harosoy 63 ausgewichen werden musste. Aus der Zellsuspension konnten Protoplasten gewonnen werden (Abb. 7A), deren Lebensfähigkeit durch Vitalitätsfärbung mit Fluorescein-diacetat bestätigt wurde. Durch Färbung mit dem zellwandspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor wurde nachgewiesen, dass die Protoplasten von Zellwandresten frei waren (Abb. 7B). Aus der gleichen Zellsuspensionskultur wurde parallel eine 3800 x g-Fraktion präpariert, die ebenfalls mit Calcofluor angefärbt wurde. Die mikroskopische Analyse des Präparats zeigte, dass es sich bei den groben Strukturen, die im Durchlicht zu sehen waren (Abb. 7C), um Zellwandbruchstücke handelte (Abb. 7D), so dass die 3800 x g-Fraktion als zellwandreiche Fraktion bezeichnet werden kann. Die Mikroskopie der 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln lieferte ein ähnliches Bild.

Aus den Protoplasten wurde durch Lyse und Zentrifugation eine Membranfraktion isoliert, um das Ergebnis des Bindungstests nicht durch die Anwesenheit einer großen Menge löslicher Proteine zu verfälschen. Während die Protoplastenmembranen nicht in der Lage waren, den Radioligand spezifisch zu binden, besaß die zellwandreiche 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenzellen eine Bindungsaktivität von $11,6 \pm 5,5$ pmol/mg ($n = 3$) (Abb. 7E). Diese Korrelation spricht mit Nachdruck für eine zellwandständige Bindestelle.

Da es auch denkbar wäre, dass die Bindestelle in der Plasmamembran lokalisiert ist und beim enzymatischen Abbau der Zellwand beschädigt wurde, kann das Fehlen der spezifischen Bindung von IndAz[^{14}C]IleMe an Protoplastenmembranen nicht unbedingt als Abwesenheit der Bindestelle interpretiert werden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde in einem Kontrollexperiment die Unversehrtheit der Protoplastenoberfläche überprüft. Das β -Glucan-Bindeprotein in der Plasmamembran von Sojabohnenzellen ist eine hochaffine spezifische Bindestelle für das (1,3)-(1,6)-Hepta- β -glucosid aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* (Cosio et al., 1990) und sollte bei schonender Protoplastenpräparation funktionsfähig erhalten bleiben (Cosio et al., 1988). Im Bindungstest mit dem ^{125}I -markierten 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugat des Hepta- β -glucosids als Radioligand (Cosio et al., 1990) wurde dieselbe spezifische Bindung von ca. 0,12 pmol/mg ($n = 3$) an Protoplastenmembranen wie Mikrosomen aus Sojabohnenzellen festgestellt (Abb. 7F). Daher ist anzunehmen, dass die Plasmamembran durch die Enzymbehandlung nicht stark beschädigt wurde.

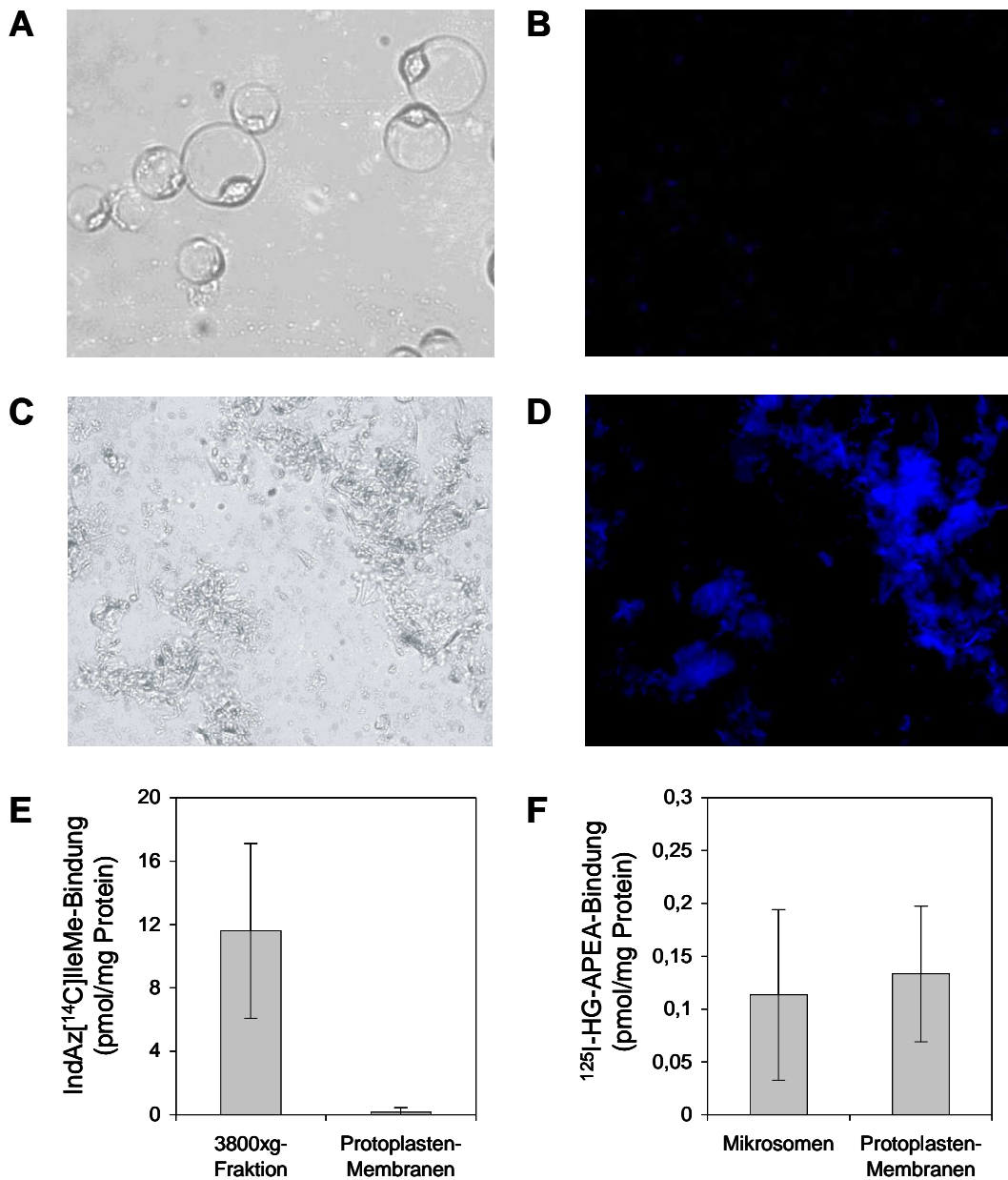


Abb. 7: Intrazelluläre Lokalisierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Protoplasten aus einer 10 Tage alten Sojabohne SH 63-Zellkultur wurden mit 0,1 % (w/v) Calcofluor gefärbt. Das Präparat wurde im Phasenkontrast (A) und unter UV-Licht mit dem Filtersatz 487901 (B) abgelichtet. Eine 3800 x g-Fraktion aus der gleichen Zellkultur wurde ebenso gefärbt und im Phasenkontrast (C) sowie unter UV-Licht (D) mikroskopiert.

Aus den SH 63-Protoplasten wurde eine Membranfraktion isoliert, die zusammen mit der 3800 x g-Fraktion aus SH 63-Zellen dem IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindungstest unterzogen wurde (n = 3) (E).

In einer Mikrosomenpräparation aus der oben verwendeten SH 63-Zellkultur und in der Membranfraktion aus SH 63-Protoplasten wurde die Bindung des ¹²⁵I-markierten 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugats des Hepta- β -glucosids (¹²⁵I-HG-APEA) an das plasmamembranständige β -Glucan-Bindprotein nachgewiesen (n = 3) (F).

Insgesamt ergaben die Untersuchungen zur Lokalisierung, dass sich die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in der Zellwand von Sojabohnenzellen befindet und sowohl in der Zellsuspensionskultur als auch in der Pflanze vorkommt, in letzterer hauptsächlich in der Wurzel.

2. Abhängigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung vom Entwicklungszustand des Organismus

Es wurde die Beobachtung gemacht, dass die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung stark vom Alter der Pflanze bzw. Zellkultur abhängt; je älter der Organismus, desto stärker die Bindungsaktivität. In Sojabohnenwurzeln nahm die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung im Lauf von drei Wochen um das Vierfache zu (Abb. 8A). Noch deutlicher war die Dynamik in der Zellkultur zu verzeichnen, die im Alter von sieben Tagen kaum spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung zeigte, eine Woche später jedoch eine um das 20fache gesteigerte Bindungsaktivität aufwies (Abb. 8B). Vermutlich nimmt die Anzahl der Bindestellen mit fortschreitender Entwicklung des Organismus zu.

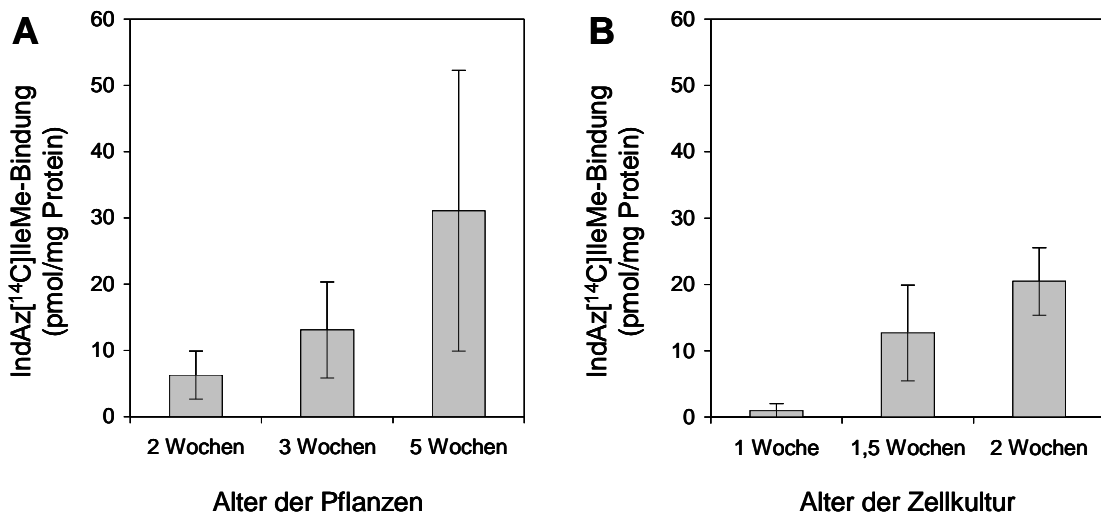


Abb. 8: Altersabhängigkeit der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung

Aus Sojabohnenpflanzen (A) und der Sojabohne-Zellkultur SH 63 (B) verschiedenen Alters wurde je eine 3800 x g-Fraktion präpariert und die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt (n = 3).

3. Vorkommen der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in anderen Pflanzenarten

Einige Pflanzen aus verschiedenen Familien wurden auf IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindungsaktivität getestet, um einen Hinweis auf die Verbreitung der Bindestelle im Pflanzenreich zu erhalten. Neben der Sojabohne zeigte auch *Medicago truncatula* als weiterer Vertreter der Leguminosen spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindungsaktivität, ebenso die Solanaceen *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* sowie *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der Brassicaceae (Tab. 2). Die Werte der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung sind nicht quantitativ miteinander vergleichbar, da die Bindungsaktivität in den getesteten Pflanzen möglicherweise wie in Sojabohne je nach Entwicklungszustand variiert, diese Abhängigkeit hier aber nicht untersucht wurde. Es soll lediglich festgehalten werden, dass sich das Vorkommen der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle nicht auf Sojabohne oder die Familie der Leguminosen beschränkt. Überraschend war die Beobachtung, dass in der *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellkultur keine IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung nachgewiesen werden konnte, weder in der späten stationären Wachstumsphase (Tab. 2), noch zu einem früheren Zeitpunkt.

Pflanzenmaterial bzw. Zellkulturen	Alter	IndAz[¹⁴ C]IleMe-Bindung (pmol/mg)	
<i>Glycine max</i> Wurzeln	3 Wochen	13,1 (± 7,2)	n = 8
<i>Glycine max</i> Zellkultur	stationär (1,5 Wochen)	11,9 (± 7,2)	n = 3
<i>Medicago truncatula</i> Wurzeln	6 Wochen	7,5	n = 1
<i>Nicotiana tabacum</i> Wurzeln	1-7 Monate	13,3 (± 3,5)	n = 3
<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 Zellkultur	stationär (2 Wochen)	0	n = 4
<i>Solanum tuberosum</i> Wurzeln	5 Wochen	3,1	n = 1
<i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzeln	4 Wochen	2,2	n = 1

Tab. 2: IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in verschiedenen Pflanzenarten

Aus dem angegebenen Pflanzen- bzw. Zellkulturmaterial wurde je eine 3800 x g-Fraktion isoliert und die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt.

4. Biochemische Charakterisierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Nach der erfolgreichen Lokalisierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle und der Feststellung ihrer offensichtlich weiten Verbreitung im Pflanzenreich sollten nun ihre biochemischen Eigenschaften untersucht werden, um nach Möglichkeit Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten und die Basis für eine eventuelle Isolierung der Bindestelle zu schaffen.

4.1. Grundlegende biochemische Charakteristika der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung war weitgehend unabhängig vom pH-Wert des Inkubationspuffers. Nur im alkalischen Bereich ab pH 8 wurde eine leichte Tendenz zu abnehmender Bindungsaktivität festgestellt (Abb. 9A).

Die Verdrängung des Radioliganden durch zunehmende IndEt-IleMe-Konzentrationen zeigte, dass die Bindung der 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugate spezifisch war (Abb. 9B). Es traten jedoch bei dieser Kompetitionsanalyse technische Schwierigkeiten auf: Die Liganden erwiesen sich als nur begrenzt wasserlöslich – die Grenze lag zwischen 1 und 1,5 mM – so dass die Konzentrationsabhängigkeit der Verdrängung nicht vollständig erfasst werden konnte (Abb. 9B). Folglich kann auch kein Wert für die halbmaximale Inhibition der Bindung (IC₅₀) angegeben werden. Der Kurvenverlauf deutet auf niedrige Affinität der Bindestelle hin und zeigt, dass der standardmäßig verwendete 1000fache IndEt-IleMe-Überschuss keine vollständige Verdrängung des Radioliganden bewirkte. Trotzdem wurde auch in allen folgenden Experimenten der Standardbindungstest mit 1000fachem IndEt-IleMe-Überschuss beibehalten, da selbst bei höchstmöglicher IndEt-IleMe-Konzentration keine vollständige Verdrängung erreicht werden konnte (Abb. 9B).

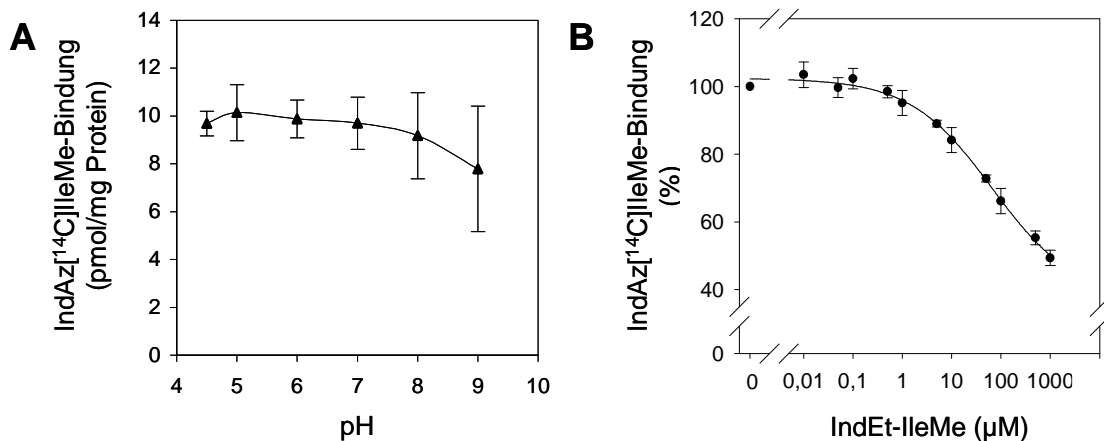


Abb. 9 Charakteristische Parameter der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung an die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln (I)

(A) pH-Abhängigkeit der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung (n = 4)

(B) Konzentrationsabhängigkeit der Konkurrenz der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung durch IndEt-IleMe (n = 3) bei einer Radioligandkonzentration von 0,1 μM. Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in Abwesenheit des Kompetitors wurde als 100 % definiert. Die Berechnung der sigmoiden Kurve erfolgte nach der Formel $y = y_0 + a/[1+(x/x_0)^b]$.

Entsprechend schwierig gestaltete sich die Untersuchung der Abhängigkeit der Bindung von der Radioligandkonzentration. Im Konzentrationsbereich bis 1,5 μM IndAz[^{14}C]IleMe mit 1000fachem IndEt-IleMe-Überschuss wurde keine Sättigung der spezifischen Bindung erreicht (Abb. 10A). Gleichzeitig wurde die hohe Kapazität der Bindestelle, d.h. die hohe Konzentration von Bindestellen im Gewebe, deutlich, die üblicherweise mit niedriger Affinität einhergeht (Burt, 1978). Bei einer IndAz[^{14}C]IleMe-Konzentration von 1,5 μM beispielsweise ergab die Verdrängung durch 1000fachen IndEt-IleMe-Überschuss eine spezifische Bindung von ca. 329 pmol/mg ($n = 2$) (Abb. 10A). Um die Radioligandkonzentration weiter erhöhen zu können, musste aus Löslichkeitsgründen die IndEt-IleMe-Konzentration auf 100fachen Überschuss herabgesetzt werden, wodurch nicht mehr $34 \pm 4 \%$ ($n = 3$), sondern nur noch $16 \pm 4 \%$ ($n = 3$) des insgesamt gebundenen IndAz[^{14}C]IleMe verdrängt wurden (Abb. 9B). Unter den veränderten Bedingungen konnte bis zu einer IndAz[^{14}C]IleMe-Konzentration von 15 μM gemessen werden (Abb. 10B). Bis 10 μM IndAz[^{14}C]IleMe stieg die spezifische Radioligandbindung proportional zur Radioligandkonzentration an. Erst zwischen 10 und 15 μM IndAz[^{14}C]IleMe schien sich die Sättigung anzudeuten, für deren deutlichen Nachweis jedoch Messpunkte jenseits der 15 μM -Grenze nötig wären. Die beste Übereinstimmung mit den Messpunkten besaß eine sigmoide Kurve, die mit der Formel $y = a/[1 + e^{-(x-x_0)/b}]$ berechnet wurde. Damit kündigte sich ein möglicherweise kooperatives Bindungsphänomen an. Es muss jedoch mit Nachdruck darauf hingewiesen werden, dass der Kurvenverlauf aufgrund der fehlenden Messpunkte im Sättigungsbereich nur eine eingeschränkte Beschreibung der Ligandbindung darstellt.

Durch die Analyse der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) sollten die Dissoziationskonstante (K_d) und die maximale Anzahl der Bindestellen (B_{max}) in der 3800 x g-Fraktion ermittelt werden. Beide Parameter können nur dann bestimmt werden, wenn die Bindung nicht kooperativ ist. Die vorliegenden Bindungswerte bei 1000fachem IndEt-IleMe-Überschuss (Abb. 10A) ergaben nach Scatchard eine Anordnung der Messpunkte, die einem Teil der Kurve entspricht, wie sie bei Kooperativität vorkommt (Abb. 10C) (Bisswanger, 1979). Die vermutlich zu erwartende abfallende zweite Hälfte der Kurve fehlt aus Mangel an Messwerten im Sättigungsbereich. Aus den Bindungswerten bei 100fachem IndEt-IleMe-Überschuss konnte keine weitere Information gewonnen werden, da auch hier keine Sättigung erreicht wurde (Abb. 10B) und zudem die Werte im Scatchard-Diagramm stark streuten, wahrscheinlich verursacht durch die eingeschränkte Verdrängung des Radioliganden (Munson und Rodbard, 1983). Das Scatchard-Diagramm (Abb. 10C) bestätigt die Abweichung von einer hyperbolen Bindungsfunktion (Abb. 10B).

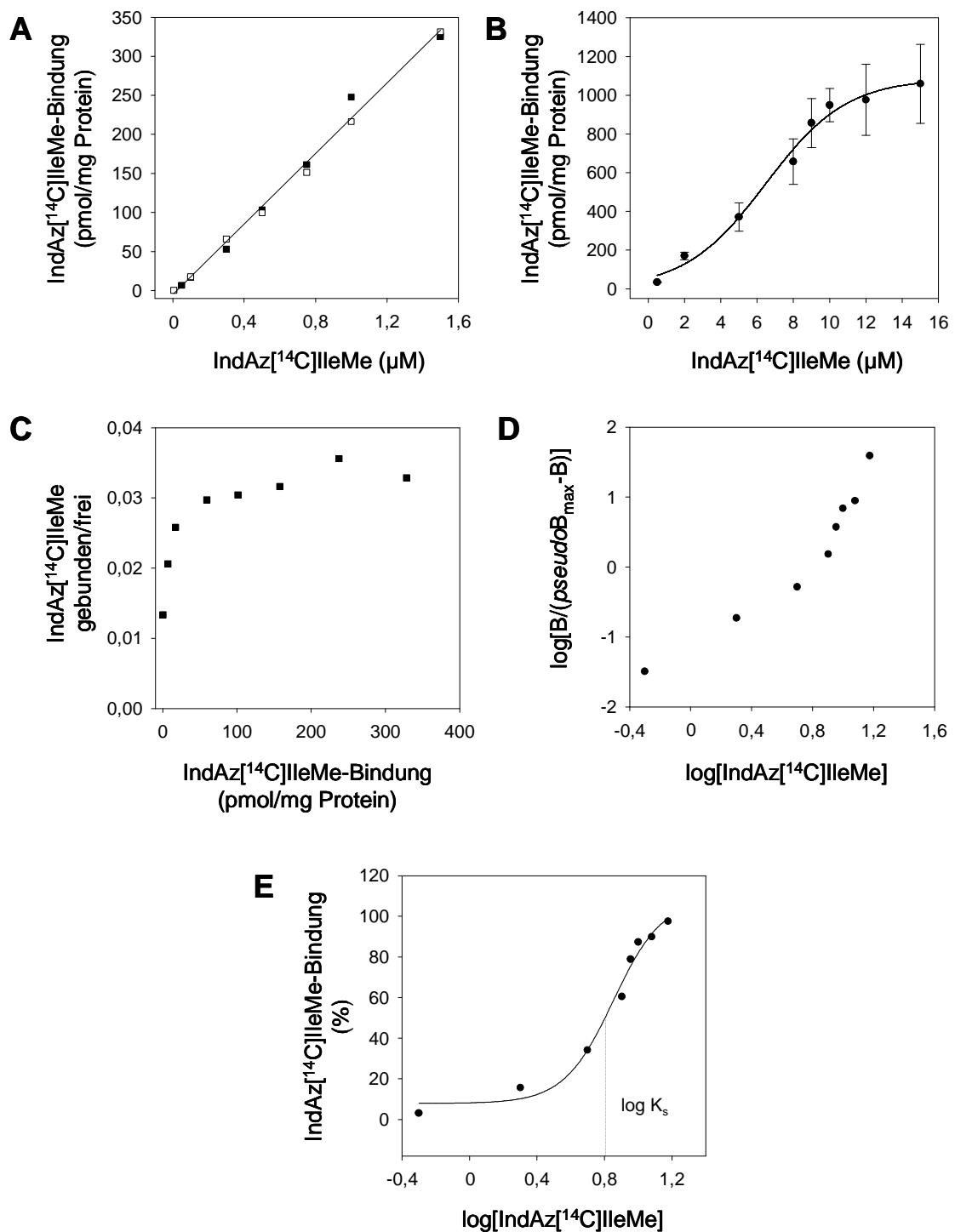


Abb. 10 Charakteristische Parameter der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung an die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln (II)

(A) Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bei 1000fachem IndEt-IleMe-Überschuss (n = 2).

(B) Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bei 100fachem IndEt-IleMe-Überschuss (n = 3). Berechnung der sigmoiden Kurve nach der Formel $y = a/[1+e^{-(x-x_0)/b}]$.

(C) Scatchard-Diagramm der Bindungswerte bei 1000fachem IndEt-IleMe-Überschuss (A).

(D) Hill-Diagramm der Bindungswerte bei 100fachem IndEt-IleMe-Überschuss (**B**) mit $pseudoB_{max} = y_{max} = 1086$ pmol/mg aus der Sättigungskurve (**B**) und $B =$ spezifisch gebundener Radioligand. Aus dem biphasischen Diagramm wurde für den Abschnitt unterhalb der halbmaximalen Bindungssättigung ein Hill-Koeffizient n_H von 1,2 berechnet. Für den oberen Abschnitt wurde kein n_H berechnet (Erläuterung: siehe Text)

(E) Halblogarithmische Darstellung der IndAz[^{14}C]IleMe-Konzentrationsabhängigkeit zur Ermittlung des apparenten K_s -Wertes von 6,3 μM mit 100 % Bindung = $pseudoB_{max} = y_{max} = 1086$ pmol/mg aus der Sättigungskurve (**B**). Die sigmoide Kurve wurde nach der Formel $y = y_0 + a/[1 + e^{-(x-x_0)/b}]$ berechnet.

Die Analyse von Bindungsdaten durch das Hill-Diagramm ermöglicht die Feststellung, ob Kooperativität vorliegt, sowie Aussagen über die maximal mögliche Anzahl von kooperierenden Bindestellen (Hill-Koeffizient n_H) und eventuell die Ermittlung der intrinsischen Dissoziationskonstanten K'_1 und K'_n bei n Bindestellen. Die Erstellung des Hill-Diagramms erfordert die Kenntnis der maximalen Anzahl der Bindestellen (B_{max}) in der 3800 x g-Fraktion. Da diese durch die Scatchard-Analyse nicht ermittelt werden konnte, wurde $y_{max} = 1086$ pmol/mg aus der Sättigungskurve (Abb. 10B) als B_{max} eingesetzt, obwohl B_{max} damit erheblich unterschätzt wird. Es ist außerdem zu beachten, dass dieser y_{max} -Wert bei unvollständiger Verdrängung des Radioliganden bestimmt wurde und daher, selbst wenn er im Sättigungsbereich läge, nicht die tatsächliche Anzahl der Bindestellen ausdrücken würde, sondern nur als maximaler Wert bezüglich des 100fachen IndEt-IleMe-Überschusses verstanden werden darf. Deshalb soll im folgenden von „ $pseudoB_{max}$ “ gesprochen werden.

Das Hill-Diagramm war biphasisch (Abb. 10D) mit zwei scheinbar linearen Abschnitten oberhalb bzw. unterhalb der halbmaximalen Sättigung der Bindung. Solche Diagramme sind mehrfach in der Literatur zu finden (Riggs, 1998; Michaely und Bennett, 1995); hier sollen aber keine zwei Geraden dargestellt werden, weil das nicht dem tatsächlichen Verhalten der Funktion entspricht. Bei n kooperierenden Bindestellen beginnt und endet das Hill-Diagramm immer mit einer Steigung von 1, die einer einzelnen Bindestelle entspricht, da bei der Besetzung der ersten Bindestelle noch keine Kooperativität besteht und ebenso bei Besetzung der letzten freien Bindestelle diese sich wie eine einzelne Bindestelle verhält (Cornish-Bowden und Koshland, 1975). Zwischen diesen Endabschnitten ist die Kurve je nach Bindungsphänomen unterschiedlich, oft mehrfach gekrümmt. Linear verläuft sie nur bei $n = 1$. Die maximale Steigung dieses mittleren Abschnitts wird üblicherweise als Hill-Koeffizient (n_H) angegeben, informiert über die maximal mögliche Anzahl von kooperierenden Bindestellen und beschreibt die Art der Kooperativität – positiv ($n_H > 1$), negativ ($n_H < 1$) oder nicht kooperativ ($n_H = 1$). In Abbildung 10D kann für den Abschnitt unterhalb

der halbmaximalen Bindungssättigung ein Hill-Koeffizient von 1,2 abgeleitet werden, so dass sich bei niedrigen Radioligandkonzentrationen die Kurve scheinbar, wie erwartet, an $n_H = 1$ annähert. Es liegen aber in diesem Bereich nicht genug Messwerte vor, um eine Abschätzung der Dissoziationskonstante der ersten Bindestelle (K'_1) vorzunehmen. Der Anstieg der Kurve im mittleren Bereich scheint für starke Kooperativität zu sprechen. Allerdings kann kein Hill-Koeffizient angegeben werden und damit keine Aussage über die maximal mögliche Anzahl der kooperierenden Bindestellen gemacht werden, weil im oberen Abschnitt keine Annäherung an $n_H = 1$ erfolgt. Dies ist ein deutliches Zeichen für einen systematischen Fehler (Cornish-Bowden und Koshland, 1975), dessen Ursache in diesem Fall leicht erklärbar ist. Die Unterschätzung von $pseudoB_{max}$ durch Verwendung des y_{max} -Wertes aus der Sättigungskurve (Abb. 10B) nämlich führt zu einer Erhöhung von $\log[B/(pseudoB_{max}-B)]$, die bei niedriger Radioligandkonzentration gering ist, sich aber bei höheren Radioligandkonzentrationen in einer immer stärkeren Abweichung der Werte niederschlägt, so dass es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Steigung kommt. Vor dem Hintergrund dieser Tatsache kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vermeintliche Kooperativität der IndAz[^{14}C]IleMe-Bindung durch die experimentellen Mängel (zu geringer Überschuss an nichtmarkiertem Ligand und fehlende Bindungswerte im Sättigungsbereich) vorgetäuscht wurde. Die begrenzte Löslichkeit der Liganden jedoch verhinderte weitere Ansätze, die zur Klärung der Bindungsverhältnisse beigetragen hätten.

Zuletzt wurde die Radioligandkonzentration ermittelt, bei der die Hälfte der Bindestellen besetzt ist (K_s), um eine Konstante zur Beschreibung der Affinität anzugeben. Wieder musste in Ermangelung von $pseudoB_{max}$ $y_{max} = 1086$ pmol/mg als 100 % Bindung eingesetzt werden, weshalb K_s nur als grobe Schätzung verstanden werden darf. Der tatsächliche K_s -Wert muss deutlich höher liegen. Abb. 10E zeigt das halblogarithmische Diagramm, aus dem ein apparenter K_s -Wert von 6,3 μ M berechnet wurde.

Es handelt sich daher bei der IndAz[^{14}C]IleMe-Bindestelle um eine niedrigaffine Bindestelle mit hoher Kapazität, wodurch das Vorliegen eines Rezeptors für Jasmonate sehr unwahrscheinlich wird. Es liegt möglicherweise ein kooperatives Bindungsphänomen vor, für das ein apparenter K_s -Wert von 6,3 μ M, nicht jedoch K_d , B_{max} , n_H und IC_{50} bestimmt werden konnten (Abb. 9 und 10). Die niedrige Affinität der Bindestelle ließ den Verdacht auf ein Enzym aufkommen. Gegen eine solche Annahme spricht die Unabhängigkeit der Bindung vom pH-Wert sowie das von K. Konstantinidis (unveröffentlicht) ermittelte Temperaturoptimum von 8°C. Im späteren Verlauf wird auf diese Frage näher eingegangen (Ergebnisse I Kapitel 4.3).

4.2. Wettbewerbsanalyse mit Jasmonaten und synthetischen Analoga

Um Hinweise auf eine mögliche physiologische Bedeutung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle zu erhalten, wurde eine Wettbewerbsanalyse mit verschiedenen natürlich vorkommenden Jasmonaten und synthetischen Jasmonat-Analoga durchgeführt, deren biologische Aktivität in Sojabohne bereits beschrieben ist (Fliegmann et al., 2003). Die drei wichtigsten, weil bestuntersuchten Jasmonate (\pm)-JA, (\pm)-MeJA und (\pm)-OPDA wurden als Wettbewerbern für die spezifische Bindung des Radioliganden eingesetzt (Abb. 11A). Während JA keine Verdrängung des IndAz[¹⁴C]IleMe im untersuchten Konzentrationsbereich bewirkte, konnte bei MeJA ab einer Konzentration von 50 μ M eine Abnahme der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung nachgewiesen werden. Ähnlich effektiv war OPDA als Wettbewerber. Keines der natürlich vorkommenden Jasmonate erreichte jedoch das Ausmaß der Inhibition durch IndEt-IleMe. Alle Verdrängungskurven blieben unvollendet und damit die Bestimmung der IC₅₀-Werte unmöglich, aber immerhin schien die Bindestelle eine gewisse Affinität zu MeJA und OPDA zu besitzen.

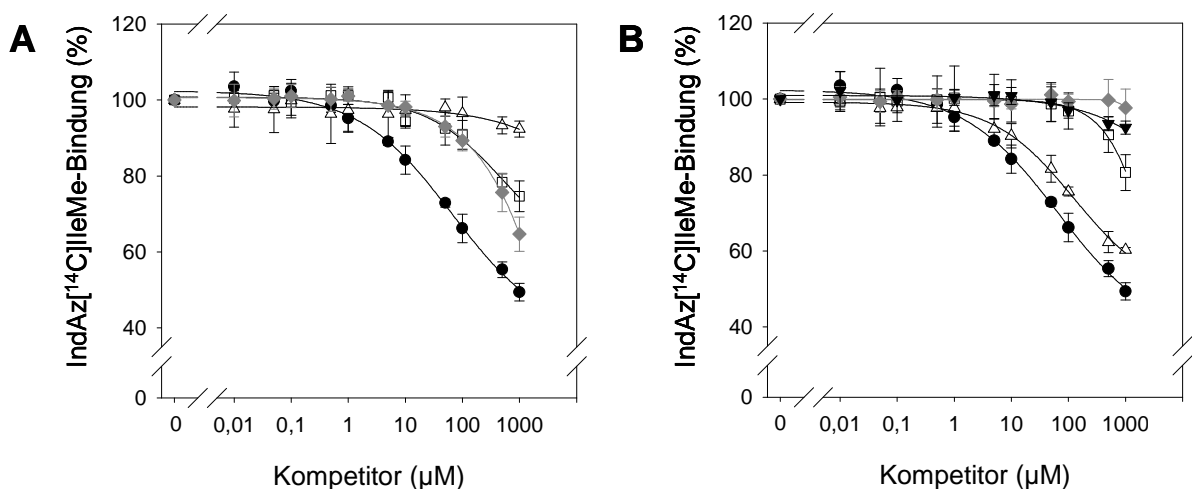


Abb. 11: Wettbewerb der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung durch Jasmonate und synthetische Analoga

(A) Vergleichend mit IndEt-IleMe (●) wurden die Jasmonate (\pm)-JA (Δ), (\pm)-MeJA (\square) und (\pm)-OPDA (\blacklozenge) als Wettbewerbern für die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung an die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln eingesetzt (je n = 3). Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Konzentration betrug 0,1 μ M. Die Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Wettbewerbers wurde als 100 % definiert. Für die Berechnung der sigmoiden Kurven wurden die Formeln $y = y_0 + a/[1+(x/x_0)^b]$ für IndEt-IleMe, MeJA und OPDA sowie $y = a/[1+e^{-(x-x_0)/b}]$ für JA verwendet.

(B) Analog zu (A) wurden die synthetischen Indanoyl-Isoleucin-Konjugate IndEt-IleMe (●), Ind-IleMe (Δ), Ind-Ile (\square) sowie die Bausteine der Konjugate, Ind (\blacklozenge) und IleMe (\blacktriangledown), als Wettbewerbern eingesetzt

(je $n = 3$). Für die Berechnung der sigmoiden Kurven wurden die Formeln $y = y_0 + a/[1+(x/x_0)^b]$ für IndEt-IleMe und Ind-IleMe sowie $y = a/[1+e^{-(x-x_0)/b}]$ für Ind-Ile, Ind und IleMe verwendet.

Verschiedene synthetische Indanoyl-Isoleucin-Konjugate (Abb. 3) wurden ebenfalls auf inhibitorische Wirkung untersucht (Abb. 11B), um strukturelle Merkmale zu identifizieren, die für die spezifische Bindung notwendig sind. Das Fehlen des C6-Substituenten im 1-Oxoindanoyl-isoleucinmethylester (Ind-IleMe) beeinträchtigte die Bindungsaktivität nur wenig; Ind-IleMe erwies sich nach IndEt-IleMe als bester Kompetitor, wobei auch hier, wie bei allen Substanzen, kein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Bemerkenswert ist die mangelhafte Kompetition durch 1-Oxoindanoyl-isoleucin (Ind-Ile), die sich erst ab einer Konzentration von 500 μ M andeutete. Damit lag bei den Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten analog zu JA/MeJA ein Paar vor, dessen freie Säure Ind-Ile einen schlechten Kompetitor darstellte im Gegensatz zum Methylester Ind-IleMe. Offensichtlich werden von der IndAz[14 C]IleMe-Bindestelle Methylester den entsprechenden freien Säuren als Liganden vorgezogen. Zuletzt wurden die beiden Bausteine der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate einzeln überprüft, um sicherzustellen, dass die Gesamtstruktur des Konjugats und nicht etwa nur ein Teil davon für die spezifische Bindung verantwortlich ist. Weder 1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind) noch der Isoleucinmethylester (IleMe) führten zur Verdrängung des IndAz[14 C]IleMe von der Bindestelle (Abb. 11B).

Die Kompetitionsanalyse zeigte, dass die Jasmonate MeJA und OPDA zwar mit dem Radioligand in Konkurrenz treten konnten, jedoch nur in begrenztem Ausmaß, weshalb die physiologische Relevanz dieser Bindestelle für die untersuchten Jasmonate zweifelhaft erscheint. Es waren aber definierte strukturelle Bedingungen, insbesondere das Vorliegen eines Methylesters, für die Bindung förderlich. Dieses Ergebnis führte zu der Überlegung zurück, ob es sich bei der IndAz[14 C]IleMe-Bindestelle möglicherweise um ein Enzym handeln könnte, etwa eine Esterase. In diesem Fall sollten entsprechende Reaktionsprodukte nachweisbar sein.

4.3. Stabilität von IndAz[14 C]IleMe in Gegenwart der 3800 x g-Fraktion

Die radioaktive Markierung der Aminosäure von IndAz[14 C]IleMe ermöglichte die Überprüfung der eventuellen Umsetzung des Radioliganden beim Kontakt mit der spezifischen Bindestelle. Zu diesem Zweck wurde nach 2,5-stündiger Inkubation von IndAz[14 C]IleMe mit der 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln der Inkubationspuffer mit Chloroform und

das Zellwandmaterial mit MeOH extrahiert. Anschließend wurden die eingeeengten Extrakte einer Dünnschichtchromatographie unterzogen (Abb. 12). Als Referenzsubstanzen wurden IndAz[¹⁴C]IleMe bzw. der entsprechende nichtmarkierte Ligand IndEt-IleMe verwendet, die aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit identisches Laufverhalten ($R_f = 0,88$) zeigten, ferner das mutmaßliche Produkt IndEt-Ile ($R_f = 0,57$), das beim Vorliegen einer Esterase zu erwarten wäre, sowie L-Isoleucinmethylester ($R_f = 0,75$), um die ebenfalls denkbare Abspaltung der Aminosäure zu überprüfen. IndEt-Ile war durch alkalische Hydrolyse von IndEt-IleMe hergestellt worden. Der Nachweis der radioaktiven Substanz erfolgte durch Autoradiographie, alle nichtmarkierten Substanzen wurden auf der fluoreszierenden Kieselgelplatte durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht, mit Ausnahme von IleMe, der mit Ninhydrin nachgewiesen werden musste.

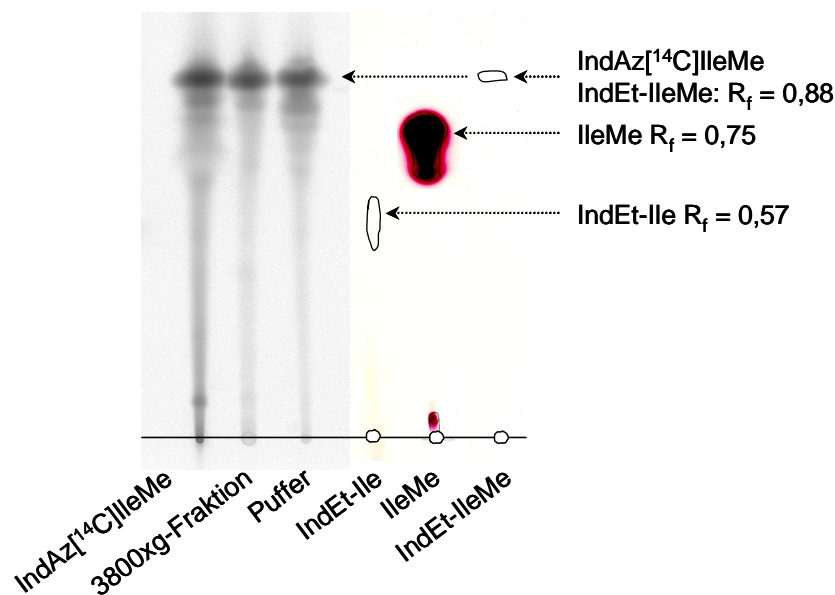


Abb. 12: Dünnschichtchromatographie von Extrakten der 3800 x g-Fraktion und des Bindungspuffers nach Inkubation mit IndAz[¹⁴C]IleMe

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln wurde mit 15 μ M IndAz[¹⁴C]IleMe in Bindungspuffer inkubiert. Nach 2,5 Stunden wurde die 3800 x g-Fraktion mit MeOH und der Überstand mit Chloroform extrahiert, die Extrakte eingeeengt und auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄-Platte mit Chloroform/MeOH 4/1 als Laufmittel chromatographiert. Als Referenzsubstanzen dienten IndAz[¹⁴C]IleMe, IndEt-IleMe, IndEt-Ile und IleMe. Die Radioaktivität wurde durch Autoradiographie nachgewiesen, IleMe durch Reaktion mit Ninhydrin und alle übrigen Substanzen durch UV-Bestrahlung der Kieselgelplatte. Die gezeigte Chromatographie stellt eines von zwei übereinstimmenden Ergebnissen dar.

Weder IndEt-Ile noch IleMe konnten in den Extrakten der 3800 x g-Fraktion oder des Inkubationspuffers nachgewiesen werden (Abb. 12). Offensichtlich blieb IndAz[¹⁴C]IleMe für die Dauer des Bindungstests intakt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle nicht um ein Enzym handelt, das den Liganden als Substrat verwendet.

Da sich nun die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle als niedrigaffin mit hoher Kapazität erwiesen hatte, scheinbar kein Enzym für die Umsetzung des Liganden darstellt und zellwandständig ist, musste die Frage geklärt werden, ob es sich überhaupt um ein Protein handelt. Aufgrund der Lokalisierung in der Zellwand wäre auch eine Kohlenhydratstruktur denkbar.

4.4. Untersuchung der chemischen Natur der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle

Die Zellwand ist ein stark vernetztes Gebilde aus drei interagierenden Matrices (Gibeaut und Carpita, 1994): Cellulose-Mikrofibrillen bestehen aus Cellulosemolekülen, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Hemicellulosen umgeben die Mikrofibrillen und verbinden sie nichtkovalent miteinander. Hemicellulosen sind verzweigte Polysaccharide aus neutralen Zuckern; in Dicotyledonen ist Xyloglucan der Hauptbestandteil. Das Cellulose-Hemicellulose-Gerüst ist in eine Pectinmatrix eingebettet, ein Gemisch aus verzweigten, sauren Polysacchariden, die untereinander durch Ionenbindungen verknüpft sind und deren wesentliche Komponente die Polygalacturonsäure ist. Außerdem enthält die Zellwand Proteine, meist Glykoproteine, die knapp 10 % der Zellwandmasse ausmachen und durch Van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkung, Ionenbindung oder kovalent an die Polysaccharide gebunden sind (Jamet et al., 2006). Die Zellwände verholzter Pflanzenteile enthalten außerdem Einlagerungen von Lignin, einem Mischpolymerisat aus Phenylpropanen, vor allem Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol sowie den entsprechenden Säuren.

Es sollte untersucht werden, welche dieser Zellwandkomponenten für die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung verantwortlich ist. Hierzu wurden durch verschiedene physikalische, chemische und enzymatische Behandlungen einzelne oder mehrere dieser Bestandteile der 3800 x g-Fraktion angegriffen, um die Auswirkung der strukturmodifizierenden Behandlung auf die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung zu ermitteln.

4.4.1. Prüfung auf Proteinartigkeit der Bindestelle

Die Zerstörung bzw. Entfernung von Proteinen ist auf verschiedene Weise möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Verfahren parallel angewandt, um festzustellen, ob die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle proteinartiger Natur ist.

Zunächst wurden die Proteine der 3800 x g-Fraktion durch 15-minütiges Kochen denaturiert. Dies hatte die Reduktion der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung um $51 \pm 9 \%$ ($n = 3$) gegenüber der unbehandelten 3800 x g-Fraktion zur Folge (Abb. 13A), so dass entweder ein teilweise hitzestabiles Protein oder eine teilweise hitzelabile nichtproteinartige Struktur vorliegen musste.

Üblicherweise werden hochkonzentrierte Salzlösungen zur Extraktion ionisch gebundener Zellwandproteine eingesetzt (Robertson et al., 1997). Waschungen der 3800 x g-Fraktion mit verschiedenen Salzlösungen entfernten bis zu 90 % der Proteine, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Bindungsaktivität. Die Extraktion mit 4 % SDS, einem starken Detergens, das beispielsweise zur Denaturierung von Proteinen bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet wird (Laemmli, 1970), führte ebenfalls zur Solubilisierung von ca. 90 % der in der 3800 x g-Fraktion enthaltenen Proteine, die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung wurde dadurch aber nicht reduziert. Im Gegenteil bewirkte die SDS-Extraktion eine leichte Zunahme der Bindungsaktivität um $20 \pm 15 \%$ ($n = 4$) (Abb. 13A), die eventuell durch Freilegung vormals unzugänglicher Bindestellen erklärt werden könnte. Folglich ist die Bindestelle entweder nichtproteinartiger Natur, oder es liegt ein fest verankertes, eventuell kovalent gebundenes Protein vor.

Der Datensatz wurde um Experimente mit Proteinase K erweitert, die in Konzentrationen von 0,1 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt wurde, jedoch keine Verminderung der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bewirkte (Abb. 13B). In einem Kontrollexperiment wurde die 3800 x g-Fraktion vor dem Zusatz des Enzyms mit 50 mM DTT behandelt, um Disulfidbrücken zu reduzieren, die einem mutmaßlichen Bindeprotein gegebenenfalls Resistenz gegen Proteinase K verleihen könnten (Ishizu et al., 2001). Weder die DTT-Behandlung allein noch der anschließende Proteinabbau durch Proteinase K führte zu einer Abnahme der Bindungsaktivität (Abb. 13C). Es ist daher anzunehmen, dass etwa vorhandene inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken weder für das Bindungsereignis selbst noch für die Integration der Bindestelle in der Zellwand noch für die Proteinase K-Resistenz verantwortlich sind. In Gegenwart des hitzedenaturierten Enzyms war ein partieller Verlust der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung zu verzeichnen, der auch bei anderen Enzymen beobachtet wurde, aufgrund der fehlenden Enzymwirkung aber ohne Bedeutung für die Interpretation des Ergebnisses ist. Die Ursache für dieses Phänomen blieb ungeklärt.

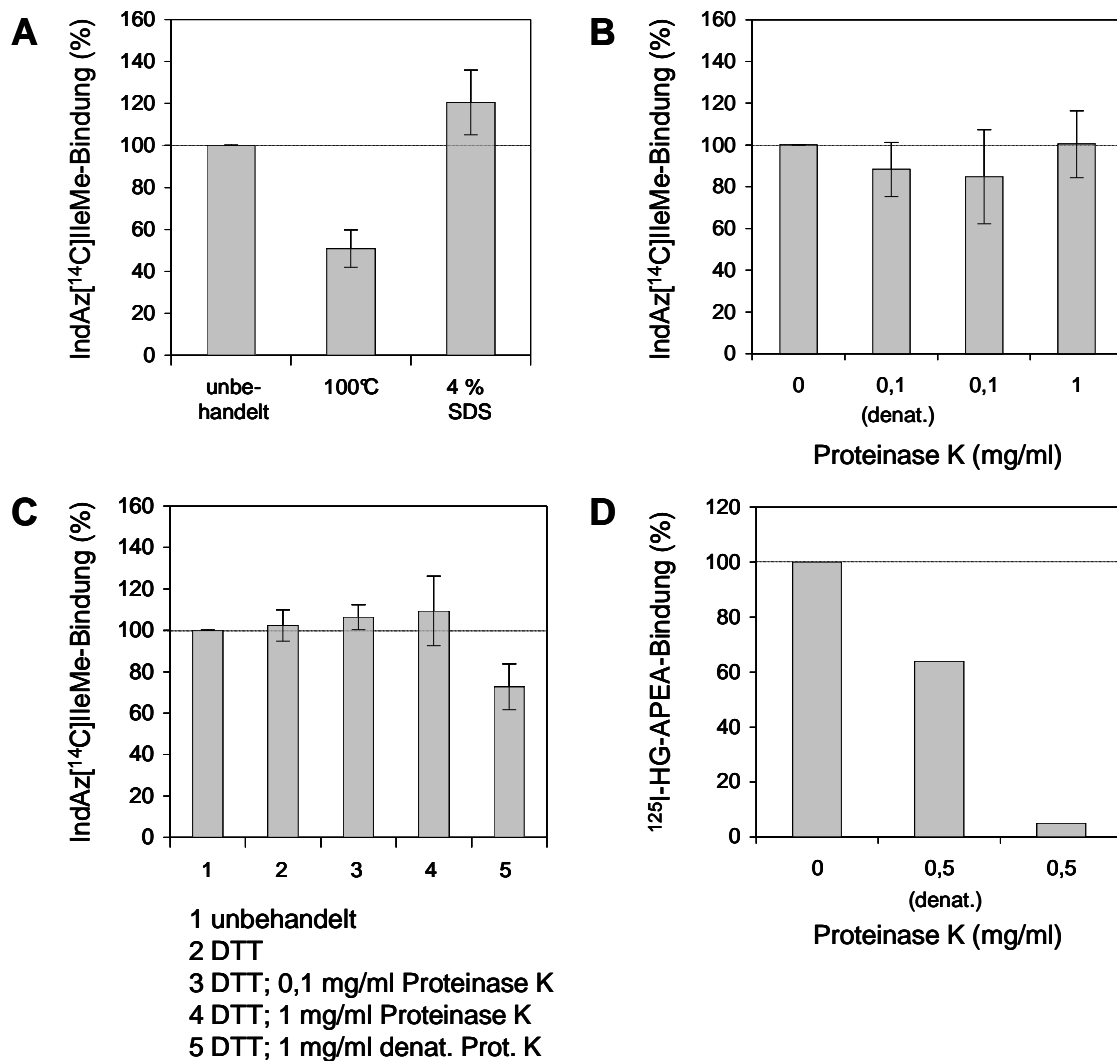


Abb. 13: Einfluss von proteinverändernden Behandlungen der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln wurde den unten aufgeführten Behandlungen unterzogen und im Anschluss die spezifische IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt, die jeweils relativ zur spezifischen IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung der unbehandelten 3800 x g-Fraktion (100 %) angegeben ist.

(A) Hitzebehandlung bei 100°C, 15 min (n = 3) bzw. Extraktion mit 4 % SDS, 1 h, RT (n = 4).

(B) Proteinabbau durch Proteinase K, 1 h, 37°C (n = 5). Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt.

(C) Vorbehandlung mit 50 mM DTT, 1 h, RT, dann Proteinabbau durch Proteinase K, 1 h, 37°C (n = 3). Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt.

(D) Mikrosomen aus Sojabohnenwurzeln wurden 1 h bei 37°C mit 0,5 mg/ml Proteinase K behandelt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt. Anschließend wurde die spezifische Bindung des ¹²⁵I-markierten 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugats des Hepta-β-glucosids (¹²⁵I-HG-APEA) ermittelt, die relativ zur Bindung an unbehandelte Mikrosomen (100 %) angegeben ist.

Um von der unverminderten IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in Gegenwart des Enzyms auf Resistenz der Bindestelle gegenüber Proteinase K schließen zu können, war eine Kontrolle erforderlich, nämlich der Nachweis der Funktionsfähigkeit des Enzyms. Dafür wurde erneut das β -Glucan-Bindeprotein in der Plasmamembran von Sojabohnenzellen herangezogen. Die spezifische Bindung des ¹²⁵I-markierten 2-(4-Aminophenyl)-ethylamin-Konjugats des Hepta- β -glucosids aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* an Mikrosomen aus Sojabohnenwurzeln wurde durch Vorbehandlung der Membranen mit 0,5 mg/ml Proteinase K beinahe vollständig unterbunden (Abb. 13D), wodurch bestätigt wurde, dass die Protease-Behandlung den effizienten Abbau von Proteinen zur Folge hatte. Obwohl in Gegenwart des hitzedenaturierten Enzyms auch ein partieller Verlust der Bindungsaktivität um 36 % zu verzeichnen war, wurde die Auswirkung der Enzymaktivität durch Reduktion der ¹²⁵I-HG-APEA-Bindung um weitere 59 % sehr deutlich.

Diese Kollektion von Daten legt auf den ersten Blick eine nichtproteinartige Natur der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle nahe. Es muss jedoch beachtet werden, dass aufgrund der Lokalisierung der Bindestelle in der Zellwand ebenso ein stabil integriertes, gut geschütztes Protein vorliegen könnte (Jamet et al., 2006), das gegenüber SDS, DTT und Proteinase K unempfindlich ist und nur durch Erhitzen teilweise denaturiert werden kann.

4.4.2. Prüfung auf Kohlenhydratartigkeit der Bindestelle

In Anlehnung an übliche Methoden zur Fraktionierung der Zellwand wurde die 3800 x g-Fraktion zunächst mit verschiedenen Extraktionsmitteln behandelt, um festzustellen, ob die offensichtlich sehr widerstandsfähige IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle ihre Aktivität durch chemische Behandlung der Zellwand verliert. Die Extraktion der 3800 x g-Fraktion mit einer Lösung aus 50 mM Na₂CO₃ und 20 mM NaBH₄, die vor allem Pectin-Polysaccharide und Pectin-assoziierte Glykoproteine entfernt (Ryden und Selvendran, 1990), führte zu einem Verlust der Bindungsaktivität um 36 ± 18 % (n = 4) (Abb. 14A). Durch Inkubation mit 4 M KOH, 4 % H₃BO₃ und 20 mM NaBH₄ werden hauptsächlich Hemicellulosen und Hyp-reiche Glykoproteine extrahiert (Ryden und Selvendran, 1990). Diese Behandlung führte zum vollständigen Verlust der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung an das Zellwandmaterial (Abb. 14A). In beiden Extrakten konnte auch nach Neutralisierung und Dialyse keine IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung nachgewiesen werden, so dass nicht feststellbar war, ob die Bindestelle extrahiert wurde oder nicht. Da sich bei Versuchen zur Photoaffinitätsmarkierung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle herausgestellt hatte, dass bei Belichtung mit UV-Licht

keine kovalente Verknüpfung des Radioliganden mit der Bindestelle erfolgte, konnte auch auf diesem Weg nicht gezeigt werden, ob die Extraktion erfolgreich war oder lediglich Denaturierung der Bindestelle in der Zellwand stattgefunden hatte.

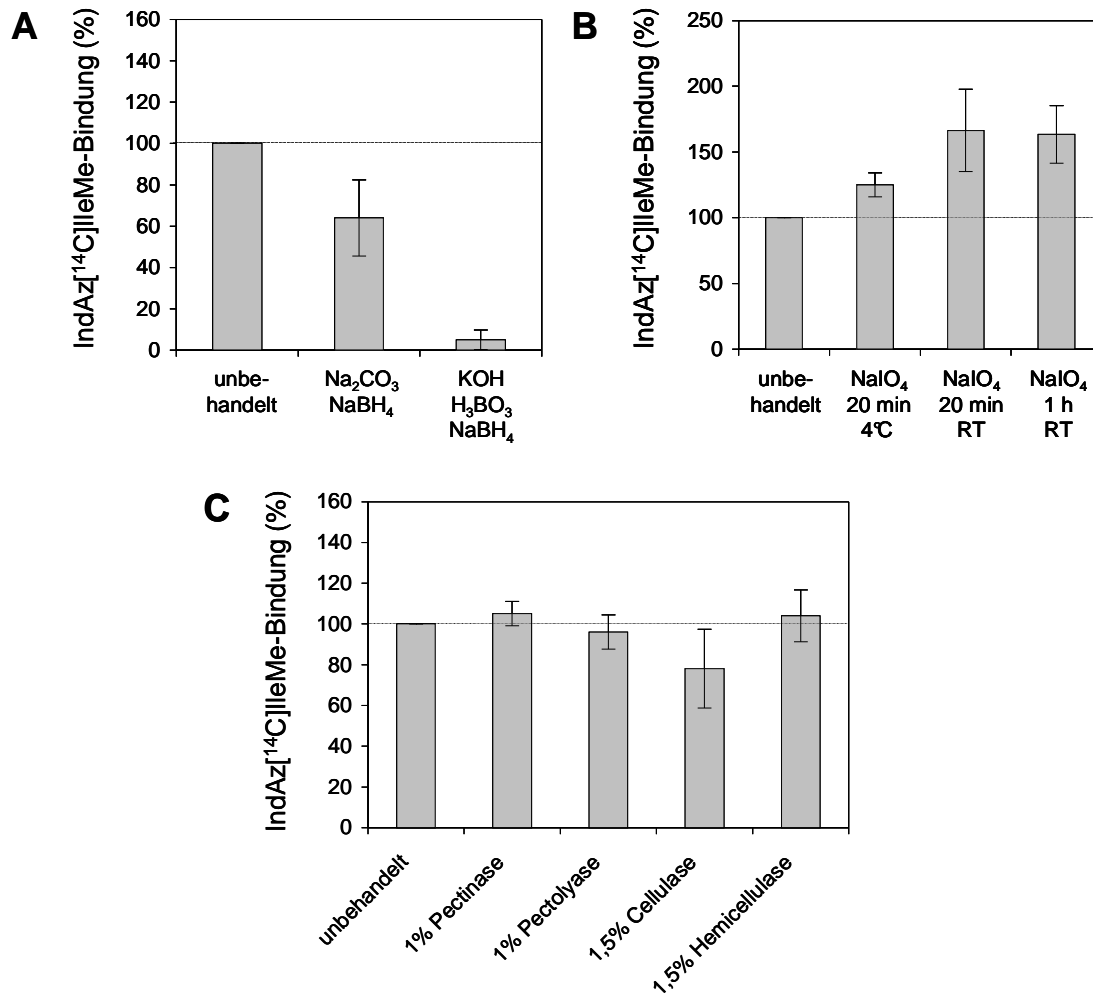


Abb. 14: Einfluss von kohlenhydratverändernden Behandlungen der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnenwurzeln wurde den unten aufgeführten Behandlungen unterzogen und im Anschluss die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt, die jeweils relativ zur spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung der unbehandelten 3800 x g-Fraktion (100 %) angegeben ist.

(A) Extraktion mit 50 mM Na₂CO₃ und 20 mM NaBH₄ bzw. mit 4 M KOH, 4 % H₃BO₃ und 20 mM NaBH₄, beide bei 8°C ÜN (je n = 3).

(B) Oxidation mit 20 mM Natriumperodat; die Temperaturen und Inkubationszeiten sind in der Abbildung angegeben (n = 3).

(C) Kohlenhydratabbau durch 1 % (w/v) Pectinase, 1 % (w/v) Pectolyase, 1,5 % (w/v) Hemicellulase oder 1,5 % (w/v) Cellulase Onozuka RS, 3h Inkubation bei 37°C (je n = 3).

Die Prüfung auf Kohlenhydratartigkeit erfolgte nach verschiedenen Methoden. Kohlenhydrate mit benachbarten OH-Gruppen sind empfindlich gegenüber Natriumperiodat, das durch Oxidation an diesen Stellen zur Spaltung der C-C-Bindung führt (McManus, 1956). Die 3800 x g-Fraktion wurde mit 20 mM NaIO₄ bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange inkubiert (Abb. 14B), um die Beteiligung solcher Kohlenhydrate an der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung festzustellen. Abb. 14B zeigt, dass mit zunehmender Intensität der NaIO₄-Behandlung die Bindungsaktivität nicht abnahm, sondern im Gegenteil eine Steigerung der Bindungsaktivität um 66 ± 31 % (n = 3) beobachtet wurde, die durch Freilegung zusätzlicher Bindestellen erklärt werden könnte. Offensichtlich gehören Kohlenhydrate mit benachbarten OH-Gruppen nicht zur strukturellen Ausstattung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle.

Eine enzymatische Analyse sollte über die Rolle der verschiedenen Zellwand-Polysaccharide Aufschluss geben (Abb. 14C). Weder Pectinase noch Pectolyase, beide in einer Endkonzentration von 1 %, noch 1,5 % Hemicellulase bewirkten einen Rückgang der Bindungsaktivität. Allein der Abbau von Cellulose durch 1,5 % Cellulase war mit einem leichten Verlust der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung um 22 ± 19 % (n = 3) verbunden. Daraufhin wurde in einem Kontrollexperiment die Bindung von IndAz[¹⁴C]IleMe an mikrokristalline Cellulose untersucht. Da keine spezifische Bindung an Cellulose nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass der geringfügige Effekt der Behandlung mit Cellulase (Abb. 14C) nicht als Zerstörung einer celluloseartigen Bindestelle zu interpretieren ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die kohlenhydratartige Natur der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle ausgeschlossen werden.

4.4.3. Prüfung auf Lipidartigkeit der Bindestelle

Der Vollständigkeit wegen wurde auch eine Lipase-Behandlung der 3800 x g-Fraktion durchgeführt, um den unwahrscheinlichen Fall auszuschließen, dass die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung von einem Lipid verursacht wird.

Die Behandlung mit Lipase wirkte sich positiv auf die Bindungsaktivität aus. Nach der Vorinkubation der 3800 x g-Fraktion mit 9 U Lipase war die spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung um 29 ± 12 % (n = 3) höher als in der unbehandelten Kontrolle, bei 18 U Lipase um 37 ± 7 % (n = 3) (Abb. 15). Offensichtlich ist die Bindestelle nicht lipidartiger Natur.

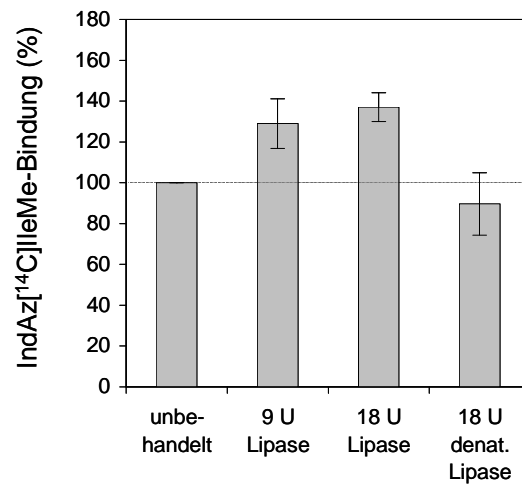


Abb. 15: Einfluss von Lipase-Behandlung der 3800 x g-Fraktion auf die spezifische IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung

Die 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln wurde mit 9 U bzw. 18 U Lipase aus Schweinepankreas 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt. Anschließend wurde die spezifische IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung bestimmt, die jeweils relativ zur spezifischen IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung der unbehandelten 3800 x g-Fraktion (100 %) angegeben ist (n = 3).

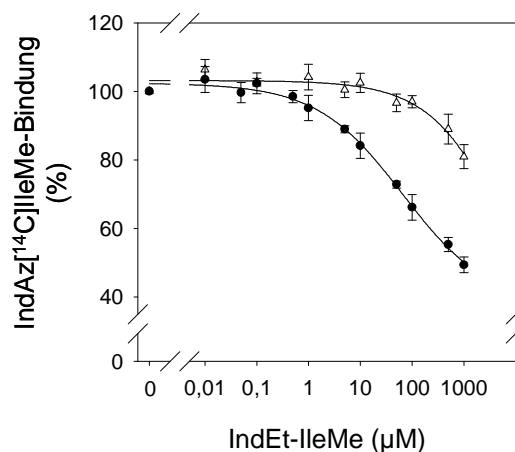


Abb. 16: Bestimmung der IndAz¹⁴C]IleMe-Bindung an Björkman-Lignin aus *Fagus silvatica*

Pro Ansatz wurden 320 μg Björkman-Lignin (Δ) mit 0,1 μM IndAz¹⁴C]IleMe und ansteigenden IndEt-IleMe-Konzentrationen versetzt (n = 3). Die Bindung des Radioliganden von $9,33 \pm 0,86$ pmol/mg Lignin in Abwesenheit des Kompetitors wurde als 100 % definiert. Für die Berechnung der Kurve wurde die Formel $y = a/[1+(x/x_0)^b]$ verwendet. Zum Vergleich ist die entsprechende Konzentrationsabhängigkeit der Konkurrenz an der 3800 x g-Fraktion aus Sojabohnewurzeln (●) aus Abb. 9B gezeigt.

4.4.4. Prüfung auf Ligninartigkeit der Bindestelle

Nachdem sich die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle gegenüber den meisten Behandlungen als auffallend resistent erwiesen hatte und in mehreren Fällen sogar eine deutliche Zunahme der Bindungsaktivität zu beobachten war, wurde zuletzt Lignin als ebenfalls extrem stabile Komponente der Zellwand als mögliche bindende Struktur ins Auge gefasst. Die Überprüfung erfolgte an einem Björkman-Lignin-Präparat aus Buchenholz (*Fagus silvatica*) (Lüdemann und Nimz, 1974).

IndAz[¹⁴C]IleMe war in der Lage, an Lignin zu binden. In Abwesenheit des nichtmarkierten Liganden wurde bei 0,1 µM Radioligand eine Bindung von $9,33 \pm 0,86$ pmol/mg Lignin ($n = 3$) beobachtet (Abb. 16). Es zeigte sich aber, dass diese Bindung nicht spezifisch war. Im Gegensatz zur bereits besprochenen Verdrängung des Radioliganden von der Bindestelle in der 3800 x g-Fraktion konnte an Lignin bis zu einem 1000fachen IndEt-IleMe-Überschuss keine Kompetition festgestellt werden. Bei 10000fachem IndEt-IleMe-Überschuss wurden nur 19 ± 4 % ($n = 3$) des gebundenen IndAz[¹⁴C]IleMe verdrängt, während die Radioligandbindung in der 3800 x g-Fraktion um 51 ± 2 % reduziert wurde. Da auch keine Abhängigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung von der eingesetzten Ligninmenge festgestellt werden konnte, wird angenommen, dass die Bindestelle nicht ligninartiger Natur ist.

5. Zwischenbewertung der Ergebnisse

Die Gesamtheit der Daten zeigt, dass die Identifizierung der niedrigaffinen spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in Sojabohnenwurzeln aufgrund der Lokalisierung in der Zellwand äußerst problematisch ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde keine Möglichkeit für eine funktionelle Extraktion der Bindestelle gefunden, um sie dann durch UV-Bestrahlung mit dem Radioligand zu markieren. Zudem hatten vorläufige Tests gezeigt, dass sich IndAz[¹⁴C]IleMe nicht kovalent mit der Bindestelle verknüpfen ließ. Des Weiteren würde die unvollständige Verdrängung des Radioliganden von maximal 51 ± 2 % (Abb. 9B) die Photoaffinitätsmarkierung als Mittel zur Erkennung der Bindestelle erschweren. Daher blieb die Azido-Funktion des IndAz[¹⁴C]IleMe ungenutzt. Auch über die chemische Natur der Bindestelle können keine verlässlichen Aussagen gemacht werden. Die beschriebenen Untersuchungen erlauben lediglich eine Eingrenzung der Möglichkeiten, nämlich den recht wahrscheinlichen Ausschluss von Cellulose, Pectin, Hemicellulosen, Lipiden, Lignin und

leicht gebundenen Zellwandproteinen. Es bleibt der Verdacht auf ein stabil integriertes (Glyko)protein.

Da in der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle ursprünglich ein eventueller Jasmonat-rezeptor vermutet worden war, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit intrazelluläre Calcium-konzentrationsänderungen untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Rolle von Ca²⁺ als „second messenger“ bei der Übertragung von Jasmonatsignalen zu erhalten. Diese Analysen wurden an transformierten *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen durchgeführt. Eine Kurzcharakteristik der spezifischen IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung an diese BY-2-Zellen sollte dann den Vergleich beider Datensätze miteinander ermöglichen. Wie bereits erwähnt, konnte aber keine spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in BY-2-Zellen nachgewiesen werden (Tab. 2). Ebenso erfolglos blieben Messungen von Änderungen der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Aequorin-exprimierenden Sojabohnenzellen, die offensichtlich ihre Responsivität verloren hatten, da sie weder auf Jasmonate noch auf altbewährte Reize (Mithöfer et al., 1999) reagierten. Daher müssen das Bindungsphänomen in Sojabohne und die Ca²⁺-Konzentrationsänderungen in Tabak getrennt voneinander betrachtet werden, obwohl beide durch Jasmonate und synthetische Indanoyl-Isoleucin-Konjugate verursacht werden.

II. Jasmonatinduzierte Calciumantworten in *Nicotiana tabacum* L. BY-2-Zellen

Transformierte *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen, die Apoaequorin konstitutiv im Cytosol (BY-2_{cyt}) bzw. Zellkern (BY-2_{nuc}) exprimieren (Pauly et al., 2001), wurden verwendet, um Änderungen der Calciumkonzentrationen in diesen beiden Kompartimenten zu messen.

1. Induktion von spezifischen Calciumsignaturen durch verschiedene Oxylipine

Von primärem Interesse war die Frage, ob natürlich vorkommende Oxylipine in der Lage sind, spezifische Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) und/oder Zellkern ($[Ca^{2+}]_{nuc}$) zu induzieren. Aus der Familie der Jasmonate wurden (–)-JA, (±)-MeJA und deren biosynthetische Vorstufe (±)-OPDA ausgewählt. Darüber hinaus wurde repräsentativ für die Gruppe der Phytoprostane Phytoprostan B₁ Typ II auf calciuminduzierende Aktivität getestet.

1.1. Jasmonsäure

Die Biolumineszenz in BY-2_{cyt}-Zellen zeigte im Ruhezustand einen cytosolischen Calciumspiegel von ca. 0,1 μ M an. Die Behandlung der Zellen mit JA führte nach einer Anlaufphase von wenigen Sekunden zu einem schnellen, transienten und dosisabhängigen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg (Abb. 17A). Nach etwa 30 sec wurde die maximale Calciumkonzentration erreicht, wobei mit abnehmender JA-Konzentration eine Verzögerung der Antwort beobachtet wurde. Nach 4 min war $[Ca^{2+}]_{cyt}$ zur Basishöhe zurückgekehrt. Die eingesetzten JA-Konzentrationen scheinen für Phytohormone ziemlich hoch zu sein; eine Konzentration von mindestens 0,3 mM war nötig, um eine messbare Antwort zu erhalten. Aus drei unabhängigen Experimenten wurde eine nicht ganz in den Sättigungsbereich reichende Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb. 17C), der eine maximale cytosolische Calciumkonzentration von $0,7 \pm 0,1 \mu$ M ($n = 3$) bei 2 mM JA und eine apparente halbmaximale Effektorkonzentration (EC_{50}) von $1,13 \pm 0,21$ mM JA ($n = 3$) zu entnehmen sind.

Neben dem cytosolischen $[Ca^{2+}]$ -Anstieg hatte JA auch eine Auswirkung auf $[Ca^{2+}]_{nuc}$. In BY-2_{nuc}-Zellen wurde bei Behandlung mit JA nach einer Anlaufphase von mehreren

Minuten ein langsamer, transienter und dosisabhängiger Anstieg der Calciumkonzentration im Zellkern beobachtet (Abb. 17B). Deutlicher als im Cytosol, wo es sich nur um Sekunden handelte, war im Zellkern die Verzögerung der Calciumantwort bei abnehmender JA-Konzentration zu sehen. Frühestens nach einer Stunde, bei niedrigen JA-Konzentrationen noch viel später, war $[Ca^{2+}]_{nuc}$ zum Ruhespiegel von 0,1 bis 0,2 μM zurückgekehrt.

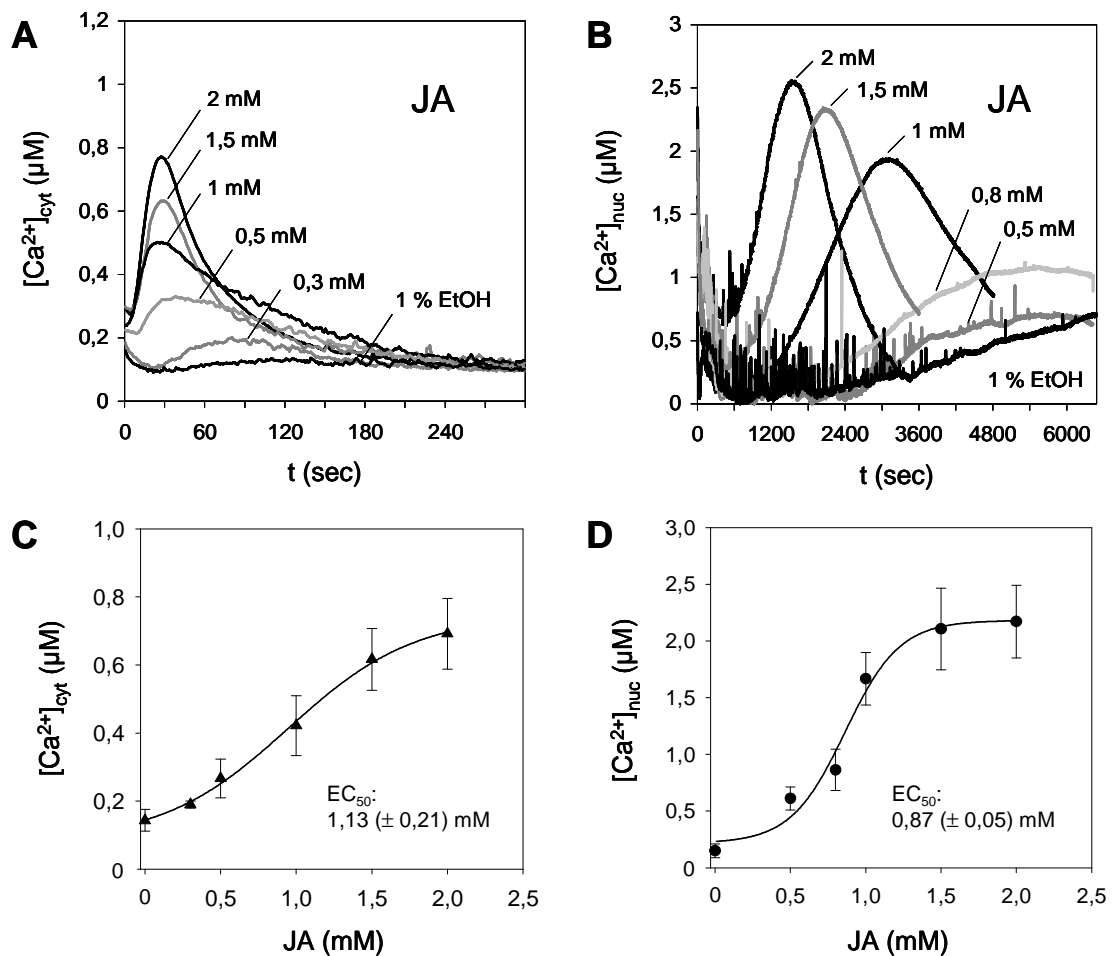


Abb. 17: JA-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

(A) Dosisabhängige Calciumantwort auf JA im Cytosol. (B) Dosisabhängige Calciumantwort auf JA im Nucleus. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils 3 unabhängige Experimente. Als Lösungsmittelkontrolle wurde EtOH in der höchsten verwendeten Konzentration eingesetzt. Zur Ermittlung der apparenten halbmaximalen Effekorkonzentrationen (EC_{50}) wurden die maximalen Calciumkonzentrationen ($n = 3$) in Cytosol (C) und Zellkern (D) gegen die JA-Konzentration aufgetragen.

Wie beim cytosolischen Calcium bewegte sich die wirksame Effekorkonzentration für $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten mit 0,5 bis 2 mM JA in einem Bereich jenseits physiologischer Werte (Abb. 17D). Aus drei unabhängigen Experimenten wurden eine apparente EC_{50} von $0,87 \pm 0,05$ mM JA und eine maximale induzierbare $[Ca^{2+}]_{nuc}$ von $2,2 \pm 0,3$ μ M ermittelt.

1.2. Methyljasmonat

Häufig wird der Methylester der Jasmonsäure zur Induktion jasmonattypischer Reaktionen verwendet. In BY-2-Zellen jedoch erwies sich MeJA bezüglich der Calciumantworten als nicht aktiv (Abb. 18). Bis zu einer Konzentration von 2 mM wurde weder im Cytosol noch im Zellkern eine Änderung der Calciumkonzentration verzeichnet. Offenbar ist die freie Carboxylgruppe von entscheidender Bedeutung für die calciuminduzierende Aktivität der JA. Auf diese Beobachtung wird im späteren Verlauf näher eingegangen (Ergebnisse II Kapitel 2).

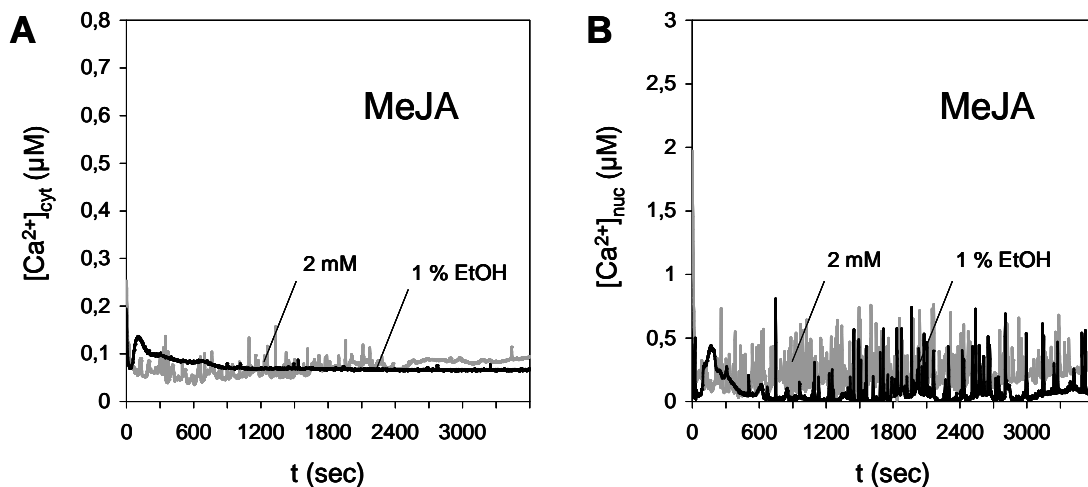


Abb. 18: Wirkung von MeJA auf die Calciumkonzentrationen in Cytosol und Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

Tabakzellen BY-2_{cyt} (A) und BY-2_{nuc} (B) wurden mit 2 mM MeJA bzw. dem Lösungsmittel EtOH behandelt und die Biolumineszenz bis 1 h nach Effektorzugabe verfolgt. Die gezeigten Messungen sind jeweils repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

1.3. 12-Oxophytodiensäure

Das Signalmolekül OPDA, dessen biologisches Wirkungsspektrum mit dem der JA zum Teil überlappt, sich in vielen Fällen aber auch stark unterscheidet (Weber, 2002), wurde als potenzieller Auslöser für $[Ca^{2+}]_{cyt}$ - und $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Änderungen an BY-2-Zellen getestet. Abb. 19A zeigt einen sofortigen $[Ca^{2+}]$ -Anstieg im Cytosol, dessen Beginn nicht erfasst werden konnte, weil die Zugabe des Effektors, das Platzieren der Küvette im Luminometer und der Start der Messung etwa 4 sec in Anspruch nahmen. Wie bei JA war auch hier sowohl die Höhe der Calciumkonzentration als auch die Kinetik der Antwort dosisabhängig. Die Scheitelpunkte der Calciumkurven wurden je nach OPDA-Konzentration zwischen 5 und 22 sec erreicht. Nach 2 min war die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort abgeschlossen. Im Vergleich zur Induktion mit JA war der transiente $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg im OPDA-Experiment schneller, früher und höher. Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 19C) zeigt eine maximale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration von $1,1 \pm 0,1 \mu M$ ($n = 3$) bei 2 mM OPDA und eine apparente EC_{50} von $0,57 \pm 0,06$ mM OPDA ($n = 3$).

Während die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten auf JA und OPDA einander recht ähnlich waren (Abb. 17A und 19A), wurde die unterschiedliche Wirkung der beiden Substanzen im Zellkern sehr deutlich. Nach einer Anlaufphase von nur wenigen Sekunden wurde durch OPDA ein schneller, transients, dosisabhängiger und überraschend starker $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg ausgelöst (Abb. 19B), der bei hohen OPDA-Konzentrationen bis zu 99 % des gesamten Aequorins verbrauchte. Eine solch durchschlagende Wirkung lässt den Verdacht aufkommen, es könnte sich bei OPDA statt eines biologischen Signals vielmehr um eine Ionophor-ähnliche Eigenschaft handeln, die zur Entladung des Aequorins führte. Tatsächlich wurden auch in BY-2_{cyt}-Zellen bei Behandlung mit OPDA bis zu 99 % des gesamten Aequorins entladen. Allerdings konnten die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ - und $[Ca^{2+}]_{nuc}$ - Antworten auf OPDA durch übliche Calciumkanalinhibitoren teilweise bis vollständig blockiert werden (Abb. 24, 26, 28). Daher darf die Ionophor-Theorie als eher unwahrscheinlich angesehen werden. Die maximale Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern, induziert durch 2 mM OPDA, lag bei $11,9 \pm 2,4 \mu M$ ($n = 3$) (Abb. 19D) und war damit mehr als fünfmal höher als $[Ca^{2+}]_{nuc}$ bei sättigender JA-Konzentration. Interessanterweise bewegte sich trotz dieser enormen Aktivität von OPDA die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 19D) mit einer apparenten EC_{50} von $0,43 \pm 0,08$ mM ($n = 3$) im gleichen Konzentrationsbereich, der für JA ermittelt wurde.

Eine weitere Gemeinsamkeit der JA- und OPDA-induzierten Calciumsignale stellt die Verzögerung der Antwort mit abnehmender Effektorkonzentration dar. Der hervorstechendste

Unterschied zwischen diesen beiden Induktoren liegt in der Kinetik der Calciumantworten. Zwischen den Maxima der Calciumkonzentrationen in Cytosol und Zellkern lagen bei OPDA nur 21 ± 7 sec ($n = 3$) (Abb. 19A und B), während nach dem JA-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Maximum ein Zeitraum von mindestens 20 min verstrich, bis das $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Maximum erreicht war (Abb. 17A und B). Dieser Umstand lässt das Vorliegen von zwei verschiedenen Transduktionsprozessen für JA- und OPDA-Signale vermuten.

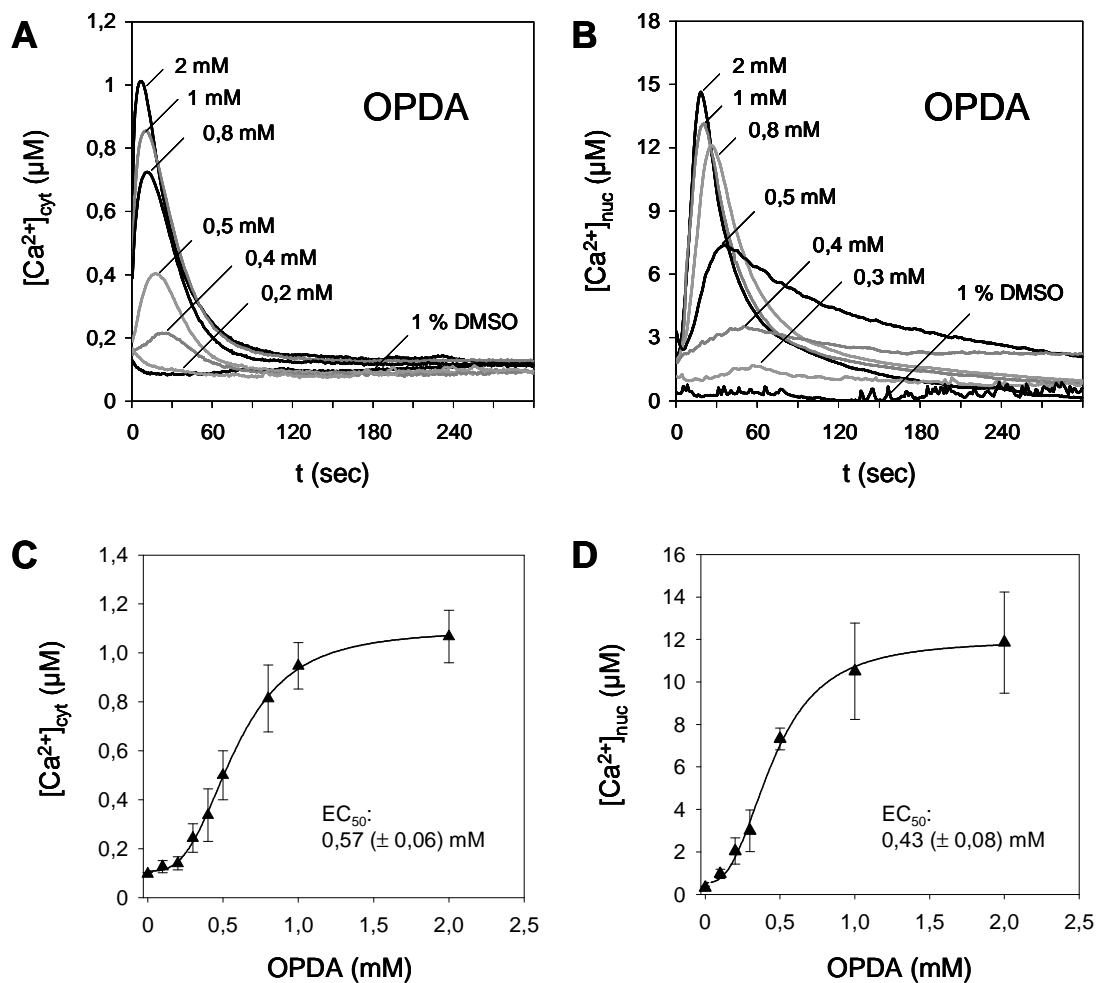


Abb. 19: OPDA-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

(A) Dosisabhängige Calciumantwort auf OPDA im Cytosol. (B) Dosisabhängige Calciumantwort auf OPDA im Nucleus. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils 3 unabhängige Experimente. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in der höchsten verwendeten Konzentration eingesetzt. Zur Ermittlung der apparenten halbmaximalen Effektorkonzentrationen (EC_{50}) wurden die maximalen Ca^{2+} -Konzentrationen ($n = 3$) in Cytosol (C) und Zellkern (D) gegen die OPDA-Konzentration aufgetragen.

1.4. Phytoprostan B₁ Typ II

Der Vertreter der Phytoprostane, PPB₁ (Abb. 2), löste ebenfalls Ca²⁺-Antworten in beiden Kompartimenten aus (Abb. 20). Es wurden nur zwei PPB₁-Konzentrationen getestet, 2 mM und 1 mM, die zeigten, dass die [Ca²⁺]-Änderungen dosisabhängig waren. Der transiente [Ca²⁺]_{cyt}-Anstieg (Abb. 20A) erreichte sein Maximum, das bei 2 mM PPB₁ einen Wert von $0,54 \pm 0,08 \mu\text{M}$ hatte, nach $31 \pm 6 \text{ sec}$ ($n = 3$). Da nur relativ hohe PPB₁-Konzentrationen eingesetzt wurden, konnte keine Verzögerung der [Ca²⁺]_{cyt}-Antwort festgestellt werden, wie sie bei den Jasmonaten beobachtet wurde.

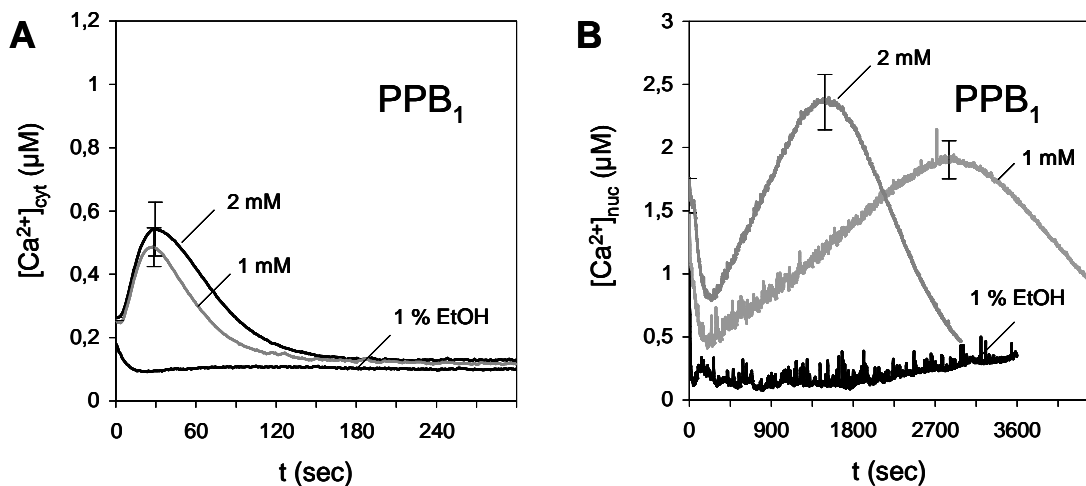


Abb. 20: PPB₁-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration in Cytosol und Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

(A) Dosisabhängige Calciumantwort auf PPB₁ im Cytosol. (B) Dosisabhängige Calciumantwort auf PPB₁ im Nucleus. Die gezeigten [Ca²⁺]-Änderungen stellen jeweils den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen dar. Als Lösungsmittelkontrolle wurde EtOH in der höchsten verwendeten Konzentration eingesetzt.

Auf die [Ca²⁺]_{cyt}-Antwort folgte nach ca. 3 min eine langsame Zunahme der Calciumkonzentration im Zellkern (Abb. 20B), deren Maximum von $2,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$ bei 2 mM PPB₁ nach $26 \pm 4 \text{ min}$ ($n = 3$) erreicht wurde, um dann im Lauf von weiteren 30 min ebenso langsam wieder abzunehmen. Im Zellkern wurde bei 1 mM PPB₁ die Verzögerung der Calciumantwort mit dem Maximum nach $48 \pm 1 \text{ min}$ ($n = 3$) sehr deutlich (Abb. 20B). Beim Vergleich von PPB₁ mit JA (Abb. 17) fällt ein übereinstimmender Kurvenverlauf in beiden

Kompartimenten auf. Sowohl die $[Ca^{2+}]$ -Werte als auch die Kinetik der $[Ca^{2+}]$ -Änderungen bei den entsprechenden Effektorkonzentrationen weichen nur wenig voneinander ab.

Die vorgelegten Daten zeigen, dass verschiedene Vertreter der Oxylipine in BY-2-Zellen unterschiedliche Calciumsignaturen auslösen, zu denen sowohl das Cytosol als auch der Zellkern einen Beitrag leisten. Ob dabei der transiente $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg, der immer der Antwort im Zellkern vorausging (Abb. 17, 19 und 20), eine zwingende Voraussetzung für die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Änderung ist, oder ob es sich um zwei unabhängige Ereignisse handelt, bleibt zu untersuchen.

Die fehlende Aktivität von MeJA lieferte einen ersten Hinweis auf strukturelle Eigenschaften, die den Signalmolekülen Ca^{2+} -induzierende Wirksamkeit verleihen. Das folgende Kapitel beschäftigt sich daher mit Struktur-Aktivitätsvergleichen, um essentielle Strukturmerkmale der Effektoren zu identifizieren.

2. Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Jasmonaten und synthetischen Jasmonat-Analoga bei der Induktion von Calciumantworten

Neben JA, OPDA und Jasmonoyl-Isoleucin-Konjugaten (Abb. 1) wurden die bereits in den Bindungsstudien eingesetzten Indanoyl-Isoleucin-Konjugate (Abb. 3) an BY-2_{cyt}- und BY-2_{nuc}-Zellen getestet. Als Effektorkonzentration für die vergleichenden Calciummessungen wurde 1 mM gewählt, da diese Konzentration in der Nähe bzw. weit über den EC_{50} -Werten lag, die für JA und OPDA bestimmt worden waren (Abb. 17 und 19) und daher eine deutliche Unterscheidung zwischen aktiven und nicht aktiven Substanzen erwarten ließ. Es wurden insgesamt 3 verschiedene Calciumsignaturen beobachtet, die von einzelnen Substanzen oder von Molekülgruppen ausgelöst wurden.

2.1. Aktivitätsprofil I: OPDA

Keines der verwendeten Signalmoleküle konnte die bereits beschriebene außerordentliche Wirkung von OPDA nachahmen. Sowohl die Höhe des $[Ca^{2+}]$ -Anstiegs mit $0,94 \pm 0,11 \mu\text{M}$ im Cytosol bzw. $10,42 \pm 2,29 \mu\text{M}$ im Zellkern als auch die Geschwindigkeit der Antwort in beiden Kompartimenten blieben unerreicht (Abb. 21A und D). Strukturell handelt es sich bei OPDA um ein Octadecanoid und Cyclopentenon mit freier Carboxylgruppe. Dies trifft unter allen übrigen Substanzen nur noch auf PPB₁ Typ II (Abb. 2) zu, dessen Ca^{2+} -induzierende Aktivität allerdings keine Ähnlichkeit mit der von OPDA aufwies (Abb. 20).

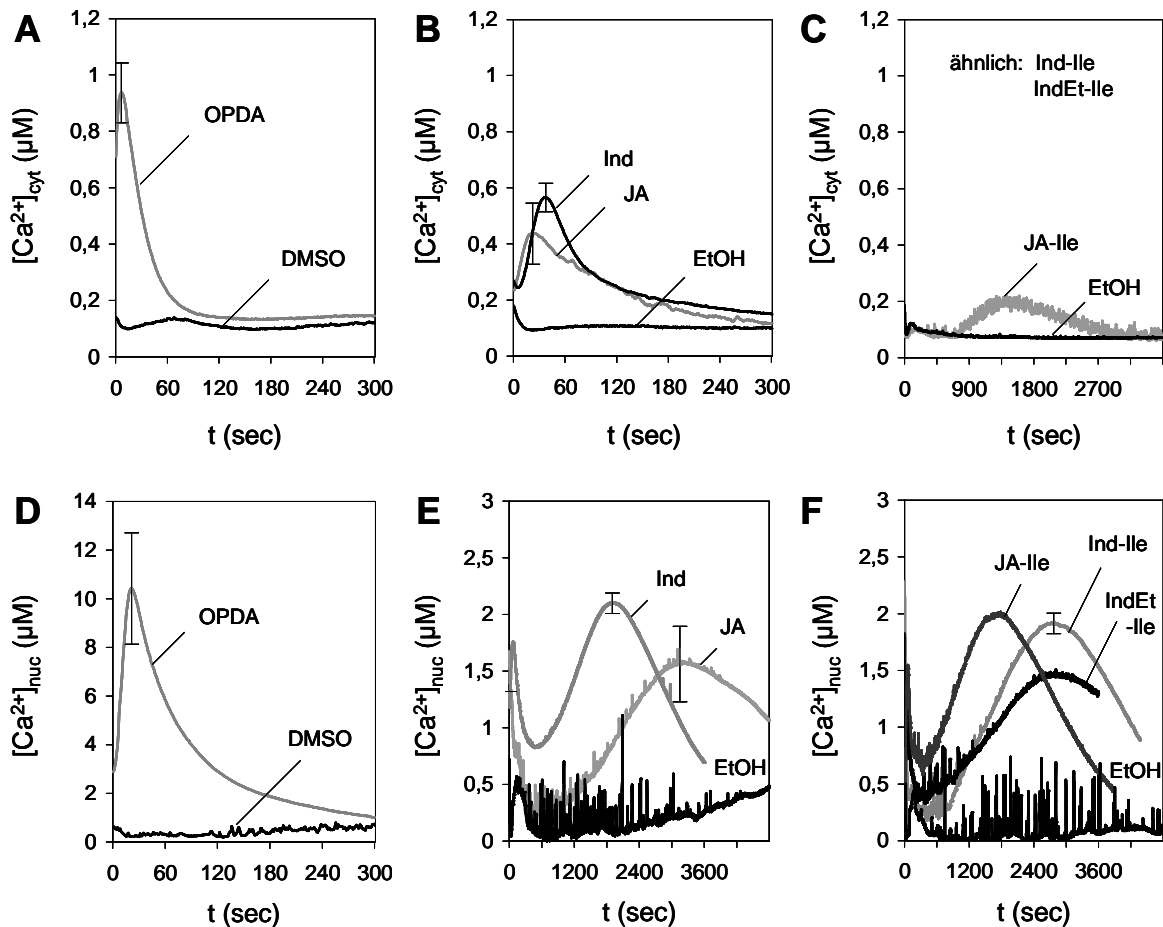


Abb. 21: Struktur-Aktivitätsvergleich von Jasmonaten und Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in Cytosol und Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

BY-2_{cyt}-Zellen wurden mit 1 mM OPDA (A), JA und Ind (B) bzw. JA-Ile, Ind-Ile und IndEt-Ile (C) behandelt. In (C) ist nur die Antwort auf JA-Ile stellvertretend für alle übrigen Substanzen dieser Gruppe gezeigt. BY-2_{nuc}-Zellen wurden ebenfalls mit 1 mM OPDA (D), JA und Ind (E) bzw. JA-Ile, Ind-Ile und IndEt-Ile (F) behandelt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Die gezeigten $[Ca^{2+}]$ -Änderungen stellen jeweils den Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Messungen dar; bei IndEt-Ile und JA-Ile handelt es sich um repräsentative Einzelmessungen.

2.2. Aktivitätsprofil II: JA und Ind

Die synthetische 1-Oxoindan-4-carbonsäure (Ind) wurde aufgrund ihres Aktivitätsprofils der Jasmonsäure zugeordnet (Abb. 21B und E). Von diesen beiden Substanzen wurde ein früher und transientser $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg auf $0,44 \pm 0,11 \mu\text{M}$ nach 22 sec (JA, $n = 3$) bzw. $0,57 \pm 0,05 \mu\text{M}$ nach 37 sec (Ind, $n = 6$) ausgelöst, gefolgt von einer späten und langsamen

$[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort mit dem Maximum von $1,56 \pm 0,33 \mu M$ nach 52 min (JA, $n = 3$) bzw. $2,10 \pm 0,12 \mu M$ nach 31 min (Ind, $n = 6$).

Abb. 21E zeigt bei Applikation von Ind einen kurzen transienten $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg zu Beginn der Messung, der nach etwa 10 min in die beschriebene $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort übergang. Dieses frühe Calciumsignal wurde auch in einigen Experimenten mit JA, IndEt-Ile, JA-Ile und PPB₁ beobachtet (Abb. 20B, 21F), war aber weder dosisabhängig noch reproduzierbar und wird daher für nicht charakteristisch gehalten.

Ind (Abb. 3A) besitzt wie JA (Abb. 1) eine Carbonylgruppe am C₅-Ring und scheint mit dem aromatischen System, obwohl planar, ein guter Ersatz für JA zu sein. Ursprünglich wurden die Aminosäurekonjugate der 1-Oxoindan-4-carbonsäure Ind-IleMe und Ind-Ile (Abb. 3) als synthetische Analoga für JA entworfen (Krumm et al., 1995). Hier wurde nun erstmals eine eigenständige Aktivität der Indanon-Einheit nachgewiesen, während das Konjugat mit Isoleucin eher die Aktivität des Jasmonoyl-Isoleucin-Konjugats nachahmte (Abb. 21C und F). Die durch Ind ausgelösten Ca^{2+} -Antworten waren, analog zu den JA-induzierten Antworten (Abb. 17), in beiden Kompartimenten dosisabhängig.

2.3. Aktivitätsprofil III: Isoleucin-Konjugate von JA und Ind

Die Konjugation von JA und Ind mit der Aminosäure Ile veränderte die Calciumsignatur, die durch diese beiden Substanzen ausgelöst wurde. BY-2_{cyt}-Zellen antworteten auf JA-Ile und Ind-Ile nicht mehr mit dem JA-typischen schnellen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg (Abb. 21B), sondern mit einer sehr schwachen Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentration, die 15 min nach Effektorzugabe begann und nach 20 bis 30 min ihr Maximum von ca. $0,2 \mu M$ erreichte, um dann langsam wieder auf $0,1 \mu M$ zu sinken (Abb. 21C). Diese Wirkung auf $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wurde in ähnlicher Form bei JA-Ile, Ind-Ile und IndEt-Ile gefunden, war in geringem Ausmaß dosisabhängig (maximale induzierbare $[Ca^{2+}]_{cyt} = 0,33 \mu M$) und ist in Abb. 21C am Beispiel von JA-Ile dargestellt. Allerdings konnte dieser $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg nur mit Effetorkonzentrationen von 1 mM und höher ausgelöst und mitunter überhaupt nicht nachgewiesen werden. Es soll festgehalten werden, dass durch Konjugation mit Isoleucin die frühe $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort auf JA und Ind verloren ging, wodurch ein qualitativer Aktivitätsunterschied zwischen JA/Ind in konjugierter bzw. nicht konjugierter Form gezeigt wurde.

Interessant ist die Wirkung der Konjugate auf $[Ca^{2+}]_{nuc}$. Es ist nämlich keineswegs der Fall, dass die Konjugation mit Isoleucin Signalmoleküle wie JA oder Ind vollständig inaktiviert. JA-Ile und Ind-Ile lösten im Zellkern Calciumantworten aus, die den $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf JA und Ind entsprachen (Abb. 21E und F) und wie diese dosisabhängig waren. Sowohl die maximale Ca^{2+} -Konzentration von ca. 2 μM als auch die Kinetik des transienten $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstiegs war bei allen vier Substanzen ähnlich. Hierzu muss erwähnt werden, dass grundsätzlich der Zeitraum, in dem die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort stattfand, bei einer gegebenen Effektor-konzentration in verschiedenen Experimenten stark variierte, wahrscheinlich abhängig vom Zustand der Zellen. Mit 1 mM JA beispielsweise wurde der Scheitelpunkt der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Kurve nach 52 ± 23 min ($n = 5$) erreicht, Ähnliches gilt für die anderen Substanzen. Daher darf der zeitlichen Position der verschiedenen $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten in Abb. 21E und F keine allzu große Bedeutung beigemessen werden. Vielmehr könnten alle diese Calciumsignale im Zellkern unter Vorbehalt als identisch angesehen werden. Es handelt sich bei den gezeigten Kurven jeweils um Mittelwerte aus 3 bis 6 unabhängigen Messungen, sofern die Standardabweichung am Scheitelpunkt angegeben ist. JA-Ile stellt eine repräsentative Einzelmessung dar.

Die übereinstimmenden Effekte von JA und JA-Ile bzw. Ind und Ind-Ile auf $[Ca^{2+}]_{nuc}$ trotz unterschiedlicher $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten geben verschiedenen Spekulationen über die Natur der Signalmoleküle Raum, vorausgesetzt es handelt sich jeweils um identische Calciumantworten. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass für die Calciumantwort im Zellkern ausschließlich Isoleucin-Konjugate verantwortlich sind, während für den cytosolischen $[Ca^{2+}]$ -Anstieg JA/Ind als Signalsubstanzen wirken. In diesem Fall müsste nach dem Auslösen der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort durch JA/Ind in der Zelle die Konjugation mit Isoleucin stattfinden, um in Form von JA-Ile/Ind-Ile die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort zu induzieren. Weniger wahrscheinlich wäre der umgekehrte Fall, dass JA/Ind in beiden Kompartimenten die eigentlichen Auslöser der $[Ca^{2+}]$ -Änderungen darstellen, so dass der Effekt der Konjugate auf $[Ca^{2+}]_{nuc}$ (Abb. 21F) und eventuell auch der verspätete schwache $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg (Abb. 21C) durch Freisetzung von JA/Ind nach Abspaltung der Aminosäure zu erklären wäre. Ein drittes Modell würde keine Umwandlung von JA/Ind und JA-Ile/Ind-Ile ineinander voraussetzen, mit der Konsequenz, dass es zwei Rezeptortypen mit unterschiedlicher Selektivität geben müsste, einen Rezeptor für die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort, der nur JA und Ind erkennt, und einen zweiten für die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort, der neben JA/Ind auch die entsprechenden Isoleucin-Konjugate als Liganden akzeptiert. Alle drei Szenarien führen zu der Annahme, dass es sich bei den Calciumantworten im Cytosol und Zellkern um voneinander unabhängige Ereignisse handelt. Würde man in einer vierten Variante davon ausgehen,

dass die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort auf JA/Ind (Abb. 21B) zwingende Voraussetzung für die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Änderung (Abb. 21E) ist, wären die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf JA/Ind trotz des übereinstimmenden Erscheinungsbildes nicht mit den $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf JA-Ile/Ind-Ile gleichzusetzen, da diese unabhängig von dem JA-typischen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg ausgelöst wurden (Abb. 21C und F).

Zur Klärung der Abläufe, die zu den Calciumantworten führen, müsste demnach erstens ermittelt werden, ob in der Zelle Umsetzungen von JA/Ind und JA-Ile/Ind-Ile ineinander stattfinden, und zweitens, ob der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg Voraussetzung für die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf JA und Ind ist. Diese Fragen sollen später behandelt werden (Ergebnisse II Kapitel 3 und 4).

Der Ethyl-Substituent am C6 (Abb. 3B) verleiht dem 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucin-methylester (IndEt-IleMe) gegenüber Ind-IleMe eine gesteigerte Aktivität in verschiedenen Biotests (Mithöfer et al., 2005). In den Calciummessungen verhielt sich 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-isoleucin (IndEt-Ile) wie Ind-Ile und JA-Ile (Abb. 21C und F) – der Substituent bewirkte keinen signifikanten Aktivitätsunterschied. Erst Experimente mit IndEt-IleMe zeigten, dass es mit der Ethylgruppe tatsächlich eine besondere Bewandnis haben muss. Bei allen bisher beschriebenen calciuminduzierenden Substanzen handelte es sich nämlich um freie Säuren, während die entsprechenden Methylester MeJA (Abb. 18), JA-IleMe und Ind-IleMe nicht aktiv waren. IndEt-IleMe entzog sich als einziger Methylester dieser Regelmäßigkeit, indem er eine Ca^{2+} -Antwort im Zellkern auslöste (Abb. 22A). Kinetik und Höhe dieses transienten $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstiegs stimmten in etwa mit denen der übrigen Isoleucin-Konjugate (Abb. 21F) überein, der Kurvenverlauf war aber nicht glatt, sondern unruhig, wie man es bei inaktiven Substanzen oder Lösungsmittelkontrollen beobachten konnte. Die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf IndEt-IleMe war dosisabhängig (Abb. 22A) mit einer EC_{50} von $0,45 \pm 0,11$ mM und einer maximalen induzierbaren Calciumkonzentration von $1,34 \pm 0,07$ μ M ($n = 3$) (Abb. 22B). Sie unterschied sich von den $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf die übrigen Isoleucin-Konjugate dadurch, dass mit abnehmender IndEt-IleMe-Konzentration keine Verzögerung der Antwort eintrat (Abb. 22A). Im Cytosol löste IndEt-IleMe analog zu den anderen Konjugaten eine schwache und späte $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort aus (vgl. Abb. 21C). IndEt-IleMe stellt einen Sonderfall dar, der seine Eigenschaften dem C6-Substituenten verdankt. Die Ethylgruppe verleiht dem Methylester, verglichen mit dem unsubstituierten, inaktiven Ind-IleMe, calciuminduzierende Aktivität. Aufgrund der genannten Besonderheiten könnte man bei IndEt-IleMe von einem vierten Aktivitätsprofil sprechen. Durch die Übereinstimmungen mit dem Aktivitätsprofil von JA-Ile, Ind-Ile und IndEt-Ile aber und wegen des unruhigen

Kurvenverlaufs könnte die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf IndEt-IleMe auch als abgeschwächte Form der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf die anderen Isoleucin-Konjugate interpretiert werden.

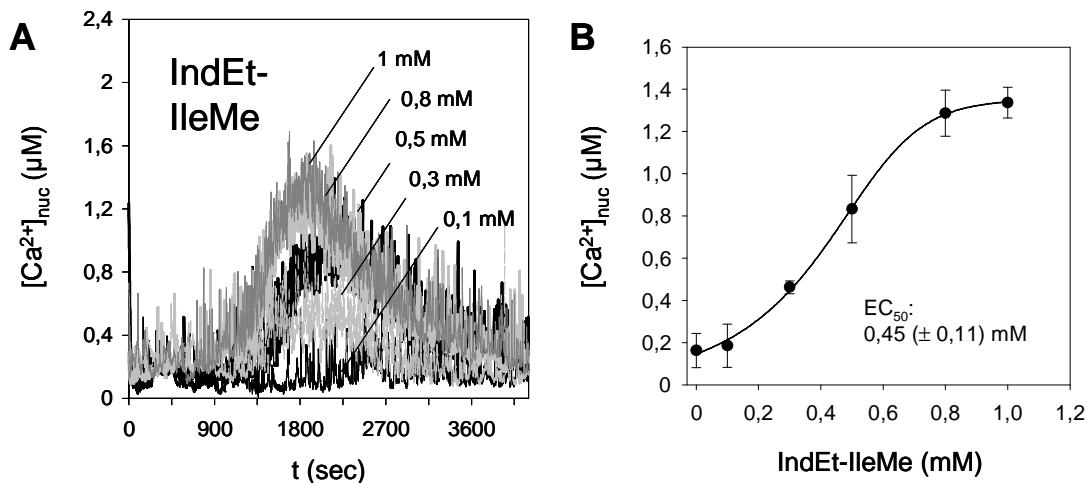


Abb. 22: IndEt-IleMe-induzierte Änderungen der Calciumkonzentration im Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

(A) Dosisabhängige Calciumantwort auf IndEt-IleMe im Zellkern. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren 3 unabhängige Experimente. (B) Zur Ermittlung der apparenten halbmaximalen Effektorkonzentration (EC_{50}) wurden die maximalen Ca^{2+} -Konzentrationen ($n = 3$) gegen die IndEt-IleMe-Konzentration aufgetragen.

2.4. Bedeutung der Carboxylgruppe für die Aktivität der Induktoren

Alle oben beschriebenen Carbonsäure/Carbonsäuremethylester-Paare (JA/MeJA, JA-Ile/JA-IleMe, Ind-Ile/Ind-IleMe) mit Ausnahme von IndEt-Ile/IndEt-IleMe lassen vermuten, dass die freie Carboxylgruppe bei der Induktion von Calciumantworten eine zentrale Rolle spielt, da jeweils nur die freie Säure aktiv war. Ferner deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Esterhydrolyse in der Zelle, sofern sie überhaupt stattfindet, nicht schnell genug abläuft, um aus den inaktiven Methylestern wirksame Auslöser für die Calciumantworten zu machen. Oder die Perzeption findet an der Zelloberfläche statt, so dass im Zellinneren freigesetzte Säuren keine Wirkung haben.

Zunächst drängte sich der Verdacht auf, dass möglicherweise nicht die Jasmonate bzw. Jasmonat-Analoga selbst, sondern vielmehr eine Abnahme des pH-Wertes des Puffers bei Zugabe der Carbonsäuren das Signal für die Calciumantworten sein könnte, nicht zuletzt

weil die Substanzen in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Die Überprüfung des pH-Wertes bei den jeweils höchsten Effektorkonzentrationen zeigte jedoch, dass keine Ansäuerung der Zellsuspension stattfand. Des Weiteren musste festgestellt werden, ob eventuell die Carboxylfunktion allein, unabhängig von der Jasmonatstruktur, die Calciumantworten induzierte. Zu diesem Zweck wurden BY-2_{nuc}-Zellen mit 2 mM Essigsäure behandelt. Im Verlauf von einer Stunde wurde kein Anstieg der Calciumkonzentration im Zellkern verzeichnet (Abb. 23B). Es war daher die Jasmonatstruktur in Kombination mit der Carboxylgruppe, die die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Änderung bewirkte.

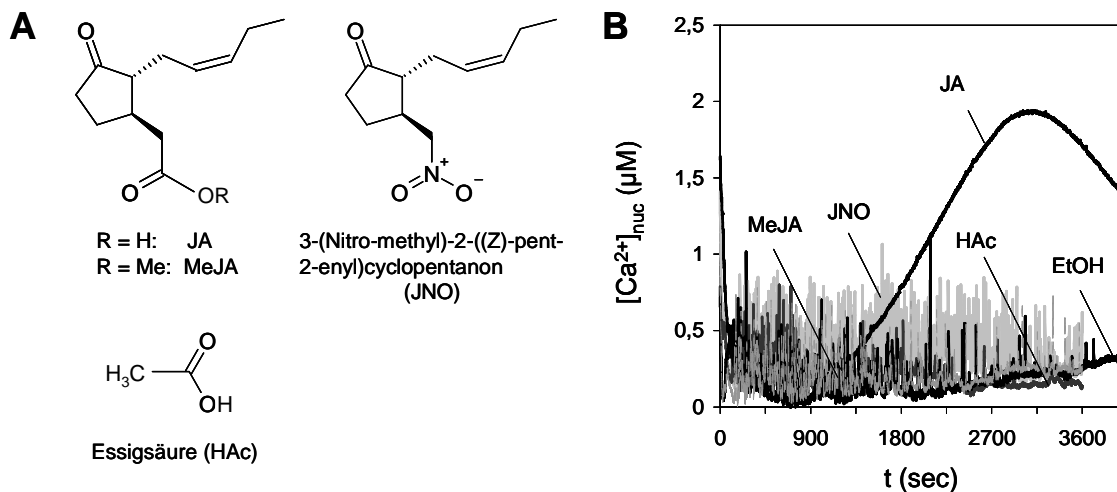


Abb. 23: Untersuchung der Bedeutung der freien Carboxylgruppe für die Induktion der Calciumantwort im Zellkern von Tabak BY-2-Zellen

(A) Strukturen von JA, MeJA, JNO und HAc. (B) Wirkung von 1 mM JA, 1 mM MeJA, 1 mM JNO und 2 mM HAc sowie 1 % EtOH als Lösungsmittelkontrolle auf die Calciumkonzentration im Zellkern. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren 3 unabhängige Experimente.

Die Verbindung 3-(Nitro-methyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon (JNO, Abb. 23A) besitzt die Struktur der JA, trägt aber anstelle der Carboxylgruppe die beinahe gleich große Nitrogruppe, wodurch die negative Ladung verloren geht, die Elektronenkonfiguration aber gleich bleibt (Alston et al., 1983). Abb. 23B zeigt, dass die fehlende Ladung in JNO zum Verlust der calciuminduzierenden Aktivität führte. Die negative Ladung der Carboxylgruppe scheint daher von entscheidender Bedeutung zu sein.

Mit allen verwendeten Substanzen wurden Kontrollmessungen an extrahiertem Aequorin durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Interferenz mit der Lumineszenz auftrat. Keine der Substanzen beeinflusste die Lichtemission des Aequorins.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass der Struktur-Aktivitätsvergleich erstens zur Unterscheidung von OPDA- und JA/Ind-Signalen führte, zweitens ein eigenes Aktivitätsprofil der Isoleucin-Konjugate beschrieb und drittens die zentrale Rolle der freien Carboxylgruppe aufdeckte. Zwei Fragen blieben unbeantwortet: Welche Signalmoleküle sind die eigentlichen Auslöser der Calciumantworten im Zellkern? JA/Ind oder die entsprechenden Isoleucin-Konjugate oder beide? Und sind die Calciumantworten im Cytosol mit denen im Zellkern gekoppelt, oder handelt es sich um voneinander unabhängige Ereignisse? Die beiden folgenden Kapitel beschäftigen sich mit diesen Problemen.

3. Pharmakologische Charakterisierung der Calciumantworten in Cytosol und Zellkern

Zellkompartimente beziehen Ca^{2+} für Änderungen der internen Calciumkonzentration aus extra- und/oder intrazellulären Quellen. Üblicherweise werden Ca^{2+} -Kanalinhhibitoren eingesetzt, um die Herkunft des Calciums zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurden LaCl_3 und EGTA verwendet, um den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zu unterbinden, und Rutheniumrot als Inhibitor für Ryanodinrezeptor-Kanäle. Da die Dosisabhängigkeit der Inhibition ein wichtiger Hinweis auf das Vorliegen der erwünschten pharmakologischen Wirkung ist, wurden die Inhibitoren in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Neben der Charakterisierung der jasmonatinduzierten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ - und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antworten durch die Bestimmung der Ca^{2+} -Quellen bzw. beteiligten Ca^{2+} -Kanäle wurde vor allem die Klärung der Frage angestrebt, ob die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort Voraussetzung für die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort ist.

3.1. Herkunft des Calciums für die Antworten im Cytosol

Der Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration kann durch Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum oder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern entstehen. Ein häufig benutzter Inhibitor für den Einstrom von extrazellulärem Calcium durch Kanäle der Plasmamembran ist La^{3+} (Pinosos und Tester, 1997).

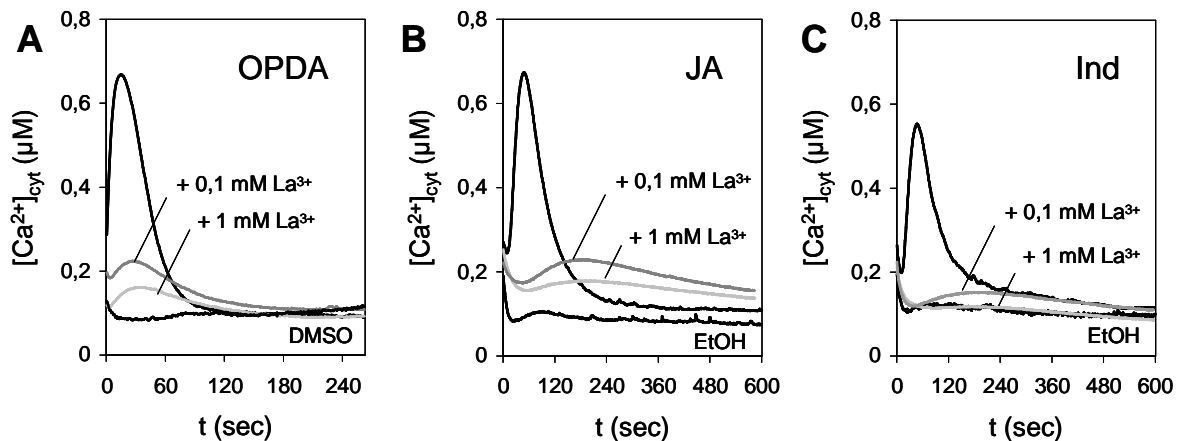


Abb. 24: Inhibition der cytosolischen Calciumantworten auf OPDA, JA und Ind durch La^{3+}

Tabak-BY-2_{cyt}-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des Inhibitors La^{3+} mit 0,5 mM OPDA (A), 2 mM JA (B) und 1 mM Ind (C) behandelt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren je 2 unabhängige Experimente.

BY-2_{cyt}-Zellen wurden 5 min vor der Calciummessung mit 0,1 mM bzw. 1 mM LaCl_3 vorbehandelt. Alle cytosolischen Calciumantworten, nämlich die auf OPDA, JA und Ind, wurden beinahe vollständig durch La^{3+} blockiert, wobei in allen Fällen bereits mit 0,1 mM LaCl_3 eine Inhibition von ca. 80 % erreicht wurde (Abb. 24).

Die Daten legen die Notwendigkeit eines Calciumeinstroms durch die Plasmamembran für das Entstehen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antworten nahe. Entsprechende Messungen, bei denen das extrazelluläre Ca^{2+} durch Zusatz von EGTA entfernt wurde, bestätigten dieses Ergebnis. Allerdings muss trotz nahezu vollständiger Hemmung durch La^{3+} nicht die gesamte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort aus extrazellulärem Ca^{2+} bestehen. Nach einem Einstrom von außen, der durch La^{3+} blockiert wird, könnte sich auch Calcium aus internen Speichern durch calcium-induzierte Calciumfreisetzung (calcium induced calcium release, CICR) beteiligen (Fabiato und Fabiato, 1975). Ein solcher Beitrag intrazellulären Calciums würde in Gegenwart von La^{3+} ebenfalls ausbleiben, so dass die La^{3+} -Inhibition keinen Rückschluss auf eine rein extrazelluläre Herkunft des Calciums erlaubt.

CICR wird in tierischen Zellen durch die Aktivierung von calciumsensitiven Ryanodinrezeptoren (RyR) ausgelöst, die zur Öffnung von Calciumkanälen führt (Kuba, 1994). Für RyR-

Kanäle hat sich Rutheniumrot (RR) als Inhibitor etabliert (Smith et al., 1985; Imagawa et al., 1987; Ma et al., 1988). Auch in Pflanzenzellen hemmt RR die cADPR- bzw. Ryanodin-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Allen et al., 1995). Durch Vorbehandlung von BY-2_{cyt}-Zellen mit 50 μM RR wurden die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antworten auf JA und Ind um ca. 50 % gehemmt, mit 10 μM RR war die Inhibition schwächer, aber immer noch deutlich (Abb. 25B und C).

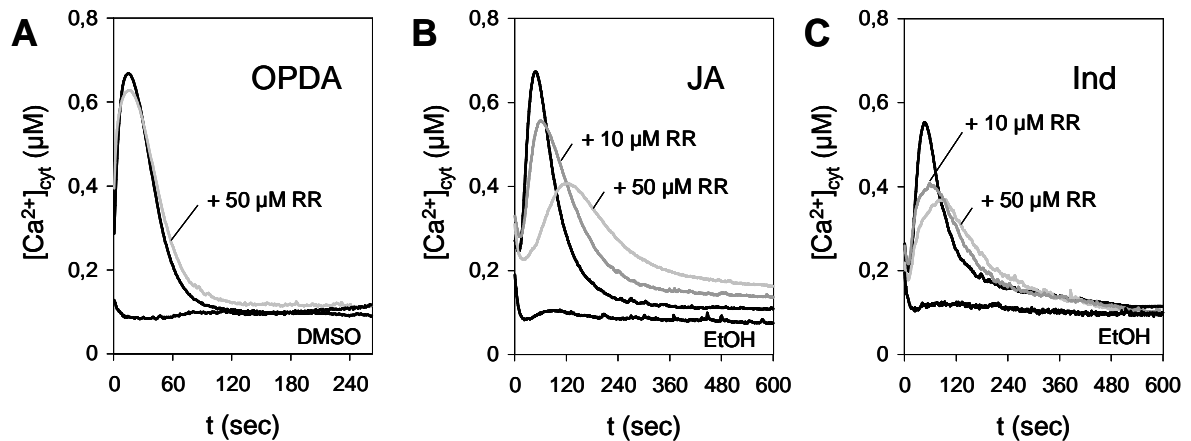


Abb. 25: Inhibition der cytosolischen Calciumantworten auf OPDA, JA und Ind durch Rutheniumrot

Tabak-BY-2_{cyt}-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des Inhibitors RR mit 0,5 mM OPDA (A), 2 mM JA (B) und 1 mM Ind (C) behandelt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren je 2 unabhängige Experimente mit Ausnahme von (A), das ein Einzelexperiment ohne Wiederholung darstellt.

Rutheniumrot steht aufgrund seiner intensiv roten Farbe im Verdacht, die Lichtemission des Aequorins abzufangen und auf diese Weise eine Hemmung des $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiegs vorzutäuschen. Tatsächlich wurden in Kontrollmessungen mit extrahiertem Aequorin in Anwesenheit von 10 μM RR die volle Lumineszenz, mit 50 μM RR aber nur etwa 50 % der Lumineszenz detektiert. Dies tut den Calciummessungen mit BY-2-Zellen jedoch keinen Abbruch, da die Messergebnisse nicht als absolute Lumineszenz wiedergegeben werden, sondern bei der Kalibrierung die durch RR behinderte Lichtemission zu jedem Zeitpunkt der Messung mit der ebenfalls durch RR reduzierten Gesamtlichtemission der Probe verrechnet wird. Die Ergebnisse in Abb. 25B und C bestätigen, dass nicht die Interferenz des Farbstoffs mit der Lumineszenz für die beobachtete Erniedrigung der Calciumkonzentration verantwortlich ist, weil die Hemmung der Antwort bereits bei 10 μM RR auftrat und sich nicht nur in niedrigeren Calciumkonzentrationen, sondern auch in einer Verzögerung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstiegs ausdrückte.

Die partielle Hemmung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten auf JA und Ind durch RR deutet darauf hin, dass ein Teil des Calciums durch RyR-ähnliche Kanäle fließt, was als Hinweis auf CICR interpretiert werden kann. Dies bedeutet jedoch nicht zweifelsfrei die Beteiligung von Ca^{2+} aus intrazellulären Reservoirs, da RR – obwohl gemeinhin als Inhibitor für intrazelluläre Calciumfreisetzung bezeichnet – auch Calciumströme durch die pflanzliche Plasmamembran blockiert (Marshall et al., 1994). Der anfängliche Calciumeinstrom scheint durch CICR verstärkt zu werden, ob aber die dafür verantwortlichen Kanäle in der Plasmamembran oder in einer intrazellulären Membran lokalisiert sind, bleibt daher unbeantwortet.

Da sowohl La^{3+} als auch RR die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten auf JA und Ind jeweils gleichermaßen beeinflussten (Abb. 24 und 25), wird die frühere Annahme (Ergebnisse II Kapitel 2.3.) unterstützt, dass es sich um die gleiche Calciumantwort handelt, die von beiden Substanzen ausgelöst wird. OPDA war im Struktur-Aktivitätsvergleich durch andersartige Ca^{2+} -Antworten aufgefallen (Abb. 21). Daher verwundert es nicht, dass die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort auf OPDA im Gegensatz zu JA/Ind durch 50 μM RR praktisch nicht beeinflusst wurde (Abb. 25A) und somit ein anderer Mechanismus des Calciumeinstroms zu vermuten ist, an dem RyR-ähnliche Kanäle nicht beteiligt sind. Allerdings muss dieses Ergebnis mit Vorsicht behandelt werden, weil es nicht durch Wiederholungen bestätigt wurde. Alle anderen Experimente wurden mindestens zweimal mit zwei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt.

Die ermittelten Charakteristika der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten, nämlich der erforderliche Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum und bei JA/Ind die Sensitivität gegenüber RR, wurden im Folgenden an BY-2_{nuc}-Zellen untersucht, um Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu finden, die die Frage nach der Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ klären könnten.

3.2. Abhängigkeit der Calciumantworten im Zellkern von extrazellulärem Calcium

Wenn die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf OPDA, JA und Ind von dem jeweils vorausgehenden $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg abhängen, sollte die Unterdrückung der cytosolischen Calciumantwort durch La^{3+} das Ausbleiben der Antwort im Zellkern zur Folge haben. Anderenfalls sollte die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort in Gegenwart des Inhibitors trotzdem stattfinden. Die Behandlung von BY-2_{nuc}-Zellen mit 1 mM $LaCl_3$ führte zur beinahe vollständigen Blockierung der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf OPDA, JA und Ind (Abb. 26). Schon mit 0,1 mM $LaCl_3$ wurde die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -

Antwort auf OPDA um ca. 80 % ($n = 2$), die Antworten auf JA und Ind um mindestens 50 % (je $n = 2$) gehemmt, verbunden mit einer starken Verzögerung des $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstiegs bei JA und Ind. Ergänzende Messungen, in denen das extrazelluläre Calcium durch EGTA komplexiert wurde, bestätigten diesen Befund.

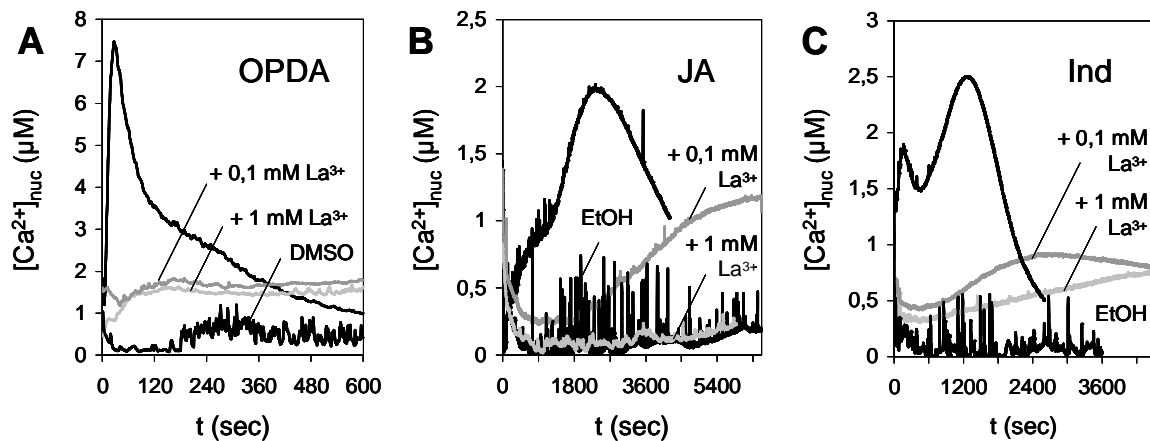


Abb. 26: Inhibition der Calciumantworten auf OPDA, JA und Ind im Zellkern durch La^{3+}

Tabak-BY-2_{nuc}-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des Inhibitors La^{3+} mit 0,5 mM OPDA (A), 2 mM JA (B) und 1 mM Ind (C) behandelt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren je 2 unabhängige Experimente.

Bei OPDA spricht nichts gegen die Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort vom $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg; im Gegenteil würde ein CICR-Mechanismus eine plausible Erklärung für die rasche Aufeinanderfolge der beiden Calciumsignale darstellen. Die übrigen Substanzen hatten jedoch beim Struktur-Aktivitätsvergleich eher das Gegenteil vermuten lassen, da JA, Ind und die entsprechenden Isoleucin-Konjugate übereinstimmende Calciumantworten im Zellkern auslösten, obwohl die Konjugate keinen JA-ähnlichen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg verursacht hatten (Abb. 21). Daher wurde nun am Beispiel des Konjugats IndEt-IleMe die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort in Gegenwart von La^{3+} untersucht. Überraschenderweise blockierten beide La^{3+} -Konzentrationen die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf IndEt-IleMe vollständig (Abb. 27). Folglich scheint die IndEt-IleMe-induzierte Calciumantwort im Zellkern einen Einstrom von extrazellulärem Calcium zu benötigen, der sich wahrscheinlich in dem beobachteten schwachen und langsamen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg ausdrückte (Abb. 21C).

Sollten die Calciumantworten im Zellkern tatsächlich von den jeweiligen cytosolischen Calciumantworten abhängen, würde das für JA, Ind und die Isoleucin-Konjugate die Entstehung von einheitlichen $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten (Abb. 21E und F) durch zwei sehr unterschiedliche $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signale (Abb. 21B und C) bedeuten. Alternativ könnte in allen Fällen für die Generierung der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten ein langsamer Einstrom von extrazellulärem Calcium verantwortlich sein, wie er bei einigen Isoleucin-Konjugaten beobachtet wurde (Abb. 21C), so dass die frühen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten auf JA und Ind nichts mit den $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten zu tun hätten. Einstündige Messungen mit JA oder Ind zeigten aber nach den frühen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten keinen erneuten $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg.

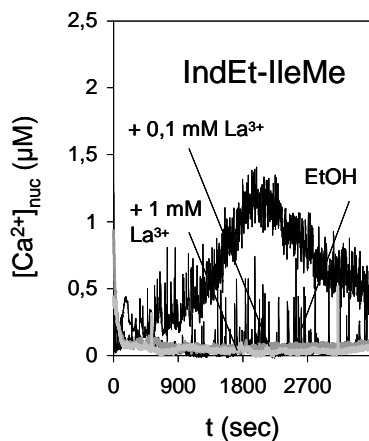


Abb. 27: Inhibition der Calciumantwort auf IndEt-IleMe im Zellkern durch La^{3+}

Tabak-BY-2_{nuc}-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des Inhibitors La^{3+} mit 1 mM IndEt-IleMe behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 1 % EtOH. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren 4 unabhängige Experimente.

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass La^{3+} neben der Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms durch die Plasmamembran eine zweite, unbekannte Wirkung auf die Zellen ausübt, die zur Unterdrückung der Calciumantworten im Zellkern führte. Denkbar wäre z.B. eine Aufnahme von La^{3+} in die Zelle mit anschließender Blockierung intrazellulärer Calciumkanäle. Die Aufnahme von La^{3+} in BY-2-Zellen konnte abgeschätzt werden, da La^{3+} wie Ca^{2+} die Eigenschaft besitzt, Aequorin zu entladen (Kemple et al., 1990), wie in Kontrollmessungen mit extrahiertem Aequorin festgestellt wurde. BY-2_{cyt}-Zellen reagierten auf die Zugabe von 1 mM $LaCl_3$ mit einer geringen Lichtemission, die nicht durch mechanische Stimulierung der Zellen verursacht wurde und daher wahrscheinlich auf die Entladung des cytosolischen Aequorins durch La^{3+} zurückzuführen ist. Die Lichtemission entsprach etwa 3,8 % des eingesetzten $LaCl_3$. Da die Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms durch die Plasmamembran relativ hohe La^{3+} -Konzentrationen (0,1 mM bis 1 mM) erforderte, ist es eher unwahrscheinlich, dass die geringen La^{3+} -Mengen, die ins Innere der Zelle gelangten, durch Blockierung von intrazellulären Ca^{2+} -Kanälen für den Ausfall der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten verantwortlich waren. Natürlich können aber andere La^{3+} -Effekte nicht ausgeschlossen werden. Solch ein unbe-

kannter Effekt müsste dann allerdings auch von EGTA ausgeübt werden, da EGTA die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten ebenfalls unterdrückte.

Diese Überlegungen führen zu dem Schluss, dass die Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort vom $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg die wahrscheinlichste Interpretation darstellt, auch wenn damit zwei verschiedene Arten von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten sehr ähnliche $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auslösen würden.

3.3. Einfluss von Rutheniumrot auf die Calciumantworten im Zellkern

Da die cytosolischen $[Ca^{2+}]$ -Änderungen durch RR beeinflusst wurden, müsste sich im Fall von $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -abhängigen $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten eine entsprechende Auswirkung der RR-Behandlung im Zellkern zeigen. Tatsächlich wurden die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten auf JA und Ind durch RR teilweise gehemmt (Abb. 28A und B). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass durch RR Calciumkanäle blockiert wurden, die direkt am $[Ca^{2+}]$ -Anstieg im Zellkern mitwirken.

Auch die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auf IndEt-IleMe wurde durch RR inhibiert (Abb. 28D), der Natur dieser Antwort entsprechend ohne konzentrationsabhängige Verzögerung (vgl. Abb. 22A). Der Einfluss von RR auf den sehr schwachen IndEt-IleMe-induzierten cytosolischen $[Ca^{2+}]$ -Anstieg (Abb. 21C) wurde nicht untersucht, so dass auch hier unklar bleibt, ob RR direkt oder indirekt auf die $[Ca^{2+}]$ -Änderung im Zellkern wirkt.

Die durch OPDA induzierte $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort war ebenfalls empfindlich gegenüber RR (Abb. 28C). Da dieser Inhibitor die cytosolische Ca^{2+} -Antwort auf OPDA kaum beeinflusste (Abb. 25A), scheint hier erstmals ein Hinweis auf einen direkten RR-Effekt im Zellkern vorzuliegen. Es wird jedoch daran erinnert, dass das Ergebnis des BY-2_{cyt}-Experiments mit OPDA und RR nicht durch Wiederholungen bestätigt wurde.

Die pharmakologischen Untersuchungen deckten die Notwendigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} für jasmonatinduzierte Calciumantworten in Cytosol und Zellkern auf. Des Weiteren scheinen die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antworten auf JA und Ind durch CICR über RyR-ähnliche Kanäle verstärkt zu werden, und eventuell sind auch an der Entstehung der $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten RyR-ähnliche Kanäle direkt oder indirekt beteiligt. Die vorsichtige Formulierung der Schlussfolgerungen in diesem Kapitel beruht darauf, dass Inhibitoren für Calciumkanäle trotz häufiger Verwendung nicht unumstritten sind und immer nur indirekte „Beweise“ liefern. Deshalb beschränkte sich in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von Inhibitoren auf La^{3+} und RR, mit dem vorrangigen Ziel, die Wirkungsweisen auf $[Ca^{2+}]_{cyt}$ - und $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -

Antworten zu vergleichen. Die meist übereinstimmenden Inhibitoreffekte auf beide Ca^{2+} -Antworten deuten darauf hin, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort vom $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg abhängt. Weitere Inhibitoren, etwa für IP_3 - oder TRP-Kanäle, wurden aus genanntem Grund nicht verwendet.

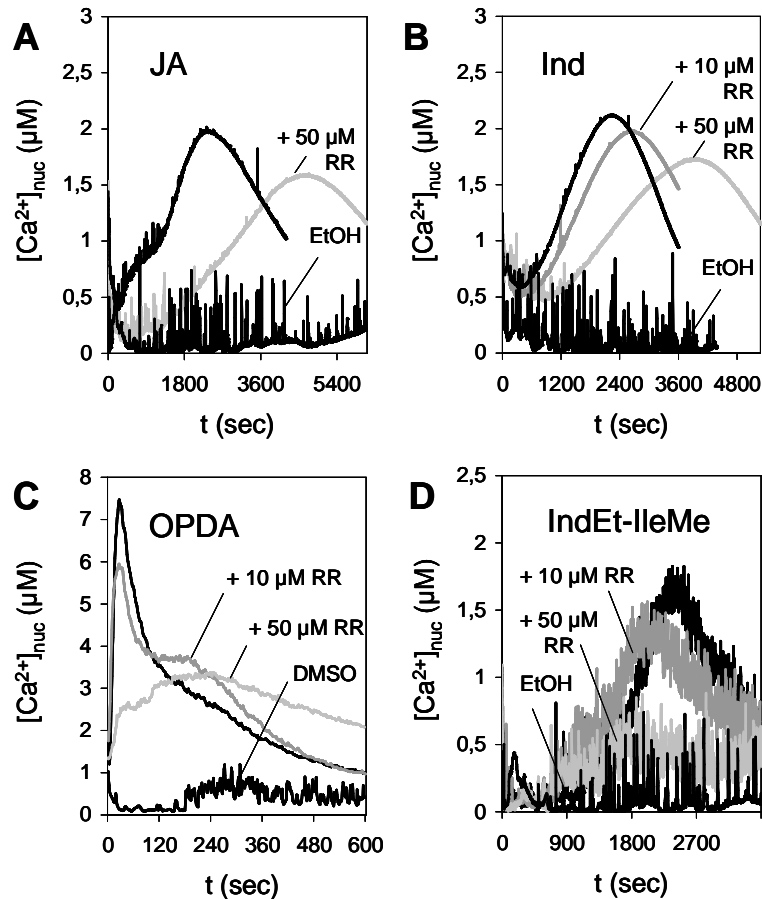


Abb. 28: Inhibition der Calciumantworten auf OPDA, JA, Ind und IndEt-IleMe im Zellkern durch Rutheniumrot

Tabak-BY-2_{nuc}-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des Inhibitors RR mit 2 mM JA (A), 1 mM Ind (B), 0,5 mM OPDA (C) und 1 mM IndEt-IleMe (D) behandelt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren je mindestens 2 unabhängige Experimente.

4. Aufnahme und Stabilität von Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen

Für die Perzeption der Jasmonate sind zwei Möglichkeiten denkbar. Es könnte einen Rezeptor an der Oberfläche der BY-2-Zellen geben, der die Jasmonatsignale in cytosolische $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen übersetzt. Wenn aber die Erkennung der Signalmoleküle im

Inneren der Zelle stattfindet, müssten die exogen angebotenen Substanzen zunächst durch die Barriere der Plasmamembran dorthin gelangen. Dieser Schritt würde bereits eine Auswahl treffen, die sich in Aktivitätsunterschieden ausdrücken könnte, je nachdem, wie leicht ein Molekül die Plasmamembran passiert.

Da für die Calciummessungen alle verwendeten Effektoren in Konzentrationen eingesetzt werden mussten, die mindestens um einen Faktor 10 höher waren als für Phytohormone zu erwarten ist, könnte z.B. bei Perzeption im Zellinneren eine begrenzte Aufnahme der Signalmoleküle durch BY-2-Zellen als mögliche Ursache vermutet werden.

In der vorliegenden Arbeit war festgestellt worden, dass die Isoleucin-Konjugate von JA bzw. Ind bezüglich der Ca^{2+} -Antworten in Cytosol und Zellkern möglicherweise als eigenständige Signalmoleküle wirken, da sich ihr Aktivitätsprofil von dem der JA/Ind unterschied (Abb. 21). Ob und wie sich das Zusammenspiel von JA und JA-Ile bzw. Ind und Ind-Ile bei der Induktion der Ca^{2+} -Antworten gestaltet, hängt davon ab, ob in der Zelle eine Umwandlung der beiden Moleküle ineinander stattfindet oder nicht. Um sachdienliche Hinweise zu erhalten, wurde daher die Aufnahme von Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten durch BY-2-Zellen und das Schicksal der Konjugate im Inneren der Zellen untersucht.

4.1. Aufnahme von 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen

Der radioaktiv markierte 6-Azido-1-oxoindanoyl[^{14}C]isoleucinmethylester (IndAz[^{14}C]IleMe), der als C6-Substituent an Stelle der Ethylgruppe eine Azidogruppe trägt und funktionell dem IndEt-IleMe entspricht (Schüler et al., 1999; Schüler et al., 2001), wurde verwendet, um die Aufnahme der synthetischen Jasmonat-Analoga durch BY-2-Zellen zu untersuchen. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus IndEt-IleMe/IndAz[^{14}C]IleMe (30 Bq/nmol) behandelt, die im folgenden der Einfachheit halber als „IndEt-IleMe*“ bezeichnet wird. IndEt-IleMe* wurde in Endkonzentrationen von 0,1 mM bis 1 mM eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min, 15 min oder 1 h wurden die Zellen gewaschen und die Radioaktivität bestimmt. Da die Messung der Radioaktivität keine Unterscheidung zwischen aufgenommenem und an der Zelloberfläche haftendem IndEt-IleMe* erlaubte, wurde in Parallelansätzen die Bindung von IndEt-IleMe* an lysierte Zellen ermittelt, um dann von der IndEt-IleMe*-Gesamtmenge in und an intakten BY-2-Zellen subtrahiert zu werden.

Abb. 29 zeigt die Menge an aufgenommenem IndEt-IleMe* pro Gramm Frischgewicht der Zellen vor dem Hintergrund der entsprechenden $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort. Wenn man grob geschätzt annehmen würde, dass 1 g Zellen etwa einem Volumen von 1 ml entspräche, wären die in der Abbildung angegebenen Werte für aufgenommenes IndEt-IleMe* gleich-

bedeutend mit Konzentrationsangaben in mM. Die Akkumulation von IndEt-IleMe* in den Zellen erfolgte kontinuierlich und abhängig von der angebotenen Konzentration. Nach einer Stunde hatten die Zellen bei 1 mM IndEt-IleMe* im Puffer $1,25 \pm 0,18 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) aufgenommen (Abb. 29A); das würde einer intrazellulären IndEt-IleMe*-Konzentration entsprechen, die etwas höher wäre als die des Puffers. Gleiches gilt für $0,72 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) aufgenommenes IndEt-IleMe* bei 0,5 mM IndEt-IleMe* im Puffer (Abb. 29B) bzw. $0,20 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) bei 0,1 mM IndEt-IleMe* (Abb. 29C) jeweils nach einer Inkubationszeit von einer Stunde. Die Substanz schien recht effizient aufgenommen zu werden.

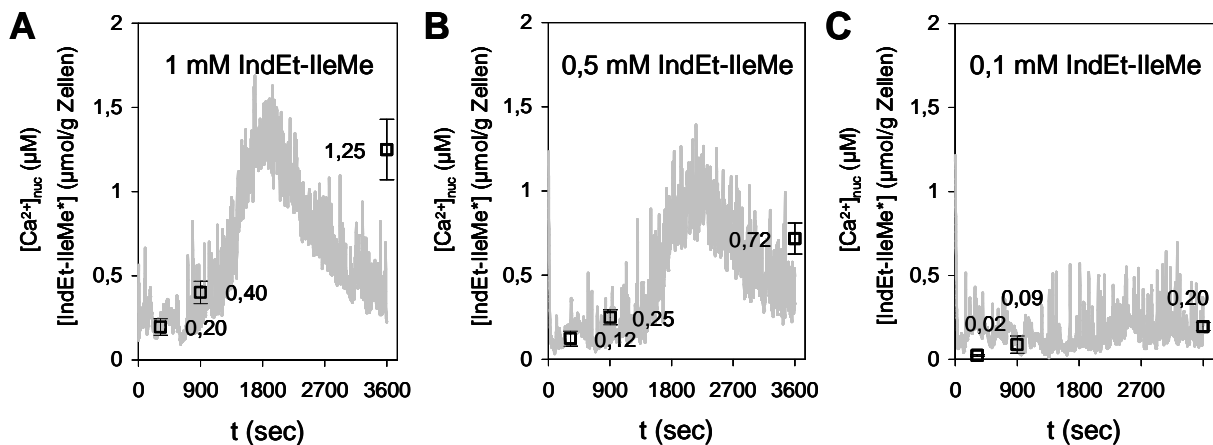


Abb. 29: Aufnahme von IndEt-IleMe/IndAz[^{14}C]IleMe in BY-2-Zellen

Intakte und lysierte Tabakzellen wurden mit 1 mM (A), 0,5 mM (B) und 0,1 mM (C) IndEt-IleMe/IndAz- ^{14}C IleMe (= IndEt-IleMe* mit 30 Bq/nmol) je 5 min, 15 min und 1 h inkubiert, anschließend gewaschen und die Radioaktivität bestimmt. Die Menge an aufgenommenem IndEt-IleMe* (\square) ergab sich durch Subtraktion der Radioaktivität der lysierten Zellen von der Gesamtradioaktivität der intakten Zellen und ist in $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht angegeben (je $n = 3$). Die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antworten (—) bei den jeweiligen IndEt-IleMe-Konzentrationen sind Abb. 22 entnommen.

Interessanter als der IndEt-IleMe*-Gehalt der Zellen nach einer Stunde sind die Werte zu Beginn der Ca^{2+} -Messung, da durch diese Konzentrationen die Ca^{2+} -Antworten ausgelöst würden, sofern die Erkennung der Signalmoleküle im Inneren der Zelle stattfände. Die Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern begann nach ca. 15 min anzusteigen. Die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auf 1 mM IndEt-IleMe würde damit von höchstens $0,40 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) (Abb. 29A) und die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auf 0,5 mM IndEt-IleMe von höchstens $0,25 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) (Abb. 29B) ausgelöst werden. Das Experiment mit 0,1 mM extrazellulärem IndEt-IleMe*

zeigt, dass die in 15 min aufgenommene Menge von $0,09 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ ($n = 3$) nicht ausreichte, um eine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auszulösen (Abb. 29C). Diese Daten belegen, dass die möglicherweise calciumauslösenden IndEt-IleMe-Konzentrationen im Zellinneren zwar niedriger als die exogen angebotenen Konzentrationen waren, trotzdem aber immer noch höher als für Phytohormone erwartet, die normalerweise im niedrig-mikromolaren Bereich wirksam sind.

4.2. Stabilität von 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten in BY-2-Zellen

Beim Struktur-Aktivitätsvergleich wurde die Frage aufgeworfen, ob in BY-2-Zellen eine Umwandlung von JA oder Ind in die entsprechenden Isoleucin-Konjugate oder umgekehrt eine Spaltung der Konjugate in JA/Ind und Ile stattfindet. Mit Hilfe von IndAz[^{14}C]IleMe wurde die Stabilität der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate in BY-2-Zellen durch chromatographische Analyse von Zellextrakten untersucht.

BY-2-Zellen wurden mit der oben beschriebenen IndEt-IleMe*-Mischung in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Nach 1 h Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen gewaschen und mit MeOH extrahiert, der Puffer mit Chloroform ausgeschüttelt und beide Extrakte durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit lysierten BY-2-Zellen durchgeführt. Als Referenzen für die Chromatographie dienten die Ausgangssubstanzen IndEt-IleMe und IndAz[^{14}C]IleMe sowie die denkbaren Spaltprodukte, nämlich IleMe und IndEt-Ile. Letzteres war durch alkalische Hydrolyse aus IndEt-IleMe hergestellt worden.

IndEt-IleMe und IndAz[^{14}C]IleMe zeigten übereinstimmendes Laufverhalten mit einem R_f -Wert von 0,88 (Abb. 30). IndAz[^{14}C]IleMe wurde natürlich im Puffer, aber auch im Zellextrakt in großer Menge nachgewiesen, während eine wesentlich geringere Menge an lysierte Zellen gebunden vorlag. Eine Abspaltung der Aminosäure aus IndEt-IleMe* scheint in BY-2-Zellen nicht stattgefunden zu haben, da weder im Puffer noch im Zellextrakt [^{14}C]IleMe mit einem erwarteten R_f -Wert von 0,75 gefunden wurde (Abb. 30). Auch eine Hydrolyse des Methylesters zu IndEt-Ile ($R_f = 0,58$) war nicht nachweisbar. Es gab zwar eine schwache radioaktive Markierung etwa auf Höhe von IndEt-Ile, die aber, wie einige andere Verunreinigungen, schon in der Originallösung von IndAz[^{14}C]IleMe vorhanden war und in den Extrakten wiedergefunden wurde.

Stattdessen wurden zwei nicht identifizierte radioaktive Produkte (S1 und S2) in bedeutenden Mengen nachgewiesen (Abb. 30). Es könnte sich um IndAz[^{14}C]IleMe-Abbauprodukte

unbekannter Art handeln oder um Substanzen, die stabil an IndAz[¹⁴C]IleMe oder IndAz-[¹⁴C]IleMe-Abbauprodukte gebunden sind. S1 ($R_f = 0,27$) wurde nur im Extrakt der intakten Zellen gefunden, scheint also in einem Prozess gebildet zu werden, der die lebende Zelle voraussetzt, oder eine IndAz[¹⁴C]IleMe-Verbindung mit einem löslichen Zellbestandteil darzustellen. S1 wurde von den Zellen nicht ins Medium abgegeben, da die Substanz im Extrakt des Puffers kaum nachweisbar war (Abb. 30). S2 ($R_f = 0,40$) dagegen wurde sowohl von lebenden als auch von lysierten Zellen gebildet. Es könnte sich um das Produkt eines membranständigen Enzyms handeln, das im Fall von lysierten Zellen hauptsächlich in den Puffer entlassen wurde und nur in geringer Menge an das Zellmaterial gebunden blieb, während es von intakten Zellen zum Teil ins Medium abgegeben wurde, zum Teil intrazellulär akkumulierte.

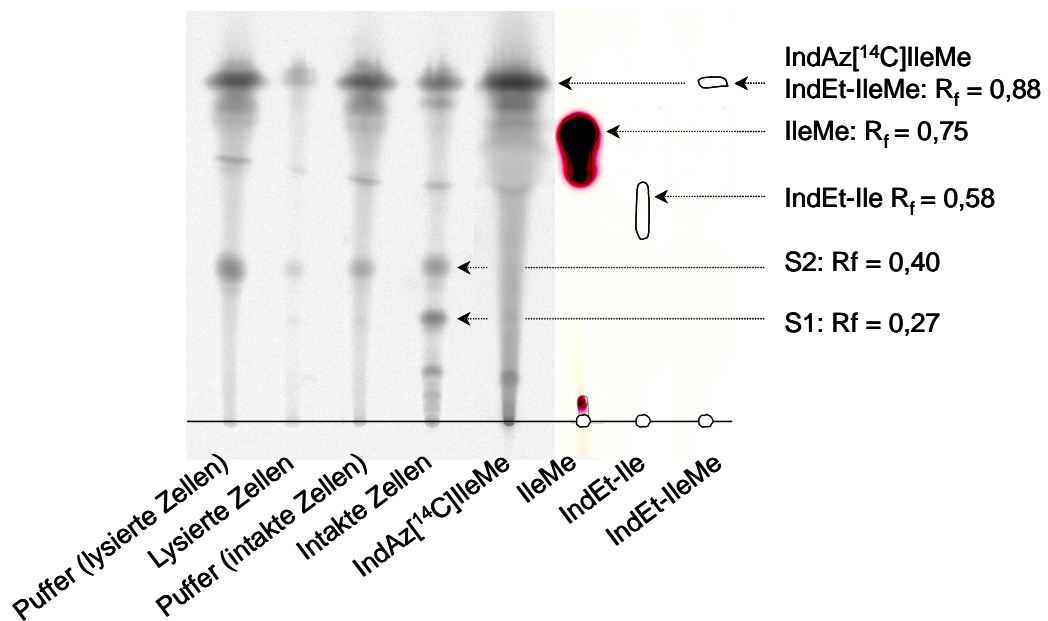


Abb. 30: Dünnschichtchromatographie von Extrakten der intakten und lysierten BY-2-Zellen sowie des Inkubationspuffers nach Behandlung mit IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe

Intakte und lysierte Tabakzellen wurden mit 1 mM IndEt-IleMe/IndAz[¹⁴C]IleMe (= IndEt-IleMe* mit 30 Bq/nmol) 1 h inkubiert, anschließend das Zellmaterial vom Inkubationspuffer getrennt, gewaschen und mit MeOH extrahiert. Der Puffer wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Beide Extrakte wurden eingengt und auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄-Platte mit Chloroform/MeOH 4/1 als Laufmittel chromatographiert. Als Referenzsubstanzen dienten IndAz[¹⁴C]IleMe, IndEt-IleMe, IndEt-Ile und IleMe. Die Radioaktivität wurde durch Autoradiographie nachgewiesen, IndEt-Ile und IndEt-IleMe durch UV-Bestrahlung der Kieselgelplatte und IleMe durch Reaktion mit Ninhydrin. Die gezeigte Chromatographie stellt eines von zwei übereinstimmenden Ergebnissen dar.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass IndEt-IleMe* im Laufe der Calciummessung zum Großteil unverändert in der Zelle akkumulierte ohne IndEt-Ile oder IleMe zu bilden, so dass man das vollständige Konjugat für die Induktion der Ca^{2+} -Antworten verantwortlich machen möchte. Die Präsenz der beiden unbekannt Substanzen S1 und S2 jedoch verhindert eine sichere Aussage.

5. Genexpressionsstudien in BY-2-Zellen mit Jasmonaten und synthetischen Analoga

Wenn die durch Jasmonate induzierten Änderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen in Cytosol und Zellkern Elemente einer Signaltransduktionskaskade sind, muss es zelluläre Reaktionen geben, die durch diese Jasmonate ausgelöst werden und bei Unterdrückung der Ca^{2+} -Antworten, z.B. durch den Inhibitor La^{3+} , ausbleiben. Da die Expression vieler Gene durch Jasmonate induzierbar ist (Stintzi et al., 2001; Goossens et al., 2003), sollte zum Abschluss dieser Arbeit an einem oder mehreren Beispielen die calciumabhängige Genexpression gezeigt werden. Die Auswahl der Gene erwies sich aber als unerwartet schwierig, so dass dieses letzte Kapitel eher den Charakter eines Ausblicks hat.

Die Auswahl geeigneter Gene war deshalb schwierig, weil die Calciumantworten nur unter besonderen Bedingungen ausgelöst werden konnten. Erstens musste das L&S-Medium durch BY-2-Puffer (siehe Methoden 1.7.) ausgetauscht werden, der weder Saccharose noch das Wachstumshormon 2,4-D (Auxin) enthielt. Versuche mit IndEt-IleMe hatten gezeigt, dass BY-2-Zellen in L&S-Medium nicht mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Anstieg antworteten. Zweitens musste die BY-2-Zellkultur in der stationären Phase sein. Zellen einer 7 Tage alten Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, reagierten weder auf IndEt-IleMe noch auf JA mit den beschriebenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antworten. Drittens waren für die Induktion der Calciumantworten außergewöhnlich hohe Effetorkonzentrationen nötig. Die in der Literatur beschriebenen Genexpressionsstudien wurden dagegen mit Zellkulturen durchgeführt, die sich in der exponentiellen Phase befanden, wobei als Induktor meist MeJA in Konzentrationen von 50 μM oder 100 μM eingesetzt wurde. Ausgerechnet MeJA aber löste keine Calciumantworten aus (Abb. 18).

Da Auxin die Induktion von Ca^{2+} -Signalen in BY-2-Zellen verhinderte und bekannterweise die Nikotinproduktion in Tabakpflanzen hemmt (Hibi et al., 1994), wurde die Ornithin-Decarboxylase (ODC) als erster Kandidat ausgewählt. Die ODC ist an der Biosynthese von

Polyaminen und Nikotin beteiligt, und ihre Transkripte akkumulieren in BY-2-Zellen bei Behandlung mit Jasmonaten innerhalb von 1 Stunde (Imanishi et al., 1998).

BY-2-Zellen einer 12 bis 14 Tage alten Kultur wurden in An- oder Abwesenheit von 1 mM LaCl_3 mit 1,5 mM JA, 0,3 mM OPDA, 1 mM Ind-IleMe bzw. 1 mM IndEt-IleMe versetzt, ohne Schütteln im Dunkeln inkubiert, nach 3 h geerntet, die Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben, um sie durch real-time PCR zu analysieren. Durch Vitalitätsfärbung mit FDA wurde sichergestellt, dass die Zellen die dreistündige Inkubation überlebt hatten. Auch die Menge und die gute Qualität der erhaltenen RNA bestätigten, dass die Zellen kurz vor der Ernte noch am Leben waren.

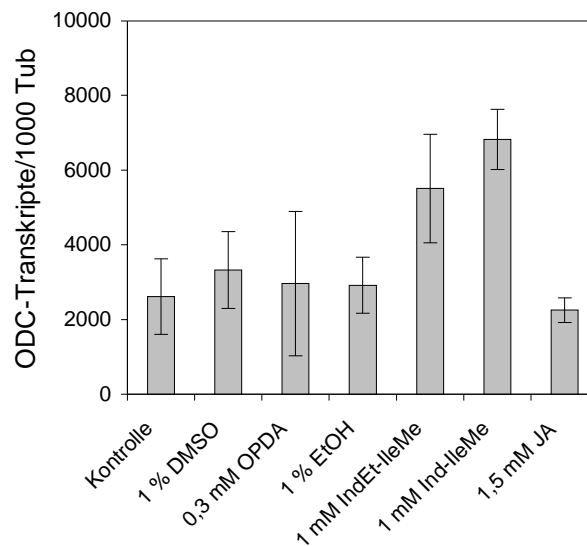


Abb. 31: Induktion der ODC-Expression in BY-2-Zellen unter den Versuchsbedingungen für die Calciummessung

BY-2-Zellen einer 12 bis 14 Tage alten Kultur wurden in BY-2-Puffer (siehe Methoden 1.7.) mit JA, OPDA, Ind-IleMe, IndEt-IleMe bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln 3 h inkubiert, dann Gesamt-RNA extrahiert und die daraus resultierende cDNA mit einem ODC-spezifischen Primerpaar durch qRT-PCR analysiert. Als interner Standard diente γ -Tubulin. Die ODC-Transkriptmengen sind jeweils pro 1000 γ -Tubulin-Transkripte angegeben und stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Mit γ -Tubulin als internem Standard wurde zunächst die Akkumulation der ODC-Transkripte in Abwesenheit von La^{3+} untersucht. Es wurden sowohl für Tubulin als auch für ODC die gewünschten PCR-Produkte erhalten, wie durch Schmelzkurven, Agarosegel-Elektrophorese und Sequenzierung festgestellt wurde. OPDA und JA hatten keinen Einfluss auf die Expression der ODC (Abb. 31). Durch die Behandlung der Zellen mit IndEt-IleMe oder Ind-

IleMe wurde die ODC-Transkriptmenge in etwa verdoppelt. Diese geringe Erhöhung der Transkriptmenge, zusammen mit den großen Standardabweichungen, lässt bezweifeln, dass hier eine wirkliche Induktion der Genexpression durch die Indanoyl-Isoleucin-Konjugate vorliegt. Im Falle einer Induktion würde dieses Ergebnis darauf hindeuten, dass die Expression der ODC nicht von den Ca^{2+} -Antworten reguliert wird, da zwar IndEt-IleMe eine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auslöste (Abb. 22), Ind-IleMe aber inaktiv war.

Um zu prüfen, ob die beobachteten Schwankungen der Transkriptmengen von Bedeutung waren, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen für die Induktion der ODC-Expression (Imanishi et al., 1998), wurde MeJA als Induktor eingesetzt, um eine bestmögliche Induktion der ODC-Expression als Vergleichswert zu erhalten. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich die besonderen Bedingungen, die Voraussetzung für die Induktion der Calciumantworten waren, auf die Induktion der ODC-Expression auswirkten. Es wurden sowohl BY-2-Zellen einer 7 Tage alten Kultur als auch einer 14 Tage alten Kultur verwendet, die sich, abweichend von den Bedingungen für die Ca^{2+} -Messung, nicht in BY-2-Puffer, sondern in L&S-Medium ohne 2,4-D befanden (Goossens et al., 2003; Imanishi et al., 1998). Außerdem wurde die Inkubationszeit auf 9 Stunden verlängert und jeweils Jasmonatkonzentrationen von 50 μM und 1 mM verglichen. Neben MeJA wurde auch JA als Induktor verwendet.

Abb. 32A zeigt bei Behandlung mit 50 μM MeJA einen 7fachen Anstieg der ODC-Expression in der 7 Tage alten Kultur. Bereits nach 3 h war die maximale Transkriptmenge akkumuliert, die bis 9 h nach Induktion unverändert blieb. Die Erhöhung der MeJA-Konzentration auf 1 mM führte zum gleichen Ergebnis. Auch 50 μM JA induzierte die Expression der ODC, nach 3 h im gleichen Ausmaß wie MeJA und nach 6 h mit einer Steigerung der Transkriptmenge auf das 14fache der Kontrolle, um im Lauf der nächsten 3 h wieder auf die 7fache Menge abzunehmen (Abb. 32A). Diese starke Induktion der ODC-Expression demonstriert, dass die beobachtete Verdoppelung der Transkriptmenge durch Indanoyl-Isoleucin-Konjugate unter den Versuchsbedingungen der Calciummessung (Abb. 31) keine vergleichbare Induktion der Genexpression darstellt. Die Induktion der ODC-Expression hängt offensichtlich nicht vom Alter der Zellkultur ab, da die Transkriptmengen in 14 Tage alten Zellen mit denen in 7 Tage alten Zellen in etwa übereinstimmten (Abb. 32B).

Aus ungeklärten Gründen führte die Behandlung mit 1 mM JA zum Tod der Zellen, so dass eine denkbare Hemmung der JA-induzierten ODC-Expression bei erhöhter JA-Konzentration nicht ausgeschlossen werden kann. Der durch 1 mM JA verursachte Zelltod wurde

nicht weiter untersucht und bleibt ungeklärt, da weder bei den Calciummessungen mit bis zu 2 mM JA noch im zugehörigen Genexpressionsversuch (Abb. 31) mit 3-stündiger Inkubation der Zellen derartige Probleme aufgetreten waren. Der einzige Unterschied zwischen den Calciummessungen und dem Kontrollexperiment zur Genexpression bestand in der Verwendung von (-)-JA und BY-2-Puffer bei ersteren bzw. (±)-JA und L&S-Medium in letzterem. Man möchte den Anteil an (+)-JA für die letale Wirkung verantwortlich machen, wofür es aber keine Hinweise gibt.

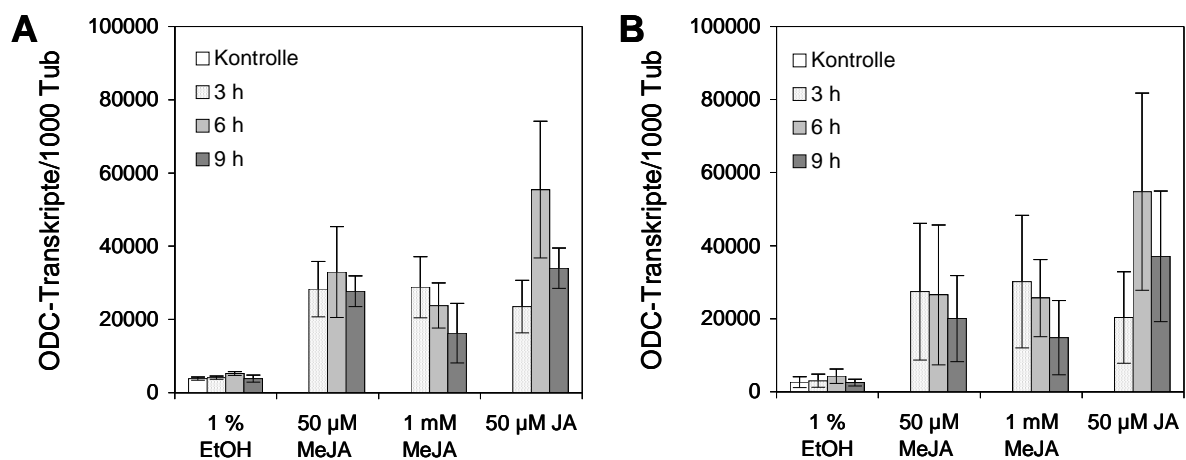


Abb. 32: Induktion der ODC-Expression in BY-2-Zellen unter Versuchsbedingungen, die keine Induktion von Calciumantworten erlauben

BY-2-Zellen einer 7 Tage alten Kultur (**A**) und Zellen einer 14 Tage alten Kultur (**B**) wurden in L&S-Medium ohne 2,4-D mit 50 µM MeJA, 1 mM MeJA, 50 µM JA bzw. dem Lösungsmittel EtOH bis zu 9 h inkubiert, dann Gesamt-RNA extrahiert und die daraus resultierende cDNA mit einem ODC-spezifischen Primerpaar durch qRT-PCR analysiert. Als interner Standard diente γ -Tubulin. Die ODC-Transkriptmengen sind jeweils pro 1000 γ -Tubulin-Transkripte angegeben und stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass die Expression der ODC wahrscheinlich nicht durch die Calciumsignale in Cytosol und Zellkern reguliert wird, da sowohl JA als auch MeJA die ODC-Expression unter Bedingungen induzierten, die keine Induktion von Calciumantworten erlaubten (Abb. 32), während umgekehrt unter den Bedingungen der Ca^{2+} -Messung keine Steigerung der ODC-Expression beobachtet wurde (Abb. 31). Folglich wurde von der Analyse der Induktionen in Gegenwart des Inhibitors La^{3+} Abstand genommen.

Zwei weitere jasmonatresponsive Gene wurden untersucht, nämlich das einer 5-*epi*-Aristolochen-Synthase (Facchini und Chappell, 1992) für die Biosynthese der Sesquiterpene und das einer Endochitinase (Shinshi et al., 1987) als Vertreter allgemeiner Abwehrgene, sowie das Gen der Cysteinprotease CP-23 (Ueda et al., 2000), deren Expression während der Seneszenz erhöht wird. Bei keinem dieser Gene konnte durch Behandlung der Zellen mit OPDA, JA, IndEt-IleMe oder Ind-IleMe unter den Bedingungen der Calciummessung eine Zunahme der Transkriptmenge festgestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die sehr speziellen Bedingungen für die Induktion von Calciumantworten viele der bekannten jasmonatinduzierbaren Gene nicht in Frage kommen, um im Zusammenhang mit den Ca^{2+} -Signalen untersucht zu werden. Wenn es eine Gruppe von Genen gibt, deren Expression unter diesen besonderen Bedingungen durch Jasmonate aktiviert wird, wäre es wahrscheinlich, dass die Induktion der Genexpression von den beschriebenen Ca^{2+} -Signalen abhängt. Eine solche Gruppe von Genen dürfte am besten in einem Microarray-Ansatz zu finden sein.

F Diskussion

1. Die Suche nach einem Jasmonatrezeptor

In jüngster Zeit hat die Hormonforschung in Pflanzen mit der Entdeckung mehrerer Rezeptoren einen bedeutenden Sprung gemacht. Der ehemals kleine Kreis bekannter Rezeptoren für Ethylen, Cytokinine und Brassinosteroide wurde durch die Identifizierung von Gibberellin-, Abscisinsäure (ABA)- und Auxinrezeptoren erweitert (Bishopp et al., 2006). Es handelt sich dabei um Proteine unterschiedlicher Art und Lokalisierung, die alle unter anderem in *Arabidopsis* beschrieben wurden. Die fünf bekannten Ethylenrezeptoren bilden eine Familie von Histidinkinase-Rezeptoren (Schaller und Bleecker, 1995; O'Malley et al., 2005), die wahrscheinlich alle in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums verankert sind, wie für den am besten charakterisierten Rezeptor ETR1 gezeigt wurde (Chen et al., 2002). Für die Perzeption von Cytokinin ist ebenfalls eine Familie von Histidinkinase-Rezeptoren bestehend aus drei Mitgliedern verantwortlich (Yamada et al., 2001). Für eines dieser Proteine, AHK3, wurde die Lokalisierung in der Plasmamembran nachgewiesen (Kim et al., 2006). Brassinosteroide werden durch drei verwandte LRR (leucine-rich-repeat)-Rezeptorkinasen in der Plasmamembran erkannt (Cano-Delgado et al., 2004; Wang et al., 2001). Bei dem Gibberellinrezeptor *GID1* in Reis handelt es sich um ein lösliches Protein im Zellkern (Ueguchi-Tanaka et al., 2005); in *Arabidopsis* wurden drei entsprechende Rezeptoren beschrieben (Nakajima et al., 2006). Die vier bisher bekannten Auxinrezeptoren sind zellkernlokalisierte, lösliche F-box-Proteine mit LRR-Domänen (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005), der ABA-Rezeptor *FCA* ein ebenfalls zellkernlokalisiertes RNA-bindendes Protein (Razem et al., 2006). Einen weiteren ABA-Rezeptor stellt die H-Untereinheit der Mg-Chelatase in Chloroplasten dar (Shen et al., 2006).

Jasmonate finden in Übersichtsartikeln über Phytohormonrezeptoren oder -bindestellen keine Erwähnung, da bisher weder genetische noch biochemische Bemühungen sachdienliche Hinweise hervorgebracht haben.

1.1. Der Radioligand

In der vorliegenden Arbeit wurde ein biochemischer Ansatz gewählt, um unter Verwendung des synthetischen Jasmonat-Analogons 6-Azido-1-oxoindanoyl[¹⁴C]isoleucinmethylester

(IndAz[¹⁴C]IleMe) (Schüler et al., 1999) als Radioligand eine mutmaßliche Bindestelle für Jasmonate zu untersuchen. Die Qualität des Liganden hinsichtlich biologischer Aktivität, chemischer Reinheit, Markierung und zusätzlicher Eigenschaften wie z.B. Photoaktivierbarkeit ist für den Erfolg einer solchen Strategie ausschlaggebend. IndAz[¹⁴C]IleMe bot sich als vielversprechender Kandidat für die Suche nach einer Jasmonatbindestelle in Sojabohne an, da Indanoyl-Isoleucin-Konjugate wie Jasmonate in der Sojabohne-Zellkultur SH63 Auslöser der Akkumulation von Glyceollinen, den Phytoalexinen der Sojabohne, sind (Fliegmann et al., 2003). Die 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugate IndAz-IleMe und IndEt-IleMe entsprechen in ihrer Aktivität der äußerst wirkungsvollen OPDA, das unsubstituierte Konjugat Ind-IleMe bewirkt eine geringere und damit eher JA-ähnliche Glyceollinproduktion. Die Verstärkung der biologischen Aktivität durch den C6-Substituenten stellte einen glücklichen Zufall dar, durch den die Ausstattung des Liganden mit einer Azidogruppe für die Photoaffinitätsmarkierung des erwarteten Bindeproteins mit optimaler biologischer Aktivität gekoppelt war (Schüler et al., 1999). Auch die chemische Reinheit des verwendeten IndAz[¹⁴C]IleMe-Präparats war zufriedenstellend (Abb. 12). Die einzige Schwäche des IndAz[¹⁴C]IleMe bestand in der vergleichsweise geringen spezifischen Radioaktivität von 10 GBq/mmol, die dafür verantwortlich war, dass nur eine niedrigaffine Bindestelle in Sojabohne nachgewiesen werden konnte (Abb. 10). Für den Nachweis einer hochaffinen Bindestelle wäre ein Radioligand mit höherer spezifischer Radioaktivität erforderlich gewesen. Etwa 10 TBq/mmol sollte ein Radioligand besitzen, wie beispielsweise die Bindungsstudien mit ¹²⁵I-HG-APEA in Sojabohne zeigen (Cosio et al., 1996). Einige Versuche waren unternommen worden, IndAz-IleMe mit Tritium (IndAz[³H]IleMe) oder Iod (¹²⁵I-Ind-IleMe) zu markieren, jedoch ohne Erfolg.

In Japan bemüht man sich ebenfalls um die Identifizierung von Jasmonatbindeproteinen auf biochemischem Wege. Es liegt ein Bericht über die Herstellung von Jasmonsäurederivaten vor, die eventuell als Liganden in Frage kommen könnten (Jikumaru et al., 2004). Ein JA-Dexamethason-Heterodimer, ein JA-Biotin-Konjugat und verschiedene JA-Aminosäure-Konjugate – für letztere wurde die Markierung mit [³H]Aminosäuren vorgeschlagen – zeigten in Reis- und Sojabohnebiotests JA-ähnliche biologische Aktivität und wurden daher als geeignete chemische Sonden vorgestellt. Ein JA-Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat war nicht aktiv. Etwas weiter fortgeschritten scheint ein Projekt zu sein, das sich auf Coronatinderivate als potenzielle Liganden konzentriert (Suzuki et al., 2004). Coronatin ist ein Phytotoxin aus *Pseudomonas syringae*, das strukturelle Ähnlichkeit mit OPDA aufweist und zahlreiche jasmonatspezifische biologische Antworten in verschiedenen Systemen auslöst, oft weit effektiver als Jasmonate selbst (Weiler et al., 1994). Die Coronatinstruktur diente

übrigens als Vorlage für die Synthese der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate (Schüler et al., 1999). Nachdem von Suzuki et al. (2004) die biologische Aktivität von JA, Coronatin, Dihydrocoronatin und anderen Coronatinderivaten in Form von Induktion der Duftstoffemission in Reis gezeigt worden war, hatten die Autoren eine Bindungsstudie mit [4,5-³H]-Dihydrocoronatin angekündigt, deren Ergebnis noch auf sich warten lässt. Ein Vorteil dieses Radioliganden dürfte seine spezifische Radioaktivität von 2,04 TBq/mmol sein.

1.2. Die Spezifität und Affinität der Bindestelle

Mit IndAz[¹⁴C]IleMe wurde in Sojabohne eine niedrigaffine spezifische Bindestelle hoher Kapazität nachgewiesen (Abb. 9B, 10A und B). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dieser IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle um keinen Rezeptor handelt. Alle bekannten Phytohormonrezeptoren sind hochaffine Bindestellen mit K_d -Werten der jeweiligen Hormone im niedrig-nanomolaren Bereich (Napier, 2004; Kepinski and Leyser, 2005; Razem et al., 2006), mit Ausnahme von Gibberellin, für dessen Bindung an *GID1* eine Dissoziationskonstante von 1,4 μ M angegeben wird (Ueguchi-Tanaka et al., 2005).

Gegen das Vorliegen eines Rezeptors sprechen auch die relativen Affinitäten verschiedener Jasmonate und Indanoyl-Isoleucin-Konjugate zur IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle (Abb. 11), die nicht mit der biologischen Aktivität dieser Substanzen in Sojabohne bezüglich der Akkumulation von Glyceollinen korrelieren (Fliegmann et al., 2003). Theoretisch könnte die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle der Jasmonatperzeption für andere biologische Antworten in Sojabohne dienen, da mehr als ein Rezeptor vorhanden sein dürfte, wie es am Beispiel der Abscisinsäure gezeigt wurde. ABA kontrolliert über den Rezeptor FCA die Blühzeit (Razem et al., 2006), während bei ABA-Perzeption durch die Mg-Chelatase H Samenkeimung, Wachstum des Keimlings und Bewegung der Stomata reguliert werden (Shen et al., 2006). Da aber die Konkurrenz der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung durch die natürlichen Jasmonate eher dürftig ausfiel (Abb. 11A), ist nicht nur eine Rezeptorfunktion unwahrscheinlich, sondern es könnte grundsätzlich die physiologische Relevanz dieser Bindestelle für die untersuchten Jasmonate ernsthaft bezweifelt werden. Eine gewisse Glaubwürdigkeit gewinnt das Bindungsphänomen durch die auffallende Strukturabhängigkeit der Ligandenspezifität. Sowohl bei den Jasmonaten (JA/MeJA) als auch bei den synthetischen Analoga (Ind-Ile/Ind-IleMe) wurden jeweils die Methylester den freien Säuren als Liganden vorgezogen (Abb. 11). Diese Tendenz lässt vermuten, dass der Methylester von OPDA möglicherweise ein guter Kompetitor und damit ein Kandidat für einen natürlichen Ligand wäre. Mangels Verfügbarkeit von MeOPDA konnte diese Möglichkeit jedoch

nicht überprüft werden. Denkbar wäre auch, dass JA-Isoleucin-Konjugate die natürlichen Liganden wären, da die Bindestelle nur Indanoyl-Isoleucin-Konjugate, nicht aber deren Bausteine Ind oder IleMe akzeptierte (Abb. 11B). Dies wäre zu prüfen. Die IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindestelle kann daher nur unter Vorbehalt als Jasmonatbindestelle bezeichnet werden.

1.3. Die Überprüfung von COI1 als Bindestelle für IndAz[¹⁴C]IleMe

Nachdem das F-box-Protein TIR1 einen Auxinrezeptor darstellt (Dharmasiri et al., 2005), wurde das mit TIR1 verwandte lösliche F-box-Protein COI1, das an der Jasmonat-Signaltransduktion beteiligt ist (Devoto et al., 2002), einem Bindungstest unterzogen. In löslichen Proteinfractionen aus Wildtyp-Kartoffelpflanzen und *coi1*-Mutanten wurde keine IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindung gefunden. Der Nachweis einer möglichen Bindung von IndAz-IleMe an COI1 würde einen Radioligand mit höherer spezifischer Radioaktivität oder eine stark angereicherte Präparation des COI1-Proteins erfordern.

Die niedrigaffine IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle dagegen wurde auch in der Kartoffelpflanze gefunden (Tab. 2, wt) und durch die *coi1*-Mutation nicht merklich beeinflusst.

2. Die potenzielle Jasmonatbindestelle

Auch wenn mit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle offensichtlich kein Jasmonatrezeptor vorliegt, kann sie dennoch als potenzielle Jasmonatbindestelle von physiologischer Bedeutung sein, etwa für Transport, Speicherung oder Metabolismus der Jasmonate. Ob das der Fall sein könnte, soll in einer kritischen Betrachtung ihrer Eigenschaften erwogen werden.

Für andere Phytohormone, vor allem Auxin und Cytokinin, wurden neben den genannten Rezeptoren zahlreiche Bindeproteine verschiedenster subzellulärer Lokalisierung beschrieben, deren Funktion meist nicht bekannt ist (Palme, 1993; Arzanova et al., 2002). Einige zeigen mit K_d -Werten im mikromolaren Bereich nur geringe Affinität für die jeweiligen Phytohormone. Da Bindestellen aber mit dem Ziel untersucht werden, Kandidaten für Rezeptoren zu finden, beschränkt sich die Charakterisierung dieser nebenbei anfallenden niedrigaffinen Bindeproteine gewöhnlich auf die Angabe der Dissoziationskonstante.

2.1. Die Lokalisierung der Bindestelle in der Wurzel

Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle wurde in mehreren Pflanzenarten aus drei verschiedenen Familien nachgewiesen (Tab. 2) und scheint demnach im Pflanzenreich weit verbreitet zu sein. Innerhalb der Pflanze konzentrierte sich das Vorkommen der Bindestelle auf die Wurzel, wie am Beispiel der Sojabohne gezeigt ist (Abb. 6) und auch bei *Medicago*, Kartoffel, Tabak und *Arabidopsis* festgestellt wurde. Das organspezifische Vorkommen der Bindestelle legt nahe, dass es sich bei dem beobachteten Bindungsphänomen um kein zufälliges Ereignis oder gar Artefakt handelt und kann als Hinweis auf eine biologische Funktion der Bindestelle in der Wurzel verstanden werden. In einer Sojabohnepflanze im Normalzustand ist der JA-Gehalt in jungen Blättern, Blüten und Früchten am höchsten, in Wurzeln eher gering (Creelman und Mullet, 1995). Umso größer ist die Zahl der jasmonat-regulierten Prozesse in der Wurzel. Einige Beispiele mögen die Rolle der Jasmonate in diesem unterirdischen Pflanzenorgan illustrieren. MeJA hemmt das Längenwachstum der Primärwurzel in *Arabidopsis* (Staswick et al., 1992), während die Bildung von Wurzelhaaren durch MeJA, JA und Ethylen gefördert wird (Zhu et al., 2006). In Rapswurzeln hemmt MeJA die Aufnahme von Nitrat (Rossato et al., 2002). Die arbuskuläre Mykorrhiza in Gerste und *Medicago truncatula* geht mit dem Anstieg der endogenen JA-Konzentration der betroffenen Zellen einher und ist von dieser abhängig (Hause et al., 2002; Isayenkov et al., 2005). Die Reaktion von *Medicago truncatula* auf Rhizobien wird durch Ethylen und JA kontrolliert (Sun et al., 2006a). In Reis regulieren Jasmonate zusammen mit ABA die Reaktion auf Salzstress (Moons et al., 1997); Cadmium induziert die Akkumulation von Jasmonaten in Erbsenwurzeln (Rodriguez-Serrano et al., 2006). Im Rahmen der zahlreichen jasmonatinduzierten Abwehrreaktionen bewirken Jasmonate in verschiedenen Pflanzen Resistenz beim Befall der Wurzel durch Bodenpilze und Nematoden (Staswick et al., 1998; Vijayan et al., 1998; Cooper et al., 2005). Grundsätzlich ist daher zu erwarten, dass die Wurzel über Jasmonatbindestellen verfügt, vielleicht auch über solche, die ausschließlich an wurzelspezifischen Prozessen beteiligt sind und deshalb nur dort vorkommen.

2.2. Die Lokalisierung der Bindestelle in der Zellwand

Auf zellulärer Ebene erwies sich die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle als zellwandständig (Abb. 7). Unter den Bindeproteinen für andere Phytohormone finden sich ebenfalls solche, die in Wurzeln vorkommen, jedoch keine in der Zellwand (Arzanova et al., 2002). Möglicherweise gibt es für andere Phytohormone keine Bindestellen in der Zellwand. Wahr-

scheinlicher ist aber, dass solche bisher nicht gefunden wurden, da man üblicherweise nur in Mikrosomen und löslichen Fraktionen nach Bindestellen sucht, während die Zellwand vernachlässigt wird.

Obwohl unerwartet, ist eine Jasmonatbindestelle in der Zellwand bei genauerer Betrachtung nicht abwegig. Exogen verabreichte JA akkumuliert in Tomatenblättern im Apoplast, wird scheinbar nicht in die Zellen aufgenommen und induziert aus dieser extrazellulären Position heraus auch bei unterdrückter JA-Biosynthese die Expression des JA-responsiven Proteinase-Inhibitor II-Gens PIN2. Im Laufe der 24-stündigen Inkubation bleibt, neben der Entstehung einiger saurer, nicht näher beschriebener JA-Metaboliten, der Großteil der applizierten JA als freie JA erhalten (Bücking et al., 2004). Diesem Bericht ist eine mögliche Bedeutung des extrazellulären Raums für den Jasmonathaushalt sowie die scheinbare JA-Perzeption an der Plasmamembran zu entnehmen.

Die extrazelluläre Ansammlung freier JA ist nicht ohne weiteres zu erwarten, da es sich um eine hydrophobe, schwache Säure mit einem pK_s -Wert von 4,5 handelt (Dathe et al., 1993). Im leicht sauren Milieu der Zellwand (pH ca. 5-6) (Grignon und Sentenac, 1991) liegen solche Moleküle zum Teil undissoziiert vor, sind in dieser Form membrangängig, werden von der Zelle aufgenommen, dissoziieren im neutralen Cytosol (pH ca. 7,2) (Kurkdjian und Guern, 1989) und können als geladene Moleküle die Plasmamembran nicht mehr passieren, so dass es zu einer Anreicherung der Substanz in der Zelle kommt (Kramer, 2006). Zahlreiche Untersuchungen mit langkettigen Fettsäuren und anderen hydrophoben schwachen Säuren, die in protonierter Form durch schnellen „Flip-Flop“ die Seite einer Doppelmembran wechseln (Kamp und Hamilton, 1992; Chen und Szostak, 2004) bzw. die Plasmamembran von tierischen Zellen oder Bakterien in Abhängigkeit vom transmembranen pH-Gradient passieren (Trigatti und Gerber, 1996; Kurdi et al., 2000), legen die passive Diffusion durch den beschriebenen „ion trapping“-Mechanismus nahe. Tatsächlich ist die Aufnahme von JA durch Protoplasten der Gerste vom pH-Wert des Mediums abhängig. JA wird im Sauren wesentlich besser aufgenommen als MeJA, dessen Aufnahme pH-unabhängig ist (Dathe et al., 1993). Die intrazelluläre Akkumulation exogen verabreichter JA wurde auch in Gerstenblättern beobachtet (Bücking et al., 2004). Wenn nun aber in Tomatenblättern freie Jasmonsäure ausschließlich im Apoplast akkumuliert, obwohl sie eigentlich von den Zellen aufgenommen werden sollte, muss es einen Mechanismus geben, der die JA im extrazellulären Raum zurückhält. Eine Bindestelle in der Zellwand zu diesem Zweck wäre denkbar. Aufgrund des Vorkommens der IndAz-[^{14}C]IleMe-Bindestelle in zwei Vertretern der Solanaceae – Tabak und Kartoffel (Tab. 2) – ist anzunehmen, dass auch Tomatenpflanzen über diese Bindestelle verfügen. Ob die

IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindestelle aber mit den in Tomatenblättern beobachteten Vorgängen in Zusammenhang steht, ist zu bezweifeln, da sie bei allen untersuchten Pflanzenarten in den oberirdischen Pflanzenteilen kaum vorkommt (Abb. 6) und in Sojabohne keine Affinität zu freier Jasmonsäure zeigte (Abb. 11A).

Die Zellwände der Wurzel scheinen bei einigen jasmonatvermittelten Reaktionen eine wichtige Rolle zu spielen. In der *Arabidopsis*-Mutante *cev1* ist das Gen der Cellulose-Synthase *CeSA3* betroffen, das hauptsächlich in Wurzeln exprimiert wird. Die Folge ist eine Reduktion des Cellulosegehalts der *cev1*-Wurzeln um ca. 55 %, während die Blätter der Pflanzen normale Cellulosemengen enthalten. Außerdem zeichnen sich die Mutanten durch erhöhte Jasmonatproduktion, konstitutive Expression von Abwehrgenen und erhöhte Resistenz gegen Pilze aus. Die veränderte Architektur der Zellwand scheint das Signal zu geben, das über die Jasmonat-Signaltransduktion die Abwehrreaktionen auslöst. (Ellis et al., 2002). Andere Mutationen des *CeSA3*-Gens, die in den *Arabidopsis*-Mutanten *eli1-1* und *eli1-2* identifiziert wurden, führen ebenfalls zu reduzierter Cellulosesynthese in der Wurzel. Gleichzeitig zeigen *eli1-1* und *eli1-2*-Pflanzen vermindertes Streckungswachstum der Zellen, Expression von Abwehrgenen und ektopische Ligninsynthese, die eine Abwehrreaktion der Pflanze darstellt. Im Wildtyp bewirkt die Behandlung mit JA und Ethylen die gleichen Reaktionen (Cano-Delgado et al., 2003). Von den Autoren wurde folgende Interpretation vorgeschlagen: Das verminderte Streckungswachstum der Zellen sei das Schlüsselereignis, das zum Beispiel durch reduzierte Cellulosesynthese verursacht würde. Es führe, vermittelt durch Jasmonat und Ethylen, zur Ligninsynthese. Da aber JA und Ethylen auch die Hemmung der Cellulosesynthese selbst verursachen (Cano-Delgado et al., 2003), bleiben die Zusammenhänge, die Rolle der JA betreffend, doch unklar. Ein dritter Bericht zu diesem Thema beschreibt *cob5*-Pflanzen, die aufgrund des ausgeschalteten *COBRA*-Gens abnormales Zellwachstum zeigen. *COBRA* kodiert vermutlich ein Protein, das die Celluloseauflagerung und das orientierte Streckungswachstum der Zellen in der Wurzel reguliert. Auch in *cob5*-Pflanzen wird die Störung des Zellwachstums von erhöhter JA-Akkumulation und der Expression von Abwehrgenen begleitet (Ko et al., 2006). Diese Arbeiten legen also einen Zusammenhang zwischen dem Cellulosegehalt der Zellwand und der jasmonatvermittelten Initiierung von Abwehrreaktionen nahe. Auch die IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindung, die mit dem Alter der Pflanze bzw. Zellkultur zunimmt (Abb. 8), ist damit in gewisser Weise von der Zellwandarchitektur abhängig, wenn man bedenkt, dass die Zellwand mit fortschreitender Entwicklung der Pflanze starken Veränderungen unterworfen ist. Cellulose scheint aber nicht für die IndAz-[¹⁴C]IleMe-Bindung verantwortlich zu sein, da diese durch Cellulasebehandlung der Zellwandfraktion kaum beeinflusst wurde (Abb. 14C)

und die Oxidation der Cellulose durch Periodat im Gegenteil eine Steigerung der Bindungsaktivität zur Folge hatte (Abb. 14B). In jedem Fall wären Spekulationen über eine mögliche Rolle der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle bei Prozessen, die auf dem oben genannten Cellulosemangel beruhen, zu gewagt. Es darf aber bemerkt werden, dass eine Jasmonatbindestelle in der Zellwand – welcher Art auch immer – durchaus sinnvoll wäre angesichts der Beteiligung der Zellwand an jasmonatvermittelten Reaktionen.

Interessanterweise beschreibt der einzige bisher vorliegende Bericht über eine Jasmonatbindestelle ein extrazelluläres Protein, nämlich das Lipidtransferprotein LTP1 aus Tabak (Buhot et al., 2004). LTPs sind Proteine niedriger Molekularmasse, die in die extrazelluläre Matrix exportiert werden und verschiedene Lipide und andere hydrophobe Moleküle binden können. Sie haben strukturelle Ähnlichkeit mit Elicitinen, die bekannte Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen sind, und spielen wie diese eine Rolle bei Pflanze-Pathogen-Interaktionen (Blein et al., 2002). Die Bindung von JA an LTP1 wurde gezeigt, indem der an LTP1 gebundene Fluoreszenzfarbstoff 2-p-Toluidino-6-naphthalensulfonsäure (TNS, $K_d = 8,28 \mu\text{M}$) durch JA verdrängt wurde ($K_i = 15,55 \mu\text{M}$) (Buhot et al., 2004). Der LTP1-JA-Komplex bindet an einen Elicitinrezeptor in der Plasmamembran und bewirkt in Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *Phytophthora parasitica*. Obwohl einige Parallelen zwischen LTP1 und der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle ins Auge fallen – etwa die Lokalisierung in der Zellwand oder die Bindungskonstanten im mikromolaren Bereich – dürfte es sich bei der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle mit einiger Sicherheit nicht um ein Lipidtransferprotein handeln, da LTPs aus Pflanzenmaterial leicht mit Wasser extrahiert werden können (Douliez et al., 2001), die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle dagegen sogar nach Extraktion mit 4 % SDS noch fest in der Zellwand verankert blieb (Abb. 13A).

2.3. Die chemische Natur der Bindestelle

Aufgrund der Lokalisierung in der Zellwand und der außerordentlichen Widerstandsfähigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle gegenüber Hitze, SDS und Proteinase K (Abb. 13A und B) wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, es könnte sich um eine nichtproteinartige Struktur handeln.

Pectin, Hemicellulosen, Cellulose und Lipide konnten aber durch enzymatische oder chemische Behandlung der Zellwandfraktion ausgeschlossen werden (Abb. 14 und 15). Auch Lignin wurde überprüft, das wegen seiner Unzerstörbarkeit ein Kandidat für die bindende Struktur sein könnte. Ein weiterer Grund für die Überprüfung von Lignin war die Zunahme der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung mit fortschreitendem Alter der untersuchten Pflanz-

zen bzw. Zellkulturen (Abb. 8), die auf der verstärkten Bildung von sekundären Zellwänden bzw. der damit verbundenen Ligninproduktion beruhen könnte. Besonders ausgeprägt war die Altersabhängigkeit der Bindung in der Sojabohne-Zellkultur (Abb. 8B), die ebenfalls Lignin produziert (Nimz et al., 1975). In einer Björkman-Lignin-Präparation aus Buchenholz (Lüdemann und Nimz, 1974) wurde aber kaum spezifische IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung nachgewiesen (Abb. 16) und Lignin daher als bindende Struktur ebenfalls ausgeschlossen.

Es bleibt als letzte Möglichkeit ein außerordentlich stabil integriertes und gegenüber den meisten Behandlungen resistentes Protein. Die Extrahierbarkeit von Zellwandproteinen hängt von deren Interaktion mit der Polysaccharidmatrix ab. Offensichtlich gehört die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle weder zu den ionisch gebundenen Proteinen, die mit konzentrierten Salzlösungen aus der Zellwand gewaschen werden können (Robertson et al., 1997), noch zu den hydrophoben Proteinen, die mit Detergenzien, etwa mit 4 % SDS (Abb. 13A), solubilisiert werden können (Ringli et al., 2001). Das ist nicht ungewöhnlich. Die zellwandassoziierte Kinase WAK1 aus *Arabidopsis* beispielsweise ist so stark mit der Zellwand verbunden, dass sie weder durch Salze noch durch Detergenzien solubilisiert werden kann. Allein durch Kochen der Zellwand in 4 % SDS und 50 mM DTT kann WAK1 extrahiert werden (He et al., 1996). Ein weiteres Beispiel wäre die Bindestelle für Malformin in *Phaseolus vulgaris*. Malformin ist ein zyklisches Pentapeptid, das vom Pilz *Aspergillus niger* gebildet wird und vielfältige Auswirkungen auf Wachstum und Entwicklung von Pflanzen hat. Nur nach enzymatischem Abbau der Zellwand können zellwandständige Malformin-Bindestellen mit Tris-Puffer oder NaOH extrahiert werden (Ciarlante und Curtis, 1977). Viele Glykoproteine sind äußerst stabil, manche sogar kovalent mit Polysacchariden verbunden (Showalter, 1993) und verbleiben auch nach sequenzieller Extraktion mit SDS, DMSO, CDTA, Na₂CO₃, KOH und Borat in der unlöslichen Fraktion der Zellwand (Ryden and Selvendran, 1990). Die drei letztgenannten Extraktionsmittel führten in der Zellwand aus Sojabohnewurzeln zwar zum partiellen bzw. vollständigen Verlust der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung (Abb. 14A), ob dieser aber mit der Extraktion der Bindestelle einherging, konnte nicht festgestellt werden, da sie ihre Bindungsfähigkeit verloren hatte. Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle scheint keine Disulfidbrücken zu enthalten, die direkt oder indirekt der Verankerung des Proteins in der Zellwand dienen und für die Bindungsaktivität nötig wären (Abb. 13C).

Die Zellwand ist ein dynamisches Gebilde, dessen Zusammensetzung und Struktur sich sowohl im Lauf der Entwicklung als auch induziert durch äußere Reize ständig verändert (Gibeaut und Carpita, 1994; Lee et al., 2004). Da die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung mit dem Alter des Organismus zunahm (Abb. 8), könnte es sich bei der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle,

wie bei vielen Zellwandproteinen, um ein Protein mit entwicklungsregulierter Expression handeln (Showalter, 1993).

Gegen die Proteinartigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle sprechen auf den ersten Blick die Proteinase K-Resistenz und die partielle Hitzestabilität der Bindestelle (Abb. 13). Beide Eigenschaften können aber – besonders in der Zellwand – auch auf Proteine zutreffen. Hyp-reiche Glykoproteine der Zellwand sind proteaseresistent (Jamet et al., 2006). Germin und Germin-ähnliche Proteine beispielsweise sind extrazelluläre Glykoproteine, die als Oligomere vorliegen, in Pflanzenentwicklung und -abwehr eine Rolle spielen und sowohl Proteaseverdau als auch Kochen unbeschadet überstehen (Caliskan, 2000). Der Griffel von Tomatenblüten bildet ein hitzestabiles Peptid, das die Dissoziation der pollenspezifischen Rezeptorkinasen LePRK1 und LePRK2 unter Dephosphorylierung von LePRK2 bewirkt (Wengier et al., 2003). Weitere Beispiele für hitze- und/oder proteaseresistente Proteine finden sich in Bakterien oder HeLA-Zellen (Radolf et al., 1987; Brandon und Goldberg, 2001; del Castillo-Olivares et al., 1998).

Aufgrund dieser Überlegungen wird die Proteinartigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle als glaubwürdigste Interpretation der Daten betrachtet.

2.4. Die unbekannt Funktion der Bindestelle

Wie bereits besprochen, ist eine direkte Beteiligung der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle an der Transduktion von Jasmonatsignalen unwahrscheinlich. Eher denkbar wäre eine Speicherfunktion. Die Konzentration von Signalmolekülen am Wirkort wird durch deren Neubildung oder Freisetzung und die anschließende Entfernung der Substanzen aus dem System bestimmt. Letztere kann durch Abbau, Modifikation, Bindung oder Abtransport in ein anderes Kompartiment erfolgen. Indol-3-Essigsäure (IAA) beispielsweise ist als freie Säure biologisch aktiv und wird durch Konjugation mit Aminosäuren inaktiviert. Die Konjugate dienen, je nach Aminosäure, als vorübergehende Speicherform, Transportform oder als Substrate für den Abbau (Staswick et al., 2005). Der Jasmonathaushalt scheint nicht durch einen solchen Mechanismus reguliert zu sein, da auch Aminosäure-Konjugate der Jasmonsäure biologische Aktivität besitzen (Tamogami et al., 1997). Alternativ könnten Jasmonate durch Bindung an ein Protein in eine inaktive Speicherform überführt werden. Wenn tatsächlich die Zellwand der Ort ist, an dem Jasmonate akkumulieren und über einen Zeitraum von mehreren Stunden gelagert werden, wie in Tomatenblättern für JA gezeigt wurde (Bücking et al., 2004), ist die Bindung der JA durch eine extrazelluläre Struktur zu erwarten. Die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle könnte einem solchen Zweck dienen, zwar nicht für JA, die keine Affinität zur dieser Bindestelle zeigte (Abb. 11A), vielleicht aber für andere Mitglieder

der Jasmonatfamilie wie MeJA, OPDA, MeOPDA oder JA-Isoleucin-Konjugate. Stressinduzierte OPDA- bzw. MeOPDA-Akkumulation wurde verschiedentlich beobachtet, jedoch ohne Überprüfung ihrer subzellulären Lokalisierung (Blechert et al., 1999; Ludwig et al., 2005; Laudert und Weiler, 1998). Auch über die Akkumulation von JA-Isoleucin-Konjugaten wurde berichtet (Kramell et al., 1995; Hause et al., 2002), in einem Fall mit dem Hinweis auf extrazelluläre Ansammlung der Konjugate (Dathe et al., 1993).

Da sich die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle durch niedrige Affinität auszeichnet (Abb. 10), wurde vermutet, es könnte ein Enzym vorliegen, das eventuell den Liganden umsetzt. Bisher sind drei Enzyme identifiziert, die Jasmonate modifizieren. Die JA-Aminosäure-Synthase JAR1 konjugiert JA mit Aminosäuren (Staswick und Tiryaki, 2004), die JA-Methyltransferase JMT verestert die Carboxylgruppe der JA mit einer Methylgruppe ($K_m = 38,5 \mu\text{M}$) (Seo et al., 2001), und die MeJA-spaltende Esterase MJE katalysiert die umgekehrte Reaktion (Stuhlfelder et al., 2004). Interessanterweise konzentriert sich die Expression und Enzymaktivität der MJE in der Wurzel. Da aber kein Signalpeptid für den Transport in ein bestimmtes Kompartiment gefunden wurde, nimmt man an, dass das Enzym im Cytosol vorliegt. Aufgrund der bevorzugten Bindung von Methylestern durch die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle wurde eine Esterase für möglich gehalten (Abb. 11). Es konnte jedoch nach Inkubation von IndAz[¹⁴C]IleMe mit der Zellwandfraktion aus Sojabohnenwurzeln kein entsprechendes Spaltprodukt IndAz[¹⁴C]Ile nachgewiesen werden (Abb. 12). Auch eine denkbare Abspaltung der Aminosäure [¹⁴C]IleMe wurde nicht beobachtet. Da außerdem die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung weitgehend pH-unabhängig war (Abb. 9A), wird wahrscheinlich kein Enzym vorliegen.

3. Die fehlende Bindungsaktivität von BY-2-Zellen

Zellsuspensionskulturen der meisten Pflanzen besitzen primäre Zellwände ähnlich denen meristematischer Zellen; so auch *Nicotiana tabacum*. In transgenen Tabakzellen, die das *Tcyt*-Gen aus *Agrobacterium* tragen, führt eine erhöhte Cytokininproduktion zur Bildung von Sekundärwänden, die neben einer veränderten Kohlenhydratzusammensetzung und phenolischen Komponenten zahlreiche Proteine enthalten, die in untransformierten Zellen nicht vorhanden sind (Blee et al., 2001). Das Fehlen der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung in *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen (Tab. 2) könnte auf dem Fehlen sekundärer Zellwände beruhen. Auf die Möglichkeit eines solchen Zusammenhangs deutet sowohl die Altersab-

hängigkeit der IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindung (Abb. 8) als auch die Fähigkeit der bindungsaktiven Sojabohne-Zellsuspensionskultur zur Ligninproduktion (Nimz et al., 1975) hin.

Selbst wenn die IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle in BY-2-Zellen nachweisbar wäre und ähnliche Bindungseigenschaften wie in Sojabohne aufweisen würde, müsste man davon ausgehen, dass das Bindungsphänomen nichts mit den jasmonatinduzierten Ca²⁺-Antworten zu tun hätte. Es besteht keine Korrelation zwischen den Affinitäten der Substanzen zur IndAz[¹⁴C]IleMe-Bindestelle und ihren calciuminduzierenden Aktivitäten (Abb. 11, 18, 21). Dennoch fallen einige Gemeinsamkeiten auf, die hier wenigstens genannt seien. Etwa die Abhängigkeit beider Ereignisse vom Alter der Pflanze bzw. Zellkultur (Abb. 8 und nicht gezeigt) oder die hohen Effetorkonzentrationen, die sowohl für die Bindung in Sojabohne als auch für die Induktion der Ca²⁺-Antworten in Tabak erforderlich sind (Abb. 10, 17, 19). Die vorliegenden Daten lassen aber keine Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zu.

4. Die Übertragung von Phytohormonsignalen durch Calcium

Für Phytohormone liegen mehr oder weniger umfangreiche Hinweise auf die Beteiligung cytosolischer Calciumkonzentrationsänderungen an der Transduktion des Signals vor. Das mit Abstand bestuntersuchte Beispiel sind ABA-induzierte [Ca²⁺]_{cyt}-Oszillationen in Schließzellen, die das Schließen der Stomata herbeiführen (Allen et al., 2000; McAinsh et al., 2000). Auch andere Reaktionen, beispielsweise die Expression stressinduzierter Gene, werden durch ABA ausgelöst und durch [Ca²⁺]_{cyt}-Signale vermittelt (Wu et al., 1997). Auxin und Kinetin induzieren ebenfalls einen [Ca²⁺]_{cyt}-Anstieg in Schließzellen und lösen die Öffnung der Stomata aus (Irving et al., 1992). Cytokinine stimulieren sowohl die Aufnahme von Calcium als auch die Knospenbildung in Moosprotonema (Schumaker und Gizinski, 1993). Verschiedene Reaktionen auf Ethylen sind von Calcium abhängig (Raz und Fluhr, 1992; Petruzzeli et al., 2003), GA induziert den Ca²⁺-Einstrom in Aleuronzellen (Bush, 1996), und für die Beteiligung von Ca²⁺ an der Brassinolid-Signaltransduktion in Reis liegen indirekte Hinweise vor (Yang und Komatsu, 2000). Die spärlichen Berichte über eine mögliche Rolle von [Ca²⁺]_{cyt}-Änderungen bei jasmonatinduzierten Reaktionen wurden bereits aufgeführt (Einleitung Kapitel 5).

Neben dem Cytosol verfügen Mitochondrien, Chloroplasten und Zellkern der Pflanzenzelle über einen autonomen Calciumhaushalt und können zu kompartimentübergreifenden Ca²⁺-

Signaturen beitragen (Xiong et al., 2006). Bisher liegen jedoch keine Berichte über hormoninduzierte Calciumantworten in diesen Organellen vor.

Im pflanzlichen Zellkern kennt man spezifische $[Ca^{2+}]$ -Änderungen, die durch Temperatur, mechanischen oder osmotischen Reiz, Mastoparan, Cryptogein und drei andere Elicitorine, Harpin, Flagellin, Laminarin und Oligogalacturonide ausgelöst werden (van der Luit et al., 1999; Pauly et al., 2000; Xiong et al., 2004; Lecourieux et al., 2005). Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals sowohl $[Ca^{2+}]_{cyt}$ als auch $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antworten, die durch Jasmonate induziert werden. Als aktive Substanzen erwiesen sich JA und OPDA (Abb. 17 und 19), während MeJA in keinem der Kompartimente einen Anstieg der Calciumkonzentration auslöste (Abb. 18). Außerdem zeigten Messungen mit Phytoprostan B₁ Typ II, dass auch andere Oxylipine, die nicht zur Jasmonatfamilie gehören, JA-ähnliche Calciumsignaturen erzeugen (Abb. 20).

5. Die calciuminduzierende Aktivität der Jasmonate und Indanoyl-Isoleucin-Konjugate

5.1. Der Unterschied zwischen JA und MeJA

Seit der Entdeckung der Jasmonate hat sich eine stattliche Kollektion von Daten angesammelt, die die biologische Aktivität von entweder MeJA oder JA belegen. Der Methylester der Jasmonsäure wird gemeinhin als Äquivalent der JA betrachtet. Man spricht von der biologischen Aktivität der „Jasmonate“, gleichviel, ob die biologische Antwort durch JA oder MeJA ausgelöst wurde. Tatsächlich belegen einige vergleichende Studien eine ähnliche oder sogar gleiche Aktivität von JA und MeJA (Koda et al., 1991; Bodnaryk und Yoshihara, 1995; Ellard-Ivey und Douglas, 1996; Kramell et al., 2000; Zhu et al., 2006). Vereinzelt finden sich aber auch Berichte über Reaktionen, etwa die Duftemission in Limabohne oder die Glyceollinproduktion in Sojabohne, die durch JA, nicht aber durch MeJA induziert werden (Hopke et al., 1994; Fliegmann et al., 2003). Die Calciumantworten in BY-2-Zellen reihen sich in diese zweite Gruppe ein (Abb. 17 und 18).

Bisher steht die Frage nach einer möglicherweise eigenständigen Rolle von MeJA noch im Schatten der großen Diskussion um die Unterscheidung zwischen Cyclopentanon- und Cyclopentenonsignalen und wird nur hin und wieder gestreift (Weber, 2002). Die Unklarheit resultiert aus der möglichen intrazellulären Umformung der beiden Moleküle ineinander.

MeJA kann Zellmembranen durch Diffusion passieren, scheint aber nicht nur die Transportform der JA zu sein, sondern hat wahrscheinlich selbst Signalfunktion – unter Umständen eine solche, die sich von der Aktivität der JA unterscheidet (Seo et al., 2001). Es mag auch Fälle geben, in denen die Wirkung von MeJA auf der Hydrolyse des Esters zu JA beruht, möglicherweise dann, wenn MeJA eine gegenüber JA abgeschwächte Aktivität aufweist, wie etwa bei der Induktion der Phytoalexinproduktion in Reis (Nojiri et al., 1996). Tatsächlich wird in BY-2-Zellen aus exogen angebotenen MeJA nach der Aufnahme sofort JA freigesetzt; nach 10 min sind bereits ca. 30 % des aufgenommenen MeJA hydrolysiert (Swiatek et al., 2004). Die Bedeutung der MeJA-Hydrolyse wird durch das Enzym JAR1 aus Arabidopsis beleuchtet, das JA mit Aminosäuren konjugiert. JAR1 akzeptiert nur freie JA als Substrat, so dass MeJA-induzierte Reaktionen, die durch JAR1 vermittelt werden, die Abspaltung der Methylgruppe erfordern (Staswick et al., 2002). Theoretisch wäre auch denkbar, dass für bestimmte Reaktionen MeJA das Signalmolekül ist und die freie JA durch Veresterung ihre Aktivität erhält. In BY-2-Zellen findet jedoch kaum Veresterung exogen angebotener JA statt (Swiatek et al., 2004). Das muss natürlich nicht für andere Pflanzen oder Zellkulturen gelten. Es könnte auch Jasmonatrezeptoren geben, die beide Signalmoleküle mehr oder weniger gut erkennen. Wahrscheinlich kommen alle diese Mechanismen vor, je nachdem um welches System und welche Reaktion es sich handelt.

Im Fall der jasmonatinduzierten Calciumantworten scheint ein einfacher Zusammenhang vorzuliegen. MeJA war im Gegensatz zu JA sowohl im Cytosol als auch im Zellkern inaktiv (Abb. 18). Daher ist anzunehmen, dass ein mutmaßlicher Rezeptor nur JA, nicht aber MeJA erkennt. Wenn die Perzeption im Zellinneren stattfindet, käme hinzu, dass offensichtlich die von Swiatek et al. (2004) nachgewiesene schnelle Hydrolyse des MeJA nicht genug JA freisetzt, um die entsprechenden Calciumantworten (Abb. 17) auszulösen. Dies wird verständlich, wenn man beachtet, dass MeJA wesentlich langsamer und weniger effizient von BY-2-Zellen aufgenommen wird als JA (Swiatek et al., 2004). Der Mechanismus des „ion trapping“ (Kramer, 2006), der wahrscheinlich der raschen JA-Aufnahme zugrunde liegt, wurde bereits besprochen.

Nicht nur die Veresterung der Carboxylgruppe im MeJA, sondern auch der Austausch der Carboxylgruppe gegen die Nitrogruppe im JNO führte zum Verlust der calciuminduzierenden Aktivität (Abb. 23). Offensichtlich ist die negative Ladung der freien Carboxylgruppe für die Induktion der Calciumantworten entscheidend.

5.2. Der Unterschied zwischen Cyclopentanonen und Cyclopentenonen

Jasmonate scheinen bezüglich ihrer biologischen Aktivität zwei verschiedenen Gruppen anzugehören. Cyclopentanone wie JA und MeJA weisen ein Aktivitätsprofil auf, das mit dem von Cyclopentenonen wie OPDA nur teilweise überlappt (Mithöfer et al., 2005). Daher ist es nicht verwunderlich, dass OPDA in BY-2-Zellen eine Calciumsignatur induzierte, die sich von derjenigen der JA deutlich unterscheidet (Abb. 17, 19, 21). Dieser Befund legt nahe, dass es sich um zwei unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse handelt, die durch JA und OPDA ausgelöst werden. Vor allem die Schnelligkeit der OPDA-induzierten Calciumantworten ist ein deutliches Zeichen, dass OPDA als eigenständiges Signal wirkt, da in einem Zeitraum von wenigen Sekunden die Bildung von JA aus OPDA unmöglich ist.

Eine Erklärung für die äußerst schnelle Aufeinanderfolge der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ - und $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort bei OPDA (Abb. 19) könnte sein, dass es sich beim $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Anstieg um eine durch cytosolisches Calcium induzierte Calciumfreisetzung (CICR) handelt. In diesem Fall müsste der Zellkern Ryanodinrezeptoren (RyR) oder RyR-ähnliche Rezeptoren besitzen, die bei Aktivierung durch Ca^{2+} die Öffnung der entsprechenden RyR-ähnlichen Kanäle für den Einstrom von Ca^{2+} ins Nucleoplasma bewirken. In tierischen Zellen wurden RyR-Kanäle in der inneren Kernmembran sowie CICR im Zellkern nachgewiesen (Gerasimenko et al., 2003; Marius et al., 2006). Die pharmakologischen Daten wären mit einem solchen Vorgang bei OPDA-Behandlung der BY-2-Zellen vereinbar. Durch La^{3+} wurde sowohl die $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ - als auch die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort unterdrückt (Abb. 24A, 26A). RR beeinflusste den $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg nicht (Abb. 25A), wohl aber die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort (Abb. 28C). Demnach würde OPDA einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in Form der beobachteten $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort induzieren, Ca^{2+} würde dann aus dem Cytosol in den Zellkern diffundieren und dort über RyR-ähnliche Kanäle die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auslösen.

Seit Jahren wird über die Möglichkeit der Diffusion von Ca^{2+} durch die Kernhülle debattiert. Die Größe der Kernporen müsste die freie Diffusion von Ca^{2+} -Ionen erlauben; zahlreiche Arbeiten, vor allem solche an isolierten Zellkernen, belegen aber, dass keine freie Diffusion von Ca^{2+} durch die Kernhülle erfolgt und der Zellkern in der Lage ist, unabhängig vom Cytosol eigene Calciumsignale zu erzeugen (Malviya und Rogue, 1998; Badminton et al., 1995; Pauly et al., 2000). Wenn nun aber die OPDA-induzierte $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort direkt durch CICR auslösen würde, wäre das mit einer Diffusion von cytosolischem Calcium in den Zellkern verbunden. Theoretisch müsste dann der JA-induzierte $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg (Abb. 17A) ebenfalls eine sofortige $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort nach sich ziehen. Es vergehen aber bei JA nach abgeschlossenem $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signal mehrere Minuten bis zum

Beginn des $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstiegs (Abb. 17B). Denkbar wäre, dass die räumliche Begrenzung von Calciumsignalen im Cytosol den vorgeschlagenen Mechanismus ermöglicht. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Ca^{2+} ist im Zellinneren durch die Pufferwirkung des Cytosols herabgesetzt, wodurch lokale $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signale erzeugt werden können (Sanders et al., 1999). Die Begrenzung von $[Ca^{2+}]$ -Änderungen auf bestimmte Stellen des Cytosols wird durch eine geeignete Anordnung der zuständigen Calciumkanäle und -pumpen bewirkt und trägt in Kombination mit der Verteilung der Ca^{2+} -Sensoren stark zur Spezifität der Signaltransduktion bei (Trewavas und Malho, 1997). Durch OPDA könnte ein lokales $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signal in unmittelbarer Nähe der Kernhülle erzeugt werden, um nach Diffusion in den Zellkern durch CICR die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auszulösen. Ein ähnliches Phänomen wurde in HeLa-Zellen beschrieben, wo Histamin in Zellkernnähe räumlich begrenzte, transiente Zunahmen der cytosolischen Calciumkonzentration auslöst, sogenannte „ Ca^{2+} puffs“ (Lipp et al., 1997). Diese setzen sich im Zellkern in Form eines starken $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstiegs fort. Obwohl die Autoren ihre Beobachtung als Einstrom cytosolischen Calciums in den Zellkern interpretieren, könnte ebenso CICR aus der Kernhülle zum $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg in HeLa-Zellen beitragen. Höhere Histaminkonzentrationen bewirken einen globalen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, der innerhalb weniger Sekunden den Zellkern erfasst, wo er in einen starken $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg übergeht (Lipp et al., 1997). Entsprechend scheint in BY-2-Zellen durch hohe OPDA-Konzentrationen ein globaler Calciumkonzentrationsanstieg ausgelöst zu werden, da in beiden Kompartimenten beinahe das gesamte Aequorin verbraucht wurde. Auch in Pflanzenzellen wurden $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signale beschrieben, die ausschließlich in Zellkernnähe vorkommen: Nod-Faktoren induzieren in *Medicago truncatula* lokale $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Oszillationen in der Peripherie des Zellkerns von Wurzelhaaren (Ehrhardt et al., 1996).

Für JA wäre die entsprechende Schlussfolgerung, dass sich die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signale in weiterer Entfernung vom Zellkern ereignen und abklingen würden, ohne eine sofortige $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auszulösen, wie es in histaminbehandelten HeLa-Zellen das Schicksal vom Zellkern entfernter „ Ca^{2+} puffs“ ist (Lipp et al., 1997).

Würde man voraussetzen, dass keine Diffusion stattfindet, könnte man annehmen, dass OPDA direkt auf den Zellkern wirkt, um die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort auszulösen. Der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg müsste dabei dennoch eine Rolle spielen, da die Unterdrückung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort durch La^{3+} die $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Antwort ebenfalls unterbindet (Abb. 24A und 26A). Eine dritte Möglichkeit wäre eine durch OPDA regulierte Diffusion des cytosolischen Ca^{2+} in den Zellkern, gefolgt von CICR. Experimente mit isolierten Zellkernen sowie die subzelluläre Lokalisie-

rung der Ca^{2+} -Signale durch „ Ca^{2+} imaging“ könnten eventuell zur Klärung der Verhältnisse beitragen.

Der JA-induzierten Calciumsignatur scheinen andere Mechanismen zugrunde zu liegen. Wahrscheinlich ist auch bei JA der Einstrom extrazellulären Calciums durch die Plasmamembran notwendig (Abb. 24B), im Gegensatz zu OPDA scheint aber der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg durch CICR verstärkt zu werden (Abb. 25B). Die hierfür verantwortlichen Calciumkanäle können im Zellinneren oder in der Plasmamembran liegen, da RR nicht nur intrazelluläre Kanäle (Smith et al., 1985; Allen et al., 1995), sondern auch Ca^{2+} -Ströme durch die pflanzliche Plasmamembran blockiert (Marshall et al., 1994). In *Arabidopsis* wurde ein Calciumkanal in der Plasmamembran von Wurzelhaaren beschrieben, der zeigt, dass eine erhöhte cytosolische Calciumkonzentration den Einstrom extrazellulären Calciums stimulieren kann (Very und Davies, 2000).

Aufgrund der pharmakologischen Daten (Abb. 24B, 25B, 26B, 28A) wird vermutet, dass die JA-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort vom $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signal abhängt. Der Zeitraum von mehreren Minuten zwischen den beiden Antworten könnte von einem oder mehreren cytosolischen Signaltransduktionsereignissen verursacht werden.

OPDA besitzt durch die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe (Abb. 1) eine elektrophile Reaktivität, über die das Cyclopentanon JA nicht verfügt. Einige OPDA-spezifische Aktivitäten werden dieser elektrophilen Eigenschaft zugeschrieben (Stintzi et al., 2001). Über die Jasmonatfamilie hinaus gibt es viele Oxylipine mit α,β -ungesättigter Carbonylgruppe, deren biologische Aktivität wahrscheinlich auf der elektrophilen Reaktivität beruht (Farmer et al., 2003; Almeras et al., 2003). Die Calciumsignatur jedoch, die durch OPDA ausgelöst wurde (Abb. 19), scheint nicht durch die Elektrophilie bestimmt zu werden, da PPB_1 – ebenfalls ein elektrophiles Cyclopentenon (Abb. 2) – eine Ca^{2+} -Signatur induzierte, die keine Ähnlichkeit mit der von OPDA aufweist (Abb. 20). Im Gegenteil, die durch PPB_1 induzierten Ca^{2+} -Antworten gleichen denen der JA (Abb. 17). Es liegen bereits Hinweise auf eine ähnliche biologische Aktivität von JA und PPB_1 vor: In Zellkulturen von *Eschscholzia californica* und *Crotalaria cobalticola* lösen beide Oxylipine die Produktion von Phytoalexinen aus (Thoma et al., 2004).

5.3. Die Isoleucin-Konjugate der Jasmonsäure

Die wenigen bisher vorhandenen Berichte über JA-Isoleucin-Konjugate beschreiben bei exogener Verabreichung eine biologische Aktivität von JA-Ile, die der Aktivität von JA

qualitativ wie quantitativ gleicht (Tamogami et al., 1997; Kramell et al., 1997; Miersch et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Aktivitätsunterschied zwischen JA und JA-Ile festgestellt. JA-Ile induzierte eine Calciumsignatur, die sich von der JA-induzierten Calciumsignatur durch das Fehlen der JA-ähnlichen $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort unterscheidet (Abb. 21). Auf den ersten Blick erinnert das an die Inaktivierung von Auxin durch Konjugation mit Aminosäuren (Normanly, 1997). Im Zellkern aber war JA-Ile aktiv (Abb. 21F). Diese Modulation der JA-Aktivität durch Konjugation mit Ile ergänzt das Bild, das durch die Charakterisierung der *Arabidopsis*-Mutante *jar1-1* entworfen wurde, nämlich dass manche JA-induzierte Reaktionen, beispielsweise die Hemmung des Wurzelwachstums, die Aktivierung der JA durch Konjugation mit Ile erfordern (Staswick und Tiryaki, 2004). Die unterschiedlichen Calciumsignaturen in BY-2-Zellen legen nahe, dass eventuell auf Ebene des Calciums eine Unterscheidung zwischen JA- und JA-Ile-Signalen stattfindet.

Es wäre denkbar, dass JA-Ile selbst keine calciuminduzierende Aktivität besitzt und die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort (Abb. 21F) nach JA-Ile-Spaltung durch freigesetzte JA auslöst wird. Konjugatsspaltung scheint aber in BY-2-Zellen nicht stattzufinden, da das Indanoyl-Isoleucin-Konjugat IndEt-IleMe* nicht hydrolysiert wurde (Abb. 30). Natürlich könnte die Hydrolyse von IndEt-IleMe* in BY-2-Zellen auch daran scheitern, dass ein mutmaßliches JA-Ile-spaltendes Enzym nur JA-Ile, nicht aber IndEt-IleMe als Substrat akzeptiert. Ein Bericht über JA-Ile bestätigt aber den Befund, dass keine Hydrolyse des Konjugats erfolgt, denn JA-Ile induziert in Gerstenblättern die Expression JA-responsiver Gene ohne vorherige Freisetzung von JA aus JA-Ile (Kramell et al., 1997).

Umgekehrt könnte JA in der Zelle konjugiert werden, um in Form von JA-Ile die $[Ca^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort zu induzieren. Diese Möglichkeit ist ebenfalls unwahrscheinlich, da von Swiatek et al. (2004) berichtet wurde, dass exogen verabreichte JA in BY-2-Zellen nur mit Zuckern konjugiert oder hydroxyliert wird, während keine Konjugate mit Aminosäuren gebildet werden.

5.4. Die synthetischen Indanoyl-Isoleucin-Konjugate

Verschiedene Indanoyl-Isoleucin-Konjugate (Abb. 3) haben sich als funktionelle Analoga der Jasmonate etabliert. Eine Zuordnung einzelner Indanoyl-Isoleucin-Konjugate zu bestimmten Jasmonaten ist zwar nicht möglich, der Vergleich der Aktivitäten in verschiedenen Biotests lässt aber gewisse Zusammenhänge erkennen. Die unsubstituierten Konjugate Ind-Ile und Ind-IleMe zeigen häufig eine Aktivität wie JA oder MeJA, während die 6-substituierten Konjugate IndEt-IleMe und IndAz-IleMe neben der Aktivität von JA/MeJA

auch OPDA-Aktivität nachahmen (Mithöfer et al., 2005). So induzieren JA, Ind-Ile und Ind-IleMe in Limabohne die Emission eines charakteristischen Musters von Duftstoffen, das sich von dem durch ODPa, IndEt-IleMe und IndAz-IleMe induzierten Duftmuster unterscheidet (Krumm et al., 1995; Schüler et al., 1999; Schüler et al., 2001). In Sojabohnenzellen sind OPDA, IndEt-IleMe und IndAz-IleMe bedeutend stärkere Auslöser der Glyceollinproduktion als JA und Ind-IleMe (Fliegmann et al., 2003). Die Rankenkrümmung von *Bryonia dioica* ist eine Antwort auf OPDA und wird ebenso durch IndEt-IleMe, nicht aber durch Ind-Ile oder Ind-IleMe ausgelöst (Lauchli und Boland, 2002; Blechert et al., 1999). Die Nikotinproduktion in Tabak wird durch MeJA und Ind-IleMe gleichermaßen induziert (Zhang et al., 1997). Zu den JA/MeJA-typischen Reaktionen, die auch durch IndEt-IleMe ausgelöst werden, gehören die Nikotinproduktion in Tabak, die Akkumulation von Benzo[c]phenanthridinalkaloiden in *Eschscholzia californica*, die übrigens, abweichend vom genannten Schema, nicht durch Ind-Ile und Ind-IleMe induziert wird (Haider et al., 2000), ferner die Expression von Abwehrgenen in Gerste und Tomate sowie die Hemmung des Wurzelwachstums in *Arabidopsis* (Schüler et al., 2004). Bisher ist kein Beispiel für eine OPDA-ähnliche Wirkung unsubstituierter Indanoyl-Isoleucin-Konjugate bekannt.

Dieses trotz einzelner Unregelmäßigkeiten recht ebene Bild wird nun durch die Struktur-Aktivitätsanalyse in BY-2-Zellen gestört. Keines der 6-substituierten Indanoyl-Isoleucin-Konjugate zeigte OPDA-ähnliche Aktivität, der C6-Substituent scheint allgemein für die Induktion der Ca^{2+} -Antworten nicht von besonderer Bedeutung zu sein, und IndEt-IleMe – ob seiner überragenden Aktivität in beinahe allen Biotests als Favorit unter den Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten gehandelt (Schüler et al., 2004) – erwies sich als nur mäßiger Auslöser der Ca^{2+} -Antworten (Abb. 21C und F).

Stattdessen wurden andere Zusammenhänge aufgedeckt, die eine überzeugende Bestätigung der bei den Jasmonaten beobachteten Verhältnisse darstellen. Der Konjugatbaustein Ind, der bisher in nur zwei Biotests eingesetzt und für kaum bis überhaupt nicht aktiv befunden worden war (Zhang et al., 1997; Krumm et al., 1995), induzierte die gleiche Calciumsignatur wie JA (Abb. 21B und E). Ind-Ile verhielt sich wie JA-Ile (Abb. 21C und F) und Ind-IleMe war wie JA-IleMe in beiden Kompartimenten inaktiv. Damit liegt erstmals ein Fall vor, in dem die Konjugatbildung bei natürlichen Jasmonaten und Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten übereinstimmende Auswirkungen auf die Aktivität hat. Wie bei den Jasmonaten war bei den Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten die Aktivität vom Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe abhängig – mit Ausnahme von IndEt-IleMe (Abb. 21). Obwohl der C6-Substituent im IndEt-Ile keine Steigerung der Aktivität gegenüber Ind-Ile bewirkte, scheint er dennoch einen Einfluss unbekannter Art zu besitzen, da er dem Methylester IndEt-IleMe calcium-induzierende Aktivität im Zellkern verlieh (Abb. 22).

Das neue und in sich stimmige Aktivitätsprofil der Indanoyl-Isoleucin-Konjugate, das die vorliegende Arbeit präsentiert, steht nicht im Widerspruch zu den oben genannten Studien. So unterschiedlich sich Indanoyl-Isoleucin-Konjugate in verschiedenen Biotests verhalten, so vielfältig ist die Wirkungsweise der Jasmonate selbst, je nachdem, welche Reaktion in welchem System untersucht wird. In umfangreichen Struktur-Aktivitätsanalysen wurden sehr genaue strukturelle Eigenschaften der Induktoren identifiziert, die für ihre Aktivität zwingend notwendig sind (Miersch et al., 1999; Haider et al., 2000; Blechert et al., 1999). Diese Eigenschaften sind aber je nach Biotest unterschiedlich. Vermutlich werden solche Merkmale der Jasmonatstruktur von verschiedenen Rezeptoren erkannt. Die Beobachtung, dass mehrere Jasmonate in verschiedenen Pflanzen bei Verwundung in unterschiedlichen Mengen akkumulieren, also jede Pflanze mit ihrer eigenen „Oxylipin-Signatur“ antwortet (Weber et al., 1997), hat zu der Vermutung geführt, jede Pflanze könnte ihr bevorzugtes Signalmolekül aus der Jasmonatfamilie für die spezifische Reaktion auf einen bestimmten Reiz haben (Miersch et al., 1999). Mehr noch, auch innerhalb einer Pflanze wurden gewebe-spezifische „Oxylipin-Signaturen“ in den Organen der Tomatenblüte beschrieben (Hause et al., 2000). Die eingangs besprochenen Erkenntnisse, die durch verschiedene *Arabidopsis*-Mutanten gewonnen wurden, gewähren erste Einblicke in die Kausalbeziehungen der einzelnen Signalmoleküle und biologischen Antworten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Signalmoleküle und ihre charakteristischen Calciumsignaturen bestimmten zellulären Reaktionen, nämlich der Expression von Genen zuzuordnen. Dieses Unterfangen scheiterte jedoch, vermutlich an den speziellen physiologischen Bedingungen, die für die Induktion der Calciumantworten in BY-2-Zellen nötig waren.

6. Die Bedingungen für die Induktion von Calciumantworten

Es liegen Berichte über das Fehlen cytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen bei JA-Behandlung von Tomaten-Mesophyll oder Sojabohne-Zellsuspensionen vor (Moyen et al., 1998; Fliegmann et al., 2003). Anscheinend ist der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg keine allgegenwärtige zelluläre Reaktion auf Jasmonate. Da in BY-2-Zellen die Beobachtung gemacht wurde, dass Jasmonate nur unter bestimmten Bedingungen Ca^{2+} -Antworten in Cytosol und Zellkern auslösen, liegt die Vermutung nahe, dass nur jasmonatinduzierte Reaktionen, die mit diesen Bedingungen in Einklang zu bringen sind, durch Ca^{2+} -Signale vermittelt werden.

Erstens antworteten BY-2-Zellen auf Jasmonate und Analoga nur dann mit den beschriebenen Änderungen der Calciumkonzentration, wenn sich die Zellkultur in der stationären Wachstumsphase befand. Jasmonate sind Regulatoren pflanzlicher Entwicklungsprozesse, darunter Seneszenz (Sembdner und Parthier, 1993). JA akkumuliert in alternden Blättern von *Arabidopsis thaliana* oder *Asparagus officinalis* (He et al., 2002; Gapper et al., 2002), eine Transkriptomanalyse in *Arabidopsis* zeigt die Beteiligung des Jasmonat-Signalwegs an der Regulation der Expression zahlreicher Gene während der natürlichen Blattalterung (Buchanan-Wollaston et al., 2005), und auch in Tabak wird die Expression von Genen, die bei Seneszenz eine Rolle spielen, durch JA induziert (Pageau et al., 2006). Außerdem scheint die cytosolische Calciumkonzentration an der Regulation von Alterungsprozessen beteiligt zu sein (Huang et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Cysteinprotease CP-23, die in Tabakpflanzen und BY-2-Zellkulturen während der Seneszenz verstärkt exprimiert wird (Ueda et al., 2000), als möglicher Kandidat für ein calciumreguliertes Gen untersucht. Es konnte jedoch nach Behandlung der BY-2-Zellen mit Jasmonaten oder Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten keine Induktion der CP-23-Expression festgestellt werden.

Eine zweite Voraussetzung für die Induktion der Calciumantworten war die Entfernung des L&S-Mediums, das durch einen Puffer ohne Saccharose und 2,4-D ersetzt wurde. Ob der Zuckermangel oder die Abwesenheit von 2,4-D die entscheidende Veränderung war, wurde nicht untersucht. Zwar wird die JA-induzierte Expression einiger Gene durch Zucker stimuliert (Creelman und Mullet, 1995), es scheint aber auch den umgekehrten Fall zu geben. Durch Zuckermangel induzierte Seneszenz in *Arabidopsis*-Zellkulturen zeichnet sich durch ein Transkriptom aus, das sich von dem Expressionsmuster während der natürlichen Alterung von *Arabidopsis*-Blättern unterscheidet, wobei beide Transkriptome unter anderem durch den Jasmonat-Signalweg kontrolliert werden (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Theoretisch könnten in BY-2-Zellen Jasmonatsignale für die Expression solcher Gene durch die beobachteten Ca^{2+} -Antworten in Cytosol und Zellkern vermittelt werden.

Alternativ oder ergänzend zum Zuckermangel könnte die Abwesenheit des Wachstumshormons 2,4-D die Entstehung der Calciumantworten ermöglichen. Es ist bekannt, dass beispielsweise die Induktion der Nikotinbiosynthese in Tabak durch MeJA nur in Abwesenheit von 2,4-D erfolgen kann (Goossens et al., 2003). Daher wurde die Expression der Ornithin-Decarboxylase (ODC) untersucht, die an der Biosynthese von Polyaminen und Nikotin beteiligt ist (Imanishi et al., 1998). Die ODC-Expression war aber nur unter experimentellen Bedingungen möglich, die keine Induktion von Calciumantworten erlaubten und umgekehrt (Abb. 31 und 32).

Die dritte Bedingung für die Induktion der Ca^{2+} -Antworten waren sehr hohe Effektorkonzentrationen. Für OPDA, JA und IndEt-IleMe wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, die sich alle im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mM und 2 mM bewegten (Abb. 17C und D, 19C und D, 22B). Phytohormone wirken normalerweise in nanomolaren oder niedrig mikromolaren Konzentrationen. Jasmonate werden in Biotests meist in Konzentrationen von 50 μM oder 100 μM eingesetzt. Die Literatur bietet aber auch erstaunlich viele Beispiele für jasmonatinduzierte Reaktionen, die durch JA- oder MeJA-Konzentrationen von 0,5 mM und höher induziert wurden (Rickauer et al., 1997; Ellard-Ivey und Douglas, 1996; Mandujano-Chavez et al., 2000; Koch et al., 1999; Tamogami et al., 1997). Wenn über die möglichen Gründe spekuliert wird, vermutet man entweder ein bestimmtes Stereoisomer von JA oder MeJA, das für die Aktivität verantwortlich ist und nur einen gewissen Anteil der applizierten Substanz ausmacht, oder die möglicherweise begrenzte Aufnahme der Substanz in die Zelle, die zu einer Herabsetzung der wirksamen Effektorkonzentration führen würde. Wenn die für die Ca^{2+} -Antworten erforderliche Perzeption der Signalmoleküle im Inneren der Zelle stattfindet, wäre damit für die Induktion der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antworten tatsächlich eine starke Verminderung der Konzentration verbunden, da in den wenigen Sekunden bis zum Beginn des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstiegs keine großen Mengen akkumulieren können. Für die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antwort auf IndEt-IleMe wurde gezeigt, dass bei Perzeption im Zellinneren maximal die Hälfte der angebotenen Konzentration für die Induktion der Antwort zur Verfügung stehen würde (Abb. 29). Theoretische Überlegungen zu möglicherweise aktiven oder inaktiven Stereoisomeren würden nicht weit führen, da bei MeJA und JA offensichtlich unterschiedliche Konfigurationen der Seitenketten für unterschiedliche Reaktionen verantwortlich sind (Koda et al., 1992).

Es wäre möglich, dass für die Induktion Ca^{2+} -vermittelter Reaktionen in BY-2-Zellen niedrigere Jasmonatkonzentrationen ausreichen, wenn beispielsweise Calmodulin als Calciumsensor beteiligt wäre. Da es sich bei der Bindung von Ca^{2+} an die vier Bindestellen des Calmodulins um eine kooperative Bindung handelt, kann bereits ein dreifacher Anstieg der Calciumkonzentration eine vollständige Aktivierung des Calmodulins bewirken (Trewavas und Malho, 1997), so dass ein weitaus geringerer als der maximal mögliche $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ - bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Anstieg zur Übertragung des Signals ausreichen würde.

7. Ausblick

Die drei Calciumsignaturen, die durch OPDA, JA/Ind und JA/Ind-Isoleucin-Konjugate ausgelöst wurden, könnten Teile verschiedener Signaltransduktionsprozesse sein, die zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen. Die Suche nach jasmonatinduzierter und calciumvermittelter Genexpression in BY-2-Zellen muss auf Gene abzielen, die unter den oben beschriebenen Bedingungen exprimiert werden, und könnte bei Erfolg die Zuordnung bestimmter Gene zu den jeweiligen Induktoren und Calciumsignaturen ermöglichen. Da La^{3+} in einer Konzentration von 1 mM die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ -Antworten auf OPDA und JA beinahe vollständig blockiert und gleichzeitig die Gewinnung von RNA guter Qualität nicht behindert, könnte dieses System dazu dienen, erstmals eine Funktion des Zellkerncalciums in Pflanzen aufzudecken.

Neben der Identifizierung zellulärer Reaktionen, die durch Jasmonate induziert werden und bei Unterdrückung der Calciumantworten ausbleiben, muss ein weiteres Kriterium erfüllt sein, um von Calcium als Signalvermittler sprechen zu können: Es sollte die Beteiligung eines Calciumsensors demonstriert werden (Sanders et al., 1999).

Die weitere Bearbeitung der IndAz[^{14}C]IleMe-Bindestelle in der Zellwand von Sojabohnenwurzeln wird problembehaftet sein. Interessant wäre, die Bindung von MeOPDA und JA-IleMe zu überprüfen, da es sich bei der einen oder anderen Substanz eventuell um einen natürlich vorkommenden Liganden handeln könnte. Wollte man die Extraktion der Bindestelle zum Zweck ihrer Identifizierung in Angriff nehmen, könnte die kombinierte Anwendung von zellwandabbauenden Enzymen und geeigneten Extraktionsmitteln eventuell zum Erfolg führen.

Grundsätzlich sind Indanoyl-Isoleucin-Konjugate als Radioliganden nicht zu verwerfen. Die Suche nach einer hochaffinen Jasmonatbindestelle, die einen potenziellen Rezeptor darstellen könnte, würde aber die radioaktive Markierung des Liganden mit Tritium oder Iod erfordern – eine sicherlich lohnenswerte Herausforderung für Chemiker.

G Literaturverzeichnis

Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053-1057

Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Chory, J., and Schroeder, J.I. (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* **289**, 2338-2342

Allen, G.J., Muir, S.R., and Sanders, D. (1995) Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737

Almeras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Mene-Saffrane, L., and Farmer, E.E. (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 205-216

Alston, T.A., Porter, D.J.T., and Bright, H.J. (1983) Enzyme inhibition by nitro and nitroso compounds. *Acc. Chem. Res.* **16**, 418-424

Anderson, J.P., Badruzsafari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3460-3479

Arzanova, I.A., Veshkurova, O.N., and Salikhov, S.I. (2002) Hormone-binding plant proteins. Isolation, physicochemical properties, and receptor function. *Chem. Nat. Comp.* **38**, 207-222

Badminton, M.N., Kendall, J.M., Sala-Newby, G., and Campbell, A.K. (1995) Nucleo-plasmin-targeted aequorin provides evidence for a nuclear calcium barrier. *Exp. Cell. Res.* **216**, 236-243

Birkett, M.A., Campbell, C.A.M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A.J., Martin, J.L., Matthes, M., Napier, J.A., Pettersson, J., Pickett, J.A., Poppy, G.M., Pow, E.M., Pye, B.J., Smart, L.E., Wadhams, G.H., Wadhams, L.J., and Woodcock, C.M. (2000) New roles for *cis*-jasmonate as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9329-9334

Bishopp, A., Mähönen, A.P., and Helariutta, Y. (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**, 1857-1869

Bisswanger, H. (1979) *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel, 21-25

Blechert, S., Bockelmann, C., Fülllein, M., v. Schrader, T., Stelmach, B., Niesel, U., and Weiler, E.W. (1999) Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* **207**, 470-479

- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Müller, M.J., Xia, Z.-Q., and Zenk, M.H. (1995)** The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4099-4105
- Blee, E. (2002)** Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**, 315-321
- Blee, K.A., Wheatley, E.R., Bonham, V.A., Mitchell, G.P., Robertson, D., Slabas, A.R., Burrell, M.M., Wojtaszek, P., and Bolwell, G.P. (2001)** Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* **212**, 404-415
- Blein, J.-P., Coutos-Thevenot, P., Marion, D., and Ponchet, M. (2002)** From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci.* **7**, 293-296
- Bodnaryk, R., and Yoshihara, T. (1995)** Structure-activity relationships of cyclopentane analogs of jasmonic acid for induced responses of canola seedlings, *Brassica napus* L. *J. Chem. Ecol.* **21**, 1735-1743
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. (2004)** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**, 1577-1591
- Bradford, M.M. (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
- Brandon, L.D., and Goldberg, M.B. (2001)** Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J. Bacteriol.* **183**, 951-958
- Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1999)** Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring $[Ca^{2+}]$ in the various compartments of a living cell. *Microsc. Res. Tech.* **46**, 380-389
- Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H.B., Zhu, S., Newman, M.-A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., and Mundy, J. (2006)** *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* **47**, 532-546
- Bruns, R.F., Lawson-Wendling, K., and Pugsley, T.A. (1983)** A rapid filtration assay for soluble receptors using polyethylenimine-treated filters. *Anal. Biochem.* **132**, 74-81
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., and Leaver, C.J. (2005)** Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 567-585
- Bücking, H., Förster, H., Stenzel, I., Miersch, O., and Hause, B. (2004)** Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley. *FEBS Lett.* **562**, 45-50

- Buhot, N., Gomes, E., Milat, M.-L., Ponchet, M., Marion, D., Lequeu, J., Delrot, S., Coutos-Thevenot, P., and Blein, J.-P. (2004)** Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5047-5052
- Bunney, T.D., Shaw, P.J., Watkins, P.A.C., Taylor, J.P., Beven, A.F., Wells, B., Calder, G.M., and Drobak, B.K. (2000)** ATP-dependent regulation of nuclear Ca²⁺ levels in plant cells. *FEBS Lett.* **476**, 145-149
- Burt, D.R. (1978)** Criteria for receptor identification. In: *Neurotransmitter Receptor Binding* (edited by Yamamura, H.I., et al.) Raven Press, New York, 41-55
- Bush, D.S. (1996)** Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta* **199**, 89-99
- Caliskan, M. (2000)** Germin, an oxalate oxidase, has a function in many aspects of plant life. *Turk. J. Biol.* **24**, 717-724
- Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., and Bevan, M. (2003)** Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **34**, 351-362
- Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.-C., Nam, K.H., Li, J., and Chory, J. (2004)** BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Dev.* **131**, 5341-5351
- Chen, I.A., and Szostak, J.W. (2004)** Membrane growth can generate a transmembrane pH gradient in fatty acid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7965-7970
- Chen, Y.-F., Randlett, M.D., Findell, J.L., and Schaller, G.E. (2002)** Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 19861-19866
- Ciarlante, D., and Curtis, R.W. (1977)** Isolation and characterization of the cell wall receptor of ¹⁴C-malformin in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **18**, 225-234
- Cooper, W.R., Jia, L., and Goggin, L. (2005)** Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. *J. Chem. Ecol.* **31**, 1953-1967
- Cornish-Bowden, A., and Koshland, D.E. (1975)** Diagnostic uses of the Hill (Logit and Nernst) plots. *J. Mol. Biol.* **95**, 201-212
- Cosio, E.G., Feger, M., Miller, C.J., Antelo, L., and Ebel, J. (1996)** High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. *Planta* **200**, 92-99
- Cosio, E.G., Frey, T., Verduyn, R., van Boom, J., and Ebel, J. (1990)** High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* **271**, 223-226
- Cosio, E.G., Pöpperl, H., Schmidt, W.E., and Ebel, J. (1988)** High-affinity binding of fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fractions and protoplasts. *Eur. J. Biochem.* **175**, 309-315

- Creelman, R.A., and Mullet, J.E. (1995)** Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4114-4119
- Creelman, R.A., and Mullet, J.E. (1997)** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381
- Dathe, W., Kramell, H.-M., Daeter, W., Kramell, R., Slovik, S., and Hartung, W. (1993)** Uptake of jasmonic acid and related compounds by mesophyll protoplasts of the barley leaf. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 133-140
- Dathe, W., Rönsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., and Schreiber, K. (1981)** Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**, 530-535
- del Castillo-Olivares, A., Yantiri, F., Chueh, P.-J., Wang, S., Sweeting, M., Sedlak, D., Morre, D.M., Burgess, J., and Morre, D.J. (1998)** A drug-responsive and protease-resistant peripheral NADH oxidase complex from the surface of HeLa S cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 125-140
- Demole, E., Lederer, E., and Mercier, D. (1962)** Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **45**, 645-685
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G. (2002)** COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 457-466
- Devoto, A., and Turner, J.G. (2004)** Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol. Plant.* **123**, 161-172
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005)** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997)** Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858
- Dong, A., Xin, H., Yu, Y., Sun, C., Cao, K., and Shen, W.H. (2002)** The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, OsCaM61, depends on its prenylation status. *Plant Mol. Biol.* **48**, 203-210
- Douliez, J.-P., Jegou, S., Pato, C., Larre, C., Molle, D., and Marion, D. (2001)** Identification of a new form of lipid transfer protein (LTP1) in wheat seeds. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1805-1808
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R. (1996)** Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681
- Ellard-Ivey, M., and Douglas, C.J. (1996)** Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **112**, 183-192

- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., and Turner, J.G. (2002)** The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566
- Fabiato, A., and Fabiato, F. (1975)** Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.* **249**, 469-495
- Facchini, P.J., and Chappell, J. (1992)** Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11088-11092
- Farmer, E.E. (1997)** New fatty acid-based signals: a lesson from the plant world. *Science* **276**, 912-913
- Farmer, E.E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V. (2003)** Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 372-378
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A. (1990)** Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7713-7716
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A. (1992)** Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W. (2003)** The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{CO11} and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* **15**, 1083-1094
- Fliegmann, J., Schüler, G., Boland, W., Ebel, J., and Mithöfer, A. (2003)** The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. *Biol. Chem.* **384**, 437-446
- Galis, I., Simek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H., and Matsuoka, K. (2006)** A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant J.* **46**, 573-592
- Gapper, N.E., Norris, G.E., Clarke, S.F., Lill, R.E., and Jameson, P.E. (2002)** Novel jasmonate amino acid conjugates in *Asparagus officinalis* during harvest-induced and natural foliar senescence. *Physiol. Plant.* **114**, 116-124
- Gerasimenko, J.V., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, N.J., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (2003)** NAADP mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J. Cell. Biol.* **163**, 271-282
- Gibeaut, D.M., and Carpita, N.C. (1994)** Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* **8**, 904-915
- Goossens, A., Häkkinen, S.T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inzé, D., and Oksman-Caldentey, K.M. (2003)** A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8595-8600
- Grignon, C., and Sentenac, H. (1991)** pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 103-128

- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H. (1992)** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2389-2393
- Haider, G., von Schrader, T., Fülllein, M., Blechert, S., and Kutchan, T.M. (2000)** Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol. Chem.* **381**, 741-748
- Halitschke, R., Ziegler, J., Keinänen, M., and Baldwin, I.T. (2004)** Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *Plant J.* **40**, 35-46
- Hall, J.L., and Moore, A.L. (1983)** Isolation of membranes and organelles from plant cells. Academic Press London ISBN 0-12-318820
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., and Bading, H. (1997)** Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* **385**, 260-265
- Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., and Strack, D. (2002)** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* **130**, 1213-1220
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., and Wasternack, C. (2000)** Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J.* **24**, 113-126
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., and Gan, S. (2002)** Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* **128**, 876-884
- He, Z.-H., Fujiki, M., and Kohorn, B.D. (1996)** A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 19789-19793
- Hetherington, A.M., and Brownlee, C. (2004)** The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 401-427
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1994)** Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* **6**, 723-735
- Hille, A., Purwin, C., and Ebel, J. (1982)** Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in cultured soybean cells by an elicitor from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Cell Rep.* **1**, 123-127
- Hopke, J. (1997)** Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., and 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
- Huang, F.-Y., Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Callaham, D.A., Sabato, R., Zelcer, A., and Hepler, P.K. (1997)** Increases in cytosolic Ca²⁺ in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. *Plant Physiol.* **115**, 51-60

- Imagawa, T., Smith, J.S., Coronado, R., and Campbell, K.P. (1987)** Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J. Biol. Chem.* **262**, 16636-16643
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., and Nakamura, K. (1998)** Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1101-1111
- Irving, H.R., Gehring, C.A., and Parish, R.W. (1992)** Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1790-1794
- Isayenkov, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D., and Hause, B. (2005)** Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol.* **139**, 1401-1410
- Ishizu, K.-I., Watanabe, H., Han, S.-I., Kaneshashi, S.-N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K., and Handa, H. (2001)** Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J. Virol.* **75**, 61-72
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., and Pont-Lezica, R.F. (2006)** Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* **11**, 33-39
- Jikumaru, Y., Asami, T., Seto, H., Yoshida, S., Yokoyama, T., Obara, N., Hasegawa, M., Kodama, O., Nishiyama, M., Okada, K., Nojiri, H., and Yamane, H. (2004)** Preparation and biological activity of molecular probes to identify and analyze jasmonic acid-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1461-1466
- Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., and Trewavas, A.J. (1995)** Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* **269**, 1863-1865
- Kamp, F., and Hamilton, J.A. (1992)** pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11367-11370
- Kemple, M.D., Lovejoy, M.L., Ray, B.D., Prendergast, F.G., and Nageswara Rao, B.D. (1990)** Mn(II)-EPR measurements of cation binding by aequorin. *Eur. J. Biochem.* **187**, 131-135
- Kendall, J.M., and Badminton, M.N. (1998)** *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *TIBTECH* **16**, 216-224
- Kenton, P., Mur, L.A.J., and Draper, J. (1999)** A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J. Exp. Bot.* **50**, 1331-1341
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005)** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451
- Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G., and Hwang, I. (2006)** Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 814-819

- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1996)** Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**, 489-503
- Ko, J.-H., Kim, J.H., Jayanty, S.S., Howe, G.A., and Han, K.-H. (2006)** Loss of function of COBRA, a determinant of oriented cell expansion, invokes cellular defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **57**, 2923-2936
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., and 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
- Koda, Y., Kikuta, Y., Kitahara, T., Nishi, T., and Mori, K. (1992)** Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate. *Phytochemistry* **31**, 1111-1114
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S., and Yoshihara, T. (1991)** Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**, 1435-1438
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brückner, C., Schmidt, J., Sembdner, G., and Parthier, B. (1995)** Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *J. Plant Growth Regul.* **14**, 29-36
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B., and Wasternack, C. (2000)** Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the „oxylipin signature“ in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* **123**, 177-187
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., and Wasternack, C. (1997)** Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett.* **414**, 197-202
- Kramer, E.M. (2006)** How far can a molecule of weak acid travel in the apoplast or xylem? *Plant Physiol.* **141**, 1233-1236
- Krumm, T., Bandemer, K., and Boland, W. (1995)** Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. *FEBS Lett.* **377**, 523-529
- Kuba, K. (1994)** Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in neurones. *Jpn. J. Physiol.* **44**, 613-650
- Kurdi, P., van Veen, H.W., Tanaka, H., Mierau, I., Konings, W.N., Tannock, G.W., Tomita, F., and Yokota, A. (2000)** Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane ΔpH, in many lactobacilli. *J. Bacteriol.* **182**, 6525-6528
- Kurkdjian, A., and Guern, J. (1989)** Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 271-303
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lauchli, R., and Boland, W. (2002)** Indanoyl amino acid conjugates: tunable elicitors of plant secondary metabolism. *Chem. Rec.* **3**, 12-21

- Laudert, D., and Weiler, E.W. (1998)** Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* **15**, 675-684
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005)** Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**, 527-538
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006)** Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* **171**, 249-269
- Lee, M.-W., Qi, M., and Yang, Y. (2001)** A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 527-535
- Lee, S.-J., Saravanan, R.S., Damasceno, C.M.B., Yamane, H., Kim, B.-D., and Rose, J.K.C. (2004)** Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 979-988
- Leon, J., Rojo, E., Titarenko, E., and Sanchez-Serrano, J.J (1998)** Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 412-419
- Li, H., Dauwalder, M., and Roux, S.J. (1991)** Partial purification and characterization of a Ca²⁺-dependent protein kinase from pea nuclei. *Plant Physiol.* **96**, 720-727
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004)** The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**, 319-331
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M.J., and Bootman, M.D. (1997)** Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J.* **16**, 7166-7173
- Logan, D.C., and Knight, M.R. (2003)** Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol.* **133**, 21-24
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004)** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1938-1950
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003)** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165-178
- Lüdemann, H.-D., and Nimz, H. (1974)** ¹³C-Kernresonanzspektren von Ligninen, 2. *Makromol. Chem.* **175**, 2409-2422
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D.G., and Romeis, T. (2005)** Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10736-10741
- Ma, J., Fill, M., Knudson, C.M., Campbell, K.P., and Coronado, R. (1988)** Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* **242**, 99-102

Malviya, A.N., and Rogue, P.J. (1998) "Tell me where is calcium bred": Clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* **92**, 17-23

Mandujano-Chávez, A., Schoenbeck, M.A., Ralston, L.F., Lozoya-Gloria, E., and Chappell, J. (2000) Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 285-294

Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E., and Leite, M.F. (2006) Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* **39**, 65-73

Marshall, J., Corzo, A., Leigh, R.A., and Sanders, D. (1994) Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. roots. *Plant J.* **5**, 683-694

McAinsh, M.R., Gray, J.E., Hetherington, A.M., Leckie, C.P., and Ng, C. (2000) Ca²⁺ signalling in stomatal guard cells. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 476-481

McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M. (1998) Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci.* **3**, 32-36

McManus, J.F.A. (1956) Factors favouring restriction to 1,2 glycols of materials coloured by the periodic acid-Schiff reaction. *Nature* **178**, 914-915

Memelink, J., Verpoorte, R., and Kijne, J.W. (2001) ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* **6**, 212-219

Menke, F.L.H., Parchmann, S., Müller, M.J., Kijne, J.W., and Memelink, J. (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **119**, 1289-1296

Michaely, P., and Bennett, V. (1995) The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. *J. Biol. Chem.* **270**, 22050-22057

Miersch, O., Kramell, R., Parthier, B., and Wasternack, C. (1999) Structure-activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid in gene expression of barley leaves. *Phytochemistry* **50**, 353-361

Mithöfer, A., and Ebel, J. (1999) Functional reconstitution of β -glucan elicitor-binding activity upon incorporation into lipid vesicles. *FEBS Lett.* **458**, 129-132

Mithöfer, A., Ebel, J., Bhagwat, A.A., Boller, T., and Neuhaus-Url, G. (1999) Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* **207**, 566-574

Mithöfer, A., Maitrejean, M., and Boland, W. (2005) Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. *J. Plant Growth Regul.* **23**, 170-178

Mithöfer, A., and Mazars, C. (2002) Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells. *Biol. Proced. Online* **4**, 105-118

- Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1997)** Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**, 2243-2259
- Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R., and Johannes, E. (1998)** Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.* **21**, 1101-1111
- Müller, M.J. (2004)** Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 441-448
- Munson, P.J., and Rodbard, D. (1983)** Number of receptor sites from Scatchard and Klotz graphs: A constructive critique. *Science* **220**, 979-981
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.-C., Park, S.-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I. (2006)** Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* **46**, 880-889
- Napier, R. (2004)** Plant hormone binding sites. *Ann. Bot.* **93**, 227-233
- Nimz, H., Ebel, J., and Grisebach, H. (1975)** On the structure of lignin from soybean cell suspension cultures. *Z. Naturforsch.* **30c**, 442-444
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N., and Omori, T. (1996)** Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol.* **110**, 387-392
- Normanly, J. (1997)** Auxin metabolism. *Physiol. Plant.* **100**, 431-442
- O'Malley, R.C., Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Binder, B.M., O'Donnell, P., Klee, H.J., and Bleecker, A.B. (2005)** Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *Plant J.* **41**, 651-659
- Orozco-Cardenas, M., and Ryan, C.A. (1999)** Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6553-6557
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.-F., and Masclaux-Daubresse, C. (2006)** The two senescence-related markers, *GS1* (cytosolic glutamine synthetase) and *GDH* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* **57**, 547-557
- Palme, K. (1993)** From binding proteins to hormone receptors? *J. Plant Growth Regul.* **12**, 171-178
- Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., Graziana, A., Muto, S., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2001)** The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* **30**, 413-421

Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., van der Luit, A.H., Moreau, M., Trewavas, A.J., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2000) Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* **405**, 754-755

Petruzzelli, L., Sturaro, M., Mainieri, D., and Leubner-Metzger, G. (2003) Calcium requirement for ethylene-dependent responses involving 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in radicle tissues of germinated pea seeds. *Plant Cell Environ.* **26**, 661-671

Pineros, M., and Tester, M. (1997) Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *J. Exp. Bot.* **48**, 551-577

Radolf, J.D., Borenstein, L.A., Kim, J.Y., Fehniger, T.E., and Lovett, M.A. (1987) Role of disulfide bonds in the oligomeric structure and protease resistance of recombinant and native *Treponema pallidum* surface antigen 4D. *J. Bacteriol.* **169**, 1365-1371

Raz, V., and Fluhr, R. (1992) Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell* **4**, 1123-1130

Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., and Hill, R.D. (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**, 290-294

Reddy, V.S., and Reddy, A.S.N. (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* **65**, 1745-1776

Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Véronési, C., Grimal, H., Esquerré-Tugayé, M.-T. (1997) The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta* **202**, 155-162

Riggs, A.F. (1998) Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *J. Exp. Biol.* **201**, 1073-1084

Ringli, C., Hauf, G., and Keller, B. (2001) Hydrophobic interactions of the structural protein GRP1.8 in the cell wall of protoxylem elements. *Plant Physiol.* **125**, 673-682

Robertson, D., Mitchell, G.P., Gilroy, J.S., Gerrish, C., Bolwell, G.P., and Slabas, A.R. (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J. Biol. Chem.* **272**, 15841-15848

Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A., and Sandalio, L.M. (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ.* **29**, 1532-1544

Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G., and Sanchez-Serrano, J.J. (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**, 153-165

Rossato, L., Le Dantec, C., Laine, P., and Ourry, A. (2002) Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: Identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *J. Exp. Bot.* **53**, 265-275

Ryden, P., and Selvendran, R.R. (1990) Cell-wall polysaccharides and glycoproteins of parenchymatous tissues of runner bean (*Phaseolus coccineus*). *Biochem. J.* **269**, 393-402

- Sanders, D., Brownlee, C., and Harper, J.F. (1999)** Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., and Harper, J.F. (2002)** Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14** Suppl., S401-S417
- Scatchard, G. (1949)** The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672
- Schaller, F. (2001)** Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* **52**, 11-23
- Schaller, G.E., and Bleecker, A.B. (1995)** Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* **270**, 1809-1811
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M. (2000)** Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11655-11660
- Schmidt, A., and Boland, W. (2007)** General strategy for the synthesis of B₁ phytoprostanes, dinor isoprostanes, and analogs. *J. Org. Chem.* **72**, 1699-1709
- Schüler, G., Görls, H., and Boland, W. (2001)** 6-Substituted indanoyl isoleucine conjugates mimic the biological activity of coronatine. *Eur. J. Org. Chem.* 1663-1668
- Schüler, G., Mithöfer, A., Baldwin, I.T., Berger, S., Ebel, J., Santos, J.G., Herrmann, G., Hölscher, D., Kramell, R., Kutchan, T.M., Maucher, H., Schneider, B., Stenzel, I., Wasternack, C., and Boland, W. (2004)** Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Lett.* **563**, 17-22
- Schüler, G., Wasternack, C., and Boland, W. (1999)** Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling. *Tetrahedron* **5**, 3897-3904
- Schumaker, K.S., and Gizinski, M.J. (1993)** Cytokinin stimulates dihydropyridine-sensitive calcium uptake in moss protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10937-10941
- Sembdner, G., and Parthier, B. (1993)** The biochemistry and the physiological and molecular actions of Jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 569-589
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2001)** Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4788-4793
- Shen, Y.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Du, S.-Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.-L., Peng, C.-C., Yu, X.-C., Zhu, S.-Y., Fan, R.-C., Xu, Y.-H., and Zhang, D.-P. (2006)** The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**, 823-826
- Shinshi, H., Mohnen, D., and Meins, F. (1987)** Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 89-93
- Showalter, A.M. (1993)** Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23

Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1985) Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature* **316**, 446-449

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., and Suza, W. (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616-627

Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6837-6840

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

Staswick, P.E., Tiryaki, I., and Rowe, M.L. (2002) Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**, 1405-1415

Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, C.C. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* **15**, 747-754

Stintzi, A., and Browse, J. (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10625-10630

Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12837-12842

Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Machereux, P., and Schaller, A. (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* **32**, 585-601

Stuhlfelder, C., Müller, M.J., and Warzecha, H. (2004) Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2976-2983

Suhita, D., Kolla, V.A., Vavasseur, A., and Raghavendra, A.S. (2003) Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Sci.* **164**, 481-488

Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M., and Vavasseur, A. (2004) Cytoplasmic alkalinization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* **134**, 1536-1545

Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D.M., Bright, L., Oldroyd, G., and Harris, J.M. (2006a) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.* **46**, 961-970

Sun, Q.-P., Guo, Y., Sun, Y., Sun, D.-Y., and Wang, X.-J. (2006b) Influx of extracellular Ca^{2+} involved in jasmonic-acid-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and *JR1* expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **119**, 343-350

- Suzuki, M., Hasegawa, M., Kodama, O., and Toshima, H. (2004)** Dihydrocoronatine, promising candidate for a chemical probe to study coronatine-, jasmonoid- and octadecanoid-binding protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1617-1620
- Swiatek, A., Van Dongen, W., Esmans, E.L., and Van Onckelen, H. (2004)** Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **135**, 161-172
- Szymanski, D.B., Liao, B., and Zielinski, R.E. (1996)** Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis Cam-3* promoter. *Plant Cell* **8**, 1069-1077
- Tamogami, S., Rakwal, R., and Kodama, O. (1997)** Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* **401**, 239-242
- Thoma, I., Krischke, M., Löffler, C., and Müller, M.J. (2004)** The isoprostanoid pathway in plants. *Chem. Phys. Lipids* **128**, 135-148
- Trewavas, A.J., and Malho, R. (1997)** Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**, 1181-1195
- Trigatti, B.L., and Gerber, G.E. (1996)** The effect of intracellular pH on long-chain fatty acid uptake in 3T3-L1 adipocytes: evidence that uptake involves the passive diffusion of protonated long-chain fatty acids across the plasma membrane. *Biochem. J.* **313**, 487-494
- Ueda, J., and Kato, J. (1980)** Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* **66**, 246-249
- Ueda, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Hashimoto, J. (2000)** Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Mol. Biol.* **44**, 649-657
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-Y., Hsing, Y.-I.C., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2005)** GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693-698
- van der Luit, A.H., Olivari, C., Haley, A., Knight, M.R., and Trewavas, A.J. (1999)** Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **121**, 705-714
- Véronési, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouéat, M.-L., and Esquerré-Tugayé, M.-T. (1996)** Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol.* **112**, 997-1004
- Very, A.-A., and Davies, J.M. (2000)** Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9801-9806
- Vick, B.A., and Zimmermann, D.C. (1984)** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* **75**, 458-461
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J. (1998)** A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7209-7214

- Wang, Z.-Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001)** BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380-383
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., and Miersch, O. (2006)** The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.*, **163**, 297-306
- Weber H. (2002)** Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 217-224
- Weber, H., Vick, B.A., and Farmer, E.E. (1997)** Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10473-10478
- Weiler, E.W. (1997)** Octadecanoid-mediated signal transduction in higher plants. *Naturwissenschaften* **84**, 340-349
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., and Bublitz, F. (1994)** The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.* **345**, 9-13
- Wengier, D., Valsecchi, I., Cabanas, M.L., Tang, W.-H., McCormick, S., and Muschietti, J. (2003)** The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6860-6865
- Wolucka, B.A., Goossens, A., and Inzé, D. (2005)** Methyl jasmonate stimulates the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.* **56**, 2527-2538
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005)** A receptor for auxin. *Plant Cell* **17**, 2425-2429
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R., and Chua, N.-H. (1997)** Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**, 2126-2130
- Xiong, T.C., Bourque, S., Lecourieux, D., Amelot, N., Grat, S., Briere, C., Mazars, C., Pugin, A., and Ranjeva, R., (2006)** Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1209-1215
- Xiong, T.C., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2004)** Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J.* **40**, 12-21
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001)** The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-1023
- Yamane, H., Takagi, H., Abe, H., Yokota, T., and Takahashi, N. (1981)** Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol.* **22**, 689-97
- Yang, G., and Komatsu, S. (2000)** Involvement of calcium-dependent protein kinase in rice (*Oryza sativa* L.) lamina inclination caused by brassinolide. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1243-1250

Yang, T., and Poovaiah, B.W. (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 45049-45058

Zhang, H.-Y., Xie, X.-Z., Xu, Y.-Z. and Wu, N.-H. (2004) Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 437-444

Zhang, Z.-P., Krumm, T., and Baldwin, I.T. (1997) Structural requirements of jasmonates and mimics for nicotine induction in *Nicotiana sylvestris*. *J. Chem. Ecol.* **23**, 2777-2789

Zhu, C., Gan, L., She, Z., and Xia, K. (2006) Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **57**, 1299-1308

Ziegler, J., Keinänen, M., and Baldwin, I.T. (2001) Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* **58**, 729-738

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena in der Abteilung Bioorganische Chemie (Prof. Dr. W. Boland) unter der Leitung von PD Dr. A. Mithöfer angefertigt, wobei die experimentellen Arbeiten am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Ebel durchgeführt wurden.

Vor allem Axel Mithöfer möchte ich danken! Zunächst für die Überlassung des spannenden Themas. Vor allem aber für die exzellente Fernbetreuung, für die geduldige Beantwortung aller Fragen, ob per Telefon oder schriftlich. Die umfangreiche E-mail-Korrespondenz verdient dabei besondere Anerkennung, weil Briefeschreiben nicht gerade zu seinen Leidenschaften zählt. Ich bin sehr dankbar für seine Großzügigkeit, für die Freiheit, die er mir bei der Durchführung der Arbeit gewährt hat, und das damit verbundene Vertrauen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. J. Ebel, der mich in seinem Labor beherbergt hat, das Voranschreiten meiner Arbeit mit größtem Interesse verfolgt hat, bald als Rat- und Auskunftgeber unentbehrlich wurde, mit seiner biochemischen Kompetenz und einem reichen Erfahrungsschatz entscheidend zum Erfolg des Unternehmens beigetragen hat und schließlich das „Kuckucks-Ei“ adoptierte, indem er die offizielle Betreuerfunktion übernahm.

Diese Konstellation war eine außerordentliche Bereicherung. Aber damit nicht genug – ein Dritter hat sich als „Comandante“ verdient gemacht: Dr. Christian Mazars, der mich und das Calciumprojekt in Toulouse beaufsichtigt hat. Ohne ihn hätte sich meine Jasmonatforschung in eine düstere Richtung entwickelt.

Außerdem danke ich

- Dr. Judith Fliegmann für die Einführung in die Molekularbiologie
- Dr. Mathias Maitrejean für die unkomplizierte Versorgung mit Indanoyl-Isoleucin-Konjugaten
- Dr. Ales Svatos für die gelungene Fernsteuerung bei der Verseifung von IndEt-IleMe
- Dr. Martina Silber für die vielen hilfreichen Diskussionen
- Margit Leitner und Heiko Maischak für die Kontrollmessungen einzelner Jasmonate
- meinen Eltern und Geschwistern für ihre rege Anteilnahme („Was forschst du denn da eigentlich dauernd?“)

und allen Mitgliedern der AG Ebel, nämlich Judith Fliegmann, Martina Silber, Karin Schmieja, Karina Valer, Alma Djulic, allen Ehemaligen und Gästen für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Es war mir ein Vergnügen!

Lebenslauf

Name: Agnes Walter
Geburtsdatum: 29.10.1973
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schule und Studium

09/1984 - 07/1993 Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

01/1994 - 07/1994 Au-Pair-Aufenthalt in Santiago, Chile

10/1994 - 07/1997 Studium der Biologie und Chemie
für das Lehramt an Gymnasien
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

08/1997 - 07/1998 Integriertes Auslandsstudium der Biologie
an der Universidad de Concepción, Chile

10/1998 - 07/2002 Fortsetzung des Lehramtstudiums Biologie/Chemie
an der LMU München
Abschluss: Erstes Staatsexamen

10/2002 - 12/2002 Erweiterung des Biologiestudiums an der LMU München
durch Ablegen der Diplom-Hauptprüfung
Abschluss: Diplom Biologie

Diplomarbeit zum Thema: „Import und Assemblierung
von fünf kerncodierten Proteinen in Plastiden der Gerste
(*Hordeum vulgare*)“ bei Prof. Dr. L. Eichacker

seit 03/2003 Promotion am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie,
Jena, Abteilung Bioorganische Chemie, Prof. Dr. W. Boland,
unter Leitung von PD Dr. A. Mithöfer
in Kooperation mit der LMU München, Prof. Dr. J. Ebel
(promovierende Universität: LMU)

Thema der Dissertation: „Charakterisierung einer
potenziellen Bindestelle für Jasmonate in *Glycine max* L.
und jasmonatinduzierte Calciumantworten in *Nicotiana
tabacum* L.“