

Studien zum Aminosäuremetabolismus von Tabakpflanzen mit Hilfe von ^{13}N : Methyljasmonat steigert den metabolischen Fluss von Serin und Glycin sowie den Blattexport des Stickstoffs

Nils Hanik^a, Michael Schueller^b und Richard A. Ferrieri^b

^aJohannes Gutenberg Universität, 55099 Mainz, ^bBrookhaven National Laboratory (BNL), Upton, NY, USA 11973

Einleitung: Jasmonate (JA's) werden mit der natürlichen Pflanzenabwehr und in diesem Zusammenhang mit der Zellwandzusammensetzung in Verbindung gebracht. JA's steigern den ektopischen Anteil an Lignin, während sie den Zelluloseanteil verringern.¹ Bislang ist wenig über den Mechanismus dieser Regulation bekannt. Der Positronenemitter ^{13}N stellt, einen idealen Kandidaten dar, um Studien am Aminosäuremetabolismus von Pflanzen durchzuführen. ^{13}N in Form von gasförmigem Ammoniak, wurde der Pflanze appliziert und der Stickstoff durch die Glutaminsynthetase fixiert und somit in den Aminosäurestoffwechsel der Pflanze eingeschleust. Anschließende Detektion der Radioaktivitätsverteilung an ausgewählten Positionen der Pflanze oder in Kombination mit HPLC-Methoden ermöglichte Aussagen über den Transport des Stickstoffs sowie über das Profil der *in planta* synthetisierten Aminosäuren.

Experimentelles: Verwendet wurden 8 Wochen alte *Nicotiana tabacum L.* (cv Samsun) die im 16/8 Lichtzyklus (Intensität: $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aufgezogen wurden. $^{13}\text{NO}_3^-$ wurde am Zyklotron über die $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ Kernreaktion erhalten und mit Devarda's Reagenz zum Ammoniak reduziert. Das Gas wurde in eine, die Zielregion (photosyntheseaktives Blatt) umfassende, Kammer geleitet. Die Exportmenge aus der Zielregion und die Transportmengen zum Apex und in die Wurzeln wurden mit Hilfe von NaI(Li)-Szintillatoren gemessen und über 120 min bilanziert. Alternativ wurde nach 20 Minuten eine definierte Menge an Pflanzenmaterial extrahiert, mit *o*-Phtaldialdehyd (OPA) derivatisiert und mit Hilfe der HPLC analysiert. (Gradient 100%, 0,01 M Phosphatpuffer $t = 0$ min bis 80 % MeOH nach 30 min; Phenomenex Ultramex[®] C₁₈ 10 μ 100 x 4,60 mm, 1,5 ml/min) Innerhalb von 60 min wurden 22 Aminosäuren getrennt detektiert. Die Detektion erfolgte über einen NaI(Li)-Szintillator mit nachgeschaltetem UV-Detektor bei 340 nm.

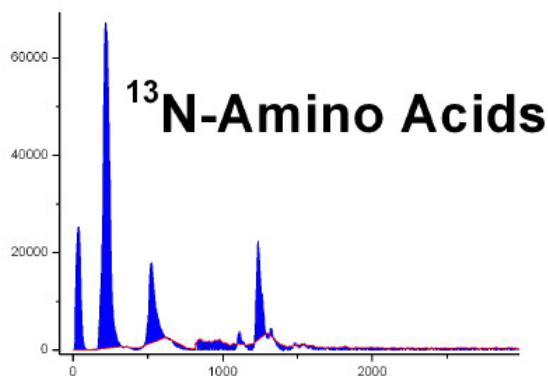


Abb. 1: exemplarisches Chromatogramm der ^{13}N -markierten Aminosäuren

Ergebnisse und Diskussion: Methyljasmonat steigert den Blattexport von Stickstoffhaltigen Molekülen zu Wurzeln und Apex wobei dem Apex ein größerer Anteil zukommt. Es beeinflusst nicht die Glutaminsynthetase-Aktivität aber steigert signifikant den metabolischen Fluss der Aminosäuren Glycin und Serin. Bei der Biosynthese von Lignin werden Monolignine mit Hilfe der Kaffeesäure *ortho*-Methyl Transferase (COMT) methyliert, wobei als Methylendonoren die Aminosäuren Serin und Glycin eine übergeordnete Rolle spielen. Deren ansteigender metabolischer Fluss bei steigender Nachfrage von Lignin für die Zellwandsynthese lässt darauf schließen, dass die COMT ein zentrales Schlüsselenzym im Mechanismus der durch JA's hervorgerufenen Abwehrreaktion ist.

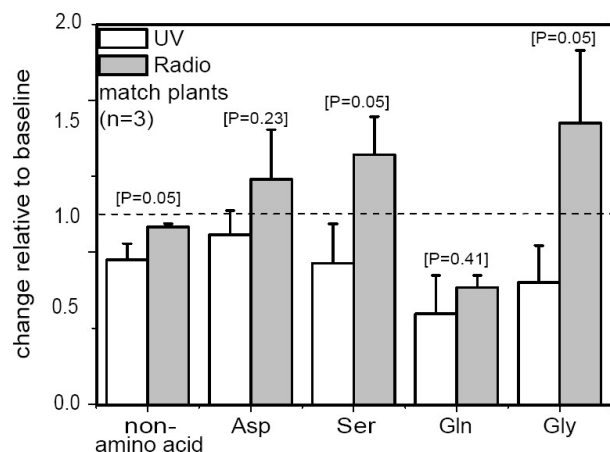


Abb. 2: relative Veränderung des Aminosäuregehalts

Zusammenfassung: Die Verwendung von ^{13}N -Ammoniak zur Analyse von Transportdynamik, Verteilung und Metabolismus des Stickstoffs in Pflanzen ist ein nützliches Werkzeug um ein tieferes Verständnis der komplexen Abwehrprozesse die durch JA's hervorgerufen werden zu erhalten. In dieser Studie konnten die aus der Stickstoffassimilation resultierenden Aminosäureprofile ein mögliches Schlüsselenzym für den von JA's induzierten Abwehrmechanismus von Tabakpflanzen aufzeigen. Weitere Studien bezüglich der COMT-Aktivität im Zusammenhang mit der Behandlung von Pflanzen mit Methyljasmonat belegen dieses Ergebnis.²

Acknowledgment: I want to thank Dr. Jacob Hooker, Prof. Dr. Joanna Fowler and Prof. Dr. Rösch. Funding by DAAD and DOE.

¹ C. Baron and P. C. Zambryski, Annual Review of Genetics, Vol. 29: 107-129 (1995)

² J.E. Lee, T. Vogt, B. Hause und M. Lobler, Plant Cell Physiol., Vol. 38(7): 851-862 (1997)