

„Oxidation von Polyenfettsäuren durch Lipoxygenasen“

K u m u l a t i v e H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

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

von

Herrn Dr. rer. nat. Ivo Feußner

geb. am: 21.08.1964 in: Braunschweig

Gutachter:

1. Prof. Dr. B. Parthier
2. Prof. Dr. W. Boland
3. Prof. Dr. F. Spener

Halle (Saale), verteidigt am 02.02.2000

Verzeichnis der in der Arbeit zusammengefaßten Publikationen:

1. Feussner, I, Kühn, H (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. FEBS Lett. 367: 12-14
2. Feussner, I, Hause, B, Vörös, K, Parthier, B, Wasternack, C (1995a) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv *Salome*). Plant J. 7: 949-957
3. Feussner, I, Wasternack, C, Kindl, H, Kühn, H (1995b) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11849-11853
4. Feussner, I, Hause, B, Nellen, A, Wasternack, C, Kindl, H (1996) Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. Planta 198: 288-293
5. Feussner, I, Kühn, H, Wasternack, C (1997a) Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate  $\beta$ -oxidation? FEBS Lett. 406: 1-5
6. Feussner, I, Balkenhohl, TJ, Porzel, A, Kühn, H, Wasternack, C (1997b) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. J. Biol. Chem. 272: 21635-21641
7. Holtman, WL, Vredenburg-Heistek, JC, Schmitt, NF, Feussner, I (1997) Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. Eur. J. Biochem. 248: 452-458
8. Feussner, I, Wasternack, C (1998) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. Fett/Lipid 100: 146-152
9. Feussner, I, Bachmann, A, Höhne, M, Kindl, H (1998) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. FEBS Lett. 431: 433-436
10. Vörös, K, Feussner, I, Kuhn, H, Lee, J, Graner, A, Löbler, M, Parthier, B, Wasternack, C (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*) leaves. Eur. J. Biochem. 251: 36-44
11. Kohlmann, M, Bachmann, A, Weichert, H, Kolbe, A, Balkenhohl, TJ, Wasternack, C, Feussner, I (1999) Formation of lipoxygenase pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. Eur. J. Biochem. 260: 885-895
12. Hornung, E, Walter, M, Kühn, H, Feussner, I (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4192-4197

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
1. Lipoxygenasen in Pflanzen	3
2. Intrazelluläres Vorkommen	5
3. Physiologische Substrate und Metabolite - der Lipoxygenase-Reaktionsweg	7
3.1. Synthese von Hydroperoxy- und Ketokonjugiertenfettsäuren - die Lipoxygenase-Reaktion	9
3.2. Synthese von Hydroxykonjugiertenfettsäuren - der Reduktase-Reaktionsweg	10
3.3. Synthese von Aldehyden und Traumatin - der Hydroperoxid Lyase-Reaktionsweg	12
3.4. Synthese von Jasmonaten - der Allenoxid Synthase-Reaktionsweg	15
3.5. Kartierung von Metaboliten des Lipoxygenase-Reaktionsweges	18
4. Reaktionsmechanismus und Struktur von LOXs	25
5. Zusammenfassung	30
6. Literatur	31

## Anhang

## 1. Lipoxygenasen in Pflanzen

Lipoxygenasen (Linoleat:Sauerstoff Oxidoreduktase, EC 1.13.11.12; LOXs) sind weit verbreitet in höheren Organismen (Rosahl, 1996, Siedow, 1991, Yamamoto, 1992) und wurden bisher in Vertebraten, Algen, Pilzen und höheren Pflanzen nachgewiesen. LOXs gehören zur Familie der Dioxygenasen und enthalten ein über Aminosäureseitenketten gebundenes Eisenatom. Sie katalysieren die regiospezifische Umsetzung von Fettsäuren mit einem (1Z,4Z)-Pentadiensystem und molekularem Sauerstoff unter Bildung von (1Z,3E)-Hydroperoxyfettsäuren (Gardner, 1991). Hierbei entsteht stereospezifisch das Hydroperoxid nur in der S-Konfiguration (Abb. 1).

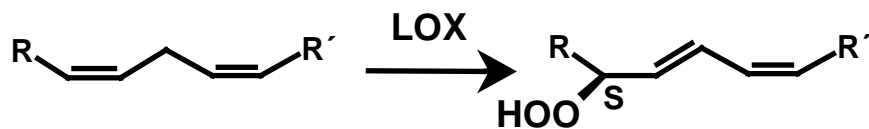


Abb. 1: Die LOX-Reaktion.

Bei Tieren ist das häufigste Substrat eine Polyenfettsäure (PUFA) der Kettenlänge C<sub>20</sub>, die Arachidonsäure (Yamamoto, 1992). Sie wird zu verschiedenen Regioisomeren umgesetzt, wobei die Hydroperoxidgruppe an den Kohlenstoffatomen 5, 8, 11, 12 oder 15 der Fettsäure entsteht. Basierend auf diesen Befunden klassifiziert man LOXs der Vertebraten nach ihrer Regiospezifität gegenüber Arachidonsäure. So synthetisieren die 5-LOXs des Menschen vor allem (5S,6E,8Z,11Z,14Z)-5-Hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure, die ein Intermediat in der Biosynthese der Leukotriene und Lipoxine darstellt. Diese Verbindungen sind Botenstoffe in der Antwort auf Entzündungsprozesse (Ford-Hutchinson *et al.*, 1994). In Pflanzen können LOXs ebenfalls nach ihrer Regiospezifität eingeteilt werden. Da hier Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure die häufigsten Substrate darstellen, werden sie nach den aus ihnen durch die LOX-Reaktion entstehenden Regioisomeren der Positionen 9 und 13 eingeteilt (Vick, 1993). Allerdings ist die Regiospezifität unter Umständen schwierig für bestimmte Enzyme zuzuordnen, da sie von den verwendeten Reaktionsbedingungen, wie dem pH-Wert, abhängig sein kann (Gardner, 1989, Kühn *et al.*, 1985). Daher wurde für pflanzliche LOXs eine neue Einteilung in zwei Gruppen vorgeschlagen, die auf Homologien in ihren cDNA-Sequenzen basieren. So unterscheidet man Enzyme ohne (LOX1-Typ) und mit chloroplastidärem

Transitpeptid (*LOX2*-Typ), wobei beide Familien untereinander einen erhöhten Grad an Sequenzhomologie aufweisen (Shibata *et al.*, 1994).

Trotz der weiten Verbreitung von LOXs in Pflanzen und ihrer intensiven Bearbeitung seit mehr als sechzig Jahren, beginnt man die physiologische Funktion erst für wenige LOXs zu verstehen (s. 3.) (Bell *et al.*, 1995, Feussner *et al.*, 1997a, Rance *et al.*, 1998). Charakteristisch für alle LOXs ist ihre hohe Homologie auf der Ebene ihrer Aminosäuresequenz. Sie sind somit nur schwer zu unterscheiden. Darüber hinaus ist keine Verwandtschaft zu anderen Proteinen nachweisbar. Dies gelang bisher selbst aufgrund von neuerdings verfügbaren Proteinstrukturen nicht (Prigge *et al.*, 1996). Auch die Tatsache, daß LOXs in Pflanzen als Multigenfamilie vorkommen, erschwert ihre Unterscheidung. So sind bisher, z. B. aus Sojabohne, 12 verschiedene cDNAs bzw. Gene isoliert worden, die für LOXs kodieren (Shibata, 1996). Im Fall der Kartoffel geht man sogar von 30-40 LOX-Genen aus. Hier wird die enorme Vielzahl von LOX-Genen für die Unterscheidung von Kartoffelsorten verwandt (Bachem *et al.*, 1996). Die Regulation der Expression von LOX-Genen kann darüber hinaus in einer Zelle einerseits von einem entwicklungspezifischen Programm und/oder durch abiotischen oder biotischen Streß bestimmt werden (Saravitz & Siedow, 1995, Saravitz & Siedow, 1996). Zusätzlich können extrem unterschiedliche enzymatische Aktivitäten in verschiedenen Geweben bzw. während ihres Auftretens innerhalb eines Gewebes vorkommen. Insbesondere das Vorkommen mehrerer LOXs in einer Zelle erschwert die Zuordnung verschiedener Formen zu distinkten physiologischen Funktionen (Feussner & Kindl, 1994, Grayburn *et al.*, 1991).

Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten bei der Bearbeitung von möglichen physiologischen Funktionen wurden LOXs im Rahmen dieser Arbeit erstmalig mit Hilfe von zwei sich ergänzenden Ansätzen analysiert. Im ersten Fall wurde dazu die inter- und intrazelluläre Lokalisation bestimmter LOXs in einem Gewebe analysiert (Kapitel 2). Hier sollte aufgrund ihres Vorkommens an oder in entsprechenden Organellen bestimmter Zellen eines definierten Entwicklungsstadiums (Keimung) oder nach abiotischem Streß (Jasmonat- oder Sorbit-Behandlung des Gerstenblattes) auf eine Funktion dieser LOXs geschlossen werden. Im zweiten Ansatz wurde das endogene Vorkommen solcher Metaboliten im gesamten Gewebe oder im isolierten Organell analysiert, durch die sich eindeutig die enzymatische Aktivität von LOXs *in vivo* zurückverfolgen läßt (Kapitel 3). Mit diesem Ansatz sollte erstmalig in Pflanzen

auf die endogenen Substrate von LOXs geschlossen werden, um dann über ihren weiteren Metabolismus auf physiologische Funktionen bestimmter LOXs zu schließen.

## **2. Intrazelluläres Vorkommen**

Das Vorkommen von LOXs in einer Pflanze und darüber hinaus in einzelnen Geweben und Zellen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Teilen der Pflanze, ihren Entwicklungsstadien und in Abhängigkeit von externen Stimuli beträchtlich (Rosahl, 1996). Als Unterscheidungshilfe teilt man LOXs im Zusammenhang mit ihrem intrazellulären Vorkommen in solche Enzyme ein, die löslich oder an Membranen gebunden sind.

Lösliche LOXs werden besonders in Keimlingen oder reifenden Samen in großen Mengen gebildet, wo sie im Cytosol lokalisiert sind (Rosahl, 1996). Bis heute gibt es keinen gesicherten Hinweis auf eine bestimmte physiologische Funktion dieser Enzyme. In späteren pflanzlichen Entwicklungsstadien findet man lösliche LOXs, insbesondere in Blättern, in der Vakuole (Tranbarger *et al.*, 1991), im Zellkern (Feussner *et al.*, 1995a) und im Chloroplasten (Bell *et al.*, 1995, Feussner *et al.*, 1995a, Heitz *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 1994, Royo *et al.*, 1996). In Sojabohnen scheinen vakuoläre LOXs eine Funktion als Stickstoffspeicherproteine zu übernehmen (Tranbarger *et al.*, 1991). Im Falle der chloroplastidären LOXs ist ihre Beteiligung an der Biosynthese von Jasmonaten dadurch eindeutig nachgewiesen worden, daß LOX-, „antisense“-Pflanzen, die einen erheblich reduzierten Gehalt an diesen LOX-Proteinen enthielten, nach Verwundung kein Jasmonat mehr bilden konnten (Bell *et al.*, 1995).

Für das Vorkommen von partikulären LOXs zeichnet sich noch kein einheitliches Bild ab. Sie werden in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsstadien in verschiedenen Organen gefunden. Im Keimling sind sie an der Plasmamembran (Nellen *et al.*, 1995) und an der Membran der Lipidkörper detektiert worden (Feussner & Kindl, 1992, Radetzky *et al.*, 1993). In Blättern, Blüten und Früchten wurden sie an der Hüll- und Thylakoidmembran des Chloroplasten gefunden (Blee & Joyard, 1996, Bowsher *et al.*, 1992, Ealing, 1994). Mögliche Funktionen dieser Enzyme werden in den Kapiteln 3 und 5 diskutiert.

Zur Beantwortung der Frage nach einer möglichen Rolle von LOXs im Lipidstoffwechsel der Pflanze wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Entwicklungsstadien bearbeitet, die sich durch einen erhöhten Katabolismus von PUFAs, den Substraten von LOXs, auszeichnen: die

Keimung und die Seneszenz (Gerhardt, 1993, Thomas, 1986). Die Keimung, insbesondere fettreicher Samen, zeichnet sich dadurch aus, daß als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle Triacylglycerine mobilisiert werden (Gerhardt, 1993). Lipidkörper stellen die Speicherorganellen für Triacylglycerine in Pflanzen dar (Huang, 1994). Sie besitzen als einziges Organell eine Membran aus einer einzigen Lipidschicht, die einen Triacylglycerintropfen in ihrem Inneren umgibt. Ihre Proteinausstattung ist vergleichsweise einfach und beschränkt sich auf Strukturproteine und wenige Enzyme in ihrer Membran. Während der Biogenese dieses Organells, z. B. während der Samenreifung, werden insbesondere die für dieses Stadium charakteristischen Strukturproteine, die Oleosine, synthetisiert (Huang, 1996). Der Abbau der Lipidkörper, z. B. während der Keimung, geht mit der Bildung anderer spezifischer Proteine einher (Kindl, 1997). Unter ihnen befindet sich bereits eine, in einem sehr frühen Stadium der Keimung, den ersten 24 Stunden, *de novo* synthetisierte LOX (Feussner & Kindl, 1994). Vergleicht man das intrazelluläre Vorkommen von LOXs in den Kotyledonen von Gurkenkeimlingen verschiedenen Alters mit Hilfe von immunocytoologischen Methoden, ergibt sich ein temporär differenziertes Vorkommen. Während in trockenen bzw. für eine Stunde keimenden Gurkensamen keine LOXs nachweisbar sind, findet man in Kotyledonen in für einen Tag gekeimten Samen eine LOX, die spezifisch an den Membranen der Lipidkörper lokalisiert ist (Feussner *et al.*, 1996). Bereits einen Tag später ist eine spezifische intrazelluläre Zuordnung von LOXs zum Lipidkörper nicht mehr möglich, da neu hinzugekommene cytosolische LOXs dominieren. Das zeitlich und räumlich spezifische Vorkommen einer LOX an den Membranen der Lipidkörper, bereits zu Beginn des Abbaus dieser Organellen und vor dem Auftreten von LOXs in anderen Orten der Zelle, ist bemerkenswert. Es kann als Anzeichen einer spezifischen Funktion dieser Lipidkörper-LOX bei der Mobilisierung der Speicherlipide des Lipidkörpers gewertet werden. In dieser vorläufigen Arbeitshypothese wird dieser LOX eine ähnliche Funktion zugerechnet, wie der LOX im reifenden Retikulozyten. Letztere ist am Abbau der mitochondrialen Membranen dieser Zellen beteiligt (Schewe & Kühn, 1991).

Gerstenblätter zeigen nach Behandlung mit Jasmonsäure oder ihrem Methylester (JM) einen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp (Wasternack & Parthier, 1997). Sein Merkmal ist eine Vergilbung der Blätter, und er geht einher mit dem Abbau chloroplastidärer Membranen und der Induktion sogenannter Jasmonat-induzierter Proteine (Hause *et al.*, 1994). Mindestens drei dieser Proteine sind LOXs. Sie haben molekulare Massen von 92, 98 und 100 kDa (LOX-92,

LOX-98, LOX-100) (Feussner *et al.*, 1995b). Alle drei LOXs unterscheiden sich im zeitlichen Verlauf ihrer Induktion durch JM. Dabei wird LOX-100 zuerst und am stärksten induziert. Immunocytoologische Analysen ergaben, daß alle drei LOXs in den Chloroplasten der Mesophyllzellen der Blätter lokalisiert sind (Feussner *et al.*, 1995a). Vergleichende Analysen in Blättern von *Arabidopsis* zeigten die Induktion von nur einer chloroplastidären LOX. In Blättern der Sojabohne findet man jedoch ein komplexeres Bild vor. In unbehandelten Blättern ist LOX in der Vakuole der paraveinalen Mesophyllzellen, in den Bündelscheidenzellen, im Cytosol und im Zellkern nachweisbar. Durch Behandlung mit JM werden hier zwei LOXs induziert, die zusätzlich im Cytosol der Schwammesophyllzellen nachweisbar sind (Feussner *et al.*, 1995a). Während das komplexe Vorkommen von LOXs in Blättern der Sojabohne eine Zuordnung zu möglichen physiologischen Funktionen sehr erschwert, deutet das spezifische Vorkommen einer bzw. mehrerer LOXs in den Chloroplasten von *Arabidopsis* bzw. Gerste auf eine spezifische Funktion hin, etwa beim Abbau der darin enthaltenen Thylakoidmembranen.

### **3. Physiologische Substrate und Metabolite - der Lipoxygenase-Reaktionsweg**

Seit dem Beginn der Arbeiten über pflanzliche LOXs (Andre & Hou, 1932) nahm man an, daß ihr natürliches Substrat ausschließlich freie PUFAs darstellten. Erst in neueren Arbeiten zeigte sich bei Umsetzungen von Phospholipiden oder Lipidgemischen aus Membranpräparationen mit LOXs aus Samen der Sojabohne, daß veresterte PUFAs *in vitro* auch Substrate für LOXs darstellen können (Brash *et al.*, 1987, Maccarrone *et al.*, 1994). Ein wichtiger Beitrag zur Analyse der physiologischen Funktion pflanzlicher LOXs konnte im Rahmen der hier zusammengefaßten Arbeiten erbracht werden. Hier wurde erstmals *in vivo* die Umsetzung von in Triacylglycerinen veresterten PUFAs zu deren Hydroperoxidderivaten und damit die direkte Beteiligung von LOXs an der Bildung von Lipidperoxidationsprozessen unter physiologischen Bedingungen beschrieben (s. 3.1) (Feussner *et al.*, 1995c). Seit dieser Beobachtung sind eine Vielzahl von Lipiden, die PUFAs enthalten, als Substrate für pflanzliche LOXs in Betracht zu ziehen.

In Pflanzen werden die durch LOXs gebildeten Fettsäurehydroperoxide (Abb. 2, z. B. Hydroperoxylinolsäure, HPODE) sehr schnell durch eine Vielzahl von Enzymreaktionen



weiter umgesetzt (s. Abb. 2.) (Feussner & Wasternack, 1998, Rosahl, 1996). Als besonders gut untersuchte Verbindungen sind die C<sub>6</sub>- und C<sub>9</sub>-Aldehyde und die Jasmonate zu nennen. Bis jetzt sind sechs Enzyme beschrieben, die Fettsäurehydroperoxide umsetzen und damit um LOX-Produkte konkurrieren. Daher sind Kenntnisse zur „Verzweigung“ des Stoffwechsels nach der LOX-Reaktion wichtig für das Verständnis des Metabolismus von PUFAs. Als erstes Enzym wurde Allenoxid-Synthase (AOS) oder Hydroperoxid-Dehydrase isoliert und charakterisiert (Song & Brash, 1991). Es ist das bisher am Besten untersuchte Enzym und gehört zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme der Unterfamilie *CYP74A*. Sein Reaktionsprodukt ist ein Allenoxid, das spontan in Ketole zerfallen oder im Falle von (13S)-Hydroperoxylinolensäure zur 12-Oxophytodienonsäure zyklisiert werden kann (Song & Brash, 1991). Die letztgenannte Verbindung ist bei enzymatischer Bildung die Vorstufe der Jasmonsäure, die den Pflanzenhormonen zugerechnet wird. Ein weiteres Enzym ist Hydroperoxid-Lyase (HPL). Es spaltet die Fettsäurehydroperoxide in Aldehyde und  $\omega$ -Ketofettsäuren (Matsui, 1998). HPL-cDNAs wurden kürzlich aus *Arabidopsis* und Pfeffer isoliert. Ihre Analyse erbrachte ebenfalls die Zuordnung dieses Enzyms zu den Cytochrom-P450-Enzymen. Darüber hinaus bilden sie mit den AOS eine gemeinsame Unterfamilie, *CYP74A* bzw. *CYP74B*. Bei dem dritten gut charakterisierten Enzym handelt es sich um eine Peroxygenase (Blee & Schuber, 1990). Sie katalysiert Umsetzungen zu Hydroxy-, Epoxy- und  $\beta$ -Hydroxyepoxyfettsäuren. Die Epoxygruppen können anschließend zu Dihydroxygruppen hydrolysiert werden, so daß Di- und Trihydroxyfettsäuren entstehen (Hamberg, 1993). Dieses Enzym wurde besonders in Keimlingen der Sojabohne charakterisiert. Seine Reaktionsprodukte wurden aber auch in einer Vielzahl anderer Pflanzen gefunden. Weiterhin können LOXs selbst ihre Produkte weiter umsetzen. Diese oxidieren bei Sauerstoffmangel die Fettsäurehydroperoxide zu den entsprechenden Ketoderivaten (Abb. 2, z. B. Ketolinolsäure, KODE) (Kühn *et al.*, 1991b). Schließlich sind noch zwei weniger gut charakterisierte Enzyme zu nennen, die Hydroperoxid-Reduktase (s. 3.2) und die Divinylether-Synthase (DES) (Feussner *et al.*, 1998a, Grechkin, 1998).

Über die Regulation des LOX-Reaktionsweges, insbesondere unter Berücksichtigung der genannten Verzweigungen, gibt es noch keine Befunde. Wenige Daten existieren über das organspezifische Vorkommen in Pflanzen (Blee & Joyard, 1996). Anhaltspunkte zur Funktion der Produkte des LOX-Reaktionsweges, die man unter dem Oberbegriff „Oxylipine“ zusammenfaßt, ist bisher auf wenige Verbindungen begrenzt. Das meiste Wissen ist über die

Entstehung und Rolle von Jasmonaten vorhanden (Creelman & Mullet, 1997, Wasternack & Parthier, 1997).

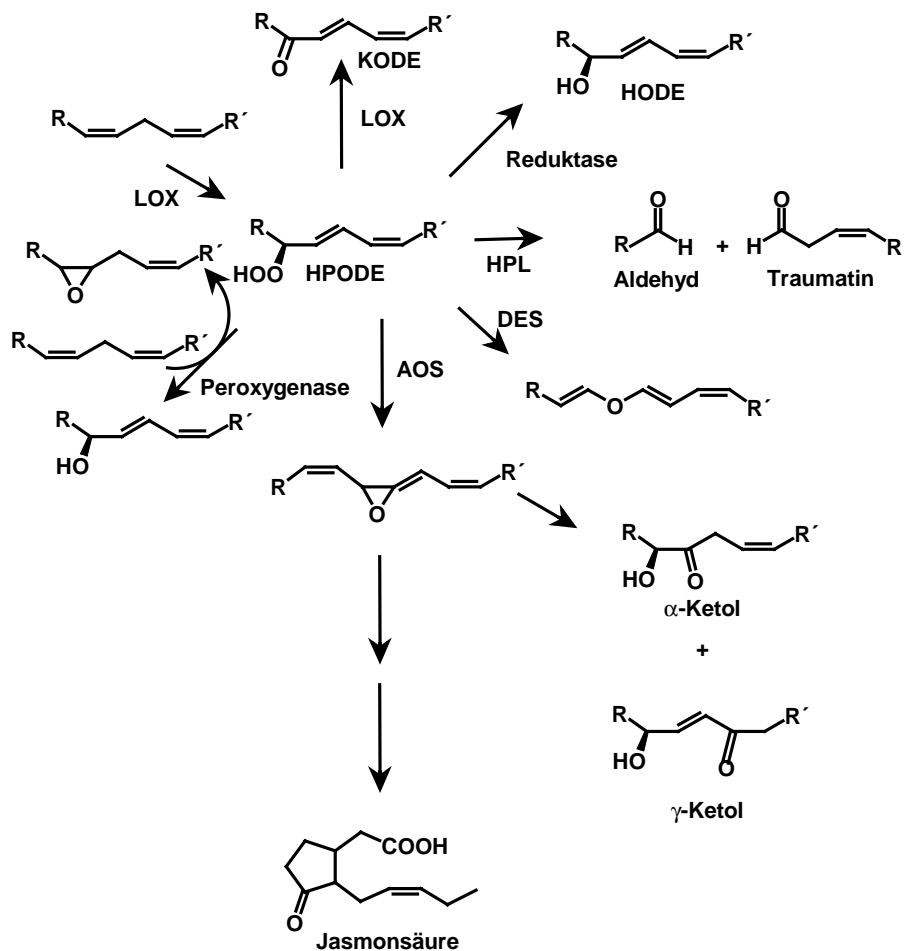


Abb.2: Der LOX-Reaktionsweg (HPL, Hydroperoxid-Lyase; DES, Divinylether-Synthase; AOS, Allenoxid-Synthase; KODE, Ketolinolsäure; HODE, Hydroxylinolsäure; HPODE, Hydroperoxylinolsäure).

### 3.1. Synthese von Hydroperoxy- und Ketokonjugierten Fettsäuren - die Lipoxygenase-Reaktion

Generell katalysieren LOXs die Umsetzung von PUFAs zu den entsprechenden Hydroperoxidderivaten (s. Kapitel 1) (Gardner, 1991). Das endogene Vorkommen der aus dieser Reaktion resultierenden Lipidhydroperoxide ist in Pflanzen nur wenig untersucht worden (Rosahl, 1996). Eine Ausnahme stellen Analysen der Triacylglycerinfraction isolierter Lipidkörper aus Gurken- und Sonnenblumenkeimlingen dar. In ihnen gelang kürzlich erstmals in Pflanzen der Nachweis von aus der LOX-Reaktion resultierenden Triacylglycerinderivaten, die ein, zwei oder drei Moleküle von (13*S*,9*Z*,11*E*)-13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure

enthalten (Feussner *et al.*, 1997b). Aufgrund der aus diesem Befund resultierenden Eigenschaften läßt sich die LOX des Lipidkörpers funktionell deutlich von anderen pflanzlichen LOXs unterscheiden (s. Kapitel 4) (Feussner & Kindl, 1994). Sie ist der LOX aus Retikulozyten des Kaninchens sehr ähnlich. Untersuchungen zur Zusammensetzung der Lipide von Keimblättern der Gurke haben gezeigt, daß die Triacylglycerinfraktion zu 70 - 80 % Linolsäure enthält. Diese zweifach ungesättigte Fettsäure ist daher nicht nur die dominierende Fettsäure dieses Gewebes, sondern auch das Substrat der dort lokalisierten LOX. Darüber hinaus konnten alle JM-induzierten, chloroplastidären LOXs der Gerste ebenfalls als 13-LOXs mit einem sauren pH-Optimum identifiziert werden (Kohlmann *et al.*, 1999).

Existiert Sauerstoffmangel im Gewebe, besitzen LOXs außerdem eine Hydroperoxidaseaktivität (Garssen *et al.*, 1971). Unter diesen Bedingungen setzen sie die entstandenen Fettsäurehydroperoxide zu einem komplexen Gemisch aus Hydroxyepoxyfettsäuren, oxidierten und nicht-oxidierten Fettsäuredimeren und der Hauptkomponente den Ketokonjudienfettsäuren um (vergl. Abb. 6, anaerober Zyklus) (Garssen *et al.*, 1976, Garssen *et al.*, 1971, Kühn *et al.*, 1991b). Einige pflanzliche LOXs, wie LOX-2 aus Sojabohne oder LOX-1 aus Erbse, besitzen diese Hydroperoxidaseaktivität sogar bei normalem Sauerstoffpartialdruck (Axelrod *et al.*, 1981, Kühn *et al.*, 1991a). In der Regel beträgt aber der Anteil an detektierbaren Ketokonjudienfettsäuren unter physiologischen Bedingungen etwa 5 - 10 % bezogen auf die nachweisbaren Fettsäurehydroperoxide (Feussner *et al.*, 1997b).

### **3.2. Synthese von Hydroxykonjudienfettsäuren - der Reduktase-Reaktionsweg**

Durch den Nachweis von Lipidhydroperoxiden *in planta*, und ihre Bildung durch eine LOX (Feussner *et al.*, 1997b), stellt sich die Frage nach ihrem weiteren Katabolismus im LOX-Reaktionsweg (vergl. Abb. 2). Im Falle der Gurke erbrachte die Suche nach möglichen Abbauprodukten während der ersten vier Tage der Keimung den Nachweis einer drastischen Zunahme von freier (13*S*,9*Z*,11*E*)-13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure im Cytosol (Feussner *et al.*, 1995c). Außerdem gaben isolierte Lipidkörper identischer Keimungsstadien überwiegend diese Fettsäure an ihre Umgebung ab (Feussner *et al.*, 1995c). Diese Ergebnisse sprechen für folgende Arbeitshypothese zum Abbau von in den Speicherlipiden enthaltenen

PUFAs in Gurkenkeimlingen: initialer Schritt ist die Umsetzung von veresterter Linolsäure der Triacylglycerine durch eine spezifische Lipidkörper-assozierte LOX zu (13S)-Hydroperoxyderivaten. Ihr folgt die Hydrolyse durch eine Lipase (Balkenhohl *et al.*, 1998), da in der Fraktion der Speicherlipide ausschließlich die Hydroperoxyderivate angetroffen werden (Feussner *et al.*, 1997b), der sich die Reduktion zu (13S)-Hydroxyderivaten anschließt (Feussner *et al.*, 1998a). Nur diese vergleichsweise stabilen und ungiftigen Verbindungen stellen anschließend das endogene Substrat der  $\beta$ -Oxidation im Stadium der Keimung dar (Abb. 3) (Feussner *et al.*, 1997a). Zur Untermauerung dieser Arbeitshypothese wurden fettreiche Samen anderer Pflanzen, wie Tabak, Soja, Sonnenblume und Raps untersucht. Auch sie zeigten ein zeitabhängiges Vorkommen von (13S)-Hydroxylinolsäure im Verlauf der Keimung (Feussner *et al.*, 1998b, Feussner *et al.*, 1995c). Dies spricht dafür, daß der bisher allgemein akzeptierte Abbauweg von Speicherlipiden im Verlauf der Keimung nicht durch eine Lipase initiiert wird (Huang, 1993), sondern durch eine oxidative Modifikation mittels einer hoch spezifischen Lipidkörper-LOX ausgelöst wird. Eine interessante Erweiterung ist die Annahme, daß es sich bei dem vorgeschlagenen Abbauweg um eine allgemeine Reaktionsabfolge zur Auslösung des Katabolismus von in Lipiden veresterten PUFAs bei Pflanzen handelt.

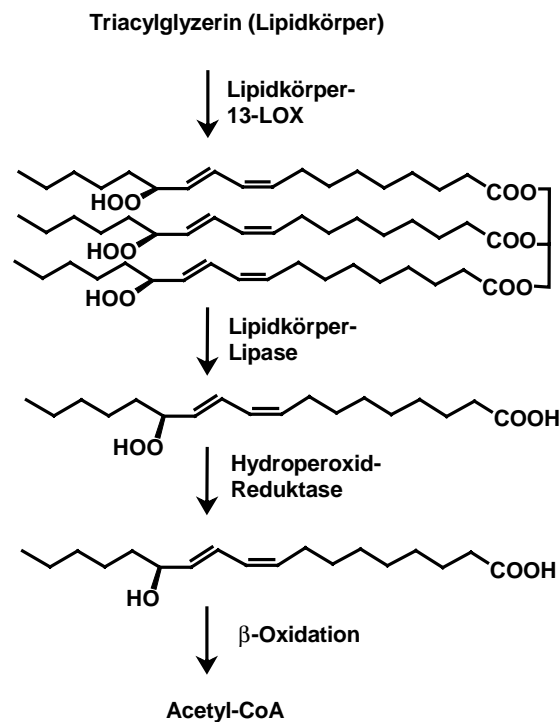


Abb. 3: Modell des Abbaus von PUFAs in Pflanzen (Reduktase-Reaktionsweg).

Der Reduktase-Reaktionsweg konnte nicht nur in Keimlingen von Ölsaaten nachgewiesen werden. In Embryonen von Gerstenkeimlingen ist ebenfalls eine 13-LOX, LOX C, nachweisbar, die bevorzugt veresterte Linolsäurereste umsetzt. Das über den Verlauf der Keimung zunehmende endogene Vorkommen von (13S)-Hydroxylinolsäure in den Triacylglycerinen, deutet auch hier auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Mobilisierung der Speicherlipide hin (Holtman *et al.*, 1997). Außer in Keimlingen ist der Reduktase-Reaktionsweg aber auch in Blättern nachweisbar. So wurde einerseits die Aktivität einer Hydroperoxid-Reduktase in Hüllmembranen isolierter Erbsenchloroplasten nachgewiesen und andererseits das durch JM induzierbare endogene Vorkommen von Hydroxyfettsäuren in Gerstenblättern gezeigt (Bachmann *et al.*, 1998, Blee & Joyard, 1996, Kohlmann *et al.*, 1999). Im Falle der Gerste ist die Herkunft dieser Derivate noch nicht geklärt, aber ihre Akkumulation erfolgt parallel mit dem Abbau der Galaktolipide. Somit könnte die Linolensäure, die Hauptbestandteil dieser Membranlipide ist, durch chloroplastidäre LOXs abgebaut werden (s. Kapitel 5) (Feussner & Wasternack, 1998, Vörös *et al.*, 1998).

### **3.3. Synthese von Aldehyden und Traumatin - der Hydroperoxid Lyase-Reaktionsweg**

Neben dem Reduktase-Reaktionsweg stellen die Umsetzungen von Fettsäurehydroperoxiden durch HPL und die ihr nachfolgenden Enzyme eine weitere wichtige Reaktionssequenz im pflanzlichen Lipidkatabolismus dar (Hatanaka *et al.*, 1995) (Abb. 4). HPL spaltet die Fettsäurehydroperoxide von Linol- bzw. Linolensäure in den gesättigten Aldehyd Hexanal oder in ungesättigte (3Z)-Aldehyde und  $\omega$ -Ketofettsäuren (Matsui, 1998). Während die (3Z)-Aldehyde einen Verzweigungspunkt in diesem Reaktionsweg darstellen, ist über den Verbleib der  $\omega$ -Ketofettsäuren bisher sehr wenig bekannt (Grechkin *et al.*, 1990). Einerseits können sie direkt durch die Einwirkung von Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zu den (3Z)-Alkoholen reduziert werden, die mit kurzkettigen Karbonsäuren flüchtige Ester bilden können (Hatanaka *et al.*, 1995). Außerdem können (3Z)-Aldehyde durch (3Z):(2E)-Enoyl-Isomerasen zu (2E)-Aldehyden umgewandelt werden (Noordermeer *et al.*, 1999, Phillips *et al.*, 1979). Diese können wiederum durch ADHs zu (2E)-Alkoholen reduziert und anschließend verestert werden (Abb. 4). Kürzlich wurde noch eine weitere Reaktion für (3Z)-Aldehyde vorgeschlagen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß diese Aldehyde erneut Substrate für

LOXs darstellen könnten. In der Sojabohne war die Bildung von (2*E*)-4-Hydroperoxy-2-aldehyden durch LOXs nachweisbar (Gardner & Grove, 1998). Diese Aldehyde werden anschließend durch eine Peroxygenase zu (2*E*)-4-Hydroxy-2-aldehyden reduziert (Gardner & Hamberg, 1993). Es kann aber bisher nicht ausgeschlossen werden, daß alternativ die Bildung von (2*E*)-4-Hydroxy-2-aldehyden unspezifisch über autooxidative Prozesse analog eines für Säugetiere vorgeschlagenen Biosyntheseweges erfolgt (vergl. Abb. 4) (Pryor & Porter, 1990). Zur intrazellulären Lokalisation des HPL-Reaktionsweges ist bisher nur wenig bekannt, da spezifische Antikörper zur Lokalisation von HPL fehlen. Ihre enzymatische Aktivität wurde jedoch in einer Anzahl von Früchten in der Mikrosomenfraktion nachgewiesen (Matsui, 1998). Für Erbsenblätter wurde das Enzym den Hüllmembranen der Chloroplasten zugeordnet (Blee & Joyard, 1996). Darüber hinaus scheinen alle weiteren Enzyme im Cytosol lokalisiert zu sein.

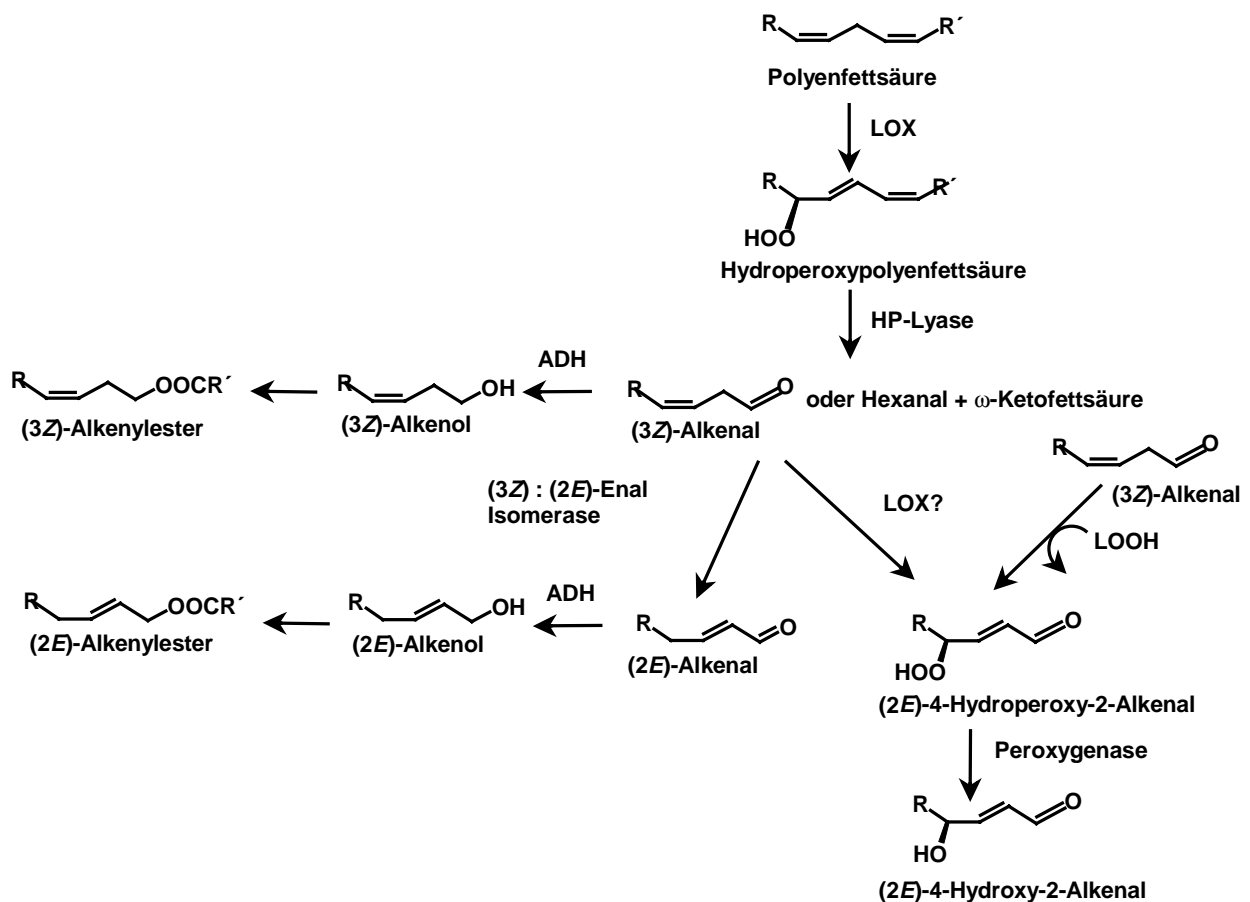


Abb. 4: Der Metabolismus von Aldehyden in Pflanzen (HPL-Reaktionsweg).

Das Vorkommen von Blattaldehyden, -alkoholen und ihren Estern als flüchtige Produkte der HPL-Reaktion in einer Vielzahl von pflanzlichen Geweben hat enorme wirtschaftliche Konsequenzen. So steigern z. B. (3Z,6Z)-Nonadienal, dem typischen Geruch von frischen Gurken, oder (2E)-Hexenal, dem Geruch von jungen Blättern, den Gebrauchswert von Lebensmitteln, weil man den Geruch jeweils als angenehm empfindet. Hexenal dagegen, ein unerwünschter Aromabestandteil der Sojabohne, ist stark wertmindernd. Dieser Aldehyd trägt wesentlich zu einem ranzigen Aroma bei. Für seine Wahrnehmung reichen bereits Konzentrationen von 4,5 ppb (Siedow, 1991). Daher beeinflussen im positiven wie im negativen Sinne diese Substanzen in Nahrungsmitteln über ihren Geruch oft entscheidend deren Geschmack und ihre Haltbarkeit (Matsui, 1998). Obwohl man in Pflanzen eine zunehmend genauere Vorstellung über die Biosynthese dieser Verbindungen hat und ihr Vorkommen in der Gasphase, die eine Pflanze umgibt, sicher nachgewiesen wurde (Hatanaka *et al.*, 1995) (Abb. 4), ist über ihr mögliches endogenes Vorkommen bzw. über eine Funktion sehr wenig bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese hochreaktiven Produkte des HPL-Reaktionsweges von möglichen Reaktionspartnern ihrer Umgebung sofort umgesetzt werden. Dadurch stellen sich zwei Fragen: (1) Ist die Synthese dieser Verbindungen der Bestandteil eines physiologischen Regelprozesses? (2) Entstehen diese Verbindungen durch Streß oder Alterung als Fragmente von PUFAs, die durch Oxidationsreaktionen im Zuge des Membranabbaus freigesetzt werden? Für die letztere Vorstellung sprechen eine Anzahl von Befunden bei Säugetieren. Hier wird das Vorkommen eines dieser Aldehyde, des (2E)-4-Hydroxy-2-nonenals (HNE), als Indiz für streßbedingte Oxidationsprozesse von Membranen angesehen, und das Vorkommen von HNE-Protein-Konjugaten konnte in oxidativ gestreßten Hepatozyten, Tumoren, arteriosklerotischen Läsionen und defekten Phagosomen belegt werden (Quinn *et al.*, 1995, Toyokuni *et al.*, 1994, Uchida *et al.*, 1993). Die erhobenen Befunde gehen davon aus, daß die detektierten Protein-Konjugate unspezifisch gebildet werden, die konjugierten Proteine ohne Funktion sind und anschließend abgebaut werden. Im Falle der Pflanze kann dies derzeit nicht beantwortet werden. Im Gegensatz zum tierischen System könnte es in Pflanzen eine gerichtete Biosynthese dieser Aldehyde geben (Gardner & Grove, 1998, Gardner & Hamberg, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kürzlich das endogene Vorkommen der oben beschriebenen Aldehyde in Gerstenblättern belegt werden (Kohlmann *et al.*, 1999). In pflanzlichen Zellkulturen wurde (2E)-4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) nachgewiesen, und die Autoren

vermuten, daß ein hoher intrazellulärer Gehalt an HNE in diesen Kulturen mit einer hohen embryogenen Kompetenz der Zellen einhergeht (Deighton *et al.*, 1997). Hier wurden Gerstenblätter im Verlauf ihrer Behandlung mit JM untersucht. Es zeigte sich, daß ca. 78 % der Enzymaktivität, die Fettsäurehydroperoxide metabolisierte, auf die Enzymaktivität einer oder mehrerer HPLs zurückzuführen war (Kohlmann *et al.*, 1998). Darüberhinaus konnten (2*E*)-4-Hydroxy-2-hexenal (HHE), Hexanal, und (2*E*)-Hexenal eindeutig in Extrakten von Gerstenblättern identifiziert und quantifiziert werden, wobei ihr endogener Gehalt durch eine Behandlung der Blätter mit JM deutlich erhöht wurde (Kohlmann *et al.*, 1999). Durch diese Untersuchungen wurde erstmalig die Bildung von HHE in Pflanzen gezeigt. In Bezug auf sein quantitatives Vorkommen war (2*E*)-Hexenal der dominierende Aldehyd mit einem Gehalt von 45 nmol/g FG nach 24 Stunden JM-Behandlung gegenüber 1,6 nmol/g FG in unbehandelten Gerstenblättern. Im Falle der Gerste korreliert die Akkumulation der Aldehyde mit dem Abbau der Galaktolipide. Somit könnte insbesondere das HHE mit dem Abbau dieser Membranlipide in Zusammenhang stehen.

### **3.4. Synthese von Jasmonaten - der Allenoxid Synthase-Reaktionsweg**

Das Enzym AOS katalysiert die erste Umsetzung des AOS-Reaktionsweges. Er führt u. a. zur Bildung von Jasmonsäure. Nach dieser Enzymreaktion verzweigt der AOS-Reaktionsweg. Die von der AOS zu instabilen Allenoxiden umgesetzten Fettsäurehydroperoxide, zerfallen einerseits spontan in  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketole oder sie zyklisieren zu racemischer (15*Z*)-12-Oxo-10,15-phytodienonsäure (12-Oxo-PDA) (vergl. Abb. 2). Ist  $\alpha$ -Linolensäure Substrat der vorgeschalteten LOX-Reaktion, entsteht (13*S*,9*Z*,11*E*,15*Z*)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure, aus der unter sequenzieller Einwirkung mehrerer Enzyme des AOS-Reaktionsweges das Pflanzenhormon Jasmonsäure gebildet wird (Abb. 5) (Sembdner & Parthier, 1993, Vick & Zimmerman, 1987a). Zunächst wird die instabile (13*S*,9*Z*,11*E*,15*Z*)-12,13-Epoxy-9,11,15-octadecatriensäure durch die für dieses Allenoxid hoch spezifische Allenoxidcyclase (AOC) zu (9*S*,13*S*,15*Z*)-12-Oxo-9,13,15-phytodienonsäure (*cis*-[+]-12-Oxo-PDA) umgesetzt (Hamberg, 1988). Anschließend erfolgt die Reduktion der Doppelbindung im Cyclopentenonring durch eine spezifische 12-Oxo-PDA- $\Delta^{10}$ -Reduktase (OPRII) (Schaller & Weiler, 1998). Dann wird die Karbonsäureseitenkette verkürzt, indem drei  $\beta$ -



Oxidationszyklen ( $3R,7S$ )-Jasmonsäure liefern, die spontan größtenteils zu ( $3R,7R$ )-Jasmonsäure epimerisiert. Das Gleichgewicht von ( $3R,7R$ ) zu ( $3R,7S$ ) beträgt etwa 9 : 1 (Sembdner & Parthier, 1993). Neben der freien Säure sind außerdem ihr Methylester, bestimmte Aminosäurekonjugate, Glukoseester und hydroxylierte Derivate in Pflanzen bekannt (Sembdner *et al.*, 1994, Sembdner & Parthier, 1993). Die zuletzt beschriebene Reaktionsabfolge wird auch als Jasmonat-Kaskade bezeichnet (Abb. 5).

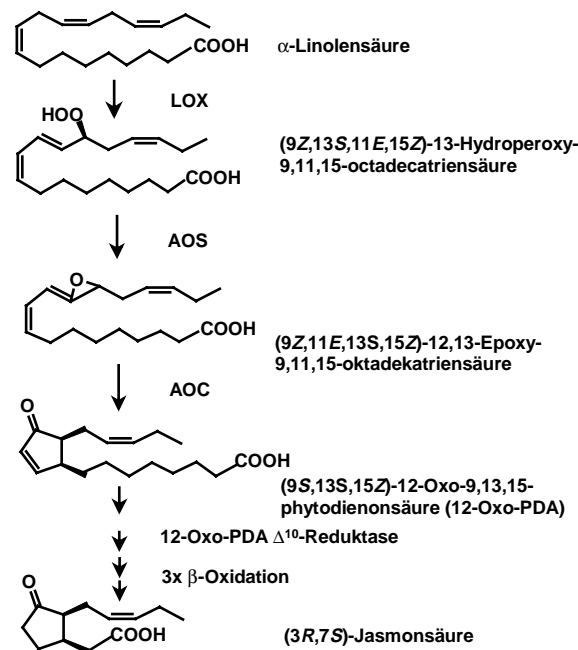


Abb. 5: Die Jasmonat-Kaskade als ein möglicher Stoffwechselweg des AOS-Reaktionsweges.

Bemerkenswert ist, daß an der Biosynthese von Jasmonsäure wahrscheinlich drei Kompartimente beteiligt sind. Während die entsprechenden LOXs, AOS und AOC im Chloroplasten lokalisiert zu sein scheinen (Blee & Joyard, 1996, Vick & Zimmerman, 1987b), ist 12-Oxo-PDA- $\Delta^{10}$ -Reduktase im Cytosol lokalisiert (Schaller & Weiler, 1997). Obwohl die abschließenden  $\beta$ -Oxidationszyklen in ihrer chemischen und enzymatischen Natur gut charakterisiert sind (Vick & Zimmerman, 1989), ist ihre intrazelluläre Lokalisation noch nicht untersucht worden. Es ist aber wahrscheinlich, daß sie in den „Mikrobodies“ lokalisiert sind, da bisher in Pflanzen keine anderen Organellen mit diesen Enzymaktivitäten identifiziert werden konnten (Gerhardt, 1993). Inwieweit die Jasmonat-Kaskade ein Spezialfall oder der unter physiologischen Bedingungen einzig vorkommende Stoffwechselweg des AOS-Reaktionsweges ist, kann derzeit noch nicht beantwortet werden. Die wenigen bisher

durchgeführten Untersuchungen deuten daraufhin, daß dieser Reaktionsweg nicht ausschließlich der Bildung von Jasmonsäure dient. So gelang in Keimlingen von Mais und Sonnenblume der parallele Nachweis mehrerer für den Verzweigungspunkt nach der AOS-Reaktion charakteristischer Metabolite. Neben den  $\alpha$ -Ketolen der Linol- und Linolensäure wurde in beiden Pflanzen die Vorstufe der Jasmonsäure 12-Oxo-PDA identifiziert (Vick & Zimmerman, 1982). Auch scheint der AOS-Reaktionsweg einer komplexen Regulation zu unterliegen, an der eine transkriptionelle Regulation der Enzyme ebenso beteiligt zu sein scheint wie auch intrazelluläre Transportprozesse (Laudert *et al.*, 1998).

Für die physiologische Funktion der Jasmonate sind vor allem ihre vielfältigen stimulatorischen oder hemmenden Wirkungen auf pflanzliche Wachstums- und Entwicklungsprozesse zu nennen. Außerdem gilt Jasmonsäure als ein zentrales Signalelement von biotischem und abiotischem Streß, wie etwa bei der Verwundung (Wasternack & Parthier, 1997). Die Frage, ob Jasmonat als hormoneller Regulator der Seneszenz wirkt oder als Streßsignal, das auch Seneszenz auslösen kann, ist derzeit nicht zu beantworten (Parthier, 1990). Die durch Jasmonate induzierte Blattseneszenz zeichnet sich insbesondere im Gerstenblatt durch folgende Merkmale aus: (1) Abbau von Chlorophyll und eine damit verbundene Reduktion der photosynthetischen Leistung, (2) Abbruch der Synthese zahlreicher Proteine einschließlich der Ribulosebisphosphat-Carboxylase, (3) Zunahme der zellulären Atmung, der Menge und Aktivität von Proteasen und Peroxidasen und (4) Synthese neuer abundant auftretender Proteine, der Jasmonat-induzierten Proteine (JIPs) (Sembdner & Parthier, 1993). LOXs scheinen im Pflanzenreich ubiquitär verbreitete JIPs zu sein (Rosahl, 1996). Im Falle der drei aus Gerstenkeimlingen bzw. Körnern isolierten cDNAs, die für LOXs kodieren, wurde für alle eine Induktion durch JM beschrieben (van Mechelen, 1998). Darüber hinaus wurde kürzlich jene cDNA isoliert, die für die chloroplastidäre LOX-100 codiert (Vörös *et al.*, 1998). Diese cDNA hat eine Länge von 3073 bp und das zugehörige Proteinprodukt besitzt 936 Aminosäurereste mit einem errechneten Molekulargewicht von 106 kDa. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Sequenzen pflanzlicher LOXs konnte sie als chloroplastidäre LOX vom LOX2-Typ identifiziert werden. Nach Expression in *E. coli* konnte diese LOX mit dem Substrat Linolsäure als 13-LOX und mit Arachidonsäure als Substrat als 15-LOX identifiziert werden. Das Enzym zeigt maximale Aktivität bei pH 7,0 mit einer Präferenz für Linolsäure. Auch diese LOX ist durch Jasmonate induzierbar, da ihre mRNA transient mit einem Maximum zwischen 12 und 18 Stunden nach JM-Behandlung von

Gerstenblattsegmenten nachweisbar ist. Bemerkenswert ist, daß sie weder durch exogene Applikation von Abscisinsäure noch durch den endogenen Anstieg von Jasmonsäure, wie er durch z. B. durch Sorbit-Behandlung von Gerstenblattsegmenten hervorgerufen wird (Lehmann *et al.*, 1995), induziert wird. Die Frage ob dieses Enzym bevorzugt das Substrat für einen der im Abschnitt 3 diskutierten Reaktionswege bereitstellt, kann derzeit nicht beantwortet werden. Eine Analyse wird dadurch erschwert, daß einerseits wenigstens drei der Jasmonat-induzierten LOXs des Gerstenblattes biochemisch nahezu nicht unterscheidbar sind (vgl. Kapitel 3.1.) (Feussner *et al.*, 1995a, Kohlmann *et al.*, 1999) und andererseits vier der sechs initialen Enzyme der verzweigenden Stoffwechselwege des LOX-Reaktionsweges (vgl. Abb. 2), d. h. LOX, Reduktase, HPL und AOS in den Hüllmembranen von Chloroplasten nebeneinander nachweisbar sind (Blee & Joyard, 1996).

### **3.5. Kartierung von Metaboliten des Lipoxygenase-Reaktionsweges**

Ein weiterer Ansatz zur Unterscheidung mehrerer LOXs, die biochemisch einander sehr ähnlich sind und am gleichen Ort in der Zelle lokalisiert sind, stellt ein Vergleich verschiedener physiologischer Situationen durch die Kartierung von Metaboliten des LOX-Reaktionsweges dar. Eine solche Untersuchung wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführt. Zunächst wurde zur Etablierung der Methode die bereits gut charakterisierte Situation während der Keimung analysiert und anschließend die gleiche Vorgehensweise für die Unterscheidung von chloroplastidären LOXs genutzt. Da die vorgestellten Analysen noch nicht publiziert sind, soll hier auf wesentliche Ergebnisse eingegangen werden, während die hierzu verwendete Methodik veröffentlicht ist (Feussner *et al.* 1995c, Kohlmann *et al.* 1999).

Die Keimung fettreicher Samen zeichnet sich dadurch aus, daß als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle Triacylglycerine mobilisiert werden (Gerhardt, 1993). Dieser Abbau der Speicherlipide geht mit der Bildung einer spezifischen Lipidkörper-assoziierten LOX einher (Feussner & Kindl, 1994). Das zeitlich und räumlich spezifische Vorkommen dieser LOX an den Membranen der Lipidkörper kann als Anzeichen einer spezifischen Funktion dieser Lipidkörper-LOX bei der Mobilisierung der Speicherlipide des Lipidkörpers gewertet werden. Während die Analyse von Metaboliten der LOX-Reaktion in isolierten Lipidkörpern des

Gurkenkeimlings bereits beschrieben worden ist (vgl. Kap. 3.1. und 3.2.), werden hier die Ergebnisse zur Metabolit-Kartierung des gesamten Keimblattes zusammengefaßt.

Verfolgt man den Gesamtgehalt an PUFAs in keimenden Gurkensamen über eine Woche (Abb. 6), so zeigt sich ein differenzierter Verlauf der Menge an Linol- und Linolensäure. Gurkensamen enthalten 350  $\mu\text{mol/g}$  FG Linolsäure und 2,5 nmol/g FG Linolensäure. Eine erste Reduktion der Linolsäuremenge auf 250  $\mu\text{mol/g}$  FG ist bereits in den ersten 24 Stunden nachweisbar. Dieser drastische Katabolismus von Linolsäure setzt sich bis zu einer Menge von 70  $\mu\text{mol/g}$  FG nach 120 Stunden fort. Diese deutliche Abnahme an Linolsäure spiegelt den Abbau der Speicherlipide in diesem Stadium wieder, deren Hauptbestandteil Linolsäure darstellt (ca. 80 %). Dagegen ist für Linolensäure, vermutlich im Rahmen ihrer einsetzenden Biosynthese, eine Zunahme bis 72 Stunden auf 12 nmol/g FG zu beobachten.

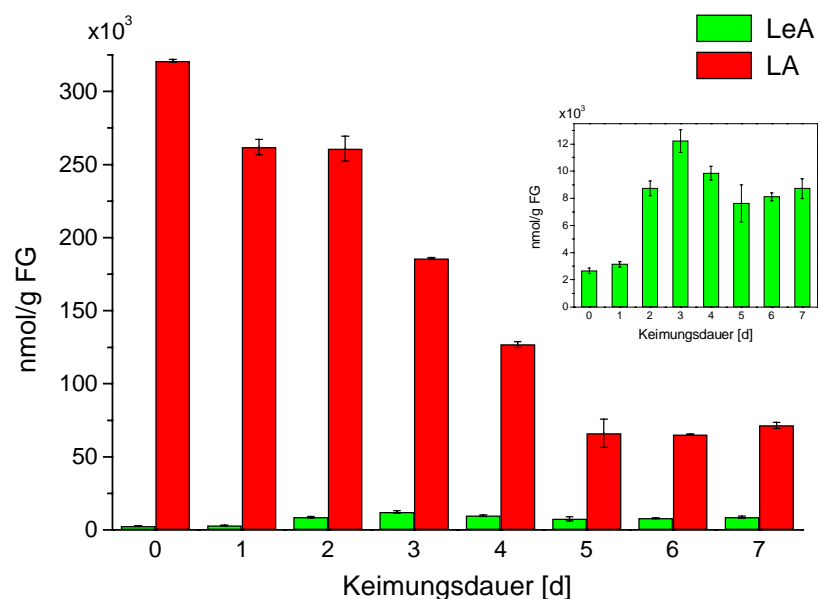


Abb. 6: Gesamtgehalt an PUFAs in Kotyledonen von keimenden Gurkensamen (LeA, Linolensäure; LA, Linolsäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

Nach der in Kapitel 3.2. formulierten und experimentell belegten Arbeitshypothese wird die in den Speicherlipiden veresterte Linolsäure zunächst durch eine 13-LOX oxidiert, um nach mehreren Umsetzungen als Hydroxy-Konjungenfettsäure in der  $\beta$ -Oxidation abgebaut zu werden. Analysiert man die gesamten Oxylipinderivate dieses Gewebes, so findet man nahezu ausschließlich das Produkt der Lipidkörper-Lipoxygenase, (13*S*,9*Z*,11*E*)-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure (13-H(P)ODE). Zu Beginn enthalten Gurkensamen 4  $\mu\text{mol/g}$  FG an

racemischem 13-H(P)ODE, welches ein vermutlich während ihrer Lagerung entstandenes Autoxidationsprodukt darstellt. Mit dem ersten Keimungstag setzt parallel zum Vorkommen der Lipidkörper-LOX und der beginnenden Abnahme von Linolsäure eine transiente Akkumulation von optisch aktivem 13-H(P)ODE in den Lipiden ein. Ab dem zweiten Tag ist am Lipidkörper eine Lipaseaktivität nachweisbar, die spezifisch 13-H(P)ODE aus den Speicherlipiden spaltet und ihre maximale Aktivität am vierten Keimungstag erreicht (Balkenhohl *et al.*, 1998). Mit der Induktion dieser Lipaseaktivität wird auch die maximale Akkumulation von 13-H(P)ODE (14  $\mu\text{mol/g}$  FG) bereits nach 48 Stunden erreicht. Interessanterweise sind zu diesem Zeitpunkt ca. 6 % der gesamten in diesem Gewebe enthaltenen Linolsäure durch die Lipidkörper-LOX umgesetzt worden.

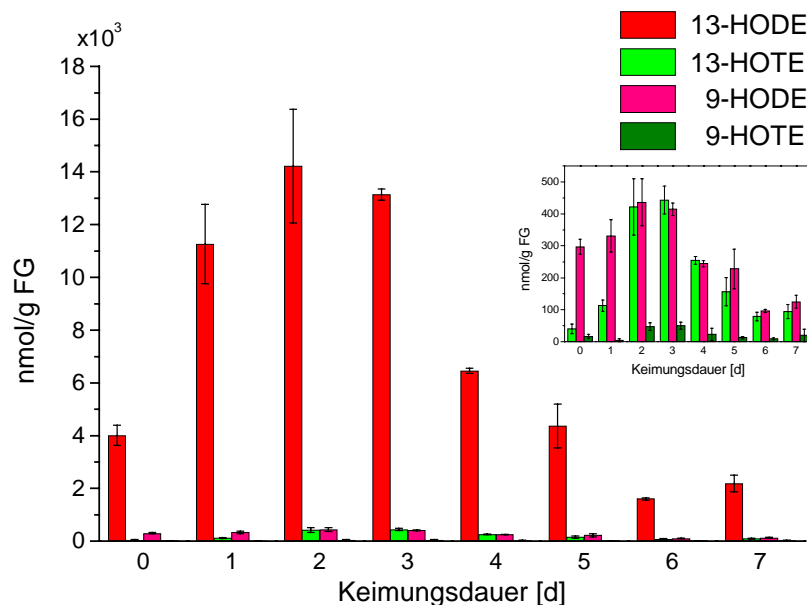


Abb. 7: Gesamtgehalt an Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren in Kotyledonen von keimenden Gurkensamen (HODE, Hydroxylinolsäure; HOTE, Hydroxylinolensäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

Der Gehalt an freien Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren wird einerseits durch die Freisetzung von 13-HODE aus den Speicherlipiden und andererseits durch die direkte Umsetzung freier PUFAs zu den verschiedenen Derivaten bestimmt. Auch in der Fraktion der freien Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren ist 13-HODE der dominierende Metabolit. Für 13-HODE und die anderen drei Derivate wird eine transiente Akkumulation mit einem maximalen Anstieg bei etwa 3 Tagen beobachtet. Dabei ist die Menge an freiem 13-HODE mit 190 nmol/g FG, im

Vergleich zu dem quantifizierten Vorkommen in allen Lipiden, um etwa 100-fach niedriger. Vergleicht man dagegen das Vorkommen der verschiedenen Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren, so wird deutlich, daß in der Lipidfraktion lediglich 13-H(P)ODE nachweisbar ist, während in der Fraktion der freien Fettsäuren alle Derivate nachweisbar sind.

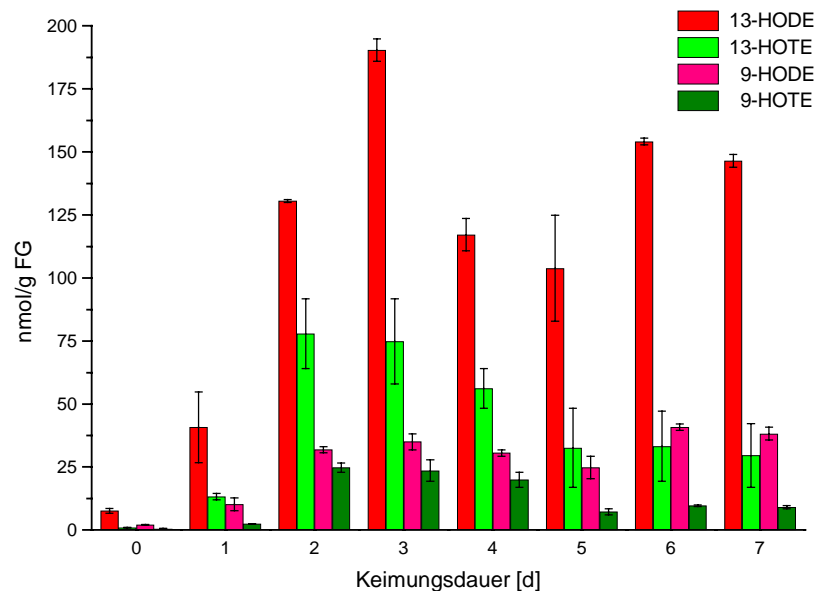


Abb. 8: Gehalt an freien Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren in Kotyledonen von keimenden Gurkensamen (HODE, Hydroxylinolsäure; HOTE, Hydroxylinolensäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

In Abb. 9 ist der Gehalt an allen quantifizierten, freien Oxylipinen zusammengefaßt. Bemerkenswert ist hier, daß 13-HODE, ein Vertreter des Reduktase-Reaktionsweges, sowie Hexanal, einem Repräsentanten des HPL-Reaktionsweges, etwa gleichermaßen preferentiell akkumulieren. Darüber hinaus ist der erstmalige Nachweis und die Quantifizierung von (2E)-4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) in Pflanzen hervorzuheben. Es akkumuliert im Verlauf der Keimung transient.

Zur weiteren Analyse der physiologischen Funktion chloroplastidärer LOXs der Gerste wurden drei unterschiedliche Behandlungsmethoden gewählt, die zu einem differenzierten Muster von LOXs auf Ebene der Proteine führten. So war der zeitliche Verlauf, die Intensität und das Muster der Isoformen im Verlauf der Induktion chloroplastidärer LOXs bei der Behandlung von Gerstenblattsegmenten mit JM, Sorbit und Salicylat unterschiedlich, wobei

eine parallele Inkubation der Blattsegmente in Wasser als Kontrollen diente (Feussner *et al.*, 1995b).

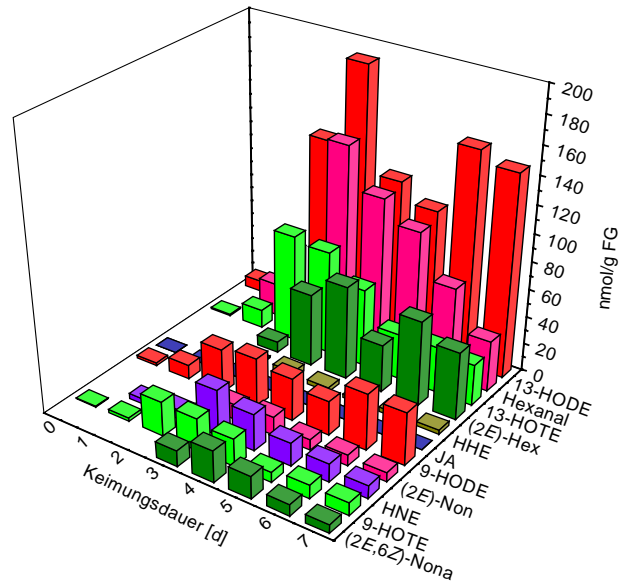


Abb. 9: Gehalt an freien Oxylipinen in Kotyledonen von keimenden Gurkensamen (HODE, Hydroxylinolsäure; HOTE, Hydroxylinolensäure; Hex, Hexenal; Non, Nonenal; Nona, Nonadienal; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

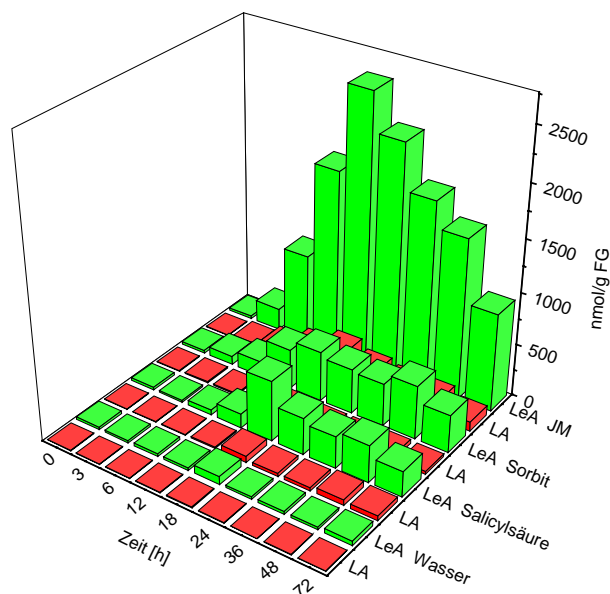


Abb. 10: Gehalt an freien PUFAs in unterschiedlich behandelten Gerstenblattsegmenten (LeA, Linolensäure; LA, Linolsäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

Verfolgt man den Gehalt an freien PUFAs (Abb. 10), so zeigt sich eine transiente Akkumulation von PUFAs. Nach 18 Stunden JM-Behandlung wird für  $\alpha$ -Linolensäure eine 100-fache Akkumulation gegenüber dem in unbehandelten Gerstenblättern nachgewiesen. Bei gleichem zeitlichem Verlauf ist sie bei Sorbit- und Salicylat-Behandlung nur etwa 20-fach. Der Gehalt an Linolsäure betrug in unbehandelten Blättern etwa ein Fünftel des Gehaltes von  $\alpha$ -Linolensäure und die Akkumulation ist insgesamt schwächer, wobei die maximalen Gehalte etwa 10-fach niedriger waren als im Fall von  $\alpha$ -Linolensäure.

PUFAs sind das Substrat von LOXs und werden durch sie zu Hydroperoxy-Konjugiertenfettsäuren umgesetzt (vgl. Abb. 2). Entsprechend den bestimmten Gehalten an freien PUFAs, ist eines der beiden möglichen Produkte aus der Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure mit LOX, die (13*S*,9*Z*,11*E*,15*Z*)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (13-HPOTE), der Hauptmetabolit. Während diese Oxylipine in unbehandelten Gerstenblättern nicht nachweisbar sind, ist ihre Akkumulation in JM-behandelten Blattsegmenten am Stärksten. Sie erreicht bei transientem Verlauf ihr maximales Vorkommen von 90 nmol/g FG nach 18 Stunden (Abb. 11). Im Falle der Sorbit- bzw. Salicylat-Behandlung ist ebenfalls eine transiente Akkumulation zu beobachten. Ihr Gehalt beträgt in Sorbit-behandelten Gerstenblättern nach 48 Stunden etwa ein Fünftel und in Salicylat-behandelten Gerstenblättern nach 18 Stunden etwa die Hälfte der Menge in JM-behandelten Blattsegmenten. Während das Verhältnis der Derivate gleicher Positionsspezifität, z. B. 13-HPOTE : 13-HPODE, dem Vorkommen der PUFAs entsprach (1 : 10), wurden Unterschiede im Verhältnis der Positionsisomeren in den verschieden behandelten Blattsegmenten detektiert (Tab. 1).

Tab 1: Verhältnis der Positionsisomeren 13-HPOTE und 9-HPOTE in den verschieden behandelten Blattsegmenten.

	Kontrolle	JM-Behandlung	Salicylat-Behandlung	Sorbit-Behandlung
13-HPOTE : 9-HPOTE	0	3 : 1	10 : 1	1 : 1

Eine mögliche Folgereaktion von Hydroperoxy-Konjugiertenfettsäuren im LOX-Reaktionsweg stellt ihre Spaltung in der HPL-Reaktion dar. Die Quantifizierung der hieraus resultierenden Aldehyde in Gerstenblattsegmenten wurde in Kapitel 3.3. zusammengefaßt. Eine wichtige Konkurrenzreaktion zu dieser Umsetzung stellt die Reduktasereaktion dar. Die Kartierung der für sie charakteristischen Metabolite, der Hydroxy-Konjugiertenfettsäuren, ist in Abb. 12



dargestellt. Bemerkenswerterweise wurde hier die stärkste Akkumulation in Salicylat-behandelten Blattsegmenten nachgewiesen, und zwar für das vorrangig akkumulierende Reduktaseprodukt (13*S*,9*Z*,11*E*,15*Z*)-13-Hydroxy-9,11,15-octadecatriensäure (13-HOTE). Der Gehalt von 13-HOTE ist nach 18 Stunden Salicylat-Behandlung etwa 1000-fach erhöht. Bei Sorbit- und JM-Behandlung ist jeweils eine transiente Akkumulation zu beobachten. Ihr Gehalt steigt nach 18 Stunden JM-Behandlung 300-fach und ist in Sorbit-behandelten Blattsegmenten nach 48 Stunden 100-fach erhöht. Das Verhältnis innerhalb der Produkte von 13-LOX entsprach auch hier dem Vorkommen der PUFAs (1 : 10) und die Unterschiede im Verhältnis der Positionsisomeren in den verschiedenen behandelten Blattsegmenten entsprachen denen der Hydroperoxy-Konjugiertenfettsäuren mit der Ausnahme, daß in Sorbit-behandelten Blattsegmenten das 13-HPOTE : 9-HPOTE-Verhältnis 2 : 1 betrug (vgl. Tab. 1).

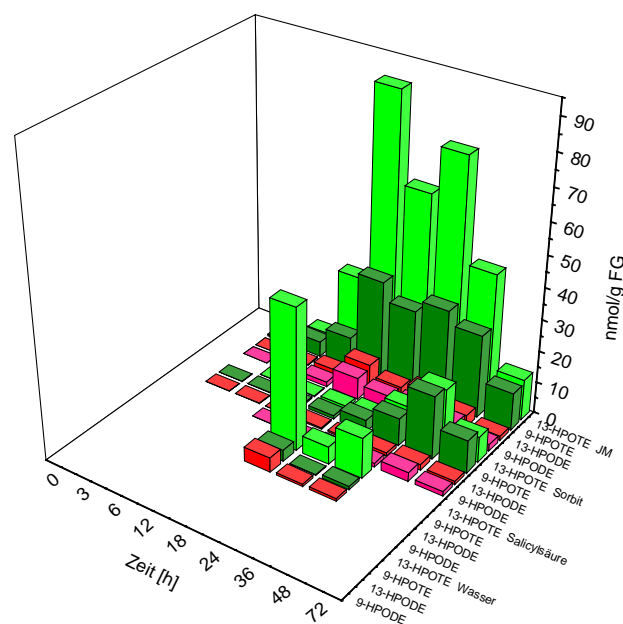


Abb. 11: Gehalt an freien Hydroperoxy-Konjugiertenfettsäuren in unterschiedlich behandelten Gerstenblattsegmenten (HPOTE, Hydroperoxylinolensäure; HPODE, Hydroperoxylinolsäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

Folgende Befunde lassen sich aus diesen Analysen ableiten: JM- bzw. Salicylat-Behandlung führen zu einer massiven Akkumulation von Lipidperoxiden. Darüberhinaus werden diese Lipidperoxide ausschließlich enzymatisch gebildet, da sie alle als *S*-Enantiomere vorliegen. Dagegen werden Regioisomere der Linolensäure, die durch Autoxidation hervorgerufen werden könnten, wie 16- bzw. 12-HPOTE, nicht angetroffen. Das preferentielle Vorkommen

von Regioisomeren der Position 13 nach JM-Behandlung bestätigt die Befunde der biochemischen Analyse der chloroplastidären LOXs als Linolsäure-13-LOXs. Bei der spezifisch durch Sorbit induzierten LOX-94 könnte es sich um eine Linolsäure-9-LOX handeln, da der Anteil von Regioisomeren der Position 9 ebenfalls nur in diesen Proben erhöht ist. Bemerkenswert ist außerdem die ungewöhnlich hohe Akkumulation von Hydroxy-Konjudienfettsäuren nach Salicylat-Behandlung. Dies könnte darauf hindeuten, daß Salicylat unter Umständen den Katabolismus der Hydroperoxy-Konjudienfettsäuren in anderen Reaktionswegen als dem Reduktaseweg inhibiert. Dagegen lassen sich keine Belege für die Arbeitshypothese finden, daß die Induktion spezifischer LOXs mit der Induktion spezifischer Reaktionswege einhergeht. Vergleicht man die absoluten Mengen des dominierenden Metaboliten des HPL-Reaktionsweges, (2*E*)-Hexenal, mit dem des Reduktaseweges, 13-HPOTE, so zeigt sich keine Bevorzugung einer der beiden Reaktionswege.

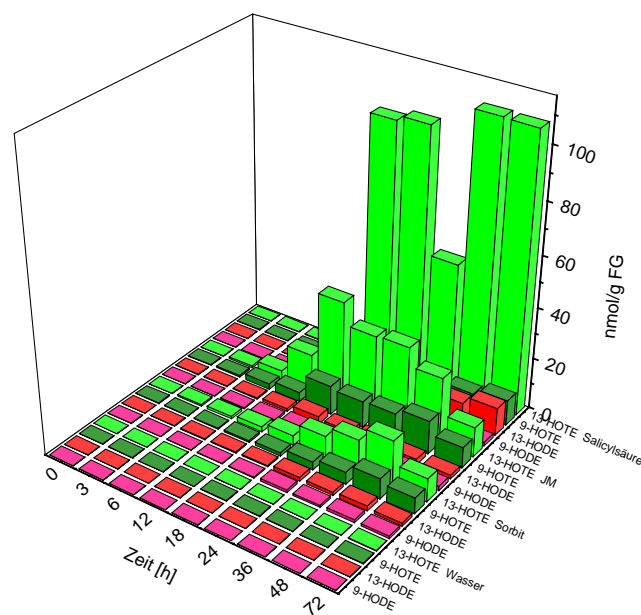


Abb. 12: Gehalt an freien Hydroxy-Konjudienfettsäuren in unterschiedlich behandelten Gerstenblattsegmenten (HOTE, Hydroxylinolensäure; HPODE, Hydroxylinolsäure; die Werte stellen den Durchschnitt aus zwei unabhängigen Experimenten dar).

#### 4. Reaktionsmechanismus und Struktur von LOXs

LOXs gehören zur Familie der Dioxygenasen. Sie enthalten pro Molekül ein direkt über fünf Aminosäureseitenketten gebundenes Eisenatom. Nach einem generell akzeptierten Modell der

Katalyse beginnt die Aktivierung des Enzyms mit der Oxidation seines Eisenatoms (De Groot *et al.*, 1975) (Abb. 6). Dies geschieht zunächst durch stöchiometrische Mengen eines beliebigen Peroxides, welches das Fe(II) in seine aktive Fe(III)-Form oxidiert (Abb. 6, Schritt a). Dann setzt ein Katalysezyklus ein, der größere Mengen an Fettsäurehydroperoxiden bildet. Sie vermögen eine zunehmende Menge an Enzym zu aktivieren. Die eigentliche Reaktion beginnt nach der Bindung eines Substratmoleküls im aktiven Zentrum mit der Abstraktion eines Protons von einer doppelt allylständigen Methylengruppe von PUFAs (vgl. Abb. 1). Dies hat die Reduktion des Eisens nach Fe(II) zur Folge (Abb. 6, Schritt b). Ob aus dem Substratmolekül ein Pentadienyl- oder Bisallylradikal entsteht, wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert (Nelson & Seitz, 1994). Unter anaeroben Bedingungen verläßt das Radikal das Enzym und bildet eine Vielzahl von sekundären Produkten (van der Heijdt *et al.*, 1993) (Abb. 6, Schritt f bzw. Schritt a und Kapitel 3.1). Unter aeroben Bedingungen reagiert molekularer Sauerstoff mit dem Radikal zu einem Fettsäurehydroperoxyradikal (Abb. 6, Schritt c). Der Zyklus wird durch die Bildung eines Hydroperoxidanions unter Oxidation des Eisens fortgesetzt (Abb. 6, Schritt d). Während das Hydroperoxidanion unmittelbar protoniert wird und das aktive Zentrum verläßt, befindet sich das Eisen wieder in der Oxidationsstufe (III) der Ausgangssituation und es kann ein neuer Katalysezyklus beginnen (Abb. 6, Schritt e).

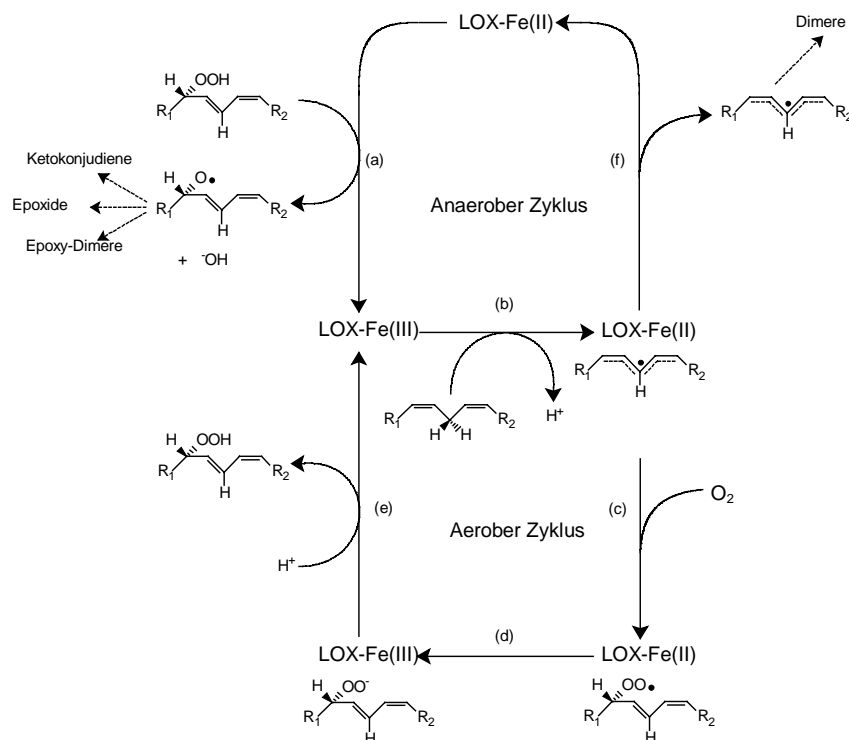


Abb. 6: Katalysezyklus von LOX nach (De Groot *et al.*, 1975).

Die Positionsspezifität von LOXs ist von zwei katalytischen Teilreaktionen abhängig: (1) der Selektivität der Position der initialen Abspaltung eines Protons (Abb. 7, „Wasserstoffabspaltung“) und (2) der Spezifität der Position der Anlagerung von molekularem Sauerstoff (Abb. 7, „Sauerstoffanlagerung“). Im Fall der Linolensäure, Arachidonsäure oder Eicospentaensäure, d. h. bei PUFAs mit mehreren doppelt allylständigen Methylengruppen ist somit die Abspaltung eines Protons an 2, 3 bzw. 4 verschiedenen Methylengruppen möglich. Anschließend kann molekularer Sauerstoff an der Position angelagert werden, die sich in [+2]- oder [-2]-Richtung in Bezug auf die initiale Abspaltung des Protons befindet (Abb. 7). Daher könnte die Umsetzung von Arachidonsäure, einer PUFA mit 3 doppelt allylständigen Methylengruppen, durch LOXs zu maximal 6 verschiedenen Positionsisomeren führen. Die Mehrzahl pflanzlicher LOXs oxygenieren aber die entsprechenden Substrate hochspezifisch an einer Position.

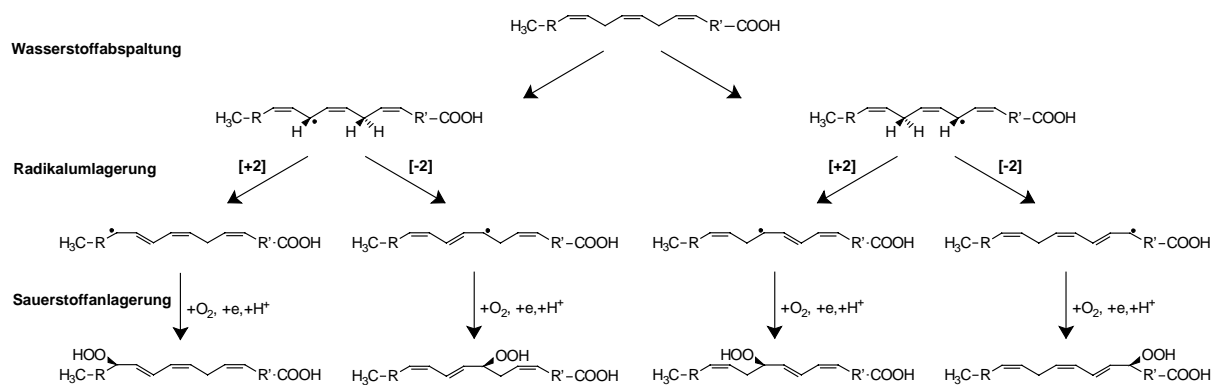


Abb. 7: Model der Regiospezifität der LOX-Reaktion bei mehreren doppelt allyl-ständigen Methylengruppen.

Die Lipidkörper-LOX aus Gurkenkotyledonen stellt hier eine Ausnahme dar. Sie besitzt eine bisher sowohl für pflanzliche wie für Säugetier-LOXs einmalige Positionsspezifität mit dem Substrat Arachidonsäure. Das gereinigte Enzym katalysiert nicht die Bildung eines Positionsisomers. Es gelang vielmehr der Nachweis der Bildung der drei Positionsisomere (15*S*,5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*)-15-Hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatetraensäure, (12*S*,5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-12-Hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraensäure und (8*S*,5*Z*,9*E*,11*Z*,14*Z*)-8-Hydroperoxy-5,9,11,14-eicosatetraensäure in einem Verhältnis von 76 : 4 : 20 (Feussner & Kühn, 1995). Damit gelang erstmals der Nachweis, daß eine LOX molekularen Sauerstoff spezifisch in entgegengesetzten Positionen anlagern kann ([+2]-Richtung: 15-HPETE, 12 HPETE; [-2]-Richtung: 8-HPETE). Interessanterweise führt die Bindung des gereinigten Enzyms an die

Membranen isolierter Lipidkörper zu einer Erhöhung der Enzymaktivität um den Faktor 4 und zu einer Veränderung der Positionsspezifität. Das membrangebundene Enzym setzt Arachidonsäure bevorzugt zu (8*S*,5*Z*,9*E*,11*Z*,14*Z*)-8-Hydroperoxy-5,9,11,14-eicosatetraensäure (< 69%) um (Feussner & Kühn, 1995).

Für die weitere biochemische Charakterisierung der Lipidkörper-LOX der Gurke wurde die inzwischen verfügbare cDNA verwendet (Höhne *et al.*, 1996). Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Fusionsprotein erstellt, bei dem der Aminoterminus des Enzyms mit einem Epitop aus sechs Histidinresten verlängert wurde. Dies diente zur Reinigung des rekombinanten Proteins mit Hilfe einer Nickel-Chelat-Chromatographie. Mit diesem Ansatz gelang es, aktives Enzym nach Kultivation in *E. coli* bei niedrigen Temperaturen und anschließender Affinitätsreinigung in Ausbeuten von 4 - 5 mg/l Bakterienkultur zu erhalten (Feussner *et al.*, 1998c). Es zeigte eine unveränderte Regiospezifität und ein pH-Optimum von pH 7,2 gegenüber seinem natürlichen Substrat Trilinolein. Anschließend wurde die Substratspezifität dieser Linolsäure-13-LOX gegenüber Trilinolein mit der einer weiteren Linolsäure-13-LOX verglichen, der LOX-1 der Sojabohne. Hier zeigte sich, daß der Umsatz von Trilinolein durch LOX-1 im Vergleich zur Lipidkörper-LOX vierfach reduziert war. Darüber hinaus erbrachte die Analyse der entstandenen Produkte deutliche Unterschiede in der Vollständigkeit der Umsetzung. Während LOX-1 Trilinolein nur in die Monohydroperoxyderivative umzusetzen vermochte, konnte im Falle der Lipidkörper-LOX eine vollständige Umsetzung von Trilinolein in die Trihydroperoxyderivative beobachtet werden (Feussner *et al.*, 1998c). Diese Eigenschaft zeigt erneut, daß die LOX des Lipidkörpers funktionell deutlich von anderen pflanzlichen Linolsäure-13-LOXs unterscheidbar ist.

Die Interpretation der Positionsspezifität von LOXs auf molekularer Ebene ist Gegenstand einer langjährigen Kontroverse (Browner *et al.*, 1998). Grundsätzlich diskutiert man zwei Modelle (Abb. 8). Gemeinsam ist beiden Modellen die Substratorientierung am aktiven Zentrum im Fall der Linolsäure-13-LOXs. Hier befindet sich der unpolare Methylterminus des Substrates am Boden der Substratbindungstasche des Enzyms. Für die Substratorientierung von Linolsäure-9-LOXs hingegen wurden zwei alternative Möglichkeiten vorgeschlagen. Das aktuellere Modell schlägt eine gegenüber 13-LOXs größere Substratbindungstasche vor, wodurch das Substrat tiefer im Enzym gebunden wird (Gillmor *et al.*, 1998) (Abb. 8A). Im

zweiten Fall wird von einer inversen Orientierung des Substrats am Bindungszentrum ausgegangen (Egmond *et al.*, 1975, Gardner, 1989) (Abb. 8B).

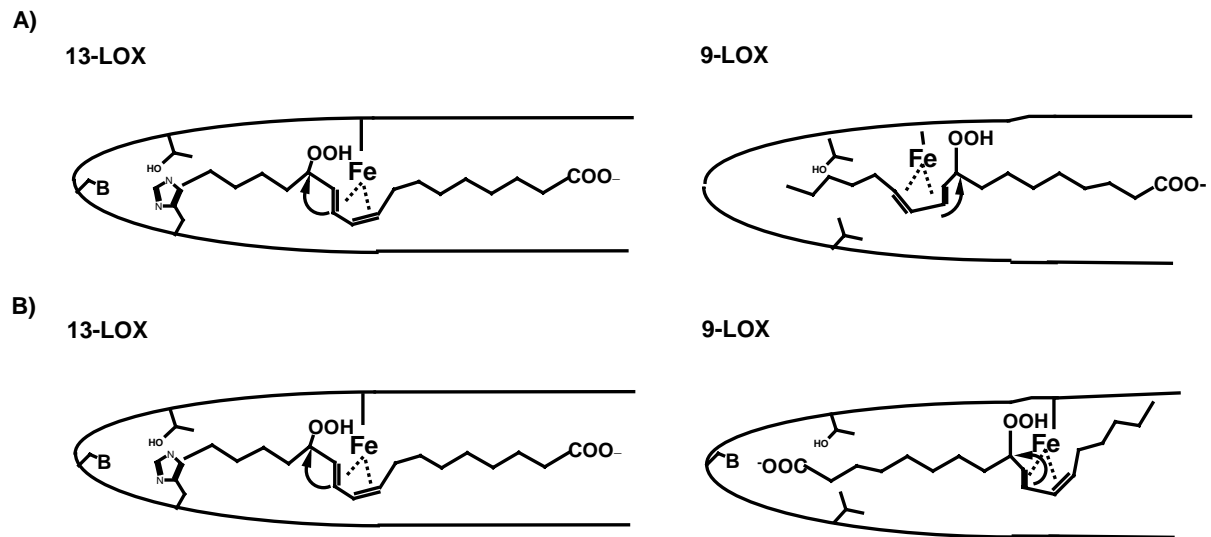


Abb. 8: Modelle der Substratorientierung pflanzlicher LOXs.

Im Rahmen dieser Arbeit trugen die gerichtete Mutagenese des aktiven Zentrums der Lipidkörper-LOX der Gurke zur teilweisen Aufklärung des Reaktionsmechanismus pflanzlicher LOXs bei (Hornung *et al.*, 1999). Durch Sequenzvergleiche und die räumliche Modellierung des Enzym-Substrat-Komplexes pflanzlicher LOXs, wurde H608 als primäre strukturelle Determinante für die Positionsspezifität der Lipidkörper-LOX der Gurke vermutet. Der Austausch dieser Aminosäure durch das kleinere Valin führte zu einer Änderung der Positionsspezifität, d. h. die Lipidkörper-LOX wurde von einer Linolsäure-13-LOX in eine Linolsäure-9-LOX umgewandelt. Diese Veränderung wird möglicherweise durch die Demaskierung der geladenen Guanidingruppe der Seitenkette von R758 durch die H608V-Mutation erklärt und führt zu einer inversen Orientierung des Substrates (Abb. 8B). Darüber hinaus führte eine R758L+H608V-Doppelmutation zu einem stark reduzierten Substratumsatz und dem Verlust der Positionsspezifität. Trilinolein hingegen, indem die darin enthaltenen Linolsäurereste keine freien Karboxylgruppen besitzen, wurde auch von der H608V-Mutante zu den (13S)-Hydro(pero)xyderivaten umgesetzt. Es wird daher angenommen, daß der H608V-Austausch die Orientierung des Substrats nur im Falle der freien Polyenfettsäuren am aktiven Zentrum so ändert, daß eine die stereospezifische Sauerstoffinsertion an C-9 erfolgen kann. Somit konnte gezeigt werden, daß die Substratspezifität von LOXs für Triacylglycerine auf die Gruppe der Linolsäure-13-LOXs beschränkt zu sein scheint.

## 5. Zusammenfassung

Die in der vorgelegten Arbeit vorgestellten Untersuchungen dienen der Funktionsanalyse pflanzlicher LOXs im Rahmen des Lipidmetabolismus von PUFAs. Dies geschah erstmalig durch eine Kombination chemisch-analytischer, biochemischer und molekularer Ansätze. Zur Analyse der Beteiligung pflanzlicher LOXs am Lipidmetabolismus wurden spezifische LOXs beim Abbau der Speicherlipide während der Keimung von Gurkensamen, und beim Abbau chloroplastidärer Membranlipide während der Jasmonat- und Stress-induzierten Seneszenz von Gerstenblättern untersucht. Außerdem wurden Folgereaktionen der Lipidperoxidation am Beispiel der Biosynthese von Aldehyden untersucht. Darüber hinaus wurde nach molekularen Determinanten im aktiven Zentrum einer LOX gesucht, die die direkte Umsetzung von veresterten Polyenfettsäuren katalysiert.

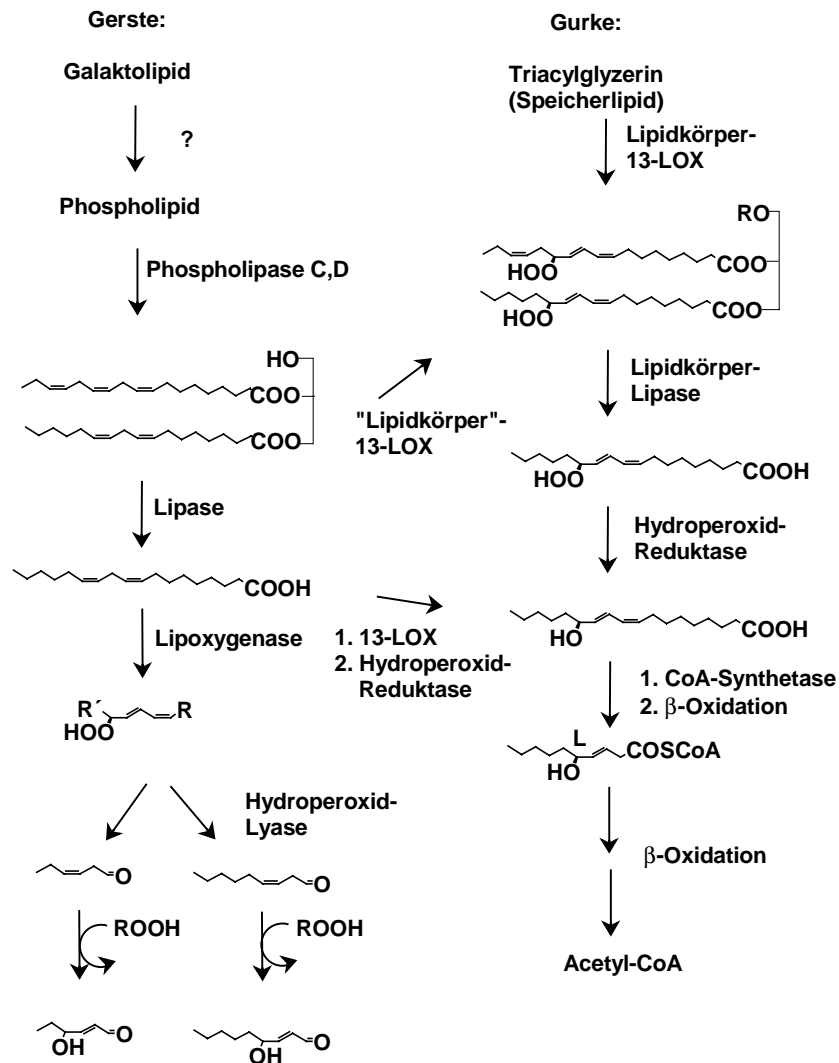


Abb. 9: Modell einer Beteiligung von LOXs am Lipidkatabolismus.

Die für die Keimung erbrachten Daten konnten erstmalig zeigen, daß eine spezifische LOX einen zentralen Stoffwechselweg innerhalb dieses Entwicklungsvorgangs unmittelbar auslöst und für die beobachteten Lipidperoxidationsprozesse verantwortlich ist (Abb. 9 linke Seite). Zusammengefaßt sprechen die vorgestellten Ergebnisse für folgenden neuen Stoffwechselweg zum Abbau von in den Speicherlipiden enthaltenen PUFAs während der Keimung: initialer Schritt ist die Umsetzung von veresterten PUFAs der Triacylglycerine durch eine spezifische Lipidkörper-assoziierte LOX zu (13*S*)-Hydroperoxyderivaten. Ihr folgt die Hydrolyse durch eine Lipase, da in der Fraktion der Speicherlipide ausschließlich die Hydroperoxyderivate angetroffen werden, der sich die Reduktion zu (13*S*)-Hydroxyderivaten anschließt. Nur diese stabilen Verbindungen stellen anschließend das endogene Substrat der  $\beta$ -Oxidation im Stadium der Keimung dar. Diese Daten werden durch die strukturellen Untersuchungen gestützt, die eine spezifische Umsetzung von Triacylglycerinen durch Linolsäure-13-LOXs zeigen, denn nur die (13*S*)-Hydroxyderivate und nicht die (9*S*)-Hydroxyderivate von PUFAs besitzen jene Stereochemie, die für einen Abbau über eine „klassische“  $\beta$ -Oxidation gefordert werden muß.

Im Falle der JM-induzierten Seneszenz kann die Frage nach einer physiologischen Funktion JM-induzierter LOXs noch nicht eindeutig beantwortet werden. Hier ist es offen, ob die gebildeten Lipidperoxide eine spezifische Funktion innerhalb dieses Prozesses einnehmen. Es ergeben sich für die untersuchten chloroplastidären LOXs aber zwei mögliche Funktionen: (1) die Peroxidation von PUFAs dient der Zerstörung von Membranen, so daß Metabolite und ihre Stoffwechselprozesse nicht mehr getrennt sind (Siedow, 1991) und es damit nur zur ungerichteten Induktion weiterer Reaktionen des LOX-Reaktionsweges kommt, z. B. des hier analysierten HPL-Reaktionsweges (Abb. 9 rechte untere Seite), oder (2) die Peroxidation von Lipiden durch chloroplastidäre LOXs leitet unmittelbar den Abbau von PUFAs als Bestandteil der Membranen ein, in Analogie zu dem für die Keimung vorgeschlagenen Stoffwechselweg (Abb. 9 Mitte).

## 6. Literatur

Andre, E, Hou, K-W (1932) The presence of a lipid oxidase in soybean, glycine soya. Lieb. C. R. Acad. Sci. (Paris) 194: 645-647



- Axelrod, B, Cheesbrough, TM, Laakso, S (1981) Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* 71: 441-451
- Bachem, CWB, van der Hoeven, RS, de Bruijn, SM, Vreugdenhil, D, Zabeau, M, Visser, RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9: 745-753
- Bachmann, A, Kohlmann, M, Wasternack, C, Feussner, I, (1998) Oxylipins in sorbitol-stressed barley leaf segments. In: (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., & Martínez-Force, E., Eds.) *Advances in Plant Lipid Research.*, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla pp 288-290
- Balkenhohl, T, Kühn, H, Wasternack, C, Feussner, I, (1998) A lipase specific for esterified oxygenated polyenoic fatty acids in lipid bodies of cucumber cotyledons. In: (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., & Martínez-Force, E., Eds.) *Advances in Plant Lipid Research.*, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla pp 320-322
- Bell, E, Creelman, RA, Mullet, JE (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8675-8679
- Blee, E, Joyard, J (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110: 445-454
- Blee, E, Schuber, F (1990) Efficient epoxydation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxid-dependent Oxygenase. *J. Biol. Chem.* 265: 12887-12894
- Bowsher, CG, Ferrie, BJM, Ghosh, S, Todd, J, Thompson, JE, Rothstein, SJ (1992) Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiol.* 100: 1802-1807
- Brash, AR, Ingram, CD, Harris, TM (1987) Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids. *Biochemistry* 26: 5465-5471
- Creelman, RA, Mullet, JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381
- De Groot, JJMC, Veldink, GA, Vliegthart, JFG, Boldingh, J, Wever, R, Van Gelder, BF (1975) Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenases-1. *Biochim. Biophys. Acta* 377: 71-79

- Deighton, N, Magill, WJ, Bremner, DH, Benson, EE (1997) Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal in plant tissue cultures: LC-MS determination of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives. *Free Rad. Res.* 27: 255-265
- Ealing, PM (1994) Lipoxygenase activity in ripening tomato fruit pericarp tissue. *Phytochem* 36: 547-552
- Feussner, I, Kindl, H (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett.* 298: 223-225
- Feussner, I, Kindl, H (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes - comparison of molecular and enzymatic properties. *Planta* 194: 22-28
- Feussner, I, Kühn, H (1995) The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *FEBS Lett.* 367: 12-14
- Feussner, I, Hause, B, Vörös, K, Parthier, B, Wasternack, C (1995a) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv *Salome*). *Plant J.* 7: 949-957
- Feussner, I, Ziegler, J, Miersch, O, Wasternack, C, (1995b) Jasmonate- and stress-induced lipoxygenase forms in barley leaf segments (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*). In: (Kader, J.-C., & Mazliak, P., Eds.) *Plant Lipid Metabolism.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 292-294
- Feussner, I, Wasternack, C, Kindl, H, Kühn, H (1995c) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11849-11853
- Feussner, I, Hause, B, Nellen, A, Wasternack, C, Kindl, H (1996) Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta* 198: 288-293
- Feussner, I, Kühn, H, Wasternack, C (1997a) Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate  $\beta$ -oxidation? *FEBS Lett.* 406: 1-5
- Feussner, I, Balkenhohl, TJ, Porzel, A, Kühn, H, Wasternack, C (1997b) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J. Biol. Chem.* 272: 21635-21641
- Feussner, I, Wasternack, C (1998) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Fett/Lipid* 100: 146-152

- Feussner, I, Blée, E, Weichert, H, Rousset, C, Wasternack, C, (1998a) Fatty acid catabolism at the lipid body membrane of germinating cucumber cotyledons. In: (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., & Martínez-Force, E., Eds.) *Advances in Plant Lipid Research.*, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla pp 311-313
- Feussner, I, Balkenhohl, TJ, Porzel, A, Kühn, H, Wasternack, C, (1998b) Structural elucidation of oxygenated triacylglycerols in cucumber and sunflower cotyledons. In: (Schreier, P., Herderich, M., Humpf, H.-U., & Schwab, W., Eds.) *Natural Product Analysis.*, Vieweg, Braunschweig pp 57-58
- Feussner, I, Bachmann, A, Höhne, M, Kindl, H (1998c) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett.* 431: 433-436
- Ford-Hutchinson, AW, Gresser, M, Young, RN (1994) 5-lipoxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 383-417
- Gardner, HW (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: 274-281
- Gardner, HW (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 221-239
- Gardner, HW, Grove, MJ (1998) Soybean lipoxygenase-1 oxidizes 3Z-nonenal - A route to 4S-hydroperoxy-2E-nonenal and related products. *Plant Physiol.* 116: 1359-1366
- Gardner, HW, Hamberg, M (1993) Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia-Faba* L). *J. Biol. Chem.* 268: 6971-6977
- Garssen, GJ, Veldink, GA, Vliegthart, JFG, Boldingh, J (1976) The formation of threo-11-hydroxy-trans-12:13-epoxy-9-cis-octadecenoic acid by enzymic isomerization of 13-L-hydroperoxy-9-cis,11-trans-octadecadienoic acid by soybean lipoxygenase-1. *Eur. J. Biochem.* 62: 33-6
- Garssen, GJ, Vliegthart, JFG, Boldingh, J (1971) An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.* 122: 327-332
- Gerhardt, B, (1993) Catabolism of fatty acids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -oxidation). In: (Moore, J., T.S., Ed.) *Lipid Metabolism in Plants.*, CRC Press, London pp 527-565
- Grayburn, WS, Schneider, GR, Hamiltonkemp, TR, Bookjans, G, Ali, K, Hildebrand, DF (1991) Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. *Plant Physiol.* 95: 1214-1218

- Grechkin, AN, (1998) Biosynthesis of divinyl ether oxylipins: occurrence and catalytic properties of divinyl ether synthase. In: (Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E., & Martínez-Force, E., Eds.) *Advances in Plant Lipid Research.*, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla pp 279-285
- Hamberg, M (1988) Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156: 543-550
- Hamberg, M (1993) Pathways in the biosynthesis of oxylipins in plants. *J. Lipid Mediators* 6: 375-384
- Hatanaka, A, Kajiwara, T, Matsui, K (1995) The biogeneration of green odour by green leaves and its physiological functions - past, present and future. *Zeitschrift Für Naturforschung* 50c: 467-472
- Hause, B, zur Nieden, U, Lehmann, J, Wasternack, C, Parthier, B (1994) Intracellular localization of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Bot. Acta* 107: 333-341
- Heitz, T, Bergey, DR, Ryan, CA (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114: 1085-1093
- Holtman, WL, Vredenburg-Heistek, JC, Schmitt, NF, Feussner, I (1997) Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. *Eur. J. Biochem.* 248: 452-458
- Hornung, E, Walter, M, Kühn, H, Feussner, I (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4192-4197
- Huang, AHC (1994) Structure of plant seed oil bodies. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 4: 493-498
- Huang, AHC (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110: 1055-1061
- Kindl, H (1997) The oxygen-dependent modification of triacylglycerols and phospholipids, the different way of initiating lipid body mobilization. *Z. Naturforsch.* 52c: 1-8
- Kohlmann, M, Bachmann, A, Weichert, H, Kolbe, A, Balkenhohl, TJ, Wasternack, C, Feussner, I (1999) Formation of lipoxygenase pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur. J. Biochem.* 260: 885-895
- Kohlmann, M, Kuntzsch, A, Wasternack, C, Feussner, I, (1998) Effect of jasmonic acid methyl ester on enzymes of the lipoxygenase pathway in barley leaves. In: (Schreier, P.,

- Herderich, M., Humpf, H.-U., & Schwab, W., Eds.) *Natural Product Analysis.*, Vieweg, Braunschweig pp 339-340
- Kühn, H, Heydeck, D, Wiesner, R, Schewe, T (1985) The positional specificity of wheat lipoxygenase; the carboxylic group as signal for the recognition of the site of the hydrogen removal. *Biochim. Biophys. Acta* 830: 25-29
- Kühn, H, Eggert, L, Zabolotsky, OA, Myagkova, GI, Schewe, T (1991a) Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates. *Biochem.* 30: 10269-10273
- Kühn, H, Wiesner, R, Rathmann, J, Schewe, T (1991b) Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* 4: 9-14
- Laudert, D, Weiler, EW (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15: 675-684
- Maccarrone, M, Van Aarle, PGM, Veldink, GA, Vliegthart, JFG (1994) In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1190: 164-169
- Matsui, K (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belgian Journal of Botany* 131: 50-62
- Nellen, A, Rojahn, B, Kindl, H (1995) Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. *Z. Naturforsch.* 50c: 29-36
- Nelson, MJ, Seitz, SP (1994) The structure and function of lipoxygenase. *Curr Opin Struct Biol* 4: 878-884
- Parthier, B (1990) Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *J. Plant Growth Regul.* 9: 57-63
- Peng, YL, Shirano, Y, Ohta, H, Hibino, T, Tanaka, K, Shibata, D (1994) A novel lipoxygenase from rice - primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* 269: 3755-3761
- Phillips, DR, Matthew, JA, Reynolds, J, Fenwick, GR (1979) Partial Purification and Properties of a Cis-3:Trans-2-Enal Isomerase from Cucumber Fruit. *Phytochem.* 18: 401-404
- Prigge, ST, Boyington, JC, Gaffney, BJ, Amzel, LM, (1996) Lipoxygenases: structure and function. In: (Piazza, G. J., Ed.) *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes.*, AOCS Press, Champaign, Il pp 1-32

- Quinn, MT, Linner, JG, Siemsen, D, Dratz, EA, Buescher, ES, Jesaitis, AJ (1995) Immunocytochemical detection of lipid peroxidation in phagosomes of human neutrophils: correlation with expression of flavocytochrome b. *J. Leukoc. Biol.* 57: 415-421
- Radetzky, R, Feussner, I, Theimer, RR, Kindl, H (1993) Transient occurrence of lipoxygenase and glycoprotein gp49 in lipid bodies during fat mobilization in anise seedlings. *Planta* 191: 166-172
- Rance, I, Fournier, J, Esquerre-Tugaye, MT (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6554-6559
- Rosahl, S (1996) Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* 51c: 123-138
- Royo, J, Vancanneyt, G, Perez, AG, Sanz, C, Störmann, K, Rosahl, S, Sanchez-Serrano, JJ (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound- regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271: 21012-21019
- Saravitz, DM, Siedow, JN (1995) The lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves - changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. *Plant Physiol.* 107: 535-543
- Saravitz, DM, Siedow, JN (1996) The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant Physiol.* 110: 287-299
- Schaller, F, Weiler, EW (1997) Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants - 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *Eur. J. Biochem.* 245: 294-299
- Schaller, F, Hennig, P, Weiler, EW (1998) 12-Oxophytodienoate-10,11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiol.* 118: 1345-1351
- Schewe, T, Kühn, H (1991) Do 15-lipoxygenases have a common biological role? *Trends Biochem. Sci.* 16: 369-373
- Sembdner, G, Parthier, B (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589
- Shibata, D, (1996) Plant lipoxygenase genes. In: (Piazza, G. J., Ed.) *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes.*, AOCs Press, Champaign, Il pp 39-56

- Shibata, D, Slusarenko, A, Casey, R, Hildebrand, D, Bell, E (1994) Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: S41-S42
- Siedow, JN (1991) Plant lipoxygenase - structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145-188
- Song, W-C, Brash, AR (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* 253: 781-784
- Thomas, H (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in senescence. *Journal of Plant Physiology* 123: 97-105
- Toyokuni, S, Uchida, K, Okamoto, K, Hattori-Nakakuki, Y, Hiai, H, Stadtman, ER (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2616-2620
- Tranbarger, TJ, Franceschi, VR, Hildebrand, DF, Grimes, HD (1991) The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell* 3: 973-987
- Uchida, K, Szweda, LI, Chae, H-Z, Stadtman, ER (1993) Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8742-8746
- van der Heijdt, LM, van der Lecq, F, Lachmansingh, A, Versluis, K, van der Kerk-van Hoof, A, Veldink, GA, Vliegthart, JFG (1993) Formation of octadecadienoate dimers by soybean lipoxygenases. *Lipids* 28: 779-782
- van Mechelen, JR. (1998), Doktorarbeit, Universiteit Utrecht, Utrecht.
- Vick, BA, (1993) Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In: (Moore, J., T.S., Ed.) *Lipid Metabolism in Plants.*, CRC Press, London pp 167-191
- Vick, BA, Zimmerman, DC (1982) Levels of oxygenated fatty acids in young corn and sunflower plants. *Plant Physiol.* 69: 1103-1108
- Vick, BA, Zimmerman, DC, (1987a) Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: (Stumpf, P. K., & Conn, E. E., Eds.) *The Biochemistry of Plants.*, Academic Press, London pp 53-90
- Vick, BA, Zimmerman, DC, (1987b) Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* 1073-1078

- Vick, BA, Zimmerman, DC (1989) Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. Plant Physiol. 90: 125-132
- Vörös, K, Feussner, I, Kuhn, H, Lee, J, Graner, A, Löbner, M, Parthier, B, Wasternack, C (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. Eur. J. Biochem. 251: 36-44
- Wasternack, C, Parthier, B (1997) Jasmonate signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2: 302-307
- Yamamoto, S (1992) Mammalian lipoxygenases - molecular structures and functions. Biochim. Biophys. Acta 1128: 117-131



## **Danksagung**

Ich danke allen Mitarbeitern für ihre experimentellen und intellektuellen Beiträge zu den in dieser Arbeit vorgestellten und zusammengefaßten Ergebnissen. Darüberhinaus danke ich allen Kollegen und Freunden für vielfältige Unterstützungen, Kooperationen und hilfreiche Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. B. Parthier und Prof. Dr. C. Wasternack für die Unterstützung und Hilfe beim Aufbau der Arbeitsgruppe „Lipidperoxidation“ und für die Diskussion und Durchsicht bei den zur Durchführung der Arbeiten notwendigen Projekte und vieler der hier aufgeführten Publikationen.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe, dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst und der BASF AG, die durch ihre finanzielle Unterstützung die hier vorgestellten Arbeiten ermöglicht haben.

Meiner Familie danke ich für die Geduld und ihr Verständnis und insbesondere meiner Frau für die nie ermüdende Unterstützung im wissenschaftlichen Alltag.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Dr. Ivo Feußner  
Geburtsdatum/-ort: 21.08.64, Braunschweig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

### Ausbildung

1970 - 1974 Grundschule, Kassel  
1974 - 1983 Gymnasium, Kassel (Abschluß: allgemeine Hochschulreife, 5/1983)  
1983 - 1986 Grundstudium Chemie, Philipps-Universität Marburg (Vordiplom, 10/1986)  
1984 - 1985 Zivildienst, Arbeiter Samariter Bund, Lohfelden  
1986 - 1989 Hauptstudium Chemie, Philipps-Universität Marburg (Diplomprüfung, 4/1989)  
5/1989 - 4/1990 Diplomarbeit bei Prof. Dr. K. Radsak, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Thema der Arbeit: "Untersuchungen zur Palmitoylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung eines viralen Glykoproteines"  
10/1989 - 2/1990 Studentische Hilfskraft im Chemiepraktikum für Medizinstudenten, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg  
9/1990 - 2/1993 Dissertation bei Prof. Dr. H. Kindl, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Thema der Arbeit: "Vergleich pflanzlicher Lipoxygenasen unter besonderer Berücksichtigung der Biosynthese einer Lipoxygenase aus Lipidkörpern"  
1991 Graduiertenpraktikum Analytische Chemie  
9/1990 - 2/1993 Promotionsstipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung

### Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang:

1/1993 - 12/1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. W. Roos, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, Arbeiten zum vakuolären Aminosäuretransport in *Penicillium cyclopium*  
2/1994 - 12/1994 Strahlenschutzbeauftragter am Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle  
1/1995 - 12/1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. C. Wasternack, Abteilung Hormonforschung (Prof. Dr. B. Parthier), Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Arbeiten zur Funktion pflanzlicher Lipoxygenasen  
1/1997 - Leiter der DFG-geförderten Nachwuchsgruppe „Lipidperoxidation“, Abteilung Hormonforschung, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Die Arbeit wurde nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt.

Halle, den 26.05.99

Ivo Feußner