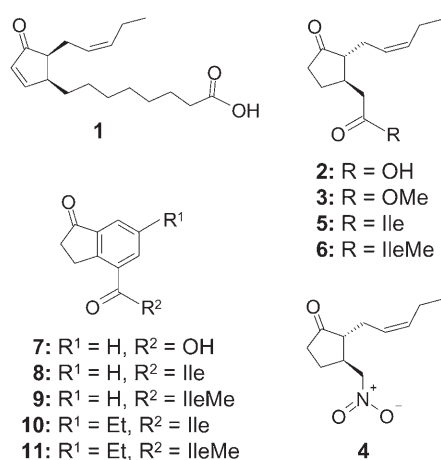


# Strukturelle Erfordernisse für Jasmonate und synthetische Analoga als Auslöser von Calciumsignalen im Zellkern und im Cytosol von Pflanzenzellen\*\*

Agnes Walter, Christian Mazars, Mathias Maitrejean, Jörn Hopke, Raoul Ranjeva, Wilhelm Boland und Axel Mithöfer\*

Professor Jürgen Ebel gewidmet

Von Octadecanoiden abstammende Phytohormone wie Jasmonate und 12-Oxophytodiensäure (OPDA; **1**) sowie deren synthetische Analoga (Schema 1) induzieren zahlreiche phy-



Schema 1. Strukturen von Jasmonaten und synthetischen Analoga.

siologische Reaktionen in Geweben und Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten.<sup>[1,2]</sup> Obwohl Jasmonate bekanntlich abiotischen und biotischen Stress einschließlich Verwundung, Pathogen- und Herbivorbefall vermitteln, sind die Kenntnisse über jasmonatinduzierte Signalwege, die zelluläre Reaktionen auslösen, gering. Indirekte Befunde deuten an, dass das Jasmonatsignal Änderungen der cytosolischen freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induziert.<sup>[3,4]</sup> Solche Daten könnten  $\text{Ca}^{2+}$  eine

Rolle als ubiquitärer Sekundärbotenstoff in der Jasmonat-Signaltransduktion einräumen, der eine Vielzahl zellulärer Prozesse in Pflanzen vermittelt.<sup>[5,6]</sup> Spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen wurden bereits im Cytosol und im Zellkern von Pflanzenzellen nach Stimulierung durch von Pathogenen gebildete Elicitoren oder osmotischen Stress beschrieben.<sup>[7,8]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Tabakzellen, die das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Aequorin im Cytosol oder Nucleoplasma enthalten,<sup>[9]</sup> eingesetzt, um bei Behandlung mit Jasmonaten und synthetischen funktionellen Analoga den Verlauf der Calciumkonzentrationen in beiden Kompartimenten zu untersuchen.

Wir stellten fest, dass zwei der natürlich vorkommenden Substanzen, nämlich OPDA (**1**), die biosynthetische Vorstufe der Jasmonsäure (JA; **2**), und JA selbst sowohl im Cytosol als auch im Zellkern dosisabhängige transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  bzw.  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ ) induzierten. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Muster unterschieden sich stark bezüglich Kinetik und Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. So induzierte OPDA (**1**) einen schnellen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg auf bis zu  $1 \mu\text{M}$  innerhalb von 30 s nach Applikation (Abbildung 1 a), gefolgt von einem

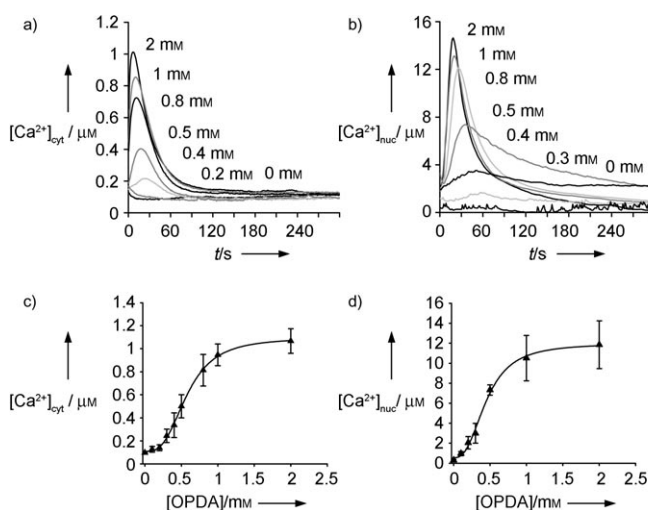


Abbildung 1.  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen im a) Cytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) und b) Zellkern ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ ) von Tabakzellen, induziert durch unterschiedliche OPDA-Konzentrationen; Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte für OPDA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen: c)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  und d)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ . Die Kurven repräsentieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen aus je drei unabhängigen Experimenten.

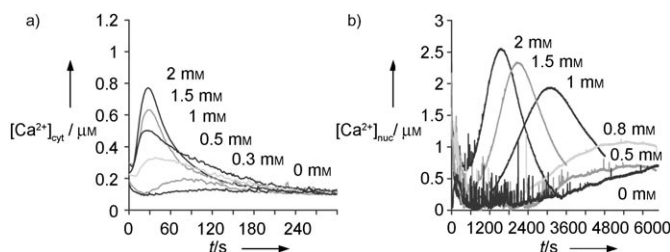
[\*] Dipl.-Biol. A. Walter, Dr. M. Maitrejean, Dr. J. Hopke, Prof. Dr. W. Boland, Priv.-Doz. Dr. A. Mithöfer  
 Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie  
 Bioorganische Chemie  
 Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena (Deutschland)  
 Fax: (+49) 3641-571-256  
 E-Mail: amithoefer@ice.mpg.de

Dr. C. Mazars, Prof. Dr. R. Ranjeva  
 Signaux et Messages Cellulaires chez les Végétaux  
 UMR CNRS/UPS 5546  
 24 Chemin de Borde Rouge, BP 42617 Auzerville  
 31326 Castanet-Tolosan (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch ein Marie-Curie-Stipendium (QLK3-CT-2001-60067) für A.W. unterstützt. Wir danken Dr. O. Miersch und Dr. C. Wasternack für die Überlassung von OPDA.

starken  $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg (Abbildung 1b), der gegenüber  $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$  zehnfach höher und um nur 15 s verzögert war. Nach unserem Kenntnisstand wurde ein solch starker  $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Anstieg in Pflanzenzellen bisher nicht beschrieben. Als Effektkonzentration, die 50% der Konzentrationsänderung induziert ( $EC_{50}$ ), wurde  $(0.57 \pm 0.06)$  mM für das Cytosol und  $(0.43 \pm 0.08)$  mM für das Nucleoplasma ermittelt (Abbildung 1c,d).

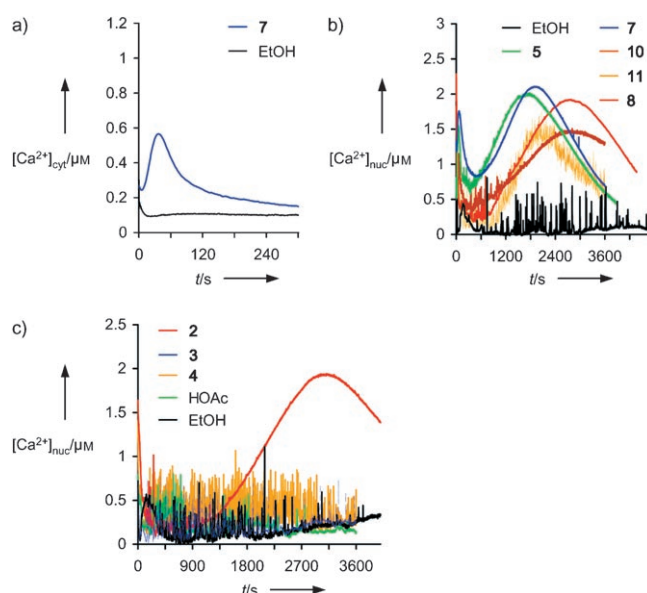
Auch JA (2) induzierte einen schnellen Anstieg des  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signals innerhalb der ersten Minuten (Abbildung 2a) mit einer  $EC_{50} = (1.13 \pm 0.21)$  mM. Die JA-indu-



**Abbildung 2.**  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen im a) Cytosol ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) und b) Zellkern ( $[Ca^{2+}]_{nuc}$ ) von Tabakzellen, induziert durch unterschiedliche JA-Konzentrationen. Die Kurven repräsentieren  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen aus je drei unabhängigen Experimenten.

zierte  $Ca^{2+}$ -Signatur im Zellkern dagegen (Abbildung 2b;  $EC_{50} = (0.87 \pm 0.05)$  mM) unterschied sich von  $\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$  durch eine Anlaufphase von etwa 20 min und eine starke Verzögerung der  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderung bei abnehmender JA-Konzentration. Obwohl die  $EC_{50}$ -Werte ziemlich hoch scheinen, liegen sie doch in der gleichen Größenordnung, die für die Induktion der Duftstoffemission in der Limabohne nötig ist.<sup>[10]</sup> Außerdem ist nicht bekannt, wie viel der exogen angebotenen Substanzen in das Zellinnere gelangt. Im Unterschied zu OPDA (1) bewirkte JA (2) nur eine Änderung der  $[Ca^{2+}]_{nuc}$ -Konzentration von  $2.5 \mu M$ , und es zeigte eine andere Kinetik. Diese deutlichen Unterschiede in  $\Delta[Ca^{2+}]_{nuc}$  weisen klar darauf hin, dass JA (2) und OPDA (1) unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse initiieren. Interessanterweise induziert OPDA (1) ein Spektrum zellulärer Antworten, das nur teilweise mit JA-induzierten Antworten überlappt und ebenfalls die Existenz von Signalwegen aufzeigt, die sich von denen von JA (2) unterscheiden.<sup>[11]</sup>

Als Nächstes wandten wir uns der Frage zu, ob andere biologisch aktive Jasmonate wie der Methylester von JA (MeJA; 3)<sup>[1]</sup> und das JA-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile; 5)<sup>[12]</sup> in der Lage sind, intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen auszulösen. Bei Behandlung mit MeJA (3) war bis zu einer Konzentration von 2 mM weder im Cytosol noch im Zellkern eine Induktion von  $\Delta[Ca^{2+}]$  nachweisbar. Eine mögliche Hydrolyse von MeJA (3) in der Zelle erfolgt offensichtlich nicht schnell genug, um  $Ca^{2+}$ -Signale durch freigesetztes JA (2) auszulösen. Das JA-Ile-Konjugat (5) hatte keine Wirkung auf  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , zeigte aber bezüglich der Induktion von  $\Delta[Ca^{2+}]_{nuc}$  die gleiche Aktivität wie JA (2) (Abbildung 3b), wodurch eine Modulation der JA-Aktivität durch Konjuga-



**Abbildung 3.** a)  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen im Cytosol ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) von Tabakzellen, induziert durch 1 mM 7; b)  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen im Zellkern ( $[Ca^{2+}]_{nuc}$ ) von Tabakzellen, induziert durch 1 mM 5, 7, 8, 10, 11; c)  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen im Zellkern ( $[Ca^{2+}]_{nuc}$ ) von Tabakzellen, induziert durch 1 mM 2, 3, 4 und Essigsäure (HOAc); als Lösungsmittelkontrolle wurde Ethanol (EtOH) eingesetzt. Die Kurven repräsentieren  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderungen aus je drei unabhängigen Experimenten.

tion mit einer Aminosäure offenkundig wurde. Der Methylester von JA-Ile (6) war, ähnlich MeJA (3), in beiden Kompartimenten inaktiv.

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse deutet stark auf eine hohe Spezifität des Perzeptionssystems hin, das die Jasmonatsignale in entsprechende  $Ca^{2+}$ -Signaturen übersetzt. Dies führte uns dazu, Struktur-Aktivitäts-Zusammenhänge genauer zu untersuchen, und die Studie um synthetische 1-Oxoindanoyl-L-isoleucin-Konjugate, die als funktionelle Analoga der Jasmonate etabliert sind, zu erweitern.<sup>[2]</sup> Die einzige Substanz, die neben OPDA (1) und JA (2) in beiden Zellkompartimenten  $Ca^{2+}$ -induzierende Aktivität zeigte, war 1-Oxoindan-4-carbonsäure (7) (Abbildung 3a,b). Bisher war der 1-Oxoindanoyl-Baustein der Konjugate als biologisch nicht aktiv beschrieben worden,<sup>[13]</sup> in diesem System jedoch wies er JA-ähnliche Aktivität auf. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die für JA-Ile (5) erhalten wurden, waren sowohl das Isoleucin-Konjugat von 7, 1-Oxoindanoyl-L-isoleucin (8), als auch das substituierte 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isoleucin (10) nur im Zellkern aktiv (Abbildung 3b), während der 1-Oxoindanoyl-L-isoleucinmethylester (9) vollständig inaktiv war.

Insgesamt decken diese Ergebnisse zwei strukturelle Eigenschaften der Jasmonate auf, die für die Induktion von  $Ca^{2+}$ -Signaturen entscheidend sind: Erstens ging durch Konjugation der Substanzen mit Isoleucin ihre Wirkung auf  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  verloren, ihre Aktivität bezüglich  $\Delta[Ca^{2+}]_{nuc}$  blieb aber erhalten. Bisher wurde lediglich die Aktivierung von JA (2) durch Bildung von JA-Ile (6) beschrieben.<sup>[12]</sup> Wir wiesen erstmals einen partiellen Verlust der JA-Aktivität durch Konjugation mit einer Aminosäure nach. Zweitens wurden

alle Substanzen einschließlich der Konjugate durch Veresterung der Carboxygruppe vollständig inaktiv. Interessanterweise war der Methylester von **10**, 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isooleucinmethylester (**11**), die einzige Substanz, die auch ohne freie Carboxygruppe in der Lage war,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  zu induzieren (Abbildung 3b). Die Ethylgruppe als C6-Substituent verleiht dem Molekül offensichtlich die Eigenschaft, die durch Veresterung bewirkte Unterdrückung der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierenden Aktivität zu kompensieren. Diese Beobachtung korreliert mit der allgemein erhöhten biologischen Aktivität von **11** gegenüber **9**.<sup>[2]</sup>

Um die Notwendigkeit der freien Carboxygruppe von JA (**2**) genauer zu bestimmen, wurde 3-(Nitromethyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon (JNO; **4**) eingesetzt. Die  $\text{NO}_2$ -Gruppe von JNO (**4**) hat eine ähnliche Größe und Elektronenverteilung wie die Carboxygruppe von JA (**2**).<sup>[13]</sup> Wie in Abbildung 3c gezeigt, war JNO (**4**) inaktiv, was belegt, dass ein Carboxylat für die Induktion einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur absolut notwendig ist. Dass allein die Gegenwart einer organischen Säure, z. B. Essigsäure, nicht ausreichte, um eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung in Tabakzellen auszulösen, verdeutlicht die Notwendigkeit von definierten strukturellen Bedingungen (Abbildung 3c).

Neue Daten hatten bereits gezeigt, dass Calcium die spezifische Expression von Genen zur Auslösung geeigneter Reaktionen auf externe Reize induziert.<sup>[14]</sup> Interessanterweise wird die Expression einiger  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierbarer Gene auch durch Jasmonate ausgelöst, sodass die Vermutung nahe liegt, dass Jasmonat- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege zumindest teilweise miteinander verknüpft sein könnten.<sup>[15]</sup> Wir beobachteten hier einen transienten Anstieg der Konzentration des Sekundärbotenstoffs  $\text{Ca}^{2+}$ , der durch bestimmte Jasmonate im Cytosol und Nucleoplasma von Pflanzenzellen induziert wurde. Mit der neu entdeckten biologischen Aktivität der 1-Oxoindan-4-carbonsäure (**7**) erwiesen sich die synthetischen Substanzen als vollkommene Entsprechungen der Jasmonate und ließen klare Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erkennen: Nur nichtkonjugierte Verbindungen wie OPDA (**1**), JA (**2**), und 1-Oxoindan-4-carbonsäure (**7**) mit freier, negativ geladener Carboxygruppe konnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in beiden Kompartimenten auslösen. Isoleucin-Konjugate von **2** und **7** zeigten nur im Zellkern  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierende Aktivität, während die Methylester der Isoleucin-Konjugate (**6**, **9**) ohne Carboxyfunktion vollständig inaktiv waren, mit Ausnahme des 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isooleucinmethylesters (**11**); dies spricht somit gegen die denkbare Erklärung, eine möglicherweise begrenzte Aufnahme aller Methylester in die Zelle könnte der alleinige Grund für ihre Inaktivität sein. Ferner konnte gezeigt werden, dass in intakten Zellen  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  wahrscheinlich autonom und unabhängig von  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  erzeugt wird. Unsere Ergebnisse legen die Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen hochspezifischen Perzeptionsmechanismen und Signalwegen nahe, die an der Initiierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaturen im Cytosol und im Zellkern von Pflanzenzellen beteiligt sind. Die Identifizierung dieser Perzeptionssysteme sowie die Aufklärung anschließender Si-

gnaltransduktionsereignisse, die zu den unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mustern führen, stehen als Nächstes an.

### Experimentelles

(±)-cis-12-Oxophytodiensäure (**1**) wurde von O. Miersch und C. Wasternack, IPB Halle, zur Verfügung gestellt. (–)-Jasmonsäure (**2**) und (±)-Methyljasmonat (**3**) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Die synthetischen Substanzen wurden wie beschrieben synthetisiert: 1-Oxoindan-4-carbonsäure (**7**),<sup>[16]</sup> 1-Oxoindanoyl-L-isooleucin (**8**),<sup>[16]</sup> 1-Oxoindanoyl-L-isooleucinmethylester (**9**),<sup>[16]</sup> 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isooleucin (**10**),<sup>[17]</sup> 6-Ethyl-1-oxoindanoyl-L-isooleucinmethylester (**11**),<sup>[17]</sup> Jasmonoyl-L-isooleucin (**5**),<sup>[16]</sup> Jasmonoyl-L-isooleucinmethylester (**6**),<sup>[16]</sup> 3-(Nitromethyl)-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentanon (**4**).<sup>[18]</sup> Die Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wurde mit transgenen Tabak-Zelllinien (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) durchgeführt, die das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Aequorin entweder im Cytosol oder im Zellkern exprimieren.<sup>[9]</sup> Die Endkonzentration des Lösungsmittels betrug maximal 1 % (v/v); jede Änderung der Lumineszenz wurde bezogen auf die Gesamtmenge des rekonstituierten Aequorins im Ansatz ausgewertet.<sup>[9]</sup>

Eingegangen am 9. Dezember 2006

Online veröffentlicht am 8. Mai 2007

**Stichwörter:** Biologische Aktivität · Intrazelluläres Calcium · Jasmonate · Signaltransduktion · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] C. Wasternack, B. Hause, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2002**, 72, 165–221.
- [2] A. Mithöfer, M. Maitrejean, W. Boland, *J. Plant Growth Regul.* **2005**, 24, 170–178.
- [3] P. Kenton, L. A. J. Mur, J. Draper, *J. Exp. Bot.* **1999**, 50, 1331–1341.
- [4] Q.-P. Sun, Y. Guo, Y. Sun, D.-Y. Sun, X.-J. Wang, *J. Plant Res.* **2006**, 119, 343–350.
- [5] D. Sanders, J. Pelloux, C. Brownlee, J. F. Harper, *Plant Cell* **2002**, 14, 401S–417S.
- [6] D. Lecourieux, R. Ranjeva, A. Pugin, *New Phytol.* **2006**, 19, 711–724.
- [7] N. Pauly, M. R. Knight, P. Thuleau, A. Graziana, S. Muto, R. Ranjeva, C. Mazars, *Cell Calcium* **2001**, 30, 413–421.
- [8] D. Lecourieux, O. Lamotte, O. Bourque, D. Wendehenne, C. Mazars, R. Ranjeva, A. Pugin, *Cell Calcium* **2005**, 38, 527–538.
- [9] A. Mithöfer, C. Mazars, *Biol. Proced. Online* **2002**, 4, 105–118.
- [10] T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Physiol.* **1999**, 121, 153–162.
- [11] E. E. Farmer, E. Alméras, V. Krishnamurthy, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2003**, 6, 372–378.
- [12] P. E. Staswick, I. Tiryaki, *Plant Cell* **2004**, 16, 2117–2127.
- [13] T. A. Alston, D. J. T. Porter, H. J. Bright, *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 418–424.
- [14] B. Kaplan, O. Davydov, H. Knight, Y. Galon, M. R. Knight, R. Fluhr, H. Fromm, *Plant Cell* **2006**, 18, 2733–2748.
- [15] A. Devoto, J. G. Turner, *Physiol. Plant.* **2005**, 123, 161–172.
- [16] T. Krumm, K. Bandemer, W. Boland, *FEBS Lett.* **1995**, 377, 523–529.
- [17] G. Schüler, H. Goerls, W. Boland, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1663–1668.
- [18] J. Hopke, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1997**.