

Charakterisierung und Funktion von *CYP74*-Enzymen in pflanzlichen Organismen

Kumulative Dissertation

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

vorgelegt der

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

von

Michael Stumpe

Geboren am 13. September 1977 in Köthen (Anhalt)

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Wasternack
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Hamberg

Halle (Saale), 09. November 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009651

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009651>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2 Die CYP74-Familie der Cytochrom P450-Enzyme	4
2.1 Enzymkatalyse und Substratspezifität.....	4
Hydroperoxid-Lyase	6
Divinylether-Synthase	10
Allenoxid-Synthase.....	11
Studien zum Katalysemechanismus.....	12
Umsatz von ω - und (ω -1)-Hydroxy-Fettsäuren.....	18
2.2 Organspezifische und intrazelluläre Lokalisation der CYP74-Enzyme	22
2.3 Oxylipinprofiling und physiologische Funktion von Oxylipinen	26
Oxylipinprofile verschiedener Kartoffelorgane.....	26
Untersuchungen von <i>Arabidopsis</i> CYP74-Deletionsmutanten	29
3 Zusammenfassung	35
4 Literaturverzeichnis	37
5 Publikationen und Manuskripte	44

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase(n)
α -DOX	α -Dioxygenase(n)
CTS	chloroplastidäres Transitpeptid
DES	Divinylether-Synthase(n)
EAS	Epoxyalkohol-Synthase
EI	Elektronenstoßionisierung
12,13-EOT	12,13-Epoxyoctadecatriensäure
HOJA	Hydroxyjasmonat
HPL	Hydroperoxid-Lyase(n)
9-H(P)ODE	(9 <i>S</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i>)-9-Hydro(pero)xy-10,12-octadecadiensäure
9-H(P)OTE	(9 <i>S</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-9-Hydro(pero)xy-10,12,15-octadecatriensäure
13-H(P)ODE	(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>S</i>)-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure
13-H(P)OTE	(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>S</i> ,15 <i>Z</i>)-13-Hydro(pero)xy-9,11,15-octadecatriensäure
KODE	Ketooctadecadiensäure
KOTE	Ketooctadecatriensäure
LA	Linolsäure
LeA	Linolensäure
LOX	Lipoxygenase(n)
NCI	negative chemische Ionisierung
12-OPDA	12-Oxo-phytodiensäure
RA	(7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i>)-Hexadecatriensäure
VSP	vegetatives Speicherprotein

1 Einleitung und Ziel der Arbeit

„Oxylipine“ ist eine Bezeichnung für oxidierte Fettsäuren und ihre Metabolite. Sie spielen eine bedeutende Rolle in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen und bei Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress (Feussner & Wasternack, 2002; Schillmiller & Howe, 2005). Ihre Synthese kann sowohl autooxidativ (chemisch) als auch enzymatisch durch Mono- oder Dioxygenasen erfolgen. Bei der enzymatischen Biosynthese besitzen α -Dioxygenasen (α -DOX) und Lipoxygenasen (LOX) eine große Bedeutung. Die Reaktionsprodukte dieser Enzyme sind Fettsäure-Hydroperoxide (Blée, 2002).

Die α -DOX fügt molekularen Sauerstoff spezifisch am C-2 von Fettsäuren ein. Die Rolle dieses Enzyms und seiner Reaktionsprodukte werden derzeit in verschiedenen Pflanzen untersucht. Erste Ergebnisse zeigen auch hier, wie bei den LOX-abhängigen Oxylipinen, eine Rolle in der Stressantwort gegenüber Pathogenen (de Leon *et al.*, 2002).

LOX benötigen für ihre Aktivität ein (1Z,4Z)-Pentadiensystem innerhalb des Kohlenstoffgerüsts der Fettsäure. Im Pflanzenreich gehören Linol- und α -Linolensäure (LA, α -LeA) zu den wesentlichen Substraten und bilden somit Ausgangspunkt der verschiedenen Oxylipine des so genannten LOX-Reaktionsweges (Blée, 2002). Der Einbau des Sauerstoffs erfolgt in der Regel stereospezifisch in der *S*-Konfiguration (Abb. 1) (Gardner, 1991).

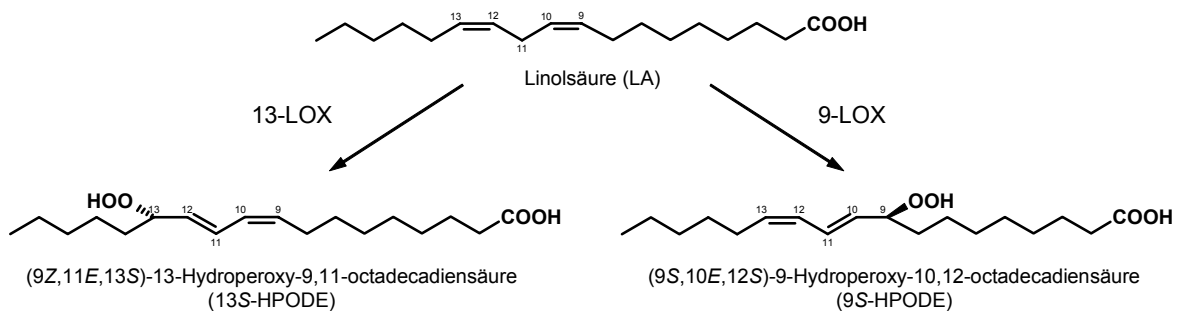


Abb. 1: LOX-Reaktion am Beispiel der Linolsäure. In Abhängigkeit der Regioselektivität des Enzyms werden das 9S- bzw. das 13S-Hydroperoxid gebildet.

Eine Einteilung der pflanzlichen LOX kann aufgrund ihrer regiospezifischen Einführung von Sauerstoff in das Substrat LA erfolgen. Man unterscheidet entsprechend 13- und 9-LOX (Abb. 1) (Feussner & Wasternack, 2002). In Vertebraten erfolgt die Einteilung in Bezug auf Arachidonsäure (AA). Die Regiospezifität ist aber keine absolute

Enzymeigenschaft, sondern kann zudem von äußeren Faktoren, wie z. B. dem pH-Wert oder der Zugänglichkeit des Substrates, abhängen (Gardner, 1989; Began *et al.*, 1999). Eine zweite Möglichkeit der Klassifizierung in Pflanzen erfolgt aufgrund differentieller Sequenzhomologien und des Vorhandenseins eines chloroplastidären Transitpeptides (CTS). LOX vom Typ 2 besitzen im Gegensatz zu Typ 1 ein CTS (Shibata *et al.*, 1994).

Die durch LOX gebildeten Fettsäure-Hydroperoxide werden in Pflanzen schnell durch weitere Enzyme metabolisiert (Blée, 2002). Zurzeit kennt man sieben verschiedene Folgereaktionen (Abb. 2).

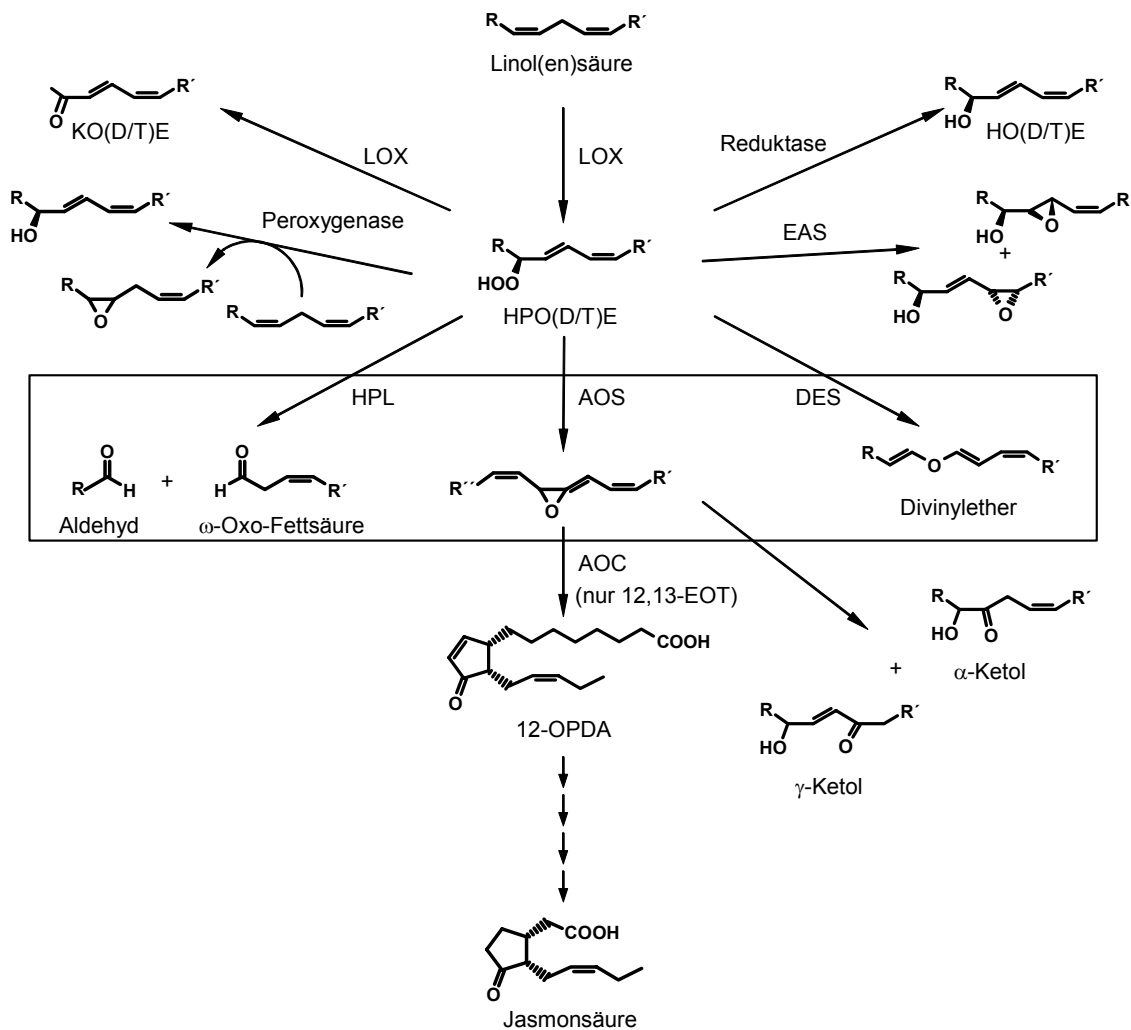


Abb. 2: Der Lipoxygenase (LOX)-Reaktionsweg. Eingerahmt sind die *CYP74*-Enzyme. EOT-Epoxyoctadecatriensäure, HO(D/T)E-Hydroxyoctadeca(di/tri)ensäure, KO(D/T)E-Ketooctadeca(di/tri)ensäure, EAS-Epoxyalkohol-Synthase, weitere Abkürzungen siehe Text.

Zu ihnen zählen die Reduktase-, die Epoxyalkohol-Synthase-, die Peroxygenase-Reaktion sowie die Umsetzung durch LOX selbst. Neben diesen Stoffwechselschritten kommt der Umsetzung der Hydroperoxide durch die *CYP74*-Familie der Cytochrom-P450-

haltigen Enzyme eine große Bedeutung zu. Zu dieser gehören bisher die Allenoxid-Synthase (AOS), Hydroperoxid-Lyase (HPL) und Divinylether-Synthase (DES) (Feussner & Wasternack, 2002). Sie bilden Verzweigungspunkte im LOX-Reaktionsweg, die zur Synthese von Pflanzenhormonen bzw. hormonähnlichen Substanzen (Jasmonate, Traumatin), Phytoalexinen (Aldehyde, Divinylether) und Stoffen mit bisher unbekanntem Funktionen führen (Feussner & Wasternack, 2002).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Eigenschaften und der physiologischen Funktionen von *CYP74*-Enzymen in Pflanzen. Dazu wurden unter anderem die höheren Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Knoblauch (*Allium sativum*) sowie als niedere Pflanze das Moos *Physcomitrella patens* als Untersuchungsobjekte gewählt. *Arabidopsis*, die Modellpflanze deren Genom vollständig sequenziert ist, besitzt nur zwei *CYP74*-Enzyme (eine AOS, eine HPL) und sollte somit ein relativ einfach zu verstehendes und zu untersuchendes System sein. In Kartoffel und Knoblauch finden sich zusätzliche *CYP74*-Aktivitäten, wie 9-DES-, 9-AOS- oder 13-DES-Aktivitäten, die zu Beginn der Arbeit entweder noch gar nicht oder nur wenig untersucht worden waren (Galliard & Phillips, 1972; Grechkin *et al.*; 1995; Hamberg, 2000). Mit *P. patens* wählten wir ein Objekt, welches phylogenetisch weit von den anderen Untersuchungsobjekten entfernt liegt. Es besitzt im Vergleich zu höheren Pflanzen interessante Eigenschaften: das Vorhandensein von sehr langkettigen Fettsäuren (AA und Eicosapentaensäure), die als Vorläufer der Oxylipine dienen können, sowie die Möglichkeit einfach und schnell Deletionsmutanten durch homologe Rekombination zu generieren (Girke *et al.*; 1998).

Zur Aufklärung physiologischer Funktionen von *CYP74*-Enzymen in Pflanzen sollten zunächst neue Enzyme isoliert und deren Eigenschaften charakterisiert werden. So waren Untersuchungen hinsichtlich ihrer Substratspezifität, Verteilung in spezifischen Organen und Geweben sowie ihrer intrazelluläre Lokalisierung geplant. Die Ergebnisse können erste Informationen zur Rolle der Enzyme in Pflanzen geben. Des Weiteren soll der Gehalt unterschiedlicher Oxylipine in Pflanzen und *CYP74*-Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen bestimmt werden, um so weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion zu erhalten.

2 Die *CYP74*-Familie der Cytochrom P450-Enzyme

Enzyme der P450-Superfamilie kommen in allen Lebewesen vor. Allen gemeinsam ist das Häm b als prosthetische Gruppe, welches über ein hoch konserviertes Cystein an das Protein gebunden ist. Aufgrund dieses Kofaktors und dessen Bindung durch die Cystein-Seitenkette ergibt sich nach Reduktion und Behandlung des Enzymes mit Kohlenmonoxid ein typisches Absorptionsmaximum bei 450 nm, welches dieser Enzymfamilie ihren Namen gab (P für Pigment). Sie besitzen konservierte Aminosäurebereiche anhand deren man, basierend auf der Primärstruktur, eine Zugehörigkeit zu den P450-Enzymen ableiten kann (Noordermeer *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass sie sich auf ein Ur-P450-Enzym zurückführen lassen, welches bereits vor 1 Milliarde Jahren existiert haben soll (Nelson, 1999).

P450-Enzyme zählen zu den Monooxygenasen und katalysieren u. a. Hydroxylierungen, Epoxydierungen, N-Demethylierungen und Desaminierungen. Sie besitzen eine wichtige Funktion in der Detoxifikation von Xenobiotika sowie bei der Biosynthese von zahlreichen endogenen Substanzen, wie z. B. Steroidhormonen. Aufgrund der enormen Vielzahl dieser Enzyme entwickelte man eine Nomenklatur, die auf Sequenzidentitäten basiert. Der systematische Name beginnt mit *CYP*, gefolgt von der Familiennummer. Proteine einer Familie besitzen mehr als 40 % Sequenzidentität zueinander. Innerhalb einer Unterfamilie, die durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet wird, teilen sie eine Sequenzidentität von mehr als 55 %. Proteine einer Unterfamilie werden chronologisch durchnummeriert.

In der *CYP74A*-Unterfamilie finden sich 13- und 9/13-AOS, in *CYP74B* die 13-HPL, *CYP74C* beinhaltet 9/13-HPL und 9-AOS und *CYP74D* die 9-DES (vgl. 2.1). Zwei Sequenzen aus Reis, deren Aktivität noch nicht beschrieben ist, wurden den Unterfamilien E und F zugeordnet (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>).

2.1 Enzymkatalyse und Substratspezifität

Die meisten P450-Enzyme benötigen molekularen Sauerstoff und NAD(P)H als Kosubstrate. Dabei reagieren sie meist nicht direkt mit NAD(P)H, sondern mit einem Flavoprotein (Cytochrom P450-Reduktase), welches die Elektronen von NAD(P)H zum P450 transferiert. Neben molekularem Sauerstoff können auch organische Hydroperoxide, wie Cumenhydroperoxid und t-Butylhydroperoxid als Sauerstoffdonor dienen (Griffin *et al.*, 1980; Blake & Coon, 1981). Im Gegensatz dazu benötigen *CYP74*-Enzyme keinen

exogenen Sauerstoff und NAD(P)H. Sie nutzen ihr Substrat als Sauerstoffdonor und Reduktionsäquivalent (Song & Brash, 1991; Shibata *et al.*, 1995; Noordermeer *et al.*, 2001a). Ähnlich verhält es sich bei der Prostacyclin-Synthase (CYP8) und der Thromboxan-Synthase (CYP5) (Hecker & Ullrich, 1989). Ein weiterer Unterschied zu den typischen P450-Enzymen ist die geringe Affinität zu Kohlenmonoxid, die vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sie keinen molekularen Sauerstoff während der Katalyse binden müssen (Shibata *et al.*, 1995a; Matsui *et al.*, 2000a). Für diese Sauerstoffbindung ist wahrscheinlich die so genannte I-Helix (Benennung basierend auf der Kristallstruktur von Cytochrom P450cam) verantwortlich. Innerhalb dieser Helix existiert ein konserviertes Threonin, welches für die Aktivierung des Sauerstoffs verantwortlich gemacht wird (Poulos *et al.*, 1985; Gotoh, 1992; Poulos, 1995). In allen bisher charakterisierten CYP74-Enzymen ist dieses durch eine kleine hydrophobe Aminosäure (Isoleucin, Valin, Alanin) ausgetauscht (Matsui *et al.*; 1996; Itoh *et al.*, 2001).

Aufgrund der Regiospezifität der LOX entstehen in Pflanzen zwei Gruppen von Substraten für die Folge-Enzyme, die 9- bzw. 13-Hydroperoxyoctadeca(di/tri)ensäure (9- bzw. 13-HPO(D/T)E). Bei den CYP74-Enzymen kann man folglich Enzyme unterscheiden, die 9- bzw. 13-hydroperoxidspezifisch oder unspezifisch sind. Die Mehrzahl, der bisher klonierten und charakterisierten CYP74-Enzyme ist spezifisch für 13-Hydroperoxide. Dennoch findet man unter allen CYP74-Aktivitäten auch 9-spezifische oder unspezifische Enzyme (Feussner & Wasternack, 2002). Aus Curcubitaceen (Matsui *et al.*, 2000b; Tijet *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* und *P. patens* (diese Arbeit) wurden HPL kloniert, die substratunspezifisch sind, während Messungen in Birnen und Mandeln eine 9-spezifische HPL zeigten (Kim & Grosch, 1981). Auch unter den AOS finden sich unspezifische (Gerste (Maucher *et al.*, 2000)) und 9-spezifische Enzyme (Tomate (Itoh *et al.*, 2002), Kartoffel (diese Arbeit)). Bei den DES gibt es erst wenige klonierte und charakterisierte Enzyme. Die beiden DES aus Solanaceen zeigen eine hohe Selektivität für 9-Hydroperoxide (Itoh & Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001), während das Enzym aus Knoblauch (diese Arbeit) 13- und 9-HPODE gleichermaßen umsetzt. Oft findet man LOX und CYP74 mit gleichen Spezifitäten gemeinsam in Pflanzenorganen vor (Grechkin, 1998). Auch bei der Selektivität gegenüber Hydroxiden der LA bzw. LeA scheint es in der Evolution eine gemeinsame Entwicklung zwischen verfügbarem Substrat und Enzymeigenschaft gegeben zu haben. CYP74-Enzyme aus grünen Geweben, in denen LeA die dominierende Fettsäure ist, bevorzugen meist LeA-Derivate, während solche aus

unterirdischen Organen eine Präferenz für Hydroperoxide der LA haben (Shibata *et al.*, 1995b; Itoh & Howe, 2001; Itoh *et al.*, 2002, diese Arbeit).

Hydroperoxid-Lyase

Fettsäure-Hydroperoxide, die Produkte der LOX-Reaktion, können chemisch gespalten werden. Zum einen kann es durch eine säurekatalysierte Reaktion, im Sinne eines Hock-Criegee Mechanismus, zur heterolytischen Spaltung des Hydroperoxides kommen, dessen Reaktionsprodukte im Falle von 13-HPOTE (3Z)-Hexenal und (9Z)-12-Oxo-9-dodecensäure sind (Gardner & Plattner, 1984; Grechkin, 1998). Durch eine autooxidative homolytische Spaltung des Hydroperoxides, z. B. durch Hitze, entsteht ein Gemisch aus verschiedenen Alk(a/e)nen, Alkoholen und Aldehyden (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996, Grechkin, 1998). Die Hauptprodukte dieser Spaltung sind z. B. bei 13-HPOTE Pentenol und (9Z,11E)-13-Oxo-9,11-tridecadiensäure. In der Natur findet man die Reaktionsprodukte beider Mechanismen nach der Inkubation von Fettsäure-Hydroperoxiden mit unterschiedlichen Proteinextrakten. Aufgrund der verschiedenen Reaktionsprodukte unterscheidet man „homolytische“ und „heterolytische“ HPL (Gardner, 1991; Grechkin, 1998). Die homolytische Hydroperoxidspaltung ist zum einen als anaerobe LOX-Reaktion bekannt, zum anderen existieren vermutlich auch „echte“ homolytische HPL in niederen Pflanzen, wie Algen und Pilzen (Gardner, 1991; Grechkin, 1998).

Die HPL des LOX-Reaktionsweges katalysiert die Spaltung des Kohlenstoffgerüsts zwischen dem Hydroperoxid-tragendem Kohlenstoff und der Methingruppe der Doppelbindung in Nachbarstellung (Noordermeer *et al.*, 2001a). Dabei entstehen Reaktionsprodukte ähnlich denen der säurekatalysierten Spaltung. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Enzymkatalyse mit einer heterolytischen Spaltung des Hydroperoxides beginnt und diese Enzyme als „heterolytische“ HPL bezeichnet (Gardner & Plattner, 1984). Mit der spektroskopischen Untersuchung dieser HPL identifizierte man diese als Häm-Proteine, genauer als P450-Enzyme (Shibata *et al.*, 1995a). Dieses und die Tatsache, dass Radikalfänger, wie z. B. Gallensäurederivate oder α -Tocopherol, die Katalyse hemmen, führten zu der Hypothese einer homolytischen Spaltung des Hydroperoxids unter Ausbildung eines Epoxyallylradikals (Abb. 3) (Hatanaka *et al.*, 1986; Shibata *et al.*, 1995a). Inwieweit dieses zu einem Kation oxidiert wird, ist noch nicht geklärt. Die hohen Substrat-Umsatzraten (bis zu 2000 s^{-1}) sprechen für einen sehr

effizienten Mechanismus und deuten auf eine reine Radikalkatalyse hin (Tijet *et al.*, 2000; Grechkin & Hamberg, 2004). Das Epoxyallylradikal bzw. -kation ist vermutlich ein gemeinsames Intermediat im Reaktionsmechanismus aller CYP74-Enzyme. Sie unterscheiden sich wahrscheinlich nur in den Folgereaktionen (Abb. 3) (Feussner & Wasternack, 2002).

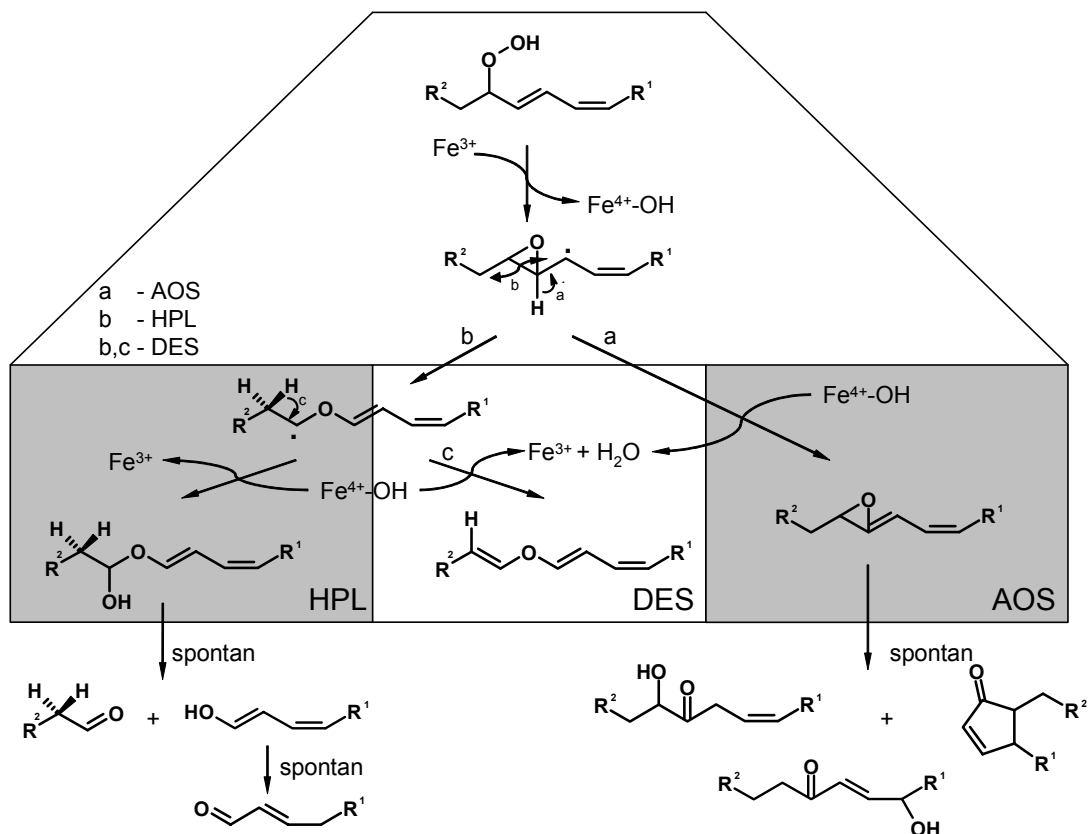


Abb. 3: Postulierter radikalischer Reaktionsmechanismus der CYP74-Enzyme (Song *et al.*, 1993; Grechkin, 2002; Grechkin & Hamberg, 2004). Allen gemeinsam ist ein Epoxyallylradikal, das unterschiedlich weiter reagiert. Die Reaktionen nach der homolytischen Spaltung des Hydroperoxides können auch in Form von Kationen erfolgen. Inwieweit es sich um einen gemischten Radikal/Kation-Mechanismus handelt oder um einen reinen Radikal-Mechanismus ist noch nicht geklärt.

Bei der HPL kommt es zur Spaltung der C-C-Bindung des Oxirans, gefolgt von der Anlagerung des Hydroxylradikals unter Bildung eines Halbacetals. Grechkin und Hamberg konnten 2004 zeigen, dass dieses Halbacetal das tatsächliche HPL-Reaktionsprodukt ist (Grechkin & Hamberg, 2004). Aufgrund der chemischen Instabilität (Halbwertszeit 20 s bei 0 °C) kommt es zur spontanen Dissoziation und damit zur Bildung eines Aldehyds und eines Enols, welches zu einem zweiten Aldehyd isomerisiert. Dieser Mechanismus wird unterstützt durch Untersuchungen mit $[^{18}\text{O}_2]$ -13-HPOTE bzw. $[^{18}\text{O}]$ -Wasser. Dabei wurde

gezeigt, dass der Sauerstoff beider Aldehydgruppen vom Hydroperoxid stammt und nicht vom Wasser. (Grechkin & Hamberg, 2004) Diese Ergebnisse widersprechen älteren Beobachtungen durch Hatanaka und Mitarbeiter, die nur in einem der Spaltprodukte eine [¹⁸O]-Markierung fanden, während das zweite Produkt unmarkiert blieb (Hatanaka *et al.*, 1986). Eine Erklärung hierfür ist die Möglichkeit des schnellen Sauerstoffaustausches der Aldehyde mit Wasser über Aldehydhydrate (Grechkin & Hamberg, 2004).

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus nutzte man die Tatsache, dass es sich bei den CYP74-Enzymen um Häm-Proteine handelt. Durch Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das Fe³⁺ der Häm-Gruppe in gereinigter HPL bei niedrigen Temperaturen im *low-spin* Zustand vorliegt (Noordermeer *et al.*, 2001b). Der energetische Unterschied zwischen *high-* und *low-spin* ist nur gering und lässt sich durch Temperatur, Druck, pH-Wert und Salzkonzentration beeinflussen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch Detergenzien, wie z. B. TritonX-100 oder n-Octyl-β-D-glucopyranosid, der *high-spin* Zustand stabilisiert wird (Noordermeer *et al.*, 2001b). Solche Detergenzien werden standardmäßig bei der Reinigung der CYP74-Enzyme genutzt, um diese zu solubilisieren. Ebenso beobachtete man eine Erhöhung der Aktivität der Enzyme durch derartige Substanzen (Shibata *et al.*, 1995b; Noordermeer *et al.*, 2001a). Wir untersuchten diesen Einfluss auf die HPL aus Gerste und fanden Veränderungen der kinetischen Parameter: eine Vergrößerung der Maximalgeschwindigkeit und eine Erniedrigung der Michaelis-Menten-Konstante (diese Arbeit). Inwieweit die Stabilisierung des *high-spin* Zustandes durch Detergenzien die Kinetik der Reaktion beeinflusst, ist bisher noch nicht geklärt, da die Veränderung des Spin-Zustandes und der damit verbundenen Änderung des Redoxpotentials in der Regel nicht geschwindigkeitsbestimmende Schritte sind (Noordermeer *et al.*, 2001a). Änderungen der Proteinstruktur durch Detergenzien könnten ebenfalls der Grund für die Erhöhung der Aktivität sein. Man geht davon aus, dass HPL sehr sensitiv auf Veränderungen ihrer hydrophoben Umgebung reagieren und dass Detergenzien eine membran-ähnliche Umgebung schaffen wie sie *in vivo* vorliegt (Shibata *et al.*, 1995b; Noordermeer *et al.*, 2001a, 2001b). Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit einer Regulation der HPL durch die Organisation der Membranen um die Proteine auf. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass eine höhere HPL-Aktivität nach einer Extraktion aus homogenisiertem Pflanzenmaterial als nach einer sanften Methode aus Protoplasten gefunden wird (Vick & Zimmerman, 1987).

Bei unseren Untersuchungen mit der Gersten-HPL stellten wir auch einen Einfluss der Konzentration von monovalenten Kationen fest. Hierbei erfolgte eine Erhöhung der

Aktivität des Enzyms, während die Michaelis-Menten-Konstante nicht beeinflusst wurde (diese Arbeit). Auch hier nehmen wir Veränderungen in der Proteinstruktur an. Diese scheinen aber von anderer Natur zu sein, als die im Falle der Detergenzien, da nicht alle kinetischen Parameter gleich beeinflusst werden und da die Effekte sich durch Kombination von Detergenzien und Kation noch vergrößern.

Entscheidende Hinweise zur Aufklärung des Katalysemechanismus und des Einflusses von Ionen und Detergenzien werden die Bestimmung der 3-dimensionalen Struktur der Proteine geben. Diese könnte auch zur Identifizierung von Substrat-erkennungsmechanismen und der damit verbundenen Spezifität verwendet werden. Da CYP74-Enzyme die Reaktionsprodukte der LOX als Substrate nutzen, kann man die Theorien zur LOX-Regiospezifität vermutlich auf CYP74-Enzyme übertragen. Basierend auf der aufgelösten Struktur verschiedener LOX und gerichteten Mutagenesen nimmt man an, dass die Größe der Bindungstasche die Regiospezifität beeinflusst und die Fettsäure mit dem Methyl-Ende in diese eintaucht (Browner *et al.*, 1998; Gillmot *et al.*, 1998). Das Carboxyl-Ende wird durch positive Aminosäuren am Rand der Tasche erkannt. Kann das Substrat tief in das Protein vordringen, erfolgt die Oxidation weiter entfernt vom Methyl-Ende; ist die Bindungstasche klein kommt es zur Einführung des Sauerstoffs näher am Methyl-Ende.

Alternativ wäre eine inverse Orientierung der Fettsäure in der Bindungstasche für die Spezifität verantwortlich (Prigge *et al.*, 1998; Hornung *et al.*, 1999; Coffa & Brash, 2004). Bei 13-LOX befindet sich das Methyl-Ende in der hydrophoben Bindungstasche; bei 9-LOX dringt das Carboxyl-Ende der Fettsäure zuerst in die Bindungstasche ein.

Beide Möglichkeiten können auch für die CYP74-Enzyme diskutiert werden. Bei der HPL aus Tee, einer 13-HPL, zeigten Untersuchungen mit synthetischen Hydroperoxiden, dass die Distanz zwischen Hydroperoxid-tragendem Kohlenstoff und dem Carboxyl-Ende keine entscheidende Rolle spielt (Hatanaka *et al.*, 1992). Bei der in dieser Arbeit beschriebenen HPL aus *P. patens*, einer 9/13-HPL, wurden verschiedene natürlich vorkommende Hydroperoxide getestet. Hier zeigte sich, dass die höchste Aktivität gegenüber Substraten zu finden war, deren Hydroperoxid sich an Position ω -10 befindet. Aus diesen Daten und weiteren Untersuchungen zu Substratspezifitäten bei anderen HPL (Hatanaka *et al.* 1992; Shibata *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001) könnte man davon ausgehen, dass diese Enzyme den Abstand zwischen Methyl-Ende und Hydroperoxid-Position „messen“ und dass das Substrat mit dem Methyl-Ende zuerst eindringt (Abb. 4).

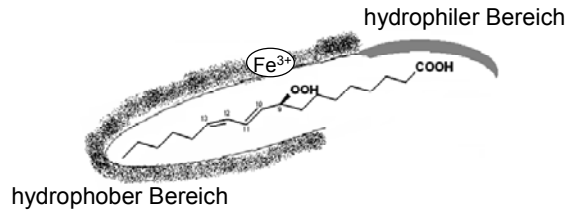


Abb. 4: Modell der Substrat-Bindungstasche der PpHPL und Orientierung des Substrates.

Bei einer kleinen Bindungstasche werden folglich nur ω -6 Hydroperoxide umgesetzt, während bei einem größeren Volumen „ ω -6 und ω -10 Substrate“ genutzt werden können. Doch auch hier gibt es Ausnahmen: So zeigt die HPL aus *Arabidopsis* auch eine hohe Aktivität gegenüber 9- γ HPOTE (diese Arbeit). Vergleicht man dieses Hydroperoxid mit 13-HPOTE, dem bevorzugtem Substrat, findet man in beiden das gleiche 4-Hydroperoxy-(1Z,5E,7Z)-dien-Motiv, welches sich nur in der Orientierung zum Carboxyl-Ende unterscheidet.

Divinylether-Synthase

Die DES katalysiert die Bildung von Divinylethern aus Fettsäure-Hydroperoxiden (Galliard & Phillips, 1972; Grechkin, 2002). Dabei stammt der Sauerstoff der Ether-Gruppe aus dem Substrat (Crombie *et al.*, 1991). Der Katalysemechanismus ähnelt sehr dem der HPL, nur im letzten Schritt gibt es Unterschiede (Grechkin, 2002). Bei der DES kommt es zu einer Abspaltung eines Protons und so zur Bildung des Divinylethers (Abb. 3, Reaktionsweg b und c). In diesem Eliminierungsschritt unterscheiden sich die einzelnen bisher untersuchten DES. Mit Hilfe von stereospezifisch deuterierten Hydroperoxiden konnte gezeigt werden, dass die DES aus Kartoffel und Knoblauch, deren Produkt eine *trans*-Doppelbindung besitzt, spezifisch den pro-*R*-Wasserstoff an der β -Methylgruppe abspalten, während die DES aus *Clematis vitalba* und *Ranunculus acris* den pro-*S*-Wasserstoff abspalten und die sich bildenden Divinylether eine *cis*-Doppelbindung besitzen (Hamberg, 2005).

Die Substratspezifität der verschiedenen DES wurde bisher vor allem in Proteinextrakten aus Pflanzen analysiert. In Versuchen mit Kartoffelknollen und Tomatenwurzeln fand man eine für 9-Hydroperoxide spezifische DES (Galliard & Phillips, 1972; Caldelari & Farmer, 1998). Diese Ergebnisse wurden nach der Klonierung und Charakterisierung der DES aus diesen Solanaceen bestätigt (Itoh & Howe; 2001; Stumpe *et al.*, 2001). Beide zeigen eine deutliche Präferenz für 9-HPODE, während die 13-

Hydroperoxide kaum oder überhaupt nicht als Substrate verwendet werden. In Blättern von Ranunculaceen (Hamberg, 1998, 2002, 2004) und Knoblauchknollen (Grechkin *et al.*, 1995) fand man DES, die bevorzugt die 13-Hydroperoxide umsetzen. Bei dem Knoblauchenzym beobachtete man auch eine Umsetzung des 15-Hydroperoxides der Arachidonsäure (Grechkin *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu HPL und AOS scheint die Knoblauch-DES jedoch nicht absolut spezifisch für *S*-konfigurierte Hydroperoxide zu sein. Aus einer racemischen Mischung von 13(*R,S*)-HPODE wird bevorzugt das *S*-Isomer umgesetzt. Mit einer sehr viel geringeren Geschwindigkeit findet man aber auch eine Umsetzung des *R*-Isomers (Grechkin *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Klonierung des Enzyms aus Knoblauch. Die Bestimmung der Substratspezifität zeigte eine Präferenz für Hydroperoxide der LA, wobei nur ein geringer Unterschied zwischen den beiden Regioisomeren (13 und 9) zu messen war. Die Aktivität gegenüber den Hydroperoxiden der LeA liegt bei etwa 20 % im Vergleich zu den LA-Derivaten.

In verschiedenen Algen gelang die Isolierung von Divinylethern, die von ω -6-Hydroperoxiden verschiedener C18- und C20-Fettsäuren abgeleitet sind. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass möglicherweise in diesen Organismen DES mit entsprechenden Spezifitäten anzutreffen sind (Proteau & Gerwick, 1993; Jiang & Gerwick, 1997).

Allenoxid-Synthase

Bisher sind zwei verschiedene Häm-Protein-Klassen bekannt, die Allenoxide aus Fettsäure-Hydroperoxiden bilden (Tijet & Brash, 2002). In marinen Invertebraten ist das Enzym strukturell verwandt mit Katalasen (Brash *et al.*, 1991; Boutaud & Brash, 1999), in Pflanzen wurde die AOS als Cytochrom P450-haltiges Protein identifiziert (Song & Brash, 1991). Wie schon bei der HPL und DES stammt der Sauerstoff des Reaktionsproduktes vom Fettsäure-Hydroperoxid (Grechkin, 1998). Ähnlich wie bei der DES kommt es bei der AOS zur Eliminierung eines Protons und zur Bildung einer neuen Doppelbindung (Abb. 3, Reaktionsweg a). Inwieweit es sich dabei um eine *cis*- oder *trans*- Doppelbindung handelt, ist noch nicht geklärt. Tijet und Brash vermuten, dass sich die AOS in der Spezifität der Eliminierung unterscheiden und dass so unterschiedlich isomere Allenoxide gebildet werden (Tijet & Brash, 2002). Dieses würde die verschiedenen Halbwertzeiten, der durch die Kartoffel-AOS bzw. der Mais-AOS gebildeten Allenoxide, erklären. Nach der Hydrolyse dieser Allenoxide finden sich auch Unterschiede im Verhältnis des

(9*R*)-Hydroxy- zum (9*S*)-Hydroxy-Enantiomers des α -Ketols, die ebenso darauf zurückzuführen sein könnten. Anstelle der Eliminierung kann auch ähnlich der HPL-Reaktion eine Anlagerung des Hydroxyradikals unter Bildung eines Epoxyalkohols erfolgen (Song *et al.*, 1993). Song und Mitarbeiter fanden diese Nebenreaktion nach Inkubation der Lein-AOS mit (8*R*)-Hydroxy-(15*S*)-Hydroperoxyeicosapentaensäure. Die sehr ähnlichen Reaktionsmechanismen und die hohe Sequenzähnlichkeit legen eine evolutionäre Entwicklung der CYP74-Enzyme aus einem Vorläufer nahe. Um eine Vorstellung über diese „Ur-CYP74“ zu erhalten, wäre es von Interesse CYP74-Enzyme aus „alten“ Organismen, wie z. B Algen, zu identifizieren.

Studien zum Katalysemechanismus

Zur Identifikation von Aminosäuren, die an der enzymatischen Katalyse oder der Substratspezifität beteiligt sind, spielen neben der Strukturaufklärung auch Mutagenesestudien eine entscheidende Rolle.

In der HPL aus Alfalfa (CAB54847) erfolgte durch zielgerichtete Mutagenese der Austausch des hochkonservierten Cysteins durch Alanin bzw. Serin (Noordermeer *et al.*, 2001b). Die Mutanten zeigten keine Aktivität und keine Bindung der prosthetischen Gruppe. Um weitere essentielle Aminosäuren zu finden, wurden von uns ebenfalls Arbeiten durchgeführt, in denen verschiedene Punktmutanten generiert wurden. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte nach Sequenzvergleichen von CYP74-Enzymen durch die Suche nach konservierten Aminosäuren innerhalb der HPL, AOS bzw. DES und innerhalb 13- bzw. 9-Hydroperoxid-spezifischer Enzyme. Diese Methode führte zu keinen positiven Ergebnissen, da die so erhaltenen Mutanten keinen Unterschied in ihren enzymatischen Eigenschaften zeigten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte deshalb als weiterer Ansatz der Austausch ganzer Aminosäurebereiche zwischen verschiedenen CYP74-Enzymen. In einem ersten Ansatz wurden chimäre Proteine erzeugt, indem ein Austausch von etwa 50 % der Sequenz erfolgte (Tab. 1).

Diese Mutanten wurden in *E. coli* exprimiert und das Zelllysate auf seine Aktivität getestet. Dazu wurde es mit [1-¹⁴C]-Hydroperoxiden inkubiert und die entstehenden Reaktionsprodukte mittels HPLC analysiert (Methode siehe Blée & Joyard, 1996). In allen Fällen konnte keine Aktivität gemessen werden. Aus diesem Grund wurden kleinere Bereiche, etwa 10-15 %, ausgetauscht (sowohl C-terminale als auch interne Bereiche, Tab. 1). Die jeweiligen Schnittstellen wurden in putativen Loop-Regionen gewählt, die

durch ein Alignment zwischen CYP74-Enzymen und P450-Enzymen, deren Kristallstruktur bekannt ist (Poulos *et al.*, 1985; Ravichandran *et al.*, 1993; Hasemann *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2000), bestimmt wurden (Abb. 5A). Diese Schnittstellen liegen in weniger konservierten Bereichen der CYP74-Enzyme (Abb. 5B). Von den chimären Proteinen zeigte nur die Kombination aus zweier AOS mit verschiedenen Substratspezifitäten (13-StAOS1 und 9-StAOS3) eine enzymatische Aktivität. Nach der Umsetzung mit 13-HPOTE ließen sich bei den HPLC-Analysen AOS-Reaktionsprodukte nachweisen. 9-HPOTE wurde nur zu geringen Raten umgesetzt, vergleichbar mit dem 13-StAOS1-Enzym.

Tab. 1: Zusammenfassung der hergestellten chimären Proteine. Die angegebenen Aminosäurebereiche wurden fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Die Aktivität wurde mit [1-¹⁴C]-markierten Hydroperoxiden getestet: - keine messbare Aktivität. Die Aminosäurebereiche beziehen sich auf folgende Accession-Nummern: AtAOS: CAA63266; AtHPL: AAC69871; LeHPL: AAF67142; StAOS1: CAD29735; StAOS3: CAI30876; StDES: CAC28152

Chimäres Protein	N-Terminus	C-Terminus	Aktivität	
AtHPL-AtAOS	AtHPL: 29-247	AtAOS: 265-518	-	
LeHPL-StAOS3	LeHPL: 12-259	StAOS3: 270-491	-	
StAOS3-LeHPL	StAOS3: 1-286	LeHPL: 278-476	-	
StDES-StAOS3	StDES: 1-272	StAOS3: 287-491	-	
StAOS3-StDES	StAOS3: 1-286	StDES: 273-478	-	
StAOS1-StAOS3	StAOS1: 44-461	StAOS3: 423-491	13-AOS	
StAOS3-StAOS1-StAOS3	StAOS3 1-359	StAOS1 398-461	StAOS3 423-491	-
StAOS3-StDES-StAOS3	StAOS3 1-359	StDES 347-409	StAOS3 423-491	-

Basierend auf den bekannten Strukturen verschiedener P450-Enzyme nimmt man an, dass es sechs Substraterkennungsbereiche gibt, die über die gesamte Sequenz verteilt sind (Gotoh, 1992). Die Bereiche vier und fünf liegen innerhalb der Domäne, die bei den internen Austausch ersetzt worden ist. Die letzte Erkennungsstelle liegt innerhalb der ausgetauschten Region im StAOS1-StAOS3-Chimär. Von größerer Bedeutung für die Substratbindung scheinen aber die ersten drei Regionen, welche im zweiten Viertel liegen, zu sein (Gotoh, 1992; Williams *et al.*, 2000). Auch das konservierte Threonin in der

I-Helix von P450-Enzymen, welches für die Aktivierung des Kosubstrats (Sauerstoff) verantwortlich gemacht wird, liegt im mittleren Bereich der Sequenz. Diese Bereiche stammen im chimären Protein von der 13-StAOS1; nur die letzten 68 Aminosäuren stammen von der 9-StAOS3. Innerhalb dieses C-terminalen Bereiches befindet sich aber das Cystein, welches für die Komplexierung des Häms verantwortlich ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch bei *CYP74*-Enzymen vermutlich N-terminale bzw. mittlere Domänen für die Substratspezifität verantwortlich sind.

Der Nachteil dieser zielgerichteten Mutagenesen ist die begrenzte Anzahl an Mutanten. Parallel zu den oben beschriebenen Experimenten wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit Ansätze für eine ungerichtete Mutagenese ausgearbeitet. Dazu war neben der Etablierung der Methode auch die Entwicklung eines effizienten Screening-Verfahrens notwendig.

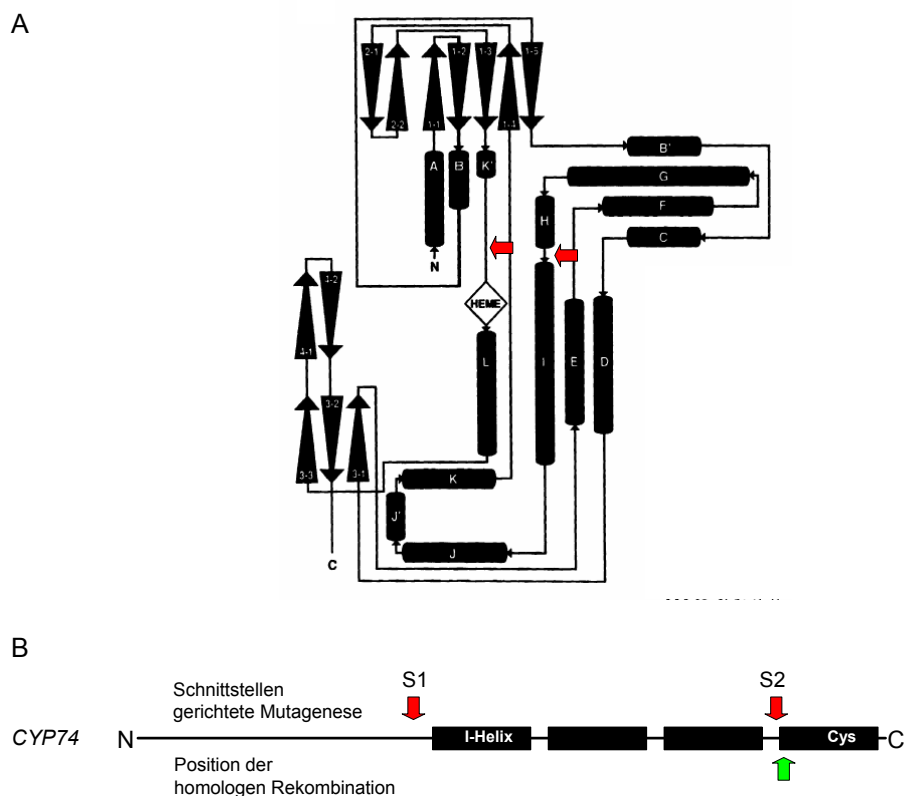


Abb. 5: Relative Positionen der gewählten Schnittstellen (S1 und S2) und der homologen Rekombination. A: Sekundärstrukturelemente von P450-Enzymen (Ravichandran *et al.*, 1993); nach Sequenzvergleich zwischen *CYP74*- und P450-Enzymen wurden die Schnittstellen zum Domänenaustausch (Pfeile) in putativen Loop-Regionen gewählt. B: schematische Darstellung eines *CYP74*-Enzyms, schwarze Boxen repräsentieren hoch konservierte Bereiche, Cys: Lage des Häm-bindenden Cysteins, I-Helix: Lage der putativen I-Helix in *CYP74*-Enzymen nach Sequenz-Vergleich mit P450-Enzymen, deren Struktur bekannt ist. Pfeile markieren Lage der Schnittstellen bei der gerichteten Mutagenese (rot, oberhalb) bzw. Position der homologen Rekombination bei der Chimerogenese (grün, unterhalb).

Erster Ansatzpunkt war die rekombinante Expression der Enzyme in *E. coli* mit gleichzeitiger Sekretion in das Periplasma. Durch die Wahl dieses Systems wird der Zellaufschluss umgangen, da die Substrate ungehindert an das Enzym gelangen und umgesetzt werden können. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pET20b (Novagen) gewählt, der, durch die Fusion des rekombinanten Proteins mit der *pelB* Transit-Sequenz, den Transport in das Periplasma vermittelt. Versuche mit der DES und der HPL aus Kartoffel zeigten, dass es möglich ist, diese Proteine aktiv im Periplasma zu exprimieren. Im Zellüberstand ließ sich keine Aktivität nachweisen. Beide Enzyme wurden im Weiteren zur Entwicklung eines Screening-Verfahrens auf enzymatische Aktivität genutzt.

Zur Bestimmung der Aktivität gibt es zwei Möglichkeiten: (1) der Nachweis der entstehenden Reaktionsprodukte oder (2) die Messung des Fettsäure-Hydroperoxidverbrauches. Vorteil von Möglichkeit (2) ist die Nutzbarkeit des Systems für alle CYP74-Klassen und auch für LOX (hier erfolgt dann der Nachweis der Fettsäure-Hydroperoxidbildung), während in (1) für jede CYP74-Klasse eine eigene Methode entwickelt werden muss. Dennoch wurde auch diese Strategie verfolgt.

Da insbesondere Divinylether eine antimikrobielle Wirkung besitzen (Weber *et al.*, 1999), wurde versucht diese Eigenschaft zum Nachweis von DES-Aktivität zu nutzen. Dazu wurden DES-exprimierende Zellen (s. o.) und Kontrollzellen auf Agar-Platten, die mit Fettsäure-Hydroperoxiden bestrichen wurden, angeimpft und bei 37 °C über Nacht bzw. bei 25 °C mehrere Tage inkubiert. Dabei zeigte sich in einzelnen Fällen ein vermindertes Wachstum bei DES-exprimierenden *E. coli*-Zellen. Dieser Effekt ließ sich aber nicht zuverlässig reproduzieren.

Bei der HPL-Reaktion entstehen Aldehyde, diese werden entweder direkt mittels GC (Noordermeer *et al.*, 1999) oder nach Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit Hilfe der HPLC aufgetrennt und detektiert (Kohlmann *et al.*, 1999). Für das Screening sollte die letztere Methode abwandelt werden, indem nach der Derivatisierung die Absorption der entstehenden Hydrazone (bei 366 bzw. 382 nm) im Reaktionsansatz gemessen wird, so dass die HPLC-Analyse entfallen kann. Hierbei zeigte sich, dass die Menge an Aldehyd, die produziert wird, nicht ausreicht, um eindeutig bestimmt zu werden.

Parallel zu diesen Arbeiten wurde an einem Screening-Verfahren zur Messung des Fettsäure-Hydroxidverbrauches gearbeitet. Eine in der Literatur oft verwendete Methode zur Bestimmung von Hydroperoxiden erfolgt mit Hilfe des so genannten FOX-Assays (Jiang *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 2000; Gay & Gebicki, 2002; Eymard & Genot, 2003). Dabei nutzt man die oxidative Wirkung von Hydroperoxiden, die zur Bildung von Fe³⁺ aus Fe²⁺

führt. Das Eisen-Ion bildet dann zusammen mit Xylenolorange einen farbigen Komplex, der bei 560 nm vermessen werden kann. Gay und Gebicki entwickelten den bestehenden Test weiter und erhöhten die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit (Gay & Gebicki, 2002). Ihre methanolische PCA-FOX-Lösung enthält: 100 μM Xylenolorange, 250 μM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und 110 mM Perchlorsäure. Diese wurde im Weiteren zur Aktivitätsbestimmung von LOX und CYP74-Enzymen genutzt. Als Testenzyme wurden die DES aus Kartoffel (Stumpe *et al.*, 2001) und die Lipidkörper-LOX aus Gurke (Feussner *et al.*, 1998) verwendet. Beide wurden mit Hilfe des pET20b-Expressionssystem ins Periplasma von *E. coli* sezerniert. Das endgültige Protokoll lautet wie folgt: 1. Animpfen der Expressionskultur mit 1 % einer Übernachtskultur und 3 h bei 37 °C schütteln; 2. Induktion der Expression mit IPTG (Endkonzentration: 1mM) und 12 h bei 16 °C schütteln; 3. 30 min mit Substrat inkubieren, danach Zugabe der PCA-FOX-Lösung und mindestens 10 min warten (Färbung bleibt bis zu 45 min stabil); 4. 5 min zentrifugieren und Absorption des Überstandes bei 560 nm vermessen. Alle Schritte können problemlos in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Zur Messung der Aktivität der DES wurden 5 nmol 9-HPODE pro Vertiefung zugegeben und wie oben beschrieben der FOX-Test durchgeführt. Man beobachtete bei 9-HPODE ohne Zellen eine Extinktion von 0,245 bis 0,266, bei der Leervektor-Kontrolle von 0,103 bis 0,150 und in Gegenwart der DES Werte von 0,068 bis 0,086 (Abb. 6A).

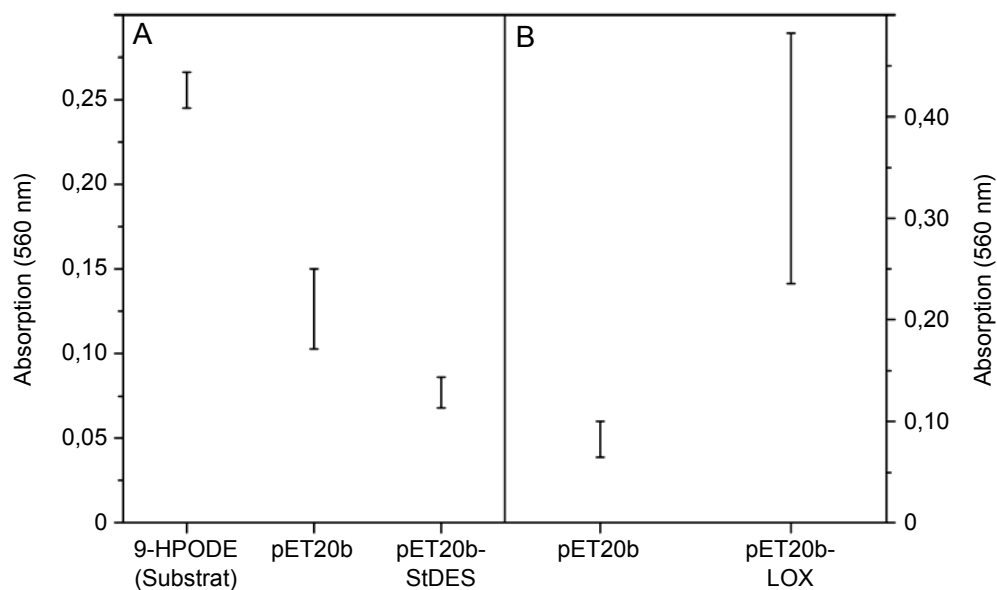


Abb. 6: Auswertung des FOX-Tests im Mikrotiterplattenmaßstab. Angegeben ist die Spanne zwischen kleinster und größter Absorption. A: CYP74-Enzym: Test des Verbrauchs von 9-HPODE (ohne Zellen, Leervektor pET20b und StDES). B: LOX: Test der Bildung von Fettsäure-Hydroperoxiden aus LeA (Leervektor pET20b und Lipidkörper-LOX).

Dieser Test kann auch zur Bestimmung der LOX-Aktivität genutzt werden, indem als Substrat z. B. LeA (9 nmol/Vertiefung) zugesetzt wird. Die Extinktionen beim Leervektor waren hier in der Regel um das 3- bis 6fache niedriger als bei der LOX (Abb. 6B).

Wie im Versuch mit 9-HPODE als Substrat zu sehen ist, nimmt die Extinktion auch bei der Leervektor-Kontrolle ab. Dieses weist auf einen Abbau des Hydroperoxides hin, der entweder enzymatisch oder nicht-enzymatisch erfolgen kann. Vermutlich kommt es dabei zur Reduktion des Substrats zum Hydroxid. In den DES-exprimierenden Zellen spielen folglich zwei Reaktionen eine Rolle, die zum Substratverbrauch führen: die DES-Reaktion und eine intrinsische Peroxidaseaktivität. Diese Tatsache muss auch bei der Reaktion der LOX mit LeA berücksichtigt werden. Das gebildete Hydroperoxid wird gleichzeitig durch *E. coli* abgebaut. Dies und unterschiedliche Expressionsraten der verwendeten LOX sind wahrscheinlich für die große Spanne der Extinktion in Abb. 6B verantwortlich. Aufgrund der beschriebenen Konkurrenzreaktion ist der hier entwickelte Test nur für Enzyme geeignet, die eine hohe Aktivität zeigen. Für eine breitere Anwendung wäre es daher von Vorteil den Abbau des Hydroperoxides durch *E. coli* zu begrenzen. Hier würden sich Bakterienstämme eignen, die z. B. Defekte in Alkylhydroperoxid-Reduktasen besitzen (Seaver & Imlay, 2001; Storz *et al.*, 2001).

Neben der Entwicklung des Screening-Verfahrens wurde eine Methode zur ungerichteten Mutagenese etabliert. Zur Einführung von Punktmutationen kann man PCR-Methoden oder so genannte Mutator-Stämme benutzen. Zum Austausch von Aminosäurebereichen kann man zudem die Methode des DNA-Shufflings oder der Chimierogenesis verwenden. In unseren Mutagenesestudien entschieden wir uns für die letztere Methode. Diese beruht auf der Möglichkeit der DNA-Rekombination in *E. coli*. Zuerst wird ein Vektor konstruiert, der zwei Gene als Tandem in derselben Orientierung unter einem Promotor enthält. Nach Verdau des Plasmides mit Restriktionsendonukleasen (in der Regel zwischen den beiden Genen) erfolgt die Transformation des linearen Vektors in *E. coli*, wobei eine Rekombination zwischen den beiden Genen stattfinden kann. Der Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig verstanden, dennoch weiß man, dass das Genprodukt von *recA* eine wichtige Rolle spielt (Caramori *et al.*, 1991; van Kampen *et al.*, 1998). Auf der einen Seite soll *E. coli* die Rekombination effizient durchführen, auf der anderen Seite sollen die Fusionsstellen der chimären Protein zufällig über den gesamten Bereich der Sequenz vorkommen. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet: Rosetta (*recA*⁺, Novagen) und HMS174 (*recA*⁻, Novagen). Bei Bakterienstämmen mit funktionierendem Rekombinationsapparat (*recA*⁺) erwartet man ein

hohes Maß an korrekten Chimären (etwa 60-70 %) (van Kampen *et al.*, 1998). Das Rekombinationsereignis ist in diesem Fall aber auf hoch-ähnliche Bereiche begrenzt. Bei *recA*⁻-Stämmen entstehen zwar weniger korrekte Chimären (etwa 30 %), doch die Fusionsstellen sollten auch in weniger ähnlichen Bereichen liegen (van Kampen *et al.*, 1998). Als Testvektor wurde pET20b gewählt, der die cDNAs für *StDES* und *StAOS3* enthielt. Diese zeigen auf Nukleotidebene eine Identität von 62 %, die über die gesamte Sequenz verteilt ist. Aufgrund dieses hohen Wertes sind auch bei *recA*⁺-Stämmen eine größere Anzahl an verschiedenen Chimären zu erwarten. Das Konstrukt wurde wie oben beschrieben mit *XhoI* zwischen den beiden cDNAs geschnitten und so linearisiert. Jeweils 0,5 µg des Vektors wurden in die beiden Stämme transformiert. Die Transformationsraten lagen bei ca. 12 Klonen/µg Vektor (Rosetta) und bei 4 Klonen/µg Vektor im Falle der HMS174-Zellen. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR auf die Größe der enthaltenen Fragmente untersucht, sequenziert und auf ihre Aktivität getestet. Die PCR-Analyse ergab nur in 30 % der Fälle bei den Rosetta-Zellen eine mögliche korrekte Rekombination, in allen anderen fanden sich Fragmente, die nicht der erwarteten Größe entsprachen. Bei HMS174-Zellen zeigten sich nur Fragmentgrößen die eine Religation des Vektors vermuten lassen. Die Sequenzierung der korrekten Rekombinanten ergab die chimären Proteine: 1. 1-424 (StDES) – 438-491 (StAOS3) und 2. 1-418 (StDES) – 432-491 (StAOS3). Diese Positionen der Rekombination liegen am Anfang eines konservierten Bereiches aller CYP74-Enzyme (Abb. 5B). Nach Expression in *E. coli* zeigten beide Proteine keine Aktivität.

Die deutlich geringere Anzahl an korrekten Rekombinationen in dem hier durchgeführten Experiment sind vermutlich auf die schlechten Transformationsraten und die damit verbundene nicht-aussagekräftige Statistik zurückzuführen. Die geringen Transformationsraten sind aus der Literatur bekannt. Diese lassen sich durch die Verwendung von hoch-kompetenten Zellen und Elektroporation zur Transformation noch um das 10- bis 100fache erhöhen, was auch zu einer größeren Zahl an verschiedenen Chimären führen sollte.

Umsatz von ω - und (ω -1)-Hydroxy-Fettsäuren

Jasmonat kommt sowohl als freie Verbindung als auch durch verschiedene Reaktionen modifiziert in Pflanzen vor (Abb. 7) (Sembdner & Parthier, 1993; Sembdner *et al.*, 1994). Am Besten untersucht ist die Methylierung am C-1, die zur Bildung von Methyl-JA führt

(Seo *et al.*, 2001). Neben dieser Modifikation treten auch noch die Reduktion der Keto-Gruppe am C-6, welche zu Cucurbinsäure führt, und Konjugation mit Aminosäuren, Tyramin oder Adenylat auf (Sembdner *et al.*, 1994; Miersch *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 2002). Diese Verbindungen, wie auch das freie Jasmonat, können am C-11 bzw. C-12 zusätzlich hydroxyliert und über diese Hydroxylgruppe glykosiliert (Yoshihara *et al.*, 1989) oder sulfatiert (Achenbach *et al.*, 1994; Gidda *et al.*, 2003) werden. Eine letzte Modifikation ist der Abbau der Carboxyl-Seitenkette von Jasmonat. Dabei kommt es zur Bildung von *cis*-Jasmon (Koch *et al.*, 1997).

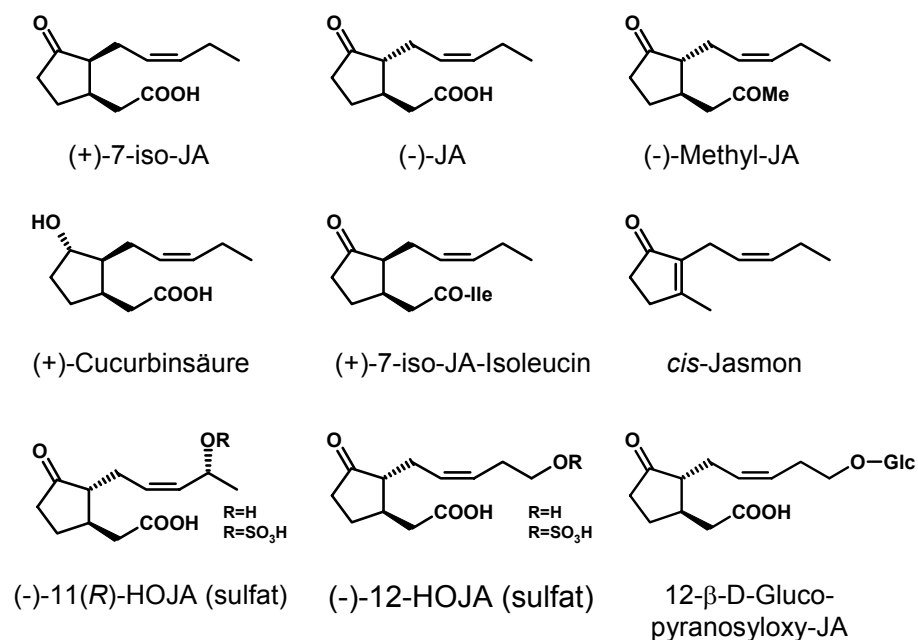


Abb. 7: Strukturformeln von natürlich vorkommender JA und JA-Derivaten.

12-Hydroxyjasmonsäure (12-HOJA) und ihre Derivate wurden erstmals in Kartoffeln nachgewiesen. An diesen Pflanzen wurde eine knolleninduzierende Wirkung von O-glykosilierter 12-HOJA gezeigt (Yoshihara *et al.*, 1989). Kürzlich fand man hydroxylierte Jasmonate auch in anderen Pflanzen, wie z. B. in *Arabidopsis* (Gidda *et al.*, 2003). Die Bildung von HOJA erfolgt durch die direkte Hydroxylierung an Position 11 bzw. 12. Ein anderer Weg könnte aber auch über die Hydroxylierung der LeA erfolgen, diese Verbindung würde dann als Substrat im LOX-Reaktionsweg bis zur HOJA umgesetzt. Erste Anhaltspunkte für diese Theorie sind das Vorkommen von ω- und (ω-1)-hydroxylierten Fettsäuren in Pflanzen, die für die Synthese der Kutikula verwendet werden (Soliday & Kolattukudy, 1977). Für die LOX aus der Sojabohne wurde zudem gezeigt,

dass sie 18-Hydroxy-LeA als Substrat nutzt und zu 13-Hydroperoxy-18-Hydroxy-LeA umsetzt (Ivanov *et al.*, 1998).

Die Frage, ob derartige Substanzen im LOX-Reaktionsweg weiter metabolisiert werden können und dadurch HOJA gebildet werden kann, sollte durch unsere Untersuchungen beantwortet werden. Ebenso erwarteten wir dadurch weitere Aussagen über die Substratspezifität der beteiligten Enzyme. Im Anschluss an die LOX-Reaktion sollte hier die Umsetzung durch die CYP74-Enzyme erfolgen. Als Fettsäuren wurden 18-Hydroxylinol(en)säure (18-HO-L(e)A) und 17-HO-LeA genutzt und mit Soja-LOX (13-LOX) (Sigma) zum entsprechenden 13-Hydroperoxid umgesetzt. Dieses wurde gereinigt und als Substrat für CYP74-Enzyme aus Kartoffel (13-StAOS1, 13-StAOS2) genutzt. Die entstehenden Produkte wurden mit Hilfe der GC/MS analysiert. Dazu wurden die Reaktionsprodukte des Umsatzes mit 13-StAOS1 bzw. 13-StAOS2 extrahiert und mit O-Methylhydroxylamin derivatisiert. Dieses Reagenz reagiert mit Ketogruppen zu den entsprechenden Oximen. Für die GC/MS-Untersuchungen mit negativer chemischer Ionisierung (NCI) erfolgte die Derivatisierung der Carboxylgruppe mit Pentafluorbenzylbromid. Zur weiteren Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte wurden auch GC/MS-Analysen mit Elektronenstoßionisierung (EI) durchgeführt. Hierzu wurde die Carboxylgruppe methyliert.

Nach der Umsetzung mit den AOS und den entsprechenden Derivatisierungen war jeweils ein zusätzliches Signal im Chromatogramm im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten. Abb. 8B zeigt das NCI-Massenspektrum dieses Signals nach der Reaktion von StAOS1 mit 13-Hydroperoxy-18-HO-LeA. Das erhaltene Massensignal $m/z = 336$ entspricht nicht dem erwarteten Signal von $m/z = 354$. Die Differenz von 18 deutet auf den Verlust von Wasser hin. Um eine Eliminierungsreaktion während der GC/MS-Analyse auszuschließen wurden potentielle Alkoholgruppen silyliert. Diese Derivatisierung führte zu keiner Änderung im Chromatogramm oder im Massenspektrum. Eine andere Möglichkeit die Massendifferenz zu erklären wäre ein intramolekularer, nukleophiler Angriff der terminalen Hydroxygruppe auf das Allenoxid unter Bildung eines inneren Ethers. (Abb. 8A)

Zur weiteren Untersuchung des gebildeten Reaktionsproduktes erfolgte eine GC/MS-EI Analyse. Wie in Abb. 8C zu sehen, findet man dabei eine stärkere Fragmentierung des Moleküls im Massenspektrum. Aufgrund der entstehenden Fragmente können Rückschlüsse auf die Struktur der Substanz gezogen werden.

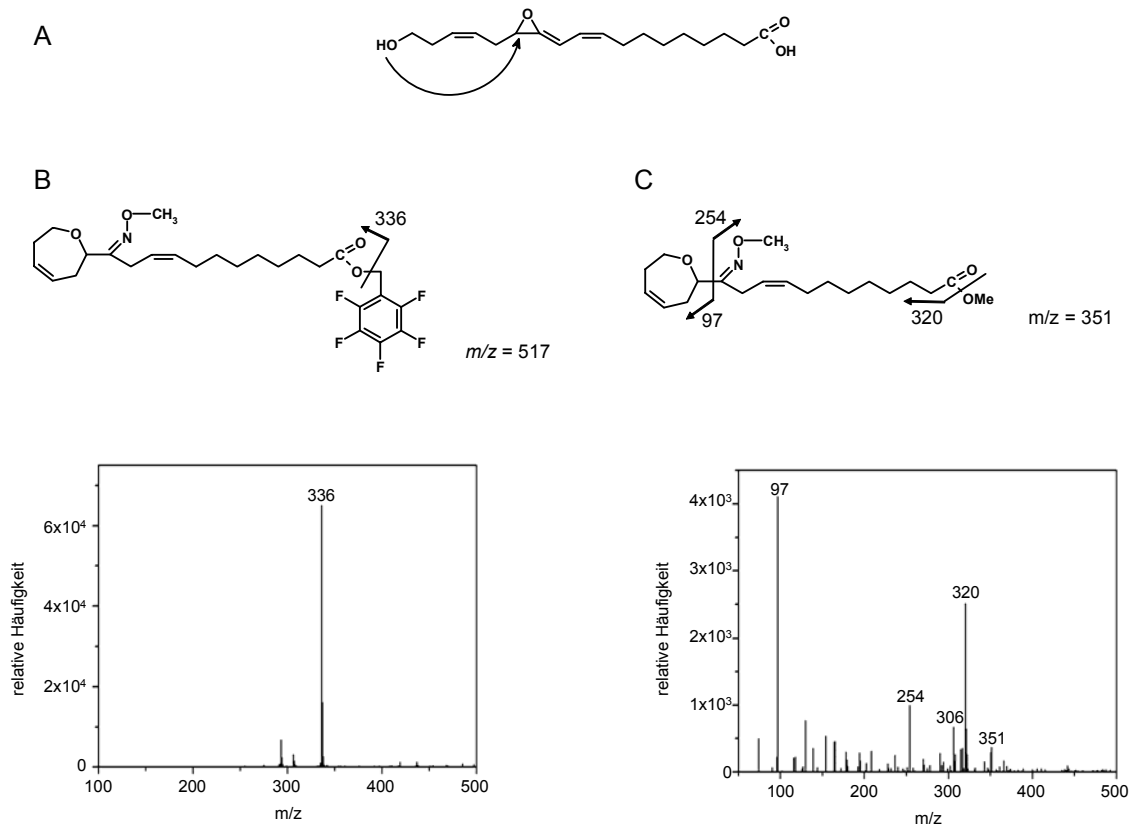


Abb. 8: A: Postulierter nukleophiler Angriff der terminalen Hydroxygruppe zur Bildung eines inneren Ethers. B,C: NCI (B)- bzw. EI (C)-Massenspektrum des Reaktionsproduktes von 13-StAOS1 mit 13-Hydroperoxy-18-HO-LeA und vermutete Struktur dieser Verbindung.

Diese Ergebnisse unterstützen die von uns postulierte Struktur des Reaktionsproduktes, obwohl noch nicht eindeutig belegt ist, ob es zu einer Bildung eines inneren Ethers oder zur Eliminierung von Wasser kommt. Bei Umsetzungsversuchen von 13-Hydroperoxy-18-HO-LA und 13-Hydroperoxy-17-HO-LeA mit 13-StAOS1 und 13-StAOS2 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Damit konnte gezeigt werden, dass zumindest diese Enzyme in der Lage sind diese ungewöhnlichen Substanzen als Substrat zu nutzen.

Durch die Einführung einer Hydroxygruppe am Methyl-Ende der Fettsäure kommt es nicht nur zu einer Änderung der Polarität, sondern auch zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen dem Ort der Katalyse im Substrat und dem modifizierten Methyl-Ende. Bei der Soja-LOX fanden sich keine Änderungen in der Positionsspezifität des Enzyms nach Umsetzung mit 18-HO-LeA (Ivanov *et al.*, 1998). Während die Änderung der spezifischen Aktivität gegenüber diesem Substrat nur leicht erniedrigt war, beobachtete man bei der Michaelis-Menten-Konstante eine Vergrößerung um das 9fache. Dieses Ergebnis unterstützt die bei der Soja-LOX angenommene Substratorientierung, da die Hydroxygruppe am Methyl-Ende die Bindung des Substrates in der hydrophoben

Bindungstasche des Enzymes behindert. Dennoch wird nicht die Katalyse an sich gestört (Ivanov *et al.*, 1998). Erhöht man die Polarität der endständigen Gruppe und führt eine Carboxylgruppe ein, findet man keine enzymatische Aktivität. Diese wird aber wieder hergestellt durch die Methylierung dieser Gruppe (Ivanov *et al.*, 1998). Ähnliche Untersuchungen weiterer Proteine der CYP74-Familie können diese ersten Einblicke in die Substratbindung und -orientierung vertiefen.

Im Anschluss an die AOS-Reaktion folgt zur Bildung von HOJA im LOX-Reaktionsweg die Umsetzung durch die AOC. Aufgrund der geringen Stabilität der Allenoxide erfolgt die Messung von AOC-Aktivitäten in der Regel als gekoppelter Test zusammen mit der AOS (Ziegler *et al.*, 1997). Dazu wurde 13-Hydroperoxy-18-HO-LeA mit der 13-StAOS1 und der StAOC inkubiert und die Reaktionsprodukte wie oben beschrieben untersucht. Dabei fand sich kein Unterschied im Chromatogramm und im Massenspektrum zwischen AOS- und AOS/AOC-Umsetzung. Bei dem gekoppelten AOS/AOC-Test ließ sich wie bei der AOS-Reaktion nur das Ketol nachweisen. Zusätzliche Signale, die auf ein Cyclopentenon, ähnlich dem 12-OPDA, deuten würden, waren nicht detektierbar. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der LOX-Reaktionsweg bei Nutzung von 18-HO-LeA in der AOC-Reaktion blockiert ist und dass HOJA wahrscheinlich nicht über diesen Weg in Pflanzen gebildet wird. Um darüber Gewissheit zu erlangen, bestände zudem die Möglichkeit die Metabolisierung von ω - und (ω -1)-hydroxylierten Fettsäuren durch Proteinextrakte aus Pflanzen zu verfolgen oder die entsprechenden Oxylipine als endogene Substanzen in Pflanzen nachzuweisen.

2.2 Organspezifische und intrazelluläre Lokalisation der CYP74-Enzyme

(2E)-Hexenal und (3Z)-Hexenol, Metabolite des HPL-Reaktionsweges, werden in der Literatur oft als „Blattaldehyd“ bzw. „Blattalkohol“ bezeichnet. Sie sind verantwortlich für den typischen „grünen Duft“ von Pflanzen. So wird der Geruch von frisch geschnittenem Gras oder grünem Tee hauptsächlich durch diese C6-Aldehyde und C6-Alkohole hervorgerufen (Hatanaka, 1993). Die Bildung derartiger Metabolite des HPL-Reaktionsweges lässt sich in sehr vielen Pflanzenklassen, angefangen bei den Moosen bis zu mono- und dikotyledonen Pflanzen, beobachten (Hatanaka *et al.*, 1978). Die erste Isolierung von (2E)-Hexenal und (3Z)-Hexenol erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts aus Blättern von Tee (Hatanaka, 1993).

Ebenso wie HPL können auch andere CYP74-Aktivitäten in grünen Geweben nachgewiesen werden. So fand man AOS-Aktivität in Spinatblättern (Blée & Joyard, 1996) und DES-Aktivität in Blättern verschiedener Ranunculaceen (Hamberg, 1998, 2002) und Knoblauch (diese Arbeit). Die CYP74-Enzyme sind jedoch nicht nur auf das Organ Blatt begrenzt. In verschiedenen Früchten konnten HPLs nachgewiesen werden, wie in Birnen (Kim & Grosch, 1981), Gurken (Hatanaka *et al.*, 1975), Melonen (Tijet *et al.*, 2001), Paprika (Shibata *et al.*, 1995b) und reifen Erdbeeren (Perez *et al.*, 1999). Auch findet man HPL in Wurzeln von Gurken- und Melonenkeimlingen (Vick & Zimmerman, 1976; Matsui *et al.*, 1989). In Lein- und Maissamen konnte man AOS-Aktivität messen (Gardner, 1991), genauso wie in Wurzeln der Tomate (Caldelari & Farmer, 1998) und in unterirdischen Organen der Kartoffel (Hamberg, 2000; diese Arbeit).

Das Auftreten von CYP74-Aktivitäten in bestimmten Pflanzenorganen ist aber auch abhängig von Entwicklungs- und Stressprozessen: So sinkt die HPL-Aktivität in Paprikafrüchten während ihrer Reifung (Shibata *et al.*, 1995b). In Blättern der Kartoffel lässt sich durch Pathogenbefall eine DES induzieren, die unter Standardbedingungen nicht nachweisbar ist (Stumpe *et al.*, 2001).

Insgesamt wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur Verteilung der CYP74-Enzyme in den einzelnen Geweben der Organe oder zu ihrer intrazellulären Lokalisierung durchgeführt. Im Fall der HPL aus Paprikafrüchten gelang eine Lokalisierung des Enzyms im Perikarp (Shibata *et al.*, 1995b). Bei der Untersuchung des Expressionsmusters der AOS aus *Arabidopsis* mit Promotor-GUS-Experimenten beobachtete man GUS-Aktivität in den Venen von jungen Blättern, die sich während der Blattentwicklung auf die gesamte Blattspreite ausbreitete (Kubigsteltig *et al.*, 1999). Innerhalb dieser Studie zeigte sich auch eine GUS-Färbung in der Abscissionszone der Blüte. Ähnliche Ergebnisse erzielte man mit Hilfe von immunozytologischen Techniken. Dabei gelang der Nachweis der AOS in der Abscissionszone der Blüte und in reifen Pollen sowie in allen Zellschichten von *Arabidopsis*- und Tomatenblättern (Stenzel *et al.*, 2003a, 2003b). Bei diesen Analysen handelt es sich um den Nachweis von 13-AOS. Die AOS3 aus Kartoffel ist spezifisch für 9-Hydroperoxide und wird, wie wir zeigen konnten, vorwiegend in unterirdischen Organen exprimiert. Aus diesem Grund nutzten wir Antikörper gegen dieses Enzym, um so die gewebsspezifische Verteilung in verschiedenen Organen der Kartoffel zu analysieren. Dabei war es möglich die AOS3 im Kortexgewebe von Wurzel, Stolon und Knolle und im Leitbündelparenchym sowohl in unterirdischen Organen als auch in Blättern nachzuweisen.

Nach der Aufklärung der Aminosäuresequenz und Klonierung verschiedener CYP74-Enzyme zeigte sich in einzelnen Fällen ein N-terminales CTS. Beispiele hierfür sind die HPL aus *Arabidopsis* (Bate *et al.*, 1998), *Medicago sativa* (Noordermeer *et al.*, 2000) und *Physcomitrella patens* (diese Arbeit) ebenso wie die AOS1 und AOS2 aus Kartoffel und Tomate (Howe *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000). Diese Befunde stützen ältere Untersuchungen, bei denen AOS- bzw. HPL-Aktivitäten an isolierten Chloroplasten z. B. von Spinat, Tabak und Tee nachgewiesen wurden (Hatanaka, 1993; Blee & Joyard, 1996). Diese Aktivitäten waren meist mit Membranen der Chloroplasten assoziiert. Dabei handelte es sich in der Regel um die Hüllmembranen, obwohl auch eine Lokalisierung in den Thylakoidmembranen vermutet wurde. Durch *in vitro*-Import-Versuche an isolierten Chloroplasten wurde die Lokalisierung der AOS und HPL von Tomate genauer untersucht (Froehlich *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich, dass die AOS, welche ein CTS besitzt, durch einen ATP-abhängigen, Protease-sensitiven Mechanismus in die innere Hüllmembran des Chloroplasten transportiert wird. Der größte Teil des Enzyms ist dem Stroma zugewandt. Die HPL, welche kein CTS besitzt, integrierte durch einem ATP-unabhängigen, Protease-insensitiven Weg in die äußere Hüllmembran der Chloroplasten und ist dem Intermembranraum zugewandt. Mit Hilfe eines YFP-Fusionsproteins konnten wir auch für die HPL aus *P. patens* eine chloroplastidäre Lokalisierung nachweisen. Hier zeigte sich keine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzsignale über das Organell. Man beobachtete vielmehr die Bildung von Domänen innerhalb des Chloroplasten, die eine höhere Strukturierung, wahrscheinlich innerhalb der Membranen, vermuten lässt.

Außer der Tomaten-HPL wurde die intrazelluläre Verteilung noch anderer Enzyme ohne CTS, wie der beiden AOS aus Gerste und der AOS3 aus Kartoffel, untersucht. Die AOS aus Gerste befindet sich sowohl im Cytosol als auch an den Chloroplasten gebunden (Maucher *et al.*, 2000). Für die AOS3 aus Kartoffel fanden wir eine Lokalisierung an den Membranen von Amyloplasten und Proplastiden. Die Maschinerie für den Transport in Chloroplasten und Amyloplasten ist hierbei identisch und daher nicht limitierend (Klöggen & Weil, 1991), sodass vermutet werden kann, dass AOS3 in Zellen, die Chloroplasten besitzen, auch in dieses Organell transportiert wird.

Insgesamt betrachtet, sind die CYP74-Enzyme im Pflanzenreich weit verbreitet und vielfach untersucht wurden. Die meisten von ihnen finden sich an Membranen, vor allem an denen von Plastiden, gebunden. Es existieren aber auch Ausnahmen, so finden sich auch CYP74-Enzyme löslich im Cytosol, wie es für eine HPL der Wassermelone beschrieben wurde (Vick & Zimmerman, 1976). Ebenso zeigt die AOS aus *Parthenium argentatum*

eine Besonderheit. Dieses Enzym, welches kein CTS trägt, macht 50% der Proteine der Latex-Partikel dieser Gummibaumart aus (Pan *et al.*, 1995). Ebenso wurde eine HPL-Aktivität auch an Lipidkörpern von Gurken nachgewiesen. (Weichert *et al.*, 2002)

Somit lässt sich kein einheitliches Bild der Lokalisierung und Verteilung in der Pflanze finden. Dieses beruht wahrscheinlich auf den vielfältigen Funktionen der unterschiedlichen Enzyme. Bei der Biosynthese von Jasmonaten existiert ein akzeptiertes Modell, welches die intrazelluläre Lokalisierung von LOX, AOS und AOC in den Chloroplasten und die darauf folgenden Syntheseschritte in den Peroxisomen annimmt (Abb. 9; Feussner & Wasternack, 2002). LeA wird aus der inneren Membran durch eine Phospholipase freigesetzt und durch eine chloroplastidäre 13-LOX zu 13-HPOTE umgesetzt. Dieses kann durch eine HPL zu Aldehyden oder durch die Reaktion der AOS und der AOC zu 12-OPDA metabolisiert werden. 12-OPDA wird dann in die Peroxisomen transportiert. Nach erfolgter Reduktion der Doppelbindung am C-10 führen drei β -Oxidationschritte zur Bildung von JA.

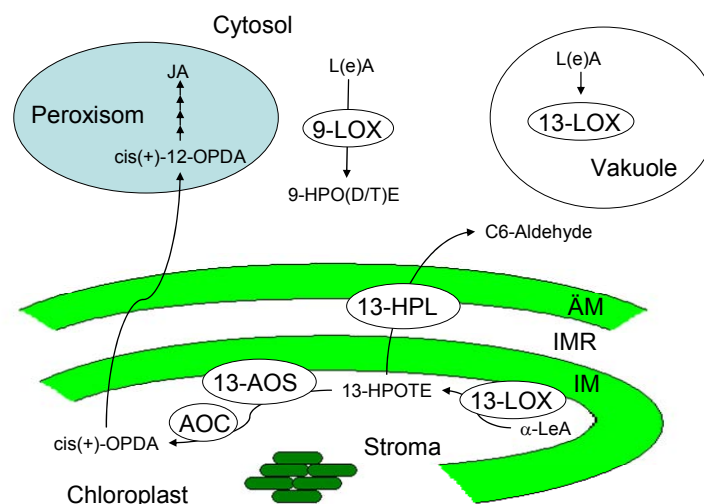


Abb. 9: Intrazelluläre Lokalisierung des LOX-Reaktionsweges (nach Feussner & Wasternack, 2002).
 ÄM: äußere Membran, IM: innere Membran, IMR: Intermembranraum

Dieses Modell wird unterstützt durch die Charakterisierung einer chloroplastidären Phospholipase A1, die zumindest in Staubbeutel den initialen Schritt der JA-Biosynthese katalysiert (Ishiguro *et al.*, 2001). Ebenso lassen sich 13-LOX ubiquitär in Chloroplasten finden, während sie in anderen Kompartimenten nur vereinzelt zu finden sind (Feussner & Wasternack, 2002). Kürzlich wurde auch eine Acyl-CoA Oxidase charakterisiert, die den ersten Schritt in der β -Oxidation katalysiert (Li *et al.*, 2005).

2.3 Oxylipinprofiling und physiologische Funktion von Oxylipinen

Die einzelnen Verzweigungen des LOX-Reaktionsweges (Abb. 2) sind nicht in allen Pflanzen vorhanden und nicht immer gleichzeitig aktiv, sondern unterliegen verschiedenen Kontrollmechanismen, die zudem für eine Spezifität in bestimmten Pflanzenorganen und -geweben sowie Entwicklungsstadien sorgen (Feussner & Wasternack, 2002). So findet man in Wurzeln der Kartoffel 9-LOX-Aktivität und als sekundäre Enzymaktivitäten 9-DES und 9-AOS (Hamberg, 2000). In Blättern dagegen beobachtet man vor allem die Tätigkeit von 13-LOX und 13-AOS (Feussner & Wasternack, 2002). Eine Möglichkeit die Aktivität der unterschiedlichen Wege *in vivo* zu bestimmen ist die Quantifizierung der einzelnen Oxylipine zu sogenannten Oxylipinprofilen. Diese sollen über den Produktnachweis einen Hinweis auf das Vorhandensein bzw. die Aktivität der einzelnen Enzyme geben. Die Bestimmung dieser Metabolite geschah durch eine Kombination von HPLC-, GC- und GC/MS-Analysen (Weichert *et al.*, 1999).

Oxylipinprofile verschiedener Kartoffelorgane

Während für viele Oxylipine schon Nachweismethoden vorlagen, sollte für Metabolite der hochspezifischen 9-StAOS3 im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zu Messung dieser Substanzen etabliert werden. Im Gegensatz zu 13-AOS werden die Produkte der 9-AOS nicht als Substrate von der AOC der Kartoffel verwendet, sondern hauptsächlich zu Ketolen hydrolysiert. Ähnlich der Analyse von Jasmonat und 12-OPDA sollte eine Quantifizierung mit Hilfe der GC/MS unter Verwendung eines 5fach deuterierten Ketols als interner Standard durchgeführt werden (wurde freundlicher Weise von Dr. O. Miersch (IPB Halle) zur Verfügung gestellt). Zur Minimierung des einzusetzenden Pflanzenmaterials erfolgte die Bestimmung der Ketole parallel zu den anderen Oxylipinen. Nach einer Vorfraktionierung und Abtrennung der Ketolisomere wurden diese für die GC/MS-Analyse derivatisiert. Im Vorfeld wurden verschiedene Methoden zur Derivatisierung getestet. Ketole besitzen drei funktionelle Gruppen: Carboxyl-, Hydroxyl- und Ketogruppe. Zur Erhöhung der Flüchtigkeit und der thermischen Stabilität müssen diese stark polaren Gruppen in weniger polare umgewandelt werden. Gebräuchliche Methoden für die Carboxylgruppe sind ihre Methylierung bzw. die Überführung in den Pentafluorbenzylester. Letztere kommt auch bei der Analyse von Jasmonaten zur Anwendung. Substanzen mit aktiven Wasserstoffen, wie bei Alkoholfunktionen, werden häufig silyliert. Diese Methode eignete sich allerdings nicht für die geplanten Hochdurchsatzanalysen, mit der

von uns verwendeten Analytik. Die Derivatisierung der Ketofunktion erfolgt meist durch Bildung eines Oxims, z. B. mit O-Methylhydroxylamin oder O-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)-hydroxylamin. Gleiche Mengen an Ketol wurden mit den oben beschriebenen Methoden in unterschiedlichen Kombinationen derivatisiert und mit Hilfe der GC/MS analysiert. Die höchste Sensitivität wurde nach Umsetzung des Ketols mit Pentafluorbenzylbromid und gleichzeitiger Derivatisierung der Ketogruppe erzielt. Zwischen den getesteten Derivatisierungsmöglichkeiten der Ketogruppe wurde kein Unterschied in der Sensitivität beobachtet. Zur Beschreibung der Details der Methode, die für die Untersuchung des 9-AOS-Reaktionsweges und seiner Reaktionsprodukte in unterschiedlichen Organen der Kartoffel genutzt wurde, siehe 5.4.

Das organspezifische Oxylinprofil der Kartoffel zeigt, dass unter Standardbedingungen in überirdischen Organen Produkte des Reduktase- und des 13-AOS-Reaktionsweges sowie Ketofettsäuren zu finden sind (Abb. 10). Während in Blättern, vor allem in jungen Blättern, 12-OPDA (ein Produkt des 13-AOS-Reaktionsweges, grün) dominiert, finden sich in Blüten hauptsächlich 9-HODE (Reduktase-Reaktionsweg, blau). Dieses Hydroxid wurde unter anderem als fungizide Substanz charakterisiert. Es zeigt eine noch stärkere inhibierende Wirkung auf die Entwicklung von Pilzen als das entsprechende Hydroperoxid (Ohta *et al.*, 1990; Ricker & Bostock, 1994). Neben dieser Abwehrfunktion konnte bisher noch kein Einfluss auf die pflanzliche Entwicklung gezeigt werden. Man nimmt an, dass das Hydroxid letztendlich in der β -Oxidation (Feussner *et al.*, 2001) abgebaut wird und dass so überschüssige Hydroperoxide aus dem LOX-Reaktionsweg entfernt werden. Der erhöhte Gehalt von 12-OPDA im Vergleich zu JA wurde auch schon in Blättern anderer Pflanzenspezies beobachtet (Laudert & Weiler, 1998; Strassner *et al.*, 2002). Anders verhält es sich z. B. in der mykorrhizierten Wurzel von Gerste (Hause *et al.*, 2002) und *Medicago truncatula* (diese Arbeit), hier dominiert JA. In Wurzel der Kartoffel findet man etwa gleiche Mengen an 12-OPDA und JA.

In den unterirdischen Organen finden sich zusätzlich noch Produkte des 9-AOS- und des 9-DES-Reaktionsweges (Abb. 10). Aufgrund des hohen Gehaltes des α -Ketols des 9-HPODEs (10 nmol/g FG) ist der Gesamtgehalt an Oxylinen in jungen etiolierten Trieben der Knolle sehr hoch. Hohe Aktivitäten des LOX-Reaktionsweges sind insgesamt oft in sich entwickelnden Pflanzen beschrieben worden (Creelman & Mullet, 1997). In Keimlingen der Gurke fand man eine hohe HPL-Aktivität (Matsui *et al.*, 1989), während in Sojakeimlingen vor allem JA akkumulierte (Creelman & Mullet, 1995).

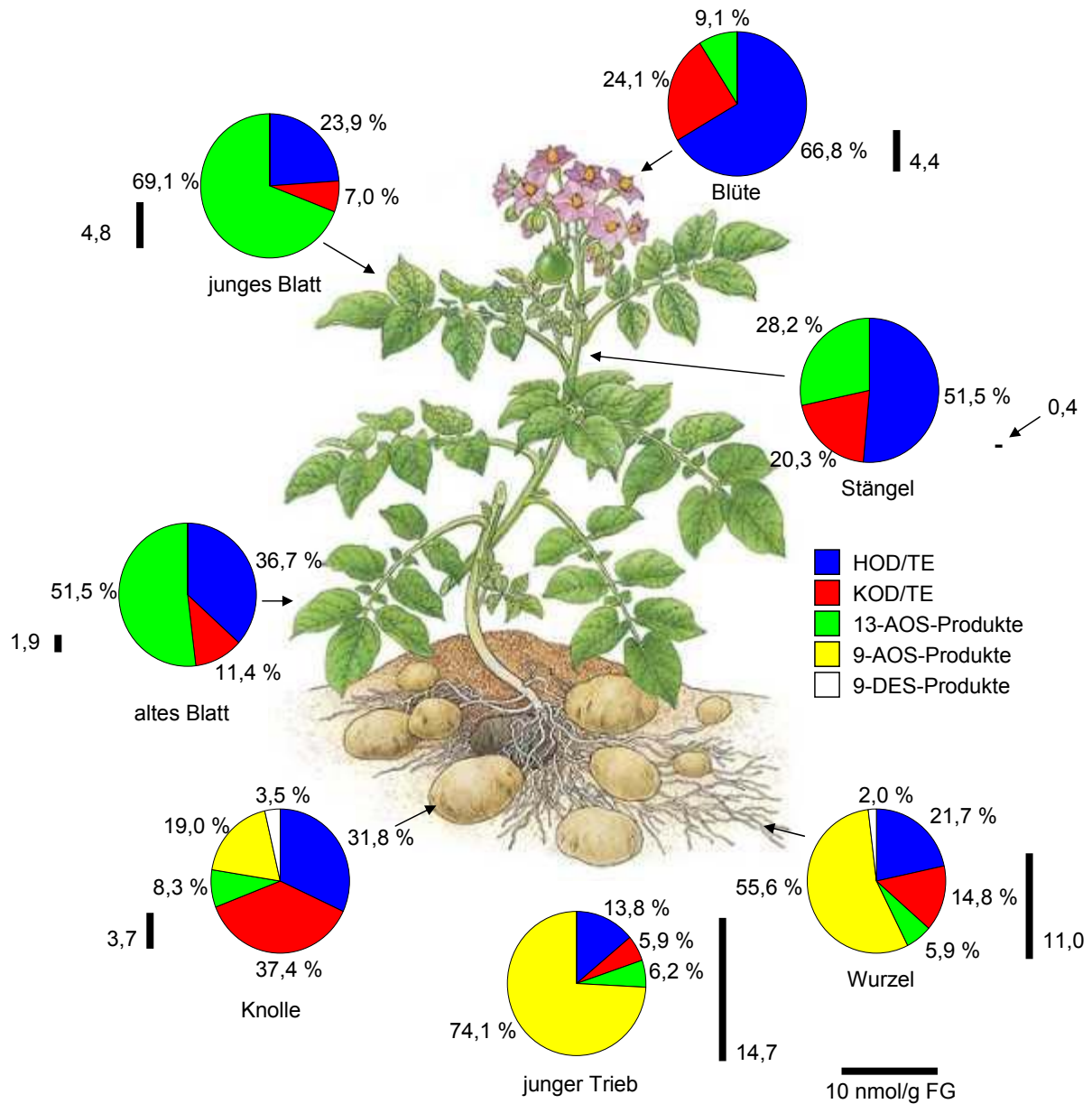


Abb. 10: Oxylinprofilierung der verschiedenen Kartoffelorgane. Angegeben sind die Prozente der einzelnen Oxylingruppen. Schwarze Balken symbolisieren die Summe der gefundenen Oxylipine.

Über die Funktion der Ketole ist bisher nur wenig bekannt. In *Lemna paucicostata* und *Pharbitis nil* spielen sie eine Rolle bei der Blühinduktion (Yamaguchi *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2003). Dieses hat vermutlich in jungen Kartoffeltrieben keine Bedeutung. Aufgrund des hohen Transkriptlevels und des Gehalts an Ketolen in diesem sich schnell entwickelnden Organ, kann aber eine Funktion bei Entwicklungsprozessen der Kartoffel nicht ausgeschlossen werden. Die Lokalisierung des Enzyms an jungen Amyloplasten deutet auch auf eine Rolle im Zuckerstoffwechsel hin. So wurde kürzlich für JA ein Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel in Pappeln beschrieben. Hier führte exogene

JA zu einer Verringerung des Stärkegehaltes der Blätter und zu einer Erhöhung in Stängel und Wurzeln (Babst *et al.*, 2005). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Ketole die Knollenentwicklung beeinflussen. Untersuchungen an transgenen Kartoffeln zeigten nämlich, dass ein 9-LOX-Metabolit dabei eine Rolle spielt (Kolomiets *et al.*, 2001). Ähnlich anderer Oxylipine können Ketole auch in Stressantworten involviert sein. Erste Ergebnisse in Tomate zeigen eine Transkriptakkumulation des orthologen Enzyms in Wurzeln nach JA-Applikation (Itoh *et al.*, 2002).

Die 9-DES-Produkte (Colnensäure und Colnelensäure) treten in Knollen und Wurzel aber nicht in jungen Trieben auf. Der Gehalt unter Standardbedingungen ist allerdings gering. In Blättern konnten keine Divinylether nachgewiesen werden. Sie lassen sich aber in diesem Organ durch die Behandlung mit Pathogenen induzieren (Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2001). Nach *Phytophthora infestans*-Infektion sind Unterschiede in der Stärke und dem zeitlichen Verlauf der Akkumulation von Divinylethern zwischen resistenten und suszeptiblen Kartoffelsorten zu beobachten (Weber *et al.*, 1999). Ähnlich anderer Oxylipine besitzen auch sie eine antimikrobielle Wirkung. Der konstitutive Gehalt der Divinylether in Wurzeln könnte also ein basaler Schutz vor Bodenpathogenen sein.

Insgesamt zeigt sich durch diese Analyse ein sehr differenziertes Bild des LOX-Reaktionsweges in Kartoffeln. Die Funktion dieser einzelnen Metabolite muss durch funktionelle Analysen in nächster Zeit genauer betrachtet werden.

Erste Anhaltspunkte dazu konnten durch Untersuchungen mit *Arabidopsis* erhalten werden, da für diese Modellpflanze ein breites Spektrum an genetischen *tools* zur Verfügung steht.

Untersuchungen von Arabidopsis CYP74-Deletionsmutanten

A. thaliana besitzt zwei CYP74-Gene (At5g42650 und At4g15440). Sie kodieren für eine HPL und eine AOS (Bate *et al.*, 1998; Laudert & Weiler, 1998). Über das SALK-Institut bestand die Möglichkeit Deletionsmutanten für beide Proteine zu erhalten (*hpl*: SALK_042412, *aos*: SALK_017756). Nach Verwundung dieser Mutanten und des Wildtyps wurde der Gehalt verschiedener Oxylipine nach bestimmten Zeitpunkten und das Expressionsmuster unterschiedlicher Gene analysiert, die durch Oxylipine reguliert werden. Durch diese Art des Stresses kann auf einfache Weise die Verletzung der Pflanze durch Herbivoren imitiert werden. Die Oxylipine wurden in drei unabhängigen Verwundungskinetiken bestimmt. Pro Zeitpunkt wurde in der Regel das Material dreier

Pflanzen vereinigt. Die Northern-Blot-Analysen wurden mit dem gleichen Material wie die Oxylinprofile durchgeführt.

In den *aos*-Pflanzen konnten keine Oxylipine (12-OPDA, dinor-OPDA, JA) nachgewiesen werden, deren Bildung der AOS-Reaktion nachgeschaltet ist. Im Wildtyp und in den *hpl*-Pflanzen akkumulieren diese Metabolite um bis zum bis zum 100fachen ihres Gehalt im Vergleich zum unverwundeten Zustand (Abb. 11).

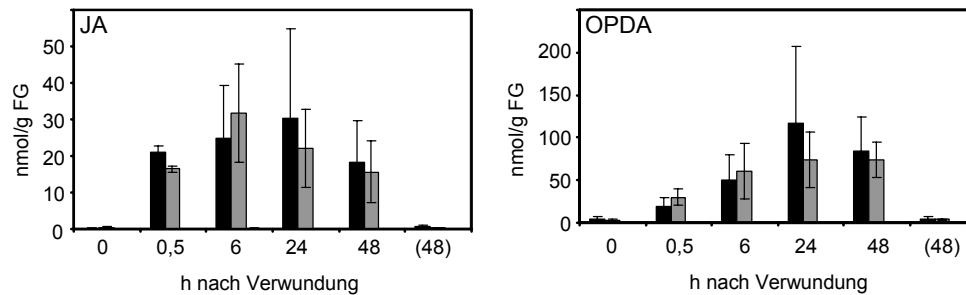


Abb. 11: JA/OPDA-Gehalt in Blättern von *Arabidopsis* nach Verwundung. (48): unverwundete Blätter geerntet zum 48-h-Zeitpunkt. Wildtyp: schwarz, *hpl*: grau, *aos*: weiß.

12-OPDA und das Folgeprodukt JA haben eine große Bedeutung in abiotischen und biotischen Stress-Situationen, wie Verwundung oder Pathogenbefall, und akkumulieren unter derartigen Bedingungen (Feussner & Wasternack, 2002; Schilmiller & Howe, 2005). Exogen applizierte JA bzw. Methyl-JA induziert u. a. Proteine, die eine Rolle bei Abwehrantworten spielen (Sembdner & Parthier, 1993; Creelman & Mullet, 1997; Feussner & Wasternack, 2002). Zu ihnen zählen Protease-Inhibitoren, Thionin, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, Chalkonsynthasen und LOX. Neben diesen finden sich auch vegetative Speicherproteine (VSP) und noch zahlreiche Proteine, deren Funktionen bisher noch nicht bekannt sind.

Die *fad3-2 fad7-2 fad8*-Mutante von *Arabidopsis*, deren LeA-Synthese gehemmt ist, bildet keine JA und zeigt eine geringere Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen (McConn *et al.*, 1997; Stintzi *et al.*, 2001). Ebenso verhält es sich mit Signalmutanten von *Arabidopsis* (*coi1*, *jar1*) oder Tomate (*jai1*), die insensitiv gegenüber JA sind bzw. eine verringerte Sensitivität aufweisen (Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004). Eine derartige Suszeptibilität gegenüber Pathogenen zeigen auch die *aos*-Pflanzen (unveröffentlichte Daten, Dr. G. Rothe, IPB Halle). Eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen zeigen Mutanten, deren JA-regulierte Signaltransduktionskette konstitutiv aktiv ist (Ellis & Turner, 2001).

Durch die Untersuchung der *opr3*-Mutante von *Arabidopsis*, die zwar 12-OPDA enthält aber dieses nicht weiter zu JA umsetzen kann, wurde gezeigt, dass 12-OPDA in der Lage ist bestimmte Abwehrgene zu induzieren (Stintzi *et al.*, 2001). Aus diesen Experimenten schlussfolgerte man, dass 12-OPDA und JA gemeinsam die Genexpression regulieren, um so eine der Situation angemessene Feinabstimmung zu erreichen. Neben Genen, die sowohl durch 12-OPDA und JA reguliert werden (*hpl*, *jr3*, *aco1*) fand man auch Gene, die ausschließlich durch JA reguliert werden (*vsp2*, *mbp*). Jeweils eines aus jeder Gruppe wurde in den *CYP74*-Deletionsmutanten von *Arabidopsis* untersucht (Abb. 12). Im Wildtyp findet sich eine transiente Akkumulation von *hpl* und *vsp2* mit Maxima bei etwa 6 h nach Verwundung. Während in den *hpl*-Pflanzen kein Unterschied zum Wildtyp bei der Expression von *vsp2* zu beobachten war, fehlte dieses Transkript in den *aos*-Pflanzen. Das *hpl*-Transkript ist weder in den *hpl*- (erwartungsgemäß) noch in den *aos*-Pflanzen zu detektieren (Abb. 12). Dieses zeigt, dass *hpl* nicht nur während der Verwundung durch die steigenden Gehalte an 12-OPDA und JA induziert wird, sondern dass auch die basale Expression unter stressfreien Bedingungen von geringen Mengen 12-OPDA und JA abhängt.

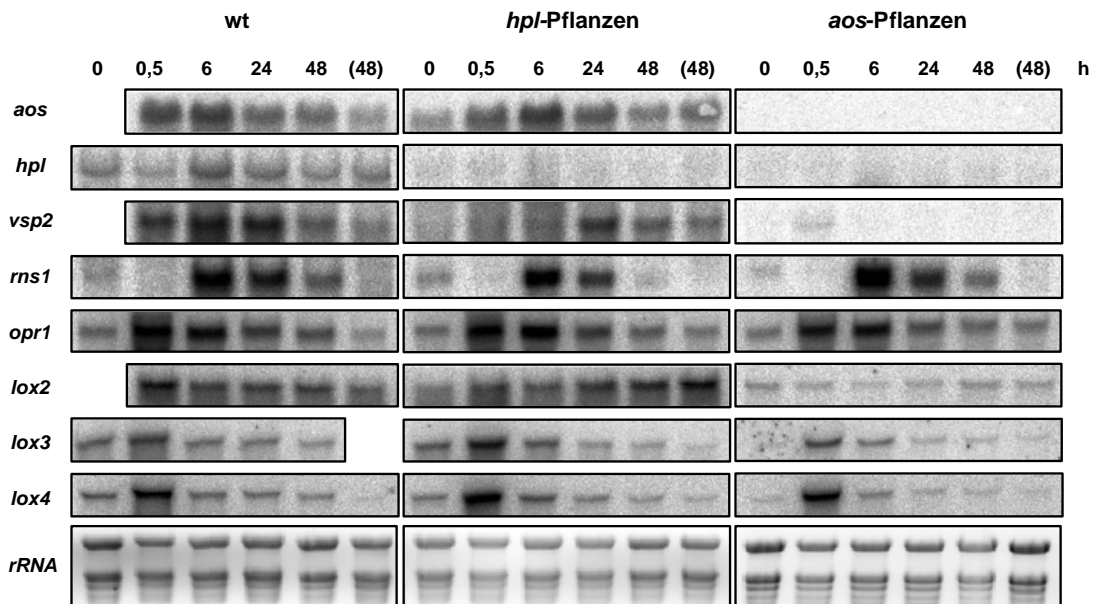


Abb.12: Northern-Blot-Analysen der Expressionsmuster verschiedener Oxylin- bzw. wundinduzierbarer Gene nach Verwundung. wt: Wildtyp-Pflanzen(48): unverwundete Blätter geerntet zum 48-h-Zeitpunkt.

Zur Unterstützung dieser Ergebnisse wurden auch die Gehalte von Aldehyden, den Reaktionsprodukten der HPL, in den Pflanzen untersucht. Dabei zeigte sich im Wildtyp keine Änderung der Menge an Hexenal (Mischung aus (3Z)- und (2E)-Hexenal) während

der Verwundungskinetik; andere Aldehyde konnten nicht detektiert werden (Abb. 13). In den *hpl*- und *aos*-Pflanzen waren nur sehr geringe Mengen an Hexenal nachweisbar. Diese können auch nicht enzymatisch, z.B. durch säurekatalysierte Spaltung von 13-HPOTE entweder in der Pflanze oder während der Probenaufarbeitung entstehen. Damit scheint die Biosynthese von Hexenalen vom AOS-Reaktionsweg und seinen Produkten abhängig zu sein.

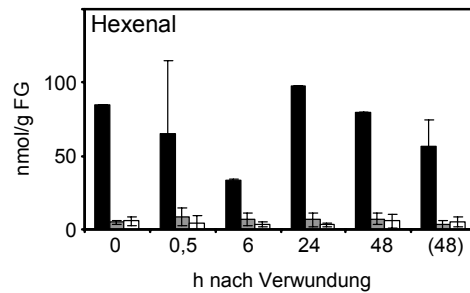


Abb.13: Hexenal-Gehalt in Blättern von *Arabidopsis* nach Verwundung. (48): unverwundete Blätter geerntet zum 48-h-Zeitpunkt. Wildtyp: schwarz, *hpl*: grau, *aos*: weiß.

Für die induzierende Wirkung von JA bzw. 12-OPDA/JA auf bestimmte Gene wird eine funktionierende Signalkette, die u. a. vom *coil*-Genprodukt abhängt, benötigt (Schilmiller & Howe, 2005). Neben diesen *coil*-abhängigen Genen fand man auch *coil*-unabhängige, die bei Verwundung induziert werden (*gst1*, *rns1*, *opr1*) (Reymond *et al.*, 2000). Die Signalmoleküle, welche diese Aktivierung kontrolliert, sind noch nicht bekannt. 12-OPDA und dinor-OPDA besitzen eine α,β -ungesättigte Carbonylfunktion. Moleküle mit derartigen Gruppen schreibt man eine potente Genregulationsfunktion in Pflanzengewebe zu (Kawamoto *et al.*, 2000). Da kein Unterschied in der Expression dieser Gene zwischen Wildtyp und *opr3*-Pflanzen existiert, spekulierte man, dass 12-OPDA dabei eine Rolle spielt (Stintzi *et al.*, 2001). Ebenso wurde gezeigt, dass die oben beschriebenen *coil*-unabhängigen Gene nach 12-OPDA-Behandlung von Pflanzen induziert werden (Stintzi *et al.*, 2001). Wir untersuchten den Transkriptgehalt von *rns1* und *opr1* in den CYP74-Deletionsmutanten von *Arabidopsis* (Abb. 12). Da kein Unterschied in der wundinduzierten Akkumulation dieser Gene beobachtet werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass bei der Induktion dieser Gene infolge der Verletzung auch andere Signalmoleküle von Bedeutung sein könnten. Ein direkter Vergleich von *opr3*-Pflanzen mit den hier untersuchten Deletionsmutanten kann nur bedingt erfolgen, da sich die Ecotypen der Mutanten unterscheiden.

Wie bereits erwähnt zählen *lox* auch zu den JA-induzierbaren Genen. *Arabidopsis* besitzt 6 verschiedene Isoenzyme. Durch exogene Methyl-JA lassen sich die Transkripte von drei der vier 13-LOX (*lox2*, *lox3* und *lox4*) in Rosettenblättern induzieren (Bell & Mullet, 1993; Stintzi *et al.*, 2001; Feussner & Wasternack, 2002). Untersuchungen des Transkriptlevels dieser Gene nach Verwundung sowohl in Wildtyp als auch in den *CYP74*-Deletionsmutanten zeigten eine schnelle transiente Akkumulation bei *lox3* und *lox4* (Abb. 12). Diese Induktion ist also unabhängig von JA und 12-OPDA. In *opr3*-Pflanzen steigt der Transkriptgehalt dieser Gene in den ersten 30 min nach Verwundung an, fällt dann aber schnell wieder ab, während im Wildtyp auch 3 h nach Verwundung immer noch ein erhöhter Level zu beobachten ist (Stintzi *et al.*, 2001).

In *aos*-Pflanzen beobachtet man einen weitaus geringeren Transkriptlevel von *lox2* im Vergleich zu Wildtyp- oder *hpl*-Pflanzen (Abb. 12). Diese LOX wird mit dem Anstieg von JA nach Verwundung in Verbindung gebracht, da transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine verminderte Expression der *lox2* aufweisen, diese Akkumulation nicht aufweisen (Bell *et al.*, 1995).

Nach Verwundung oder Pathogenbefall beobachtet man nicht nur einen Anstieg von JA, sondern auch von freien Fettsäuren, Fettsäure-Hydroxiden und Ketofettsäuren (Göbel *et al.*, 2001; Feussner & Wasternack, 2002). Die von uns untersuchten Metabolite (Hexadecatriensäure (RA), LA, LeA, 9/13-HO(D/T)E, 9/13-KO(D/T)E) akkumulieren in allen drei untersuchten genetischen Hintergründen. Bis auf 13-HOTE und 13-KOTE fanden sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp-, *aos*- und *hpl*-Pflanzen (Abb. 14). In den *aos*-Pflanzen steigt der Gehalt an 13-HOTE und 13-KOTE schneller und stärker an als im Wildtyp oder den *hpl*-Pflanzen.

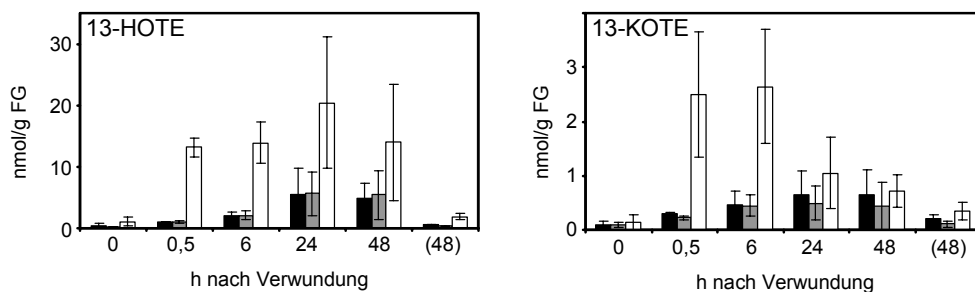


Abb. 14: 13-HOTE- und 13-KOTE-Gehalt in Blättern von *Arabidopsis* nach Verwundung. (48): unverwundete Blätter geerntet zum 48-h-Zeitpunkt. Wildtyp: schwarz, *hpl*: grau, *aos*: weiß.

Durch die Verwundung kommt es in *Arabidopsis* zu einer verstärkten Aktivität des LOX-Reaktionsweges. Da in den *aos*-Pflanzen die durch die LOX gebildeten Fettsäure-

Hydroperoxide weder im AOS- noch HPL-Reaktionsweg metabolisiert werden können, diese aber als zytotoxisch gelten (Rusterucci *et al.*, 1999), müssen sie abgebaut werden. Eine Möglichkeit führt über die Reduktion zu Fettsäure-Hydroxiden, die dann vermutlich in der β -Oxidation weiter verstoffwechselt werden (Feussner *et al.*, 2001). Dieses würde den Anstieg von 13-HOTE erklären. Ein anderer Weg zur Metabolisierung der Fettsäure-Hydroperoxide führt über Ketofettsäuren. Diese führen in größeren Mengen aber auch zum Zelltod (Vollenweider *et al.*, 2000) und sollten folglich nicht sehr stark zunehmen. In den *aos*-Pflanzen nimmt 6 h nach Verwundung der Gehalt an 13-KOTE ab und erreicht bei 24 h etwa das Niveau des Wildtyps. Insgesamt betrachtet, findet man in den *aos*-Pflanzen weniger Oxyline als im Wildtyp. Eine Erklärung hierfür wäre, dass andere hier nicht untersuchte Reaktionswege induziert werden, ein schneller und effizienter Abbau der gebildeten Oxyline (insbesondere der Fettsäure-Hydroperoxide) erfolgt oder wahrscheinlicher die positive *Feedback*-Reaktion von 12-OPDA und JA fehlt (Feussner & Wasternack, 2002; Schillmiller & Howe, 2005). Zur Klärung, ob dieser Regulationsmechanismus bereits bei der Freisetzung von Fettsäuren, den Vorläufern der Oxyline, aus Membranlipiden ansetzt, bestimmten wir den Gehalt an freien Fettsäuren. Dabei stellten wir keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten fest, obwohl bei den *aos*-Pflanzen ein etwas geringer Gehalt beobachtet wird, der aber nicht signifikant ist (Abb. 15).

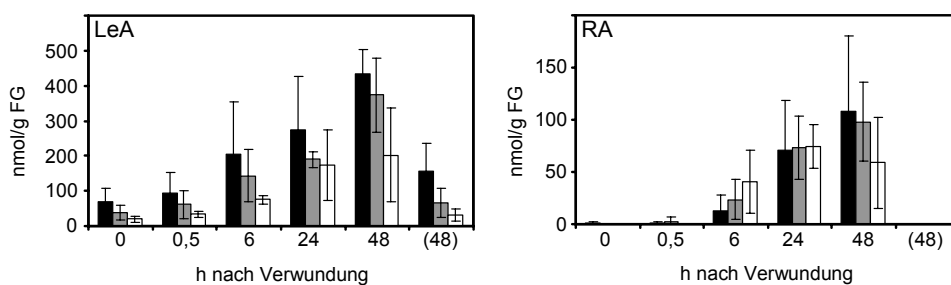


Abb. 15: LeA- und RA-Gehalt in Blättern von *Arabidopsis* nach Verwundung. (48): unverwundete Blätter geerntet zum 48-h-Zeitpunkt. Wildtyp: schwarz, *hpl*: grau, *aos*: weiß.

Diese Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation zwischen untersuchter Transkriptmenge und Metabolitengehalt auf und geben erste Hinweise auf die Aktivität der verschiedenen Verzweigungen des LOX-Reaktionsweges. Dennoch muss kritisch angemerkt werden, dass diese Messungen nur Auskunft über die *steady-state*-Mengen der Oxyline geben. Für eine genaue Analyse der Stärke der Nutzung der unterschiedlichen Reaktionswege wäre die Messung der *in vivo* Aktivitäten der beteiligten Enzyme von Nutzen.

3 Zusammenfassung

CYP74-Enzyme stellen wichtige Verzweigungspunkte im so genannten LOX-Reaktionsweg dar, der zur Bildung von Oxylipinen führt. Einige dieser Substanzen wirken als Signalstoffe in der pflanzlichen Entwicklung und bei der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress. Die Charakterisierung von neuen *CYP74*-Enzymen und die Analyse möglicher Funktionen dieser Enzyme waren Anliegen dieser Arbeit.

Bisher wurden vor allem Untersuchungen zur Funktion von Oxylipinen durchgeführt, die von 13-Hydroperoxiden der LA bzw. LeA abgeleitet sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb neben weiterführenden Analysen zum Metabolismus von 13-Hydroperoxiden Untersuchungen von Oxylipinen erfolgen, die sich von 9-Hydroperoxiden ableiten.

In den Wurzeln der Kartoffel findet man u. a. eine Aktivität, die 9-Hydroperoxide zu Allenoxiden umsetzt, welche dann zu α -, γ -Ketolen und Cyclopentenonderivaten reagieren. Das verantwortliche Enzym wurde in dieser Arbeit isoliert und näher charakterisiert. Das Transkript und das Protein finden sich vor allem in unterirdischen Organen, wie der Wurzel und den Knollen, und in etiolierten jungen Trieben der Knolle. In letzteren gelang auch der endogene Nachweis durch eine neu etablierte analytische Methode zur Quantifizierung von großen Mengen an α -Ketolen, die sich von 9-Hydroperoxiden der LA bzw. LeA ableiten lassen. Immunzytologische Analysen zeigten eine Lokalisierung dieses Enzyms an Amyloplasten im Cortex von Wurzeln, Knollen und Stolonen.

Aus dem Moos *Physcomitrella patens* gelang die erste Isolierung einer cDNA, welche für eine HPL kodiert (PpHPL). Das rekombinante Enzym zeigt nur als N-terminal verkürztes Protein eine enzymatische Aktivität. Dieser N-terminale Bereich konnte als putatives chloroplastidäres Transitpeptid identifiziert werden. Die höchste Aktivität zeigt das rekombinante Enzym gegenüber dem 9-Hydroperoxid der LA, aber auch Hydroperoxide anderer im Moos vorkommenden Fettsäuren (LeA, γ -LeA, AA) werden als Substrat genutzt. In der Gasphase von *P. patens* nach Verwundung und Applikation von Arachidonsäure findet sich in HPL-Deletionsmutanten kein Nonenal mehr, während die Bildung anderer flüchtiger Oxylipine, wie Oktenal und Oktenol, nicht beeinflusst wird.

In *Arabidopsis* findet man eine HPL und eine AOS. Für beide Gene war es möglich über das SALK-Institut Deletionsmutanten zu erhalten. Nach Verwundung oder Pathogenbefall steigt der Gehalt an verschiedenen Oxylipinen, wie z. B. Jasmonat (Produkt des

AOS-Reaktionsweges). Ebenso findet man eine Induktion verschiedener Abwehrgene. Bei der Analyse beider Mutanten nach Verwundung zeigte sich bei den *aos*-Pflanzen, deren Fähigkeit zur Jasmonatbildung nicht mehr besteht, ein Rückstau an 13-Hydroperoxiden, die über den Reduktase-Reaktionsweg und durch die Bildung von Ketofettsäuren abgebaut werden. Die *hpl*-Pflanzen zeigten keinen Unterschied in den Oxylipingehalten. Transkripte von Genen, die unter Jasmonatkontrolle stehen, wie z. B. *vsp*, waren in den *aos*-Pflanzen nicht detektierbar. Von *hpl* und *lox2* ist bekannt, dass sie durch Jasmonat induziert werden können. Während man in den *aos*-Pflanzen geringe Mengen an *lox2*-Transkript beobachten konnte, war das *hpl*-Transkript nicht detektierbar. Ebenso zeigten die *aos*-Pflanzen keine Bildung von Aldehyden (Reaktionsprodukte der HPL).

Die Analyse der Metabolite des LOX-Reaktionsweges in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln zeigte keinen Unterschied im Gehalt der untersuchten Oxylipine. Die einzige Ausnahme bildete dabei Jasmonsäure, welche in mykorrhizierten Wurzeln akkumulierte.

Neben diesen Analysen zur physiologischen Funktion wurden Untersuchungen zur Substratspezifität der *CYP74*-Enzyme durchgeführt. Wie oben erwähnt besitzt die PpHPL ein breites Substratspektrum. Dennoch lassen sich Präferenzen gegenüber Substraten erkennen, die die Hydroperoxid-Gruppe an Position ω -10 tragen. Von Bedeutung scheint also der Abstand zwischen Methylende und Hydroperoxid-Gruppe zu sein, während die Länge des Carboxylendes nur einen geringen Einfluss besitzt. Die HPL aus *Arabidopsis* bildet dahingegen eine Ausnahme. Hier scheint das innere Hydroperoxy-Doppelbindungs-Motiv eine entscheidende Rolle zu spielen und nicht die Lage im Kohlenstoffgerüst. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *CYP74*-Enzyme Hydroperoxide von ω und (ω -1)-Hydroxy-Fettsäuren metabolisieren, eine Umsetzung bis zu HOJA im weiteren LOX-Reaktionsweg konnte dahingegen nicht nachgewiesen werden.

Aus Knoblauch konnte die erste 9/13-DES kloniert und charakterisiert werden. Das rekombinante Enzym setzt spezifisch Hydroperoxide der LA um (sowohl 9 als auch 13), wohingegen der Umsatz von LeA-Derivaten deutlich schwächer war. Endogen konnte nur der Divinylether vom 13-Hydroperoxid der LA nachgewiesen werden. Das Transkript wie auch die Reaktionsprodukte wurden in Wurzeln und Knollen nachgewiesen, während der Gehalt in Blättern zum Teil unter der Detektionsgrenze lag.

4 Literaturverzeichnis

- Achenbach, H., Hubner, H., Brandt, W., and Reiter, M. (1994). Cardioactive steroid saponins and other constituents from the aerial parts of *Tribulus cistoides*. *Phytochemistry* **35**(6), 1527-43.
- Babst, B. A., Ferrieri, R. A., Gray, D. W., Lerdau, M., Schlyer, D. J., Schueller, M., Thorpe, M. R., and Orians, C. M. (2005). Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. *New Phytol* **167**(1), 63-72.
- Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E., and Rothstein, S. J. (1998). Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology* **117**(4), 1393-400.
- Began, G., Sudharshan, E., and Rao, A. G. A. (1999). Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles. *Biochemistry* **38**(42), 13920-7.
- Bell, E., and Mullet, J. E. (1993). Characterization of an *arabidopsis*-lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* **103**(4), 1133-7.
- Bell, E., Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(19), 8675-9.
- Blake, R. C., and Coon, M. J. (1981). On the mechanism of action of cytochrome P-450. Evaluation of homolytic and heterolytic mechanisms of oxygen-oxygen bond cleavage during substrate hydroxylation by peroxides. *J Biol Chem* **256**(23), 12127-33.
- Blée, E., and Joyard, J. (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol* **110**(2), 445-54.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**(7), 315-22.
- Boutaud, O., and Brash, A. R. (1999). Purification and catalytic activities of the two domains of the allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein of the coral *Plexaura homomalla*. *J Biol Chem* **274**(47), 33764-70.
- Brash, A. R., Hughes, M. A., Hawkins, D. J., Boeglin, W. E., Song, W. C., and Meijer, L. (1991). Allene Oxide and Aldehyde Biosynthesis in Starfish Oocytes. *J Biol Chem* **266**(34), 22926-31.
- Browner, M. F., Gillmor, S. A., and Fletterick, R. (1998). Burying a charge. *Nat Struct Biol* **5**(3), 179.
- Caldelari, D., and Farmer, E. E. (1998). A rapid assay for the coupled cell free generation of oxylipins. *Phytochemistry* **47**(4), 599-604.
- Caramori, T., Albertini, A. M., and Galizzi, A. (1991). *In vivo* generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* **98**(1), 37-44.
- Coffa, G., and Brash, A. R. (2004). A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(44), 15579-84.
- 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**(10), 4114-9.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 355-81.
- Crombie, L., Morgan, D. O., and Smith, E. H. (1991). An isotopic study (^2H and ^{18}O) of the enzymic conversion of linoleic acid with carbon fracture: the origin aldehydes. *J Chem Soc Perkin Trans* **1**, 567-75.
- De Leon, I. P., Sanz, A., Hamberg, M., and Castresana, C. (2002). Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J* **29**(1), 61-2.

- Ellis, C., and Turner, J. G. (2001). The *Arabidopsis* mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**(5), 1025-33.
- Eymard S., and Genot C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 497-501.
- Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M., and Kindl, H. (1998). All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett* **431**(3), 433-6.
- Feussner, I., Kühn, H., and Wasternack, C. (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**(6), 268-73.
- Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**, 275-97.
- Froehlich, J. E., Itoh, A., and Howe, G. A. (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol* **125**(1), 306-17.
- Galliard, T., and Phillips, D. R. (1972). The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1', 3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem J* **129**, 743- 53.
- Gardner, H. W., and Plattner, R. D. (1984). Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent. *Lipids* **19**, 294-9.
- Gardner, H. W. (1989). Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(*S*)- and 13(*S*)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1001**, 274-81.
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta* **1084**(3), 221-39.
- Gay CA, and Gebicki J. (2002). Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric-Xylenol Orange Peroxide Assay. *Anal Biochem* **304**, 42-6.
- Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., and Varin, L. (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**(20), 17895-900.
- Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., and Browner, M. F. (1998). The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **4**(12), 1003-9.
- Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R., and Heinz, E. (1998). Identification of a novel D6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J* **15**(1), 39-48.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S. (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* **276**, 6267-73.
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* **267**(1), 83-90.
- Grechkin, A. N., Fazliev, F. N., and Mukhtarova, L. S. (1995). The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett* **371**(2), 159-62.
- Grechkin, A. N., Ilyasov, A. V., and Hamberg, M. (1997). On the mechanism of biosynthesis of divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic bulbs. *Eur J Biochem* **245**(1), 137-42.
- Grechkin, A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**(5), 317-52.
- Grechkin, A. N. (2002). Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 457-70.
- Grechkin, A. N., and Hamberg, M. (2004). The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta* **1636**(1), 47-58.

- Griffin, B. W., Marth, C., Yasukochi, Y., and Masters, B. S. (1980). Radical mechanism of aminopyrine oxidation by cumene hydroperoxide catalyzed by purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **205**(2), 543-53.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N., and Sanchez-Serrano, J. J. (2000). Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J Exp Bot* **51**(349), 1363-70.
- Hamberg, M. (1998). A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in green leaves. *Lipids* **33**(11), 1061-71.
- Hamberg, M. (2000). New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids* **35**(4), 353-63.
- Hamberg, M. (2002). Biosynthesis of New Divinyl ether Oxylipins in *Ranunculus* Plants. *Lipids* **37**(4), 427-33.
- Hamberg, M. (2004). Isolation and structures of two divinyl ether fatty acids from *Clematis vitalba*. *Lipids* **39**(6), 565-9.
- Hamberg, M. (2005). Hidden stereospecificity in the biosynthesis of divinyl ether fatty acids. *FEBS J* **272**(3), 736-43.
- Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A., and Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **236**(4), 1169-85.
- Hatanaka, A., Kajiwar, T., and Harada, T. (1975). Biosynthetic pathway of cucumber alcohol: *trans*-2,*cis*-6-nonadienol via *cis*-3,*cis*-6-nonadienal. *Phytochemistry* **14**(12), 2589-92.
- Hatanaka, A., Sekiya, J., and Kajiwar, T. (1978). Distribution of an enzyme system producing *cis*-3-hexenal and *n*-hexenal from linolenic and linoleic acids in some plants. *Phytochemistry* **17**, 869-72.
- Hatanaka, A., Kajiwar, T., Sekiya, J., and Toyota, H. (1986). Oxygen incorporation in cleavage of ¹⁸O-labeled 13-hydroperoxylinoleyl alcohol into 12-hydroxy-(3*Z*)-dodecenal in tea chloroplasts. *Z. Naturforsch* **41c**, 359-62.
- Hatanaka, A., Kajiwar, T., Matsui, K., and Toyota, H. (1992). Substrate Specificity of Tea Leaf Hydroperoxide lyase. *Z Naturforsch* **47c**, 677-9.
- Hatanaka, A. (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34**(5), 1201-18.
- Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., and Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol* **130**(3), 1213-20.
- Hecker, M., and Ullrich, V. (1989). On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem* **264**(1), 141-50.
- Hornung, E., Walther, M., Kühn, H., and Feussner, I. (1999). Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(7), 4192-7.
- Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., and DeRocher, A. E. (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123**(2), 711-24.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(10), 2191-209.
- Itoh, A., and Howe, G. A. (2001). Molecular cloning of a divinyl ether synthase: Identification as a CYP74 cytochrome P450. *J Biol Chem* **276**, 3620-7.
- Itoh, A., Schillmiller, A. L., McCaig, B. C., and Howe, G. A. (2002). Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J Biol Chem* **277**(48), 46051-8.

- Ivanov, I., Schwarz, K., Holzhütter, H. G., Myagkova, G., and Kühn, H. (1998). ω -Oxidation impairs oxidizability of polyenoic fatty acids by 15-lipoxygenases: consequences for substrate orientation at the active site. *Biochem J* **336**(2), 345-52.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., and Wolff, S. P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**(10), 853-6.
- Jiang, Z. D., and Gerwick, W. H. (1997). Novel oxylipins from the temperate red alga *Polyneura latissima*: Evidence for an arachidonate 9(*S*)-lipoxygenase. *Lipids* **32**(3), 231-5.
- Kamal-Eldin, A., and Appelqvist, L. A. (1996). Aldehydic acids in frying oils: Formation, toxicological significance and analysis. *Grasas Y Aceites* **47**(5), 342-8.
- Kawamoto, Y., Nakamura, Y., Naito, Y., Torii, Y., Kumagai, T., Osawa, T., Ohigashi, H., Satoh, K., Imagawa, M., and Uchida, K. (2000). Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of phase II detoxification enzymes. 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin j₂-induced expression of glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **275**(15), 11291-9.
- Kim, I., and Grosch, W. (1981). Partial Purification and Properties of a Hydroperoxid Lyase from fruits of pear. *J Agric Food Chem* **29**(6), 1220-5.
- Klöggen, R. B., and Weil, J. H. (1991). Subcellular location and expression level of a chimeric protein consisting of the maize waxy transit peptide and the β -glucuronidase of *Escherichia coli* in transgenic potato plants. *Mol Gen Genet* **225**(2), 297-304.
- Koch, T., Bandemer, K., and Boland, W. (1997). Biosynthesis of *cis*-jasmonate: A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv Chim Acta* **80**(3), 838-50.
- Kohlmann, M., Bachmann, A., Weichert, H., Kolbe, A., Balkenhohl, T., Wasternack, C., and Feussner, I. (1999). Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur J Biochem* **260**(3), 885-95.
- Kolomiets, M. V., Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M., and Gladon, R. J. (2001). Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* **13**(3), 613-26.
- Kubigsteltig, I., Laudert, D., and Weiler, E. W. (1999). Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**(4), 463-71.
- Laudert, D., and Weiler, E. W. (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* **15**(5), 675-84.
- Li, C., Schillmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Yagi, K., Kobayashi, Y., and Howe, G. A. (2005). Role of β -Oxidation in Jasmonate Biosynthesis and Systemic Wound Signaling in Tomato. *Plant Cell* **17**(3), 971-86.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E., and Howe, G. A. (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**(1), 126-43.
- Matsui, K., Shibata, Y., Kajiwara, T., and Hatanaka, A. (1989). Separation of 13- and 9-hydroperoxide lyase activities in cotyledons of cucumber seedlings. *Z. Naturforsch.* **44c**, 883-5.
- Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., and Kajiwara, T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett* **394**(1), 21-4.
- Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., and Kajiwara, T. (2000a). Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**(6), 1189-96.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwara, T., and Feussner, I. (2000b). Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBS Lett* **481**(2), 183-8.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J., and Wasternack, C. (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J* **21**(2), 199-213.

- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., and Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(10), 5473-7.
- Miersch, O., Knofel, H. D., Schmidt, J., Kramell, R., and Parthier, B. (1998). A jasmonic acid conjugate, N-[-(-)-jasmonoyl]-tyramine, from *Petunia* pollen. *Phytochemistry* **47**(3), 327-9.
- Nelson, D. R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**(1), 1-10.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. G. (1999). Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z : 2E-enal isomerase. *FEBS Lett* **443**(2), 201-4.
- Noordermeer, M. A., van Dijken, A. J., Smeekens, S. C., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2000). Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *Eur J Biochem* **267**(9), 2473-82.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2001a). Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem* **2**(7-8), 494-504.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2001b). Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Lett* **489**(2-3), 229-32.
- Ohta, H., Shida, K., Peng, Y.-L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S., and Morita, Y. (1990). The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol* **31**(8), 1117-22.
- Pan, Z., Durst, F., Werck-Reichhart, D., Gardner, H. W., Camara, B., Cornish, K., and Backhaus, R. A. (1995). The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. *J Biol Chem* **270**(15), 8487-94.
- Perez, A. G., Sanz, C., Olias, R., and Olias, J. M. (1999). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J Agric Food Chem* **47**(1), 249-53.
- Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., and Kraut, J. (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* **260**(30), 16122-30.
- Poulos, T. L. (1995). Cytochrome P450. *Curr Opin Struct Biol* **5**(6), 767-74.
- Prigge, S. T., Gaffney, B. J., and Amzel, L. M. (1998). Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases. *Nat Struct Biol* **5**(3), 178-9.
- Proteau, P. J., and Gerwick, W. H. (1993). Divinyl ethers and hydroxy fatty acids from three species of *Laminaria* (brown algae). *Lipids* **28**(9), 783-7.
- Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A., and Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**(5122), 731-6.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *arabidopsis*. *Plant Cell* **12**(5), 707-20.
- Ricker, K. E., and Bostock, R. M. (1994). Eicosanoids in the *Phytophthora infestans*-potato interaction: lipoxygenase metabolism of arachidonic acid and biological activities of selected lipoxygenase products. *Physiol Mol Plant Pathology* **44**, 65-80.
- Rusterucci, C., Montillet, J. L., Agnel, J. P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J. J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J. P., and Triantaphylides, C. (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**(51), 36446-55.
- Schillmiller, A. L., and Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**(4), 369-77.
- Seaver, L. C., and Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(24), 7173-81.
- Sembdner, G., and Parthier, B. (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 569-89.

- Sembdner, G., Atzorn, R., and Schneider, G. (1994). Plant hormone conjugation. *Plant Mol Biol* **26**(5), 1459-81.
- 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**(8), 4788-93.
- Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., and Bell, E. (1994). Lipoxygenases. *Plant Mol Biol Reporter* **12**(2), 41-2.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T., and Hatanaka, A. (1995a). Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**(1), 438-43.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T., and Hatanaka, A. (1995b). Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant Cell Physiol* **36**(1), 147-56.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B., and Rothstein, S. J. (2000). Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol* **122**(4), 1335-42.
- Soliday, C. L., and Kolattukudy, P. E. (1977). Biosynthesis of cutin. ω -hydroxylation of fatty acids by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*. *Plant Physiol* **59**, 1116-21.
- Song, W.-C., and Brash, A. R. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* **253**, 781-4.
- Song, W. C., Baertschi, S. W., Boeglin, W. E., Harris, T. M., and Brash, A. R. (1993). Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. Implications for the mechanism of allene oxide synthesis. *J Biol Chem* **268**(9), 6293-8.
- 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**(6), 747-54.
- 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**(6), 1405-15.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C. A., and Wasternack, C. (2003a). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J* **33**(3), 577-89.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., and Wasternack, C. (2003b). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**(6), 895-911.
- 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**(22), 12837-42.
- Storz, G., Jacobson, F. S., Tartaglia, L. A., Morgan, R. W., Silveira, L. A., and Ames, B. N. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of ahp. *J Bacteriol* **171**(4), 2049-55.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, 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**(4), 585-601.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S., and Feussner, I. (2001). A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett* **507**(3), 371-6.
- Suzuki, M., Yamaguchi, S., Iida, T., Hashimoto, I., Teranishi, H., Mizoguchi, M., Yano, F., Todoroki, Y., Watanabe, N., and Yokoyama, M. (2003). Endogenous α -Ketol Linolenic Acid Levels in Short Day-Induced Cotyledons are Closely Related to Flower Induction in *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol* **44**(1), 35-43.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauchmani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., and Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response

- pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(25), 15107-11.
- Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D. J., Hunziker, P., Muller, B. L., Vulfson, E. N., Slusarenko, A., Brash, A. R., and Whitehead, I. M. (2000). Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*). *Lipids* **35**(7), 709-20.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L., and Brash, A. R. (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Arch Biochem Biophys* **386**(2), 281-9.
- Tijet, N., and Brash, A. R. (2002). Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 423-31.
- van Kampen, M. D., Dekker, N., Egmond, M. R., and Verheij, H. M. (1998). Substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase and *Staphylococcus aureus* lipase as studied by *in vivo* chimeragenesis. *Biochemistry* **37**(10), 3459-66.
- Vick, B. A., and Zimmerman, D. C. (1976). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol.* **57**, 780-8.
- Vick, B. A., and Zimmerman, D. C. (1987). Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol* **85**, 1073-8.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A., and Farmer, E. E. (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **24**(4), 467-76.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids - signals in plant stress responses and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 165-221
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D., and Farmer, E. E. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**(3), 485-93.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C., and Feussner, I. (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett* **464**(3), 133-7.
- Weichert, H., Kolbe, A., Kraus, A., Wasternack, C., and Feussner, I. (2002). Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings - lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes. *Planta* **215**, 612-9.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **5**(1), 121-31.
- Yamaguchi, S., Yokoyama, M., Iida, T., Okai, M., Tanaka, O., and Takimoto, A. (2001). Identification of a Component that Induces Flowering of *Lemna* among the Reaction Products of α -Ketol Linolenic Acid (FIF) and Norepinephrine. *Plant Cell Physiol* **42**(11), 1201-9.
- Yoshihara, T., Omer, E. A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y., and Koda, Y. (1989). Structure of a tuber inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric Biol Chem* **53**, 2835-7.
- Ziegler, J., Hamberg, M., Miersch, O., and Parthier, B. (1997). Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiol* **114**(2), 565-73.

5 Publikationen und Manuskripte¹

5.1 Kandzia R, Stumpe M, Berndt E, Szalata M, Matsui K, Feussner I.

On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana*.

J Plant Physiol. 2003 Jul;160(7):803-9.

Eigenanteil: Expression und Affinitätsreinigung des rekombinanten Enzyms, Bestimmung des pH-Optimums und der kinetischen Parameter (V_{max} , K_M) für drei unterschiedliche Fettsäure-Hydroperoxide.

5.2 Koeduka T, Stumpe M, Matsui K, Kajiwara T, Feussner I.

Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents.

Lipids. 2003 Nov;38(11):1167-72.

Eigenanteil: Screening einer Gerstenphagenbank, Klonierung der Gersten-*CYP74*-cDNA in Expressionsvektor und Expression des Proteins in *E. coli*, Identifizierung der enzymatischen Aktivität als HPL, Anleitung der Experimente von T. Koeduka.

5.3 Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Göbel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I.

Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*.
Phytochemistry. 2005 Apr;66(7):781-91.

Eigenanteil: Bestimmung der enzymatischen Aktivität und der Substratspezifität dreier *CYP74*-Enzyme aus *Medicago*, Messung der Aldehydgehalte in mycorrhizierten Wurzeln.

5.4 Stumpe M, Göbel C, Demchenko K, Pawlowski K, Feussner I.

Identification of an allene oxide synthase (*CYP74C*) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below ground organs of potato.

Plant J. in Revision

Eigenanteil: Isolierung und Klonierung dreier *CYP74*-cDNAs aus Kartoffel, heterologe Expression der Proteine in *E. coli*, Bestimmung der enzymatischen Aktivität und Substratspezifität, Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Affinitätsreinigung der StAOS3 für die Produktion eines Antiserums,

Affinitätsreinigung des Antiserums, organspezifischer Northern-Blot, RT-PCR-Analyse und organspezifischer Western-Blot für StAOS3, Etablierung der Methode zur Quantifizierung von endogenen Ketolen, Oxylipinprofile verschiedener Organe der Kartoffel, Manuskriptentwurf.

5.5 Stumpe M, Göbel C, Wichard T, Schaaf A, Frank W, Frank M, Reski R, Pohnert G, Feussner I.

Identification of a fatty acid hydroperoxide lyase from the moss *Physcomitrella patens* that transforms hydroperoxides of C18- and C20-polyenoic fatty acids to C9-aldehydes.

Plant J. eingereicht

Eigenanteil: Isolierung der cDNA durch Screening einer *P. patens* Phagenbank, Klonierung und Expression in *E. coli*, Herstellung von verschiedenen Fettsäure-Hydroperoxiden, Bestimmung der Substratspezifität des rekombinanten Enzyms, Charakterisierung der entstehenden Reaktionsprodukte, Konstruktion des Vektors zur Expression des YFP-Fusionsproteins, Kultivierung von *P. patens*, Manuskriptentwurf.

5.6 Carsjens JG, Stumpe M, Göbel C, Feussner I.

An unspecific 9/13-divinyl ether synthase from garlic bulbs.

J Biol Chem. Einreichung geplant

Eigenanteil: Datenbanksuche, Durchführung der 5'-RACE-PCR, Planung und Anleitung der Experimente von J. G. Carsjens, Manuskriptentwurf.

nicht in die Arbeit eingegangene Publikationen:

Stumpe M, Kandzia R, Göbel C, Rosahl S, Feussner I.

A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells.

FEBS Lett. 2001 Nov 2;507(3):371-6.

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

Identification of an allene oxide synthase (*CYP74C*) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below ground organs of potato

Michael Stumpe, Cornelia Göbel, Kirill Demchenko¹, Katharina Pawlowski² and Ivo Feussner

Georg-August-University Göttingen, Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences, Department of Plant Biochemistry, D-37077 Göttingen, Germany

¹Present address: Laboratory of Anatomy and Morphology, Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences 2, Prof. Popov st., 197376, St.-Petersburg, Russia.

²Present address: Department of Botany, Stockholm University, S-10691 Stockholm, Sweden.

Correspondence should be sent to Ivo Feussner: Phone: +49-551-39-5743; Fax: +49-551-39-5749; E-mail: ifeussn@gwdg.de

Running title: 9-AOS from below ground organs of potato

Key words: *Solanum tuberosum*; cytochrome P-450; lipid peroxidation; oxylipin metabolism; sprouting eyes; substrate specificity

The nucleotide sequences reported in this paper has been submitted to the GenBank/EMBL data bank with accession numbers CAD29735, CAD29736, and CAI30876.

SUMMARY

Allene oxide synthase enzymes are members of the cytochrome P-450 enzyme family, subfamily *CYP74*. Here we describe the isolation of three cDNAs encoding AOS from potato (StAOS1-3). Based on sequence comparisons they represent members of either the *CYP74A* (StAOS1 + 2) or the *CYP74C* (StAOS3) subfamily. StAOS3 is distinguished from the other two AOS isoforms from potato by its substrate specificity for 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid whereas 13-hydroperoxides are only poor substrates. The highest activity was shown with (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid (9-HPODE) as a substrate. This hydroperoxide was metabolized *in vitro* to α - and γ -ketols as well as to the cyclopentenone compound 10-oxo-11-

phytoenoic acid. They represent hydrolysis products of the initial StAOS3 product 9,10-epoxyoctadecadienoic acid, an unstable allene oxide. By RNA gel hybridization blot analysis, *StAOS3* was shown to be expressed in sprouting eyes, stolons, tubers and roots, but not in leaves. StAOS3 protein was found in all organs tested, but mainly in stems, stolons, sprouting eyes and tubers. As (*in vivo*) reaction products, the α -ketols derived from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid were only found in roots, tubers and sprouting eyes. Immunolocalization showed that StAOS3 was found exclusively in the envelope of proplastids and young amyloplasts. From these data one may assume a role of StAOS3-derived α -ketols in regulation of plastid development or sugar metabolism.

INTRODUCTION

Oxylipin is a collective term for bioactive compounds synthesized by oxygenation of fatty acids and their metabolites. In plants, C18 fatty acids like linoleic (LA) and α -linolenic acid (LeA) are the main precursors for the formation of such compounds (Blée, 2002). The biosynthesis of oxylipins is catalyzed by a mono- or dioxygenases, like α -dioxygenase or lipoxygenase (LOX) (Blée, 2002). LOXs introduce molecular oxygen at either the C-9 or C-13 position of LA or LeA (Feussner and Wasternack, 2002). The resulting hydroperoxides serve as substrates for at least seven enzyme families, including the members of *CYP74* family of cytochrome P-450: allene oxide synthase (AOS), hydroperoxide lyase (HPL) and divinyl ether synthase (DES) (Howe and Schilmiller, 2002). So far, physiological investigations in this field

have focused on jasmonates and their precursor 12-oxo-10,15-phytodienoic acid (12-OPDA) which are signals in plant stress response and plant development (Wasternack and Hause, 2002). They are derived from conversion of (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-13-hydroperoxy-9,11,15-octadecatrienoic acid (13-HPOTE) by AOS to a short-lived allene oxide (12,13-epoxyoctadecatrienoic acid, 12,13-EOT), which, in turn, is metabolized to by allene oxide cyclase (AOC) to 12-OPDA. Reduction of 12-OPDA by OPDA reductase and three cycles of β -oxidation yield JA (Figure 1). *In vitro*, in the absence of AOC, the allene oxide is hydrolyzed to an α - and a γ -ketol and can undergo a non-enzymatic cyclization (Grechkin and Hamberg, 2000).

The physiological significance of α - and γ -ketols and their quantity *in planta* has not been examined thus far. Several AOS enzymes have been cloned from different plant species. Most of them prefer 13-hydroperoxides as substrates and are involved in JA production. Immunocytochemical analysis in barley revealed the association of AOS with chloroplasts (Maucher *et al.*, 2000) and confirmed the localization of AOS activity within chloroplast in spinach and tomato leaves (Blée and Joyard, 1996; Froehlich *et al.*, 2001).

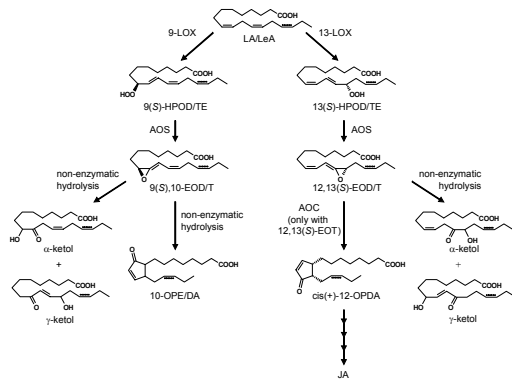


Figure 1. AOS-dependent metabolic route for linoleic (LA; without C-15-double bond) and α -linolenic acid (LeA; with C-15 double bond).

The pathway shows structures of reactions products of the AOS branch of the LOX pathway derived from hydroperoxides either of LA (HPODE) or LeA (HPOTE) in plants.

Knowledge about the 9-LOX pathway and its products is rather limited. Among the *CYP74* family enzymes, only a few prefer 9-hydroperoxides, including DES enzymes from tomato and potato which produce colneleic and colnelenic acid (Itoh and Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001) and the recently cloned AOS3 from tomato (LeAOS3) (Itoh *et al.*, 2002). Concerning the endogenous amounts of 9-*CYP74* products in plants, information about aldehydes ((3*Z*)-nonenal, (3*Z*,6*Z*)-nonadienal) and divinylethers (colneleic and colnelenic acid) is available (Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2002; Göbel *et al.*, 2003), whereas 9-AOS products have not been analyzed to date. It could be demonstrated that different plant organs contain an AOS activity that converts exogenously applied 9-hydroperoxides to α - and γ -ketols, namely corn seeds (Gardner, 1975), tomato roots (Caldelari and Farmer, 1998), tulip bulbs (Grechkin *et al.*, 2000) and stolons, roots and developing tubers from potato (Hamberg, 2000). The analysis of extracts of *Lemna paucicostata* has yielded some hints to the physiological relevance of these compounds, in that heat, drought or osmotic stress induced the production of the α -ketol of 9-HPOTE (Yokoyama *et al.*, 2000). Incubation of this α -ketol with norepinephrin led to the production of compounds with a strong flower-inducing activity in *L. paucicostata*. α -Ketols have also been linked with flower induction in *Pharbitis nil* (Suzuki *et al.*, 2003). In the present report we determined the endogenous

contents of ketols from 9-hydroperoxides in different tissues of potato in comparison with other oxylipins. The identification and characterization of the enzyme capable of producing these oxylipins, StAOS3, is described. The tissue-specific expression of the corresponding gene was examined by RNA gel blot hybridization and RT-PCR, and StAOS3 protein amounts in different organs were determined by Western blot analysis. The subcellular localization of StAOS3 in roots, stolons, tubers and leaves of potato was analyzed using immunocytochemical techniques. The possible physiological function of StAOS3 is discussed.

RESULTS

Identification of new *CYP74* Enzymes in Potato

Genes encoding several *CYP74* enzymes have been cloned from plants. In *Arabidopsis thaliana* two members of this enzyme family were found, a 13-AOS and a 13-HPL. Moreover, in potato two other isoforms have been described to date, a 9-DES and a 13-HPL (Stumpe *et al.*, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2001). In order to understand the complex system of *CYP74* enzymes and the function of oxylipins in potato, we aimed to identify additional *CYP74* enzymes in potato by screening EST databases (www.tigr.org/tdb/lgi). We found a single (TC16330) and two overlapping ESTs (TC95439 and TC95440) that showed similarity to known *CYP74* enzymes. The analysis of the DNA sequences revealed open reading frames which encode a 530 (AOS1), a 509 (AOS2), and a 491 amino acid protein (AOS3) with calculated molecular weights of 59.6, 57.3, and 55.7 kDa, respectively. The amino acid sequences showed the highest similarity (over 90% amino acid identity) with the published LeAOS1 (Sivasankar *et al.*, 2000), LeAOS2 (Howe *et al.*, 2000), and LeAOS3 (Itoh *et al.*, 2002). Because of this homology and the biochemical characteristics (see below), the enzymes were named StAOS1-3 (*Solanum tuberosum* AOS1-3) and classified in the *CYP74A* (StAOS1 and 2) or *CYP74C* subfamily (StAOS3), respectively. The amino acid sequences exhibited the motifs characteristic for *CYP74s*, e.g., the I-helix region which distinguishes the *CYP74s* from other P-450 monooxygenases, and the sequence surrounding the cysteine residue at the C-terminus that binds the heme ligand. As indicated by analysis with the ChloroP program (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP), StAOS3 seemed to lack an amino terminal transit peptide for plastidial import in contrast to StAOS1 and 2.

Functional Expression in *E. coli* and Product Analysis

In order to characterize the biochemical properties of the StAOS proteins, N-terminal truncated cDNAs (StAOS1: - 45 amino acids; StAOS2: - 43 amino acids) or the full-length cDNA were cloned into an expression vector (pQE30) that adds a His₆ tag to the N-terminus of the proteins. During the purification

using metal affinity chromatography, most of the enzyme activity was found in the pellet of the first ultracentrifugation step, indicating that the active enzymes were associated with bacterial membranes. To analyze the substrate specificity, we determined the activity with 9- and 13-HPO(D/T)E, respectively. StAOS1 and 2 degraded only 13-HPO(D/T)E. In case of StAOS3 we observed that all hydroperoxides were degraded. 9-HPODE was the best substrate whereas the activity with 9-HPOTE was only 28 % of that with 9-HPODE. The 13-hydroperoxides were only poor substrates: 13-HPODE showed 9 % and 13-HPOTE 3 %, respectively, of the activity found with 9-HPODE. StAOS1 and 2 turned out to have similar properties like their homologues from tomatoes. Therefore, we decided to focus our analysis on StAOS3. With 9-HPODE as a substrate, the recombinant StAOS3 exhibited a pH optimum of pH 6 to 6.5. To characterize the nature of the products of the enzyme reaction of StAOS3, we used [1-¹⁴C]-9-HPOTE as substrate. The reaction product, eluting at about 7 min, showed the same retention time in the HPLC-chromatograms as the α -ketol synthesized as control by unspecific 9/13-AOS from barley (Maucher *et al.*, 2000). Formation of 9-oxo-nonanoic acid, eluting at about 4 min, the product of a HPL, and colneleic acid (data not shown), the product of a DES, was not observed (Figure 2a).

To characterize the StAOS3 products in more detail and since it was known that allene oxides produced by AOS enzymes are instable and rapidly break down into γ -ketols, α -ketols and cyclic products, we analyzed all products formed from 9- and 13-HPO(D/T)E, respectively, by StAOS3. After purification of the reaction products by HPLC, they were derivatized and subjected to GC/MS. Reaction with 9-HPODE yielded three products (Figure 3a-c): an α -ketol (9-hydroxy-10-oxo-12-octadecenoic acid), a γ -ketol (10-oxo-13-hydroxy-11-octadecenoic acid) and a cyclic product (10-oxo-11-phytoenoic acid; 10-OPEA), that are known to be hydrolysis products of 9,10-EOD, the allene oxide produced from 9-HPODE (Hamberg, 2000). Upon incubation with 9-HPOTE, 13-HPODE and 13-HPOTE, the corresponding α - and γ -ketols and the cyclic compound were formed. Hence, it could be concluded that the isolated cDNA encoded an AOS with a preference for 9-hydroperoxides (9-AOS).

To analyze if 9,10-EO(D/T), the reaction products of StAOS3, serve as substrates for the AOC from potato, we expressed StAOC in *E. coli* and determined the product specificity by calculating the ratio between α -ketol and cyclopentenone, eluting at about 10 min, in the radio-HPLC-chromatogram after incubation together with different AOS enzymes. When StAOC was incubated together with StAOS1 (CAD29735) and [1-¹⁴C]-13-HPOTE mostly 12-OPDA was observed as product (Figure 2b).

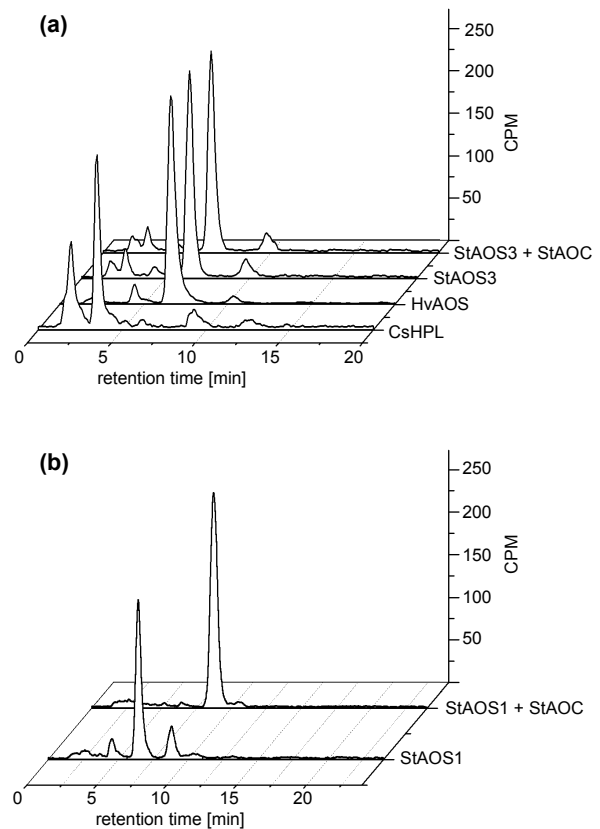


Figure 2. Activity assay for StAOS3.

Recombinant enzymes were incubated with substrates as indicated and products were analyzed by radio-HPLC. (a) StAOS3, or StAOS3 together with StAOC, HvAOS1 (CAB86383) or CsHPL (AAF64041) was incubated with [1-¹⁴C]-9-HPOTE. (b) StAOS1 or StAOS1 together with StAOC was incubated with [1-¹⁴C]-13-HPOTE. The chromatograms show representative results out of three independent experiments.

When 13-HPODE or 9-HPO(D/T)E, respectively, were used together with StAOS1 or StAOS3 in the assay with StAOC, no AOC activity was detectable indicated by the low amount of cyclopentenones formed. This is shown in Figure 2a for StAOS3 together [1-¹⁴C]-9-HPOTE.

Distribution of StAOS3 and StAOS3 Transcripts in Different Organs of Potato

The enzyme activity forming ketols after incubation with 9-HPO(D/T)E was only found in extracts of stolons, roots and developing tubers of potato, not in leaves (Hamberg, 2000). In agreement with these results, all ESTs corresponding to *StAOS3* were identified in cDNA libraries constructed from subterranean organs like roots, tubers or sprouting eyes. To study the expression of *StAOS3* in more detail we used RNA gel blot hybridization analysis to determine the amounts of *StAOS3* mRNA in different potato organs. *StAOS3* transcripts were detected in sprouting eyes, tubers, stolons, and in low amounts in roots, while no transcripts were found in leaves, stems, fruits (data not shown), and flowers (Figure 4a). To detect low amounts of *StAOS3* mRNA,

RT-PCR analysis was performed with gene specific primers using cDNAs from different potato organs as template. In addition, after 35 PCR cycles, *StAOS3* cDNA was amplified from fruits and stems (Figure 4b). After 10 more cycles, weak signals appeared also from cDNA derived from RNA from leaves and flowers (Figure 4b).

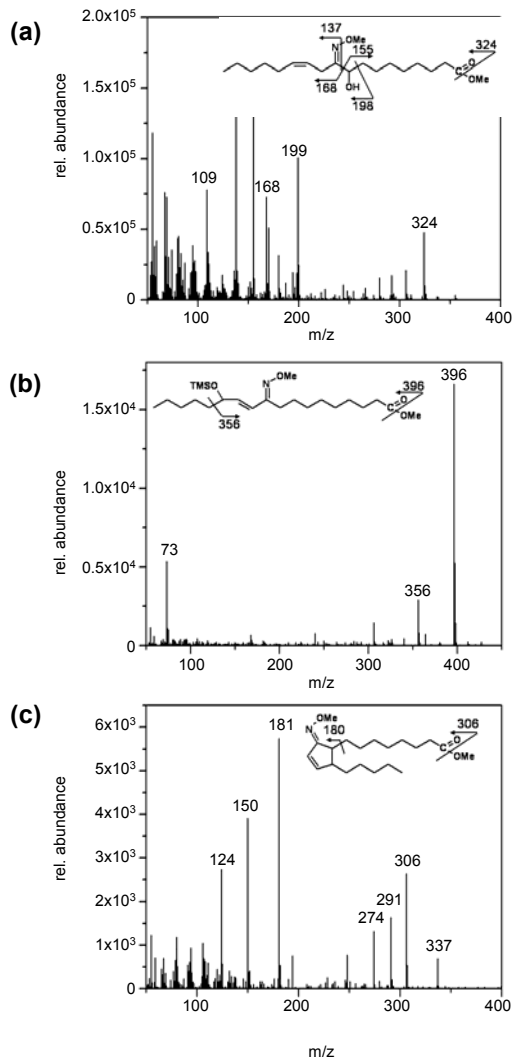


Figure 3. Mass spectra of *StAOS3* reaction products after incubation with 9-HPODE.

StAOS3 reaction products were purified on HPLC, derivatized and analyzed by GC/MS as described. Shown are mass spectra of α -ketol (a), γ -ketol (b) and cyclopentenone (c), the hydrolysis products of 9,10 EOD.

The transcript of another potato *CYP74* enzyme, *StDES*, which was constitutively found in roots, could be induced in leaves by pathogen treatment (Stumpe *et al.*, 2001). RNA gel blot hybridization analysis of *StAOS3* expression in RNA isolated from leaves treated either with *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* or *Phytophthora infestans* led to no detectable signal (data not shown).

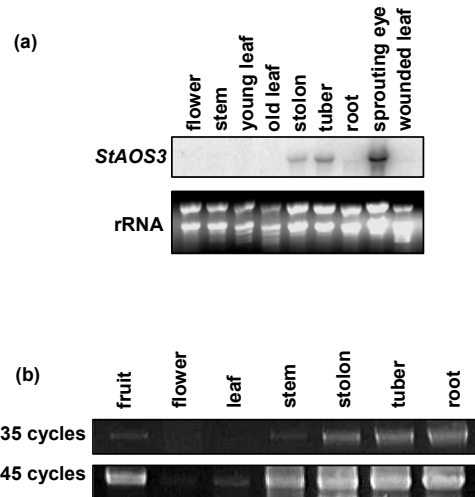


Figure 4. Analysis of transcript appearance of *StAOS3* in different organs.

(a) RNA gel hybridization blot analysis of *StAOS3*. 10 μ g of total RNA from different potato organs were separated on a gel. (b) RT-PCR analysis. 1 μ g total RNA from different organs was reverse transcribed and used as template for PCR. After different numbers of cycles, 10 μ l of the products of the PCR reactions were separated on a gel and stained with ethidium bromide. The figures show results out of three (a) or two (b) independent experiments, respectively.

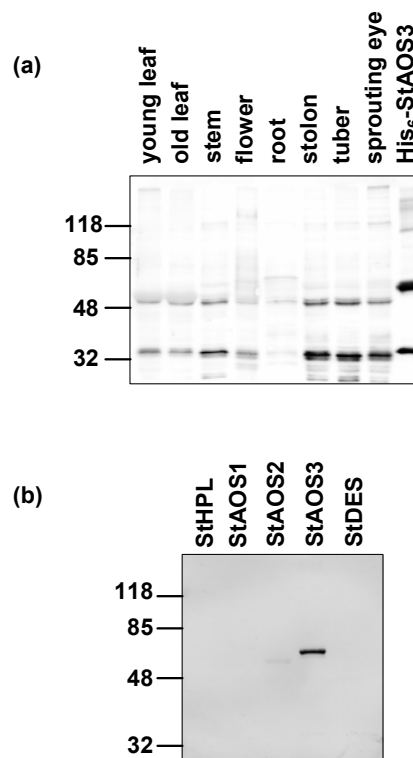


Figure 5. Western blot analysis using affinity purified *StAOS3*-antibody.

(a) Phenolic protein extracts from different organs of potato were separated on a SDS-PA gel and blotted. The following amounts of protein were applied: young and old leaves (100 μ g), flowers (30 μ g), all others (20 μ g). (b) Cross-reaction of *StAOS3*-antibody against other recombinant *CYP74* enzymes from potato: StHPL (CAC44040), StAOS1 (CAD29735), StAOS2 (CAD29736), StAOS3 (CAI30876), StDES (CAC28152). The figures show representative results out of three (a) or two (b) independent experiments, respectively.

In order to examine StAOS3 enzyme amounts in different potato organs, recombinant protein was purified and used to raise a polyclonal antibody to be used in Western blot analyses and immunocytochemistry. Using the antibody on Western blots, StAOS3 protein was detected not only in roots and tubers, but also in flowers and leaves (Figure 5a). However, StAOS3 amounts in leaves were much lower than in the other organs, since in order to detect StAOS3 protein in leaves, protein amounts on the blots had to be increased three times compared to roots, tubers and flowers. To rule out whether the StAOS3 antibody cross-reacted with other recombinant *CYP74* enzymes from potato, specificity was verified by testing the antiserum against the proteins expressed in *E. coli* (Figure 5b).

Detection of Endogenous Oxylipins

At least five *CYP74* enzymes exist in potato: one HPL, three AOS and one DES. They all compete for the hydroperoxides produced by 9- and 13-LOXs. This enzyme diversity within one plant has been found till now only in potato and tomato, and may lead to a huge variety of different oxylipins. The varying pattern of different oxylipins has been recognized before and was named “oxylipin signature” (Weber *et al.*, 1997). To get a first insight into the existing variation of oxylipins, different potato organs were analyzed for their oxylipin signatures. The preferential occurrence of specific oxylipins in distinct organs may give first hints on organ specific functions of the different oxylipins as well as on the different enzymes involved their synthesis.

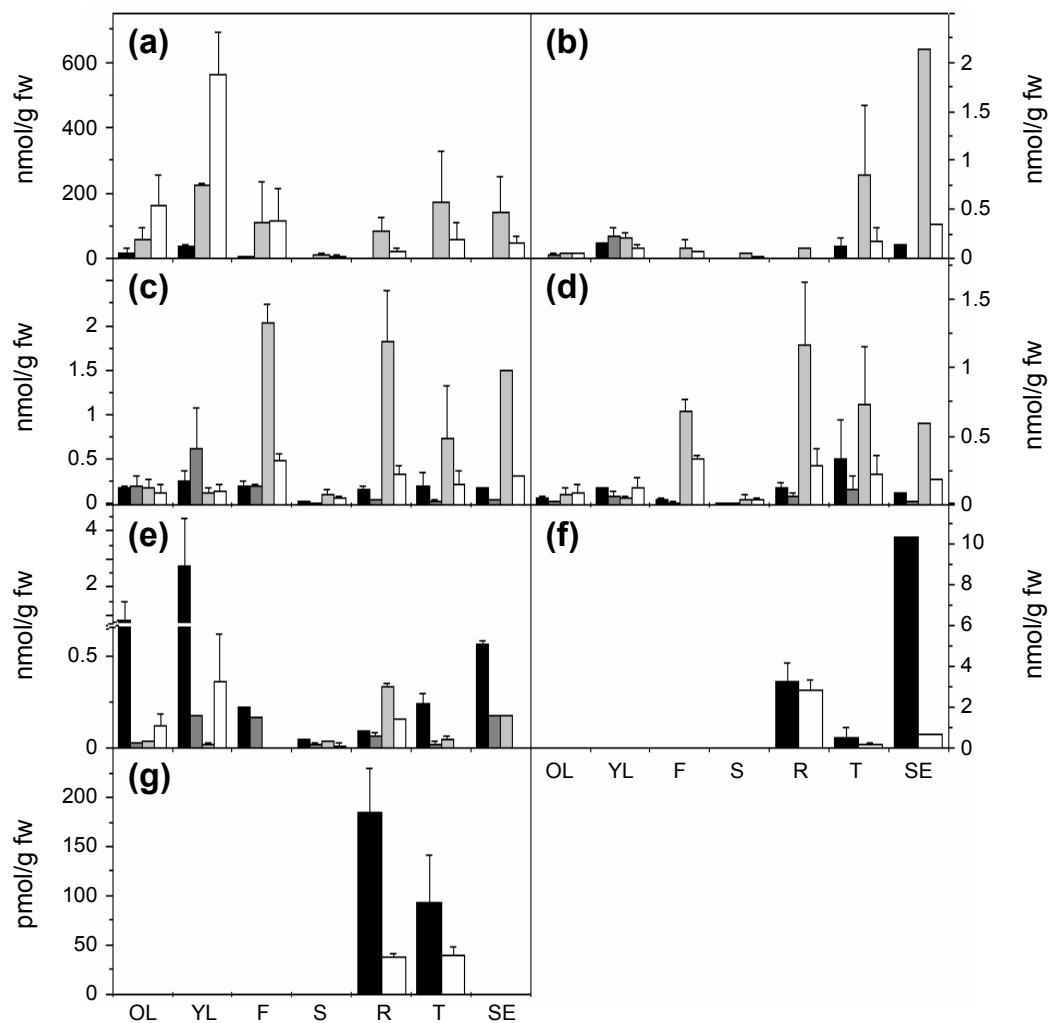


Figure 6. Oxylipin profiling of different potato organs.

Oxylipins were extracted from different potato organs and quantified as described under Materials and Methods. (a) Free fatty acids: black, roughanic acid; grey, linoleic acid; white, α -linolenic acid; (b) LOX pathway products: black, 13-HPODE; dark grey, 13-HPOTE; light grey, 9-HPODE; white, 9-HPOTE; (c) Reductase pathway products: black, 13-HODE; dark grey, 13-HOTE; light grey, 9-HODE; white, 9-HOTE; (d) Keto fatty acids: black, 13-KODE; dark grey, 13-KOTE; light grey, 9-KODE; white, 9-KOTE; (e) 13-AOS pathway products: black, 12-OPDA; dark grey, JA; light grey, α -ketol derived from 13-HPODE; white, α -ketol derived from 13-HPOTE; (f) 9-AOS pathway products: black, α -ketol derived from 9-HPODE; white, α -ketol derived from 9-HPOTE; (g) DES pathway products: black, colnelenic acid; white, colneleic acid. OL, old leaves; YL, young leaves; F, flowers; S, stems; R, roots; T, tubers; SE, sprouting eyes. The figures show representative results out of two independent experiments.

The precursors of LOX-derived hydroperoxides in solanaceous plants are roughanic acid, LA and LeA. The amount of free roughanic acid was around or below the detection limit in all below ground organs (< 0.5 nmol/g fw) while in above ground organs it varied between 0.4 and 40 nmol/g fw, being highest in young leaves (Figure 6a). Furthermore, none of its LOX-derived metabolites was detectable. Only in subterranean organs like roots or tubers LA was the main free fatty acid (87 - 175 nmol/g fw) although its absolute amount was always in the same range except in stems (11 nmol/g fw). However, in green organs like leaves, LeA occurred predominantly (113 - 563 nmol/g fw, Figure 6a). LA and LeA may be converted to 13- or 9-HPO(D/T)E which are highly reactive compounds. In all potato organs their levels were slightly above the detection limit between 0.05 and 0.15 nmol/g fw except for 9-HPODE in tubers and sprouting eyes (0.85 and 2.13 nmol/g fw; Figure 6b). In leaves mainly oxylipins derived from 13-HPOTE, namely JA (0.17 nmol/g fw), OPDA (2.77 nmol/g fw) and its α -ketol (0.36 nmol/g fw), products of the AOS branch, and 13-HOTE (0.62 nmol/g fw), product of the reductase branch, were found (Figure 6c,e). In subterranean organs these compounds were found only in small amounts (below 0.5 nmol/g fw). Oxylipins derived from 13-HPODE could be detected only in leaves in minor amounts: 13-HODE and α -ketol both with 0.25 nmol/g fw (Figure 6c,e). 9-HPO(D/T)E and their metabolites were mainly detected in subterranean organs and flowers. In roots and tubers the main products from 9-HPO(D/T)E were divinyl ether (CA: 184 and 93 pmol/g fw, CnA: around 37 pmol/g fw; Figure 6g), α -ketols (between 0.2 and 3 nmol/g fw, in comparable amounts as the 13-AOS products in leaves; Figure 6f), hydroxides and keto fatty acids (both 0.1 to 1.2 nmol/g fw; Figure 6c,d) whereas in flowers only the reductase products and keto fatty acids were observed in the same range as in subterranean organs (Figure 6c-g). The highest amount of an α -ketol found in potatoes was detected in sprouting eyes and it was derived from 9-HPODE (10.3 nmol/g fw; Figure 6b). This was the highest amount of a detected oxylipin in all experiments which might be due the fact that no formation of divinyl ethers was observed in sprouting eyes.

Subcellular Localization of StAOS3

So far, all published data about the subcellular localization of AOS forms and AOS activity showed an association with chloroplast envelopes (Blée and Joyard, 1996; Maucher *et al.*, 2000; Froehlich *et al.*, 2001). This is in agreement with amino acid sequence data indicating that nearly all AOS proteins contain a putative chloroplast transit peptide. Also the two AOS

enzymes from barley that do not contain a transit peptide could be shown to occur preferentially, though not exclusively, in chloroplasts (Maucher *et al.*, 2000). Using the StAOS3 antibody for immunolocalization of StAOS3 in sections from roots, stolons, tubers and leaves from potato, a specific signal was detected in amyloplasts and proplastids from the subterranean organs, but not in mesophyll chloroplasts (Figure 7). In all cases, the signal was restricted to the periphery of the plastids, presumably to the envelope. In roots, StAOS3 signal was detected at the periphery of cortical amyloplasts and in small organelles, presumably proplastids, in the stelar parenchyma (Figure 7a-d). Similarly, in stolons, StAOS3 signal was restricted to amyloplasts in the cortical cells and to putative proplastids in the stelar parenchyma (Figure 7e-j). Amyloplasts in the tuber parenchyma were labelled (Figure 7k-p), but no signal was found in the cells of the vascular system of tubers. In leaves, no signal was found in epidermis, mesophyll or minor veins (Figure 7q-v), but some small organelles, presumably proplastids, were labelled in the phloem parenchyma of major veins (Figure 7u,v). Hence, StAOS3 was found in amyloplasts and in proplastids in the stelar parenchyma, but never in chloroplasts.

Subcellular Localization of LOXs

The substrates of *CYP74* enzymes are produced by LOXs which may either occur in the cytosol (9-LOXs) or in plastids (13-LOXs) (Feussner and Wasternack, 2002). In order to see whether LOXs are present in the plastids labelled by the StAOS3 antibody, LOX immunolocalization was performed using an antibody raised against lipid body LOX isolated from cucumber seedlings which had been shown to recognize interspecifically cytosolic and plastidic LOX and not to distinguish between 9-LOXs and 13-LOXs or membrane-bound and soluble isoforms (Feussner *et al.*, 1995; Hause *et al.*, 2000). In roots, stolons, tubers and leaves, LOX-specific labelling was restricted to the cytoplasm; no signal could be detected in plastids (Figure 8). Furthermore, in roots, stolons and tubers, LOX-specific labelling was only found in the cortex, not in the vascular system. In leaves, LOX-specific signal was found in the vascular parenchyma in major veins and in the sieve element in minor veins (Figure 8m-p). These results may indicate that in all tissues analyzed cytosolic 9-LOXs were the predominant LOX forms and label was found almost in the same cells as StAOS3 most likely providing this AOS with its substrate. Plastidic 13-LOXs were either not detected by the antibody used here or their protein amount was below the detection limit.

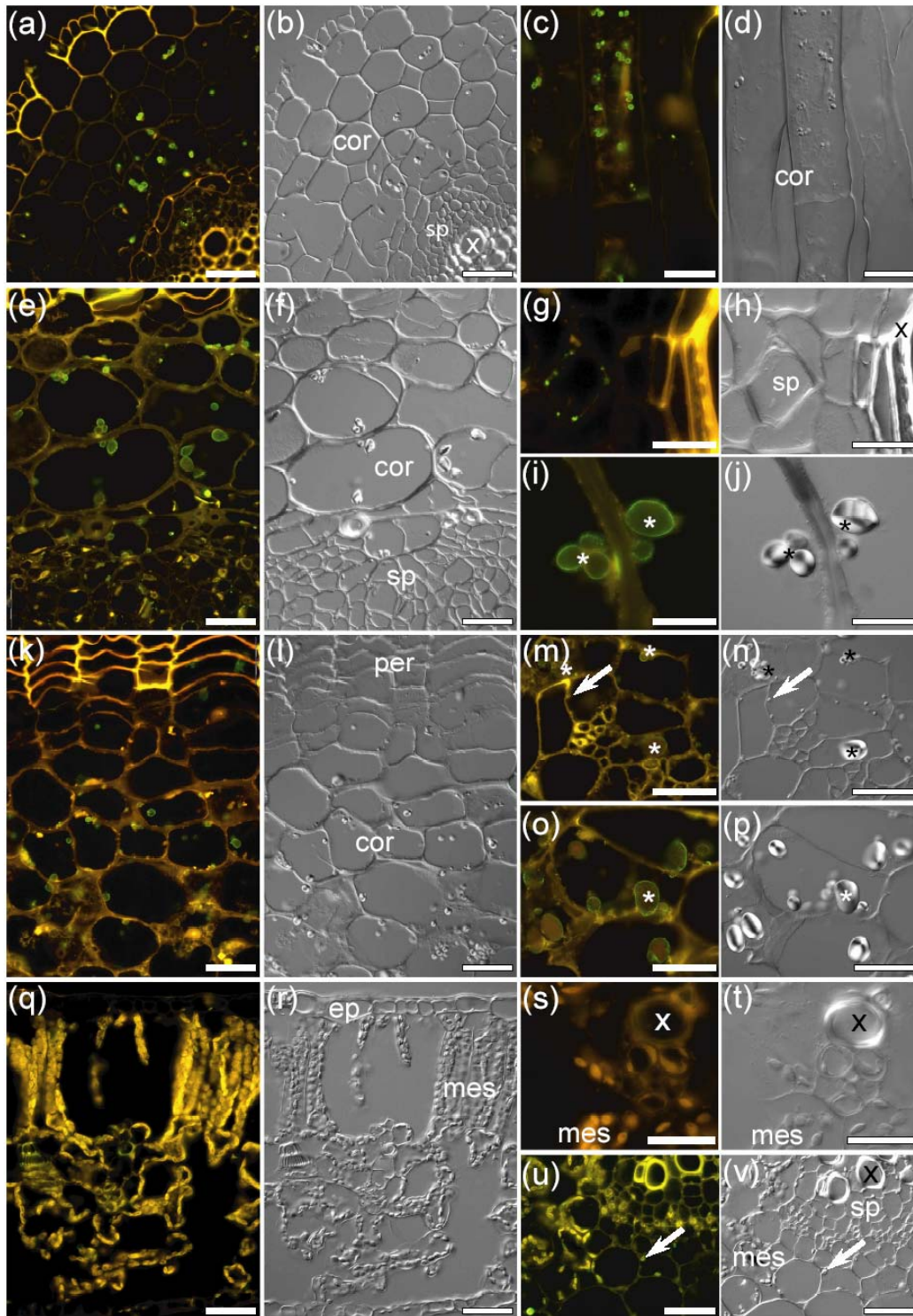


Figure 7. Immunolocalization of StAOS3 protein in different organs of *S. tuberosum*. (a) - (d), root; (e) - (j), stolon; (k) - (p), tuber; (q) - (v), leaf. For each view, the first picture was taken under epifluorescence (green colour, FITC labelling; yellow colour, autofluorescence), the second one using differential interference contrast. (a) and (b), root cross sections. Amyloplasts in the root cortex and plastids in the stelar parenchyma are labelled. (c) and (d), detail of a longitudinal section through the root cortex cells. (e) and (f), stolon cross section. Amyloplasts in the cortex and plastids in the stelar parenchyma are labelled. (g) and (h), detail of a cross section through the stolon vascular system. Labelled plastids can be seen in the stelar parenchyma cell. (i) and (j), detail of the cortex. AOS protein is localized only in the envelope of amyloplasts (asterisk). (k) and (l), cross section through the outer part of a tuber, the tuber periderm is visible in the upper part. All amyloplasts in the tuber parenchyma are labelled. (m) and (n), no labelled plastids were found in the tuber vascular system. The arrow points at an unlabeled plastid. Amyloplasts in adjacent cells of the tuber parenchyma show labelling (asterisk). (o) and (p), detail of the tuber parenchyma where labelling is restricted to the amyloplast envelopes (asterisk). (q) and (r), leaf cross section. No labelling is visible either in the epidermis or the mesophyll. (s) and (t), cross section of a leaf minor vein. No labelling is visible. (u) and (v), detail of a cross section of a leaf major vein. Labelled plastids can be seen in the stelar parenchyma (arrow). Scale bars = 50 μ m (a, b, e, f, k, l, q, r, u, v) and 20 μ m (c, d, g, h, i, j, m, n, o, p, s, t), respectively. Cor, cortex; ep, epidermis; mes, mesophyll; per, periderm; sp, stelar parenchyma; x, xylem.

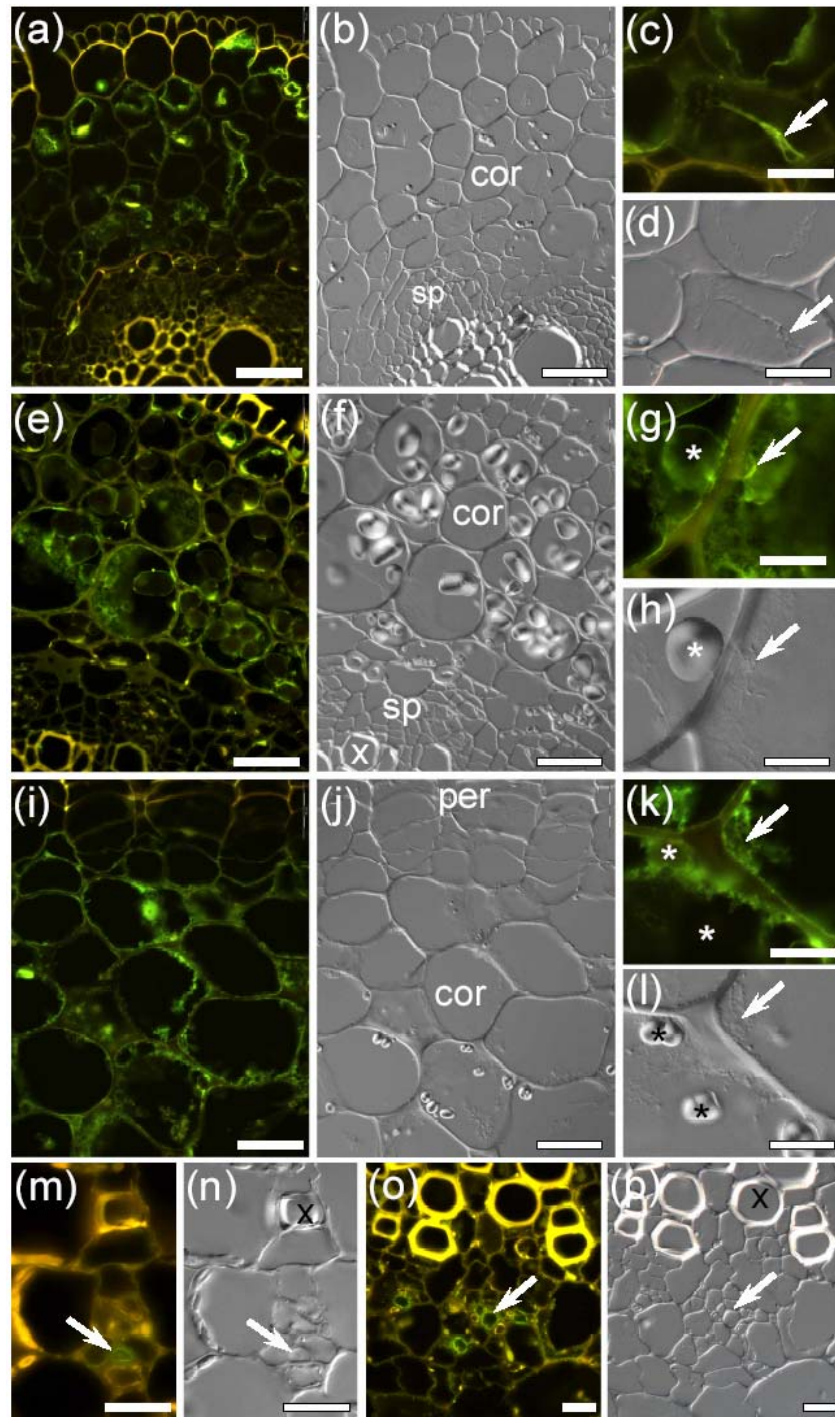


Figure 8. Immunolocalization of LOX protein in different organs of *S. tuberosum*. (a) - (d), root; (e) - (h), stolon; (i) - (l), tuber; (m) - (p), leaf. For each view, the first photograph was taken under epifluorescence (green colour, FITC labelling; yellow colour, autofluorescence), the second one using differential interference contrast. (a) and (b), root cross section. Labelling denoting the presence of LOX protein is found in the cortex, but neither in the stelar parenchyma nor in the epidermis. (c) and (d), a close-up of the root cortex shows that labelling is confined to the cytosol (arrow). (e) and (f), stolon cross section. LOX protein is found in the cortex, but neither in the stelar parenchyma nor in the periderm. (g) and (h), close-up of the cortex. LOX protein is confined to the cytosol (arrow), no labelling is seen in the amyloplasts (asterisk). (i) and (j), cross section through the outer part of a tuber, the periderm is visible at the top of the picture. LOX protein is detected in the cells of the tuber parenchyma. (k) and (l), close-up shows that LOX protein is confined to the cytosol (arrow), no labelling is seen in the amyloplasts (asterisks). (m) and (n), cross section through a leaf minor vein. The phloem sieve element contains LOX protein (arrow). (o) and (p), cross section through a leaf major vein. LOX protein is detected in several phloem elements on cell periphery (arrow). Scale bars = 50 μm (a, b, e, f, i, j) and 20 μm (c, d, g, h, k, l, m, n, o, p), respectively. For abbreviations see legend of Figure 7. (words: 3,195)

DISCUSSION

Among the numerous enzymes from the LOX pathway identified so far, AOS enzymes form the most abundant family until now (Feussner and Wasternack, 2002). This is most likely due to the fact that they catalyze a major metabolic reaction towards the formation of the phytohormone jasmonic acid (Schaller, 2001). In general, *CYP74s* are members of an atypical family of P450 monooxygenases and constitute of at least three different enzyme subfamilies: AOS, HPL, and DES. They do not require molecular oxygen nor NAD(P)H-dependent cytochrome P450-reductase (Noordermeer *et al.*, 2001). The new carbon-oxygen bonds are formed by using an acyl hydroperoxide both as the substrate and the oxygen donor. A common mechanistic feature of the AOS, HPL, and DES reactions is the intermediate epoxy allylic carbocation formed from the acyl hydroperoxide (Feussner and Wasternack, 2002). AOS and DES may deprotonate the carbocation at different positions leading to stable derivatives, whereas HPLs may catalyze a rearrangement of the positive charge leading to a fragmentation of the molecule into two aldehydes. The AOS from flax was the first member of the *CYP74* family to be cloned. Therefore, the amino acid sequenced encoded by this AOS-cDNA was grouped as *CYP74A*. Recent isolation and characterization of more than 20 different AOS-encoding cDNAs revealed different substrate specificities. Within this subfamily most enzymes are specific for (13*S*)-hydroperoxides as substrates and are therefore termed 13-AOS (Figure 1). In contrast, enzymes from barley and rice show no substrate specificity for either (9*S*)-hydroperoxides or (13*S*)-hydroperoxides, respectively, and are therefore called 9/13-AOS (Maucher *et al.*, 2000). cDNAs coding for 9-AOS have been isolated recently from tomato (Feussner and Wasternack, 2002; Itoh *et al.*, 2002) and potato (this paper). They group into the subfamily of 9/13-HPLs (*CYP74C*) due to their high sequence similarity towards these enzymes.

Here we describe the isolation of three *CYP74* from potato. Analyses of reaction products revealed that all three are AOS (Figure 2). StAOS1 and 2 showed the highest similarities to the two 13-AOS from tomato (Howe *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000). The third AOS, named StAOS3, showed the highest similarity to the recently isolated LeAOS3 (Itoh *et al.*, 2002). The deduced amino acid sequences of both enzymes were more related to the 9/13-HPL from cucumber and melon than to the other 13-AOS enzymes, so that Solanacean AOS3, LeAOS3 and StAOS3, may be classified into the *CYP74C* subfamily. Since the first enzymes had been characterized in detail in tomato we decided to focus the analysis on the third enzyme. StAOS3 and LeAOS3 shared some biochemical and molecular properties. They converted 9- and 13-HPO(D/T)E into allene oxides which were hydrolyzed into α - and γ -ketol as well as in cyclopentenones (shown for 9-HPODE in Figure 3). The highest activity was observed using 9-HPODE as substrate, followed by 9-HPOTE; 13-HPOTE and 13-HPODE,

but the last three were only poor substrates. Furthermore it was shown for protein extracts of potato that there is an AOC activity which is highly specific for 12,13-EOT and can not act on 9,10-EO(D/T) (Hamberg, 2000). We confirmed this substrate specificity by using recombinant StAOS3 in a combined AOS/AOC assay (Figure 2). Together these data clearly show that the StAOS3-derived allene oxides 9,10-EO(D/T) are not metabolized via the AOC branch of the pathway.

RNA gel blot hybridization revealed that *StAOS3* transcript occurs mainly in subterranean organs like stolon, tuber, roots and sprouting eyes (Figure 4a). This correlates with the exclusive finding of *StAOS3* ESTs in cDNA libraries made from these organs and of 9-AOS activity in the same organs (Hamberg, 2000). In addition, *LeAOS3* transcripts were exclusively found in roots (Itoh *et al.*, 2002). However, using RT-PCR we could also observe transcript of *StAOS3* in all other organs examined (Figure 4b). These findings were supported by Western blot analysis where StAOS3 protein was detectable in all organs, at least when three fold higher protein amounts were used for the above ground organs (Figure 5). This preferential distribution of the protein in below ground organs was furthermore confirmed in the immunocytochemical investigations: in subterranean organs we found many plastids containing StAOS3 protein, whereas in leaves only few plastids were labelled (Figure 7a-p vs. q-v).

To gain further insight into tissues where StAOS3 might be active, we analyzed the amount of all isomeric forms of AOS-derived ketols in plant tissues. We observed a 5-fold higher level of α -ketols derived from 9-HPODE in sprouting eyes in comparison to all other oxylipins (Figure 6f). In tubers and roots, the quantity of α -ketols was in the same range as that of other 9-LOX-derived oxylipins. In addition products, of the 9-DES branch of the oxylipin pathway were also detected in roots and tubers (Figure 6g). Altogether, in tissues where LA was dominating, most oxylipins were derived from this fatty acid, except for α -ketols for which the amounts of oxylipins derived from LA and LeA were nearly the same. In above ground organs the 13-AOS branch seemed to be the dominant one and most oxylipins derived from LeA which was the major free fatty acid in these tissues. The predominant oxylipin was OPDA, followed by JA and the α -ketols derived from 13-HPO(D/T)E (Figure 6e). The ratio of OPDA to α -ketol was here clearly in favour of OPDA, whereas both substances accumulated to similar levels in *Arabidopsis* leaves (Theodoulou *et al.*, 2005).

The data presented in this manuscript show for the first time the localization of a member of the *CYP74* enzyme family that metabolizes nearly exclusively HPO(D/T)Es derived from cytosolic 9-LOXs. The data indicate that *StAOS3* is expressed in the cortex and in the vascular phloem parenchyma of roots and stolons (Figure 7a, e), and in the peripheral parenchyma of the tuber (Figure 7k). StAOS3 protein

was also found in the phloem parenchyma of major veins of leaves (Figure 7q). Most interestingly, the protein localizes only to a subset of plastids, specifically, to amyloplasts and to non-differentiated plastids in the stellar parenchyma (Figure 7c, i, o). The lack of a signal peptide for plastidic targeting may indicate that StAOS3 is not present in the inner envelope or in the stroma. In combination with the fact that in immunocytochemical experiments, labelling was always confined to the periphery of plastids, these data may indicate that StAOS3 is associated with the outer envelope. On the other hand it has been shown for a 13-AOS from tomato (LeAOS1) that it has a plastidic transit peptide that targets the protein to the inner envelope (Froehlich *et al.*, 2001).

The substrates of StAOS3 have to be provided by cytosolic 9-LOX enzymes, since no plastidic 9-LOX has been identified up to now (Feussner and Wasternack, 2002). The observation that a LOX antibody able to recognize preferentially cytosolic 9- and 13-LOXs (Hause *et al.*, 2000) interspecifically only labelled the cytoplasm, not any StAOS3-containing plastids, may indicate that the dominating LOX species in these plants are found in the cytosol. Most likely they produce the substrates for StAOS3. Furthermore, no LOX-specific signal was found in the stellar parenchyma of roots and stolons where StAOS3 was detected in putative proplastids. Here one may assume that either the amount of the corresponding 9-LOX was below the detection limit or that the fatty acid hydroperoxides may pass membranes and enter the neighbouring cells. The later assumption may be supported by the fact that fatty acid hydroperoxides are relatively stable as demonstrated before when they had been supplied exogenously to tomato leaves and a metabolite, JA, was detected within the leaf tissue (Farmer and Ryan, 1992). Hence, it is possible that hydroperoxides diffuse over several cell layers from the root/stolon cortex to the phloem parenchyma cells. Here we show that at least under our conditions only the StAOS3-derived α -ketols were detectable in potato organs. We assume that the detected α -ketols are the final product in this 9-AOS-derived pathway, although under *in vitro* conditions, the formation of the corresponding cyclopentanoic derivatives had been observed (Hamberg, 2000). Our assumption was supported by the fact that StAOC was not able to metabolize 9,10 EO(D/T), the direct reaction product of StAOS3. Furthermore, both enzymes may have different subcellular localizations: StAOS3 should reside in the outer envelope and StAOC in the stroma. Thus it is very unlikely that its substrate, the allene oxide, with a life time of a few seconds can pass the inner envelope of plastids. It is tempting to assume that the 9-AOS-derived α -ketols may have a certain function in below ground organs, because of their high amount in roots and sprouting eyes. Knowing from other oxylipins which play a role in defence reactions and developmental processes, we may speculate about a similar function of these α -ketols. The 9-LOX pathway in potato leaves is induced upon treatment

with *P. infestans* and *P. syringae* (Göbel *et al.*, 2002). Also the 9-DES which occurred constitutively in roots could be induced in leaves upon such treatments (Stumpe *et al.*, 2001). We tested this for the StAOS3 transcripts but could not find any accumulation. Nevertheless it is possible that the α -ketols have a function in resistance to soil-borne pathogens. Hints for that are the important role of JA signalling in *Arabidopsis* in such interactions and the fact that the LeAOS3 is inducible by JA in roots in tomato (Itoh *et al.*, 2002).

The influence of 9-LOX-derived oxylipins on plant development was shown in potato and *L. paucicostata* (Kolomiets *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2001). The α -ketol derived from 9-HPOTE induces flowering in *L. paucicostata*, but the fact that StAOS3 and their products were only found at detectable levels in subterranean organs when flowering in potato is far from being induced, excludes this function. Another role for StAOS3 might be related to plastid development or sugar metabolism, since the protein is exclusively found in a subset of plastids, specifically, in amyloplasts and in non-differentiated plastids in the stellar parenchyma. This assumption might be supported by the observation that transgenic potato with a decreased level of 9-LOX showed an abnormal tuber development (Kolomiets *et al.*, 2001).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Basic molecular biological and biochemical techniques were performed as described (Ausubel *et al.*, 1993).

Plants Material and Growth Conditions

Potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) were grown in a greenhouse under 12 h of supplemented artificial light of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at about 26 °C and 12 h of dark at about 18 °C. Young leaves mean leaves from the first two stages, old leaves mean leaves from stage 6 and 7 (partial beginning senescent). In metabolic profiling experiments sprouting eyes are a mixture of small sprouting eyes and up to 3 cm shoots without roots grown in the dark at about 22 °C. Tubers are a ground mixture of whole small developing tubers (up to 4 cm in diameter).

Isolation, Expression and Purification of Recombinant Enzymes

Because of the high similarity between *CYP74* from potato and tomato we expected also AOS proteins homologous to LeAOS1 (CAB88032) and LeAOS2 (AAF67141). Using these tomato sequences we searched in potato databases and found a contig with over 90 % similarity to LeAOS2 (TC16330). Based on this sequence information, primers were designed for heterologous expression in *E. coli* (StAOS2a: 5'-CCA ACA ATC GTG GTA GCA TGC CCT AC-3'; StAOS2b: 5'-CGA TCT CGA CCT CGA TCT GCA GTT AAG-3'). For StAOS1 expression we used primer based on the LeAOS1 sequence (StAOS1a: 5'-

GCT TCA GTG TCT GAG CTC CCG C-3'; StAOS1b: 5'-TCC TTA ATT AAG CCA GGT CGA CTC AAA AAC-3'). In both cases proteins were expressed without the chloroplastidic transit peptide according to LeAOS1 (Sivasankar *et al.*, 2000) and LeAOS2 (Howe *et al.*, 2000).

The coding sequence of AOS3 from potato (StAOS3) was obtained from contigs TC95439 and TC95440 from the TIGR Potato Gene Index. The first contig contained an ATG start codon which correlates with the start of the AOS3 open reading frame from tomato (Itoh *et al.*, 2002), the other contig contained the 3' terminus. From this sequence information we deduced an upstream (5'-GAG CTC ATG GCT AAT ACC AAA GAC TCA TAC CAC-3') and a downstream (5'-CTG CAG TCA TGA TGT TGC TTT AGT TAA TGA CTT AAA AG-3') primer. Using this pair of primers the full-length cDNA was amplified from a cDNA library made of elicited potato (Göbel *et al.*, 2001). The underlined sequences represent *SacI* and *PstI* restriction sites which were used to clone the StAOS3 open reading frame in-frame into a pQE30 expression vector (Qiagen), which allowed the production of the StAOS3 protein with an N-terminal His₆ tag.

In order to express potato *AOC* (*StAOC*), primers were designed based on sequence information obtained from contig TC127765 (TIGR Potato Gene Index). Both the whole coding region and a 5'-deletion starting at nucleotide 202 of the coding sequence were amplified by PCR with a 5' *SphI* and a 3' *SalI* restriction site, respectively, and cloned into pQE30 expression vector.

For expression, the resulting plasmids were transformed into the *E. coli* strain SG13009 pREP4. The bacteria were grown at 37 °C to an OD₆₀₀ of 0.6 to 0.8, induced by 1 mM IPTG and cultivated for 24 h at 16 °C. Purification of recombinant enzyme was performed as described previously (Stumpe *et al.*, 2001). Antisera were prepared in rabbits that were primed and boosted three times during an 8 week period by intradermal injections of Freud's Adjuvant (Gibco BRL) mixture and an antigen solution containing 0.5-1.0 mg of purified StAOS3.

Product Analysis of Recombinant StAOS3 and StAOC

Fatty acid hydroperoxides (HPO(D/T)E) were prepared by incubation of the corresponding fatty acid either with soybean 13-LOX (Sigma, Germany) or with recombinant potato tuber LOX (Geerts *et al.*, 1994) to obtain the 9-hydroperoxides. Fatty acids were obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) and authentic ketols were purchased from Larodan (Valmö, Sweden). The activity of the StAOS3 was determined spectrophotometrically by measuring the decrease in absorbance at 234 nm. For product analysis, affinity-purified recombinant StAOS3 (10 µg), dissolved in 2 ml 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, was incubated with 100 nM [1-¹⁴C]-9-HPODE for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 40 µl of glacial

acetic acid and extracted with methanol/chloroform (Bligh and Dyer, 1959). The organic phase was evaporated under a stream of nitrogen and reaction products were reconstituted in HPLC solvent. HPLC analysis was performed as described (Blée and Joyard, 1996). For further product analysis non-labelled HPO(D/T)E were incubated with StAOS3 and the reaction products, whose retention times were known from the radio-HPLC, were purified by HPLC. The purified reaction products were methylated and derivatized over night at room temperature by resolving in 500 µl pyridine containing 2 % methoxyamin (Sigma). The solution was dried under nitrogen stream and extracted twice with n-hexane. For analysis of the γ -ketol, it was derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma) and subjected to GC/MS. The GC/MS analysis was performed as described (Stumpe *et al.*, 2001). To determine AOC activity, recombinant StAOC was incubated with [1-¹⁴C]-labelled HPO(D/T)E together with recombinant AOS. The extraction and HPLC analysis were performed as described above.

Protein Extraction and Western Blot Analyses

For purification of the polyclonal StAOS3 antibody, his-tag-purified StAOS3 (3 mg) was immobilized using CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Bioscience). Binding, washing and elution of the StAOS3 antibody was performed using standard protocols.

Proteins of different tissues were extracted using the phenol method (Vörös *et al.*, 1998). Concentrations were estimated using protocol according to Esen (Esen, 1978). Proteins were boiled in SDS loading buffer and loaded onto a denaturing 10 % (w/v) SDS-PA gel (Laemmli, 1970). After protein separation, the gel was blotted onto a nitrocellulose membrane (Sartorius, Göttingen, Germany) using the Trans-Blot system from Bio-Rad (Munich, Germany). After blocking with 3 % milk powder, membranes were incubated with antibodies according to a standard protocol. Primary antibodies were diluted 1:500. Using secondary antibody (goat anti-rabbit) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO), immunodetection was carried out using chromogenic substrates BCIP/NBT.

RNA Isolation, RNA Gel Blot Hybridization and RT-PCR Analyses

Total plant RNA from different tissues was isolated with Trizol (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The RNA was denaturised using glyoxal/DMSO, separated on a phosphate gel and blotted to a nylon plus membrane (Roth, Karlsruhe, Germany) using the Turboblotter System (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). To obtain a probe for StAOS3, pQE30-StAOS3 was used as template in a PCR reaction containing gene specific primers (see above). The PCR product was purified and labelled with ³²P using the HexaLabel DNA Labelling Kit (MBI, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Blots were pre-hybridized,

hybridized and washed at 65 °C according to standard protocols.

For RT-PCR analysis, cDNAs from different plant organs were synthesized from 1 µg of DNase-treated RNA using M-MLV RT (Promega, Madison, WI) and a dT₂₀ primer. 1/10 volume of the RT reaction was used as template per PCR reaction with gene specific primers (see above). After different numbers of PCR cycles, 10 µl of each reaction were separated on an agarose gel.

Metabolic Profiling of Oxylipins in Different Potato Tissues

Extraction and HPLC analysis were performed as described previously (Göbel *et al.*, 2003) with some additions to analyze free ketols, the products of 9-AOS activity. 500 ng D5-labelled α -ketol of 13-HPOTE was used as internal standard. During the first RP-HPLC, the γ - and α - ketols and the cyclic products could be separated. In the following SP-HPLC it was possible to separate the AOS products derived from 9- or 13-hydroperoxides.

Each fraction was dried and resolved in 200 µl of methanol. To each sample 50 ng of 13-KODE was added as internal standard for the next reactions. The keto-group was derivatized by adding 200 µl 50 mM O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (OPFB, Sigma) in 1.5 M sodium acetate, pH 4.5. After incubation for 5 min, the mixture was extracted twice with 1 ml of n-hexane. The combined organic phases were dried under a stream of nitrogen and derivatized with pentafluorobenzyl bromide. GC/MS analysis was performed according to (Göbel *et al.*, 2003).

Immunocytochemistry

Plant organs were cut in pieces of 2 – 5 mm length and were vacuum-infiltrated with fixative (4 % (w/v) paraformaldehyde in PBS: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄; pH 7.4) for 30 min. The fixation was performed at 4 °C for 12 h. After three washes for 20 min each in PBS the specimens were dehydrated in a graded ethanol series (20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 97, 100 % ethanol), each step for 40 min. Embedding in Steedman's wax (Vitha *et al.*, 1997) was done first for 1 h in 100 % ethanol, then in a graded wax/ethanol series (10, 20, 35, 50, 65, and 80 % v/v wax) at 37 – 40 °C followed by three changes of pure wax, each for 1 – 2 h. Ribbons of 8 µm thick sections were placed on silanized slides coated with egg white and stretched by addition of a small drop of distilled water to one end of the ribbon. The excess water was soaked away from the opposite end of the ribbon by filter paper. Slides were allowed to dry overnight at room temperature. After dewaxing three times for 15 min in ethanol and rehydration (70 %, 40 % ethanol, each step for 10 min), the sections were finally left for 30 min in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4). Sections were pre incubated for 50 min with 1 % (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS. For detection of StAOS3, sections were incubated with the antibody described above diluted 1:50 in TBS

containing 1 % (w/v) BSA. For detection of LOX protein, sections were incubated with a rabbit antibody raised against cucumber lipid body LOX (Feussner *et al.*, 1995) diluted 1:1000 in TBS. Incubations were performed in a moist chamber for over night at 4 °C. Slides were then washed three times for 20 min in TBS with 1 % BSA and incubated for 2 h at room temperature in darkness with the secondary antibody, goat anti-rabbit IgG-FITC conjugate (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:100 in TBS with 1 % BSA. Afterwards, slides were washed twice for 20 min in TBS. In negative controls, the primary antibody was omitted. Sections were then stained for 10 min in 0.01 % w/v Toluidine blue dissolved in TBS to suppress the autofluorescence of the cell walls. After washing for 10 min in TBS, the sections were mounted under a coverslip using the ProLong Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, OR). Fluorescence was examined with an Olympus BX51 microscope equipped with a SIS ColorView II digital camera and analySIS® image-analytical software (Olympus BioSystems GmbH, Hamburg, Germany).

ACKNOWLEDGEMENTS. The technical assistance of A. Nickel and P. Meyer is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr. R. Manteuffel (Gatersleben) for the generation of the StAOS3 antiserum and Drs. G. Rothe and S. Rosahl (Halle) for providing us with pathogen infected potato leaves. We thank Dr. S. Rosahl (Halle) for critical reading of the manuscript. The work was financed by grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to I.F. (Fe 446/1).

REFERENCES

- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, D.D., Seidmann, J.R., Smith, J.A. and Struhl, K. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology* New York: Green Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc.
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, **7**, 315-322.
- Blée, E. and Joyard, J. (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.*, **110**, 445-454.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Caldelari, D. and Farmer, E.E. (1998) A rapid assay for the coupled cell free generation of oxylipins. *Phytochemistry*, **47**, 599-604.
- Esen, A. (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.*, **89**, 264-273.
- 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.
- Feussner, I. and Wasternack, C. (2002) The lipoxigenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 275-297.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B. and Wasternack, C. (1995) Jasmonate-induced lipoxigenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv *Salome*). *Plant J.*, **7**, 949-957.
- Froehlich, J.E., Itoh, A. and Howe, G.A. (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, **125**, 306-317.

- Gardner, H.W.** (1975) Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic. *J Agric Food Chem*, **23**, 129-136.
- Geerts, A., Feltkamp, D. and Rosahl, S.** (1994) Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.*, **105**, 269-277.
- Göbel, C., Feussner, I. and Rosahl, S.** (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52834-52840.
- Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M. and Rosahl, S.** (2002) Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **1584**, 55-64.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. and Rosahl, S.** (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6267-6273.
- Grechkin, A.N. and Hamberg, M.** (2000) Formation of cyclopentenones from all-(E) hydroperoxides of linoleic acid via allene oxides. New insight into the mechanism of cyclization. *FEBS Lett.*, **466**, 63-66.
- Grechkin, A.N., Mukhtarova, L.S. and Hamberg, M.** (2000) The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route. *Biochem. J.*, **352**, 501-509.
- Hamberg, M.** (2000) New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids*, **35**, 353-363.
- Hause, B., Weichert, H., Höhne, M., Kindl, H. and Feussner, I.** (2000) Expression of cucumber lipid body lipoxygenase in transgenic tobacco - Lipid body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta*, **210**, 708-714.
- Howe, G.A. and Schillmiller, A.L.** (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 230-236.
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L. and DeRocher, A.E.** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol.*, **123**, 711-724.
- Itoh, A. and Howe, G.A.** (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase: Identification as a CYP74 cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3620-3627.
- Itoh, A., Schillmiller, A.L., McCaig, B.C. and Howe, G.A.** (2002) Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46051-46058.
- Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymeson, M. and Gladon, R.J.** (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*, **13**, 613-626.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-684.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwarra, T. and Feussner, I.** (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBS Lett.*, **481**, 183-188.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. and Wasternack, C.** (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J.*, **21**, 199-213.
- Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegenthart, J.F.** (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem*, **2**, 494-504.
- Schaller, F.** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.*, **52**, 11-23.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B. and Rothstein, S.J.** (2000) Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.*, **122**, 1335-1342.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S. and Feussner, I.** (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (*CYP74D*) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett.*, **507**, 371-376.
- Stumpe, M., Carsjens, J.-G., Stenzel, I., Göbel, C., Lang, I., Pawlowski, K., Hause, B. and FEUSSNER, I.** (2005) Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, in press.
- Suzuki, M., Yamaguchi, S., Iida, T., Hashimoto, I., Teranishi, H., Mizoguchi, M., Yano, F., Todoroki, Y., Watanabe, N. and Yokoyama, M.** (2003) Endogenous α -ketol linolenic acid levels in short day-induced cotyledons are closely related to flower induction in *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 35-43.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R. and Graham, I.A.** (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.*, **137**, 835-840.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B.L. and Brash, A.R.** (2001) Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (*CYP74C*) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Arch Biochem Biophys*, **386**, 281-289.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P. and Sanchez-Serrano, J.J.** (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8139-8144.
- Vitha, S., Baluska, F., Mews, M. and Volkmann, D.** (1997) Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues. *J Histochem Cytochem*, **45**, 89-95.
- Vörös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Löbner, M., Parthier, B. and Wasternack, C.** (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.*, **251**, 36-44.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 165-221.
- 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.
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D. and Farmer, E.E.** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*, **11**, 485-493.
- Yamaguchi, S., Yokoyama, M., Iida, T., Okai, M., Tanaka, O. and Takimoto, A.** (2001) Identification of a component that induces flowering of *Lemma* among the reaction products of α -ketol linolenic acid (FIF) and norepinephrine. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1201-1209.
- Yokoyama, M., Yamaguchi, S., Inomata, S., Komatsu, K., Yoshida, S., Iida, T., Yokokawa, Y., Yamaguchi, M., Kaihara, S. and Takimoto, A.** (2000) Stress-induced factor involved in flower formation of *Lemma* is an α -ketol derivative of linolenic acid. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 110-113.

Identification of a fatty acid hydroperoxide lyase from the moss *Physcomitrella patens* that transforms hydroperoxides of C18- and C20-polyenoic fatty acids to C9-aldehydes

Michael Stumpe¹, Cornelia Göbel¹, Thomas Wichard², Andreas Schaaf³, Wolfgang Frank³, Markus Frank⁴, Ralf Reski³, Georg Pohnert² and Ivo Feussner^{1,*}

¹Georg-August-University Göttingen, Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences, Department of Plant Biochemistry, D-37077 Göttingen, Germany

²Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Hans-Knöll-Strasse 8, D-07745 Jena, Germany.

³Freiburg University, Plant Biotechnology, Schaezenlestrasse 1, D-79104 Freiburg, Germany

⁴BASF Plant Science GmbH, D-67056 Ludwigshafen, Germany.

*Correspondence should be sent to Ivo Feussner: Phone: +49-551-39-5743; Fax: +49-551-39-5749; E-mail: ifeussn@gwdg.de

Running title: 9/13-HPL from *P. patens*

Key words: cytochrome P-450; lipid peroxidation; oxylipin metabolism; moss; substrate specificity

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank/EMBL data bank with accession number CAC86920.

SUMMARY

Fatty acid hydroperoxide lyase enzymes are members of the cytochrome P-450 enzyme family, subfamily *CYP74*. Here we describe the isolation of the first cDNA (*PpHPL*) encoding a hydroperoxide lyase from a lower eukaryotic organism, *Physcomitrella patens*. When expressed in *E. coli*, the recombinant protein was active when its predicted plastidic targeting peptide was deleted. PpHPL can be classified as an unspecific hydroperoxide lyase having a substrate preference for 9-hydroperoxides of C18-fatty acids as well as for the corresponding 11-hydroperoxide of arachidonic acid. 13-hydroperoxides of C18-fatty acids and 12- and 15-hydroperoxides of C20-fatty acids are poorer substrates. (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid was metabolized to (3*Z*)-nonenal and to 9-oxo-nonanoic acid. Transient expression of C-terminal fusion proteins with yellow fluorescent protein in moss

protoplasts showed that PpHPL was found in protein clusters in membranes of plastids. To gain insight into the function of PpHPL knock out lines were generated. When these wounded mutant lines were compared to wild type, the knock out lines failed to emit nonenal while formation of oct-1-en-3-ol, oct-3-en-1-ol was detectable in all lines indicating that PpHPL is involved in formation of a specific subset of volatile aldehydes in the moss. Together our findings show that in contrast to higher plants more than one pathway is involved in the biosynthesis of volatile oxylipins in *P. patens*. The moss produces metabolites typical for animals, plants, algae, and mushrooms by a classical plant-type transformation of arachidonic acid described here and by new metabolic reactions not fully elucidated so far.

INTRODUCTION

Oxylipin is a collective term for oxygenated metabolites derived from polyunsaturated fatty acids (PUFAs). They are bioactive compounds involved in signal and defence reactions in mammals, higher plants and algae (Brash, 1999; Blee, 2002; Pohnert, 2005). The biosynthesis of many oxylipins is initiated by the conversion of PUFAs by a lipoxygenase (LOX) (Feussner and Wasternack, 2002). While in higher plants C18-fatty acids like linoleic (LA) and α -linolenic acid (LeA) are the main precursors of such compounds, in animals and algae oxylipins derive predominantly from C20-fatty acids (Brash, 1999; Gerwick, 1999; Pohnert, 2005).

The biosynthesis of oxylipins starts with the LOX-catalyzed introduction of molecular oxygen into PUFAs to form hydroperoxides (Brash, 1999). In plants these hydroperoxides serve as substrates for at least 7 enzyme families, including three subfamilies of *CYP74*-type of cytochrome P-450: hydroperoxide lyase (HPL), allene oxide synthase (AOS) and divinyl ether synthase (DES) (Howe and Schilmiller, 2002). In contrast to typical P-450 monooxygenases, *CYP74*-enzymes require neither O₂ nor NADPH as cofactors (Feussner and Wasternack, 2002). Instead, the hydroperoxide group of the fatty acid substrate serves as oxygen donor and as a source of reducing

equivalents. The HPL cleaves the hydrocarbon backbone resulting in a short chain aldehyde and the corresponding ω -oxo-fatty acid (Noordermeer *et al.*, 2001). The AOS converts hydroperoxides to unstable allene oxides which are hydrolyzed into α - and γ -ketols or can spontaneously undergo non-enzymatic cyclization (Wasternack and Hause, 2002). In the presence of an allene oxide cyclase, the allene oxide is metabolized to 12-oxo-phytodienoic acid (12-OPDA). Subsequent reduction of 12-OPDA by OPDA-reductase and three cycles of β -oxidation yields jasmonic acid (Wasternack and Hause, 2002). DES produces divinyl ether which can be cleaved into short chain aldehydes and ω -oxo fatty acids under acidic conditions (Hamberg, 1993).

Several *CYP74*-enzymes have been cloned from different plant species. Some of them contain plastidic transit peptides, for instance an AOS from the model plant *Arabidopsis thaliana* (Laudert *et al.*, 1996). A plastidic association was shown for the AOS and the HPL from tomato (Froehlich *et al.*, 2001) and for AOS from barley (Maucher *et al.*, 2000). In addition, AOS activity in spinach was found at the chloroplast envelope (Blée and Joyard, 1996).

In higher plants the basic substrates for *CYP74*-enzymes are 13- or 9-hydroperoxides of linoleic or linolenic acids. Based on their substrate specificity the enzymes may thus be classified into 13- or 9-hydroperoxide specific enzymes, or unspecific enzymes. The short chain aldehydes of the HPL metabolizing 13-hydroperoxide of linoleic (13-HPODE) or α -linolenic acid (13-HPOTE) are hexanal and (3*Z*)-hexenal, respectively (Noordermeer *et al.*, 2001). The resulting ω -oxo fatty acid can be isomerized to traumatin, a wounding hormone (Zimmerman and Caudron, 1979). The volatile reaction products of 9-hydroperoxides (9-HPODE or 9-HPOTE) are (3*Z*)-nonenal and (3*Z*,6*Z*)-nonadienal, respectively. For the HPLs from *A. thaliana* and tomato it was also shown that they can use hydroperoxides of arachidonic acid (AA) as substrates but only at very low efficiency (around 5 % relative activity compared to the best substrate 13-HPOTE) (Kandzia *et al.*, 2003).

The short chain aldehydes are compounds of the green odor of plants and have an antimicrobial effect *in vitro*. The physiological function of aldehydes is mainly addressed to plant defence against microbes and herbivores (Blee, 2002; Rosahl and Feussner, 2005). Production of C6-aldehydes upon inoculation of French bean has been demonstrated for an avirulent variety of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, whereas a virulent strain did not lead to such an increase (Croft *et al.*, 1993). Different C6-volatiles have been shown to induce defence related genes and to stimulate phytoalexin accumulation (Zeringue, 1992; Bate and Rothstein, 1998). In transgenic potato plants lacking *HPL* transcript an increase in aphid performance was observed (Vancanneyt *et al.*, 2001). Up to now the effect of C9-volatiles has not been investigated.

In contrast to other eukaryotic organisms, the knowledge on the biosynthesis of oxylipins in mosses is limited. These organisms contain C18, C20, and longer chain length fatty acids (Dembitsky, 1993). In the moss *Physcomitrella patens* for example the main fatty acids are palmitic acid, LA and arachidonic acid (AA) (Girke *et al.*, 1998). Certain mosses are known to emit aldehydes and their corresponding alcohols, like octenal, octenol but also hexanal and hexenal (Dembitsky, 1993). Recently it was shown that the moss *P. patens* produces oct-1-en-3-ol, oct-2-en-1-ol and (2*E*)-nonenal after wounding. These volatiles are all derived from AA (Wichard *et al.*, 2005b). While the octenols may be produced by the action of a novel LOX with a lyase activity that has been described recently (Senger *et al.*, 2005), the enzyme responsible for C9-volatile production is still unknown.

Here we present the isolation and characterization of a new HPL from the moss *P. patens*. The substrate specificity against hydroperoxides of different fatty acids was analyzed and we show that the enzyme is most likely localized at the membrane of chloroplasts. Using a knock-out mutant for this HPL we demonstrate that the release of (2*E*)-nonenal after wounding is mediated by this enzyme and may derive from 12-hydroperoxy arachidonic acid.

RESULTS

Isolation and Characterization

Previous studies suggested that the moss *P. patens* might contain a HPL activity which uses 12-hydroperoxy AA (12-HPETE) as substrate to form (2*E*)-nonenal (Wichard *et al.*, 2005b). As this conversion is rather unusual, we set out to clone the corresponding gene, analyze the recombinant protein and get so inside into the fatty acid-derived aldehyde and alcohol formation in mosses. In an EST database we found a partial clone with similarity to known *CYP74*-enzymes from higher plants. To isolate the full-length cDNA clone we screened a cDNA library of *P. patens* gametophytes. Of about 1×10^6 plaques screened, 12 positives were isolated and partially sequenced. The isolates were identical in the overlapping regions. The longest insert sequenced had a length of 1975 bp excluding its poly(A). The coding sequence started at position 190 and ended at position 1599 of the isolated cDNA fragment. A stop-codon located 30 bp upstream of the start-Met indicated the clone is full length. The deduced protein consists of 532 amino acids and has a predicted molecular mass of about 59.9 kDa. The amino acid sequence was most similar to that of allene oxide synthases from *P. patens* (63 %; Acc.-No. CAC86919) and *Arabidopsis* (61 %; Acc.-No. CAA63266). PpHPL contained typical *CYP74* motifs and amino acids within its sequence, however, the amino acid sequence did not reliably group into any subfamily. Currently, enzymes are grouped into subfamilies based on sequence identity higher than 55 % (an arbitrary definition known from mammalian cytochrome P450 enzymes). PpHPL as well as PpAOS exhibit less than

50 % amino acid identity to other *CYP74s*, and therefore cannot easily be categorized into the known subfamilies using the established criteria of sequence identity (Figure 1). The N-terminal 39 amino acids of PpHPL were recognized as a plastidic transit peptide by the signal peptide prediction program TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

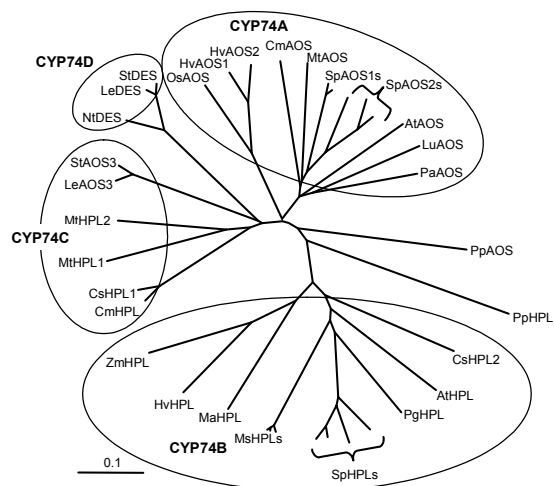


Figure 1. Phylogenetic relationship of *CYP74* families.

Amino acid sequences were aligned using ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). The phylogram was constructed using Treeview (Page, 1996). Amino acid sequences corresponding to the following Acc.-No. were used for the analysis: AtAOS: CAA63266, AtHPL: AAC69871, CmAOS AAM66138, CmHPL1: AAK54282, CshHPL1: AAF64041, CshHPL2: AF229812, HVAOS1: CAB86384, HVAOS2: CAB86383, HvhHPL: CAC82980, LeAOS3: AAN76867, LeDES: AAG42261, LuAOS: AAA03353, MaHPL1: CAB39331, MsHPLs: CAB54847, CAB54848, CAB54849, MTAOS1: TC22359, MhHPL1: CAC86898, MhHPL2: CAC86899, NiDES: AAL40900, OSAOS: AAL38184, PAOS1: CAA55025, PghHPL1: AAK15070, PpAOS: CAC86919, PpHPL: CAC86920, SpAOS1s: CAB88032, CAD29735, SpAOS2s: AAF67141, CAD29736, CAC82911, SpHPLs: AAF67142, AAA97465, CAC44040, CAC91565, StAOS3: CAI30876, StDES: CAC28152, ZmHPL: AAS47027.

When a full length and a truncated protein lacking the plastidic transit peptide were expressed in *E. coli*, only the truncated protein metabolized fatty acid hydroperoxides. Therefore, all further analyses were performed with the truncated protein. Using [^{14}C]-13-HPOTE as a substrate we tested the enzymatic activity of the recombinant enzyme. The only product found in the HPLC chromatogram was (9*Z*)-12-oxo-9-dodecenoic acid, the expected reaction product of an HPL enzyme. Ketols, products of AOS activity, or divinyl ethers resulting from DES activity were not observed. We conclude from these results that the isolated cDNA encodes an HPL. In order to characterize the range of accepted substrates for the novel HPL enzyme, different hydroperoxides of LA and α -LeA were tested as substrates and the resulting aldehydes were detected as DNPH-derivatives in HPLC-analyses (Figure 2). All four fatty acid

hydroperoxides were metabolized by the enzyme indicating that this HPL belongs to the group of unspecific 9/13-HPLs. Using 9-HOPDE as substrate we determine the pH optimum of the recombinant protein spectrophotometrically to be around pH 8.

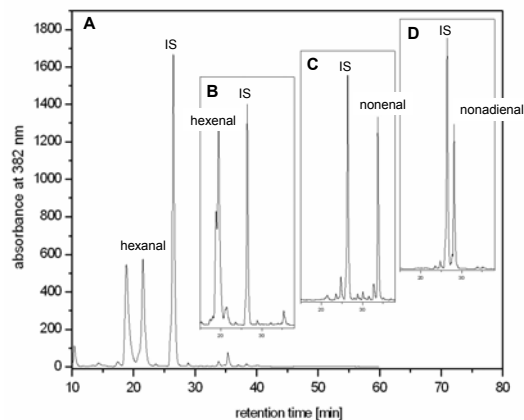


Figure 2. Substrate specificity of PpHPL.

HPLC-analysis of aldehydes formed after incubation of recombinant PpHPL with 13-HPODE (A), 13-HPOTE (B), 9-HPODE (C) and 9-HPOTE (D). Samples were derivatized with DNPH before analysis. IS, internal standard (heptanal).

To gain further insight into the substrate specificity of the enzyme in addition to the previous substrates the hydroperoxides of γ -LeA and AA were tested. The majority of hydroperoxides tested served as substrates and were converted to the corresponding aldehydes (Figure 3). Figure 3B illustrates the range of detected aldehyde products. In each case we found an additional aldehyde compared to the negative empty vector control. The identity of derivatized aldehydes was verified in HPLC runs by coelution with authentic standards. The aldehydes derived from 8- and 5-HPETE were separated on HPLC and analyzed directly by electrospray ionization/mass spectrometry. Based on their molecular weight and retention time the further C12- and C15-aldehydes were identified. Based on biosynthetic considerations their structures were tentatively assigned to (3*Z*,6*Z*)-dodecadienal and (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-pentadecatrienal. To analyze the substrate specificity on quantitative basis we used 30 μM of each hydroperoxide in a spectrophotometric assay where the consumption of the hydroperoxide was followed. The highest activity was observed using 9-HPODE as substrate, followed by 11-HPETE (40 %), 9-HPOTE (35 %), and 9- γ HPOTE (26 %). Using 13- γ HPOTE, 8-HPETE and 5-HPETE the activity was not easily detectable (below 1 % in comparison to 9-HPODE), however the resulting aldehydes were reproducibly detected by HPLC analysis after 30 min of incubation time of the enzymatic reaction (Figure 3C).

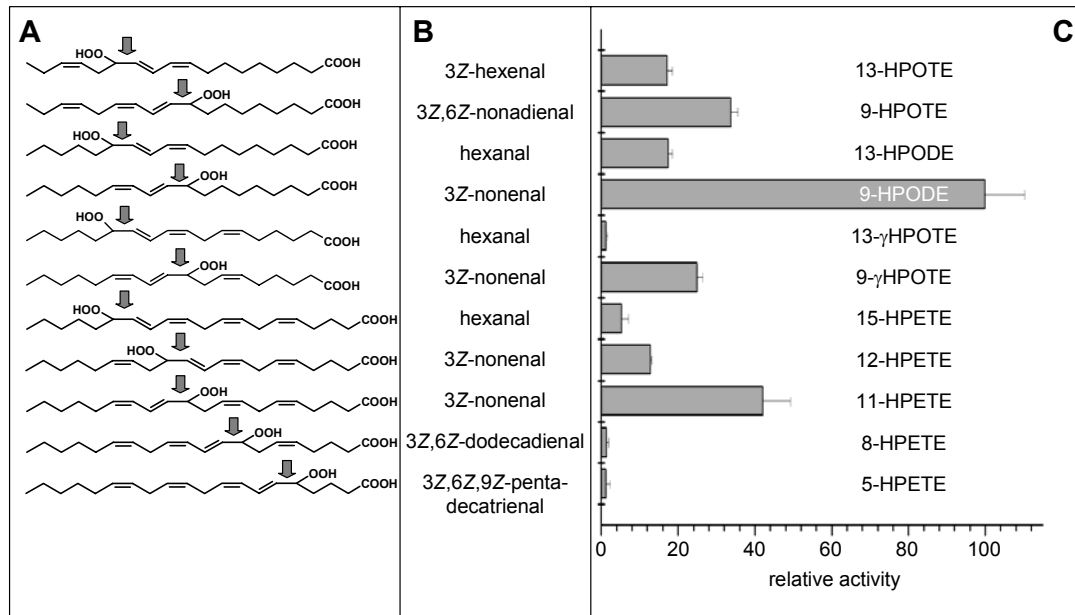


Figure 3. Substrate specificity of recombinant PpHPL.

A) Structures of hydroperoxide substrates administered, the arrows indicate cleavage site by PpHPL; B) Aldehydes formed after incubation with correspondent hydroperoxide. Aldehydes were identified as DNPH-derivatives by HPLC-DAD or HPLC-MS, respectively; C) Relative activity of PpHPL against hydroperoxides; recombinant protein was incubated with 30 μ M hydroperoxide in Na-phosphate, pH 8.0, and activity was measured spectrophotometrically at 234 nm.

Intracellular Localization

The enzymatic activity of *CYP74*-enzymes was previously found to associate with chloroplasts, in particular with the envelope (Blée and Joyard, 1996). This observation is consistent with the prediction that some of the *CYP74*-enzymes carry a plastidic transit peptide. Import assays as well as immunocytochemical studies with different *CYP74*-enzymes support plastidic localization (Maucher *et al.*, 2000; Froehlich *et al.*, 2001). We created an expression vector encoding a C-terminal fusion protein of PpHPL with YFP and transformed *Physcomitrella* protoplasts with this construct. After 3 days of expression YFP fluorescence was detectable. Visualization of the YFP fusion protein by fluorescence microscopy revealed a plastidic localization. To analyze it in more detail we used confocal laser scanning microscopy. As seen in Figures 4A and C YFP not fused to an HPL enzyme is distributed within the cytosol. In the case of PpHPL-YFP chloroplastic localization was obvious by colocalization with red chlorophyll autofluorescence. Interestingly, the distribution of the fusion protein in chloroplasts was not uniform, and a punctate pattern of localization was observed (Figure 4D,F).

Analysis of PpHPL_Knock-Out Mosses

Recently it was described that after addition of AA to wounded moss different volatiles like oct-1-en-3-ol, oct-3-en-1-ol and (2*E*)-nonenal were emitted (Wichard *et al.*, 2005b). The production of the octenols was most likely caused by the recently cloned LOX of *P. patens* (Senger *et al.*, 2005). To analyze if the HPL

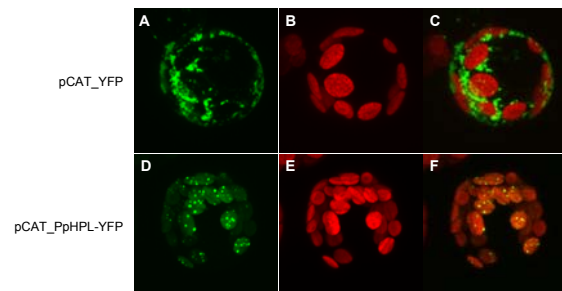


Figure 4. Subcellular localization of PpHPL.

P. patens protoplasts were transfected with pCAT_YFP and pCAT_PpHPL-YFP; A, D: YFP fluorescence in a transfected protoplast. B, E: chlorophyll fluorescence of the same protoplast. C, F: merged image of A and B or D and E, respectively.

cloned here is responsible for the formation of (3*Z*)-nonenal, which could be converted to (2*E*)-nonenal by an isomerase, we created knock-out mosses where the *PpHPL*-gene was disrupted by a cDNA coding for kanamycin resistance. We obtained 30 independent transgenic lines and the integration into the *PpHPL*-gene was verified by PCR as described in experimental procedures. Four independent lines were chosen for further studies. All were deficient for HPL activity (data not shown). The formation of oxylipins after addition of AA to wounded wild type moss and to the four individual knock-out lines was compared. As described for the wildtype (Wichard *et al.*, 2005b), we observed within the first 30 s the transient formation of 12*S*-hydro(pero)xy arachidonic acid and only trace amounts of racemic 11- and 15-

hydro(pero)xy arachidonic acid. The amount of 12-H(P)ETE declined then within the next 15 min and formation of oct-1-en-3-ol, oct-3-en-1-ol or (2*E*)-nonenal was observed. Addition of neither LA nor LeA led to formation of volatiles under these conditions (Wichard *et al.*, 2005b). The release of volatiles of moss lines sonicated for 2 minutes in an ice bath were analyzed by headspace analysis (Figure 5). In the wild type we observed the production of octenols and (2*E*)-nonenal. In contrast no (2*E*)-nonenal was detected in both knock-out moss lines. The production of other volatiles was not affected in these knock-out lines. The ω -oxo fatty acid (11-oxo-undecadienoic acid), the other product of the HPL reaction, was also not detectable whereas 12-oxo-dodecantrienoic acid, the product of the reaction with the multifunctional LOX, was found (data not shown).

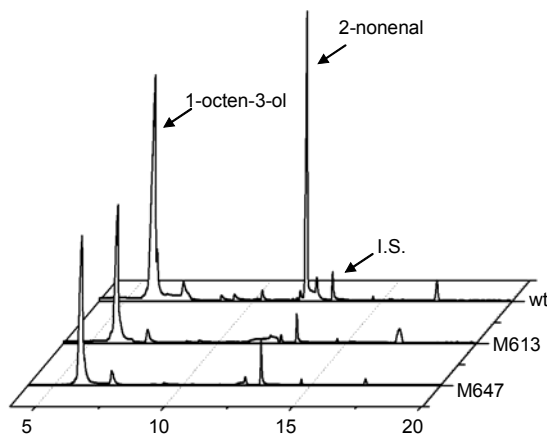


Figure 5. SPME-analysis of *P. patens* wild type and PpHPL-KOs volatile formation after wounding.

Wild type (wt) and two knock-out lines (M613, M647) were wounded for 2 minutes. I.S., internal standard (2-decanol). Arrows indicate the emitted major volatiles.

DISCUSSION

The moss *P. patens* contains not only plant typical C18-fatty acids like LA or α -LeA but also γ -LeA and C20-fatty acids like AA and eicosapentaenoic acid (EPA) (Girke *et al.*, 1998). These fatty acids may all serve as source for the formation of oxylipins. For volatile oxylipins it was shown in a previous report that they are predominantly produced from AA, which may be first oxidized to 12-HPETE (Wichard *et al.*, 2005b). This hydroperoxide may be cleaved either by a so called “homolytic hydroperoxide lyase activity” leading to the formation of octenols or by a “heterolytic hydroperoxide lyase” producing (2*E*)-nonenal. In this paper we describe the isolation and characterization of the proposed heterolytic hydroperoxide lyase. By homological searches in EST-databases from *P. patens* we found an EST with homology to *CYP74*-enzymes from higher plants. The EST was completed by screening a phage library and the full length coding sequence was expressed in

E. coli. The recombinant protein exhibited no activity, but a 5'-truncated protein cleaved hydroperoxides into aldehydes (Figure 2) and ω -oxo fatty acids and could so classify as HPL belonging to *CYP74*-enzyme family (Noordermeer *et al.*, 2001). The 5'-region was identified as chloroplastic transit peptide using the prediction program TargetP. Several other *CYP74*-enzymes contain also such a transit peptide and show only as truncated version an enzymatic activity (Laudert *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2000; Noordermeer *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000). On amino acid sequence level PpHPL shows a similarity of about 61 % and identity of about 42 % to an AOS from *Arabidopsis*, belonging to *CYP74A* subfamily (Laudert *et al.*, 1996). But in comparison to the other subfamilies the values are nearly the same: CaHPL (*CYP74B*) 57 % similarity and 40 % identity, MtHPL (*CYP74C*) 59 % similarity and 39 % identity and NtDES (*CYP74D*) 57 % similarity and 40 % identity. These low levels may be due to the high phylogenetic distance between the moss and the higher plants (Rensing *et al.*, 2002).

Most of yet cloned HPLs belong to the *CYP74B* subfamily. The substrate specificity of some recombinant enzymes of this subfamily was investigated resulting in a high selectivity for 13-HPOTE (Howe *et al.*, 2000; Noordermeer *et al.*, 2000; Sivasankar *et al.*, 2000). Their activity using other hydroperoxides was very low (13-HPOTE 7-15 % and 9-hydroperoxides 0-9 %). Similar results were observed when purified HPLs from plant tissues like green bell pepper fruits or tea leaves were analyzed (Hatanaka *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 1995). Against unusual plant hydroperoxides like 9- or 13- γ HPOTE there was only a low conversion detectable (0-2 % relative to 13-HPOTE). Thus it was proposed that the common feature of the substrate seem to be an ω 6-hydroperoxide-(ω 3Z, ω 7E, ω 12Z)-triene motive.

Changes in *Z-E*-geometry (Shibata *et al.*, 1995) as well as elimination of the ω 3-double bond lead to dramatically decrease of the conversion rate (Hatanaka *et al.*, 1992). The HPL from *Arabidopsis* is an exception in case of 9- γ HPOTE having a relative activity of app. 50 % in comparison to 13-HPOTE, the best substrate (Kandzia *et al.*, 2003). An explanation here might be that both substrates contain the 4-hydroperoxide (1*Z*,5*E*,7*Z*)-diene structure and only the orientation in respect to the carboxyl group differs. The length of the carbon chain was investigated using tea leaf HPL (Hatanaka *et al.*, 1992). Here, hydroperoxides with carbon chain length ranging from C14 to C24 containing the ω 6-hydroperoxide-(ω 3Z, ω 7E, ω 12Z)-triene motive were analyzed. Interestingly the highest activity was detected using the C22-hydroperoxide.

In contrast to these 13-hydroperoxide specific enzymes there were also HPLs having a broad substrate spectrum (unspecific or 9/13-HPLs). While the 13-HPLs belong to the *CYP74B* subfamily, they are members of the *CYP74C* subfamily and have got the highest sequence similarity to AOS enzymes

(Feussner and Wasternack, 2002). The 9/13-HPL from cucumber shows the highest activity towards 9-HPODE (Matsui *et al.*, 2000), whereas the HPL from melon prefers 9-HPOTE (Tijet *et al.*, 2000). The activity against the other hydroperoxides ranged from 80 % to 22 %. Because of limited information it is quite difficult to find conserved substrate motives for this type of enzymes. The PpHPL shows the highest sequence similarity also to AOS enzymes and has also a slight preference to 9-HPODE but its activity against other hydroperoxides ranges from 1 % to only 40 % (11-HPETE) (Figure 3C). Thus we prefer to classify the enzyme as unspecific 9/13-HPL. In contrast to all other enzymes analyzed so far, the four best substrates of PpHPL shared an ω 10-hydroperoxide-(ω 6Z, ω 8E)-diene motive, whereas additional double bounds like in 9-HPOTE or 9- γ HPOTE reduces drastically its activity.

Taken together essential for optimal activity of HPLs is a *cis-trans*-configured conjugated diene system with the *trans*-double bound beside the (*S*)-hydroperoxide bearing carbon atom. This system is always created by LOXs after metabolizing a (1Z,4Z)-diene system. Additional double bounds influence the activity rate: in case of 13-HPLs a double bound at the other site of the hydroperoxide group leads to an increase in activity (Noordermeer *et al.*, 2001; Howe and Schillmiller, 2002) whereas in case of CsHPL (Matsui *et al.*, 2000) and PpHPL the activity decreased. Analyses of the specificity of the tea leave HPL, a 13-HPL, and our results indicated that the absolute position of the diene system in relation to the methylene end and not to the carboxyl end is an important factor for the substrate specificity. Nevertheless the carboxy group plays also a role, since methylation reduces often the activity whereas to some extent an acid-amine is a better substrate (van der Stelt *et al.*, 2000; Kandzia *et al.*, 2003). An influence of the pH is also discussed in respect to amount of carboxylate anion in relation to the undissociated carboxyl group.

The enzymatic activity of *CYP74*-enzymes was often found associated with the chloroplast. Import assay studies with tomato AOS and HPL showed also an association with this organelle (Froehlich *et al.*, 2001). PpHPL contains also a chloroplastidic transit peptide and the PpHPL-YFP fusion protein was guided to the chloroplast (Figure 4D,F). Since the enzyme is only active without its transit peptide we assume that PpHPL is imported into the chloroplast where a transit peptidase processes the protein. The pH optimum of PpHPL (around pH 8.0) supports also a chloroplastidic localization. At neutral pH there is still 80 % of the activity suggesting that PpHPL could be active during photosynthetic and non-photosynthetic periods. During the purification of recombinant PpHPL we observed an association of the protein with the *E. coli* microsomes as it is described also for other *CYP74s* (Itoh and Howe, 2001; Itoh *et al.*, 2002). Because of that and the non-uniform distribution of PpHPL-YFP fusion protein in the chloroplast we assume that the protein is somehow linked to special

lipid domains within membranes that might be the inner envelope or the thylakoid.

It was described in a before going publication that after wounding the moss emitted a specific blend of volatiles that yet has not been found in higher plants (Wichard *et al.*, 2005b). As main constituents we identified oct-1-en-3-ol, oct-3-en-1-ol and (2*E*)-nonenal, which were exclusively derived from AA. While the production of the octenols is most likely caused by the recently cloned LOX of *P. patens* (Senger *et al.*, 2005), the HPL described here might be responsible for the formation of (2*E*)-nonenal by a pathway found in all higher plants. To gain further insight into the involvement of PpHPL in volatile formation, we created knock-out mosses where the *PpHPL*-gene was disrupted. Indeed the analysis of two independent lines show that PpHPL is only involved in the generation of the plant like volatile (2*E*)-nonenal and not in the formation of octenols typically found so far mainly in mammals (Figure 5). According to our findings described here and in recent publications (Senger *et al.*, 2005; Wichard *et al.*, 2005b) a so far new picture for the wound activated formation of volatile oxylipins in mosses arises that involves only one key enzyme required for the transformation of free fatty acids. This single LOX (PpLOX1) can account for high product diversity (Senger *et al.*, 2005). It either produces directly octenols from AA or it provides the substrate (12-HPETE) for PpHPL described here, leading to formation of (2*E*)-nonenal. Although 12-HPETE is not the best substrate of the recombinant enzyme, incubation of the moss with different fatty acids showed the formation of volatiles only in case of AA via the production of 12-HPETE (Wichard *et al.*, 2005b). Furthermore the predominant hydro(pero)xide within in the moss was 12-H(P)ETE (data not shown) which also indicated that 12-HPETE might be the endogenous substrate of PpHPL. Thus the moss produces metabolites typical for animals, plants, algae, and mushrooms by new transformations of AA, combining in a unique way metabolic themes from all these organisms. This might be the reason why mosses are known to be highly resistant to herbivores and pathogens in contrast to less resistant higher plants where this type of resistance is often mediated only by a single LOX/HPL pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation, Expression and Purification of Recombinant PpHPL

An EST-library from *P. patens* was provided by BASF Plant Science, and a partial EST-clone with a putative *CYP74*-sequence was identified based on sequence similarity to known *CYP74*-sequences from higher plants. A 1470 bp PCR fragment was amplified with the sense primer 5'- CGT ACG GTT GTA GCC AGT CTT GGG -3' and the antisense primer 5'- TCA ATC TGA TCG CGG CGT CAG TG -3' using the partial EST-clone as a template. A ³²P-labelled cDNA probe of the PCR fragment was synthesized using

HexaLabel DNA Labeling Kit from Fermentas and used to screen a lambda ZAPExpress cDNA library of moss gametophytes. The longest insert (*PpHPL*) was sequenced and used as a template in a PCR-based approach to construct a vector for recombinant expression of PpHPL. Forward primer (5'- GGA TCC ATG GAT CGC ACT TTA GTT C -3') and reverse primer (5'- AAG CTT TCA ATC TGA TCG CGG CGT CAG TG -3') for the amplification introduced *Bam*HI and *Hind*III restriction sites, respectively. To express a truncated protein, starting at amino acid 44, a primer was designed that introduced a *Bam*HI restriction site. Using these restriction sites it was possible to clone *PpHPL* and the truncated cDNA in-frame into the pQE30 expression vector. For heterologous expression, pQE30-PpHPLfull and pQE30-PpHPLtrunc was transformed into *E. coli* host strain SG13009 pREP4. Purification of recombinant PpHPL was performed as described previously (Stumpe *et al.*, 2001).

Product Analysis of recombinant PpHPL

To produce fatty acid hydroperoxides, the corresponding fatty acids were incubated with recombinant cucumber lipid body LOX (production of 15-, 12-, 8-HPETE, 13-HPOD/TE, 13- γ HPOTE) or potato tuber LOX (production of 11-, 5- HPETE, 9-HPOD/TE, 9- γ HPOTE).

For product analysis, affinity-purified recombinant PpHPL, diluted in 2 ml of 100 mM sodium phosphate buffer, was incubated with 100 nmol [14 C]-13-HPOTE for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 40 μ l of glacial acetic acid and extracted with methanol/chloroform (Bligh and Dyer, 1959). The obtained samples were dissolved in HPLC solvent and analyzed as described (Blée and Joyard, 1996). For substrate specificity assay recombinant enzyme was incubated with 30 μ M of each hydroperoxide, and the decrease in absorbance at 234 nm was measured spectrophotometrically.

To identify the aldehydes produced, the reaction mixture was acidified to pH 3 with HCl and incubated with 2.5 ml ethanol containing 0.1 % 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) for 1 h at room temperature. Heptanal was added as an internal standard. The hydrazones were extracted twice with hexane, evaporated under a stream of nitrogen and subjected to HPLC analysis (Kohlmann *et al.*, 1999). ESI/MS analyses were done by direct injection of derivatized aldehydes into ESI interface of an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Elektron, Germany). The mass spectrometer was operated in negative ion mode with the source voltage set to 4.5 kV, and a capillary voltage of 40 V and 300 $^{\circ}$ C. In full MS mode, scans were collected between m/z values of 150 and 500.

Transient Expression of YFP Fusion Constructs in *P. patens* and microscopy

The entire cDNA without the stop-codon was amplified containing *Nco*I restriction sites at the 5' and 3' ends. This fragment was ligated into the *Nco*I-

restricted vector pCAT_YFP (Fulda *et al.*, 2002) in order to express PpHPL as YFP-fusion protein. Plasmid DNA from this construct and from pCAT_YFP carrying no insert were transiently transfected into *P. patens* protoplasts as described previously (Rother *et al.*, 1994). Localization of YFP and its fusions in transfected protoplast were analyzed after 3 days of expression by confocal laser scanning microscopy according to (Schaaf *et al.*, 2004).

Creating and Analyzing PpHPL-Knock-Out Mosses

A region of the PpHPL cDNA comprising the nucleotides 372 to 1710 was amplified by PCR using the following primers: 5'-TGG GGC AAG AGA GCA ATC TG-3' (forward primer) and 5'-AAA GCT CCG CCA GAA GAA GG-3' (reverse primer). The PCR product was cloned into the *Eco*RV restriction site of pGEM-5Zf(+) (Promega). The selection marker cassette (*nos*-promoter::neomycin phosphotransferase::*nos*-terminator) derived from the vector pBIN19 (Bevan, 1984) was cloned into the *M*lsI site of the *PpHPL* cDNA fragment. A resulting construct showing conformity of the selection cassette with the cDNA orientation was selected for plant transformation. Before transformation the construct was digested with *Aat*II and *Not*I to release the disruption construct. 25 μ g of DNA were used for plant transformation. The transformation of *Physcomitrella* protoplasts and selection of transgenic lines was performed according to (Frank *et al.*, 2005). Using gene specific primers, transformants were additionally screened for loss of wildtype HPL allele band and incorporation of the nptII cassette into the *PpHPL*-locus. Further analyses were done with several independent transformants to exclude effects resulting from non-homologous recombination events. Moss cultures were grown under sterile conditions (Reski *et al.*, 1994). 4 ml of a suspension culture of each transformant were filtered to give 100 – 150 mg fresh weight biomass, which was resuspended in 1 ml fresh medium. The samples were cooled to 4 $^{\circ}$ C and treated with ultrasound for 2 min using a B. Braun Labsonic L 1000 ultrasonic oscillator. To characterize the emitted volatiles, the vial was sealed with a Teflon septum, and polydimethyldioxane-coated fiber (Supelco, Germany) was inserted for 15 min in the gas phase (Wichard *et al.*, 2005b). Separation was performed on a Finnigan Trace GC/MS equipped with a 15 m EC5 column ID 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness (Alltech, Deerfield, IL). The temperature program started at 40 $^{\circ}$ C (4 min) and ramped to 120 $^{\circ}$ C with a rate of 5 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, then with 20 $^{\circ}$ C min $^{-1}$ to 280 $^{\circ}$ C (2 min). The ω -oxo fatty acids from the moss cultures were analyzed by resuspending the moss in 1 ml derivatisation reagent (25 mM pentafluorobenzyl hydroxylamine in 100 mM Tris/HCl, pH7) and treated as describe above. Analyses were done according to (Wichard *et al.*, 2005a).

ACKNOWLEDGEMENTS. The technical assistance of A. Nickel and P. Meyer is gratefully acknowledged. We thank Dr. I. Heilmann (Göttingen) for critical reading of the manuscript. The work was financed by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to I.F. (Fe 446/1) and to GP (PO628 4-1).

REFERENCES

- Bate, N.J. and Rothstein, S.J. (1998) C-6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.*, **16**, 561-569.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8711-8721.
- Blee, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.*, **7**, 315-322.
- Blée, E. and Joyard, J. (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.*, **110**, 445-454.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Brash, A.R. (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23679-23682.
- Croft, K.P.C., Juttner, F. and Slusarenko, A.J. (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol.*, **101**, 13-24.
- Dembitsky, V.M. (1993) Lipids of bryophytes. *Prog. Lipid Res.*, **32**, 281-356.
- Feussner, I. and Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 275-297.
- Frank, W., Decker, E.L. and Reski, R. (2005) Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.*, **7**, 220-227.
- Froehlich, J.E., Itoh, A. and Howe, G.A. (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, **125**, 306-317.
- Fulda, M., Shockey, J., Werber, M., Wolter, F.P. and Heinz, E. (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid -oxidation. *Plant J.*, **32**, 93-103.
- Gerwick, W.H. (1999). Eicosanoids in nonmammals. In *Comprehensive Natural Products Chemistry: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives* (Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O., eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 207-254.
- Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R. and Heinz, E. (1998) Identification of a novel $\Delta 6$ -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, **15**, 39-48.
- Hamberg, M. (1993) Pathways in the biosynthesis of oxylipins in plants. *J. Lipid Mediators*, **6**, 375-384.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Matsui, K. and Toyota, H. (1992) Substrate specificity of tea leaf hydroperoxide lyase. *Z. Naturforsch.*, **47c**, 677-679.
- Howe, G.A. and Schillmiller, A.L. (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr Opin. Plant Biol.*, **5**, 230-236.
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L. and DeRocher, A.E. (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol.*, **123**, 711-724.
- Itoh, A. and Howe, G.A. (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase: Identification as a CYP74 cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3620-3627.
- Itoh, A., Schillmiller, A.L., McCaig, B.C. and Howe, G.A. (2002) Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46051-46058.
- Kandzia, R., Stumpe, M., Berndt, E., Szalata, M., Matsui, K. and Feussner, I. (2003) On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.*, **160**, 803-809.
- Kohlmann, M., Bachmann, A., Weichert, H., Kolbe, A., Balkenhohl, T., Wasternack, C. and Feussner, I. (1999) Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur. J. Biochem.*, **260**, 885-895.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Holländer-Czytko, H. and Weiler, E.W. (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 323-335.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwara, T. and Feussner, I. (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBS Lett.*, **481**, 183-188.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. and Wasternack, C. (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J.*, **21**, 199-213.
- Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem*, **2**, 494-504.
- Noordermeer, M.A., van Dijken, A.J., Smeekens, S.C., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F. (2000) Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2473-2482.
- Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, **12**, 357-358.
- Pohnert, G. (2005) Diatom/Copepod Interactions in Plankton: The Indirect Chemical Defense of Unicellular Algae. *ChemBioChem*, **6**, 1-14.
- Rensing, S.A., Rombauts, S., Van de Peer, Y. and Reski, R. (2002) Moss transcriptome and beyond. *Trends Plant Sci.*, **7**, 535-538.
- Reski, R., Faust, M., Wang, X.H., Wehe, M. and Abel, W.O. (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 352-359.
- Rosahl, S. and Feussner, I. (2005). Oxylipins. In *Plant Lipids* (Murphy, D., ed). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., pp. 329-354.
- Rother, S., Hädeler, B., Orsini, J.M., Abel, W.O. and Reski, R. (1994) Fate of a mutant macrochloroplast in somatic hybrids. *J. Plant Physiol.*, **143**, 72-77.
- Schaaf, A., Reski, R. and Decker, E.L. (2004) A novel aspartic proteinase is target to the secretory pathway and to the vacuole in the moss *Physcomitrella patens*. *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 145-152.
- Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Gobel, C., Lerchl, J., Pohnert, G. and Feussner, I. (2005) A Multifunctional Lipoxygenase with Fatty Acid Hydroperoxide Cleaving Activity from the Moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7588-7596.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1995) Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 147-156.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B. and Rothstein, S.J. (2000) Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.*, **122**, 1335-1342.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S. and Feussner, I. (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett.*, **507**, 371-376.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D.J., Hunziker, P., Müller, B.L., Vulfson, E.N., Slusarenko, A., Brash, A.R. and Whitehead, I.M. (2000) Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*). *Lipids*, **35**, 709-720.

- van der Stelt, M., Noordermeer, M.A., Kiss, T., Van Zadelhoff, G., Merghart, B., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.** (2000) Formation of a new class of oxylipins from *N*-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2000-2007.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P. and Sanchez-Serrano, J.J.** (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8139-8144.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 165-221.
- Wichard, T., Poulet, S. and Pohnert, G.** (2005a) Determination and quantification of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes as pentafluorobenzyl-oxime derivatives in diatom cultures and natural phytoplankton populations: Application in marine field studies. *J. Chromatogr. B*, **814**, 155-161.
- Wichard, T., Gobel, C., Feussner, I. and Pohnert, G.** (2005b) Unprecedented lipoxygenase/hydroperoxide lyase pathways in the moss *Physcomitrella patens*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 158-161.
- Zeringue, H.J.** (1992) Effects of C6-C10 alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochemistry*, **31**, 2305-2308.
- Zimmerman, D.C. and Caudron, C.A.** (1979) Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol.*, **63**, 536-541.

An unspecific 9/13-divinyl ether synthase from garlic bulbs¹

Jan-Gerrit Carsjens, Michael Stumpe, Cornelia Göbel, and Ivo Feussner*

Georg-August-University Göttingen, Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences, Department of Plant Biochemistry, D-37077 Göttingen, Germany

Key words: *Allium sativum*; Cytochrome P-450; Oxylinin metabolism, Product specificity, Substrate specificity

*Correspondence: Phone: +49-551-39-5743; Fax: +49-551-39-5749; E-mail: ifeussn@uni-goettingen.de

¹The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank/EMBL data bank with accession number AJ867809.

Abbreviations: AOS, Allene oxide synthase; C(n)A, Colnele(n)ic acid; DES, Divinyl ether synthase; E(n)A, Etherole(n)ic acid; HPL, Hydroperoxide lyase; HPOD, Hydroperoxy linoleic acid, HPOT, Hydroperoxy linolenic acid; L(e)A, Linole(n)ic acid

SUMMARY

13-Lipoxygenase-derived divinyl ethers are formed in garlic bulbs. Here, the identification of a garlic cDNA is described, which encodes an amino acid sequence that corresponds to divinyl ether synthases. The recombinant protein was expressed in *E. coli* and shown to metabolize 13-hydroperoxy as well as 9 hydroperoxy linoleic acid to etheroleic and colneleic

acid respectively, at pH 6.5 *in vitro*. These fatty acid derivatives have been implicated to function as plant antimicrobial compounds. RNA blot analyses revealed accumulation of divinyl ether synthase transcripts predominantly in below ground organs. Both enzyme activity and reaction products were also observed in green leaves.

INTRODUCTION

Divinyl ethers are a group of oxidized fatty acid derivatives containing ether oxygen within their hydrocarbon chains [1]. In plants they may be produced by sequential action of a lipoxygenase and a divinyl ether synthase (DES) [2]. In higher plants it was shown that linoleic (LA) and α -linolenic acid (LnA) are the main precursors of such compounds [3]. Incubation of LA or LnA with potato tuber or tomato root protein extracts led to the formation of fatty acid 9-hydroperoxides which are further metabolized to divinyl ethers, such as colneleic (CA) or colnelenic acid (CnA), respectively [2]. The DES responsible for the CA and CnA formation in potato and tomato have been cloned and characterized [4,5]. The analysis of their sequences led to classification of the enzymes within the group of cytochrome P450 enzymes, specifically in the *CYP74D* subfamily. This enzyme family also includes allene oxide synthases (AOS, *CYP74A,C*) and hydroperoxide lyases (HPL, *CYP74B,C*) [3], enzymes that also use fatty acid hydroperoxides derived from lipoxygenase activity as substrates. In contrast to most P450-containing enzymes, proteins from the *CYP74* subfamily do neither require molecular oxygen nor NADPH [6] as cosubstrates. AOS catalyze the conversion of fatty acid hydroperoxides to allene oxides which are rapidly hydrolyzed to their corresponding ketols or

undergo non-enzymatic cyclization to racemic cyclopentenone derivatives. In addition AOS is part of the pathway leading to the formation of jasmonic acid, a plant hormone involved in plant development and stress responses [7]. HPL cleave hydroperoxide substrates into short chain aldehydes and α -oxo fatty acids [8]. HPL-products and deduced compounds are implicated as anti-microbial toxins and as signals for the regulation of growth processes and gene expression [6]. Among HPL and AOS enzymes there are isoforms which predominantly use either 13- or 9-hydroperoxides (*CYP74A, B* and *C*), or which have no strict substrate preferences (*CYP74C*) [3]. The DES enzymes recently cloned from potato and tomato exhibit high substrate specificity toward 9-hydroperoxides, whereas 13-hydroperoxides are only poor substrates. In contrast to that, DES activities leading to the preferred formation of different *cis/trans* isomers of 13-fatty acid hydroperoxide derived divinyl ethers (etheroleic (EA) and etherolenic acid (EnA)) were demonstrated in garlic bulbs and *Ranunculaceae* plants [9-11], however, a cDNA coding enzyme catalyzing these reaction has not been identified so far. Beside the divinyl ethers formed in higher plants, divinyl ethers derived from eicosanoic acids were isolated from brown as well as red algae [12]. Whereas much is known about the structural diversity and

occurrence of divinyl ethers in eukaryotes, the knowledge about the physiological function of divinyl ethers is rather scarce. Divinyl ethers may be inhibitors of lipoxygenases and may play a role as phytoalexins, because these compounds reduce cytosporangium germination and mycelia growth of *Phytophthora infestans* *in vitro* at micromole concentration [1,2].

Most published reports on DES describe enzymes from *Solanaceae* and the produced divinyl ethers are CA and CnA. A 13-DES encoding gene has not been reported up to now. Knowing about the 13-DES activity in garlic we aimed to isolate a cDNA encoding a DES exhibiting a substrate preference for 13-hydroperoxides. The recombinant protein obtained was expressed in *E. coli* and is capable of converting 13- as well as 9-hydroperoxides of linoleic acid (13-HPOD and 9-HPOD) to the corresponding divinyl ethers. The 9/13-DES from garlic described here is constitutively expressed in subterranean organs. Measurements of metabolites of the LOX-pathway (oxylipins) reveal a predominant presence of derivatives of LA, including hydroxides and divinyl ethers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and recombinant expression of DES from garlic

Based on an incomplete sequence of an expressed sequence tag with similarity to cDNA sequences encoding CYP74 enzymes in an onion EST database (EST682106), primers were designed to amplify the corresponding sequence from garlic root first strand cDNA (sense primer 5' - GGC GTT TAC GAA GTT TAA CGA GGC - 3' and antisense primer 5' - GCT TCA CCA GCT TCT TGC CGT C - 3'). RNA from garlic roots was isolated with Trizol (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's recommendations. First strand cDNA was generated by reverse transcription with SuperScriptII (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) and used as a template for PCR-based cloning. The sequence of the resulting amplified cDNA was determined and used to generate gene specific primers for a 5'- and 3'-RACE PCR approach. The RACE PCR was carried out with the SMART RACE PCR amplification Kit (Clontech, Heidelberg, Germany). For recombinant expression, primers were designed to amplify the entire coding sequence (AsDES) that introduced *Bam*HI and *Pst*I restriction sites (5' - GGA TCC ATG TCC ACC TCC AAC GGC AGC AC - 3' and 5' - CTG CAG TCA GAC TGC TAC CTT GGT CAG CTC - 3'). The restriction sites were used for in frame cloning into the pQE30 expression vector which allowed the production of the AsDES protein with an N-terminal His₆ tag. The resulting plasmid was transformed into *E. coli* host strain SG 13009 (Qiagen, Hilden, Germany). The recombinant enzyme was expressed and purified as described before [5].

Enzyme activity tests and product analysis

The 9- and 13-hydroperoxy fatty acid substrates were prepared from LA and LnA (Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)) using soybean 13-LOX (Sigma, Germany) and recombinant potato tuber 9-LOX [13]. Divinyl ether fatty acids used as standards were obtained from Larodan (Malmö, Sweden). Radioactive labeled fatty acid hydroperoxides were prepared by incubating [1-¹⁴C]-labeled fatty acids with appropriate lipoxygenases. The activity of the recombinant enzyme was determined in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 30 μM of substrate by measuring the decrease of the absorbance at 234 nm. For product analysis, 100 nmol of substrate was used. After 10 min incubation time reaction products were extracted according to [14]. The organic phases were evaporated under a nitrogen stream and analyzed by reversed phase HPLC with a methanol:water:acetic acid gradient on an Agilent 1100 HPLC system (Waldbronn, Germany) as previously described [5]. For detection of vinyl ethers, the absorbance at 252 nm and 268 nm was recorded [15]. For further verification, divinyl ether containing fractions obtained by reversed phase HPLC was methylated with (trimethylsilyl)-diazomethane and analyzed by GC/MS as described [5].

Determination of in vivo activity and metabolic profiling of oxylipins

For *in vivo* activity, 0.2 g plant material was ground in liquid nitrogen and incubated for 10 min at room temperature in 2 ml of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, with [1-¹⁴C]-13-HPOD. The oxylipins were extracted as described above and analysis was performed with an Agilent 1100 HPLC system coupled with a Raytest Ramona detector [16]. Substrates and products were separated by reversed phase chromatography according to [17]. For detection of reaction products the absorbance at 252 nm and the radioactive signal were recorded.

For Oxylipinprofiling plant material was grounded and analyzed as described previously (Göbel *et al.*, 2003, Stumpe *et al.*, 2005).

Northern blot analysis

RNA extracted from garlic leaves, roots, plant bulbs and stored bulbs was separated on denaturing formaldehyde gels and transferred to a nylon membrane (Roth, Karlsruhe, Germany). A full length PCR-fragment of the gene labeled with the HexaLabel DNA Labeling Kit (MBI, Fermentas) was used as a probe. Hybridization was carried out in 5 X SSPE, 5 X Denhardt's, 0.1 % SDS, 100 μg/ml denatured herring sperm DNA. Filters were sequentially washed twice at 65 °C with 6 X SSC, 0.1 % SDS, twice with 2 X SSC, 0.1 % SDS and twice with 0.5 X SSC, 0.1 % SDS.

RESULTS

Isolation of a CYP74-enzyme from garlic

Up to now only DES with high substrate specificity for 9-fatty acid hydroperoxides have been cloned and characterized [3]. From garlic and a number of *Ranunculaceae* species it is known that these plants contain DES activities capable of metabolizing 13-hydroperoxides [9,11]. In order to characterize the enzymes which are responsible for these activities we set out to isolate and clone cDNAs that may encode a 13-DES. By screening public EST databases we identified an incomplete sequence (EST682106) from onion with similarity to known *CYP74*-enzymes. Based on this information we performed RACE-PCR to obtain the full length clone using onion as well as garlic cDNAs as templates. One complete cDNA was obtained from the garlic cDNA library. The deduced protein was tentatively named AsDES and has a length of 472 amino acids and a calculated molecular mass of 52.8 kDa. The activity of several *CYP74*-enzymes has previously been described to be located in plastids [3]. Analysis of amino acid sequences of different cloned members of the *CYP74* family revealed the presence of plastidic transit peptides [25,26,27]. The deduced amino acid sequence of AsDES lacks such a typical transit peptide. The novel *CYP74*-enzyme described here is most similar to the amino acid sequence of the AOS from *Arabidopsis* (Acc.-No.: CAA63266; 46% identity). As seen in the phylogenetic tree analysis (Fig. 1), the garlic enzyme does not easily group into an existing *CYP74*-subfamily due to its comparably low sequence identity to other *CYP74*-enzymes. However, the protein shares typical sequence motifs known from other *CYP74*-enzymes and because the AsDES shows substantial sequence similarity to the group of 13-AOS, the enzyme may be grouped into the *CYP74A*-subfamily.

Functional expression in E. coli and biochemical properties of recombinant AsDES.

Based on the sequence information and the low sequence identity to known *CYP74* it is not possible to predict its enzymatic activity. To characterize the associated activity, the full length coding sequence of *AsDES* was cloned into the plasmid pQE30 and heterologously expressed in *E. coli*. When assayed *in vitro*, the recombinant enzyme exhibited a broad pH optimum, ranging from pH 5 to 7.5, with the highest activity observed at slightly acidic pH values. Using 13-HPOD as a substrate and HPLC analysis for product analysis was performed we observed a reaction product with a retention time of 32 min that has a UV absorption maximum at 252 nm (Fig. 2A). The methylated derivative of this product was analyzed using GC/MS, and the associated mass spectrum exhibited a dominant ion at an *m/z* at 308 which is the molecular mass of EA (Fig. 2B). The fragmentation pattern is in agreement with the mass spectrum of authentic EA.

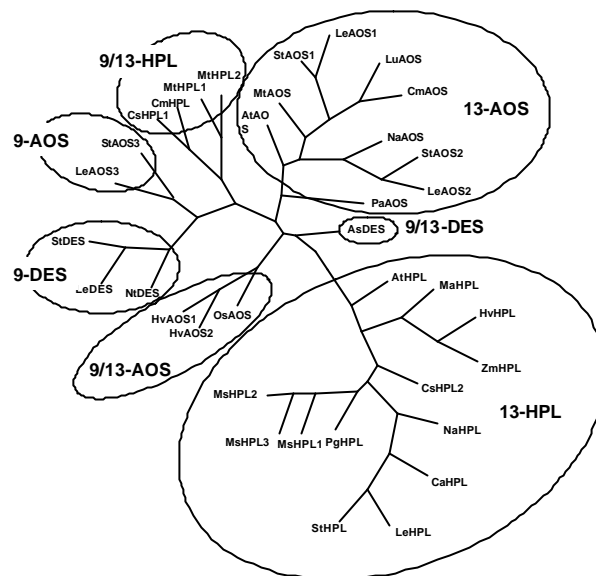


Fig. 1: An unrooted phylogenetic tree of *CYP74*-enzymes from various plants.

Phylogenetic analysis was performed using the programs ClustalX and Phylip. The analysis is based on the following Acc.-No. MsHPL1: CAB54847, MsHPL2: CAB54848, MsHPL3: CAB54849, AtHPL: AAC69871, LeHPL: AAF67142, CaHPL: AAA97465, StHPL: CAC44040, NaHPL: CAC91565, HvHPL: CAC82980, MaHPL: CAB39331, ZmHPL: AAS47027, CshHPL1: AAF64041, PghHPL: AAK15070, StDES: CAC28152, LeDES: AAG42261, NtDES: AAL40900, HvaAOS1: CAB86384, HvaAOS2: CAB86383, OsAOS: AAL38184, PaAOS1: CAA55025, LeAOS1: CAB88032, LeAOS2: AAF67141, StAOS1: CAD29735, StAOS2: CAD29736, AtAOS: CAA63266, CmAOS: AAM66138, LuAOS: AAA03353, MtAOS: CAC86897, CmHPL: AAK54282, CshHPL2: AF229812, MthHPL1: CAC86898, MthHPL2: CAC86899, StAOS3: CAI30876, LeAOS3: AAN76867, AsDES: AJ867809.

Similar results were observed using the other hydroperoxides as substrates: 9-HPOD is metabolized to CA, 9HPOT to CnA and 13-HPOT to EnA by recombinant AsDES protein. When garlic protein extracts were used to characterize DES activity, the formation of two isomers of EA and EnA was observed which differed in the *cis* or *trans* configuration of the double bond at position 11 [18]. Using the recombinant enzyme we always observed the formation of only a single isomer (Fig. 2A) with the 11-double bond in *trans* configuration, which is consistent with the isomers of EA and EnA originally described [11].

In order to analyze the substrate specificity we tested the activity of AsDES spectrophotometrically against a range of fatty acid hydroperoxides. Hydroperoxides of linoleic acid were metabolized to a higher rate than the LA derivatives. The activity toward 13-HPOD is slightly higher than towards 9-HPOD. With LnA derivatives we observed about 20% of the activity in comparison to 13-HPOD (Fig. 3).

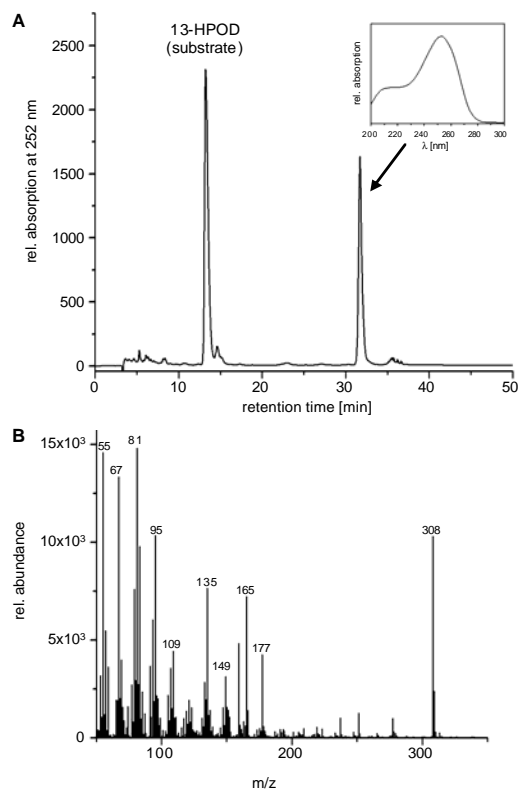


Fig. 2: HPLC analysis of products formed from 13-HPOD by *AsDES* *in vitro*.

A, 13-HPOD was incubated with recombinant DES from garlic. The resulting products were analyzed by HPLC-DAD. The chromatogram recorded at 252 nm is shown. The inlet shows the UV spectrum of the substance eluting at 32 min. B, The reaction product was purified by HPLC and analyzed as methyl ester derivative by GC/MS. The mass spectrum of the product is shown.

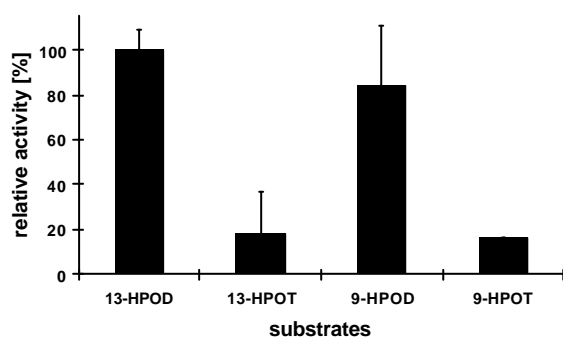


Fig. 3: Substrate specificity of *AsDES*.

Recombinant protein was incubated with 30 μ M of the respective substrate, and the decrease of absorbance at 234 nm was measured. The mean value of 13-HPOD was set to 100 %. Mean value of 3 experiments.

AsDES-transcript accumulation and *in vivo* DVE formation

To our knowledge, up to this point DES activity in garlic bulbs was described [11,19], but no information

was available about the corresponding genes. Based on the sequence information of *AsDES* we were able to analyze the expression of the transcript in different garlic organs. Analysis of the organ specific expression of *AsDES* revealed that the corresponding mRNA was present in roots and bulbs. The highest transcript level was observed in stored bulbs, whereas the transcript was barely detectable in leaves (Fig. 4). When extracts from the same organs were incubated with radiolabeled 13-HPOD and the production of labeled EA was quantified, the highest conversion was apparent in stored bulbs, whereas in leaves only 10 to 20 % of the conversion observed in stored bulbs was seen (data not shown). Parallel experiments with 9-HPOD as substrate showed similar results as for 13-HPOD, but no product formation was detected in leaves.

When the products formed were analyzed for *cis/trans*-isomer formation, we detected both isomers for all four divinyl ethers, and the *trans*-isomer was always 5 – 10-fold more abundant than the *cis*-isomer (data not shown). In addition we measured the endogenous amounts of EA and *cis*-EA in roots and bulbs (20 – 40 pmol/g fresh weight and 3 – 7 pmol/g fresh weight, respectively, Fig. 5A) showing again the same ratio as for the products formed under *in vitro* conditions.

The analysis of different oxylipins in organs of garlic shows that in subterraneous ones the predominant substance are the hydroxides of LA mainly 13-HODE (roots about 0.25 nmol/g FG) (Fig. 5B). In stored bulbs more HODE was found than in plant bulbs (0.22 nmol/g FG in stored bulbs in comparison to 0.05 nmol/g FG in plant bulbs). The ratio between 9- and 13-HODE in stored bulb are nearly the same. The oxylipins in leaves were hardly detectable.

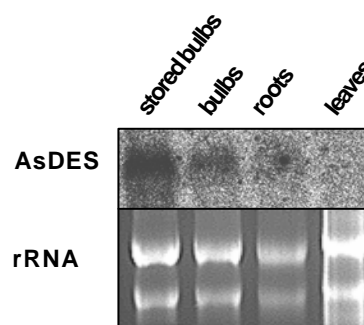


Fig. 4: RNA gel blot hybridization of garlic tissues using *AsDES* cDNA as a probe.

20 μ g of RNA from the different organs indicated were separated on a denaturing agarose gel. The autoradiograph of the blot is shown together with a photograph of an ethidium bromide stained gel of the same RNA. The figure shows one representative result.

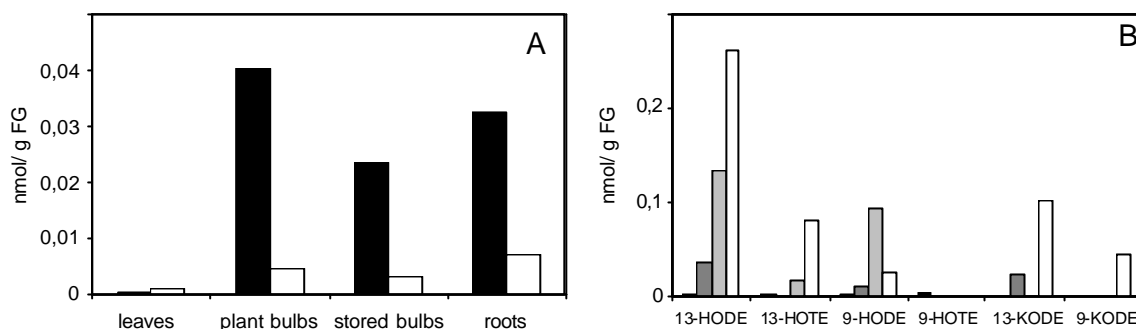


Fig. 5: Oxylipinprofil of different garlic organs.

A: Endogenous divinyl ether. black: EA, white: *cis*-EA. B: Hydroxy- and keto fatty acid. black: leaves, dark grey: plant bulbs, light grey: stored bulbs, white: roots.

DISCUSSION

Here we present the isolation and characterization of a novel *CYP74*-enzyme from garlic. To our knowledge it is the first DES reported which uses predominantly 13-HPOD as substrate. This feature distinguishes this enzyme from other cloned DES enzymes from *Solanaceae* species. The conversion of LA into the divinyl ether CA was first reported in the early 1970s by Galliard and co-workers [20]. Related activities leading to formation of EA and EnA are known from garlic and different *Ranunculaceae* species and a number of algae [9-11]. The divinyl ethers produced in various plants may differ in their *cis/trans* double bond configuration [21]. The results presented here on the endogenous amounts of these isomers, their formation in plant extracts together with the data obtained for the recombinant garlic enzyme indicate that the *trans*-isomers are direct products of AsDES. In contrast, the formation of the *cis*-isomer is not due to AsDES activity, but rather catalyzed by a yet not identified isomerase activity as has been described for the isomerization of HPL products where (3*Z*)-aldehydes are converted into (2*E*)-aldehydes [22]. In general DES activity appears to be characteristic for certain genera of plants, whereas AOS and HPL are widely distributed within the plant kingdom. From the phylogenetic analysis (Fig. 2) one may assume that DES may have evolved from AOS by gene duplication in certain plant families. The low sequence similarity to known *CYP74*-enzymes can be explained by the phylogenetic distance between garlic and the plant species where the other *CYP74s* come from and the novel enzymatic activity. As was shown for DES from *Solanaceae*, the AsDES is also preferentially expressed in below ground organs, such as bulb and root (Fig. 4). These findings are supported by the results of the DES *in vivo* activity measurements and the oxylipinprofiling. The ability the form divinyl ether is up to now restricted to some plant species, garlic and different *Solanaceae*. In all cases divinyl ether is predominantly found in subterranean organs. 13-HODE occurs mainly in roots of garlic (about 0.25 nmol/g FG). This

observation shows that there is a predominant 13-LOX activity which leads to the production of 13-HPODE. This hydroperoxid is then reduced to 13-HODE or serve as substrate for DES to form EA. In plant bulbs the amount of 13-HODE is much less than in roots, nevertheless the EA level is in the same range in both organs showing a efficient EA production and a reduced reductase activity in this organ. In stored bulb the amount of hydroxids increased compared the plant bulb. This might be the result of a higher autooxidation of fatty acids leading to the formation of 9- and 13-HPODE which are then reduced the hydroxids as it is describe during plant senescence [28]. Oxylipins, including these formed by AsDES, may play an important role in plant development and in response to biotic and abiotic stress [3]. Previous investigations in this field often specifically addressed functions of the phytohormones jasmonic acid, 12-oxo phytodienoic acid, and their derivatives, and their involvement in pathogen defense. Beside the products of the 13-lipoxygenase pathway, divinyl ether derived from 9-hydroperoxides may also play a role in pathogen defense [1,23]. An increased level of such oxylipins was not only observed up on infection of potato with *P. infestans* and *P. syringae* [15], but the absolute amount of divinyl ethers were even higher in potato lines with increased tolerance against infection by *P. infestans* [24]. In the study on potato, the divinyl ethers, CA and CnA, as well as the transcript of the DES accumulated transiently upon pathogen infection [5,16]. In many other plant pathogen interactions, including those analyzed in *Arabidopsis*, it was shown that 13-lipoxygenase derived oxylipins, such as jasmonates, play a crucial role [23]. Because of the high substrate specificity of the *Solanaceae* DES for 9-hydroperoxides, these enzymes cannot be used for physiological studies where 13-lipoxygenase derived oxylipins are involved. With the new AsDES, which also accepts 13-hydroperoxides, it is now possible to overcome this problem and to test the function of EA and EnA as phytoalexins in established model systems by transgenic approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS. We thank Dr. I. Heilmann (Göttingen) for critical reading of the manuscript. The work was financed by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Fe 446/1) and the European Commission (QLK5-CT-2001-02445).

REFERENCES

- [1] Blée, E. (1998) *Prog. Lipid Res.* 37, 33-72.
- [2] Grechkin, A. (1998) *Prog. Lipid Res.* 37, 317-352.
- [3] Feussner, I. and Wasternack, C. (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297.
- [4] Itoh, A. and Howe, G.A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 3620-3627.
- [5] Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S. and Feussner, I. (2001) *FEBS Lett.* 507, 371-376.
- [6] Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F. (2001) *ChemBioChem* 2, 494-504.
- [7] Wasternack, C. and Hause, B. (2002) *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 165-221.
- [8] Matsui, K. (1998) *Belgian J. Bot.* 131, 50-62.
- [9] Hamberg, M. (2002) *Lipids* 37, 427-33.
- [10] Hamberg, M. (2004) *Lipids* 39, 565-9.
- [11] Grechkin, A.N., Fazliev, F.N. and Mukhtarova, L.S. (1995) *FEBS Lett.* 371, 159-162.
- [12] Gerwick, W.H. (1999) in: *Comprehensive Natural Products Chemistry: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*, Vol. 1, pp. 207-254 (Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O., Eds.) Elsevier, Amsterdam.
- [13] Geerts, A., Feltkamp, D. and Rosahl, S. (1994) *Plant Physiol.* 105, 269-277.
- [14] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) *Canadian J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- [15] Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M. and Rosahl, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1584, 55-64.
- [16] Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. and Rosahl, S. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 6267-6273.
- [17] Blée, E. and Joyard, J. (1996) *Plant Physiol.* 110, 445-454.
- [18] Grechkin, A.N., Ilyasov, A.V. and Hamberg, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* 245, 137-142.
- [19] Grechkin, A.N. and Hamberg, M. (1996) *FEBS Lett.* 388, 112-114.
- [20] Galliard, T. and Phillips, D.R. (1972) *Biochem. J.* 129, 743-753.
- [21] Hamberg, M. (2005) *FEBS J.* 272, 736-743.
- [22] Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G. (1999) *FEBS Lett.* 443, 201-204.
- [23] Rosahl, S. and Feussner, I. (2005) in: *Plant Lipids*, pp. 329-354 (Murphy, D., Ed.) Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- [24] Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D. and Farmer, E.E. (1999) *Plant Cell* 11, 485-493.
- [25] Laudert, D., and Weiler, E. W. (1998) *Plant J* 15(5), 675-84.
- [26] Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., and DeRocher, A. E. (2000). *Plant Physiol* 123(2), 711-24.
- [27] Sivasankar, S., Sheldrick, B., and Rothstein, S. J. (2000). *Plant Physiol* 122(4), 1335-42.
- [28] Bachmann A.,Hause B.,Maucher H.,Garbe E.,Vörös K., Weichert H., Wasternack H. and Feussner I. (2002). *Biol. Chem.* 383 (10): 1645-1657

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. I. Feußner für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung dieser Arbeit, die zahlreichen aufschlussreichen Diskussionen zu theoretischen und praktischen Problemen und das rege Interesse am Fortschreiten der Arbeit.

Prof. C. Wasternack danke ich für die Übernahme eines Gutachtens verbunden mit seinem großen Interesse an der Arbeit.

Bei Prof. M. Hamberg möchte ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme eines Gutachtens bedanken.

Sabine Rosahl und Grit Rothe danke ich für die gelungene Kooperation und für die Pathogenversuche mit *Arabidopsis* und Otto Miersch für die Bereitstellung der Standards für das Oxylinprofil.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung Lipidstoffwechsel am IPK Gatersleben und der Abteilung Biochemie der Pflanze an der Universität Göttingen für das angenehme und produktive Arbeitsklima.

Dabei möchte ich besonders Ellen Hornung für ihre Diskussionsbereitschaft bei molekularbiologischen Fragestellungen und das Korrekturlesen, Conny Göbel für ihre Hilfe bei technischen Schwierigkeiten mit HPLC, GC und GC/MS und Andrea Nickel für ihre technische Assistenz danken.

Ebenfalls großen Dank für die angenehme Zeit in Göttingen schulde ich Susan Kunze, die fast drei Jahre Labor und Wohnung mit mir geteilt hat.

Mein besonderer Dank gilt auch „meinen“ Diplomanden, Julia Bode und Jan-Gerrit Carsjens, deren Arbeiten eine hervorragende Ergänzung zu meinem Thema darstellen.

Die vielen schönen Stunden mit Andrea, Annett, Conny, Ellen, Jan-Gerrit, Martina und Susan bei denen gegrillt, geraclettet, gefrühstückt, gerollerbladet oder Kuchen geschlemmt wurde möchte ich nicht missen.

Besonders herzlich sei an dieser Stelle meiner Familie gedankt, die mir dieses Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Und Susi – Danke für alles.

Erklärung

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

Halle, Juli 2005

Michael Stumpe

Lebenslauf

Name: Michael Stumpe
Geburtsdatum: 13.09.1977
Geburtsort: Köthen (Anhalt)
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1984 - 1991 Polytechnische Oberschule in Osternienburg
1991 - 1996 Gymnasium in Aken, Abitur

Studium

10/1996 - 07/2001 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg;

Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Abteilung Lipidstoffwechsel: „Isolierung und Charakterisierung von *CYP74*-Enzymen aus höheren Pflanzen und dem Moos *Physcomitrella patens*“

Promotion

08/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am IPK Gatersleben, Abteilung Lipidstoffwechsel; Beginn der Promotion
10/2002 Wechsel an die Georg-August-Universität Göttingen (Umzug der Arbeitsgruppe), Abteilung Biochemie der Pflanze