

**Untersuchungen zur Auswirkung der  
Überexpression des für die  
4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase  
kodierenden Gens aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.)  
in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel



vorgelegt von  
**Gaby Andersen**

Kiel  
2004

Referent: Prof. Dr. K. Krupinska

Koreferent: Prof. Dr. W. Bilger

Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2004

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 26.11.04

Der Dekan

gez. Prof. Dr. J. Grotemeyer

*Meiner Mutter*

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Bedeutung der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase im tierischen und pflanzlichen Stoffwechsel	1
1.2 Biosynthese von Vitamin E	3
1.3 Biosynthese und Funktion von Plastochinon	7
1.4 Lokalisation und Funktionen des Vitamins E in Pflanzen	9
1.4.1 Membranstabilisierende Funktion	9
1.4.2 Antioxidative Funktionen	10
1.4.3 Weitere Funktionen des Vitamins E	12
1.5 Oxidativer Stress bei Pflanzen	12
1.5.1 Seneszenz	13
1.5.2 Lichtstress	13
1.6 Zielsetzung	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme	16
2.2 Pflanzenmaterial	16
2.2.1 Anzucht der Tabakpflanzen	17
2.2.2 Selektion der transgenen Tabakpflanzen mittels Sulcotrion	18
2.2.3 Erzeugung der Stresskombination Kühle und Licht	18

2.3	Physiologische Parameter	19
2.3.1	Chlorophyllbestimmung	19
2.3.2	Vitamin E-Bestimmung	19
2.3.3	Bestimmung des Plastochinon-Gehaltes in Blättern	21
2.3.4	Bestimmung des Trockengewichts der Tabaksamen	22
2.3.5	Bestimmung des Lipidgehaltes von Tabaksamen	22
2.3.6	Bestimmung der Lipidzusammensetzung von Tabaksamen	23
2.3.7	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Tabaksamen	23
2.3.8	Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz	24
	Berechnung der Fluoreszenz Parameter	24
2.3.9	Bestimmung des Redoxstatus von P700	25
2.3.10	Statistische Analysen	25
2.4	Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
2.4.1	Gensonden	26
2.4.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien und Plasmidisolierung	28
2.4.3	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.4.4	Isolierung von Gesamt-DNA aus Tabak	29
2.4.5	Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIZOL™-Reagenz	30
2.4.6	Isolierung von poly(A) <sup>+</sup> -RNA	30
2.4.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.4.8	Radioaktive Markierung von Sonden	31
2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	31
2.4.10	Sequenzanalyse	31
2.5	cDNA-Synthese	32
2.6	<i>Southern Blot</i> -Analyse	33

2.7 <i>Northern Blot</i> -Analyse	35
2.8 Erstellung und Hybridisierung von DNA- <i>Dot-Blot</i> -Membranen	36
2.9 Mikroskopische Methoden	37
2.9.1 Erstellung von Querschnitten von Tabaksamen und Antheren	37
2.9.2 Lichtmikroskopie	37
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1 Untersuchungen zur Expression des <i>hpd</i> -Gens aus Gerste in den transgenen Tabaklinien	39
3.1.1 Nachweis der Resistenz von Tabakkeimlingen gegenüber dem Herbizid Mikado <sup>®</sup>	39
3.1.2 Nachweis des <i>hpd</i> -Gens aus Gerste in Blättern der transgenen Tabaklinien	40
3.1.3 Untersuchung der erhöhten Mikado <sup>®</sup> -Resistenz von Keimlingen der transgenen Tabaklinien	42
3.1.4 Untersuchung der Transkriptgehalte des <i>hpd</i> -Gens aus Gerste und des <i>hpd</i> -Gens aus Tabak in Blättern der transgenen Tabaklinien	44
3.1.5 Untersuchung der Transkriptgehalte der für die Enzyme der Biosynthese des Vitamins E kodierenden Gene	47
3.2 Untersuchungen zur Auswirkung der Überexpression des <i>hpd</i> -Gens aus Gerste auf den Gehalt an Vitamin E und Plastochinon-9 in den transgenen Tabakpflanzen	49
3.2.1 Untersuchung des Seneszenzverlaufs von Blättern der transgenen Linien	49
3.2.2 Analyse des Tocopherolgehaltes in Blättern der transgenen Tabaklinien	52
3.2.3 Analyse des Plastochinongehaltes in Blättern der transgenen Tabaklinien	54
3.2.3.1 Untersuchung des photochemischen <i>quenchings</i> in seneszenten Tabakblättern	56
3.2.4 Einfluss der Bestrahlungsstärke auf den Tocopherolgehalt in Tabakkeimlingen	58
3.2.5 Untersuchungen zum Keimungsverlauf in den transgenen Linien	59

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.6	Verteilung der Vitamin E-Formen innerhalb der Tabaksamen	63
3.2.7	Untersuchungen des Vitamin E-Gehaltes von Tabaksamen	66
3.2.8	Untersuchung des Lipidgehaltes und der Lipidzusammensetzung von Tabaksamen	68
3.2.9	Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung von Tabaksamen	70
3.2.10	Untersuchung der Vitamin E-Gehalte und –Zusammensetzung von Antheren der Tabaklinien	71
3.3	Untersuchungen zur Stressresistenz der transgenen Tabaklinien	74
3.3.1	Untersuchung des Einflusses von Starklicht auf Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps	74
3.3.2	Untersuchung des Einflusses der Kombination von Kühle und Licht auf Blattscheiben der transgenen Linien	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase	85
4.2	Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon	87
4.2.1	Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon im Blatt	87
4.2.2	Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon in Samen und Keimlingen	93
4.3	Funktionen des Vitamins E in der Pflanze	96
4.3.1	Funktionen des Vitamins E in Samen und Antheren	96
4.3.2	Funktionen des Vitamins E im Blatt	99
4.4	Ausblick	106
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Deoxyadenylat
Abb.	Abbildung
APX	Ascorbat-Peroxidase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Deoxycytidylat
<sup>14</sup> C	Kohlenstoff-Isotop mit der Massezahl 14
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus ( <i>Cauliflower-mosaic-virus</i> )
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laser Raster Mikroskop
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBMIB	Dibromothymochinon
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidin-5'-triphosphat
DHAR	Dehydroascorbat-Reduktase
DLPE	Dilauroylphosphatidylethanolamin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPBQ	2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
DSPC	Distearylphosphatidylcholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronen Spin Resonanz
EST	<i>expressed sequence tag</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

Fd <sub>ox</sub>	Ferredoxin in der oxidierten Form
Fd <sub>red</sub>	Ferredoxin in der reduzierten Form
Fe (II)	Eisen in der Oxidationsstufe +2
Fe (III)	Eisen in der Oxidationsstufe +3
FG	Frischgewicht
g	Zentrifugalbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GGDP	Geranylgeranyl-diphosphat
GGDR	Geranylgeranyl-diphosphat-Reduktase
GGPS	Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase
GR	Glutathion-Reduktase
γ-TMT	γ-Tocopherol-Methyltransferase
HGAD	Homogentisat-Dioxygenase
HGGT	Homogentisat-Geranylgeranyltransferase
<i>hpd</i>	Gen für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie ( <i>High-Performance-Liquid-Chromatography</i> )
HPT	Homogentisat-Phytyltransferase
HST	Homogentisat-Solanyltransferase
kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex ( <i>light harvesting complex</i> )
MDHAR	Monodehydroascorbat-Reduktase
MPBQ	2-methyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
MT	Methyltransferase
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
nt	Nukleotide
<sup>32</sup> P	Phosphor-Isotop mit der Massezahl 32
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

PDP	Phytyl-diphosphat
PPFD	Photosynthetisch aktive Photonen-Fluss-Dichte (Bestrahlungsstärke)
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q <sub>A</sub>	im D2-Protein des Photosystems II festgebundenes Plastochinon
q <sub>P</sub>	photochemische Fluoreszenzlöschung ( <i>photochemical quenching</i> )
<i>rbcS</i>	kernkodiertes Gen für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5- biphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
SAG	seneszenzassoziiertes Gen ( <i>senescence associated gene</i> )
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
T	Deoxythymidylat
Tab.	Tabelle
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TC	Tocopherol-Cyclase
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u	Enzymeinheit („unit“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

### **Anmerkung**

Englische Termini, für die es keine gebräuchlichen deutschen Ausdrücke gibt und die teilweise auch Eingang in die deutschsprachige Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten und kursiv geschrieben.

Alle Gennamen wurden entsprechend den Konventionen kursiv und mit kleinen Buchstaben, Proteinamen mit großen Buchstaben geschrieben.

## 1. Einleitung

In den letzten Jahren wurden viele Genome vollständig sequenziert. Hierdurch wird die Untersuchung gemeinsamer Stoffwechselwege von tierischen und pflanzlichen Zellen ermöglicht. Ebenso können Vergleiche zwischen biochemischen, physiologischen und genetischen Daten erfolgen. Einige Stoffwechselwege sind nach heutigen Erkenntnissen in tierischen und pflanzlichen Zellen identisch, während andere Stoffwechselwege stark voneinander abweichen oder spezifisch für den jeweiligen Organismus sind. Ein wichtiges Beispiel ist die Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon, zu der ausschließlich Pflanzen und einige Cyanobakterien befähigt sind. Mit der Kenntnis der für die Enzyme dieser Biosynthese kodierenden Gene ist es möglich, mit gentechnischen Ansätzen die Bedeutung und Regulation solcher Stoffwechselwege zu untersuchen.

### 1.1 Die Bedeutung der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase im tierischen und pflanzlichen Stoffwechsel

Oxygenasen sind wichtige Enzyme sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Stoffwechsel. Sie katalysieren den Einbau von Sauerstoff in organische Verbindungen. Man kann zwei Klassen von Oxygenasen unterscheiden. Monooxygenasen übertragen ein Sauerstoffatom auf das jeweilige Substrat, wohingegen Dioxygenasen zwei Sauerstoffatome übertragen. Die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD, E.C. 1.13.11.27) ist ein Nicht Häm-Eisen (II) Enzym. Es katalysiert die Bildung von Homogentisat (2,5-Dihydroxyphenylacetat) aus 4-Hydroxyphenylpyruvat. Diese Reaktion beinhaltet zunächst eine oxidative Decarboxylierung der 2-Oxosäureseitenkette, gefolgt von der Hydroxylierung des aromatischen Rings und einer 1,2-Umlagerung der Carboxymethylgruppe (Jefford & Cadby 1981). Das Enzym gehört zur Gruppe der 2-Oxosäure-abhängigen Dioxygenasen. Diese benötigen neben molekularem Sauerstoff und dem jeweiligen Substrat eine 2-Oxosäure für ihre Aktivität. Im Unterschied zu anderen von einer 2-Oxosäure abhängigen Enzymen ist im Falle der HPPD die 2-Oxosäure kovalenter Bestandteil des Substratmoleküls und nicht zusätzlicher Ligand. Zusätzlich ist Ascorbat als Cofaktor essentiell für die

Enzymaktivität (Que & Ho 1996). In Abwesenheit von Ascorbat wird wahrscheinlich das Fe(II) zum Fe(III) oxidiert und das jeweilige Enzym somit inaktiviert. In den meisten Organismen ist die HPPD am Abbau der Aminosäure Tyrosin beteiligt (Goodwin 1972). Tyrosin wird hierbei durch eine Tyrosin-Aminotransferase zu 4-Hydroxyphenylpyruvat desaminiert. Dieses wird zu Homogentisat umgesetzt, welches in einem mehrstufigen Prozess zu den Endprodukten Fumarat und Acetoacetat abgebaut wird. Ein Enzymdefekt der HPPD ist beim Menschen als Tyrosinämie vom Typ III bekannt. Die Krankheit ist durch eine erhöhte Tyrosinkonzentration und massive Ausscheidung von 4-Hydroxyphenylpyruvat und dessen Derivaten mit dem Urin charakterisiert. Die Patienten sind mental retardiert, die Leber ist nicht in Mitleidenschaft gezogen (Tomoeda et al. 2000).

Im Hinblick auf pflanzliche HPPDs sind mittlerweile einige Gensequenzen bekannt. Hierzu gehören unter anderem die Gensequenzen aus *Arabidopsis thaliana* L. (Norris et al. 1998), *Daucus carota* L. (Garcia et al. 1997) und *Hordeum vulgare* L. (Kleber-Janke & Krupinska 1997). Die Aminosäuresequenzen der pflanzlichen HPPDs zeigen eine Homologie von etwa 70% zueinander. Die konservierten Bereiche beschränken sich jedoch fast ausschließlich auf den C-terminalen Bereich (Linden 2000, Falk et al. 2002). Eine biochemische Charakterisierung der jeweiligen Proteine erfolgte jedoch nur im Falle der HPPD aus *Zea mays* L. und *Spinacia oleracea* L. (Barta & Böger 1996, Linden 2000, Fiedler et al. 1982). Kürzlich ist es erstmals gelungen, die Struktur der HPPD aus Mais und *A. thaliana* aufzuklären (Fritze et al. 2004).

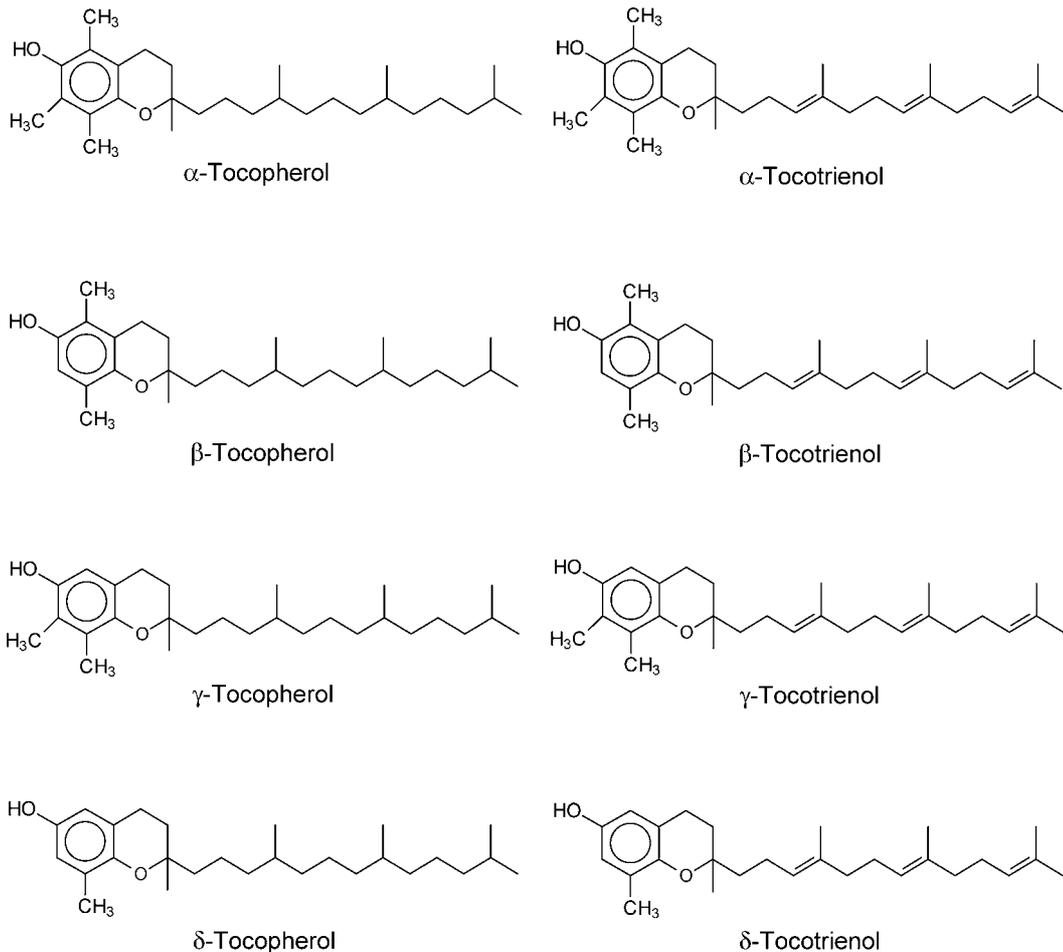
In photosynthetischen Organismen erfüllt die HPPD eine zentrale Rolle im Sekundärstoffwechsel, da anders als in tierischen Organismen das unter Beteiligung des Enzyms gebildete Homogentisat Vorläufer für die Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon ist (Whistance & Threlfall 1970). Auch in Pflanzen ist die HPPD am Abbau von Tyrosin beteiligt (Durand & Zenk 1974, Fernández-Canón & Penalva 1995). Der HPPD galt in den letzten Jahren verstärktes Interesse, da gezeigt werden konnte, dass die HPPD Zielenzym einer neuen Klasse von Herbiziden (Sulcotrione) ist, die zum Ausbleichen und damit schließlich zum Tod der Pflanzen führen (Schulz et al. 1993, Secor 1994). Sulcotrion wirkt als Inhibitor der HPPD, indem es kompetitiv mit dem Substrat an das Fe(II)-Atom im aktiven Zentrum bindet (Schulz et al. 1993, Secor 1994). Sulcotrion wird unter dem Markennamen Mikado® (Bayer CropScience) vertrieben. Eine zweite Klasse von Inhibitoren sind Isoxazole (Garcia et al. 2000,

Pallett et al. 2001), wobei der Wirkungsmechanismus bei beiden Herbizidklassen der gleiche ist. Der ausbleichende Effekt geht mit einer Akkumulation von Phytoen einher, einem Vorläufer der Carotinoid-Biosynthese. Norris et al. (1995) konnten zeigen, dass Plastochinon als Cofaktor der Phytoen-Desaturase eine essentielle Komponente der Carotinoid-Biosynthese ist. Wird durch das eingesetzte Sulcotrion die Biosynthese des Plastochinons unterbunden, so kommt es in der Folge zu einer Blockierung der Carotinoid-Biosynthese. Damit verlieren, bei gleichzeitiger Lichteinstrahlung, die Chlorophyllmoleküle der Pflanzen ihren Schutz vor photooxidativer Zerstörung, und es kommt zu dem bereits erwähnten Ausbleichen der Pflanzen. Das Herbizid wirkt sich aufgrund der bei der Keimung verstärkt ablaufenden Neusynthese des Plastochinons besonders zu diesem Zeitpunkt auf die Pflanzen aus und wird daher auch als Auflaufherbizid vertrieben.

Untersuchungen an Zellkulturen von Karotte (*Daucus carota* L.) zeigen, dass die Aktivität der HPPD mit dem Cytosol assoziiert ist (Garcia et al. 1997). Durch eine Überexpression des *hpd*-Gens aus *A. thaliana* in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) konnte ebenfalls eine Lokalisation der transgenen HPPD im Cytosol gezeigt werden (Garcia et al. 1999). Das *hpd*-Gen gehört zu den aus Gerste isolierten Seneszenz assoziierten Genen (SAG), da gezeigt werden konnte, dass Fahnenblätter der Gerste während der Seneszenz einen erhöhten Transkriptgehalt dieses Gens aufweisen (Kleber-Janke & Krupinska 1997).

### 1.2 Biosynthese von Vitamin E

Der Terminus Vitamin E umfasst eine Gruppe von insgesamt acht Verbindungen. Hierzu gehören vier Tocopherole und vier Tocotrienole. Allen gemein ist ein Chromanol-Ringsystem, an dem sich eine aliphatische C16-Seitenkette befindet. Im Fall der Tocopherole ist diese Seitenkette gesättigt, während die Seitenkette der Tocotrienole drei Doppelbindungen enthält. In Abhängigkeit des Methylierungsgrades und der Position der Methylgruppen unterscheidet man jeweils die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Formen der Tocopherole bzw. der Tocotrienole (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1** Strukturformeln der acht zur Gruppe des Vitamins E gehörenden Verbindungen

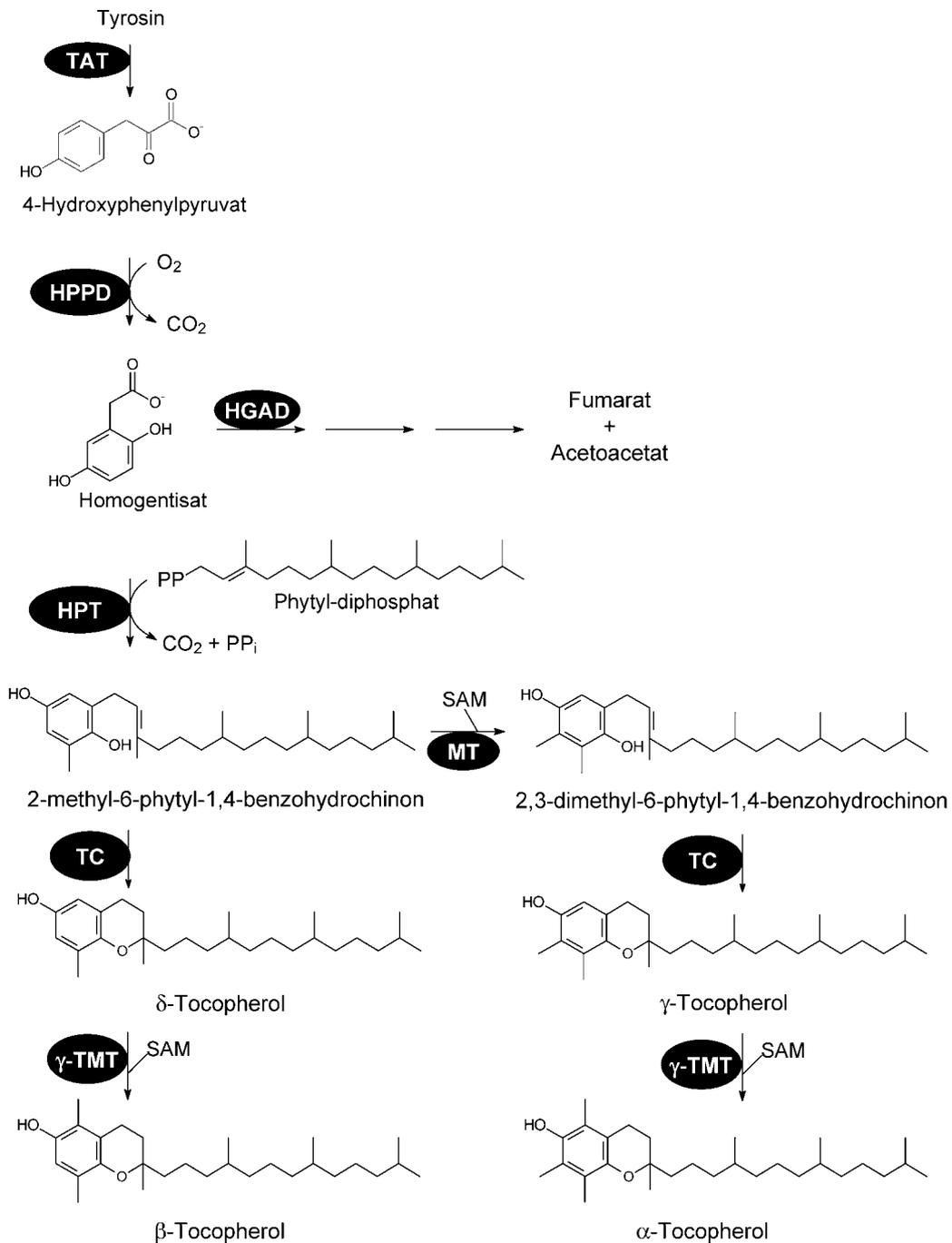
Die Biosynthese der Tocopherole ist ein mehrstufiger Prozess der in Abb. 1.2 dargestellt ist. Das durch Transaminierung des Tyrosins gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) wird durch das cytosolische Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase zu Homogentisat umgesetzt. Alle nachfolgenden enzymatischen Schritte erfolgen in den Plastiden (Soll et al. 1985). Das membrangebundene Enzym Homogentisat-Phytyltransferase (HPT) katalysiert die Kondensation eines Phytol-diphosphats (PDP) an Homogentisat. PDP kann über zwei Prozesse gebildet werden. Zum einen kann ein aus 4 Isopentenyleinheiten aufgebautes Geranylgeranyl-diphosphat (GGDP) mittels einer Geranylgeranyl-diphosphat-Reduktase (GGDR) zu PDP reduziert werden. Zum anderen kann das durch den Chlorophyll-Abbau entstehende Phytol unter Beteiligung von ATP und einer im Chloroplasten-Stroma vorhandenen Kinaseaktivität zu PDP umgesetzt werden (Soll et al. 1980).

Bei der Kondensation von PDP an Homogentisat entsteht 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon (MPBQ) (Soll 1987, Collakova & DellaPenna 2001, Savidge et al. 2002). MPBQ kann unter Beteiligung einer MPBQ-Methyltransferase und S-Adenosyl-Methionin (SAM) zu 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon (DMPBQ) methyliert werden (Marshall et al. 1985, Soll 1987, Shintani et al. 2002). MPBQ und DMPBQ können, katalysiert durch eine Tocopherol-Cyclase, zu  $\delta$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol umgesetzt werden (Stocker et al. 1996, Arango & Heise 1998, Porfirova et al. 2002). Das letzte Enzym der Biosynthese ist die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase ( $\gamma$ -TMT), welche die Methylierung des  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherols zu  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Tocopherol katalysiert (d'Harlingue & Camara 1985, Ishiko et al. 1992, Shintani & DellaPenna 1998). Die Biosynthese der Tocotrienole ist im Gegensatz zur Biosynthese der Tocopherole weit weniger gut untersucht worden, es wird allerdings von einem entsprechenden Verlauf ausgegangen (Cahoon et al. 2003, Dörmann 2003). Statt Phytol-diphosphat wird hierbei allerdings Geranylgeranyl-diphosphat (GGDP) an Homogentisat kondensiert. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine für die Biosynthese der Tocotrienole spezifische, Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase (HGGT). Die darauf folgenden Methylierungs- sowie Cyclisierungsreaktionen scheinen unter Beteiligung der an der Tocopherolbiosynthese beteiligten Enzyme abzulaufen, da gezeigt werden konnte, dass die entsprechenden Geranylgeranyl-benzohydrochinone ebenfalls durch diese Enzyme umgesetzt werden können (Soll & Schultz 1979). Cahoon et al. (2003) konnten erstmals die für die Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase kodierenden cDNAs aus Gerste, Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Reis (*Oryza sativa* L.) isolieren. Durch Überexpression der für die HGGT spezifischen cDNA aus Gerste in *A. thaliana* wurde eine Akkumulation von Tocotrienolen, welche in Blättern der Wildtyppflanzen nicht nachgewiesen werden können, erzielt.

Interessanterweise scheinen die pflanzlichen HPTs spezifisch für Phytol-diphosphat zu sein, während die HPT aus Cyanobakterien mit einer geringeren Effizienz auch mit GGDP reagiert (Collakova & DellaPenna 2001).

Mit Ausnahme der HPPD sind alle weiteren an der Biosynthese des Vitamins E beteiligten Enzyme in den Plastiden lokalisiert (Soll et al. 1985, Arango & Heise 1998).

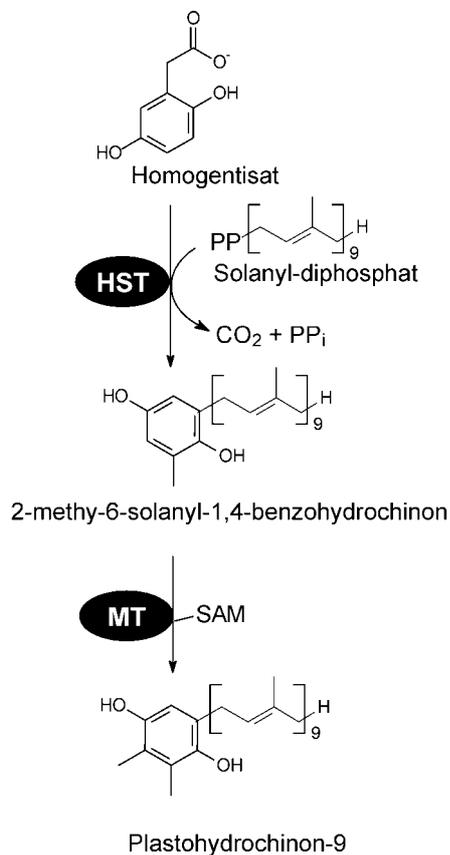
Über eine Regulation der Vitamin E-Biosynthese ist zur Zeit wenig bekannt. Man geht aber davon aus, dass die Kondensation des PDPs an Homogentisat der limitierende Schritt ist (Collakova & DellaPenna 2003a).



**Abb. 1.2:** Biosynthese der Tocopherole. Die beteiligten Enzyme sind in schwarzen Kreisen dargestellt. TAT (Tyrosin-Aminotransferase), HPPD (4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase), HGAD (Homogentisat-Dioxygenase), HPT (Homogentisat-Phytyltransferase), MT (Methyltransferase), TC (Tocopherol-Cyclase),  $\gamma$ -TMT ( $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase), SAM (S-Adenosyl-Methionin), modifiziert nach Collakova & DellaPenna (2003b).

### 1.3 Biosynthese und Funktion von Plastochinon

Die Biosynthese des Elektronenüberträgers Plastochinon ist in Abb. 1.3 dargestellt. Die Homogentisat-Solanyl-Transferase ist eine für Solanyl-diphosphat spezifische Prenyltransferase (Norris et al. 1995, Collakova & DellaPenna 2001). Die Methylierung des aromatischen Ringsystems erfolgt an der gleichen Stelle wie die Methylierung des MPBQ. Die Methyltransferase ist nach neueren Ergebnissen mit der ersten Methyltransferase der Tocopherolbiosynthese identisch (Motohashi et al. 2003, Cheng et al. 2003). Hierbei wird Plastochinon gebildet. Genau wie die Biosynthese des Vitamins E erfolgt die Biosynthese des Plastochinons in der inneren Hüllmembran der Plastiden (Soll et al. 1985).



**Abb. 1.3:** Biosynthese von Plastohydrochinon-9. Die beteiligten Enzyme sind in schwarzen Kreisen dargestellt. HST (Homogentisat-Solanyl-Transferase), MT (Methyltransferase), SAM (S-Adenosyl-Methionin), modifiziert nach Cheng et al. (2003).

Das Plastochinon fungiert in den Chloroplasten als Elektronenüberträger innerhalb der Elektronentransportkette der Photosynthese. So übernimmt im Licht ein im D2-Protein des Photosystems II festgebundenes Plastochinon  $Q_A$  in einer schnellen Reaktion ein Elektron vom Phaeophytin. Das dadurch entstandene Semichinonradikal  $Q_A^{\cdot-}$  reduziert mit einer langsameren Kinetik ein zweites Chinon  $Q_B$ , das im D1-Protein nicht kovalent gebunden ist.  $Q_B$  nimmt nacheinander insgesamt zwei Elektronen sowie zwei Protonen auf und wird dadurch zu einem Hydrochinon reduziert. Das Hydrochinon verlässt dann im Austausch gegen ein anderes Chinon den  $Q_B$ -Bindungsort (Aro et al. 1993). Eine weitere Funktion, die zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist die durch den Redoxstatus des Plastochinons vermittelte Expression plastiden- sowie kernkodierter Photosynthesegene (Pfannschmidt et al. 1999, Pfannschmidt 2002). Über den Redoxstatus des Plastochinons wird ebenfalls die als *state transition* bezeichnete Verschiebung von Lichtsammelkomplexen zwischen den Photosystemen reguliert. Jedes der beiden Photosysteme besitzt seine eigenen Lichtsammelkomplexe, um die Lichtenergie in die Reaktionszentren weiterzuleiten. Zusätzlich gibt es aber einen mobilen Lichtsammelkomplex (LHCII), der in phosphorylierter Form an Photosystem I und in dephosphorylierter Form an Photosystem II gebunden vorliegt. Lichtbedingungen, die bevorzugt das Photosystem II anregen, haben einen erhöhten Anteil an reduziertem Plastochinon zur Folge, da weniger Elektronen von Photosystem I bewegt werden können. Dies führt zur Aktivierung einer LHCII-Kinase, die eine Phosphorylierung von LHCII bewirkt, was eine laterale Verschiebung des LHCII zum Photosystem I zur Folge hat. Umgekehrt wird bei einer bevorzugten Anregung des Photosystems I und dem daraus resultierenden erhöhten Anteil an oxidiertem Plastochinon dieselbe LHCII-Kinase deaktiviert, LHCII durch eine LHCII-Phosphatase dephosphoryliert und der Lichtsammelkomplex kann so wieder an das Photosystem II binden (Allen 1992, Allen 2003). Über diesen Mechanismus kann unter variierenden Lichtbedingungen eine effiziente Photosynthese gewährleistet werden, bei der beide Photosysteme annähernd die gleiche Elektronentransportrate aufweisen.

### 1.4 Lokalisation und Funktionen des Vitamins E in Pflanzen

Vitamin E findet sich in fast allen Teilen der Pflanze, wobei die Vitamin E-Zusammensetzung und die jeweiligen Gehalte stark variieren. So kommt in grünem Pflanzengewebe hauptsächlich  $\alpha$ -Tocopherol vor (Hess 1993). Demgegenüber finden sich die Tocotrienole sowie  $\gamma$ -Tocopherol hauptsächlich in Samen (Goffmann et al. 1999, Grusak & DellaPenna 1999). Aufgrund der in den Plastiden lokalisierten Biosynthese des Vitamins E ist zu vermuten, dass die Tocopherole und Tocotrienole in Plastiden lokalisiert sind. Es gibt allerdings auch Arbeiten, die von einer Lokalisation auch außerhalb der Plastiden berichten (Newton & Pennock 1971, Janiszowska & Jasinska 1982, Janiszowska 1987). Leider liegen aber keine Daten bezüglich der Reinheit der untersuchten Fraktionen vor, so dass es sich um Verunreinigungen dieser Fraktionen mit Plastidenfraktionen handeln könnte. Innerhalb der Plastiden finden sich die Tocopherole in der Hüllmembran (Soll et al. 1984, Arango & Heise 1998), in den Thylakoidmembranen (Fryer 1992, Havaux 1998, Wise & Naylor 1987) und in Plastoglobuli (Lichtenthaler & Sprey 1966). In den Membranen werden den Tocopherolen zwei grundsätzliche Funktionen zugeschrieben: zum einen eine membranstabilisierende und zum anderen eine antioxidative Funktion.

#### 1.4.1 Membranstabilisierende Funktion

Es wird generell davon ausgegangen, dass Interaktionen zwischen  $\alpha$ -Tocopherol und anderen Membranbestandteilen die Stabilität von Membranen erhöhen können (Wang & Quinn 1999). Durch welche Wechselwirkungen dies erreicht wird, ist allerdings nicht genau geklärt. Elektronen-Spin-Resonanz-Untersuchungen (ESR) haben ergeben, dass  $\alpha$ -Tocopherol in der Art in Membranen eingelagert wird, dass die Isoprenoid-Seitenkette das Molekül in der Membran verankert, während das polare Chromanolringsystem zur Lipid-Wasser-Interphase hin orientiert ist (Niki et al. 1985, Kagan & Quinn 1988). Es gibt Hinweise auf das Vorhandensein einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe am Chromanolring des  $\alpha$ -Tocopherols und der Carbonylgruppe der Esterbindung des Phospholipids (Gomez-Fernandez et al. 1989, Shamovski & Yarovskaya 1991). Wird  $\alpha$ -Tocopherol in Vesikel eingebracht, welche aus einem äquimolaren Gemisch aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) / Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE)

bzw. Dilaurolylphosphatidylethanolamin (DLPE) / Distearylphosphatidylcholin (DSPC) bestehen, so lagert sich das  $\alpha$ -Tocopherol stets an die fluidere Komponente der Vesikel an (Gomez-Fernandez et al. 1989). Dies könnte in der Folge bedeuten, dass  $\alpha$ -Tocopherol nicht gleichmäßig in der Membran verteilt vorliegt, sondern in den Bereichen der Membran lokalisiert ist, die die höchste Fluidität aufweisen. Das wiederum könnte ein Hinweis auf eine Assoziation des  $\alpha$ -Tocopherols mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren sein. Untersuchungen, welche sich mit der Assoziation von Tocopherolen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren beschäftigten, lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Kamal-Eldin & Andersson 1997, Dolde et al. 1999, Goffmann & Becker 2002).

Ebenfalls scheint  $\alpha$ -Tocopherol auch mit Lipoxygenasen Komplexe zu bilden, wobei deren Aktivität blockiert wird (Grossmann & Waksman 1984).

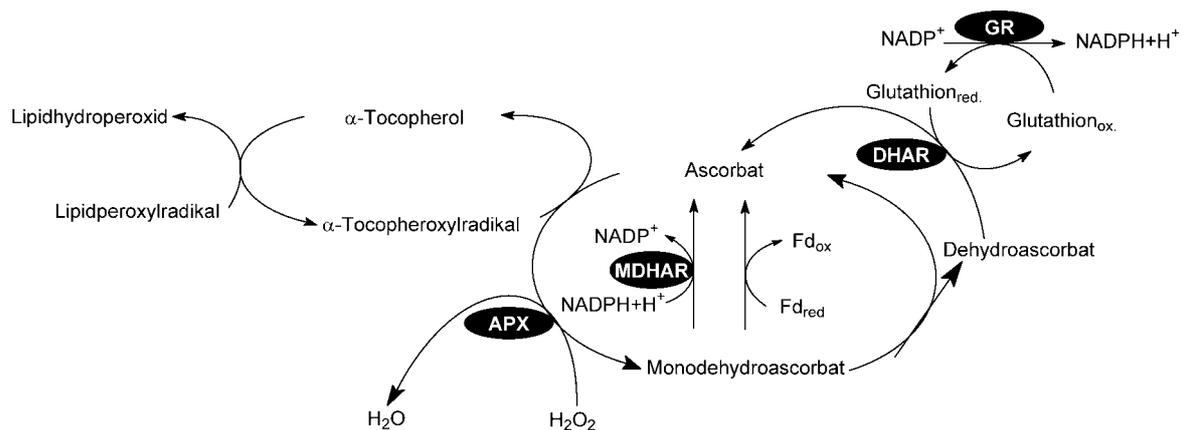
### 1.4.2 Antioxidative Funktionen

Die antioxidative Funktion des Vitamins E ist seit langem bekannt (Burton & Ingold 1986) und in tierischen Zellen insbesondere im Hinblick auf Krankheiten, die auf eine oxidative Degeneration zurückgeführt werden, sehr gut untersucht worden (Bramley et al. 2000). Sie beruht auf der Fähigkeit, das Wasserstoffatom der phenolischen Hydroxylgruppe an Lipidperoxyradikale abzugeben und damit eine Autooxidation der Lipide abubrechen. Aus  $\alpha$ -Tocopherol entsteht vorrangig nach der Öffnung des Chromanolringsystems ein Alkylradikal, das zu einem Hydroxylalkylchinon ( $\alpha$ -Tocochinon) oxidiert wird. Beim  $\gamma$ -Tocopherol erfolgt in der Regel keine Öffnung des Chromanolrings, sondern es werden Diphenylether- und Biphenyldimere gebildet. Im Unterschied zum Chinon aus der Reaktion des  $\alpha$ -Tocopherols enthalten die Dimere eine bzw. zwei phenolische OH-Gruppen, die noch antioxidativ wirksam sind (Gottstein & Grosch 1990). In beiden Fällen wird aber das zunächst gebildete Tocopheroxyradikal resonanzstabilisiert (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage ist, mit Singulett-Sauerstoff zu reagieren (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996). Dabei kann man zwei verschiedene Mechanismen unterscheiden. Zum einen kann  $\alpha$ -Tocopherol den physikalischen Anregungszustand des Singulett-Sauerstoffs löschen (*quenchen*). Hierbei gibt  $\alpha$ -Tocopherol zunächst ein Elektron an Singulett-Sauerstoff unter Bildung eines *charge transfer exciplex* ab. Nach einem folgenden *intersystem crossing*

(Interkombination) löst sich dieser Komplex unter Freisetzung von  $\alpha$ -Tocopherol und Triplett-Sauerstoff (Yamauchi & Matsushita 1977, Thomas & Foote 1978). Zum zweiten kann auch eine chemische Reaktion des  $\alpha$ -Tocopherols mit Singulett-Sauerstoff unter Hydroperoxidbildung erfolgen (Neely et al. 1988). Das gebildete Hydroperoxid reagiert unter Spaltung des Chromanolrings ab, wobei ein Parachinon und Parachinonepoxid entstehen. Der chemische *quench*-Effekt beträgt aber nur 1% des physikalischen Effekts (Kaiser et al. 1990). Die Reaktionsrate von Carotinoiden mit Singulett-Sauerstoff ist allerdings um etwa zwei Größenordnungen höher (Elstner 1990).

In der Pflanzenzelle kann Vitamin E durch Ascorbat regeneriert werden (Abb. 1.4). Das hierbei gebildete Monodehydroascorbat kann seinerseits unter Beteiligung des Glutathions regeneriert werden (Fryer 1992, Noctor & Foyer 1998).



**Abb. 1.4:** Regeneration des bei der Reaktion mit Lipidperoxyradikalen gebildeten  $\alpha$ -Tocopheryloxylradikals. Die an den Reaktionen beteiligten Enzyme sind in schwarzen Kreisen dargestellt. APX (Ascorbat-Peroxidase), MDHAR (Monodehydroascorbat-Reduktase), DHAR (Dehydroascorbat-Reduktase), GR (Glutathion-Reduktase)

### 1.4.3 Weitere Funktionen des Vitamins E

Neben den membranstabilisierenden und antioxidativen Funktionen wird insbesondere für  $\alpha$ -Tocopherol eine Beteiligung an intrazellulären Signalwegen diskutiert (Munné-Bosch & Alegre 2002, Munné-Bosch & Falk 2004).

In tierischen Zellen sind nichtantioxidative Funktionen des  $\alpha$ -Tocopherols seit einiger Zeit bekannt (Azzi & Stocker 2000). So hemmt  $\alpha$ -Tocopherol eine Protein-Kinase C, erhöht die Phosphoprotein-Phosphatase-2A-Aktivität und hat einen Einfluss auf die Expression des  $\alpha$ -Tropomyosin-Gens (Brigelius-Flohé & Traber 1999). Gesicherte Erkenntnisse darüber, ob das Vitamin E auch in pflanzlichen Zellen solche nichtantioxidativen Funktionen erfüllt, gibt es bisher nicht. Allerdings zeigt eine Mutante der Tocopherol-Cyclase aus Mais einen Defekt im Export der Saccharose in *source*-Blättern (Provencher et al. 2001). Die Autoren vermuteten eine zwischen Zellkern und Plastiden gestörte Kommunikation. Die entsprechende Mutante aus *A. thaliana* zeigt diesen Phänotyp jedoch nicht (Porfirova et al. 2002).

### 1.5 Oxidativer Stress bei Pflanzen

Eine Gemeinsamkeit der meisten Stresssituationen bei Pflanzen besteht in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Hierzu gehören Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidradikale ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Hydroxylradikale ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Es verwundert daher nicht, dass unter verschiedenen Stressbedingungen eine ganze Reihe von Pflanzen erhöhte Vitamin E-Gehalte aufweisen (Munne-Bosch & Alegre 2002).

Im folgenden werden kurz zwei Situationen, in denen Pflanzen oxidativem Stress ausgesetzt sind und während derer Vitamin E möglicherweise eine wichtige Funktion als Antioxidans erfüllen könnte, näher erläutert.

### 1.5.1 Seneszenz

Die Seneszenz ist als das letzte Entwicklungsstadium der Pflanze oder von Pflanzenorganen vor allem durch Remobilisierungsprozesse gekennzeichnet. Das augenscheinlichste Kriterium der Blattseneszenz, das den Beginn dieser Entwicklungsphase anzeigt, ist der Verlust an Chlorophyll (Hensel et al. 1993). Als Konsequenz sinkt auch die Photosyntheseleistung. Demgegenüber bleibt die Effizienz, mit der das Photosystem II arbeitet, länger gleichbleibend hoch und sinkt erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Seneszenz ab (Humbeck et al. 1996). Beim Abbau des photosynthetischen Apparates tritt oxidativer Stress auf (Thompson et al. 1987). Einige während der Seneszenz auftretende Phänomene sind damit auch auf das Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen. So können einige während der Seneszenz induzierte Gene ebenfalls durch ROS induziert werden (Buchanan-Wollaston 1997). Wie bereits erwähnt wurde (1.1), zeigt sich in Fahnenblättern der Gerste während der Seneszenz ein erhöhter Transkriptgehalt des *hpd*-Gens (Kleber-Janke & Krupinska 1997). Da weiterhin gezeigt werden konnte, dass der Gehalt an Tocopherolen in den Fahnenblättern der Gerste während der Seneszenz zunimmt, könnte der erhöhte Transkriptgehalt des *hpd*-Gens im Zusammenhang mit der Akkumulation der Tocopherole stehen (Chrost et al. 1999). Da Vitamin E als lipophiles Antioxidans Biomembranen vor oxidativem Stress schützen kann, liegt die Vermutung nahe, dass ein erhöhter Vitamin E Gehalt während der Seneszenz mit dem vermehrten Bedarf an Antioxidantien zusammenhängt.

### 1.5.2 Lichtstress

Zu viel Licht, welches von den Antennenkomplexen der Photosysteme zu den Reaktionszentren transferiert wird, verursacht Schäden durch oxidativen Stress. Zunächst sind die strahlungslose Wärmedissipation (Demmig-Adams & Adams 1992, Horton et al. 1994) und die Regulation der Größe der Antennen (Anderson & Andersson 1988, Aro et al. 1993) wichtige Mechanismen zum Schutz der Photosysteme. Bei längerfristig anhaltendem oder besonders starkem Lichtstress reichen diese Schutzmechanismen aber nicht aus. Dann wird das „Core“-Protein des Photosystem II-Reaktionszentrums, das D1-Protein, vermutlich unter Mitwirkung reaktiver Sauerstoffspezies, gespalten und damit das Photosystem inaktiviert. Dieser Prozess wird als Photoinhibition bezeichnet und führt zu einer Verringerung der

Netto-Photosynthese (Powles 1984, Aro et al. 1993). Da das D1-Protein schnell und gezielt ausgetauscht werden kann, ohne dass das gesamte Photosystem abgebaut wird, ist die Photoinhibition reversibel. Übersteigt jedoch die Photoinhibition die Neusynthese des D1-Proteins, so tritt Photodestruktion auf. Die Kombination von hohen Lichtintensitäten mit anderen Stressfaktoren, wie z.B. Kühle oder Hitze, wirkt sich besonders negativ auf die Pflanze aus (Demmig-Adams & Adams 1992). Lange Zeit wurde das Photosystem II als primärer Ort der Photoinhibition angenommen (Barber & Andersson 1992, Aro et al. 1993). Inzwischen wurde aber auch eine Photoinhibition am Photosystem I beschrieben (Havaux & Davaud 1994, Sonoike & Terashima 1994, Terashima et al. 1994, Sonoike 1995, Sonoike 1996a, Tjus et al. 1998), die besonders bei Kälte in Algen und Höheren Pflanzen ausgeprägt ist. Erstaunlicherweise wird diese Photoinhibition bei Schwachlicht beobachtet. Sie wird ebenfalls auf reaktive Sauerstoffspezies zurückgeführt, möglicherweise in noch stärkerem Ausmaß als die Photoinhibition an Photosystem II (Sonoike 1996b, Tjus et al. 2001). Untersuchungen an isolierten Thylakoidmembranen der Gerste ergaben, dass die am Photosystem I gebildeten Sauerstoffradikale zum Photosystem II diffundieren und dort zu Schädigungen führen können (Tjus et al. 2001).

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint den Tocopherolen während Starklichtstress eine besondere Funktion zuzukommen. So konnten Trebst et al. (2002) zeigen, dass  $\alpha$ -Tocopherol möglicherweise das D1-Protein des Photosystems II unter Starklichtbedingungen schützt, indem es als Singulett-Sauerstoff-*Quencher* fungiert. Bei einer Untersuchung transgener Tabakpflanzen, die eine verminderte Expression der Geranylgeranyl-diphosphat-Reduktase zeigen und infolgedessen einen verringerten Tocopherolgehalt aufweisen (Tanaka et al. 1999), wurde eine höhere Sensitivität der transgenen Pflanzen gegenüber Starklicht in Kombination mit niedrigen Temperaturen beobachtet (Havaux et al. 2003). Die gleichen Pflanzen zeigten ebenfalls eine höhere Sensitivität gegenüber Starklichtstress (Graßes et al. 2001).

### 1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, den Phänotyp von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.), cv. Xanthi, zu untersuchen, die mit der für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierenden cDNA aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors transformiert wurden. Zunächst sollen mittels geeigneter Selektionsmarker geeignete Pflanzen für die Untersuchung ausgewählt werden. Im Anschluss soll untersucht werden, ob die Überexpression des *hpd*-Gens zu einer generellen Erhöhung der Vitamin E-Gehalte in den transgenen Tabakpflanzen führt. Sollte in Tabakpflanzen die durch die HPPD katalysierte Umwandlung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisat der limitierende Schritt der Vitamin E-Biosynthese sein, so sollte es durch die Überexpression des *hpd*-Gens zu einer Erhöhung der Vitamin E-Gehalte in den transgenen Tabakpflanzen kommen. Aus den Ergebnissen werden Hinweise auf die Regulation der Vitamin E-Biosynthese erhofft. Bei dieser Untersuchung sollen sowohl unterschiedliche Pflanzengewebe als auch unterschiedliche Entwicklungsstadien des Blattes untersucht werden. Eine Überexpression des *hpd*-Gens könnte eine Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp bewirken. Es wäre vorstellbar, dass mehr Tocopherol zur Verfügung gestellt wird, welches in antioxidativen Reaktionen umgesetzt werden kann. Dies könnte zur Folge haben, dass die Thylakoidmembranen, beispielsweise während der Seneszenz, besser vor Lipidperoxidation geschützt wären. Dies könnte zu einer verzögerten Seneszenz der transgenen Linien führen.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob sich durch die Überexpression eine veränderte Stressresistenz der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ergibt. Ein grundsätzlich erhöhter Vitamin E-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp oder eine erhöhte Synthese von Vitamin E während der Stresssituation könnte in einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress resultieren. Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten Hinweise erhalten werden, die es ermöglichen, die Funktionen des Vitamins E in der Pflanze näher zu beschreiben.

## 2. Material und Methoden

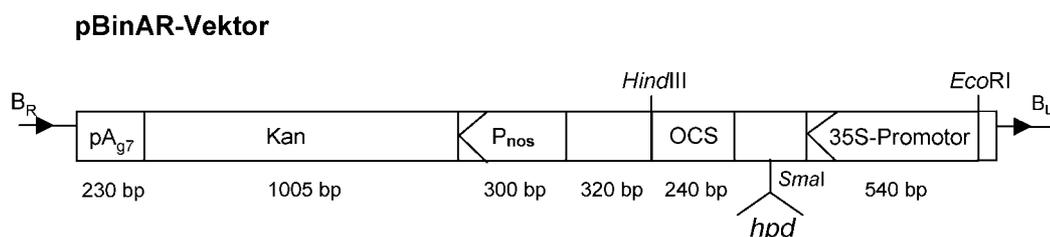
### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anderweitig vermerkt, von reiner Qualität und wurden von den Firmen Fisher Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Das Radionukleotid  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP wurde mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol von der Firma Hartmann Analytik (Hamburg) bezogen. Das Enzym Superscript II™ Reverse Transkriptase RNase H<sup>-</sup> wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Oligo-d(T)<sub>18</sub>-Nukleotide stammten von der Firma NEB, Frankfurt a.M..

Alle weiteren verwendeten Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

### 2.2 Pflanzenmaterial

Die mit der *hpd*-spezifischen cDNA aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) transformierten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi wurden mir freundlicherweise von Dr. Jon Falk für die Untersuchung zur Verfügung gestellt. Das verwendete Transformationskonstrukt ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Für die Transformation der Tabakpflanzen verwendetes Transformationskonstrukt. B<sub>R</sub> (Right Border), B<sub>L</sub> (Left Border), Kan (Kanamycinresistenz-Gen), P<sub>nos</sub> (NOS-Promotor), OCS (Octopin-Synthase-Terminator).

Die komplette kodierende Sequenz der HPPD spezifischen cDNA aus Gerste (Accession Nr. AJ000693) wurde in den binären Vektor pBinAR kloniert (Höfgen & Willmitzer 1990). Die Klonierungsschnittstelle *SmaI* liegt zwischen dem CaMV-35S-Promotor und dem Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase-Gens. Der CaMV-35S-Promotor ist einer der stärksten bekannten Promotoren und gilt als nicht regulierbar. Das Transformationskonstrukt wurde in den Agrobakterienstamm GV3101 eingebracht. Die Agrobakterien wurden zur Transformation von Blattscheiben des Tabaks cv. Xanthi nach Höfgen & Willmitzer (1988) eingesetzt.

### 2.2.1 Anzucht der Tabakpflanzen

#### MS-Festmedium

MS-Fertigmedium (Duchefa, Haarlem, Niederlande ) 0,21 % (w/v)

Phyto Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande) 0,8 % (w/v)

Die Samen der jeweils verwendeten transgenen Tabaklinien und des Wildtyps wurden zunächst mit 70%igem technischem Ethanol für zwei Minuten sterilisiert. Anschließend wurden 500 µl steriles Wasser zugegeben und nach drei Minuten die gesamte Flüssigkeit abgenommen. Danach wurden die Samen nochmals mit 500 µl sterilem Wasser gewaschen.

Die so oberflächensterilisierten Samen wurden auf MS-Festmedium (Murashi & Skoog 1962) ausgelegt und in einem Klimaschrank (RUMED, Laatzen) bei 24°C, einer PPFD von 50-100 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h angezogen.

Nach zwei Wochen wurden Keimlinge vergleichbarer Entwicklungsstadien auf Erde ausgesetzt und in einer Klimakammer weiter kultiviert. Dabei wurde ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h verwendet. Die Bestrahlungsstärke für Tabakpflanzen, die unter Schwachlicht angezogen wurden, betrug 100 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, während die unter Starklicht angezogenen Tabakpflanzen bei einer PPFD von 500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> kultiviert wurden. Die Bestrahlungsstärke für Tabakpflanzen, die im Gewächshaus angezogen wurden, variierte und betrug im Durchschnitt etwa 300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 2.2.2 Selektion der transgenen Tabakpflanzen mittels Sulcotrion

Die das *hpd*-Gen überexprimierenden transgenen Tabaklinien wurden mittels ihrer erhöhten Resistenz gegenüber dem Herbizid Sulcotrion (Handelsname: Mikado®) selektiert. Hierfür wurden oberflächensterilisierte Samen (siehe 2.2.1) sowohl des Wildtyps als auch der transgenen Tabaklinien in einer Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) auf MS-Festmedium, das kein Herbizid oder verschiedene Konzentrationen (0,3; 1; 1,5 und 3  $\mu\text{mol}$ ) des Herbizids enthielt, ausgelegt und für zwei Wochen in einem Klimaschrank (RUMED, Laatzen) bei 24°C, 50-100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h angezogen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden im Fall der Linien 39, 70 und 118 die T3- und T4-Generationen verwendet, im Fall der Linie 95 die T2- und die T3-Generation. Die untersuchten Pflanzen des Wildtyps wurden jeweils zeitgleich mit denen der transgenen Linien angezogen. Für Untersuchungen an Blattmaterial wurde das 5. – 10. Blatt von Pflanzen verwendet, die durchschnittlich acht bis zehn Wochen alt waren.

### 2.2.3 Erzeugung der Stresskombination Kühle und Licht

Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps (Fläche: 1,65  $\text{cm}^2$ ), wurden auf ein angefeuchtetes Kühlelement, d.h. eine Messingküvette mit einem Kupferboden, die durch ein elektronisch geregeltes Kältebad (Lauda RK8 CP, Lauda-Königshofen) thermostatisiert wurde, aufgelegt. Um die tatsächliche Temperatur des Blattgewebes zu bestimmen, wurde exemplarisch an einer Blattscheibe ein Thermoelement (NiCr-Ni, Durchmesser: 0,2 mm) befestigt.

Mit Hilfe einer Fiberoptiklampe (FL-460 Lighting Unit, Heinz Walz GmbH, Effeltrich) wurden die Oberflächen der Blattscheiben gleichmäßig bestrahlt. Die verwendeten Bestrahlungsstärken variierten und sind im jeweiligen Ergebnisteil angegeben.

### 2.3 Physiologische Parameter

#### 2.3.1 Chlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes sowie der Gehalte an Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 80%igem technischem Aceton bei 4°C für 12 h im Dunkeln extrahiert. Die anschließende photometrische Bestimmung sowie die Berechnung erfolgten nach den Angaben von Lichtenthaler (1987). Die Chlorophyllgehalte des verwendeten Blattmaterials wurden durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

#### 2.3.2 Vitamin E-Bestimmung

Zur Extraktion des Vitamins E aus Samen und Antheren wurde das jeweilige Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Im Falle der Blätter erfolgte die Aufarbeitung mit Hilfe einer Retschmühle (Retsch, Haan), deren Probenbehälter dahingehend neu konstruiert wurden, dass in ihnen jeweils sechs 2 ml Plastik-Reaktionsgefäße Platz finden und eine schnelle und stabile Abkühlung mit flüssigem Stickstoff ermöglichen. Daher wurde als Material Aluminium gewählt. Dadurch wird ebenfalls der Aufschluss kleiner Materialmengen ermöglicht. Die Zerkleinerung des Pflanzenmaterials erfolgt hierbei mit Hilfe von Glaskugeln (Durchmesser 2,85-3,3 mm), die zum Blattmaterial zugegeben werden. Um ein Auftauen der Pflanzenproben zu vermeiden, werden die Probenbehälter der Retschmühle mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Einwaagen im Falle des Blattmaterials betragen durchschnittlich 50 mg, im Falle der Samen 100-200 mg. Hierfür wurde in der Regel ein Volumen von 200 µl bzw. 500µl n-Heptan zum zerkleinerten Pflanzenmaterial zugegeben. Zur Extraktion des Vitamins E wird das Gemisch für mindestens 24 h bei -20°C inkubiert, um eine vollständige Extraktion des Vitamins E zu gewährleisten. Anschließend wird das Gemisch für 15 Minuten bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert und der resultierende klare Überstand für die chromatographische Bestimmung eingesetzt.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewandten Verfahren erfolgt die Trennung der acht Vitamin E-Formen sowie deren quantitative Bestimmung mittels Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Die HPLC-Anlage besteht aus einer Pumpe (LC-10ATVP Liquid

Chromatograph, Shimadzu, Duisburg), einem Probenaufgabesystem (SIL-10ADVP Autosampler, Shimadzu, Duisburg) sowie einem Fluoreszenzdetektor (RF-10XL Fluorescence Detector, Shimadzu, Duisburg). Zur Datenverarbeitung wurde die „ClassVP 5.0“ Software von Shimadzu verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

Zur Trennung der acht Vitamin E-Formen wurde eine analytische Kieselgelsäule (5 µm LiChrospher<sup>®</sup> Si60) der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min unter Verwendung eines n-Heptan/Isopropanol-Gemisches (99+1; v+v) als mobile Phase. Die Detektion erfolgte über die Eigenfluoreszenz des Vitamins E bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 290$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 328$  nm. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit Hilfe von Standardsubstanzen (Merck, Darmstadt) diente zur Identifizierung. Zur Überprüfung der Identität wurden im Zweifelsfall einzelne Vitamin E-Standardlösungen den Proben zugesetzt, um durch Aufstockung eine genaue Zuordnung treffen zu können. Die Standardsubstanzen wurden ebenfalls für eine externe Kalibrierung verwendet. Hierfür wurden jeweils 10 mg der acht Standardsubstanzen in 100 ml n-Heptan gelöst. Anschließend wurde aus diesen acht Lösungen ein Standardgemisch definierter Zusammensetzung hergestellt. Von diesem Standardgemisch wurden sieben Verdünnungen angesetzt, die chromatographisch vermessen wurden. Die so erhaltenen Peakflächen der einzelnen Vitamin E-Verbindungen wurden graphisch gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und die Kalibrierfunktion mittels linearer Regression berechnet.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Vitamin E-Gehalte des jeweils untersuchten Pflanzenmaterials durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

### 2.3.3 Bestimmung des Plastochinon-Gehaltes in Blättern

Die Bestimmung der Plastochinongehalte erfolgte nach der Vorschrift von Dähnhardt et al. (2002).

Hierfür wird derselbe Extrakt verwendet wie für die Vitamin E-Bestimmung. Um eine vollständige Oxidation des Plastochinons zu gewährleisten, werden die Proben zunächst für 72 h bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung des Plastochinons erfolgt ebenfalls über Hochleistungsflüssig-Chromatographie, unter Verwendung der für die Vitamin E-Bestimmung beschriebenen Anlage. Zur Detektion wird ein Absorptionsdetektor (484 Tunable Absorbance Detector, Waters, Eschborn) sowie ein Photodioden-Array-Detektor (SPD-M10Avp, Shimadzu, Duisburg) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug  $20\ \mu\text{l}$ . Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer analytischen Kieselgelsäule ( $5\ \mu\text{m}$  LiChrosorb Si100, VDS Optilab, Berlin). Die Flussrate betrug  $1\ \text{ml/min}$  unter Verwendung eines n-Heptan/Isopropanol-Gemisches (99,5+0,5; v+v) als mobile Phase. Die Detektion erfolgte über die Absorption des Plastochinons bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254\ \text{nm}$ . Zur Identifizierung des oxidierten Plastochinons wurden die mit Hilfe des Photodiodenarray-Detektors erhaltenen Absorptionsspektren mit Literaturdaten verglichen.

Ein aus Tabakblättern mittels n-Heptan extrahierter vollständig oxidiertes Plastochinon-Standard wurde für die externe Kalibrierung verwendet. Für die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung dieses Standards wurde das n-Heptan mittels Stickstoff entfernt und der Rückstand in absolutem Ethanol aufgenommen. Es wurde ein molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von  $17,97\text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  in absolutem Ethanol verwendet (Kruk et al. 1992).

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Plastochinongehalte des jeweils verwendeten Pflanzenmaterials durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

### **2.3.4 Bestimmung des Trockengewichts der Tabaksamen**

Die Tabaksamen wurden zunächst eingewogen (100-200 mg) und für 72 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pflanzenmaterial zum Abkühlen auf Raumtemperatur in einen Exsikkator überführt. Nach vollständigem Abkühlen wurde das Trockengewicht durch erneutes Auswiegen bestimmt. Aus der Differenz zwischen Frischgewicht und Trockengewicht konnte der Wassergehalt des Pflanzenmaterials bestimmt werden.

Das Trockengewicht wurde durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

### **2.3.5 Bestimmung des Lipidgehaltes von Tabaksamen**

Für die Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes der Tabaksamen wurden getrocknete Tabaksamen (2.3.4) verwendet.

Hierfür werden die Tabaksamen unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein zerkleinert, in ein 2 ml Plastik-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Petrolether (Siedebereich 40-60°C) versetzt. Das Gemisch wird zur Extraktion der Lipide aus dem Samengewebe für 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Der resultierende klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Lösung mit Hilfe von Stickstoff eingedampft. Die verbleibenden Lipide werden ausgewogen. Der Rückstand der Extraktion wird anschließend ebenfalls gewogen, das im Reaktionsgefäß verbliebene Lösungsmittel mit Hilfe von Stickstoff eingedampft und der hierbei erhaltene Rückstand erneut gewogen. So kann zunächst das Gewicht und unter Berücksichtigung der Dichte von Petrolether das Volumen berechnet werden, das im Extraktionsrückstand verblieben ist. Mit Kenntnis des Lipidgehaltes kann anschließend berechnet werden, wie viel in Petrolether gelöstes Lipid im Reaktionsgefäß verblieben ist. Dieser berechnete verbliebene Lipidgehalt wird bei der folgenden Wiederholung der Lipidbestimmung berücksichtigt. Durch diese Berechnung soll gewährleistet werden, dass bei den folgenden Extraktionswiederholungen tatsächlich neu in Lösung gegangenes Lipid ausgewogen wird.

Das oben beschriebene Extraktionsverfahren wurde so lange wiederholt, bis sich in zwei aufeinanderfolgenden Messungen der Lipidgehalt nicht mehr veränderte. Das war bei den Tabaksamen nach der dritten Extraktion der Fall.

Der Lipidgehalt der Tabaksamen wurde durch sechs voneinander unabhängige Messungen bestimmt.

### **2.3.6 Bestimmung der Lipidzusammensetzung von Tabaksamen**

Die Bestimmung der Lipidzusammensetzung der untersuchten Tabaksamen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Hierfür wurden die aus dem Samengewebe extrahierten Lipide (2.3.5) verwendet. Als Standardlipidgemisch diente handelsübliches Sonnenblumenöl. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Petrolether/Ether/Eisessig (50+50+1;v+v+v) verwendet.

Die Lipide wurden in Dichlormethan gelöst und mittels einer Glaskapillare auf eine Kieselgelplatte (Si60) der Firma Merck (Darmstadt) strichförmig aufgetragen und die DC-Platte in eine mit dem Fließmittel gesättigte Rundkammer gestellt. Nach der Auftrennung wurde die Platte an der Luft getrocknet und in eine Kammer gestellt, die zuvor durch Zugabe von Iodkristallen mit Iod-Dampf gesättigt wurde. Bei diesem Detektionsverfahren reichern sich die Iodmoleküle in den lipophilen Chromatogrammzonen an.

### **2.3.7 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Tabaksamen**

Diese Analyse wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (Hohenlieth) durchgeführt.

Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Tabaksamen erfolgte in Anlehnung an Goffman und Böhme (2001) mittels gaschromatographischer Analyse der entsprechenden Fettsäuremethylester. Hierfür werden 13 mg Samen in 200 µl einer Lösung aus 9% (v/v) Natriummethylat in 10% (v/v) iso-Octan und 81% (v/v) Methanol für etwa 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend werden die Samen mit Hilfe der Zerkleinerungsapparatur CRUSHexpress (Meku Erich Pollähne GmbH, Wennigsen) aufgebrochen und weitere 45 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5% (w/v) Natriumhydrogensulfat und 100 µl iso-Octan wird gut durchmischt und zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 1268 x g zentrifugiert. Die obere der beiden Phasen wird für die gaschromatographische Analyse eingesetzt. Zur Trennung der Fettsäuremethylester wurde ein Perkin Elmer GC Autosystem mit einer Kapillarsäule (FFAP, 25m – 0,25mm i.D. – 0,25 µm) verwendet. Die Trennung erfolgte isothermisch bei einer Ofentemperatur von 215°C, einer Injektortemperatur

von 240°C und einer Detektortemperatur von 260°C. Als Trägergas diente Wasserstoff (140 kPa). Das Injektionsvolumen betrug 2,5 µl bei einer Strömungsteilung (Split) von 1:70. Der Anteil der einzelnen Fettsäure ist als prozentualer Anteil am Gesamtgehalt der Fettsäuren angegeben. Die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Tabaklinien ergab sich aus einer Einzel- bzw. Doppelbestimmung von Samen aus jeweils zwei Generationen (T2 und T3 im Fall der Linie 95, T3 und T4 im Fall der Linien 39, 70 und 118).

### 2.3.8 Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz

Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde in Anlehnung an Schreiber et al. (1986) mit einem „Puls-Amplituden-Modulations“ (PAM) Chlorophyll Fluorometer 101 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) durchgeführt. Die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) wurde nach 30-minütiger Dunkeladaption bestimmt. Die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) wurde nach Gabe eines Sättigungspulses (1s, PPFD: 4000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durch eine Kalt-Lichtquelle (KL 1500; Schott, Wiesbaden) bestimmt. Das Messlicht wurde in einer Frequenz von 1,6 kHz abgegeben. Die Stärke des aktinischen Lichtes variierte und ist in den jeweiligen Ergebnisteilen angegeben. Die Signale wurden entweder mittels eines Linien-Schreibers (LKB REC 102, Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgezeichnet oder durch die zum Chlorophyll Fluorometer 101 zugehörige Software berechnet.

#### Berechnung der Fluoreszenz Parameter

$F_v/F_m: (F_m - F_0)/F_m$	Optimale Quantenausbeute von PS II $F_v/F_m$ wird im folgenden auch als maximale Effizienz von Photosystem II bezeichnet.
$q_P: (F'_m - F) / (F'_m - F'_0)$	Photochemisches Quenching (van Kooten & Snel 1990)

### 2.3.9 Bestimmung des Redoxstatus von P700

Der Redoxstatus von P700 wurde mittels eines PAM-Fluorometers 101 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) gemessen, welches mit einer entsprechenden Emitter-Detektor-Einheit kombiniert wurde (Schreiber et al. 1988). Das durch das Messlicht ( $\lambda = 820 \text{ nm}$ ) im dunkeladaptierten Zustand hervorgerufene Signal ( $I$ ) wurde registriert und anschließend elektrisch kompensiert. Anschließend wurde zusätzlich mit einer für Photosystem I spezifischen Wellenlänge mittels einer *High Intensity Light Source LS2* (Hansatech Instruments Ltd., Bachofer, Reutlingen) unter Verwendung eines RG715-Filters (Dicke: 3 mm; Schott, Mainz) angeregt und die Reflexionsänderung ( $\Delta I$ ) detektiert.  $\Delta I$  stieg bei Belichtung mit einer charakteristischen Kinetik an und erreichte nach etwa 10 Sekunden einen Maximalwert, der ausgewertet wurde. Die relative Änderung des Redoxstatus ergibt sich aus dem Quotienten  $\Delta I/I$ .  $\Delta I/I$  bei sättigendem Fernrot-Licht wurde in Kontrollblättern 100 % oxidiertem P700 gleichgesetzt. Eine stressbedingte Erniedrigung in dem Wert für  $\Delta I/I$  kann man als reduzierte Oxidation interpretieren und ist ein relatives Maß für die Inaktivierung des Photosystems I (Kim et al. 2001). Daher wird der so gemessene Redoxstatus von P700 im folgenden auch als Maß für die Effizienz von Photosystem I verwendet.

### 2.3.10 Statistische Analysen

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen erfolgte mit Hilfe von Microsoft EXCEL. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde in einigen Fällen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und ein anschließender *Fisher's least significant difference*-Test mit Hilfe des Programms MINITAB (Minitab Inc., PA, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde in beiden Fällen bei  $\alpha=0,05$  festgelegt.

## **2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Gensonden**

Zur Herstellung von DNA-*Dot-Blot*-Membranen oder für die Hybridisierung von *Southern* oder *Northern* Blots wurden verschiedene Gensonden verwendet. Die Größe der eingesetzten Gensonden, die Bezeichnung des zugehörigen Proteins, der Klonierungsvektor sowie die verwendeten Klonierungsschnittstellen sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Insbesondere im Fall der Gene, welche für Enzyme der Vitamin E-Biosynthese kodieren, wurden EST-Klone verwendet. In diesen Fällen ist auch ihre Herkunft angegeben.

## 2. Material & Methoden

**Tab. 2.1:** Liste der verwendeten Gensonden. Die Liste umfasst die Bezeichnung des zugehörigen Proteins, die Herkunft bzw. Referenz und Länge der Sonden. Zudem sind der verwendete Klonierungsvektor und die Klonierungsschnittstellen aufgeführt.

Bezeichnung	Homologie zu	Herkunft/ Referenz	Länge (bp)	Vektor	Klonierungs- schnittstelle
<i>Lehpt</i>	Prenyltransferase cDNA aus Tomate	CUGI BI924740	ca. 750	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI/XhoI</i>
<i>Lehgo</i>	Homogentisat-Dioxygenase cDNA aus Tomate	CUGI AW092200	ca. 1500	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI/XhoI</i>
<i>Stsxd</i>	Tocopherol-Cyclase cDNA aus Kartoffel	Welinder, Aalborg, DK BF 460070	ca. 1000	pBluescript SK(-)	<i>XhoI</i>
<i>Letmt</i>	$\gamma$ -Tocopherol- Methyltransferase cDNA aus Tomate	CUGI BG127606	ca. 650	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI/XhoI</i>
<i>Lehpd</i>	4-Hydroxyphenyl-pyruvat- Dioxygenase cDNA aus Tomate	CUGI AW040392	ca. 1000	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI/XhoI</i>
HvSD36	4-Hydroxyphenyl-pyruvat- Dioxygenase cDNA aus Gerste	Kleber- Janke & Krupinska (1997)  Falk et al. (2003)	ca. 800	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI</i>
pH Act.	Actin	Shah et al. (1983)	ca. 800	pBluescript SK(+)	<i>EcoRI/PstI</i>
pSR 2.1	kleine Untereinheit der RubisCo	Berry-Lowe & Meagher (1985)	ca. 800	pBluescript SK(-)	<i>EcoRI</i>

### 2.4.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien und Plasmidisolierung

#### LB-Medium

Trypton	1	% (w/v)
Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
Natriumchlorid	1	% (w/v)

*E.coli* Bakterienstämme wurden nach Animpfen aus einer Bakterienkolonie oder Stammkultur in 3 ml oder 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) über Nacht bei 37°C und 180 UpM in einem Schüttelinkubator angezogen. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei –80°C nach Zugabe von 20% Glycerin zu 1 ml einer Übernachtkultur. Aus den in 3 ml LB-Medium angezogenen Kulturen wurden die Plasmide nach Birnboim & Doley (1979) isoliert. Die Plasmide der in 200 ml LB-Medium angezogenen Kulturen wurden mit dem NucleoBond<sup>®</sup> Plasmid Purification System (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.4.3 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers mit niedrig konzentrierten Enzymen (10u/µl). Lediglich für die Restriktion der Gesamt-DNA aus Tabak wurden hoch konzentrierte Enzyme verwendet (50u/µl).

### 2.4.4 Isolierung von Gesamt-DNA aus Tabak

#### DNA-Extraktionspuffer

Sorbitol	0,35	M
Tris/HCl pH 7,5	0,1	M
EDTA	1	mM

#### Lysispuffer

Tris/HCl pH 7,5	0,2	M
EDTA	0,05	M
Natriumchlorid	2	M
CTAB	2	% (w/v)

#### Microprep-Puffer

DNA-Extraktionspuffer	25	ml
Lysispuffer	25	ml
N-lauroylsarcosin	1	% (v/v)
Natriumbisulfit	0,45	% (w/v)

#### TE-Puffer

Tris/HCl pH 8	10	mM
EDTA	1	mM

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Tabak erfolgte nach Fulton et al. (1995). Hierfür werden etwa 100 mg des jeweiligen Blattmaterials unter flüssigem Stickstoff mittels einer modifizierten Retschmühle (2.3.2) fein zerkleinert und sofort 750 µl Microprep-Puffer zugegeben. Dieses Gemisch wird für 2 h bei 65°C inkubiert, danach mit 750 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24+1; v+v) versetzt, gut durchmischt und bei 16000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 350 µl Isopropanol gefällt. Es wird nochmals bei 16000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, das erhaltene DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen und abschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

### 2.4.5 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIZOL™-Reagenz

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden etwa 100 mg Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff sorgfältig gemörsert und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Es wurden anschließend 700 µl des TRIZOL™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Danach erfolgte die Zugabe weiterer 300 µl TRIZOL™-Reagenz. Nach nochmaliger Durchmischung wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 200 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (99+1;v+v) zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt und im Anschluss 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g für 10 Minuten und 4°C wurde die sedimentierte RNA mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde getrocknet und in 50 µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 2.4.6 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Für die anschließende Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden etwa 1000 µg der mit Trizol™-Reagenz isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Die Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA erfolgte mit Hilfe des PolyAt Tract mRNA Isolation System IV (Promega, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers.

Die Isolierung basiert auf der Bindung biotinylierter oligo(dT)-Primer mit der 3'-Poly(A)-Region der mRNA. Dieser Komplex wird an Streptavidin gebunden, das an Magnetpartikel gekoppelt ist, und unter Verwendung eines Magneten spezifisch aus der Gesamt-RNA herausgezogen. Die so angereicherte mRNA wird durch Zugabe von Wasser von dem Komplex gelöst und mittels 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl Isopropanol gefällt.

### 2.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung größerer Mengen Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Diese Bestimmung geht von der Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm aus. Hierbei gilt, dass eine optische Dichte von 1 der Menge von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA entspricht. Die Abschätzung der Konzentration geringerer DNA-Mengen erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid und anschließendem Vergleich mit einer Verdünnungsreihe bekannter DNA-Konzentrationen mittels UV-Licht nach Agarosegel-Elektrophorese.

### 2.4.8 Radioaktive Markierung von Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für die Hybridisierung von Membranen erfolgte mit Hilfe des HexaLabel DNA Labeling Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers.

Die Abtrennung der bei der Markierungsreaktion nicht eingebaute Nukleotide erfolgte über MicroSpin G-25 Columns (Amersham, Pharmacia, Freiburg). Um die Effizienz der Markierungsreaktion zu bestimmen, wurde 1  $\mu\text{l}$  des aufgereinigten Markierungsansatzes mit 2,5 ml Scintillationscocktail Rotiscint (Roth) vermischt und die Zerfälle pro Minute (cpm) in einem Scintillationszähler (WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter, Wallac) gemessen.

### 2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) wurden zu analytischen oder präparativen Zwecken gelelektrophoretisch nach den von Sambrock et al. (1989) angegebenen Methoden aufgetrennt. Im Fall von DNA wurden 0,7-1%ige Agarosegele und im Fall von RNA ein Formaldehyd enthaltendes 1%iges Agarosegel verwendet.

### 2.4.10 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse von EST-Klonen (Tab. 2.1) wurden die für den Klonierungsvektor pBluescript spezifischen Oligonukleotide M 13 reverse oder M 13 universe (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 (MWG Biotech, Ebersberg) markiert waren. Die Sequenzreaktion, ein PCR-gekoppeltes Verfahren (*cycle sequencing*), wurde

entweder mit dem SequiTherm Excel™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit (Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf) oder mit dem Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt und basiert auf der Kettenabbruch-Methode von Sanger (1977). Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein 7,5%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (Rapid Gel™ XL der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg) mit Hilfe eines Licor DNA Sequenzierers (Model 4000 L, MWG Biotech, Ebersberg).

### 2.5 cDNA-Synthese

#### dNTP-Mix (- dCTP)

dATP-Natriumsalz	10 mM
dGTP-Natriumsalz	10 mM
dTTP-Natriumsalz	10 mM

#### dNTP-Mix

dATP-Natriumsalz	10 mM
dCTP-Natriumsalz	10 mM
dGTP-Natriumsalz	10 mM
dTTP-Natriumsalz	10 mM

#### RT-Reaktionsansatz

Gesamt-RNA	5	µg
Oligo d(T) <sub>18</sub>	0,5	µg
dNTP-Mix (- dCTP)	1	mM
H <sub>2</sub> O	ad	10 µl

#### Mastermix

First strand buffer	2 x	
DTT	10 mM	
RNase Inhibitor	5 u	
α- <sup>32</sup> P-dCTP	20 µCi	
H <sub>2</sub> O	ad	9 µl

Bei der reversen Transkription wurde der Reversen Transkriptase ein radioaktiv markiertes Nukleotid angeboten, und so die gebildete cDNA radioaktiv markiert. Der RT-Reaktionsansatz wurde im Heizblock bei 65°C für 5 Minuten denaturiert und dann 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 9 µl Mastermix wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und für 2 Minuten bei 42°C vorinkubiert. Anschließend wurde 1 µl Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (200u/µl) zugegeben und der gesamte Ansatz für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 µl dNTP-Mix zugegeben und weitere 40 Minuten bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch zehninütiges Erhitzen auf 72°C inaktiviert und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Durch Zugabe von 5 u RNase H und 30minütiges Inkubieren auf 37°C wurde die verbliebene RNA entfernt. Die RNA-Abbauprodukte und nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine MicroSpin G-25 Column (Amersham, Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

### 2.6 Southern Blot-Analyse

#### Denaturierungslösung

Natriumchlorid	1,5	M
Natriumhydroxid	0,5	M

#### 20 x SSPE-Lösung

Natriumchlorid	3,6	M
EDTA	20	mM
Natriumphosphat pH 7,7	200	mM

#### 100 x Denhardt`s Lösung

BSA	2	% (w/v)
Ficoll	2	% (w/v)
Polyvinylpyrrolidon-10	2	% (w/v)

#### Hybridisierungslösung

SSPE	2 x
Dehnhardt`s Lösung	5 x
SDS	0,5% (v/v)
40 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA	

Die mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte genomische DNA (siehe 2.4.4 und 2.4.9) wurde durch Kapillartransfer nach Southern (1975) unter Verwendung der Denaturierungslösung als Transferlösung auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Freiburg) übertragen, wobei das Agarosegel zuvor für 10 Minuten zur Depurination in 0,125 M Salzsäure und 30 Minuten zur Denaturierung in Denaturierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die DNA wurde auf der Membran durch Inkubation der Membran bei 80°C für 2 h fixiert. Die Hybridisierung erfolgte nach vier- bis fünfstündiger Prähybridisierung in der Hybridisierungslösung bei 65°C über Nacht. Es wurden jeweils 500000 – 700000 cpm der radioaktiv markierten Sonden (siehe 2.4.8) pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen zweimal je 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, danach einmal 15 Minuten bei 65°C in 1 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS und abschließend 10 Minuten bei 65°C in 0,1 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Autoradiographiekassette mit ein oder zwei Verstärkerfolien (Hyperscreen™ RPN 1663, Amersham, Freiburg) bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham, Freiburg) für vier Wochen exponiert. Anschließend wurden die Signale auf dem Röntgenfilm unter Verwendung der Entwicklerlösung Roentoroll HC (TETENAL, Norderstedt) und der Fixierlösung MRP Superfix PLUS (TETENAL, Norderstedt) sichtbar gemacht.

## 2.7 Northern Blot-Analyse

### 20 x SSC-Puffer

Natriumchlorid	1,5	M
Natriumcitrat	0,15	M

### Dextransulfat-Puffer

Dextransulfat	5	% (w/v)
Natriumchlorid	0,75	mM
SDS	1	% (w/v)

40 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

### Methylenblau-Lösung

Methylenblau	0,04	% (w/v)
Natriumacetat pH 5,2	0,5	M

Die mittels Formaldehyd-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte RNA (siehe 2.4.5, 2.4.6, 2.4.9) wurde durch Kapillartransfer unter Verwendung von 20 x SSC-Puffer als Transferlösung auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Freiburg) übertragen, wobei das Agarosegel zunächst für 15 Minuten in destilliertem Wasser und für zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die RNA wurde auf der Membran durch Inkubation der Membran bei 80°C für 2 Stunden fixiert. Die so auf der Membran immobilisierte RNA wurde zur Überprüfung des Transfers und der gleichmäßigen Beladung mit Methylenblau-Lösung angefärbt und so sichtbar gemacht. Hierfür wurde die Membran zunächst für 5 Minuten in 5% Essigsäure und anschließend für 10 Minuten in Methylenblau-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden mit einer Videodokumentationsanlage (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation) abgebildet.

Nach vier- bis fünfstündiger Prähybridisierung in Dextransulfat-Puffer erfolgte die Hybridisierung der Membranen, wie bei Kleber-Janke & Krupinska (1997) beschrieben, in Dextransulfat-Puffer bei 63-65°C über Nacht. Es wurden jeweils 500000 – 700000 cpm der radioaktiv markierten Sonden pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen zweimal je 10 Minuten in 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS, danach einmal 15 Minuten in 1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS

und abschließend 10 Minuten in 0,1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte bei Raumtemperatur, die vorhergehenden bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Autoradiographiekassette mit ein oder zwei Verstärkerfolien (Hyperscreen™ RPN 1663, Amersham) bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia, Freiburg) für bis zu vier Wochen exponiert. Anschließend wurden die Signale auf dem Röntgenfilm wie unter 2.6 beschrieben, sichtbar gemacht. Im Falle einer mehrfachen Hybridisierung derselben Membran wurde diese nach der Exponierung zweimal mit kochendem 0,1%igem SDS inkubiert, bis die Lösung abgekühlt war.

### 2.8 Erstellung und Hybridisierung von DNA-*Dot-Blot*-Membranen

Mit Hilfe der *Dot-Blot* Apparatur SRC96D Minifold (Schleicher und Schüll, Dassel) wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Gensonden sowie als Kontrolle der Vektor pBluescript SK(-) nach Angaben des Membranherstellers in einer Reihe von drei Verdünnungen auf Nylonmembranen (Zeta Probe GT, Biorad, München) übertragen. Der Auftrag erfolgte jeweils in den Mengen 4000/1000/250 fmol. Anschließend wurde die DNA auf der Membran durch Inkubation der Membran bei 80°C für 2 Stunden fixiert. Die so auf der Membran immobilisierte DNA wurde zur Überprüfung des Transfers und der gleichmäßigen Beladung mit Methylenblau-Lösung (2.7) angefärbt. Die Membranen wurden wie in 2.7 beschrieben abgebildet. Die Hybridisierung der DNA-*Dot-Blot*-Membranen mit radioaktiv markierter cDNA erfolgte bei 63°C über Nacht. Nach vier- bis fünfstündiger Prähybridisierung in der Hybridisierungslösung wurde die denaturierte cDNA in einer Konzentration von 500000 cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen zweimal je 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, danach einmal 15 Minuten bei 63°C in 1 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS und abschließend 10 Minuten bei 63°C in 0,5% SSPE, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Autoradiographiekassette mit ein oder zwei Verstärkerfolien (Hyperscreen™ RPN 1663, Amersham) für zwei Wochen bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia, Freiburg) exponiert. Anschließend wurden die Signale auf dem Röntgenfilm wie unter 2.6 beschrieben, sichtbar gemacht.

### **2.9 Mikroskopische Methoden**

#### **2.9.1 Erstellung von Querschnitten von Tabaksamen und Antheren**

Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in Einbettmedium (Jung, Batch No. 000593) eingelegt und anschließend mittels eines Jung Frigocut 2800 E der Firma Leica (Bensheim) Kryoschnitte bei einer Objekttemperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  und einer Umgebungstemperatur von  $-30^{\circ}\text{C}$  geschnitten. Die Schichtdicke betrug  $30\ \mu\text{m}$ . Die so erstellten Querschnitte wurden auf einen Objektträger überführt und mikroskopisch untersucht.

#### **2.9.2 Lichtmikroskopie**

Die Lichtmikroskopie wurde mit einem Axiophot-Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen), einem konfokalen-Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) TCS SP1 der Firma Leica (Bensheim) oder mit einem DMLS Mikroskop der Firma Leica durchgeführt.

Im Falle des Axiophot Mikroskops erfolgte die Bildaufnahme mit einer Sony 3 CCD Iris Kamera und die Bildakquisition mit der Image Access Software. Im Falle des CLSMs erfolgte die Bildbearbeitung mit der Leica TCS Software.

Übersichtsaufnahmen der Antheren und Tabakkeimlinge wurden mittels eines Wild Makroskops M420 unter Verwendung der Sony 3 CCD Iris Kamera und der Image Access Software digitalisiert.

## 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, den Phänotyp von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi zu untersuchen, die mit der für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierenden cDNA aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) transformiert wurden. Zum einen soll hierbei untersucht werden, ob die Überexpression zu einer generellen Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in den transgenen Tabakpflanzen führt. Zum anderen soll geklärt werden, ob die Überexpression einen veränderten Seneszenzverlauf und eine veränderte Stressresistenz der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hat.

Das erste Kapitel zeigt Untersuchungen zum Nachweis der Expression des *hpd*-Gens aus Gerste in den zuvor ausgewählten transgenen Tabaklinien sowie zum Einfluss der Überexpression auf die Transkriptgehalte der endogenen Gene, die für Enzyme der Vitamin E-Biosynthese kodieren. Inwieweit sich die Überexpression auf Ebene der Stoffwechselprodukte, also auf den Gehalt an Vitamin E bzw. Plastochinon in den transgenen Pflanzen auswirkt, und welche Konsequenzen sich daraus ergeben, ist im zweiten Kapitel dargestellt. Hierbei wurden sowohl unterschiedliche Pflanzengewebe als auch unterschiedliche Entwicklungsstadien des Blattes analysiert. Um Hinweise auf eine Funktion des Vitamins E in der Pflanze zu erhalten, wurden die transgenen Pflanzen hinsichtlich eines im Vergleich zum Wildtyp veränderten Verhaltens unter Stressbedingungen untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind im abschließenden dritten Kapitel gezeigt.

### **3.1 Untersuchungen zur Expression des *hpd*-Gens aus Gerste in den transgenen Tabaklinien**

Zu Beginn dieser Arbeit lag eine Vielzahl von mit dem *hpd*-Gen aus Gerste transformierten Tabakpflanzen vor. Zunächst war es notwendig, die für die Untersuchung geeigneten Pflanzen auszuwählen. Die Selektion erfolgte über zwei unterschiedliche Selektionsmarker. Zum einen konnte von Dr. Jon Falk bereits vor Beginn dieser Arbeit eine Resistenz einiger der transgenen Linien gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin gezeigt werden. Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob diese transgenen Linien einen gegenüber dem Wildtyp erhöhten HPPD-Gehalt aufweisen. Das Herbizid Mikado<sup>®</sup> blockiert die HPPD und dessen Anwendung führt zu einem Albino-Phänotyp der behandelten Pflanzen (siehe 1.1). Daher wurde die Resistenz der Tabakkeimlinge gegenüber diesem Herbizid als zweiter Selektionsmarker verwendet.

#### **3.1.1 Nachweis der Resistenz von Tabakkeimlingen gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup>**

Es war zu erwarten, dass die Überexpression des *hpd*-Gens zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> in den transformierten Tabakpflanzen führt. Um dies zu überprüfen, wurden Samen der transformierten Tabakpflanzen auf MS-Festmedium zur Keimung gebracht, welches zusätzlich 1µM Mikado<sup>®</sup> enthielt (siehe 2.2.2).

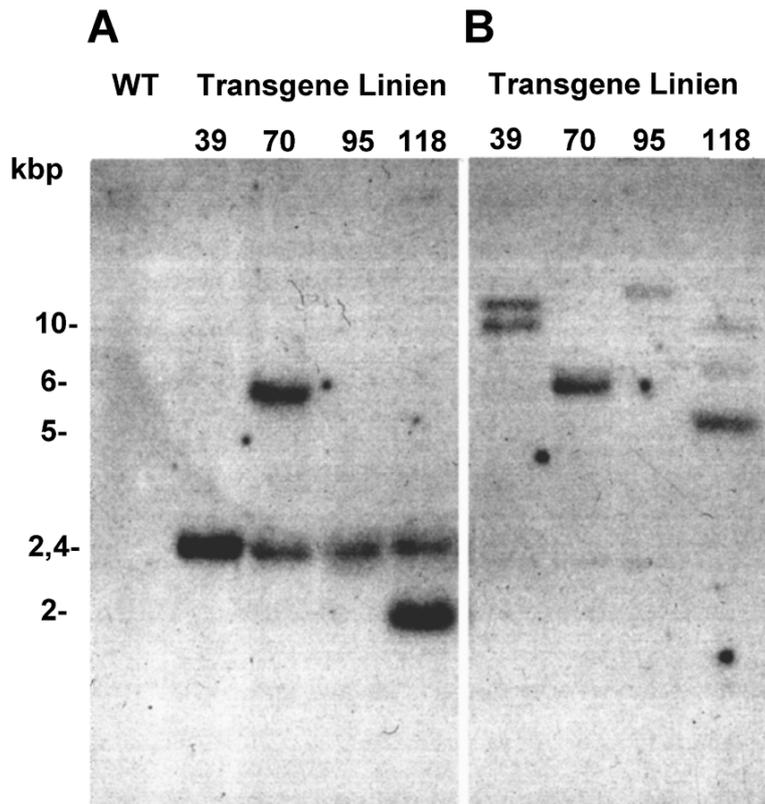
Während die Keimlinge des Wildtyps deutlich den erwarteten Effekt des Ausbleichens zeigten, waren die Keimlinge der untersuchten transgenen Linien bei der verwendeten Konzentration von 1µM Mikado<sup>®</sup> noch grün. Es konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten Keimlinge der mit dem *hpd*-Gen transformierten Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> aufweisen, was auf einen erhöhten HPPD-Gehalt hinweist. Des Weiteren konnte über die Keimung der Samen der transgenen Linien auf Mikado<sup>®</sup> überprüft werden, ob die verwendeten Linien hetero- bzw. homozygot sind. Tritt während der Keimung der Fall auf, dass die Keimlinge unter Einwirkung des Herbizids segregieren, sich also aus einer Population sowohl grüne als auch gebleichte Keimlinge entwickeln, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die vorangegangene Generation heterozygot war.

Um bei der Untersuchung lediglich homozygote transgene Pflanzen zu verwenden, wurden die grünen Keimlinge weiter kultiviert, die Samen geerntet und erneut auf dem Herbizid ausgelegt. Dies erfolgte mit einer hinreichend großen Anzahl von Keimlingen, so dass in der nächsten Generation nach Aufspaltung homozygote resistente transgene Linien identifiziert werden konnten. Anhand dieser Selektion wurden vier transgene Linien für die Untersuchung ausgewählt, die im folgenden als Linien 39, 70, 95 und 118 bezeichnet werden.

#### **3.1.2 Nachweis des *hpd*-Gens aus Gerste in Blättern der transgenen Tabaklinien**

Um zu überprüfen, ob das transformierte *hpd*-Gen aus Gerste in Blättern aller vier ausgewählten transgenen Tabaklinien vorhanden ist, und es sich um vier voneinander unabhängige Transformationsereignisse handelt, wurde für eine *Southern Blot*-Analyse (siehe 2.6) genomische DNA aus Blättern der transgenen Linien und des Wildtyps isoliert (siehe 2.4.4). Gleichzeitig kann mit dieser Untersuchung die Anzahl der Kopien des Transgens bestimmt werden.

Durch den Verdau der genomischen Tabak-DNA mit *HindIII* und *EcoRI* wird das gesamte Transformationskonstrukt einer Größe von 2,4 kbp aus der genomischen Tabak-DNA herausgeschnitten. Enthält die jeweils untersuchte transgene Linie eine vollständige Kopie des Transformationskonstruktes, so ist durch die *Southern Blot*-Analyse ein 2,4 kbp-Fragment nachweisbar. Erfolgt der Verdau der genomischen Tabak-DNA lediglich mit *EcoRI*, so wird das Transformationskonstrukt selbst nur an der Promotorseite geschnitten, die zweite Schnittstelle liegt in der umliegenden genomischen DNA. In Abhängigkeit vom Insertionsort resultieren bei voneinander unabhängig entstandenen transgenen Linien DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe.



**Abb. 3.1:** Autoradiogramm einer *Southern Blot*-Analyse zum Nachweis der Integration des *hpd*-Gens aus Gerste in das Genom der transgenen Tabakpflanzen. Die Hybridisierung erfolgte mit der radioaktiv markierten HvSD36-Sonde. Genomische DNA wurde aus ausgewachsenen Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 isoliert und mit *EcoRI* und *HindIII* (A) oder mit *EcoRI* (B) verdaut. Jeweils 30  $\mu$ g wurden auf das Agarosegel aufgetragen. Die Größen der DNA-Standardfragmente sind auf der linken Seite gezeigt.

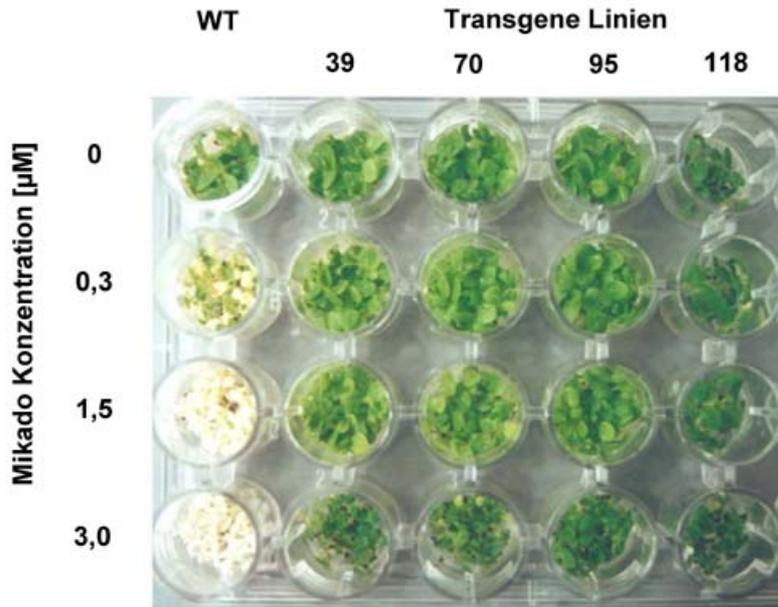
Es zeigte sich, dass eine intakte Kopie des *hpd*-Gens aus Gerste in Blättern aller vier untersuchten transgenen Tabaklinien vorhanden ist, da der Doppelverdau mit *HindIII* und *EcoRI* in allen vier Fällen ein Signal bei 2,4 kbp liefert (Abb. 3.1 A). Bei den Linien 70 und 118 konnten jeweils zwei Signale detektiert werden. Das zusätzliche Signal im Fall der Linie 70 könnte aus einem unvollständigen Verdau resultieren, da auch bei dem Verdau mit *EcoRI* allein ein Signal auf gleicher Höhe erhalten wurde (Abb. 3.1 B). Das zusätzliche Signal im Fall der Linie 118 könnte darauf hinweisen, dass hier mindestens eine Kopie des Transformationskonstruktes nicht vollständig vorliegt, da die Größe des detektierten DNA-Fragments mit einer Größe von 2 kbp unterhalb der erwarteten Größe von 2,4 kbp liegt. Erwartungsgemäß war im Wildtyp keine Kopie des *hpd*-Gens aus Gerste nachweisbar (Abb. 3.1 A). Daher kann unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen eine Kreuzreaktion der verwendeten Sonde mit dem endogenen *hpd*-Gen des Tabaks ausgeschlossen werden.

Durch den Verdau der genomischen Tabak-DNA mit *EcoRI* als einzigem Enzym, konnte zum einen gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten Tabaklinien um voneinander unabhängig entstandene Tabakpflanzen handelt. Zum anderen konnte für die Linie 39 gezeigt werden, dass hier mindestens zwei Kopien des *hpd*-Gens aus Gerste vorliegen. Die Linie 118 enthält mindestens drei Kopien, von denen mindestens eine Kopie nicht mehr vollständig vorliegt. Die Linien 70 und 95 enthalten demgegenüber jeweils mindestens eine Kopie des Transformationskonstruktes (Abb. 3.1 B).

Somit konnte gezeigt werden, dass mehrere unabhängige transgene Tabaklinien zur Verfügung stehen, welche das *hpd*-Gen aus Gerste enthalten und dadurch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> aufweisen.

#### **3.1.3 Untersuchung der erhöhten Mikado<sup>®</sup>-Resistenz von Keimlingen der transgenen Tabaklinien**

In einem weiteren Experiment wurde nun untersucht, um wie viel höher die Resistenz der transgenen Keimlinge im Vergleich zu denen des Wildtyps gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> ist. Hierfür wurden die Samen der vier ausgewählten transgenen Linien und des Wildtyps auf Medium unterschiedlicher Mikado<sup>®</sup>-Konzentration ausgelegt und für zwei Wochen kultiviert (siehe 2.2.2).



**Abb. 3.2:** Resistenz von Keimlingen des Wildtyps und der das *hpd*-Gen aus Gerste überexprimierenden transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 gegenüber dem Herbizid Sulcotrion (Mikado<sup>®</sup>). Die Keimlinge wurden auf 0; 0,3; 1,5 und 3,0 µM Mikado<sup>®</sup> für zwei Wochen in einer Mikrotiterplatte bei Schwachlicht in einem Licht/Dunkel Rhythmus von 16/8 Stunden angezogen.

Unter diesen Bedingungen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Wildtyp-Keimlingen und den Keimlingen der transgenen Linien festgestellt werden (Abb. 3.2). So war ein Ausbleichen der Keimlinge des Wildtyps bereits bei einer Mikado<sup>®</sup>-Konzentration von 0,3 µM zu erkennen. Demgegenüber waren die Keimlinge der transgenen Linien auch bei einer Konzentration von 3,0 µM Mikado<sup>®</sup> noch grün. Somit konnte in Keimlingen der transgenen Tabaklinien im Vergleich zum Wildtyp eine um mindestens Faktor 10 höhere Resistenz gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> gezeigt werden. Diese ist auf das Vorhandensein einer bzw. mehrerer Kopien des *hpd*-Gens aus Gerste zurückzuführen.

#### **3.1.4 Untersuchung der Transkriptgehalte des *hpd*-Gens aus Gerste und des *hpd*-Gens aus Tabak in Blättern der transgenen Tabaklinien**

Mit Hilfe einer *Northern Blot*-Analyse war zu prüfen, ob das Transkript des *hpd*-Gens aus Gerste in Blättern aller vier untersuchten transgenen Tabaklinien nachgewiesen werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, in wie weit sich die Expression des *hpd*-Gens aus Gerste auf die Expression des *hpd*-Gens aus Tabak in Blättern der transgenen Linien auswirkt.

Die Hybridisierung zur Detektion des Transkripts des *hpd*-Gens aus Tabak erfolgte mit der Sonde *Lehpd* aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (siehe 2.4.1). Diese Sonde wurde für den Nachweis des endogenen *hpd*-Transkripts verwendet, da die DNA-Sequenz des *hpd*-Gens aus Tabak zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt war und mehrere Versuche zur Isolierung einer *hpd*-spezifischen cDNA aus Tabak nicht erfolgreich waren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades von Tabak und Tomate war jedoch eine ausreichend hohe Homologie der *hpd*-Sequenzen beider Arten zu erwarten. Kürzlich wurden in einer öffentlichen EST-Datenbank ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) zwei EST-Sequenzen des *hpd*-Gens aus *Nicotiana benthamiana* veröffentlicht (Accession Nr. CK286689, CK285734). Ein Vergleich dieser EST-Sequenzen mit der Konsensussequenz des *hpd*-Gens aus Tomate zeigte eine Homologie der Sequenzen von 82% zueinander (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.3 ist die Konsensussequenz des *hpd*-Gens aus Tomate LeGI TC 124154 (aus: „The TIGR Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Gene Index“, [www.tigr.org](http://www.tigr.org)). gezeigt. Der blau markierte Bereich der Sequenz zeigt den überlappenden Bereich zwischen der Konsensussequenz und der für die Hybridisierung verwendeten Gensonde (siehe 2.4.1).

### 3. Ergebnisse

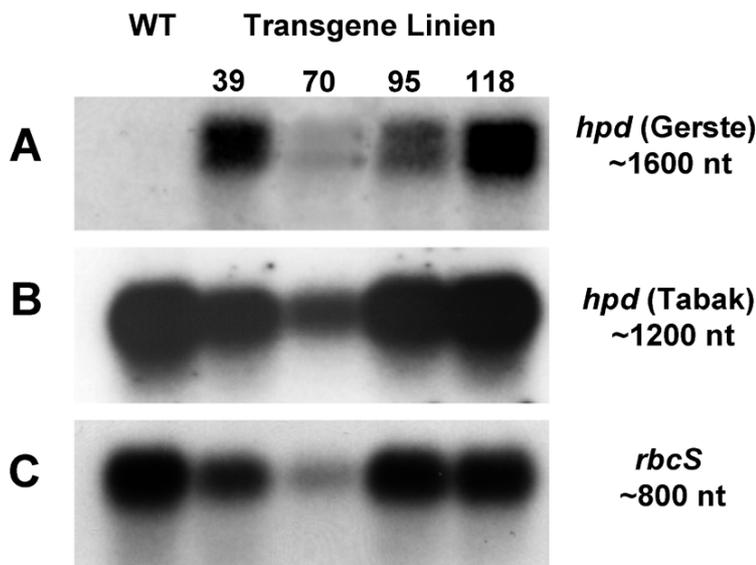
```

1
TC124154 TAAAAAAAAAAAAACAGGTGCTCCAAAATACAATGGGCATGGGCAAGGAACTCTCTCCACCACAGATACA 70
71 140
TC124154 ACCGGCGCTACCTTCAAGCTAGTTGGCTTCAATAATTTTCATCCGTGCTAATCCCCGTTCGGATTTCTTCT 141
141 210
TC124154 CCGTAAAACGCTTCCACCATATCGAATTCTGGTGCGGCGATGCAACCAATACATCTCGTCGTTTTCTCTTG 211
211 280
TC124154 GTCTCTTGGCATGCCGATTACAGCAAATCAGACCTCTCCACCGGAAATTCAGTTCATGCGTCGTATCTC 281
281 350
TC124154 CTCCGTTCTGTTTTAGGCGAACTTCAATTTGTTTTCACTGCTCCTTATTCGCCGTCAATTTAGTACCGT 351
351 420
TC124154 CAACGGCAGGTATACCTAGTTTTTCCACCCCTACTTATCGGGATTTTACGGCGAAGCATGGTCTTGGTGT 421
421 490
TC124154 TCGTGTCTTGGTGGAGGTGGAGAACGCTTACCTGGCGTTCTCCGCTAGTGTGGCTCGTGGGGCGAAA 491
491 560
TC124154 CCCCAGTTTGAACCTGTAACGATTGATGAGCATGTGGCTGTTGCTGAAGTTCATCTATATGGCGATGTCG 561
561 630
TC124154 TTTTGGGTTTGTGAGTCTTGTTAAAGATGCGGATACCCCTATTTTCCTACCAGTTTTGAGGCCATGGA 631
631 700
TC124154 TGAAACATCATCATTCAAGGAACGGATTATGGGATTCACCGACTGGACCATGCCGTTGGGAATGTGCCG 701
701 770
TC124154 GAGTTGGGTCTGTAGTGGACTACATCAAGGCATTTACGGGGTTTCATGAATTTGCGGAGTTTACAGCTG 771
771 840
TC124154 AAGATGTTGGAACGCTGAGAGCGGGCTGAACTCAGTTGTGTTGGCAAACAATGACGAGACAGTATTGCT 841
841 910
TC124154 TCCGTTGAATGAGCCGGTATATGGAATAAAAGGAAGAGTCAAATTCAGACTTATTTAGAGCATAATGAA 911
911 980
TC124154 GGGCAGGAGTGCAACATTTAGCTTTGGTTACTGAGGATATATTCAGAACATTGAGGAAATGTGGAAA 981
981 1050
TC124154 GGAGTGGAGTTGGGGGATTTGAATTCATGCCTGCACCTCCGCCTACTTATTATAAGAATTTGAGAAGTAG 1051
1051 1120
TC124154 GGCCGGGGATGTACTCAGTGACGAACAAAATCCAGGCGTGTGAAGAATTGGGGATCTTGTTGACAGGGAT 1121
1121 1190
TC124154 GATCAGGGGACTCTGCTTCAGATATTTACCAAGCCTGTGGGAGACAGGCCAACAAATATTTATAGAAATA 1191
1191 1260
TC124154 TTCAGAGAATCGGGTGCATGCTCAAAGATGAAAAGGACAAGTCTATCAGAAGGGCGGTTGTGGAGGCTT 1261
1261 1330
TC124154 CGGTAAGGGAACTTCTCTGAGCTGTTTAGATCGATCGAGGAATACGAGAAGATGCTTGAAGCCAAACAT 1331
1331 1400
TC124154 GTTAATCAAGTAGCTGCTGTGCAATGAATATATACGAGCATTAGCTTGAATCTAATTTGAAATTTGAAAG 1401
1401 1470
TC124154 GGGCATCTAAGCTTCCATTTGATCTTCTACAATTAATTATGAAATAAAAAATAGCTGTTGTGTAATAG 1471
1471 1540
TC124154 CATGGAGGGAAACAAAGTCAAGTAATTTAAGTATAATGTTGATCATAAGTCCCCTCTAAAATATCTTTTT 1541
1541 1610
TC124154 ATTAGTGCTTTGAGTTTCATGGTCGATGAAGGCAGGTGGTCTTTTTCTTATTCCTGTCATTTCTAGGTAC 1611
1611 1680
TC124154 TTATCACTTTTCTGAAAAATATTTTCATTAAAGTATGTTATTTTAGTAAAATTCTCATATATTAAGAAG 1681
1681 1750
TC124154 TCCCAATAAATATAATGTGTTGTTTACTGAATAATATCAATTTTATATATTGTTTCTTGAGAATTGAGTA 1751
1751 1820
TC124154 CTATTAATAAATAATGAAGCACAACGATACAACACTAGAAAAACATAAAAACTTGATTAATTTTTTAAGAT 1821
1821 1890
TC124154 AACATTTACTTTGGAATAGGATTATGTTGTTAAATTATCGCTTATTCTGGGATGGAAAAAGTCTCCTTT 1891
1891 1938
TC124154 CAACAATTAGTTAAATATAGTTGTTTAAATAGTATTTGTCTAATTTAAA

```

**Abb. 3.3:** Konsensussequenz des *hpd*-Gens aus Tomate LeGI TC 124154 (aus: „The TIGR Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Gene Index“, [www.tigr.org](http://www.tigr.org)). Die blauen markierten Bereiche der Sequenz zeigen den überlappenden Bereich zwischen der Konsensussequenz und der Sequenz des als Sonde eingesetzten EST-Klons *Lehpd*.

Da *Northern Blot*-Analysen unter Verwendung von Gesamt-RNA aus Tabakblättern kein klares Signal für das *hpd*-Gen aus Gerste lieferten (Daten nicht gezeigt), wurde für die in Abbildung 3.4 dargestellte *Northern Blot*-Analyse (siehe 2.7) polyA<sup>+</sup>-RNA aus Tabakblättern isoliert (siehe 2.4.5 und 2.4.6).



**Abb. 3.4:** Autoradiogramm einer *Northern-Blot* Analyse zum Nachweis der Transkripte des *hpd*-Gens im Wildtyp und den transgenen Tabaklinien. Die Hybridisierung erfolgte mit der radioaktiv markierten Sonde der für das *hpd*-Gen aus Gerste spezifischen Transkripte (A), anschließend mit der radioaktiv markierten *Lehpd*-Sonde (B), und abschließend mit der radioaktiv markierten Sonde der für das *rbcS*-Gen spezifischen Transkripte. Die *Northern-Blot* Analyse wurde mit PolyA<sup>+</sup>-RNA aus ausgewachsenen Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 durchgeführt.

Erwartungsgemäß war im Fall des Wildtyps kein Transkript des *hpd*-Gens aus Gerste detektierbar (Abb. 3.4 A). Daher war eine Kreuzreaktion der verwendeten Sonde mit Transkripten des *hpd*-Gens aus Tabak auszuschließen. Demgegenüber zeigten alle vier untersuchten transgenen Tabaklinien eine Expression des *hpd*-Gens aus Gerste auf Ebene der RNA (Abb. 3.4 A). Die, für das Transkript des *hpd*-Gens aus Gerste erhaltene, Doppelbande wurde schon bei Kleber-Janke & Krupinska (1997) beobachtet. Die im Vergleich zu den anderen Linien sehr niedrige detektierte Transkriptmenge im Fall der Linie 70 lässt sich auf eine ungleiche Beladung des *Northern Blots* zurückführen. Die Beladungskontrolle erfolgte durch Hybridisierung derselben Membran mit einer *rbcS*-spezifischen Sonde aus Soja (*Glycine max* L.) (Berry-Lowe & Meagher 1985) (Abb. 3.4 C). Unter Berücksichtigung der ungleichen

Beladung, die durch die Kontrollhybridisierung mit der *rbcS*-spezifischen Sonde aus Soja ersichtlich ist, zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Transkriptgehalt des *hpd*-Gens aus Gerste in Blättern der transgenen Tabaklinien.

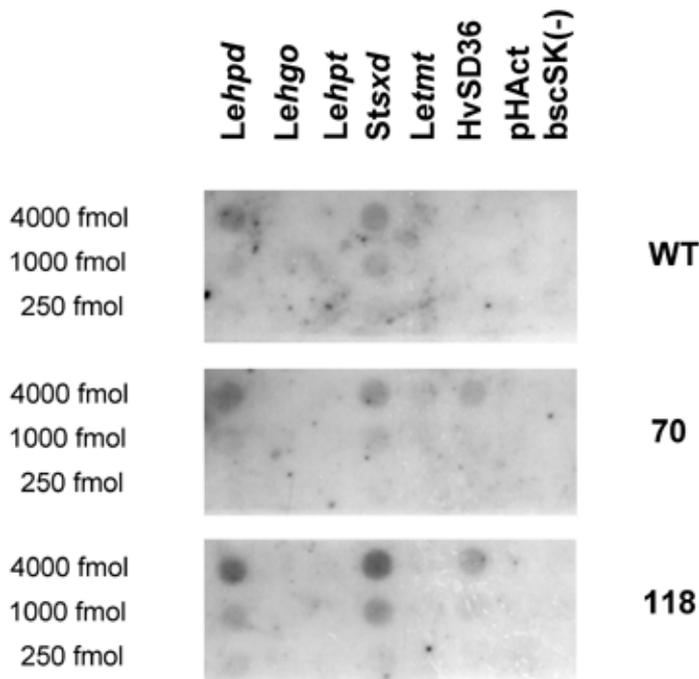
Der Transkriptgehalt des endogenen *hpd*-Gens aus Tabak war in den untersuchten Blättern ebenfalls vergleichbar hoch (Abb. 3.4 B). Eine Repression des endogenen *hpd*-Gens aus Tabak, die in den transgenen Tabaklinien auftreten könnte, scheint somit nicht wahrscheinlich.

Das detektierte Transkript des *hpd*-Gens aus Tabak ist etwa 400 nt kleiner als die bisher bekannten Sequenzen der *hpd*-Gene erwarten lassen würden.

Generell lässt sich anhand der durchgeführten *Northern Blot*-Analysen zeigen, dass eine konstitutive Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste keinen wesentlichen Einfluss auf den Transkriptgehalt des *hpd*-Gens aus Tabak in den Blättern der untersuchten transgenen Tabaklinien hat.

#### **3.1.5 Untersuchung der Transkriptgehalte der für die Enzyme der Biosynthese des Vitamins E kodierenden Gene**

Um zu untersuchen, ob sich die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in den Blättern der transgenen Tabaklinien auf den Transkriptgehalt der Gene, die für die anderen, an der Biosynthese des Vitamins E beteiligten, Enzyme kodieren auswirkt, wurden *DNA-Dot-Blot*-Membranen angefertigt (siehe 2.8), auf denen die verfügbaren Sonden der entsprechenden Gene (siehe 2.4.1) aufgetragen wurden. Die aus grünen ausgewachsenen Blättern isolierte RNA (siehe 2.4.5) wurde in cDNA umgeschrieben und dabei radioaktiv markiert (siehe 2.5). Exemplarisch wurden für diese RNA-Analyse nur Blätter der transgenen Linien 70 und 118 verwendet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3.5 dargestellt.



**Abb. 3.5:** Akkumulation der Transkripte der an der Vitamin E-Biosynthese beteiligten Enzyme. 4000, 1000 und 250 fmol der oben angegebenen Plasmide wurden auf eine Membran punktförmig aufgetragen. Gesamt-RNA wurde aus ausgewachsenen Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 70 und 118 isoliert, mittels Oligo d(T)<sub>18</sub> Primern und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und die DNA-*Dot Blot*-Membranen hiermit hybridisiert.

Es ist zu erkennen, dass die Transkriptgehalte der Gene, die für Enzyme der Biosynthese des Vitamins E kodieren (siehe Tab. 2.1), generell gering sind. Den höchsten Transkriptgehalt zeigte das für die Tocopherol-Cyclase kodierende Gen (*Stsxd*). Etwa vergleichbar hoch war der Transkriptgehalt des *hpd*-Gens aus Tabak (*Lehpd*). Das Transkript des *hpd*-Gens aus Gerste (*HvSD36*) konnte, wie auch in der vorangegangenen *Northern Blot*-Analyse (Abb. 3.4), lediglich in Blättern der transgenen Linien nachgewiesen werden, nicht aber in Blättern des Wildtyps. Die als Positivkontrolle verwendete Sonde für das Transkript des Actin-Gens (*pH Act*) zeigte nach der Hybridisierung mit der cDNA aus den verwendeten Tabakblättern kein Signal. Ebenfalls war im Fall des für die Homogentisat-Dioxygenase kodierenden Gens (*Lehgo*), kein Signal auf den *Dot Blot*-Membranen detektierbar.

Aufgrund der ähnlichen Hybridisierungsmuster des Wildtyps und der transgenen Linien kann gefolgert werden, dass die Transkriptgehalte der anderen untersuchten Gene, die für Enzyme der Vitamin E-Biosynthese kodieren, in den Blättern der transgenen Tabaklinien durch die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste nicht verändert sind.

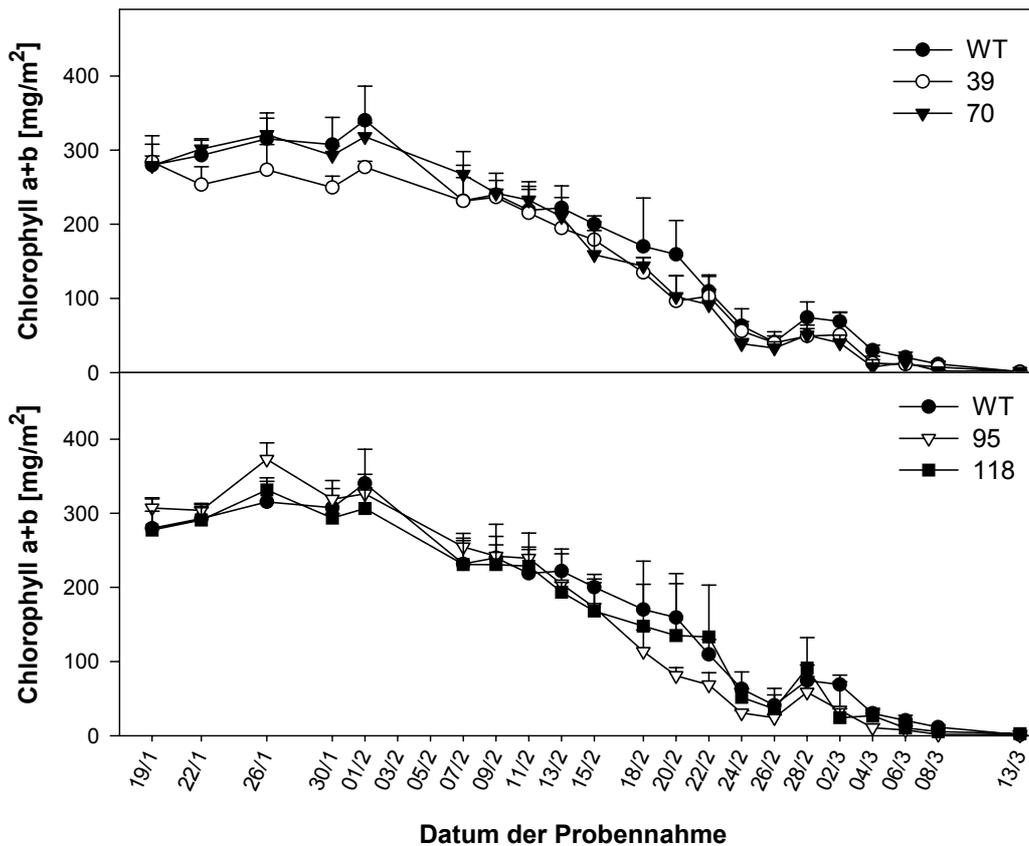
## **3.2 Untersuchungen zur Auswirkung der Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste auf den Gehalt an Vitamin E und Plastochinon-9 in den transgenen Tabakpflanzen**

Um die transgenen Tabaklinien eingehender charakterisieren zu können, wurde zunächst der allgemeine Entwicklungsverlauf der Pflanzen untersucht. Da insbesondere während der Seneszenz der Blätter ein verstärktes Risiko des Auftretens von oxidativem Stress besteht, war es von besonderem Interesse, zu klären, ob eine höhere Expression des *hpd*-Gens den Seneszenzverlauf in den transgenen Tabaklinien beeinflusst.

### **3.2.1 Untersuchung des Seneszenzverlaufs von Blättern der transgenen Linien**

Um eine infolge der Überexpression des *hpd*-Gens veränderte Blattseneszenz der transgenen Linien zu untersuchen, wurden der Chlorophyllgehalt (siehe 2.3.1) sowie die maximale Effizienz von Photosystem II (siehe 2.3.8) während der Seneszenz in Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Anzucht der im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Pflanzen erfolgte im Gewächshaus. In Abb. 3.6 ist der Gesamtchlorophyllgehalt in Abhängigkeit des Datums der jeweiligen Probennahme, also indirekt in Abhängigkeit des Blattalters, graphisch dargestellt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Probennahme, insbesondere zu Beginn, zeigten sich zwar leichte Unterschiede im Gesamtchlorophyllgehalt, allerdings sind diese nicht signifikant. Der erste deutliche Abfall im Gesamtchlorophyllgehalt zeigte sich ab dem 01.02.. Danach fiel der Gesamtchlorophyllgehalt nahezu linear ab. Am 26.02. stieg der Gehalt nochmals gering an. Ein Unterschied im Verlauf der Abnahme des Gesamtchlorophyllgehaltes zwischen den Wildtyppflanzen und den transgenen Pflanzen ließ sich jedoch nicht feststellen.

### 3. Ergebnisse

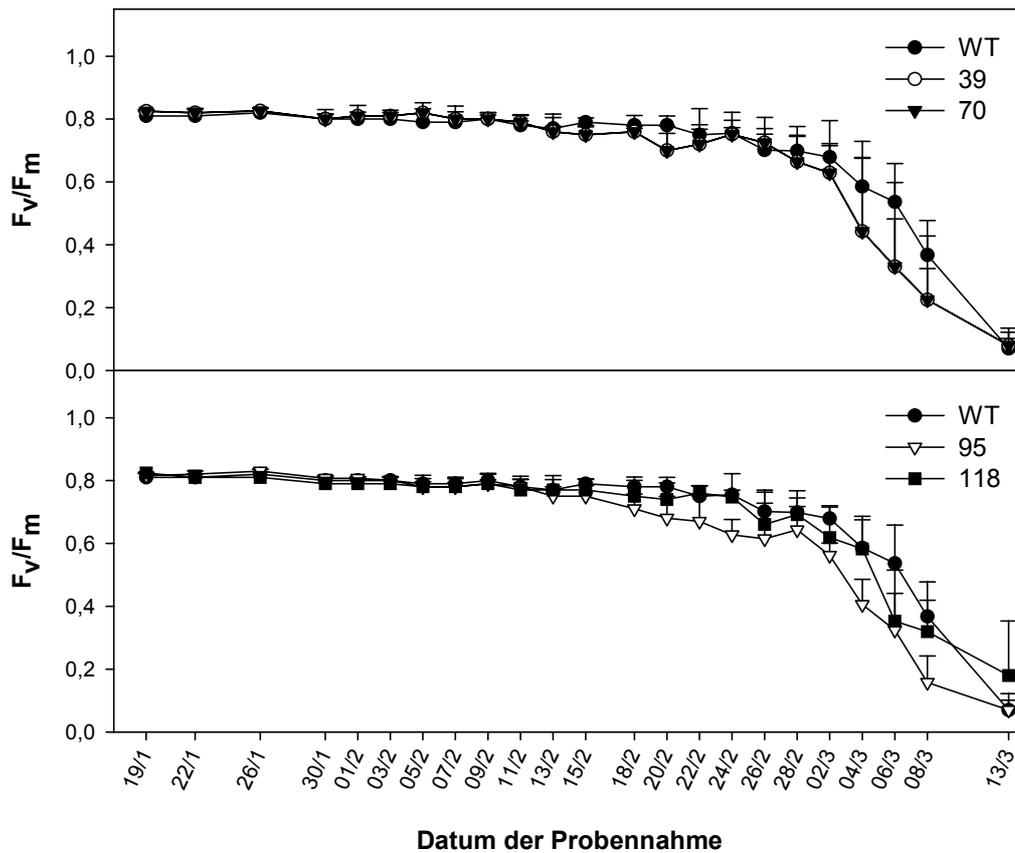


**Abb. 3.6:** Verlauf des Gesamtchlorophyllgehaltes von ausgewachsenen Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 vor und während der Blattseneszenz. Blattscheiben wurden aus Blättern von jeweils vier Pflanzen mittels eines Korkbohrers ausgestanzt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Gesamtchlorophyllgehalte von Blättern der Linien 39 und 70 sowie 95 und 118 in zwei Graphen mit dem Gesamtchlorophyllgehalt der Blätter des Wildtyps verglichen.

Im Vergleich zum Gesamtchlorophyllgehalt fiel die maximale Effizienz von Photosystem II erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt ab (Abb. 3.7). Hier war eine deutliche Abnahme erst ab dem Zeitpunkt zu erkennen, an dem der Chlorophyllgehalt bereits um etwa 50% gesunken war.

Ein Unterschied zwischen den untersuchten Wildtyppflanzen und den transgenen Pflanzen war aber auch hier nicht festzustellen.

### 3. Ergebnisse



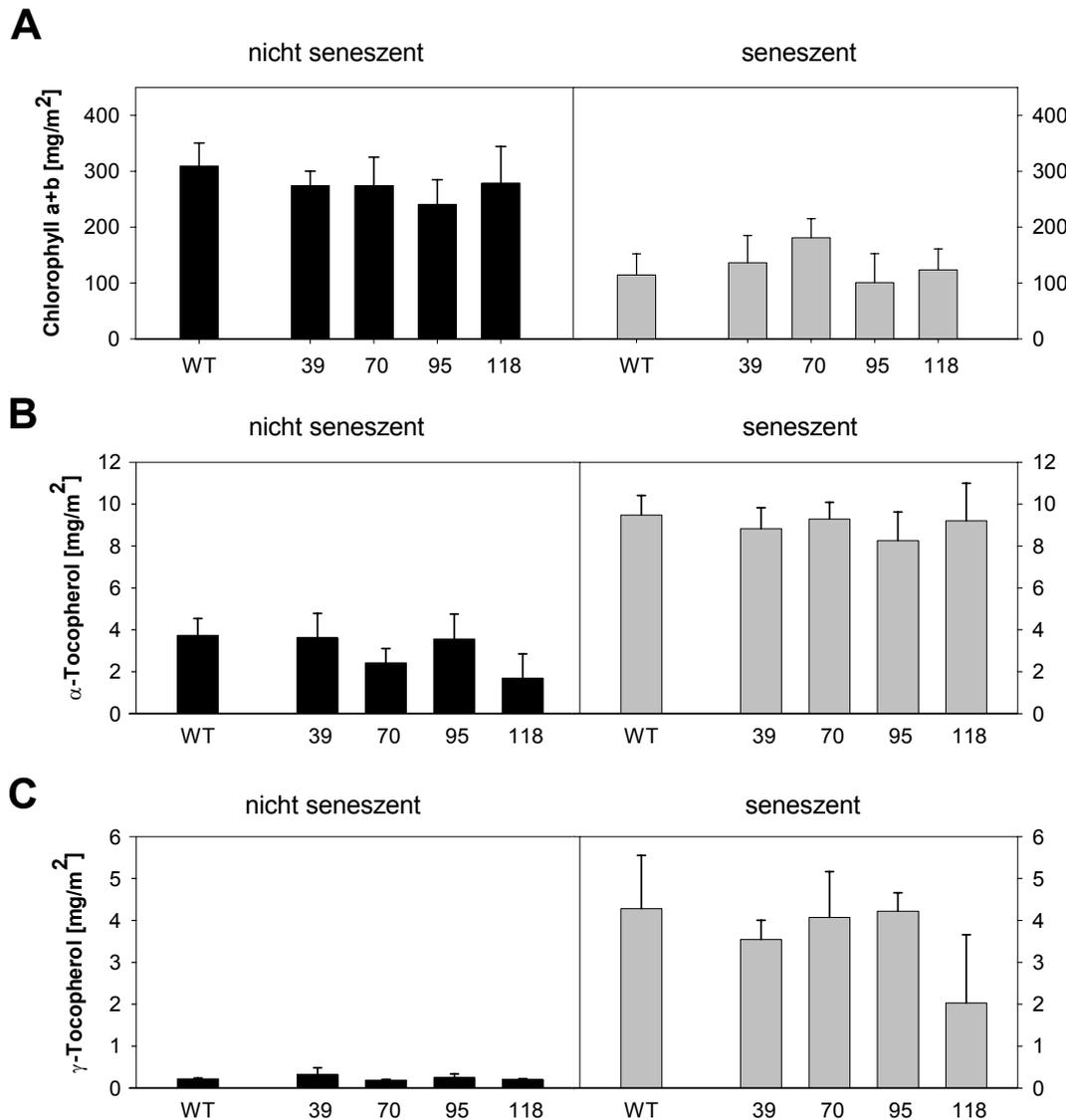
**Abb. 3.7:** Verlauf der maximalen Effizienz von Photosystem II ( $F_v/F_m$ ) von ausgewachsenen Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 vor und während der Blattseneszenz. Die Bestimmung von  $F_v/F_m$  erfolgte an Blattmaterial von jeweils 4 Pflanzen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Werte für  $F_v/F_m$  von Blättern der Linien 39 und 70 sowie 95 und 118 in zwei Graphen mit den Werten für  $F_v/F_m$  der Blätter des Wildtyps verglichen.

Bezüglich des Seneszenzverlaufes lässt sich aufgrund der erhaltenen Daten zwischen den untersuchten Blättern des Wildtyps und denen der transgenen Linien kein Unterschied feststellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Blätter des Wildtyps und der transgenen Linien, die einen vergleichbaren Chlorophyllgehalt aufweisen, auch ein vergleichbares Entwicklungsstadium repräsentieren.

#### **3.2.2 Analyse des Tocopherolgehaltes in Blättern der transgenen Tabaklinien**

Nachdem die Expression des *hpd*-Gens aus Gerste in den transgenen Tabakpflanzen auf Ebene der Transkriptgehalte und der Herbizidresistenz gezeigt werden konnte, der Verlauf der Blattseneszenz in den untersuchten transgenen Tabaklinien aber nicht verändert war, wurde im Anschluss untersucht, ob sich die Überexpression auf den Vitamin E-Gehalt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Blattes auswirkt. Hierfür wurde Blattmaterial des Wildtyps und der transgenen Linien hinsichtlich des Gehaltes an Vitamin E und Plastochinon-9 mittels HPLC analysiert (siehe 2.3.2 und 2.3.3). In einigen Pflanzen wurde während der Blattseneszenz eine Akkumulation von Tocopherolen beschrieben (Rise et al. 1989, Chrost et al. 1999). Im Fall des Tabaks wurde jedoch keine Akkumulation von Tocopherolen während der Seneszenz beobachtet (Tanaka et al. 1999). Um einen diesbezüglichen Unterschied zwischen Blättern der transgenen Linien und denen des Wildtyps erfassen zu können, wurde im Rahmen dieser Untersuchung sowohl der Tocopherolgehalt in ausgewachsenen grünen Blättern der Tabakpflanzen als auch zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt während der Seneszenz bestimmt (Abb. 3.8). Um zeigen zu können, dass sich das jeweils chromatographisch vermessene Blattmaterial in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium befand, wurden zusätzlich die Chlorophyllgehalte (siehe 2.3.1) der untersuchten Blätter bestimmt (Abb. 3.8 A).

Im Gegensatz zu den unter 3.2.1 beschriebenen Pflanzen erfolgte die Anzucht für die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Pflanzen in der Klimakammer unter Starklichtbedingungen (siehe 2.2.1).



**Abb. 3.8:** Chlorophyllgehalte und Tocopherolgehalte von nicht seneszierenden und seneszierenden Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Gesamtchlorophyllgehalte (A), die  $\alpha$ -Tocopherolgehalte (B) und die  $\gamma$ -Tocopherolgehalte (C) wurden in Blättern von jeweils vier Pflanzen bestimmt.

Anhand ihrer Chlorophyllgehalte konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Blätter des Wildtyps und der transgenen Linien in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium befanden (Abb. 3.8 A). Der Verlust an Chlorophyll im gewählten seneszenten Blattmaterial betrug etwa 50% bezogen auf den Gehalt in nicht seneszierendem Blattmaterial. Das mengenmäßig überwiegende Tocopherol in nicht seneszierenden Tabakblättern ist  $\alpha$ -Tocopherol mit einem durchschnittlichen Gehalt von etwa 4 mg/m<sup>2</sup> (Abb. 3.8 B). Während der Seneszenz stieg der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt um den Faktor 2,5 an. Demgegenüber war der Anstieg des  $\gamma$ -Tocopherolgehaltes während der Seneszenz um etwa den Faktor 10 deutlich

ausgeprägter (Abb. 3.8 C), der Gehalt bezogen auf die Blattfläche lag aber auch während der Seneszenz unter dem des  $\alpha$ -Tocopherols (Abb 3.8 B, C).

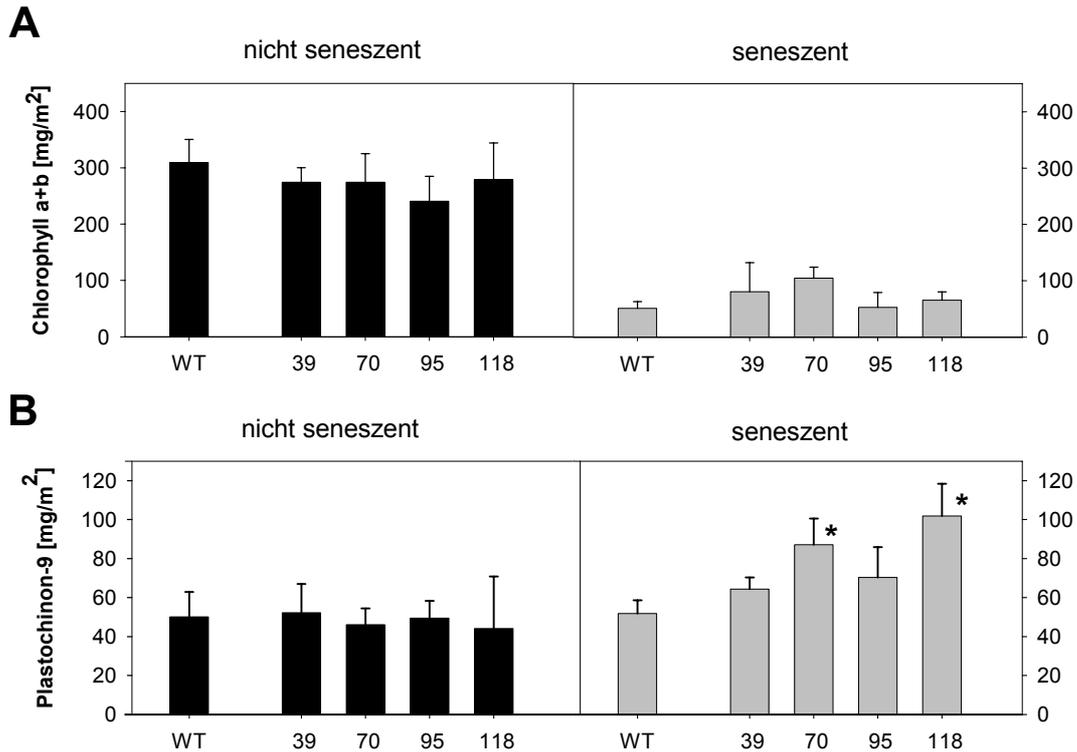
Weder im Tocopherol-Gehalt noch in der Tocopherol-Zusammensetzung des untersuchten Blattmaterials war ein Unterschied zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp feststellbar.

Diese Untersuchung zeigte zum einen eine Akkumulation von Tocopherolen in Tabakblättern während der Blattseneszenz. Die Akkumulation des  $\gamma$ -Tocopherols war hierbei ausgeprägter als die des  $\alpha$ -Tocopherols. Zum anderen zeigte sich, dass eine Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in Tabak, cv. Xanthi, weder in nicht seneszentem noch in seneszentem Blattmaterial der transgenen Pflanzen zu einer Erhöhung der Vitamin E-Gehalte in Blättern geführt hat.

#### **3.2.3 Analyse des Plastochinongehaltes in Blättern der transgenen Tabaklinien**

Da das unter Beteiligung der HPPD gebildete Homogentisat ebenfalls die Vorstufe von Plastochinon ist, könnte die Überexpression des *hpd*-Gens zu einer Erhöhung des Plastochinongehaltes in Blättern der transgenen Tabaklinien führen. Um dies zu überprüfen, wurde in Tabakblättern zweier unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Plastochinon-9-Gehalt bestimmt (siehe 2.3.3). Aufgrund der vergleichbaren Chlorophyllgehalte (Abb. 3.9 A) zum Zeitpunkt der Plastochinon-Bestimmung konnte gezeigt werden, dass ein vergleichbares Entwicklungsstadium des analysierten Blattmaterials vorlag. In nicht seneszierendem Blattgewebe war kein Unterschied im Hinblick auf den Plastochinon-9-Gehalt zwischen Wildtyp und den transgenen Linien messbar (Abb. 3.9 B). Ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhter Gehalt an Plastochinon-9 konnte aber während der Seneszenz in Blättern der Linie 70 und der Linie 118 gemessen werden (Abb. 3.9 B).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.9** Chlorophyllgehalte und Plastochinon-9-Gehalte von nicht seneszierenden und seneszierenden Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Gesamtchlorophyllgehalte (A) und die Plastochinon-9-Gehalte (B) wurden in Blättern von jeweils vier Pflanzen bestimmt. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ )

Dieses Ergebnis war recht überraschend, da bekannt ist, dass während der Seneszenz der Photosyntheseapparat abgebaut wird.

In der Tat war zum Zeitpunkt der erhöhten Plastochinongehalte in den untersuchten Blättern der transgenen Tabakpflanzen der Chlorophyllgehalt bezogen auf den Gehalt in nicht seneszierendem Blattgewebe bereits auf etwa 40% abgesunken.

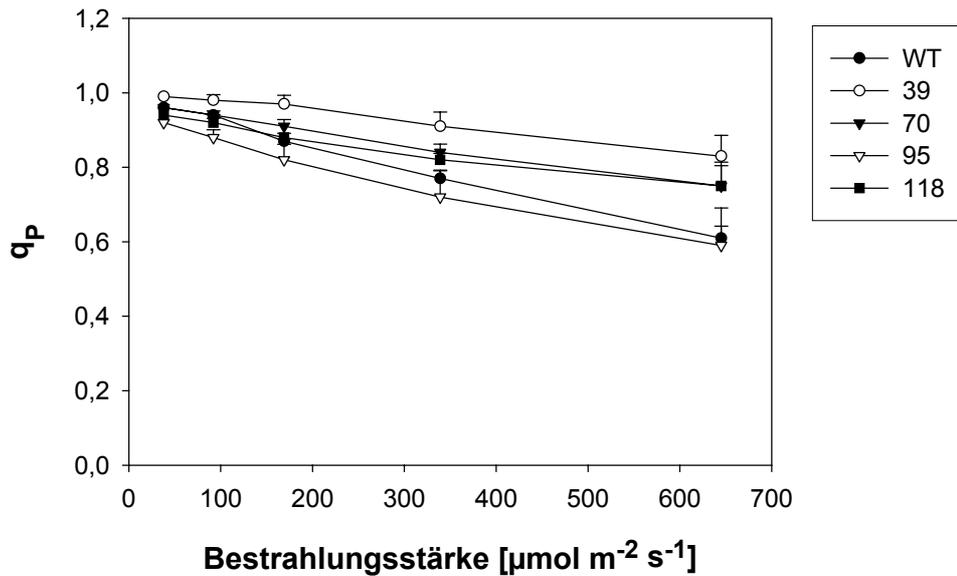
Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob sich durch den erhöhten Plastochinongehalt in seneszenten Blättern der transgenen Pflanzen eine Veränderung bezüglich der Photosynthese ergibt.

#### 3.2.3.1 Untersuchung des photochemischen *quenchings* in seneszenten Tabakblättern

Eine Erhöhung des Plastochinongehaltes in seneszenten Blättern der transgenen Linien könnte zur Folge haben, dass mehr oxidiertes Plastochinon für den Elektronentransport zur Verfügung steht und das Photosystem II dadurch in stärker oxidiertem Zustand vorliegt. Ein Maß für die unter den gewählten Versuchsbedingungen noch offenen, also oxidierten, Reaktionszentren ist das sogenannte photochemische *quenching* (photochemische Fluoreszenzlöschung), (Maxwell & Johnson 2000). Um zu prüfen, ob seneszente Blätter der transgenen Linien ein erhöhtes photochemisches *quenching* aufweisen, wurden Blattscheiben aus den entsprechenden Blättern ausgestanzt und das photochemische *quenching* mit Hilfe der Chlorophyll-Fluoreszenz untersucht (siehe 2.3.8).

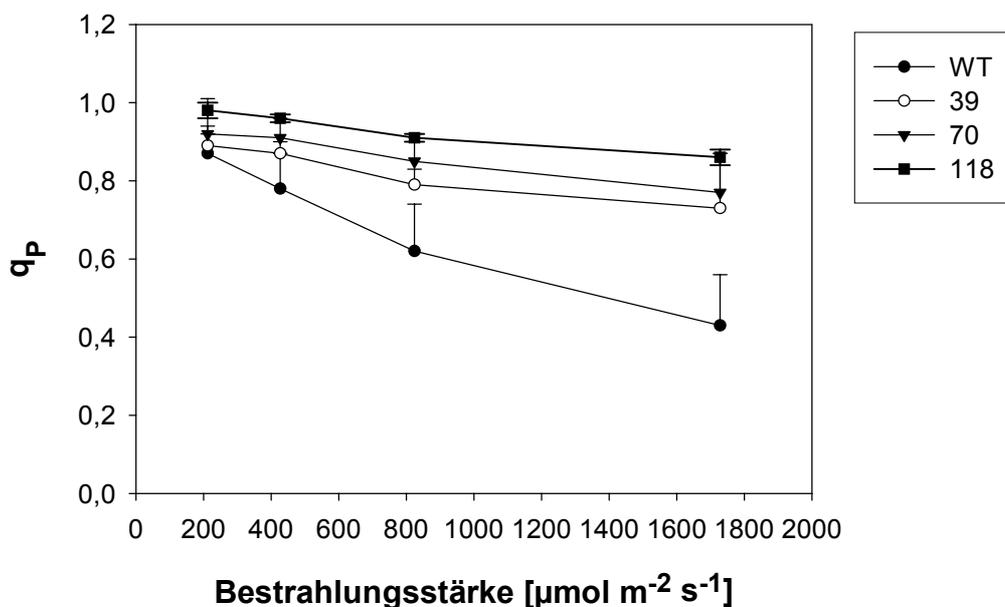
Bei der zu Beginn verwendeten Bestrahlungsstärke von  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war  $q_p$  für alle Blattproben nahezu identisch. Mit zunehmender Bestrahlungsstärke wurde allerdings ein deutlicher Unterschied zwischen den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien und denen des Wildtyps messbar. So zeigte die Linie 39 schon ab einer Bestrahlungsstärke von  $92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  einen erkennbar höheren Wert für  $q_p$  als der Wildtyp. Ein Unterschied zwischen den transgenen Linien 70 und 118 und dem Wildtyp wurde ab einer Bestrahlungsstärke von etwa  $340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sichtbar. Dieser Effekt verstärkte sich bei  $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  noch. Die Linie 95 zeigte zu keinem Zeitpunkt einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Wert für  $q_p$  (Abb. 3.10).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.10:** Photochemisches *quenching* in seneszenten Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. Die Bestimmung erfolgte an Blättern von jeweils drei Pflanzen.

Um die beobachteten Unterschiede noch zu verstärken, wurde in einem weiteren Ansatz die Bestrahlungsstärke erhöht (Abb. 3.11). Da Blattproben der Linie 95 bereits im ersten Teil keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten, wurde hier auf eine Bestimmung von  $q_p$  bei höheren Bestrahlungsstärken verzichtet.

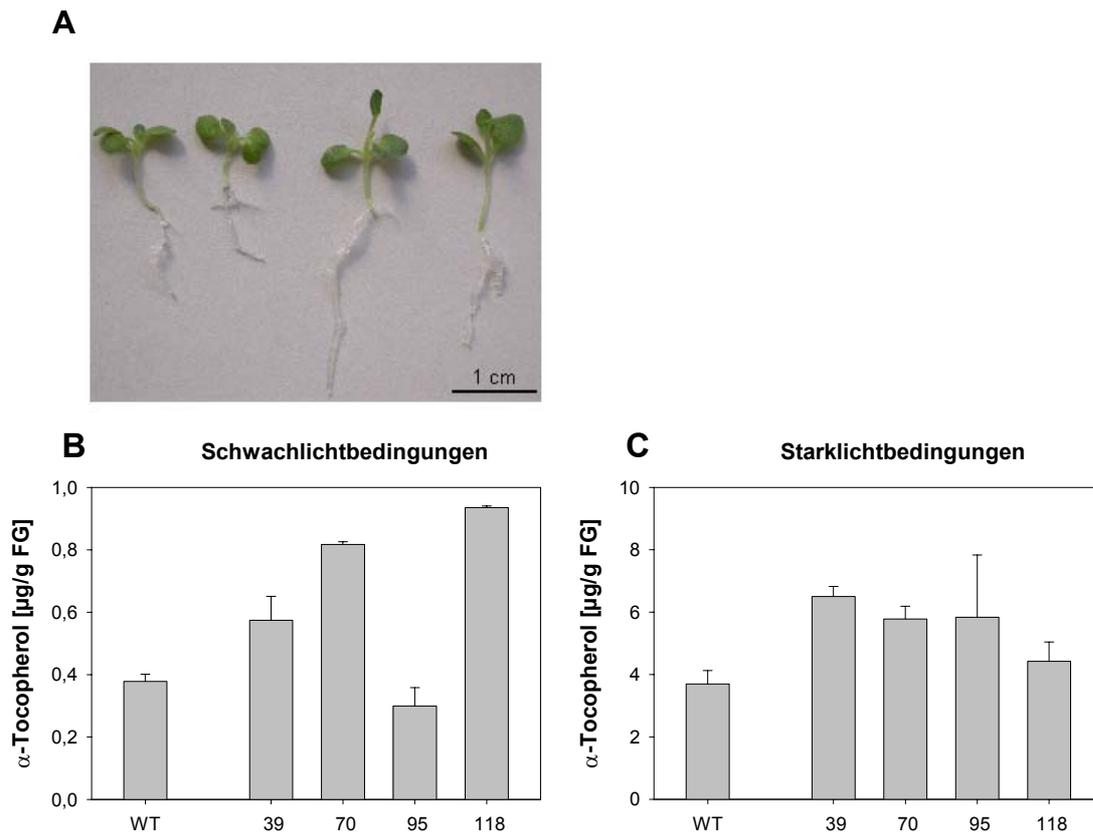


**Abb. 3.11:** Photochemisches *quenching* in seneszenten Blättern des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70 und 118 in Abhängigkeit der verwendeten Bestrahlungsstärke. Die Bestimmung erfolgte an Blättern von jeweils drei Pflanzen.

Trotz der recht hohen Standardabweichungen im Falle des Wildtyps war ab einer Bestrahlungsstärke von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ein deutlicher Unterschied für  $q_p$  zwischen den transgenen Linien 39, 70 und 118 und dem Wildtyp zu erkennen. Somit scheint sich der gegenüber dem Wildtyp erhöhte Plastochinongehalt in seneszenten Blättern der transgenen Linien, direkt auf den Redoxstatus der Reaktionszentren des Photosystems II auszuwirken. Mit Ausnahme der transgenen Linie 95 scheint ausserdem eine Korrelation zwischen dem Plastochinon-9-Gehalt und dem Ausmaß des photochemischen *quenchings* vorzuliegen.

#### **3.2.4 Einfluss der Bestrahlungsstärke auf den Tocopherolgehalt in Tabakkeimlingen**

Bei einem Vergleich zwischen Tabakpflanzen, die unter Starklicht- sowie unter Schwachlichtbedingungen angezogen wurden, fanden Tanaka et al. (1999) unter Schwachlichtbedingungen ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) einen geringeren  $\alpha$ -Tocopherolgehalt bezogen auf das Frischgewicht der Blätter als unter Starklichtbedingungen ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Es wurde daher der Einfluss der Bestrahlungsstärke auf den Tocopherolgehalt (siehe 2.3.2) von Tabakkeimlingen im Hinblick auf Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp untersucht (Abb. 3.12). Für diese Untersuchung wurden 14 Tage alte Keimlinge verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Keimlinge durchschnittlich 3 cm lang, und die Primärblätter haben sich bereits entwickelt (Abb. 3.12 A). Die Tocopherolzusammensetzung 14 Tage alter Keimlinge des Tabaks unterschied sich insoweit von der ausgewachsener Tabakblätter, als dass in den Keimlingen lediglich  $\alpha$ -Tocopherol detektierbar war. Der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Keimlinge, die unter Schwachlicht ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden, betrug lediglich ein Zehntel des Gehaltes der unter Starklicht ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogenen Keimlinge (Abb. 3.12 B, 3.12 C). Unter beiden Anzuchtbedingungen lag der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Keimlinge der transgenen Linien 39, 70 und 118 über dem des Wildtyps. Der Unterschied im  $\alpha$ -Tocopherolgehalt zwischen den Keimlingen des Wildtyps und denen der transgenen Linien war jedoch unter beiden Bestrahlungsstärken vergleichbar groß. Im Vergleich zu voll ausgebildeten Laubblättern von unter Starklicht angezogenen Wildtyppflanzen, die etwa einen  $\alpha$ -Tocopherolgehalt von  $25 \mu\text{g/g}$  FG aufweisen, lagen die hier detektierten  $\alpha$ -Tocopherolgehalte der unter Starklicht angezogenen Keimlinge mit durchschnittlich  $5 \mu\text{g/g}$  FG deutlich darunter.



**Abb. 3.12:** Einfluss der Bestrahlungsstärke auf den  $\alpha$ -Tocopherolgehalt in 14 Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. (A) zeigt das Entwicklungsstadium der verwendeten Keimlinge anhand von 4 Keimlingen des Wildtyps. Die Keimlinge wurden für 14 Tage auf MS-Festmedium unter Schwachlichtbedingungen ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (B) sowie für 14 Tage unter Starklichtbedingungen ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (C) in einem Licht/Dunkel Rhythmus von 16/8 Stunden angezogen. Der Tocopherolgehalt ergab sich aus einer Zweifachbestimmung unter Verwendung von jeweils mindestens 20 Keimlingen.

Im Gegensatz zu voll ausgebildeten Laubblättern ist bei 14 Tage alten Keimlingen der transgenen Tabaklinien eine durch die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste verursachte Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol zu verzeichnen.

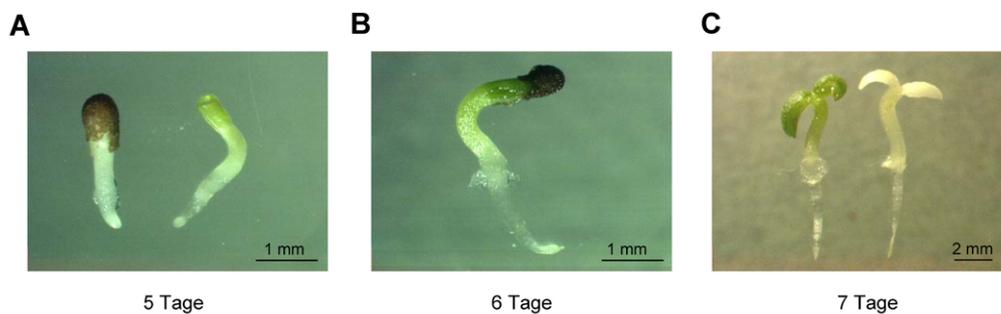
### 3.2.5 Untersuchungen zum Keimungsverlauf in den transgenen Linien

Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob die erhöhten Tocopherolgehalte in den Keimlingen der transgenen Linien, auch zu einem früheren Keimungszeitpunkt festzustellen sind. Daher wurden Keimlinge des Wildtyps und der ausgewählten Linie 70 bezüglich ihres Tocopherol- und Plastochinon-9-Gehaltes während der Keimung untersucht (siehe 2.3.2 und 2.3.3). Im Rahmen dieser Untersuchung wurde der Tocopherolgehalt sowohl von Keimlingen bestimmt, die nur auf MS-Medium angezogen wurden, als auch von Keimlingen, die auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem MS-Medium

### 3. Ergebnisse

angezogen wurden (siehe 2.2.2). Die Anzucht erfolgte unter Schwachlichtbedingungen ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

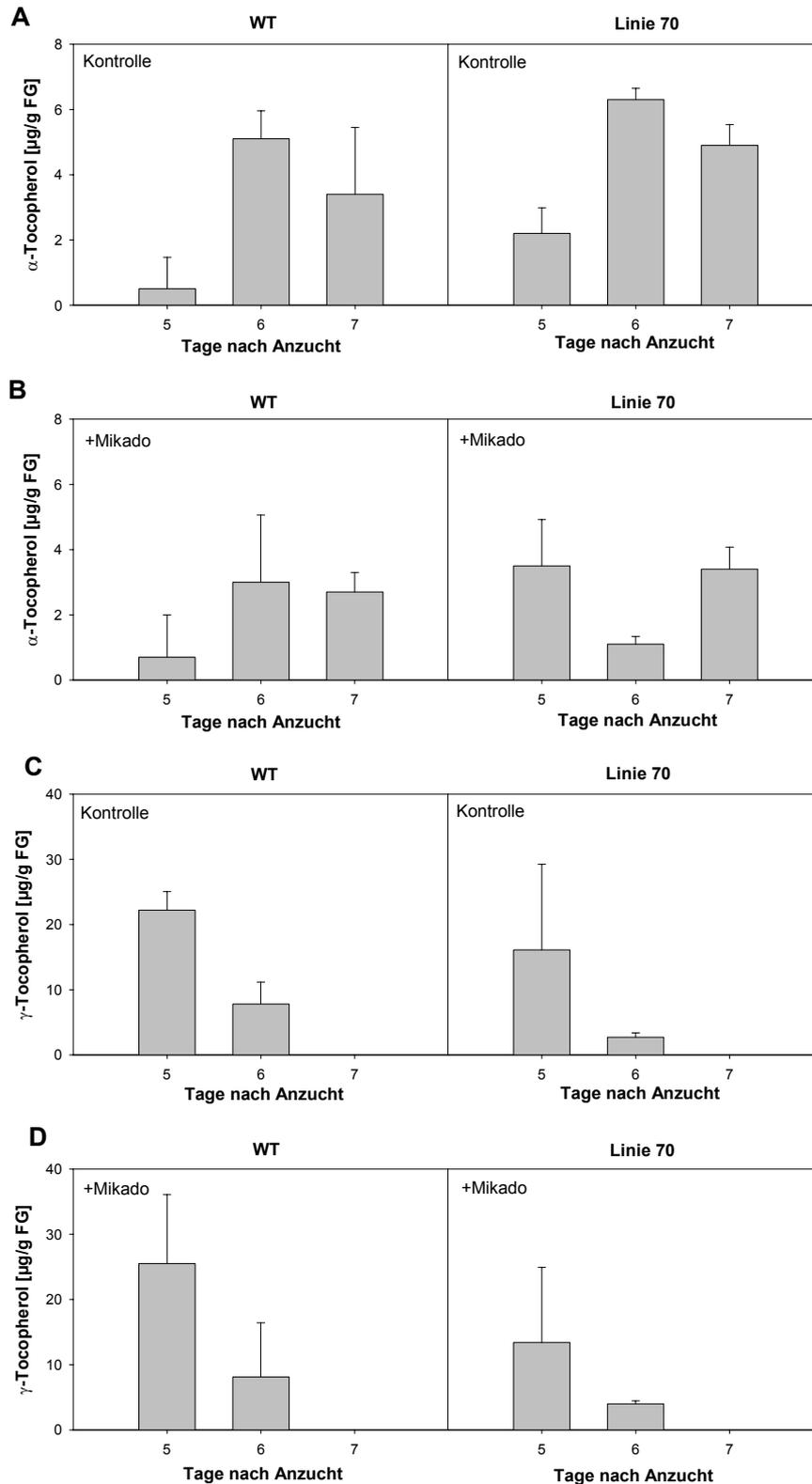
Die untersuchten Entwicklungsstadien sind anhand der in Abb. 3.13 gezeigten mikroskopischen Aufnahmen exemplarisch für die Wildtypkeimlinge dargestellt. Nach 5 Tagen ist der Keimling in der Regel etwa 2 mm lang und nur im Bereich der Keimblätter leicht ergrünt (Abb. 3.13 A). Am 6. Tag sind die Keimblätter deutlich grün gefärbt und das Hypokotyl zunehmend grünlich (Abb. 3.13 B). Die Keimblätter von 7 Tage alten Keimlingen sind in der Regel voll entfaltet und der Keimling durchschnittlich 12 mm lang (Abb. 3.13 C)



**Abb. 3.13:** Mikroskopische Aufnahmen 5 bis 7 Tage alter Wildtyp-Tabakkeimlinge, die unter Schwachlicht in einem Licht/Dunkel Rhythmus von 16/8 Stunden angezogen wurden. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden vom Rest des Samens befreit (A, rechts) und so für die Tocopherol- und Plastochinonbestimmung verwendet. Auch im Fall der 6 Tage alten Keimlinge (B) wurde der Rest des Samens vor der Bestimmung entfernt. 3.13 C zeigt einen Vergleich eines Keimlings der auf MS-Festmedium angezogen wurde (links) mit einem Keimling der auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem ( $1 \mu\text{M}$ ) MS-Festmedium angezogen wurde (rechts).

Die nur auf MS-Festmedium angezogenen Keimlinge der transgenen Linie 70 und des Wildtyps (Abb. 3.14 A) zeigten eine entwicklungsabhängige Zunahme des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes, die im Fall der transgenen Linie 70 etwas höher ausfiel. Gleichzeitig nahm der  $\gamma$ -Tocopherolgehalt entwicklungsabhängig ab (Abb. 3.14 C). In 7 Tage alten Keimlingen war in beiden Fällen kein  $\gamma$ -Tocopherol mehr nachweisbar. Keimlinge, die auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem MS-Festmedium angezogen wurden, wiesen einen etwas niedrigeren  $\alpha$ -Tocopherolgehalt als die Kontrollkeimlinge auf (Abb. 3.14 B). Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen war ein Anstieg des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes hier nicht festzustellen. Demgegenüber war  $\gamma$ -Tocopherol lediglich in 5 Tage und 6 Tage alten Keimlingen detektierbar (Abb. 3.14 D).

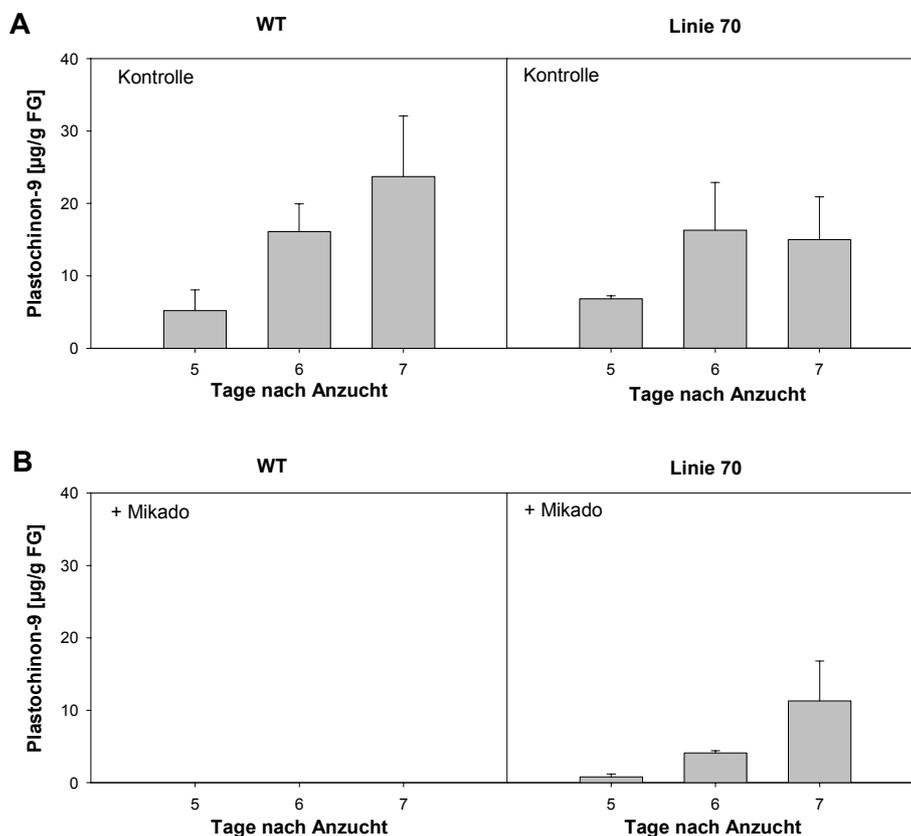
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.14:** Tocopherolgehalte von 5, 6 bzw. 7 Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der transgenen Linie 70. Die Tocopherolgehalte wurden von Keimlingen bestimmt die auf MS-Festmedium (A, C) und auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem (1  $\mu\text{M}$ ) MS-Festmedium (B, D) angezogen wurden. Der Tocopherolgehalt ergab sich aus einer Zweifachbestimmung unter Verwendung von jeweils mindestens 20 Keimlingen. In den Fällen, in denen kein Wert für den Tocopherolgehalt gezeigt ist, war die entsprechende Tocopherolform nicht detektierbar (C, D).

### 3. Ergebnisse

Um zu prüfen, ob im Falle des Wildtyps eine vollständige Blockierung der HPPD vorliegt, wurde ebenfalls der Plastochinon-9-Gehalt von Keimlingen des Wildtyps und der transgenen Linie 70 bestimmt (Abb. 3.15). Der Plastochinon-9-Gehalt der auf MS-Festmedium angezogenen Keimlinge zeigte eine entwicklungsabhängige Akkumulation (Abb. 3.15 A). Im Fall der auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem MS-Festmedium angezogenen Keimlinge des Wildtyps konnte zu keinem Zeitpunkt Plastochinon-9 detektiert werden. Die Keimlinge der transgenen Linie 70 wiesen eine entwicklungsabhängige Zunahme des Plastochinon-9-Gehaltes auf, die jedoch deutlich niedriger ausfiel als in der Kontrolle (Abb. 3.15 A,B). Während die Keimlinge des Wildtyps nach 7 Tagen auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem MS-Medium ausgebleicht waren (Abb. 3.13 C), waren die Keimlinge der Linie 70 ergrünt.



**Abb. 3.15:** Plastochinon-9-Gehalt von 5, 6 bzw. 7 Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der transgenen Linie 70. Die Plastochinon-9-Gehalte wurden von Keimlingen bestimmt die auf MS-Festmedium (A) und auf Mikado<sup>®</sup>-haltigem ( $1 \mu\text{M}$ ) MS-Festmedium (B) angezogen wurden. Der Plastochinon-9-Gehalt ergab sich aus einer Zweifachbestimmung unter Verwendung von jeweils mindestens 20 Keimlingen. In den Fällen, in denen kein Wert für den Plastochinon-9-Gehalt gezeigt ist, war Plastochinon-9 nicht detektierbar (B).

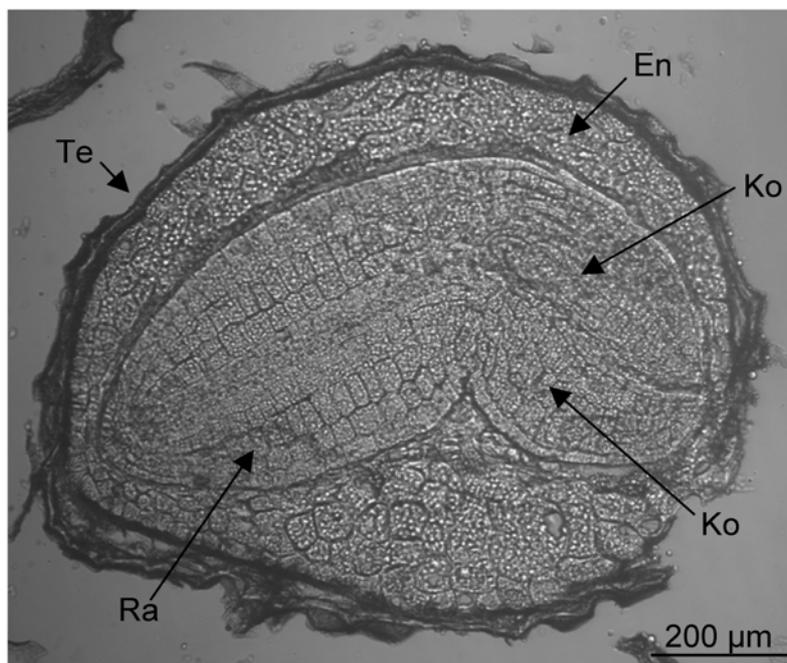
In jungen Keimlingen der transgenen Linie 70 zeigte sich somit ein erhöhter Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol im Vergleich zum Wildtyp, wobei es sich hier vermutlich nicht um eine Neusynthese handelt, da unter Bedingungen, unter denen die HPPD blockiert wird, ebenfalls  $\alpha$ -Tocopherol in den Keimlingen detektiert werden konnte. Demgegenüber scheint Plastochinon nur über eine Neusynthese gebildet zu werden.

#### 3.2.6 Verteilung der Vitamin E-Formen innerhalb der Tabaksamen

Da neben Blättern in der Regel Samen große Mengen Vitamin E enthalten, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob sich eine Veränderung des Vitamin E-Gehaltes in den Samen der transgenen Linien durch die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste ergibt.

Offensichtliche Unterschiede zwischen den Samen der transgenen Linien und denen des Wildtyps waren in Bezug auf das Aussehen, Gewicht (Frisch- sowie Trockengewicht) und Größe nicht erkenn- bzw. messbar.

Generell zählen Tabaksamen zu den Samen, in denen neben dem Embryo das Endosperm als Speichergewebe dient. Das Endosperm, das etwa aus drei bis fünf Zellschichten besteht, umschließt den Embryo und wird nach außen hin durch die Samenschale (Testa) begrenzt. Der Embryo ist aus zwei Kotyledonen sowie der Radikula aufgebaut (Abb. 3.16).

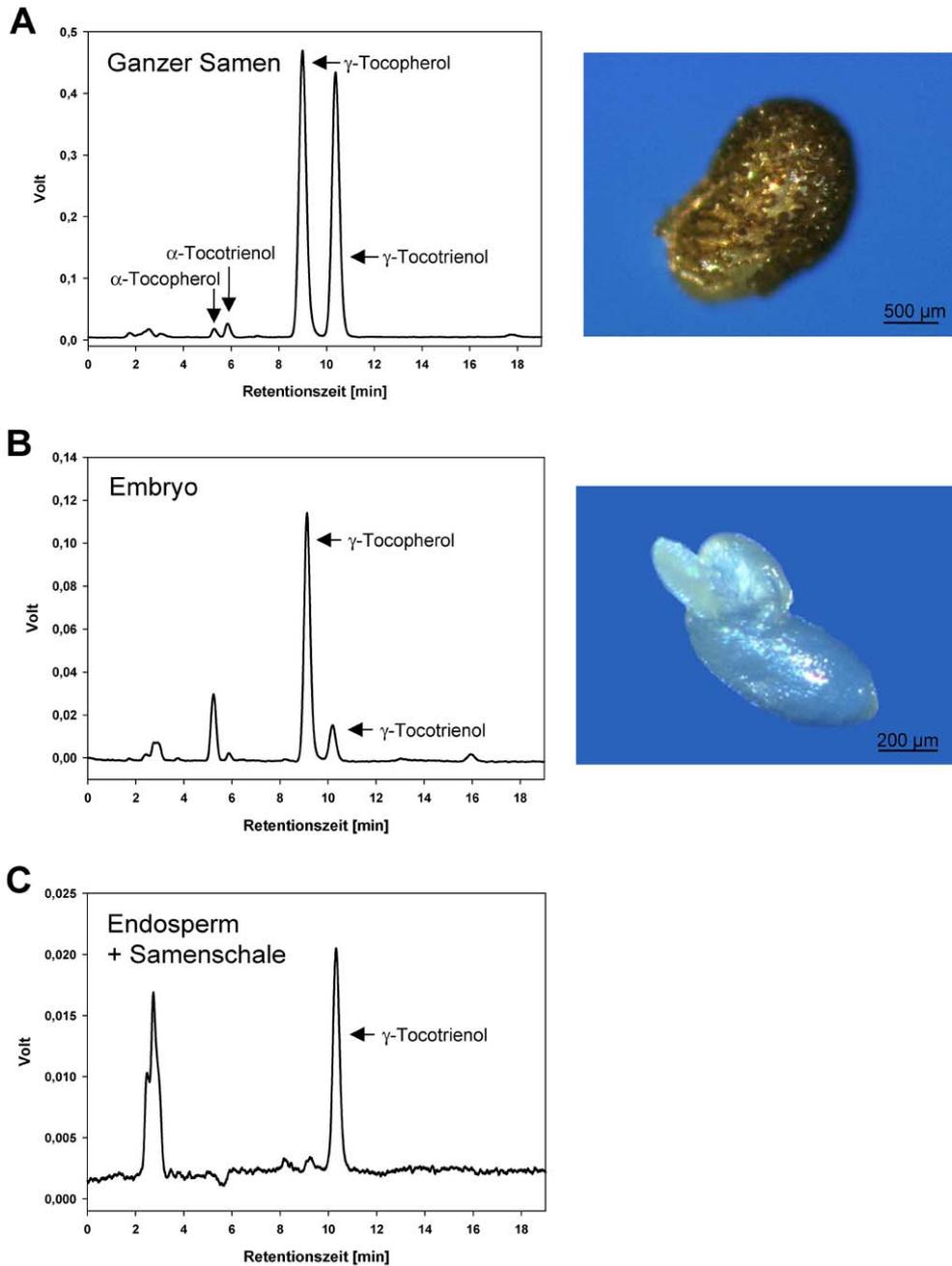


**Abb. 3.16:** Mikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch einen Tabaksamen cv. Xanthi. Testa (Te), Endosperm (En), Kotyledonen (Ko), Radikula (Ra). Für Details siehe 2.10

Zunächst wurden Tabaksamen der Wildtyppflanzen per Hand in die zwei Fraktionen, Embryo und Endosperm+Samenschale, aufgetrennt und ihre Vitamin E-Zusammensetzung bestimmt (siehe 2.3.2). Aus Gründen der leichteren Trennbarkeit dieser Fraktionen wurden hierfür Samen verwendet, die vorher 48 h lang bei Raumtemperatur auf MS-Festmedium (siehe 2.2.2) vorgequollen wurden.

Die Vitamin E-Zusammensetzung der untersuchten Tabaksamen unterscheidet sich insofern von der der Tabakblätter, als dass die hier vorherrschenden Vitamin E-Formen  $\gamma$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocotrienol sind (Abb. 3.17 A). Beide Formen wurden in vergleichbarer Menge im Samen des Tabakkultivars Xanthi gefunden. Ebenfalls waren in sehr geringen Mengen sowohl  $\alpha$ -Tocopherol als auch  $\alpha$ -Tocotrienol in den untersuchten Tabaksamen detektierbar. Aus Abb. 3.17 B geht deutlich hervor, dass  $\gamma$ -Tocopherol im Embryo des Tabaksamens lokalisiert ist. Es wurden auch geringe Mengen  $\gamma$ -Tocotrienol detektiert. Diese werden allerdings auf eine Verunreinigung des Embryos mit Endospermgewebe zurückgeführt, die bei dieser Präparation nicht ausgeschlossen werden kann. Demgegenüber war die einzige in der aus Endosperm und Samenschale der Tabaksamen detektierbare Vitamin E-Form  $\gamma$ -Tocotrienol.

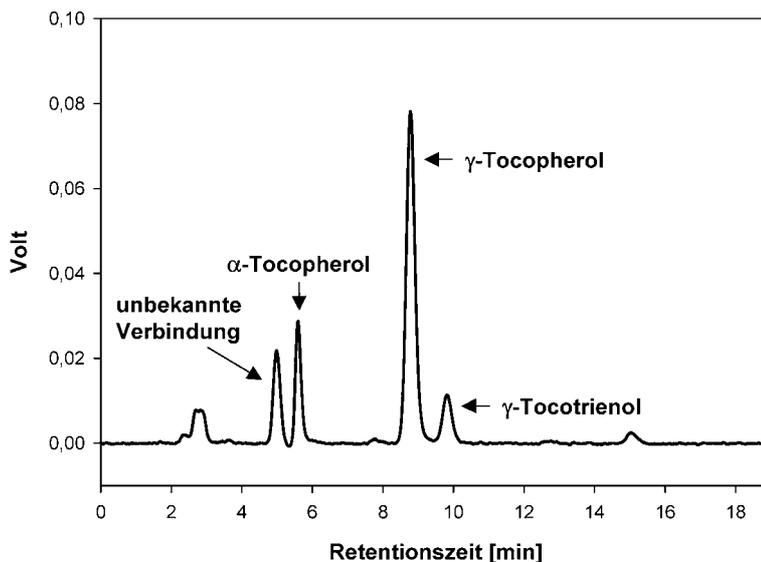
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.17:** Vitamin E-Zusammensetzung von Tabaksamen cv. Xanthi. (A) zeigt die Zusammensetzung des ganzen Samens, (B) die Zusammensetzung des Embryos und (C) die Zusammensetzung von Endosperm + Samenschale. Zur Verdeutlichung wurden mikroskopische Aufnahmen des ganzen Samens und des Embryos neben den gezeigten HPLC-Chromatogrammen abgebildet. Die *Peaks* wurden durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Standardsubstanzen den einzelnen Vitamin E-Formen zugeordnet.

Im abgebildeten Chromatogramm des Extraktes von Embryogewebe befindet sich bei einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten ein *Peak*, der als  $\alpha$ -Tocopherol interpretiert werden könnte (Abb. 3.17 B). Durch eine Aufstockung mit einer  $\alpha$ -Tocopherol-Standardlösung konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass es sich

bei diesem *Peak* nicht um  $\alpha$ -Tocopherol handelt (Abb. 3.18). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht, welche Verbindung hier detektiert wurde. Entsprechende Analysen, beispielsweise mittels Massenspektroskopie, sollten es aber zukünftig ermöglichen, Aussagen über diese unbekannte Verbindung machen zu können.



**Abb. 3.18:** Vitamin E-Zusammensetzung von Embryogewebe aus Tabaksamen, cv. Xanthi. Dem Heptanextrakt wurde eine  $\alpha$ -Tocopherol-Standardlösung zugegeben. Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC.

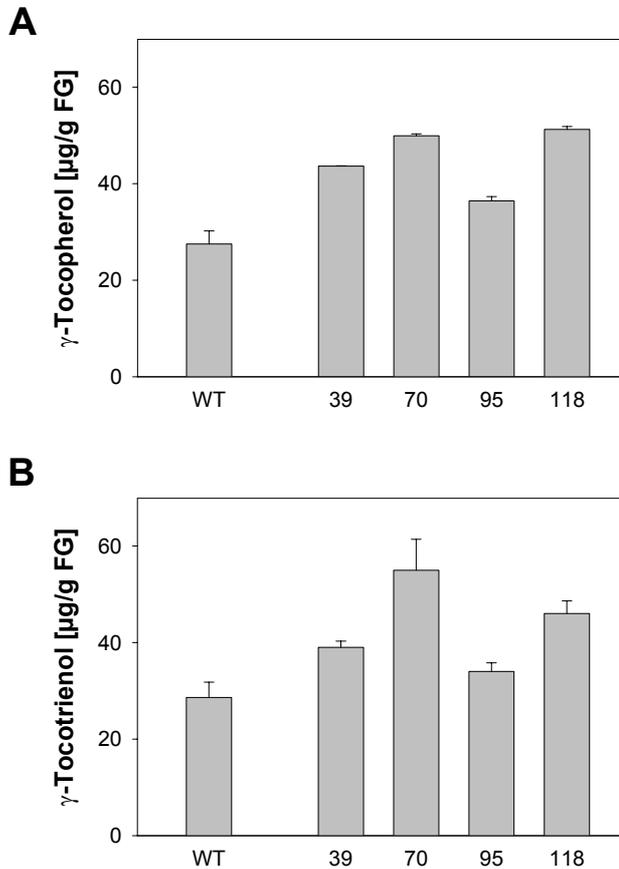
Aus den beschriebenen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass eine gewebespezifische Verteilung des im Tabaksamen vorkommenden Vitamins E vorliegt.

#### 3.2.7 Untersuchungen des Vitamin E-Gehaltes von Tabaksamen

Um zu überprüfen, ob sich die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in Samen der transgenen Tabaklinien auf den Vitamin E-Gehalt auswirkt, wurden die Samen bezüglich ihrer Vitamin E-Gehalte mittels HPLC analysiert (siehe 2.3.2).

In Bezug auf die Menge des Vitamins E unterscheiden sich die Samen der transgenen Linien deutlich von denen des Wildtyps (Abb. 3.19 A,B). So konnte im Fall der Linien 70 und 118 ein um den Faktor zwei erhöhter Vitamin E-Gehalt gemessen werden. Die Vitamin E Gehalte der Linien 39 und 95 sind zwar niedriger als die der Linien 70 und 118, jedoch deutlich höher als im Wildtypsamen. Ein Unterschied in der Zusammensetzung des Vitamins E zwischen den Samen der

transgenen Linien und denen des Wildtyps konnte nicht beobachtet werden. Die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in den Samen der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp betrifft beide Vitamin E-Formen gleichermaßen.



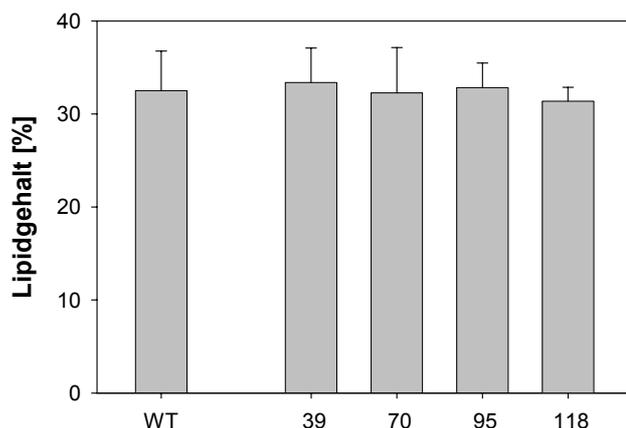
**Abb. 3.19:** Vitamin E-Gehalte von Tabaksamen des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Bestimmung des  $\gamma$ -Tocopherolgehaltes (A) bzw. des  $\gamma$ -Tocotrienolgehaltes (B) erfolgte mittels HPLC durch eine Dreifachbestimmung von Samen jeweils dreier Pflanzen.

Im Unterschied zu dem untersuchten Blattgewebe, führt eine Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in den Samen der transgenen Linien zu einer verstärkten Vitamin E-Akkumulation.

### 3.2.8 Untersuchung des Lipidgehaltes und der Lipidzusammensetzung von Tabaksamen

Vitamin E gehört zu den lipophilen Antioxidantien und wird sich daher in einer vorwiegend hydrophoben Umgebung aufhalten. Eine verstärkte Einlagerung von Vitamin E im Samen der transgenen Tabaklinien könnte mit einer erhöhten Menge an Lipiden einhergehen. Es war also von Interesse zu untersuchen, ob die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in den Samen der transgenen Tabaklinien zu einer Erhöhung des Lipidgehaltes bzw. einer Veränderung der Lipidzusammensetzung führt.

Es wurden zunächst die Lipide aus den Samen der Wildtyppflanzen und denen der transgenen Linien extrahiert und ihr Anteil am Trockengewicht gravimetrisch bestimmt (siehe 2.3.4 und 2.3.5).



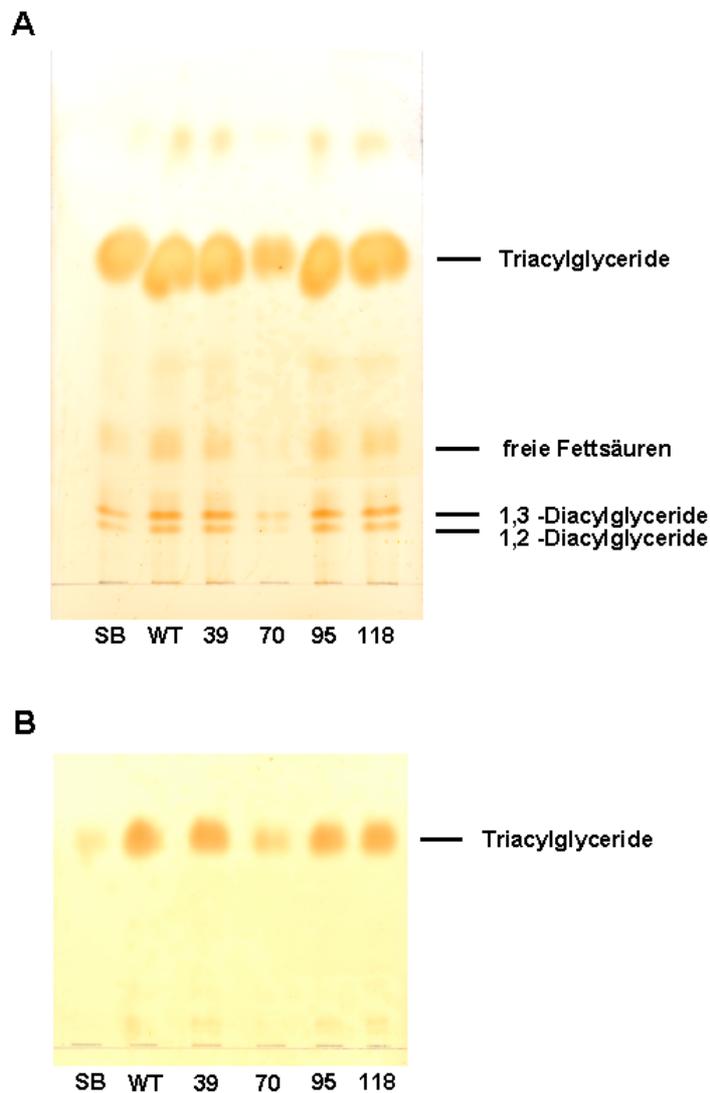
**Abb. 3.20:** Anteil des Gesamtlipides am Trockengewicht von Samen des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Lipidgehalte wurden durch insgesamt sieben Bestimmungen unter Verwendung von jeweils mindestens zwei Pflanzen ermittelt. Der Wassergehalt der Tabaksamen des Wildtyps und der transgenen Linien lag bei durchschnittlich 5%.

Der Anteil des Gesamtlipides am Trockengewicht der untersuchten Tabaksamen lag für alle untersuchten Samen zwischen 30 – 35% (Abb. 3.20). Ein Unterschied bezüglich der Lipidgehalte der Samen der transgenen Tabaklinien im Vergleich zum Wildtyp war somit nicht nachweisbar.

Um die Lipidzusammensetzung der Speicherlipide vergleichen zu können, wurden die aus den Tabaksamen extrahierten Lipide in Dichlormethan aufgenommen und dünnschichtchromatographisch untersucht (siehe 2.3.6). Als Referenz diente hierbei handelsübliches Sonnenblumenöl (Abb. 3.21). Erwartungsgemäß bestand der größte

### 3. Ergebnisse

Teil der Speicherlipide in Tabaksamen aus Triacylglyceriden. Des weiteren konnten 1,2- sowie 1,3-Diacylglyceride und freie Fettsäuren detektiert werden (Abb. 3.21 A). Da die erste DC-Platte im Hinblick auf die Triacylglyceride stark überladen war, wurde in einem weiteren Ansatz weniger Lipidlösung auf die Kieselgelplatte aufgetragen, um eine bessere quantitative Abschätzung treffen zu können (Abb. 3.21 B). Vergleicht man die *Spots* der Lipide aus den Wildtypsamen mit denen der Lipide aus den Samen der transgenen Linien beider Chromatogramme, so zeigen sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Lipide.



**Abb. 3.21:** Zusammensetzung der Lipide aus Tabaksamen des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Lipide wurden aus Samengewebe extrahiert, in Dichlormethan aufgenommen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Iod-Dampf. SB (Sonnenblumenöl).

Die Kapazität der Tabaksamen der transgenen Linien, vermehrt Vitamin E einzulagern, scheint in Anbetracht dieser Ergebnisse ausreichend zu sein. Weiterhin hat die erhöhte Menge an Vitamin E in den Samen der transgenen Linien keinen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung. Somit scheint eine spezifische Assoziation von Vitamin E mit bestimmten Lipiden nicht vorzuliegen.

#### **3.2.9 Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung von Tabaksamen**

Es ist bekannt, dass Vitamin E Membranen vor Lipidperoxidation schützt, indem es die bei der Autoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren gebildeten Lipidperoxyradikale abfängt (Fryer 1992). Es gibt Hinweise darauf, dass Vitamin E innerhalb von Membranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren assoziiert ist (Gomez-Fernandez et al. 1989). Um zu überprüfen, ob der gegenüber den Samen des Wildtyps erhöhte Vitamin E-Gehalt der Samen der transgenen Tabaklinien eine Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung zur Folge hat, wurde diese mittels Gaschromatographie bestimmt (siehe 2.3.7).

Den größten Anteil am Gesamtfettsäuregehalt hatte mit etwa 71% die Linolsäure (C 18:2). Die zweithäufigste Fettsäure in den untersuchten Tabaksamen war mit einem Anteil von etwa 13% Ölsäure (C 18:1). Palmitinsäure (C 16:0) stellte mit einem Anteil von etwa 11% die dritthäufigste Fettsäure in den Tabaksamen dar. Alle weiteren vorkommenden Fettsäuren trugen lediglich mit einem Anteil von unter 5% zum Gesamtfettsäuregehalt bei (Tab. 3.1).

### 3. Ergebnisse

**Tab. 3.1:** Fettsäurezusammensetzung der Tabaksamen des Wildtyps, cv. Xanthi, und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Fettsäurezusammensetzung ist als prozentualer Anteil am Gesamtfettsäuregehalt angegeben. Die Werte ergaben sich aus einer Dreifachbestimmung.

<sup>a</sup>: Standardabweichung liegt unter 0,04%

	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1
WT	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,6	3,0 ± 0,1	12,9 ± 1,1	71,7 ± 1,6	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,1
39	0,4 ± 0,1	10,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1	13,9 ± 1,5	70,6 ± 1,7	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
70	0,3 ± 0,1	10,6 ± 0,3	3,1 ± 0,1	13,4 ± 0,5	71,2 ± 0,9	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
95	0,2 ± 0,2	10,5 ± 0,4	3,0 ± 0,2	12,9 ± 0,8	71,9 ± 0,7	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
118	0,4 ± 0,1	10,2 ± 0,4	3,0 ± 0,1	14,6 ± 2,1	70,2 ± 2,5	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>

Die Fettsäurezusammensetzung der transgenen Samen unterscheidet sich nicht von der der Wildtypsamen, weswegen eine direkte Korrelation zwischen dem Gehalt an Vitamin E und dem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren unwahrscheinlich erscheint.

#### 3.2.10 Untersuchung der Vitamin E-Gehalte und –Zusammensetzung von Antheren der Tabaklinien

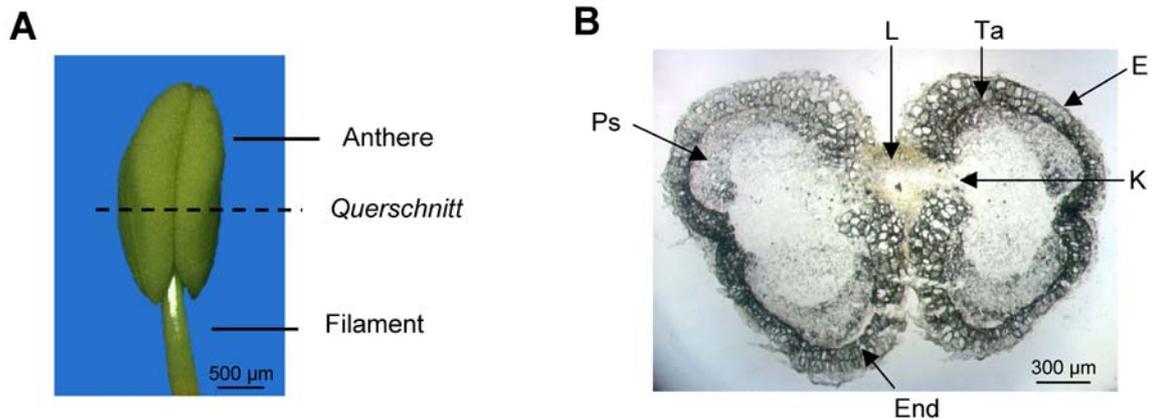
Vitamin E ist in Plastiden lokalisiert (Soll et al. 1985). Eine besondere Form von Speicherplastiden, die Elaioplasten, findet sich im Tapetum der Antheren. Es wurde daher zum einen untersucht, ob sich in dieser speziellen Plastidenform Tocopherole nachweisen lassen. Zum anderen war zu prüfen, ob die transgenen Linien möglicherweise einen erhöhten Gehalt an Vitamin E in den Antheren aufweisen.

Die Blütenentwicklung verschiedener Tabakkultivare lässt sich in neunzehn Stadien unterteilen (Koltunow et al. 1990), wobei die Stadien –7 bis –1 zeitlich vor der Meiose der Pollenmutterzellen liegen und das Stadium 1 als das Stadium definiert wurde, in dem die Meiose abgeschlossen ist. Zu diesem Zeitpunkt sind die Antheren voll differenziert und grün, sie besitzen eine Länge von etwa 0,2 cm und die gesamte Blüte eine Länge von etwa 0,8 cm. Legt man diese Kriterien zugrunde, befanden sich

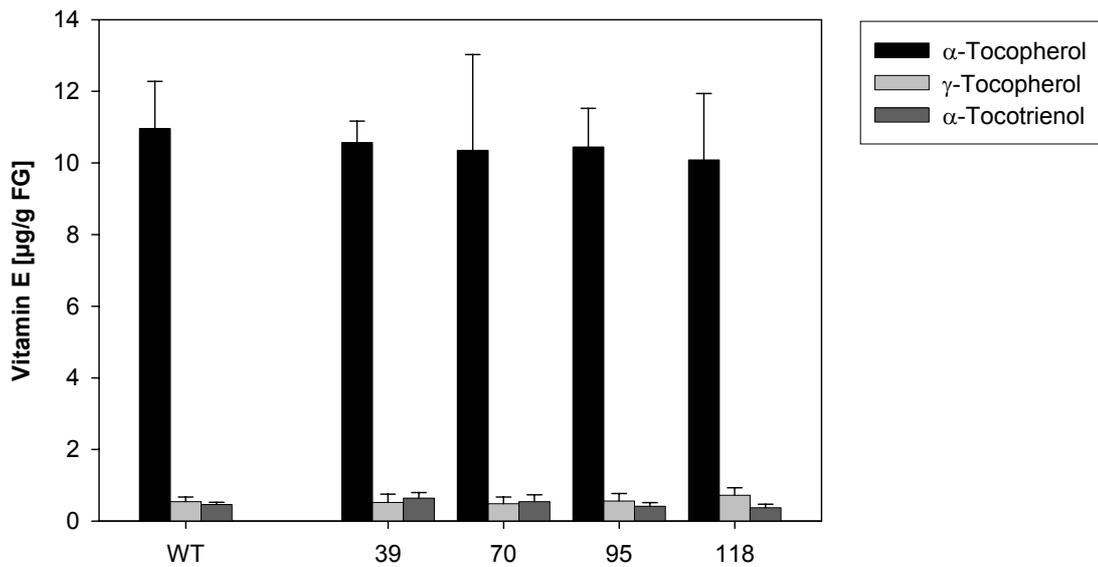
die im Rahmen dieser Untersuchung verwandten Antheren im Stadium -1 – 2 der Blütenentwicklung. Des weiteren wurden Querschnitte der Antheren angefertigt (siehe 2.9.1 und 2.9.2) und mit denen von Koltunow et al. (1990) verglichen.

Die Antheren sind der obere Teil der Staubblätter, der aus zwei Theken, den Antherenhälften (Abb. 3.22 A), zu je zwei Pollensäcken (Sporangien) besteht, in denen der Blütenstaub (Pollen) erzeugt wird. Die beiden Theken sind durch das Konnektiv miteinander verbunden (Abb. 3.22 B).

Der Querschnitt durch eine Anthere zeigt, dass deren Wand aus der Epidermis, dem Endothecium und dem einschichtigen Tapetum besteht (Abb. 3.22 B).



**Abb. 3.22:** Antheren von Tabakblüten cv. Xanthi. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Staubblattes bestehend aus dem Filament und den Theken. In (B) ist ein Querschnitt durch eine Anthere gezeigt. Pollensack (Ps), Epidermis (E), Endothecium (End), Leitbündel (L), Konnektiv (K), Tapetum (Ta).



**Abb. 3.23:** Vitamin E-Gehalt und –Zusammensetzung der Antheren des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung von Antheren von jeweils mindestens drei Pflanzen. Im Falle der Linien 39, 70 und 118 wurden Antheren von Pflanzen der T4-Generation, im Falle der Linie 95 der T3-Generation verwendet.

In den Antheren von Tabak, cv. Xanthi, konnte neben  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol auch  $\alpha$ -Tocotrienol (Abb. 3.23) detektiert werden. Die jeweiligen  $\alpha$ -Tocotrienol-Gehalte entsprachen, bezogen auf das Frischgewicht der Antheren, etwa den  $\gamma$ -Tocopherol-Gehalten. Die Antheren der transgenen Linien unterschieden sich sowohl im Hinblick auf die Vitamin E-Zusammensetzung als auch auf die jeweiligen Gehalte jedoch nicht von denen des Wildtyps.

### **3.3 Untersuchungen zur Stressresistenz der transgenen Tabaklinien**

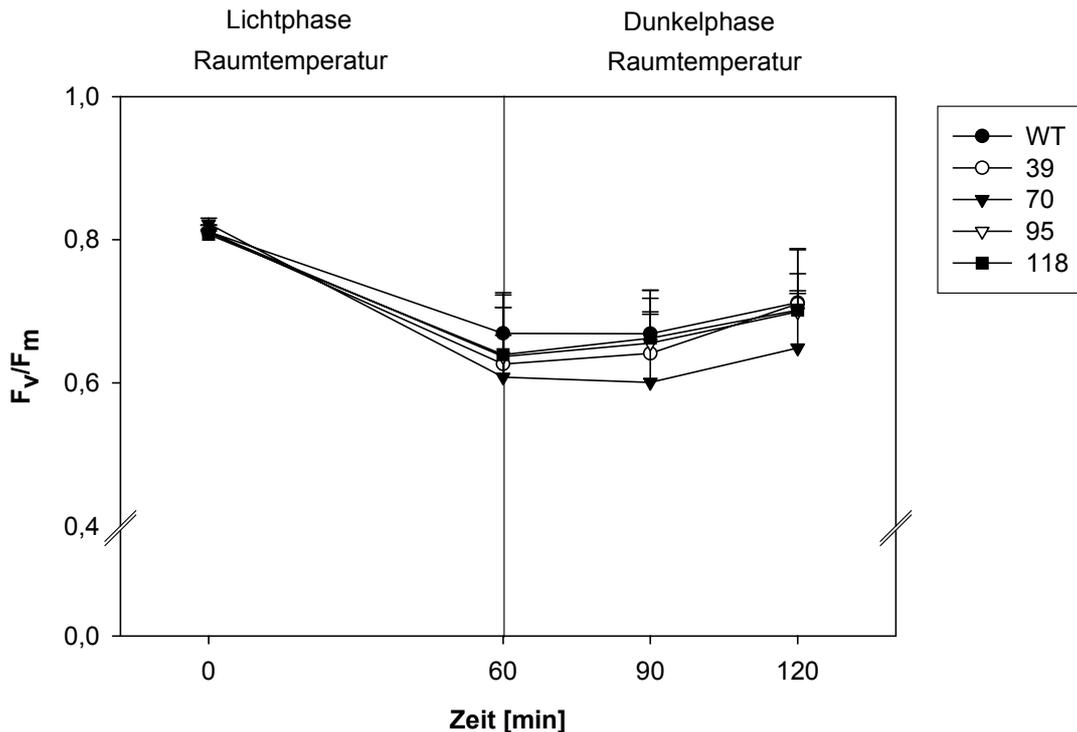
Nachdem im zweiten Ergebnisteil der Einfluss der Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in den transgenen Tabakpflanzen auf den Vitamin E- und den Plastochinon-9-Gehalt untersucht wurde, sollte im dritten Teil geprüft werden, ob sich durch die Überexpression ein verändertes Verhalten der transgenen Linien gegenüber verschiedenen Stresssituationen ergibt.

Die Überexpression des *hpd*-Gens in den transgenen Tabakpflanzen könnte es ermöglichen, dass in Situationen mit vermehrter ROS-Bildung mehr Vitamin E gebildet werden kann als in den entsprechenden Wildtyppflanzen. Dies könnte wiederum zu einer erhöhten Stressresistenz der transgenen Pflanzen führen.

#### **3.3.1 Untersuchung des Einflusses von Starklicht auf Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps**

Um zu untersuchen, ob unter Bedingungen einer Photoinhibition von Photosystem II eine vermehrte Synthese von Tocopherolen in den transgenen Pflanzen stattfindet und ob dies zu einem besseren Schutz des Photosystems führt, wurden Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps bei Raumtemperatur für eine Stunde einer Bestrahlungsstärke (PPFD) von  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt und die maximale Effizienz von Photosystem II (siehe 2.3.8) vor, direkt nach Einwirken des Starklichts und nach einer 1-stündigen Erholungsphase im Dunkeln bestimmt (Abb. 3.24).

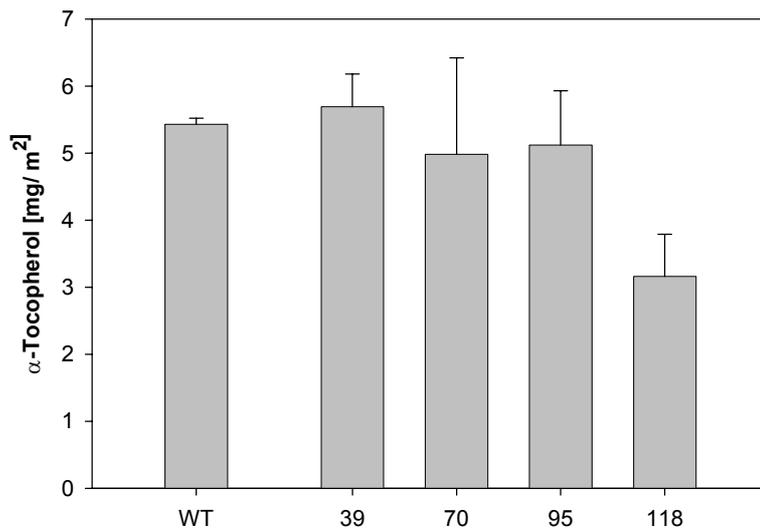
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.24:** Maximale Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) in Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 in Abhängigkeit von der Zeit während einstündiger Starklichtbedingungen und einer einstündigen Erholungsphase im Dunkeln. Die Bestrahlungsstärke betrug  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Während der Erholungsphase befanden sich die Blattscheiben im Dunkeln.  $F_v/F_m$  wurde zum Zeitpunkt 60 min. nach einer 10minütigen Dunkelphase bei Raumtemperatur bestimmt. Die Bestimmung erfolgte an Blattscheiben von jeweils drei Pflanzen.

Die maximale Effizienz von Photosystem II war direkt nach Einwirken des Starklichts um etwa 20% gesunken und stieg während einer einstündigen Erholungsphase im Dunkeln wieder an. Allerdings unterschied sich die maximale Effizienz von Photosystem II der untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien nicht von der des Wildtyps. So waren weder direkt nach der Behandlung mit Starklicht noch nach der Erholung im Anschluss deutliche Unterschiede feststellbar.

Der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt in den Blattscheiben der transgenen Pflanzen war nach der einstündigen Erholungsphase gegenüber dem Wildtyp nicht erhöht (Abb. 3.25). Die Linie 118 zeigte sogar einen deutlich geringeren Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol. Die untersuchten Blattscheiben der anderen drei transgenen Linien wiesen einen vergleichbaren Tocopherolgehalt wie die des Wildtyps auf.



**Abb. 3.25:**  $\alpha$ -Tocopherolgehalt von Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 nach einer einstündigen Belichtung mit  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer anschließenden einstündigen Erholungsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Bestimmung erfolgte an Blattscheiben von jeweils drei Pflanzen.

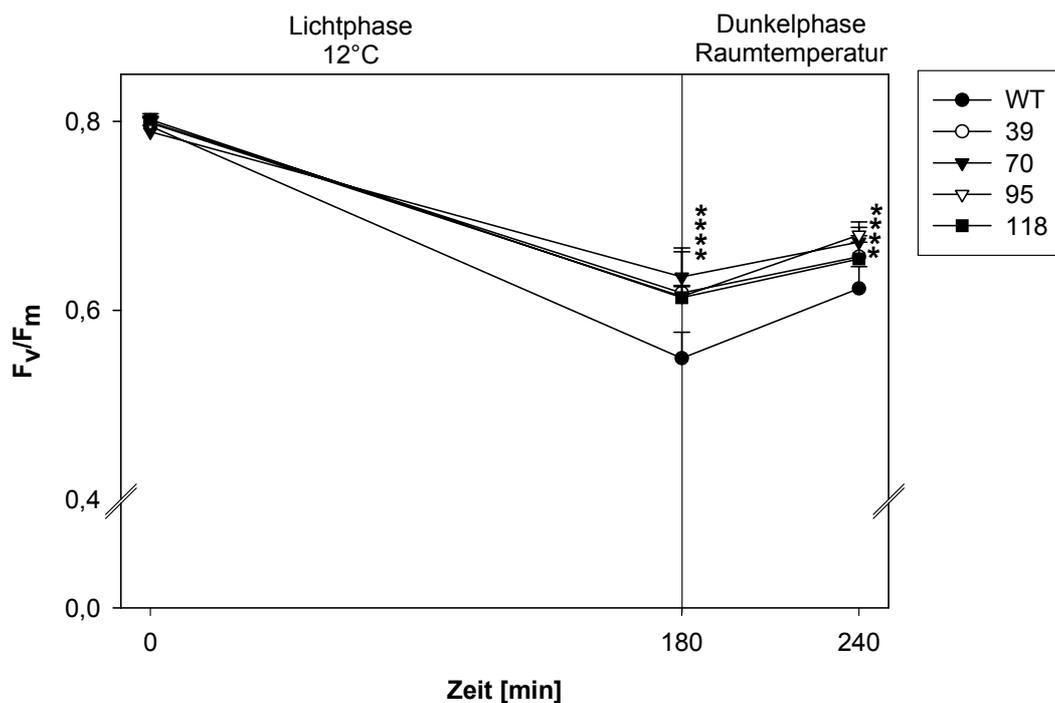
Die Blattscheiben der transgenen Linien zeigten unter den gewählten Bedingungen somit keinen besseren Schutz des Photosystems II im Vergleich zum Wildtyp. Auch der Tocopherolgehalt war in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien nach der Belichtung und einer Erholungsphase nicht höher als in den verwendeten Blattscheiben des Wildtyps. Die Ergebnisse geben somit keinen Hinweis auf eine erhöhte Toleranz der transgenen Linien gegenüber hohen Bestrahlungsstärken bei Raumtemperatur.

#### **3.3.2 Untersuchung des Einflusses der Kombination von Kühle und Licht auf Blattscheiben der transgenen Linien**

Verschiedene physiologische Vorgänge sind ungleich temperaturempfindlich. So werden die enzymatischen Prozesse der Photosynthese schon sehr schnell beeinträchtigt. Dagegen sind rein photochemische Prozesse nur in sehr geringem Maße von der Temperatur abhängig. In der Folge kommt es bei niedrigen Temperaturen bei gleichzeitiger Lichteinstrahlung zu einem Ungleichgewicht zwischen photochemischen und enzymatischen Reaktionen. Um zu untersuchen, ob während der Behandlung mit niedrigen Temperaturen und gleichzeitiger Lichteinstrahlung eine erhöhte Tocopherolsynthese in Blättern der transgenen Linien

auftritt, wurden Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber den Bedingungen von Kühle und Licht untersucht (siehe 2.4). Da Tabak eine an wärmeres Klima angepasste Pflanze ist, sind Effekte in Bezug auf Kühlestress schon bei relativ hohen Temperaturen von 12°C zu erwarten. Da niedrige Temperaturen Lichtstress noch verstärken können, wurde im Rahmen dieses Experimentes eine Bestrahlungsstärke von  $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  statt  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (siehe 3.3.1) gewählt.

Zu Beginn des Versuchs waren die maximalen Effizienzen von Photosystem II in den Blattscheiben der transgenen Linien und denen des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3.26). Nach 3 Stunden bei 12°C und einer Bestrahlungsstärke von  $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war die maximale Effizienz von Photosystem II in den Blattscheiben aller transgenen Linien signifikant höher als in den Blattscheiben des Wildtyps.

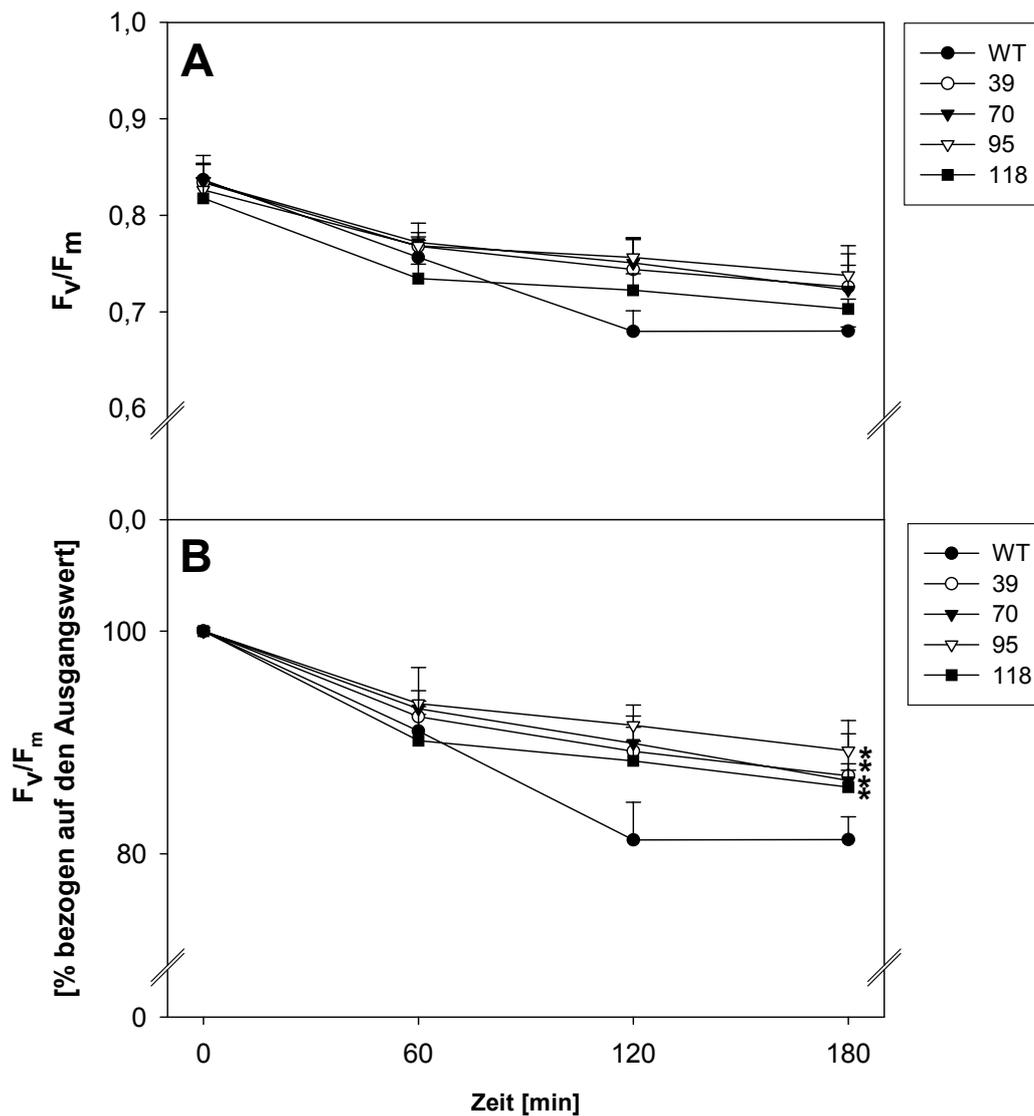


**Abb. 3.26:** Einfluss von Kühle und Licht auf die maximale Effizienz von Photosystem II ( $F_v/F_m$ ) in Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 in Abhängigkeit von der Zeit während einer dreistündigen Behandlung mit Kühle (12°C) und einer gleichzeitig eingestrahelten Bestrahlungsstärke von  $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sowie einer einstündigen Erholungsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur.  $F_v/F_m$  zum Zeitpunkt 180 min. wurde nach einer 10minütigen Dunkelphase bestimmt. Die Bestimmung erfolgte an Blattscheiben von jeweils drei Pflanzen. Die untersuchten Blattscheiben stammten von Pflanzen, die unter Schwachlicht ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ )

Auch nach einer einstündigen Erholungsphase wiesen die Blattscheiben aller transgenen Linien einen im Vergleich zum Wildtyp signifikant höheren Wert für  $F_v/F_m$  auf.

Tjus et al. (2001) konnten zeigen, dass unter Kühlestressbedingungen die am Photosystem I gebildeten Sauerstoffradikale zum Photosystem II diffundieren und dort zu Schädigungen führen können. Über eine Verteilung der Tocopherole innerhalb der Thylakoidmembranen ist nichts bekannt, und auch ein schützender Einfluss auf das Photosystem I wurde bisher nicht beschrieben. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, ob ebenfalls ein positiver Effekt auf die Effizienz von Photosystem I unter den gewählten Bedingungen zu verzeichnen ist. Eine Photoinhibition am Photosystem I wurde aber bisher nur unter Schwachlichtbedingungen beschrieben. Daher wurde in einem erneuten Ansatz die Bestrahlungsstärke auf  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verringert, die gewählte Temperatur ( $12^\circ\text{C}$ ) sowie die Dauer der Behandlung (3 Stunden) blieben unverändert. Um den in Abb. 3.26 gezeigten Effekt zu bestätigen, wurde auch hier zunächst die maximale Effizienz von Photosystem II (siehe 2.3.8) in den untersuchten Blattscheiben bestimmt (Abb. 3.27).

### 3. Ergebnisse

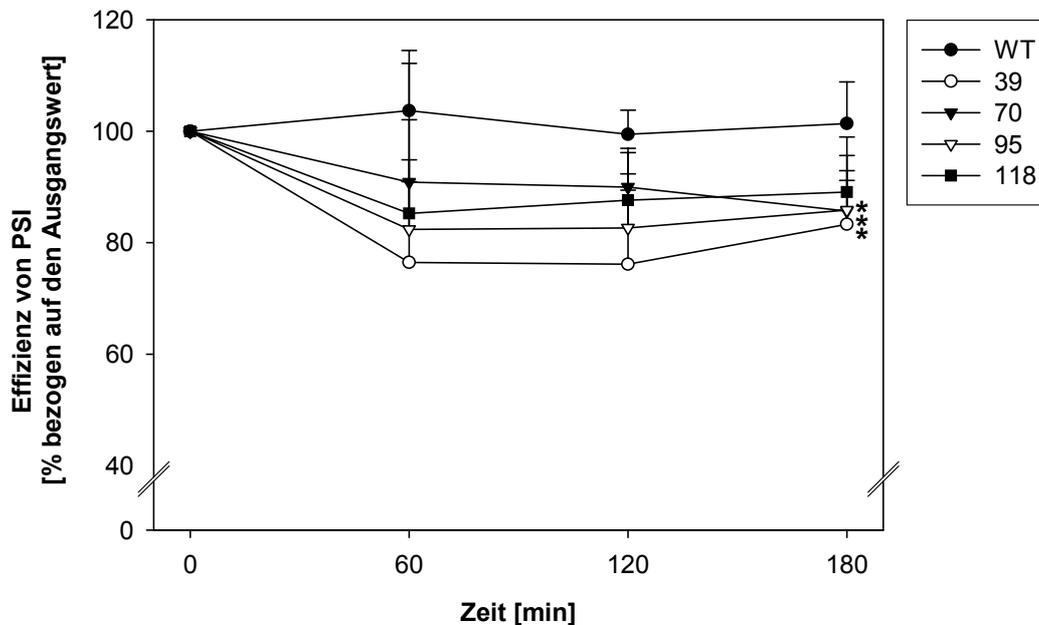


**Abb. 3.27:** Einfluss von Kühle und moderater Bestrahlungsstärke auf die maximale Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) von Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 in Abhängigkeit der Zeit während dreistündiger Behandlung mit Kühle ( $12^\circ\text{C}$ ) und einer gleichzeitig eingestrahlichten PPFD von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) zeigt die bestimmten Werte für  $F_v/F_m$ , während in (B) die nach dem Stress gemessenen Werte auf den jeweiligen Ausgangswert bezogen wurden.  $F_v/F_m$  wurde während der Stressphase jeweils nach einer 10minütigen Dunkelphase bestimmt. Die Mittelwerte zum Zeitpunkt 60 Minuten ergaben sich aus einer jeweils voneinander unabhängigen Doppelbestimmung, die Mittelwerte zum Zeitpunkt 120 Minuten aus einer jeweils voneinander unabhängigen Dreifachbestimmung und die Mittelwerte zum Zeitpunkt 180 Minuten aus einer jeweils voneinander unabhängigen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken zum Zeitpunkt 60 Minuten zeigen die Abweichung der Einzelwerte. Eine Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde lediglich mit den prozentualen Werten zum Zeitpunkt 180 Minuten durchgeführt. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

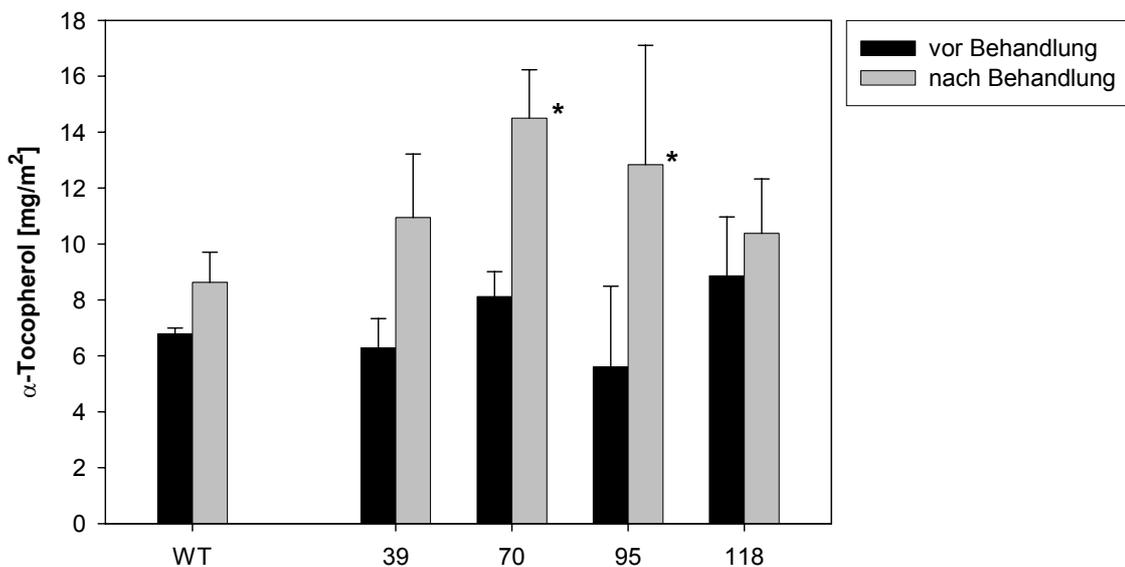
Auch unter den Bedingungen der verringerten Bestrahlungsstärke war die maximale Effizienz von Photosystem II in den untersuchten Blattscheiben des Wildtyps niedriger als in den Blattscheiben der transgenen Linien. Der Unterschied ist deutlicher zu erkennen, wenn die unter den Stressbedingungen gemessenen maximalen Effizienzen von Photosystem II auf den jeweiligen Ausgangswert bezogen werden (Abb. 3.27 B).

Die Untersuchung der Effizienz von Photosystem I, gemessen als Oxidierbarkeit von P700 (siehe 2.3.9), ergab eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Effizienz von Photosystem I in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien (Abb. 3.28). Allerdings wiesen hier lediglich die transgenen Linien 39, 70 und 95 statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf.



**Abb. 3.28:** Einfluss von Kühle und Licht auf die Effizienz von Photosystem I in Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118. Die Effizienz von Photosystem I ist in Prozent bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert in Abhängigkeit der Zeit während einer dreistündigen Stressphase durch niedrige Temperaturen ( $12^{\circ}\text{C}$ ) und einer PPF von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angegeben. Die Mittelwerte zum Zeitpunkt 60 Minuten ergaben sich aus einer jeweils voneinander unabhängigen Doppelbestimmung, die Mittelwerte zum Zeitpunkt 120 Minuten aus einer jeweils voneinander unabhängigen Dreifachbestimmung und zum Zeitpunkt 180 Minuten aus einer jeweils voneinander unabhängigen Vierfachbestimmung. Die Fehlerbalken zum Zeitpunkt 60 Minuten zeigen die Abweichung der Einzelwerte. Eine Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde lediglich mit den Werten zum Zeitpunkt 180 Minuten durchgeführt. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ ).

Im Anschluss war es nun wichtig, zu prüfen, ob die gemessenen Unterschiede in den Effizienzen von Photosystem II und Photosystem I auf einen erhöhten Vitamin E-Gehalt in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien zurückgeführt werden können. Daher wurden in einem erneuten Experiment Blattscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps für 3 Stunden bei 12°C und einer PPFD von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert und vor sowie nach der Behandlung bezüglich ihrer Tocopherolgehalte analysiert (Abb. 3.29).

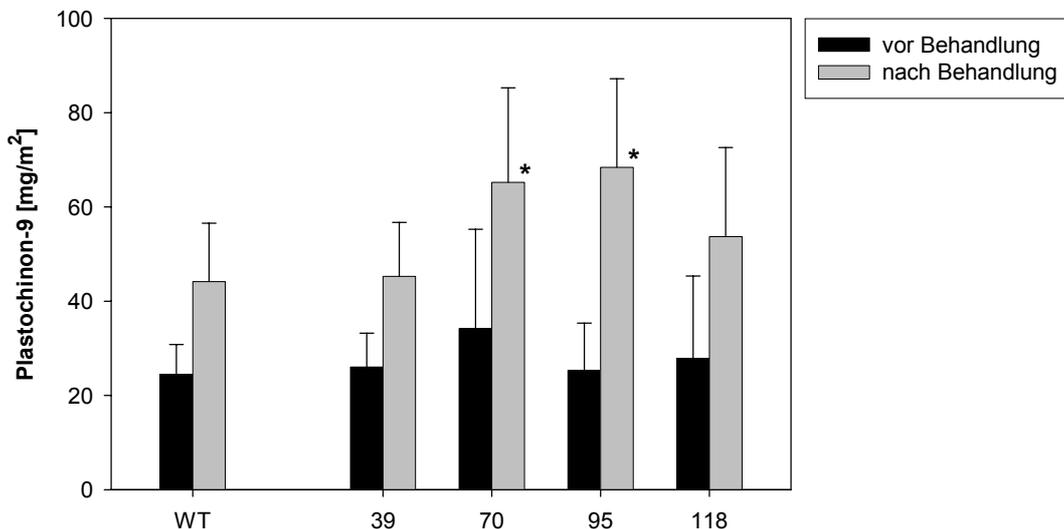


**Abb. 3.29:** Einfluss von Kühle und Licht auf den  $\alpha$ -Tocopherolgehalt von Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 vor und nach einer dreistündigen Behandlung mit niedrigen Temperaturen (12°C) und einer Bestrahlungsstärke von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Bestimmung erfolgte an Blattscheiben von jeweils mindestens vier Pflanzen. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ ).

Vor der Behandlung wiesen die untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien und die des Wildtyps vergleichbare  $\alpha$ -Tocopherolgehalte auf (Abb. 3.29).  $\gamma$ -Tocopherol war in den Blattscheiben aller Linien nur teilweise detektierbar und ist daher hier nicht aufgeführt. Nach der Behandlung war der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt sowohl in den Blattscheiben des Wildtyps als auch in den Blattscheiben der transgenen Linien erhöht (Abb. 3.29). Allerdings war die Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien ausgeprägter als im Fall der untersuchten Blattscheiben des Wildtyps. Der Unterschied im  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der transgenen Linien 70 und 95 war im Vergleich zum Wildtyp statistisch signifikant.

### 3. Ergebnisse

Da das unter Beteiligung der HPPD gebildete Homogentisat ebenfalls die Vorstufe für die Biosynthese von Plastochinon-9 ist, war es von Interesse, auch die Plastochinon-9-Gehalte zu analysieren (siehe 2.3.3). So könnte auch ein veränderter Plastochinon-Pool einen Einfluss auf die Effizienzen beider Photosysteme haben.



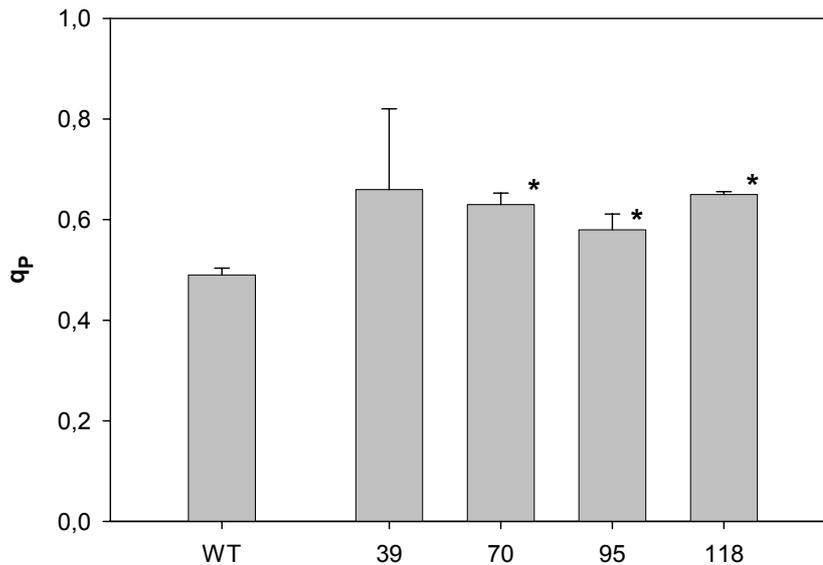
**Abb. 3.30:** Einfluss von Kühle und Licht auf den Plastochinon-9-Gehalt von Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 vor und nach einer dreistündigen Stressphase durch niedrige Temperaturen (12°C) und einer PPFD von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Bestimmung erfolgte an Blattscheiben von jeweils mindestens vier Pflanzen. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ ).

Die Bestimmung des Plastochinon-9-Gehaltes zeigte vor der Behandlung durch Kühle und Licht einen vergleichbaren Wert für die untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien und denen des Wildtyps. Nach der Behandlung waren die Plastochinon-9-Gehalte deutlich erhöht, wobei auch hier ein teilweise gegenüber den untersuchten Blattscheiben des Wildtyps signifikant erhöhter Gehalt an Plastochinon-9 in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien gemessen werden konnte.

Da auch der Plastochinon-9-Gehalt in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien im Vergleich zu denen des Wildtyps erhöht war, könnte auch hierin ein Grund für den positiven Effekt auf die maximale Effizienz von Photosystem II liegen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit der Redoxstatus des Plastochinons beeinflusst ist, wurde das photochemische *quenching* bestimmt. Dies ist ein Maß für den Redoxstatus von  $Q_A$ . Liegt dieser zu 100% reduziert vor, so nimmt  $q_P$  den Wert 0 an. Es zeigte sich ein Unterschied im Redoxstatus von  $Q_A$

### 3. Ergebnisse

zwischen den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien und denen des Wildtyps (Abb. 3.31). So lag der Wert für  $q_P$  im Falle des Wildtyps bei 0,5, während die transgenen Linien durchschnittlich einen Wert von etwa 0,6 zeigten. Daraus folgt, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien ein höherer Anteil an oxidiertem  $Q_A$  als in den untersuchten Blattscheiben des Wildtyps vorlag.



**Abb. 3.31:** Einfluss von Kühle und Licht auf das photochemische *quenching* bei  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  von Blattscheiben des Wildtyps und der transgenen Linien 39, 70, 95 und 118 nach einer dreistündigen Inkubation bei niedrigen Temperaturen ( $12^\circ\text{C}$ ) und einer Bestrahlungsstärke von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Mittelwerte ergaben sich aus einer jeweils voneinander unabhängigen Dreifachbestimmung. \* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp an ( $\alpha=0,05$ ). Aufgrund der hohen Inhomogenität der Werte der transgenen Linie 39 wurde diese in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in Blattscheiben nach einer dreistündigen Inkubation bei 12°C und einer Bestrahlungsstärke von  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  der Anteil an oxidierten, also offenen, Reaktionszentren des Photosystems II in den transgenen Linien höher war als im Wildtyp.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Effizienz von Photosystem II in den Blattscheiben der transgenen Linien nach einer Behandlung mit niedrigen Temperaturen und gleichzeitiger Lichteinstrahlung höher war als die des Wildtyps. Demgegenüber zeigten die Blattscheiben der transgenen Linien eine geringere Effizienz von Photosystem I als die untersuchten Blattscheiben des Wildtyps. Es konnte weiterhin teilweise ein gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhter Tocopherol- sowie Plastochinon-9-Gehalt in den Blattscheiben der transgenen Linien gemessen werden. Außerdem wiesen die im Rahmen dieses Experimentes untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp einen höheren Wert für das photochemische *quenching* auf.

## 4. Diskussion

Das Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase hat eine besondere Stellung im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel. Es ist gleichermaßen am Abbau von Tyrosin wie auch an der Biosynthese des Vitamins E und des Plastochinons beteiligt. Ein Ausfall der HPPD ist für Höhere Pflanzen letal (Norris et al. 1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der in der Mais-Mutante *viviparous2* (*vp2*) mutierte Genlocus entweder für die HPPD kodiert, oder die Expression des *hpd*-Gens reguliert (Matthews et al. 2003). Die Keimlinge dieser Mais-Mutante sind weiß, wenn sie unter Licht angezogen werden. Da das zu den Carotinoiden gehörende Xanthoxin die Vorstufe der Abscisinsäure darstellt (Rock & Zeevaart 1991), kann auch die durch Abscisinsäure gesteuerte Keimruhe in diesen Mutanten nicht etabliert werden, so dass der Embryo vorzeitig auskeimt. Aufgrund der großen Bedeutung der HPPD für den pflanzlichen Stoffwechsel war es von großem Interesse, die Auswirkungen einer erhöhten Aktivität dieses Enzyms in Pflanzen zu untersuchen.

### 4.1 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierende cDNA aus Gerste erfolgreich in das Genom der untersuchten Tabakpflanzen eingebracht werden konnte. Mittels *Southern Blot*-Analyse wurde nachgewiesen, dass mindestens eine vollständige Kopie des Transformationskonstruktes in allen vier untersuchten Linien vorhanden ist, wobei diese transgenen Linien aus voneinander unabhängigen Transformationsereignissen resultierten (siehe Abb. 3.1). Das *hpd*-spezifische Transkript aus Gerste konnte in Blättern der transgenen Linien durch eine *Northern Blot*-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4). Hierbei war das Auftreten einer Doppelbande auffällig, welche ebenfalls von Kleber-Janke & Krupinska (1997) sowohl in Fahnenblättern als auch in Primärblättern der Gerste beobachtet werden konnte. Die geschätzte Größendifferenz der Transkripte beträgt maximal 100 Nukleotide. Es wurden also zwei Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert, die jedoch vermutlich nur auf ein ursprüngliches Transkript zurückgeführt werden können. Es kann sich nicht um unterschiedliche Transkripte handeln, da von Dähnhardt (2003) lediglich ein Transkriptionsstartpunkt im Promotor des *hpd*-Gens

aus Gerste gezeigt werden konnte. Darüber hinaus ist die cDNA des *hpd*-Gens aus Gerste nicht mit dem natürlichen Promotor sondern unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in das Tabakgenom eingebracht worden. Es wäre denkbar, dass eine unzureichende Denaturierung der RNA vor der elektrophoretischen Auftrennung für diese Doppelbande verantwortlich ist. Die DNA-Sequenz des *hpd*-Gens aus Gerste weist über eine Länge von etwa 150 bp direkt nach dem ersten ATG einen GC-Gehalt von etwa 80% auf (Falk et al. 2002). Dies kann dazu führen, dass sich bei unzureichender Denaturierung Sekundärstrukturen ausbilden, die ein andere Größe als einzelsträngige RNA aufweisen und damit ein anderes Verhalten bei einer elektrophoretischen Auftrennung zeigen. Man würde so zwei vermeintliche Transkripte detektieren, die *in vivo* allerdings nicht vorliegen.

Überraschenderweise ist das Transkript des endogenen *hpd*-spezifischen cDNA aus Tabak um etwa 400 nt kleiner als die bisher bekannten cDNA-Sequenzen pflanzlicher *hpd*-Gene erwarten lassen würden (siehe Abb. 3.4). Um zu prüfen, ob es sich bei dem detektierten Transkript tatsächlich um das *hpd*-Transkript aus Tabak handelt, wurden mehrere Versuche, eine *hpd*-spezifische cDNA aus Tabak zu isolieren, unternommen, die jedoch nicht erfolgreich waren (Daten nicht gezeigt). Die Homologie zwischen den *hpd*-EST-Sequenzen aus Tabak und der Konsensussequenz der *hpd*-spezifischen cDNA aus Tomate lassen jedoch eine ausreichend hohe Homologie erwarten (siehe 3.1.4), so dass es sich bei dem detektierten Transkript um das *hpd*-Transkript handeln dürfte. Da durch Aminosäuresequenzierung gezeigt werden konnte, dass sich die Bereiche pflanzlicher HPPDs fast ausschließlich auf den C-Terminus beschränken (Linden 2000, Falk et al. 2002, Fritze et al. 2004), wäre es durchaus denkbar, dass im Fall der HPPD aus Tabak ein im N-terminalen Bereich verkleinertes Protein vorliegt.

Der Nachweis der HPPD aus Gerste in den transgenen Tabaklinien auf Proteinebene mittels einer *Western Blot*-Analyse konnte mit den in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden fünf verschiedenen HPPD-spezifischen Antikörpern im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Die HPPD scheint in pflanzlichen Geweben nur in sehr geringer Menge vorzuliegen. So konnten Garcia et al. (1999) lediglich die in Tabak überexprimierte HPPD aus *A. thaliana* mittels Immunogoldlokalisierung nachweisen, nicht aber das endogene Protein. Demgegenüber konnten Tsegaye et al. (2003) die HPPD in Keimlingen von *A. thaliana* durch *Western Blot*-Analyse nachweisen. Linden (2000) konnte zeigen,

dass die von Barta & Böger durchgeführte Isolierung und Untersuchung der HPPD aus Mais aller Wahrscheinlichkeit nach nicht korrekt war, da bei der Aufreinigung der Mais-HPPD ein Protein von etwa 43 kDa in sehr großer Menge angereichert wird, welches erst im letzten von vier Chromatographieschritten abgetrennt wird. Dieses Protein konnte als Amylogenin identifiziert werden (Linden 2000). Basierend auf diesen Daten haben Barta & Böger (1996) die Aufreinigung von Amylogenin beschrieben, wobei in ihrer Präparation die Mais-HPPD als Verunreinigung enthalten war.

Allerdings konnte in dieser Arbeit durch den Nachweis einer im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen stark erhöhten Resistenz von Keimlingen der transgenen Linien gegenüber dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> sowie durch die erhöhten Vitamin E-Gehalte in den Samen der transgenen Linien eindeutig gezeigt werden, dass das in das Genom des Tabaks eingebrachte *hpd*-Gen aus Gerste in den untersuchten transgenen Linien zu einem funktionsfähigen Protein führt (siehe 3.1.3, 3.2.7).

### 4.2 Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon

Generell können sowohl die Menge, als auch die Zusammensetzung des Vitamins E reguliert werden. Bei Betrachtung der Biosynthese der Tocopherole und Tocotrienole (Abb. 1.2) sind die die Menge limitierenden Schritte vermutlich eher in den ersten Reaktionsschritten zu suchen, während die die Zusammensetzung bestimmenden Reaktionen eher in den letzten Reaktionsschritten der Biosynthese zu finden sein dürften. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob durch eine konstitutive Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in Tabak eine Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erzielt werden kann.

#### 4.2.1 Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon im Blatt

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in Tabak, cv. Xanthi, nicht zu einer Erhöhung des Tocopherolgehaltes in Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp führt (siehe 3.2.2). Ein vergleichbares Ergebnis konnte kürzlich durch eine heterologe Überexpression des *hpd*-Gens aus *A. thaliana* in Tabak gezeigt werden (Rippert et al. 2004). Demgegenüber konnten Tsegaye et al. (2002) durch homologe Überexpression des *hpd*-Gens in *A. thaliana* unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors eine Erhöhung des Tocopherolgehaltes in Blättern der

entsprechenden Pflanzen um bis zu 37% erreichen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten einerseits dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche Pflanzen für die Transformation verwendet wurden, oder aber durch die Verwendung unterschiedlicher Transformationskonstrukte. Trotz der Erhöhung des Tocopherolgehaltes um bis zu 37% in Blättern der transgenen Linien scheint eine Limitierung der pflanzlichen Tocopherolbiosynthese in Blättern durch die HPPD aber unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass der Tocopherolgehalt auch in nicht-transgenen Pflanzen in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke stark variieren kann (siehe Abb. 3.12). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem von Tanaka et al. (1999) beschriebenen Befund, dass unter Starklicht angezogene Tabakpflanzen einen höheren Tocopherolgehalt aufweisen als solche, die unter Schwachlicht angezogen wurden.

Es wäre denkbar, dass die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste zu einer verringerten Transkriptionsrate des *hpd*-Gens aus Tabak in Blättern der transgenen Tabaklinien führt oder die Stabilität des endogenen *hpd*-spezifischen Transkripts verändert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Transkriptgehalt des *hpd*-Gens aus Tabak durch die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste nicht beeinflusst wurde (siehe Abb. 3.4). Auch die Transkriptgehalte der anderen für Enzyme der Biosynthese des Vitamins E kodierenden Gene aus Tabak waren durch die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste in den untersuchten Tabakblättern nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.5). Somit ist es wahrscheinlich, dass andere Faktoren für die Biosynthese des Vitamins E in Blättern limitierend sind. Es wäre beispielsweise denkbar, dass in Blättern eine Limitierung der für die Biosynthese benötigten Substrate vorliegt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass es trotz der erhöhten Expression des *hpd*-Gens nicht zu einer Erhöhung der Vitamin E-Gehalte in Blättern der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Tabaklinien kommt. In Höheren Pflanzen kann das für die Biosynthese des Vitamins E benötigte Tyrosin entweder aus dem Abbau von Proteinen stammen oder über den Shikimat-Weg in den Plastiden synthetisiert werden. Hierbei wird zunächst ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat in einer mehrstufigen Reaktion Chorismat gebildet, welches unter Beteiligung einer Chorismat-Mutase in Prephenat umgewandelt wird. Prephenat wird anschließend unter Beteiligung der Arogenat-Dehydrogenase über Arogenat zu L-Tyrosin oder zu L-Phenylalanin unter Beteiligung einer Arogenat-Dehydratase umgewandelt. Tyrosin kann über eine

Tyrosin-Aminotransferase zu 4-Hydroxyphenylpyruvat umgesetzt werden. Phenylalanin ist der Vorläufer für eine Vielzahl von Verbindungen, die als Phenylpropanoide bezeichnet werden. Die Synthese des Tyrosins durch den Shikimat-Weg ist stark reguliert. So unterliegt die Bildung des Tyrosins durch die Arogenat-Dehydrogenase einer strikten Produkthemmung (Rippert & Matringe 2002). Um diesen negativen *feedback*-Mechanismus im Hinblick auf eine erhöhte Vitamin E-Synthese zu umgehen, wurden Tabakpflanzen, die das *hpd*-Gen aus *A. thaliana* überexprimieren (Garcia et al. 1999), mit dem für die Prephenat-Dehydrogenase kodierenden Gen aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) transformiert (Rippert et al. 2004). Die Prephenat-Dehydrogenase setzt das im Shikimat-Weg gebildete Prephenat direkt in 4-Hydroxyphenylpyruvat um. Überraschenderweise akkumulierten die transgenen Tabaklinien große Mengen an Tocotrienolen in den Blättern, welche in Blättern der Wildtyppflanzen nicht detektierbar sind. Den größten Anteil an den Tocotrienolen bildete hierbei das  $\alpha$ -Tocotrienol. Aber auch  $\delta$ -Tocotrienol sowie  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Tocotrienol konnten in geringeren Mengen in den Blättern der transgenen Linien nachgewiesen werden. Insgesamt konnte durch diesen gentechnischen Ansatz der Vitamin E-Gehalt in Blättern der transgenen Linien um den Faktor 10 bis 11 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyppflanzen erhöht werden, wobei die Tocopherolgehalte in Blättern der transgenen Linien jedoch unbeeinflusst blieben. Durch Überexpression einer Tyrosin-Aminotransferase aus *Escherichia coli* in Tabakpflanzen, die die Umsetzung von Chorismat zu 4-Hydroxyphenylpyruvat katalysiert, kam es zu einer Verdopplung des Vitamin E-Gehaltes in Blättern der transgenen Tabakpflanzen, die zu einem Großteil auf einer Erhöhung des  $\alpha$ -Tocotrienolgehaltes beruhte (Herbers 2003, Geiger et al. 2001). Demnach scheint durch eine Erhöhung der Menge an verfügbarem 4-Hydroxyphenylpyruvat und durch gleichzeitige Erhöhung des metabolischen Flusses im Hinblick auf die Umsetzung des 4-Hydroxyphenylpyruvats zum Homogentisat, eine deutliche Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in Pflanzen möglich zu sein. Interessanterweise wirkt sich dieser Ansatz jedoch zu einem erheblichen Teil auf den Tocotrienolgehalt aus. Der Grund für die im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Vitamin E-Gehalte in Blättern der in dieser Arbeit untersuchten transgenen Linien könnte somit in einer Substratlimitierung liegen. Dies würde auch erklären, warum während der Blattseneszenz eine generelle Erhöhung des Tocopherolgehaltes möglich ist (siehe Abb. 3.8). Während dieser Entwicklungsphase

werden im Zuge von Remobilisierungsprozessen Proteine abgebaut, so dass hier vermutlich der Gehalt an verfügbarem Substrat höher ist als in nicht-seneszierendem Blattgewebe. Allerdings scheint die Vitamin E-Biosynthese nicht ausschließlich durch die Verfügbarkeit von 4-Hydroxyphenylpyruvat limitiert zu sein. So konnte durch homologe Überexpression des für die HPT kodierenden Gens in *A. thaliana* der Gesamt-Tocopherolgehalt in Blättern der transgenen Pflanzen um etwa den Faktor 4 erhöht werden (Collakova & DellaPenna 2003a, Collakova & DellaPenna 2003b). Eine Überexpression der für die HGGT kodierenden cDNA aus Gerste in *A. thaliana* führte zu einer Akkumulation von Tocotrienolen in Blättern und damit zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes um den Faktor 10 bis 15 (Cahoon et al. 2003). Das Ergebnis dieser beiden Ansätze spricht somit gegen eine ausschließliche Limitierung der Biosynthese der Tocopherole durch die Menge an verfügbarem Tyrosin bzw. 4-Hydroxyphenylpyruvat. Die für die Biosynthese der Tocopherole limitierende Aktivität der HPT könnte aber für die Akkumulation von Tocotrienolen in Blättern durch den Ansatz von Rippert et al. (2004) verantwortlich sein. Da es sich bei Homogentisat um eine oxidationsempfindliche Verbindung handelt und bisherigen Daten zufolge die HGGT in Blättern nicht exprimiert wird (Cahoon et al. 2003), vermuteten die Autoren, dass durch den gewählten gentechnischen Ansatz die Menge an gebildetem Homogentisat so hoch ist, dass eine im Chloroplasten lokalisierte Polyprenyltransferase als Nebenreaktion die Funktion der HGGT übernehmen kann. Somit würde eine Akkumulation von Homogentisat verhindert werden und eine Akkumulation von Tocotrienolen in Blättern auftreten.

Eine weitere Möglichkeit der Substratlimitierung besteht im Hinblick auf die Prenyl-Seitenkette der Tocopherole. In Plastiden wird die Vorläuferverbindung Isopentenyl-diphosphat durch den 1-deoxyxylulose-5-phosphat-Weg synthetisiert (Eisenreich et al. 1998, Lichtenthaler 1998) und anschließend unter Beteiligung einer Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase 1 (GGPS1) zu Geranylgeranyl-diphosphat umgesetzt (Okada et al. 2000). Anschließend entsteht Phytol-diphosphat (PDP) durch Reduktion von drei der vier Doppelbindungen mittels einer multifunktionellen Geranylgeranyl-Reduktase (GGDR) (Addlesee et al. 1996, Keller et al. 1998). Ajjawi & Shintani (2004) postulieren eine Limitierung der Tocopherolsynthese durch die Menge an verfügbarem PDP. Demnach müsste durch eine Überexpression des für die GGDR kodierenden Gens eine deutliche Erhöhung des Tocopherolgehaltes in Blättern der entsprechenden Pflanzen nachweisbar sein. Leider gibt es zur Zeit keine

Daten bezüglich eines solchen gentechnischen Ansatzes. Durch homologe Überexpression des für die 1-deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase kodierenden Gens konnte aber der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt in *A. thaliana* um bis zu 100% erhöht werden (Estevez et al. 2001). Die Überexpression einer für die Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase (GGDPS) aus *Erwinia uredovora* spezifischen cDNA in Tabak, cv. Samsun, zeigte einen schwachen Effekt hinsichtlich der Tocopherolgehalte in den Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp (Rojas Stütz & Römer 2003). Zur Zeit werden Kreuzungen dieser transgenen Linien mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tabaklinien, die das *hpd*-Gen aus Gerste überexprimieren, analysiert.

Da während der Seneszenz der Anstieg des Tocopherolgehaltes zeitgleich mit einem Abbau des Chlorophylls abläuft, wurde vermutet, dass das aus dem Chlorophyll-Abbau stammende Phytol für die Biosynthese der Tocopherole genutzt werden kann (Rise et al. 1989). Diese Vermutung kann jedoch durch einen kürzlich gemachten Befund nicht bestätigt werden. So zeigen transgene Tabakpflanzen mit einer autoregulierten Produktion von Cytokinin während der Seneszenz ( $P_{SAG12}$ -IPT) eine im Vergleich zu den Wildtyppflanzen stark verminderte Abnahme des Chlorophyllgehaltes und eine verzögerte Seneszenz. Trotz verringerten Chlorophyllabbaus kommt es aber zum gleichen Zeitpunkt wie in den Wildtyppflanzen zu einem Anstieg der Tocopherolgehalte (Dertinger et al. 2003). Somit scheint während der Seneszenz eine direkte Korrelation zwischen dem Abbau des Chlorophylls einerseits und einer Synthese der Tocopherole andererseits unwahrscheinlich. Vielmehr kann aus diesem Befund geschlossen werden, dass die während der Seneszenz beobachtete Akkumulation der Tocopherole nicht seneszenz-, sondern altersabhängig reguliert wird.

Die bisher erläuterten Möglichkeiten zur Regulation der Biosynthese gehen von einer Limitierung entweder der Substrate oder der enzymatischen Aktivitäten der an der Biosynthese des Vitamins E beteiligten Enzyme aus. Es wäre aber weiterhin auch denkbar, dass zusätzlich die Menge an Tocopherolen durch die Kapazität der Plastidenmembransysteme zur Einlagerung von Tocopherolen limitiert wird. Diese Möglichkeit ist insbesondere deshalb von Interesse, weil bekannt ist, dass Tocopherole die Stabilität von Membranen beeinflussen können (Wang & Quinn 1999). Entsprechende Befunde im Hinblick auf Tocotrienole liegen bisher nicht vor. Interessanterweise scheint es auf Grund der vorliegenden Ergebnisse so zu sein, dass ein erhöhter Tocopherolgehalt von den Pflanzen „detektiert“ werden kann, ein

erhöhter Tocotrienolgehalt allerdings nicht. Ein Argument hierfür ist, dass eine Erhöhung der Tocotrienolgehalte stets in weitaus größeren Faktoren festgestellt werden konnte als eine Erhöhung der Tocopherolgehalte, unabhängig davon, durch welchen gentechnischen Ansatz diese Erhöhung erreicht wurde. So könnte die Überexpression einzelner Gene zwar zu einer erhöhten Biosynthese insbesondere des  $\alpha$ -Tocopherols führen, aber das gebildete, überschüssige  $\alpha$ -Tocopherol wieder abgebaut werden. Bis heute konnten keine Gene, die möglicherweise an der Regulation, Akkumulation und Degradation der Vitamin E-Verbindungen beteiligt sind, aus Pflanzen isoliert werden. In tierischen Zellen kennt man aber seit einiger Zeit eine enzymatische Degradation des  $\alpha$ -Tocopherols (Brigelius-Flohé & Traber, 1999, Brigelius-Flohé et al. 2002). Ob ein vergleichbarer enzymatischer Abbau in Pflanzen auftreten kann, ist bisher nicht geklärt worden.

Es könnte auch sein, dass die zusätzliche Menge an Homogentisat in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Tabakpflanzen über die Homogentisat-Dioxygenase (HGAD) abgebaut wird. Leider liegen bisher keine gesicherten Daten über die Aktivität dieses Enzyms vor, weder während unterschiedlicher Entwicklungsphasen noch in Pflanzen, welche eine erhöhte Expression von an der Biosynthese des Vitamins E und Plastochinons beteiligten Genen zeigen. Eigene vorläufige Arbeiten zur Aktivität der HGAD in den transgenen Tabaklinien lassen eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyppflanzen vermuten, die zu einem Abbau des zusätzlich synthetisierten Homogentisats führen könnte. Auch in seneszierenden Primärblättern der Gerste könnte eine entwicklungsabhängig erhöhte Aktivität der HGAD auftreten (Kühr 2002). Da bei der angewandten Bestimmung zur enzymatischen Aktivität die erhaltene Produktmenge nicht der eingesetzten Substratmenge entsprach, ist eine eindeutige Aussage zur Zeit jedoch nicht möglich. Erhöhte Transkriptgehalte des für die HGAD kodierenden Gens konnten in *A. thaliana* unter Stressbedingungen nachgewiesen werden (Collakova & DellaPenna 2003b).

Während die Tocopherolgehalte in den transgenen Tabaklinien im Vergleich zum Wildtyp unverändert sind, zeigte sich während der Blattseneszenz ein gegenüber dem Wildtyp erhöhter Gehalt an Plastochinon-9 in den Blättern der transgenen Tabaklinien (siehe 3.2.3). Man könnte vermuten, dass das zusätzliche Plastochinon in den Plastoglobuli gespeichert wird, da gezeigt werden konnte, dass Plastoglobuli aus Buchenblättern während der Seneszenz einen erhöhten Gehalt an oxidiertem

Plastochinon aufweisen (Tevini & Steinmüller 1985). Aufgrund des erhöhten photochemischen *quenchings* in senescentem Blattmaterial (siehe 3.2.3.1) ist aber noch eher davon auszugehen, dass das zusätzliche Plastochinon-9 in den seneszenten Blättern der transgenen Linien zumindest teilweise auch in der Thylakoidmembran eingelagert wird. Durch welche Faktoren die Synthese des Plastochinons-9 reguliert wird, ist allerdings aufgrund fehlender Daten bezüglich der entsprechenden Enzymaktivitäten und Kenntnis der Transkriptgehalte der beteiligten Gene noch unklar.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keinen klaren Schluss über den Mechanismus der Regulation der Tocopherolbiosynthese zu. Eine Ursache für die uneinheitlichen Befunde ist sicherlich in den sehr unterschiedlichen Ansätzen und in der Verwendung unterschiedlicher Pflanzen zu finden. Des Weiteren wird vermutlich auch der Entwicklungszustand des Pflanzenmaterials einen Einfluss auf mögliche Regulationsmechanismen haben. Es wird zukünftig von großem Interesse sein, Faktoren, die an der Regulation der Vitamin E- und Plastochinon-Biosynthese beteiligt sind, zu identifizieren.

### **4.2.2 Regulation der Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon in Samen und Keimlingen**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Tabaklinien, die eine Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste zeigen, weisen einen erhöhten Vitamin E-Gehalt im Samen auf (siehe Abb. 3.19). Die im Samen von Tabak, cv. Xanthi, hauptsächlich vorkommenden Vitamin E-Formen sind  $\gamma$ -Tocopherol sowie  $\gamma$ -Tocotrienol (siehe Abb. 3.17). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beiden Vitamin E-Formen eine gewebespezifische Verteilung im Samen von Tabak, cv. Xanthi, aufweisen (siehe Abb. 3.17). So ist  $\gamma$ -Tocopherol im Embryo lokalisiert, während  $\gamma$ -Tocotrienol größtenteils im Endosperm gefunden wurde. Diese Form der gewebespezifischen Verteilung wurde u. a. auch für Mais, Hafer und Gerste beschrieben (Peterson 1995, Grams et al. 1970, Falk et al. 2004). Während der Samenreife werden verstärkt Speicherstoffe in den sich entwickelnden Samen transportiert und dort eingelagert. Im Falle der untersuchten Tabaksamen sind dies zu einem Großteil Lipide, die mit einem Anteil von 30-35% am Trockengewicht einen Hauptspeicherstoff darstellen (siehe Abb. 3.20). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung scheint die durch die HPPD katalysierte Umsetzung des HPP in Homogentisat

durchaus ein limitierender Schritt in der Vitamin E-Biosynthese zu sein, da auch Tsegaye et al. (2002) durch homologe Überexpression des *hpd*-Gens in *A. thaliana* unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors eine Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in Samen um 10% und unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors eine Erhöhung um 37% erzielen konnten. Eine homologe Überexpression des für die HPT kodierenden Gens in *A. thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors führte zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes um etwa 100% (Savidge et al. 2002) und unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors zu einer Erhöhung um bis zu 40% (Collakova & DellaPenna 2003a). Es wäre denkbar, dass die oben diskutierte Substratlimitierung des Tyrosins hier nicht vorliegt. So konnte in reifenden Samen von *A. thaliana* eine verstärkte Expression des Gens, welches für die Homogentisat-Dioxygenase kodiert, gefunden werden (White et al. 2000). Möglicherweise findet zu diesem Zeitpunkt ein verstärkter Tyrosinkatabolismus statt, wobei es vorstellbar wäre, dass das so gebildete Homogentisat auch für die Biosynthese des Vitamins E verwendet wird. Ebenfalls möglich ist, dass zu diesem Zeitpunkt generell eine erhöhte Vitamin E-Biosynthese abläuft und Mechanismen, die die Vitamin E-Akkumulation im Blattgewebe regulieren, während der Samenentwicklung nicht auftreten. Vielmehr scheint die Kapazität der Samen, verstärkt Vitamin E einzulagern, vorhanden zu sein. Den bisher größten Einfluss auf den Vitamin E-Gehalt durch einen gentechnischen Ansatz konnten Cahoon et al. (2003) durch Überexpression der für die HGGT spezifischen cDNA aus Gerste in Mais unter Kontrolle des Promotors des für das 16 kDa-Oleosin kodierenden Gens aus Mais erreichen. Die untersuchten Maiskörner zeigten einen etwa 6fach höheren Gehalt im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkörnern. Ein Großteil der Tocotrienole konnte hierbei im Embryo detektiert werden, in welchem sie im Wildtyp-Mais nicht vorkommen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die gewebespezifische Verteilung der Tocopherole und Tocotrienole in Samen dadurch hervorgerufen wird, dass die für die jeweilige Biosynthese spezifischen Prenyltransferasen gewebespezifisch exprimiert werden. Durch eine entsprechende *Northern Blot*-Analyse oder *in situ*-Hybridisierung sollte diese Frage geklärt werden können.

Bei der Untersuchung der Tocopherolgehalte in Keimlingen zeigte sich, dass 14 Tage alte Keimlinge der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp einen höheren  $\alpha$ -Tocopherolgehalt aufweisen (siehe Abb. 3.12). Diese Erhöhung war unabhängig von der bei der Anzucht der Keimlinge verwendeten Bestrahlungsstärke. Eine

Untersuchung der Tocopherolgehalte von Keimlingen zu früheren Keimungszeitpunkten ergab, dass der Tocopherolgehalt des Wildtyps bei Anwendung des Herbizids Mikado<sup>®</sup>, also bei Blockierung der HPPD und damit auch der Neusynthese des  $\alpha$ -Tocopherols, gegenüber der entsprechenden Kontrolle nur leicht erniedrigt war (siehe Abb. 3.14). Demgegenüber war Plastochinon-9 in den auf dem Herbizid angezogenen Keimlingen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte detektierbar (siehe Abb. 3.15). Für die Kontrollkeimlinge konnte gezeigt werden, dass während der Keimung der Plastochinon-9-Gehalt deutlich zunimmt. Somit kann bei der Keimung in Gegenwart von Mikado<sup>®</sup> von einer vollständigen Hemmung der HPPD-Aktivität ausgegangen werden. Demnach könnte das während dieser frühen Phase der Entwicklung in den Keimlingen vorhandene  $\alpha$ -Tocopherol aus dem im Embryo gespeicherten  $\gamma$ -Tocopherol gebildet werden. Dafür spricht auch, dass  $\gamma$ -Tocopherol lediglich in 5 und 6 Tage alten Keimlingen detektierbar war und sich eine deutliche Abnahme des  $\gamma$ -Tocopherolgehaltes zeigte (siehe Abb. 3.14). Der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der transgenen Linie 70 war im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht, was dadurch begründet werden könnte, dass mehr  $\gamma$ -Tocopherol im Samen gespeichert wurde. Der generell niedrigere  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der auf dem Herbizid angezogenen Keimlinge lässt sich dadurch erklären, dass durch das im Fall des Wildtyps fehlende Plastochinon und durch den im Falle der transgenen Linie 70 verringerten Plastochinongehalt vermutlich eher Schäden durch photooxidativen Stress auftreten, als in den entsprechenden Kontrollkeimlingen. Es ist anzunehmen, dass  $\alpha$ -Tocopherol dadurch vermehrt in antioxidativen Reaktionen verbraucht wird. Eine Neusynthese des  $\alpha$ -Tocopherols scheint somit erst später in der Entwicklung stattzufinden, wobei eine Regulation zunächst nicht oder vermindert auftritt, da 14 Tage alte Keimlinge einen erhöhten  $\alpha$ -Tocopherolgehalt im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (siehe Abb. 3.12). Eine vorläufige Analyse der Tocopherolgehalte von 21 Tage alten Keimlingen zeigte vergleichbare Tocopherolgehalte der transgenen Linien und des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). Da der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt bezogen auf das Frischgewicht in Keimlingen etwa 5  $\mu\text{g/g}$  FG beträgt, im ausgewachsenen grünen Blatt mit etwa 25  $\mu\text{g/g}$  FG deutlich darüber liegt, könnte in Keimlingen eine erhöhte Kapazität der Membranen,  $\alpha$ -Tocopherol einzulagern, vorliegen. Geht man davon aus, dass diese Kapazität ein für die Tocopherolsynthese limitierender Faktor ist (siehe 4.2.1), so könnte in den Keimlingen der transgenen Linien die Möglichkeit

bestehen, verstärkt  $\alpha$ -Tocopherol in die Membran einzulagern. Dies könnte im ausgewachsenen Blatt aufgrund der ohnehin um etwa den Faktor 5 höheren  $\alpha$ -Tocopherolgehalte nicht mehr möglich sein.

Unabhängig davon besteht aber für die Keimlinge offensichtlich die Möglichkeit, das vorhandene Homogentisat spezifisch für die Biosynthese des Plastochinons zu verwenden. Über Faktoren, die eine solche Koordination der Biosynthese von Tocopherolen und Plastochinon regulieren, ist bisher nichts bekannt. Denkbar wäre aber, dass die für die Biosynthese des Plastochinons spezifische Homogentisat-Solanyltransferase in den untersuchten Entwicklungsstadien aktiv ist, die an der Biosynthese der Tocopherole beteiligte Homogentisat-Phytyltransferase hingegen nicht. Somit würde das vorhandene Homogentisat ausschließlich für die Biosynthese des Plastochinons verwendet werden können, ein Umstand, der es den Keimlingen erlauben würde, schnellstmöglich einen effizienten Photosyntheseapparat aufzubauen. Die Einlagerung größerer Tocopherolmengen in den Embryo könnte somit den Embryo vor oxidativer Schädigung schützen, während das vorhandene Homogentisat bevorzugt für die Biosynthese des Plastochinons Einsatz findet.

### **4.3 Funktionen des Vitamins E in der Pflanze**

#### **4.3.1 Funktionen des Vitamins E in Samen und Antheren**

Als eine der wichtigsten Funktionen des Vitamins E in Pflanzen gilt die Fähigkeit, Autooxidationen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren abzubrechen (Fryer 1992). So konnten Falk et al. (2002) zeigen, dass das *hpd*-Gen aus Gerste unter oxidativen Stressbedingungen einen erhöhten Transkriptgehalt aufweist. Auch die während der Seneszenz erhöhten Vitamin E-Gehalte im Blatt (siehe Abb. 3.8) können durch einen verstärkten Bedarf an Antioxidantien während dieser Entwicklungsphase, in der oxidativer Stress auftritt, erklärt werden (Kunert & Ederer 1985, Chrost et al. 1999). So könnte auch im Samen die hauptsächliche Funktion des Vitamins E der Schutz der Speicherlipide, insbesondere der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor oxidativem Abbau sein. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation des Vitamins E und der Speicherlipide, scheint dies jedoch wenig wahrscheinlich zu sein. So sind die Speicherlipide in Lipidspeicherkörpern lokalisiert, die am Endoplasmatischen Reticulum gebildet werden (Huang 1996). Demgegenüber findet sich das Vitamin E in den Plastiden (Soll et al. 1985). Ein Schutz der Speicherlipide würde somit einen

Transfer des Vitamins E notwendig machen. Über entsprechende Transferproteine in Pflanzen ist aber bisher nichts bekannt. Weiterhin wäre bei einer vorrangigen Funktion als Antioxidans zum Schutz der Speicherlipide, eine Korrelation des Vitamin E-Gehaltes mit dem mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu erwarten. Diesbezügliche Untersuchungen lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Kamal-Eldin & Andersson 1997, Dolde et al. 1999, Goffmann & Becker 2002). Auch die Samen der hier untersuchten transgenen Tabaklinien akkumulieren zwar bis zu 100 % mehr Vitamin E im Samen, zeigen jedoch im Vergleich zu Samen des Wildtyps keinen Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung (siehe Tab. 3.1). So zeigte auch die Analyse einer Mutante von *A. thaliana*, die einen Defekt der  $\gamma$ -TMT aufweist, zwar eine erwartungsgemäße Veränderung der Tocopherolzusammensetzung, aber keine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Lipide in den Blättern (Bergmüller et al. 2003). Dennoch könnte Vitamin E in den Samen eine antioxidative Funktion besitzen, da während der Keimung verstärkt ROS aus dem keimenden Samen freigesetzt werden (Schopfer et al. 2001). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sogenannte orthodoxe Samen, die bei der Samenreifung eine starke Eintrocknung erfahren, einen Großteil ihrer Ascorbat-Peroxidase-Aktivität und des Ascorbatgehaltes verlieren (De Tullio & Arrigoni 2003). Da alle anderen antioxidativen Systeme nur partiell vorhanden sind, könnte Vitamin E unter diesen Bedingungen eine schützende Funktion haben, auch wenn eine verringerte Regeneration des Tocopheroxyradikals durch Ascorbat zu erwarten ist. Im Unterschied zur Chinonbildung bei der Reaktion des  $\alpha$ -Tocopherols mit Lipidperoxyradikalen, entstehen im Fall des  $\gamma$ -Tocopherols vorzugsweise Dimere, die eine bzw. zwei phenolische OH-Gruppen enthalten, die noch antioxidativ wirksam sind (Gottstein & Grosch 1990). Damit könnte das im Embryo enthaltene  $\gamma$ -Tocopherol gegenüber  $\alpha$ -Tocopherol von Vorteil sein, weil es bei einer Reaktion mit Lipidperoxyradikalen weniger schnell verbraucht würde. Dadurch könnte ein besserer Schutz des keimenden Samens gewährleistet werden. Mutanten von *A. thaliana*, welche keine Tocopherole im Samen akkumulieren können, verlieren interessanterweise mit zunehmender Lagerungsdauer ihre Keimfähigkeit und weisen ein erhöhtes Maß an Lipidperoxidation sowie eine verringerte Fähigkeit zur Remobilisierung von Speicherlipiden und eine gestörte Keimlingsentwicklung auf (Sattler et al. 2004).

Ebenfalls möglich ist eine Interaktion des  $\gamma$ -Tocopherols mit dem Stickoxidradikal ( $\text{NO}^\cdot$ ) sowie anderen reaktiven Stickstoff-Spezies. Bei  $\text{NO}^\cdot$  handelt es sich um ein Signal-Molekül, welches die Samenkeimung stimulieren kann (Beligni & Lamattina 2000). Aufgrund der nicht-substituierten 5`-Position am Chromanol-Ringsystem (siehe Abb. 1.1) kann eine Reaktion des  $\gamma$ -Tocopherols mit reaktiven Stickstoff-Spezies stattfinden (Cooney et al. 1993). Ob eine solche Interaktion in keimenden Samen auftritt und das  $\gamma$ -Tocopherol damit möglicherweise eine spezifische Funktion erfüllt, wird zur Zeit von Dr. Falk und Dr. Desel in der Arbeitsgruppe von Prof. Krupinska untersucht. Völlig unklar ist auch, welche Funktion  $\gamma$ -Tocotrienol im Endosperm erfüllt. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation des  $\gamma$ -Tocopherols und  $\gamma$ -Tocotrienols, ist auch eine unterschiedliche Funktion dieser beiden Vitamin E-Formen in Samen zu erwarten.

Ein überraschendes Ergebnis war die Detektion von  $\alpha$ -Tocotrienol in den Antheren von Tabak (siehe Abb. 3.26), da Tocotrienole bisher außer im Samen lediglich im Latex des Kautschukbaumes (*Hevea brasiliensis*) in signifikanten Mengen detektiert wurden (Dunphy et al. 1965). Es besteht die Möglichkeit, dass  $\alpha$ -Tocotrienol in den im Tapetum enthaltenen Elaioplasten lokalisiert ist. Generell fungiert das Tapetum als Nährgewebe für die sich entwickelnden Pollen. Zu einem späten Zeitpunkt der Pollenentwicklung besteht das einschichtige Tapetum vieler Pflanzen zum größten Teil aus Elaioplasten und den, gelegentlich als Tapetosomen bezeichneten, Lipidspeicher-Partikeln (Wu et al. 1997). Es wird angenommen, dass zu einem späten Entwicklungszeitpunkt der Antherenentwicklung die Tapetumzellen aufgelöst werden, die Kompartimente und Organellen freigesetzt und deren Inhaltsstoffe auf die Oberfläche des reifenden Pollens verlagert werden. Bei einem Vergleich der Lipid- und Proteinzusammensetzung der Elaioplasten und Tapetosomen mit der der Pollenoberfläche konnten Wu et al. (1997) allerdings lediglich neutrale Ester der Elaioplasten auf der Pollenoberfläche wiederfinden. Während der letzten Jahre haben sich einige Arbeiten mit der Zusammensetzung der im Tapetum enthaltenen Elaioplasten und Tapetosomen von *Brassica spec. L.* beschäftigt (Wu et al. 1997, Ting et al. 1998, Hernandez-Pinzon et al. 1999). So enthalten Elaioplasten hauptsächlich Sterolester und kleinere Mengen Triacylglyceride. Demgegenüber bestehen die Tapetosomen größtenteils aus Triacylglyceriden. Des weiteren konnten oleosinähnliche Proteine in Tapetosomen, nicht aber in Elaioplasten gefunden

werden. Die Lipide werden innerhalb der Elaioplasten in Globuli gespeichert, die allerdings im Gegensatz zu den Globuli der Chloroplasten keine Pigmente enthalten. Ob das in den Antheren detektierte  $\alpha$ -Tocotrienol tatsächlich in den Elaioplasten gespeichert wird, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, könnte jedoch durch entsprechende Präparation der Elaioplasten möglicherweise geklärt werden.

### 4.3.2 Funktionen des Vitamins E im Blatt

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Lichtstressbedingungen bei Raumtemperatur Blattscheiben der transgenen Linien weder einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Tocopherolgehalt noch eine erhöhte maximale Effizienz von Photosystem II aufweisen (siehe Abb. 3.24, Abb. 3.25). Bei niedrigen Temperaturen und gleichzeitiger Lichteinstrahlung konnte demgegenüber in Blattscheiben der transgenen Linien eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte maximale Effizienz von Photosystem II sowie eine verringerte Effizienz von Photosystem I (siehe Abb. 3.26, 3.27, 3.28) gemessen werden. Die Tocopherolgehalte der untersuchten Blätter waren nach der Behandlung gegenüber dem Ausgangswert erhöht, wobei diese Erhöhung in den Blättern der transgenen Linien ausgeprägter war (siehe Abb. 3.29). Ein vergleichbarer Effekt konnte in Bezug auf die Plastochinon-9-Gehalte der untersuchten Blattscheiben gezeigt werden (siehe Abb. 3.30). Unter den Bedingungen von Kühle und Licht scheint sich durch die im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Synthese von  $\alpha$ -Tocopherol und Plastochinon-9 ein positiver Effekt auf die maximale Effizienz von Photosystem II in Blättern der transgenen Linien zu ergeben. Offensichtlich beruht dieser Effekt aber nicht allein auf Starklichtstress, sondern scheint auch wesentlich durch die Umgebungstemperatur beeinflusst zu werden.

Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei niedrigen Temperaturen entsteht unter Starklichtbedingungen am Photosystem II vorrangig Singulett-Sauerstoff (Hideg et al. 2000). Demgegenüber handelt es sich unter Raumtemperaturbedingungen bei den am Photosystem I gebildeten ROS hauptsächlich um Superoxidanionen (Foyer et al. 1994) und bei niedrigen Temperaturen um Hydroxylradikale (Terashima et al. 1998). Eine Untersuchung von transgenen Tabakpflanzen, die eine verminderte Expression des für die Geranylgeranyl-Reduktase kodierenden Gens zeigen, und einen

infolgedessen verminderten Tocopherolgehalt aufweisen (Tanaka et al. 1999), zeigte eine höhere Empfindlichkeit von Blättern der transgenen Linien gegenüber Starklichtstress bei Raumtemperatur als der entsprechende Wildtyp (Graßes et al. 2001). Eine Untersuchung von Trebst et al. (2002) ergab, dass  $\alpha$ -Tocopherol möglicherweise das D1-Protein des Photosystems II unter Starklichtbedingungen schützt, indem es als Singulett-Sauerstoff-*Quencher* fungiert. So zeigte *Clamydomonas reinhardtii* eine Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke (250, 750 und 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Weiterhin konnte nach Blockierung der HPPD durch einen Inhibitor (Pyrazolynat) und Lichtstress (2 Stunden, 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) keine Sauerstoffentwicklung mehr nachgewiesen werden. Eine *Western Blot*-Analyse ergab, dass auch das D1-Protein nach dem Lichtstress nicht mehr nachweisbar war. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Homogentisat sowie künstlichen Singulett-Sauerstoff-*Quenchern* aufgehoben werden. Leider liegen keine Daten bezüglich des Plastochinongehaltes vor, da es vorstellbar wäre, dass es durch Zugabe des Inhibitors zu einer gleichzeitigen Blockierung der Plastochinonbiosynthese kommt. Dies könnte zu einer stark verringerten Elektronentransportrate und infolgedessen zu photooxidativer Zerstörung des D1-Proteins führen.

Prinzipiell tritt bei beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Temperaturen photooxidativer Stress auf, und beiden gemein ist ein photoinhibitorischer Effekt (Hetherington et al. 1989). Eine Besonderheit ergibt sich unter den Bedingungen der Kombination von Kühle und Licht aber dadurch, dass enzymatische Reaktionen aufgrund der niedrigen Temperaturen verlangsamt ablaufen. Dagegen sind rein photochemische Prozesse nur in sehr geringem Maße von der Temperatur beeinflusst, sodass bei niedrigen Temperaturen ein Ungleichgewicht zwischen photochemischen und enzymatischen Reaktionen entsteht. Zusätzlich kommt es unter diesen Bedingungen zu einem vermehrten Auftreten von ROS, da antioxidative Enzyme wie Glutathion-Reduktase und Ascorbat-Peroxidase durch die Kühle verlangsamt arbeiten (Asada 1996, Gechev et al. 2003). Es wäre also denkbar, dass unter diesen Bedingungen die Synthese eines nicht-enzymatischen Antioxidans von Vorteil ist. Rojas Stütz & Römer (2003) fanden in Blättern von Tabakpflanzen, die das für die Phytoen-Synthase aus *E. uredovora* kodierende Gen überexprimieren, unter Starklichtbedingungen bei Raumtemperatur (2 Stunden, 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) einen gegenüber dem Wildtyp erhöhten Gehalt an

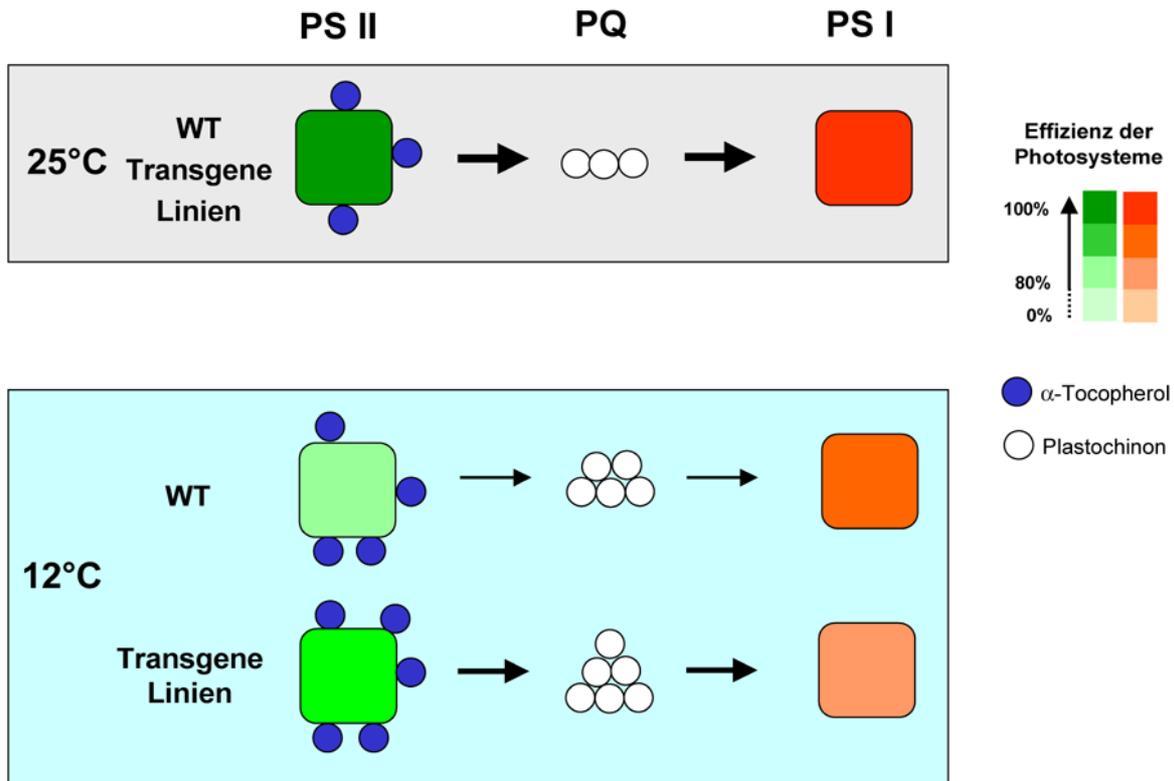
Carotinoiden. Demgegenüber war der Tocopherolgehalt in den entsprechenden Blättern der transgenen Pflanzen stark erniedrigt. Demnach wäre es denkbar, dass unter Starklichtbedingungen bevorzugt Carotinoide gebildet werden und so das für die Synthese des Phytoens benötigte GGDP nicht für die Biosynthese der Tocopherole zur Verfügung steht. Interessanterweise fanden Welsch et al. (2003) ein ATCTA-Element in Promotoren sowohl von Photosynthese-assoziierten Genen als auch Genen, die für die Enzyme der Carotinoid- und Tocopherolbiosynthese kodieren. Somit wäre eine an die Expression von Photosynthese-assoziierten Genen gekoppelte Expression der Gene sowohl des Carotinoid- als auch des Tocopherolbiosyntheseweges denkbar. Die Synthese von Tocopherolen könnte unter den Bedingungen von Kühle und Licht aber deshalb bevorzugt werden, da sich dadurch ein positiver Effekt auf die Stabilität der Thylakoidmembran ergeben kann. So konnte in Modellvesikel eingebrachtes  $\alpha$ -Tocopherol die Temperatur des Phasenüberganges der Membranen herabsetzen (Gomez-Fernandez et al. 1989). Dies würde eine insbesondere bei niedrigen Temperaturen verbesserte Funktionalität der Thylakoidmembranen zur Folge haben. Über einen vergleichbaren Effekt von Carotinoiden ist bisher nichts bekannt.

Untersuchungen an Gurke (*Cucumis sativus* L.) und Erbse (*Pisum sativum* L.) zeigten, dass im Hinblick auf  $\alpha$ -Tocopherol ein Unterschied zwischen kühesensitiven und kühetoleranten Pflanzen besteht (Wise & Naylor 1987). So nahm in Blättern der kühesensitiven Gurke der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt während einer Inkubation von 12 Stunden bei 5°C und einer gleichzeitigen Bestrahlungsstärke von 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  innerhalb der gesamten Dauer des Stresses nahezu linear ab, während die Blätter der kühetoleranten Erbsenpflanze keine Abnahme des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes zeigten. Diese Ergebnisse scheinen zunächst im Widerspruch zu den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zu stehen. Die Diskrepanzen könnten aber dadurch begründet sein, dass die Temperatur bei dem von Wise & Naylor gewählten Ansatz mit 5°C weit unter denen lagen, die im Rahmen dieser Arbeit gewählt wurden (12°C). So wäre es denkbar, dass im Fall der Gurke zwar eine Synthese des  $\alpha$ -Tocopherols stattfand, der Verbrauch allerdings die Kapazität der Neusynthese überstiegen hat, und es so zu einer Abnahme des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes während des Stresses kam. Auch Blätter von Maispflanzen, die unter suboptimalen Bedingungen angezogen wurden (15°C), zeigten im Vergleich zu Blättern von Maispflanzen, welche unter optimalen Bedingungen angezogen wurden (25°C),

einen etwa doppelt so hohen  $\alpha$ -Tocopherolgehalt (Leipner et al. 1997). Blattscheiben transgener Tabakpflanzen, welche eine verringerte Aktivität der GGDR zeigen und einen infolgedessen verringerten Tocopherolgehalt aufweisen, zeigten eine leicht verringerte maximale Effizienz von Photosystem II nach Inkubation bei 10°C und 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sowie eine erhöhte Lipidperoxidation in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp (Havaux et al. 2003).

Man geht davon aus, dass sich kühesensitive und kühetolerante Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass die Aktivitäten der enzymatischen antioxidativen Systeme eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber niedrigen Temperaturen besitzen (Havaux & Davaud 1994, Hull et al. 1997). Dadurch könnte den Tocopherolen insbesondere in kühesensitiven Pflanzen wie dem Tabak eine besondere Funktion während Kühle in Kombination mit Licht zukommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefunden Ergebnisse im Hinblick auf die Auswirkungen von Kühle in Kombination mit Licht auf die Effizienzen der Photosysteme und den Tocopherol- und Plastochinon-9-gehalt in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp sind in dem in Abb. 4.1 gezeigten Modell zusammengefasst.



**Abb. 4.1** Modell zur Auswirkung von Kühle und Licht auf die Effizienzen der Photosysteme sowie den Tocopherol- und Plastochinongehalt in den transgenen Tabaklinien im Vergleich zum Wildtyp. Die Farbintensität mit der die Photosysteme dargestellt sind, zeigt die Effizienz der Photosysteme an. PQ (Plastochinon), PS II (Photosystem II), PS I (Photosystem I).

So lassen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse den Schluss zu, dass unter den Bedingungen von Kühle und Licht das Photosystem II in den transgenen Linien besser gegen eine Photoinhibition geschützt werden kann. Ob dies die Folge eines erhöhten Tocopherolgehaltes ist und ob dies dadurch erreicht wird, dass  $\alpha$ -Tocopherol als Singulett-Sauerstoff-*Quencher* fungiert oder ob, wie im Fall von Havaux et al. (2003), eine verringerte Lipidperoxidation auftritt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Auch der erhöhte Plastochinon-9-Gehalt könnte den Elektronendruck am Photosystem II verringern, da unter diesen Umständen mehr Elektronen in die Elektronentransportkette abfließen können. Das photochemische *quenching*, welches ein Maß für die unter den Bedingungen noch offenen Reaktionszentren des Photosystems II darstellt, ist im Fall der transgenen Linien höher als im Wildtyp. Demnach könnten die untersuchten Blätter der transgenen Linien eine höhere Elektronentransportrate als die des Wildtyps

aufweisen, was den Elektronendruck am Photosystem I in den untersuchten Blättern der transgenen Linien erhöhen würde. Dies hätte möglicherweise zur Folge, dass im Fall der transgenen Linien das Photosystem I stärker inhibiert wird, was die im Vergleich zum Wildtyp verringerte Effizienz des Photosystems I in den untersuchten Blattscheiben der transgenen Linien erklären würde. So konnte unter Bedingungen, die eine Photoinhibition sowohl an Photosystem II als auch an Photosystem I zur Folge haben, durch Zugabe von DCMU, einem Inhibitor des linearen Elektronentransports, die Inhibition am Photosystem I vollständig unterbunden werden (Sonoike 1995). Weiterhin konnten Tjus et al. (1998) zeigen, dass eine verstärkte Inhibition von Photosystem II eine verringerte Inhibition von Photosystem I zur Folge hat. Demnach würde eine Inhibition des Photosystems II das Photosystem I vor weiterer Schädigung schützen können. Dieser schützende Effekt wäre in den transgenen Tabaklinien durch die Überexpression des *hpd*-Gens zumindest teilweise aufgehoben.

Unter Bedingungen, unter denen das Photosystem I verstärkt inhibiert wird, tritt aber zusätzlich zum linearen Elektronentransport auch ein cyclischer Elektronentransport um Photosystem I auf (Kim et al. 2001). Ob und in welchem Ausmaß dieser Prozess in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp verändert ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es muss aber berücksichtigt werden, dass mittels der hier verwendeten Bestimmung zur Effizienz von Photosystem I lediglich die Oxidierbarkeit von P700 gemessen wurde. Über die beteiligten Elektronenakzeptoren und -donoren kann mittels der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Bestimmungsmethode keine Aussage gemacht werden. In den transgenen Linien scheint es diesen Ergebnissen nach, unter den gewählten Bedingungen zu einer Störung des Gleichgewichts von Photosystem II und Photosystem I gekommen zu sein. So wäre das Photosystem II in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp zwar besser geschützt, insgesamt jedoch muss zukünftig geklärt werden, welche Folgen sich aus der verstärkten Inhibition des Photosystems I, insbesondere im Hinblick auf eine oxidative Schädigung, für die transgenen Linien ergeben.

Grundsätzlich scheint es nach bisherigen Befunden in der Literatur so zu sein, dass die Funktionen der Tocopherole durch andere Verbindungen, insbesondere Xanthophylle, übernommen werden können. So unterscheiden sich die Chlorophyllgehalte und die maximalen Effizienzen von Photosystem II tocopheroldefizienter Arabidopsis-Mutanten unter Starklichtbedingungen nur wenig

von den entsprechenden Wildtyppflanzen (Porfirova et al. 2002). Havaux et al. (2003) konnten zeigen, dass junge Blätter transgener Tabakpflanzen, welche eine verminderte Aktivität der GGDR zeigen und einen infolgedessen verminderten Tocopherolgehalt aufweisen, verstärkt Xanthophylle akkumulieren. Andererseits ist in Blättern der *npq1*-Mutante von *A. thaliana*, welche keine Aktivität der Violaxanthin-de-Epoxidase zeigt, eine erhöhte Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol während Photoakklimatisierung feststellbar (Havaux et al. 2000).

Bei der Untersuchung der Funktion von Antioxidantien muss also generell berücksichtigt werden, dass in Pflanzen keine einzelne Verbindung einen Schutz vor oxidativem Abbau von Molekülen vermitteln kann. Es ist vielmehr so, dass die einzelnen Verbindungen in ein Netzwerk antioxidativer Reaktionen eingebunden sind und so vermutlich der Ausfall einzelner Antioxidantien aufgefangen werden kann.

### 4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bieten eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen im Hinblick sowohl auf die Regulation der Biosynthese des Vitamins E als auch der Funktionen der Tocopherole und Tocotrienole in Höheren Pflanzen. Da gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression des *hpd*-Gens zwar zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes in Samen, unter normalen Bedingungen aber nicht in Blättern führt, ist es von Interesse zu untersuchen, welche anderen Faktoren limitierend für die Vitamin E-Biosynthese in Blättern sind. Dies könnte durch gentechnische Ansätze erreicht werden, durch die mehrere Gene, die für Enzyme der Vitamin E-Biosynthese kodieren, in das pflanzliche Genom eingebracht werden. Insbesondere die Kombination des für die Prephenat-Dehydrogenase kodierenden Gens mit dem *hpd*-Gen und dem für die HPT kodierenden Gen sollte eine deutliche Erhöhung des Tocopherolgehaltes möglich machen. In diesem Zusammenhang wäre es weiterhin wichtig, ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Homogentisat-Dioxygenase zu etablieren. Dieses würde es erlauben, den Einfluss des Homogentisat-Abbauweges auf den Tocopherolgehalt in Blättern zu klären.

Es konnte gezeigt werden, dass die das *hpd*-Gen überexprimierenden Tabakpflanzen eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Resistenz gegenüber Kühle und Licht zeigen. Hierbei konnte in den transgenen Linien eine erhöhte Effizienz von Photosystem II im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Sowohl der Tocopherolgehalt als auch der Gehalt an Plastochinon war in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp erhöht. Es müsste geklärt werden, ob der positive Effekt auf das Photosystem II ein Resultat der erhöhten Tocopherol- oder Plastochinongehalte ist. Dies könnte durch Inkubation der Blattscheiben mit DBMIB erfolgen. Dieses Herbizid unterbindet den Elektronentransport vom Plastohydrochinon zum Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex. Dadurch könnte ein vergleichbarer Redoxstatus des Plastochinons im Wildtyp und den transgenen Linien erreicht werden. Eine unter diesen Bedingungen auftretende höhere Effizienz von Photosystem II in den transgenen Linien könnte dann auf einen erhöhten Tocopherolgehalt zurückgeführt werden. Ein weiteres wichtiges Experiment wäre eine *run-on*-Analyse im Hinblick auf die Transkription von Photosynthesegenen. Durch einen, unter den Bedingungen von Kühle und Licht, möglicherweise im Vergleich zum Wildtyp veränderten Redoxstatus des Plastochinons in den Blättern

der transgenen Linien könnte sich ebenfalls eine veränderte Transkription von Photosynthesegenen ergeben. Ob die erhöhte Kapazität zur Tocopherol- und Plastochinonbiosynthese unter langanhaltenden Kühlebedingungen für die transgenen Pflanzen von Vorteil ist, könnte beispielsweise durch die Bestimmung der Biomasse von unter Kühle und Licht angezogenen Pflanzen geklärt werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase erfüllt eine zentrale Rolle im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel, da es an der Biosynthese sowohl des Vitamins E als auch des Plastochinons beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi) untersucht, die die für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierende cDNA aus Gerste überexprimieren.

Um transgene Linien mit einer erhöhten Kapazität zur Biosynthese von Vitamin E und Plastochinon auszuwählen, wurden Keimlinge auf dem Herbizid Mikado<sup>®</sup> angezogen. Dieses Herbizid führt zu einem Albino-Phänotyp der Keimlinge. Vier transgene Linien wurden ausgewählt, die eine um mindestens den Faktor 10 erhöhte Resistenz gegenüber Mikado<sup>®</sup> im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Es konnte mittels *Southern Blot*-Analyse gezeigt werden, dass das *hpd*-Gen aus Gerste in Blättern aller vier ausgewählten transgenen Tabaklinien vorhanden ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die untersuchten transgenen Linien aus vier voneinander unabhängigen Transformationsereignissen resultieren. Eine *Northern Blot*- sowie eine *Dot Blot*-Analyse zeigte, dass die Expression des *hpd*-Gens aus Gerste in Blättern keinen Einfluss auf die Transkriptgehalte endogener Gene hat, die für Enzyme der Vitamin E-Biosynthese kodieren.

Unterschiedliche Entwicklungsstadien der Pflanzen wurden hinsichtlich ihres Tocopherol- und Plastochinon-9-Gehaltes untersucht. Die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste führte nicht zu einer Erhöhung der Tocopherolgehalte in den Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Während der Seneszenz stieg der Tocopherolgehalt sowohl in den Wildtyppflanzen als auch in den transgenen Linien an. Während in nicht-seneszenten Blättern der transgenen Linien der Gehalt an Plastochinon-9 gegenüber dem Wildtyp nicht erhöht war, konnte ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Plastochinon-9-Gehalt während der Seneszenz festgestellt werden. Dieser erhöhte Plastochinon-9-Gehalt führte in den seneszenten Blättern der transgenen Linien zu einem im Vergleich zum Wildtyp erhöhten photochemischen *quenching*. Die Überexpression des *hpd*-Gens aus Gerste hatte jedoch keinen Einfluss auf den Seneszenzverlauf der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp.

Das in jungen Keimlingen gemessene  $\alpha$ -Tocopherol wird vermutlich aus dem in den Samen gespeicherten  $\gamma$ -Tocopherol gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt in zwei Wochen alten Keimlingen der transgenen Linien höher ist als in den entsprechenden Wildtypkeimlingen. Ebenfalls zeigte sich ein deutlich erhöhter Tocopherolgehalt in den unter Starklichtbedingungen angezogenen Keimlingen im Vergleich zu unter Schwachlichtbedingungen angezogenen Keimlingen. Neben  $\gamma$ -Tocopherol konnte im Samen von Tabak hauptsächlich  $\gamma$ -Tocotrienol detektiert werden. Beide Vitamin E-Formen wiesen eine gewebespezifische Verteilung innerhalb des Tabaksamens auf. So konnte  $\gamma$ -Tocopherol im Embryo,  $\gamma$ -Tocotrienol hingegen im Endosperm detektiert werden. Die Überexpression des *hpd*-Gens führte in Samen der transgenen Linien zu einem um bis zu Faktor zwei erhöhten Vitamin E-Gehalt im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypsamen. Dabei waren sowohl der  $\gamma$ -Tocopherolgehalt als auch der  $\gamma$ -Tocotrienolgehalt erhöht. Die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes ging nicht mit einer Veränderung des Lipidgehaltes, der Lipidzusammensetzung und der Fettsäurezusammensetzung einher.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es unter Kühlebedingungen in Kombination mit moderaten Bestrahlungsstärken sowohl zu einer erhöhten Tocopherol- als auch Plastochinonbiosynthese kommt. Diese war in den Blättern der transgenen Linien ausgeprägter als im Wildtyp. Die maximale Effizienz von Photosystem II zeigte einen unter diesen Bedingungen höheren Wert in den transgenen Linien. Demgegenüber war die Effizienz von Photosystem I im Vergleich zum Wildtyp in den transgenen Linien erniedrigt. Ebenfalls wiesen die transgenen Linien ein erhöhtes photochemisches *quenching* auf. Es wurde ein Modell zum Einfluss von Kühle und Licht auf die Photosysteme der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp aufgestellt.

## 5. Summary

The enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase fulfills a central role in plant secondary metabolism because it is a key enzyme in the biosynthesis of vitamin E as well as plastoquinone. In this thesis tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi), showing a constitutive overexpression of the cDNA encoding barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase were investigated.

In order to select several transgenic lines with a higher capacity for the biosynthesis of vitamin E and plastoquinone, seedlings were grown on a bleaching herbicide (Mikado<sup>®</sup>) which is known to competitively inhibit plant HPPD. As a result of the inhibition of the HPPD seedlings show an albino phenotype. Four transgenic lines could be selected by showing an up to tenfold higher resistance towards Mikado<sup>®</sup> compared to the wildtype. Genomic Southern analysis of these four transgenic lines revealed at least one intact copy of the cDNA encoding barley *hpd* in the selected transgenic tobacco lines. Furthermore, all four transgenic lines represent four individual transformation events. The barley *hpd* is expressed in the transgenic tobacco lines and the expression did not lead to changes in the transcript level of either the endogenous *hpd* gene, nor other genes encoding for enzymes of the vitamin E biosynthetic pathway in leaves as evident by Northern blot and dot blot analysis

Different developmental stages of the plants were analyzed with respect to their vitamin E- as well as their plastoquinone-9-content. The overexpression of the barley *hpd* did not lead to increased tocopherol levels in mature leaves of the transgenic tobacco lines. Though the tocopherol content in tobacco leaves is generally enhanced during senescence, this increase was comparable in leaves of the transgenic lines and the wildtype. In contrast, senescing leaves of the transgenic tobacco lines have a higher plastoquinone-9 content than the corresponding wild type leaves. This higher plastoquinone-9-content resulted in an increased photochemical quenching. However, these changes had no influence on leaf senescence in general in the transgenic lines.

During the first stages of tobacco seedling development a conversion of  $\gamma$ -tocopherol, which is localized in tobacco seeds, into  $\alpha$ -tocopherol seems to take place. Two week old seedlings of the transgenic lines showed a higher  $\alpha$ -tocopherol content than

the wild type seedlings. The tocopherol content in seedlings grown under high light conditions was tenfold higher than in seedlings grown under low light conditions. In tobacco seeds the main vitamin E forms are  $\gamma$ -tocopherol as well as  $\gamma$ -tocotrienol and both forms occur in almost equal amounts. Both forms showed a spatial distribution within the tobacco seeds.  $\gamma$ -tocopherol seems to be localised mainly in the embryo while  $\gamma$ -tocotrienol seems to be restricted to the endosperm fraction of the seeds. Constitutive overexpression of barley *hpd* resulted in an almost twofold higher vitamin E content in the seeds of the transgenic lines compared to the wild type and both forms were likewise affected. These alterations in the vitamin E content did not coincide with a change in lipid content, lipid or fatty acid composition.

Chilling temperatures in combination with moderate irradiances led to an increase of the  $\alpha$ -tocopherol- as well as the plastoquinone-9-content in tobacco leaves. However, leaves of the transgenic lines showed a higher increase in both components compared to the wild type leaves. The efficiency of photosystem II was higher in the transgenic lines compared to the wild-type after application of chilling temperatures and moderate irradiances. In contrast to this, the efficiency of photosystem I was lower in the transgenic lines compared to the wild type. Furthermore, the transgenic lines showed a higher photochemical quenching after incubation at low temperatures and moderate irradiances. A model was proposed with regard to the influence of chilling temperatures in combination with moderate irradiances to the photosystems of the transgenic lines compared to the wild type.

## 6. Literaturverzeichnis

- Addlesee HA, Gibson LCD, Jensen PE, Hunter CN (1996) Cloning, sequencing and functional assignment of the chlorophyll biosynthesis gene, chlP, of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* **389**: 126-130
- Ajjawi I, Shintani D (2004) Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. *Trends Biotechnol* **22**: 104-107
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 275-335
- Allen JF (2003) State transitions—a question of balance. *Science* **299**: 130-1532
- Anderson JM, Andersson B (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar conversion. *Trends Biochem Sci* **13**: 351-355
- Arango Y, Heise K-P (1998) Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase. *Biochem J* **336**: 531-533
- Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**: 113-134
- Asada K (1996) Radical production and scavenging in chloroplasts. In NR Baker (ed) *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht: 123-150
- Azzi A, Stocker A (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res* **39**: 231-255
- Barta IC, Böger P (1996) Purification and Characterization of 4-Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase From Maize. *Pestic Sci* **48**: 109-116
- Barber J, Andersson B (1992) Too much of a good thing can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**: 61-66
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants *Planta* **210**: 215-221
- Bergmüller E, Porfirova S, Dörmann P (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol* **52**: 1181-1190
- Berry-Lowe SL, Meagher RB (1985) Transcriptional regulation of a gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean tissue is linked to the phytochrome response. *Mol Cell Biol* **5**: 1910-1917
- Birnboim HC, Doley J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1523

- Bramley P, Elmadfa I, Kafatos A, J. KF, Manios Y, Rexborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH (2000) Vitamin E. *J Sci Food Agric* **80**: 913-938
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* **76**: 703-716
- Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB* **13**: 1145-1155
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* **48**: 191-199
- Burton GW, Ingold KU (1986) Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res* **19**: 194-201
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke T, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol* **21**: 1082-1087
- Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**: 2343-2356
- Chrost B, Falk J, Kernebeck B, Mölleken H, Krupinska K (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts - a mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization ? In JH Argyroudi-Akoyunoglou, H Senger (eds) *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht: 171-176
- Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 1113-1124
- Collakova E, DellaPenna D (2003a) Homogentisate phytyltransferase is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **131**: 632-642
- Collakova E, DellaPenna D (2003b) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol* **133**: 1-11
- Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ (1993)  $\gamma$ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to  $\alpha$ -Tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1771-1775
- Dähnhardt D (2003) Untersuchungen zur Regulation der seneszenzabhängig exprimierten Gene *hpd* und *HvS40* der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und subzelluläre Lokalisation des HvS40 Proteins. Dissertation der CAU zu Kiel

- Dähnhardt D, Falk J, Appel J, van der Kooij TAW, Schulz-Friedrich R, Krupinska K (2002) The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett* **523**: 177-181
- Dertinger U, Schaz U, Schulze E-D (2003) Age-dependence of the antioxidant system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiol Plant* **119**: 19-29
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 599-626
- De Tullio MC, Arrigoni O (2003) The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Sci Res* **13**: 249-260
- d'Harlingue A, Camara B (1985) Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis: purification and characterization of a gamma-tocopherol methyltransferase. *J Biol Chem* **260**: 15200-15203
- Dörmann P (2003) Corn with enhanced antioxidant potential. *Nat Biotechnol* **21**: 1015-1016
- Dolde D, Vlahakis C, Hazebroek J (1999) Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition and temperature during development. *JAOCS* **76**: 349-355
- Dunphy PJ, Whittle KJ, Pennock JF, Morton RA (1965) Identification and estimation of tocotrienols in Hevea Latex. *Nature* **207**: 521-522
- Durand R, Zenk MH (1974) Enzymes of the homogentisate ring-cleavage pathway in cell suspension cultures of higher plants. *FEBS Lett* **39**: 218-220
- Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk MH, Bacher A (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol* **5**: 221-233
- Elstner EF (1990) Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin. *BI Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich*
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **276**: 22901-22909
- Falk J, Krahnstöver A, van der Kooij TAW, Schlensog M, Krupinska K (2004) Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from two cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry*, im Druck
- Falk J, Krauß N, Dähnhardt D, Krupinska K (2002) The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J Plant Physiol* **159**: 1245-1253
- Fernández-Canón JM, Penalva MA (1995) Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *Aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. *J Biol Chem* **36**: 21199-21205

- Fiedler E, Soll J, Schultz G (1982) The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* **155**: 511-515
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696-717
- Fritze IM, Linden L, Freigang J, Auerbach G, Huber R, Steinbacher S (2004) The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* **134**: 1388-1400
- Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ* **15**: 381-392
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* **13**: 207-209
- Garcia I, Job D, Matringe M (2000) Inhibition of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketone nitrile of Isoxaflutole: a case of half-site reactivity. *Biochemistry* **39**: 7501-7507
- Garcia I, Rodgers M, Lenne C, Rolland A, Sailland A, Matringe M (1997) Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem J* **325**: 761-769
- Garcia I, Rodgers M, Pepin R, Hsieh T-F, Matringe M (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **119**: 1507-1516
- Gechev T, Willekens H, van Montagu M, Inzé D, van Camp W, Toneva V, Minkov I (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* **160**: 509-515
- Geiger M, Badur R, Kunze I, Sommer S (2001) Changing the fine chemical content in organisms by genetically modifying the shikimate pathway. WO 02/00901 (SunGene)
- Goffmann FD, Becker HC (2002) Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of *Brassica napus* L. *Euphytica* **125**: 189-196
- Goffmann FD, Böhme T (2001) Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *J Agr Food Chem* **49**: 4990-4994
- Goffmann FD, Thies W, Velasco L (1999) Chemotaxonomic value of tocopherols in *Brassicaceae*. *Phytochemistry* **50**: 793-798
- Gomez-Fernandez JC, Villalain J, Aranda FJ, Ortiz A, Micol V, Coutino A, Beberan-Santos MN, Prieto MJ (1989) Localization of  $\alpha$ -tocopherol in membranes. *Ann New York Acad Sci* **570**: 109-120
- Goodwin BL (1972) The biochemical, physiological, and clinical significance of p-hydroxyphenylpyruvate oxidase. In BL Goodwin (ed) Tyrosine Catabolism. Oxford University Press, Oxford, UK

- Gottstein T, Grosch W (1990) Model study of different antioxidant properties of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherol in fats. *Fat Sci Technol* **92**: 139-144
- Grams GW, Blessin CW, Inglett GE (1995) Distribution of tocopherols within the corn kernel. *JAOCS* **47**: 337-339
- Graßes T, Grimm B, Korroleva O, Jahns P (2001) Loss of a-tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* **213**: 620-628
- Grossmann S, Waksman EG (1984) New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by  $\alpha$ -tocopherol. *Int J Biochem* **16**: 281-289
- Grusack MA, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 133-161
- Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **3**: 147-151
- Havaux M, Davaud A (1994) Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem II activity. Preferential inactivation of photosystem I. *Photosynth Res* **40**: 75-92
- Havaux M, Lütz C, Grimm B (2003) Chloroplast membrane stability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol* **132**: 273-284
- Havaux M, Bonfils J-P, Lütz C, Niyogi KK (2000) Photodamage to the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol* **124**: 273-284
- Hensel LL, Grbíc V, Baumgarten DA, Bleecker AB (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 553-564
- Herbers K (2003) Vitamin production in transgenic plants. *J Plant Physiol* **160**: 821-829
- Hernandez-Pinzon I, Ross JH, Barnes KA, Damant AP, Murphy DJ (1999) Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta* **208**: 588-598
- Hess JL (1993) Vitamin E, a-tocopherol. In RG Alscher (ed) Antioxidants in Higher Plants. *CRC Press Inc, Boca Raton*: 112-134
- Hetherington SE, He J, Smilie RM (1989) Photoinhibition at low temperature in chilling sensitive and resistant plants. *Plant Physiol* **90**: 1609-1615
- Hideg É, Kálai T, Hideg K, Vass I (2000) Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition? *Phil Trans R Soc Lond B* **355**: 1511-1516

- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* **16**: 9877
- Höfgen R, Willmitzer L (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci* **66**: 221-230
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1994) Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiol* **106**: 415-420
- Huang AHC (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol* **110**: 1055-1061
- Hull MR, Long SP, Jahnke LS (1997) Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Aust J Plant Physiol* **24**: 337-343
- Humbeck K, Quast S, Krupinska K (1996) Functional and molecular changes in photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ* **19**: 337-344
- Ishiko H, Shigeoka S, Nakano Y, Mitsunaga T (1992) Some properties of  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase solubilized from spinach chloroplasts. *Phytochemistry* **31**: 1499-1500
- Janiszowska W (1987) Intracellular localization of tocopherol biosynthesis in *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* **26**: 1403-1407
- Janiszowska W, Jasinska R (1982) Intracellular localization of labelling of tocopherols with [U-<sup>14</sup>C]tyrosine in *Calendula officinalis* leaves. *Acta Biochim Pol* **29**: 37-44
- Jefford CW, Cadby PA (1981) Evaluation of the models for the mechanism of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Experientia* **37**: 1134-1137
- Kagan VE, Quinn PJ (1988) The interaction of  $\alpha$ -tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid dispersions, a fluorescence probe study. *Eur J Biochem* **171**: 661-667
- Kaiser S, Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1990) Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by the tocopherols. *Arch Biochem Biophys* **277**: 101-108
- Kamal-Eldin A, Andersson R (1997) A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *JAOCS* **74**: 375-380
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701
- Keller Y, Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* **251**: 413-4174
- Kleber-Janke T, Krupinska K (1997) Isolation of cDNA clones showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced as well as during senescence under field conditions. *Planta* **203**: 332-340

- Kim S-J, Lee C-H, Hope AB, Chow WS (2001) Inhibition of photosystems I and II and enhanced back flow of photosystem I electrons in cucumber leaf discs chilled in the light. *Plant Cell Physiol* **42**: 842-848
- Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB (1990) Different and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**: 1201-1224
- Kühr V (2002) Entwicklungsabhängige Regulation des Abbaus aromatischer Aminosäuren im Gerstenblatt. Diplomarbeit der CAU zu Kiel
- Kunert KJ, Ederer M (1985) Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiol Plant* **65**: 85-88
- Kruk J, Strzalka K, Leblanc RM (1992) Monolayer study of plastoquinones, a-tocopherol quinone, their hydroquinone forms and their interaction with monogalactosyldiacylglycerol. Charge transfer complexes in a mixed monolayer. *Biochim Biophys Acta* **1112**: 19-26
- Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P (1997) Acclimation by suboptimal growth temperatures diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant Cell Environ* **20**: 366-372
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350-383
- Lichtenthaler HK (1998) The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett* **100**: 128-138
- Lichtenthaler HK, Sprey B (1966) Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloroplasten. *Z Naturforsch* **21b**: 690-697
- Linden L (2000) Isolierung, Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation eukaryotischer 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen – Röntgenstrukturanalyse von Inhibitor-Komplexen der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation der TU München
- Marshall PS, Morris SR, Threlfall DR (1985) Biosynthesis of tocopherols: a re-examination of biosynthesis and metabolism of 2-demethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol. *Phytochemistry* **24**: 1705-1711
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET (2003) Maize phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J Exp Bot* **54**: 2215-2230
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659-668
- Motohashi R, Ito T, Kobayashi M, Taji T, Nagata N, Asami T, Yoshida S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *Plant J* **34**: 719-731

- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**: 31-57
- Munné-Bosch S, Falk J (2004) New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* **218**: 232-326
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for the growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Neely WC, Martin JM, Barker SA (1988) Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochem Photobiol* **48**: 423-428
- Newton RP, Pennock JF (1971) The intracellular distribution of tocopherols in plants. *Phytochemistry* **10**: 2323-2328
- Niki E, Kawakami A, Saito M, Yamamoto Y, Tsuchiya J, Kamiya Y (1985) Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J Biol Chem* **260**: 2191-2196
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Norris SR, Barette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in Arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139-2149
- Norris SR, Shen X, DellaPenna D (1998) Complementation of the Arabidopsis pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* **117**: 1317-1323
- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, Kamiya Y (2000) Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**: 1045-1056
- Pallet KE, Cramp SM, Little JP, Veerasekaran P, Crudace AJ, Slater AE (2001) Isoxaflutole: the background to its discovery and the basis of its herbicidal properties. *Pest Manag Sci* **57**: 133-142
- Peterson DM (1995) Oat Tocols: Concentration and stability in oat products and distribution within the kernel. *Cereal Chem* **72**: 21-24
- Pfannschmidt T (2002) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* **8**: 33-41
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628
- Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P (2002) Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12495-12500
- Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 15-44

- Provencher LM, Miao L, Sinha N, Lucas WJ (2001) Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signalling. *Plant Cell* **13**: 1127-1141
- Que LJ, Ho RYN (1996) Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme activation sites. *Chem Rev* **96**: 2607-2624
- Rippert P, Matringe M (2002) Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **269**: 4753-4761
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M (2004) Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol* **134**: 92-100
- Rise M, Cojocar M, Gottlieb HE, Goldschmidt EE (1989) Accumulation of  $\alpha$ -Tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiol* **89**: 1028-1030
- Rock CD, Zeevaart JAD (1991) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7496-7499
- Rojas Stütz MC, Römer S (2003) Characterisation of transgenic tobacco with bacterial genes encoding the geranylgeranyl pyrophosphate synthase and/or phytoene synthase. In: 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Tagungsband der ISPMB, Barcelona 23.-28. Juni 2003
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Press, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432
- Savidge B, Weiss JD, Wong YHH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 321-332
- Schopfer P, Plachy C, Frahy G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (Superoxide radicals, Hydrogen peroxide, and Hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin and abscisic acid. *Plant Physiol* **125**: 1591-1602
- Schreiber U, Klughammer C, Neubauer C (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Z Naturforsch* **43c**: 686-698

- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**: 51-62
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett* **318**: 162-166
- Secor J (1994) Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione. *Plant Physiol* **106**: 1429-1433
- Shah DM, Hightower RC, Meagher RB (1983) Genes encoding actin in higher plants: intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. *J Mol Appl Genet* **2**: 111-126
- Shamovski IL, Yarovskaya IY (1991) Computer molecular simulation of tocopherol/two phospholipid complexes. *J Chim Phys* **88**: 2675-2680
- Shintani DK, DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**: 2098-2100
- Shintani DK, Cheng Z, DellaPenna D (2002) The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* **511**: 1-5
- Soll J (1987)  $\alpha$ -Tocopherol and plastoquinone synthesis in chloroplasts membranes. *Methods Enzymol* **148**: 383-392
- Soll J, Kemmerling M, Schultz G (1980) Tocopherol and plastoquinone biosynthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch Biochem Biophys* **204**: 544-550
- Soll J, Schultz G (1979) Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochem Biophys Res Comm* **91**: 715-720
- Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **238**: 290-299
- Sonoike K (1995) Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. *Plant Cell Physiol* **36**: 825-830
- Sonoike K (1996a) Degradation of *psaB* gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. *Plant Sci* **115**: 157-164
- Sonoike K (1996b) Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiol* **37**: 239-247
- Sonoike K, Terashima I (1994) Mechanism of photosystem-I-photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L.. *Planta* **194**: 287-293

- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Stocker A, Fretz H, Frick H, Rüttimann A, Woggon WD (1996) The substrate specificity of tocopherol cyclase. *Bioorg & Med Chem* **7**: 1129-1134
- Tanaka R, Oster U, Kruse E, Rüdiger W, Grimm B (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll II and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll II in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol* **120**: 695-704
- Terashima I, Funayama S, Sonoike K (1994) The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* **193**: 300-306
- Terashima I, Noguchi K, Itoh-Nemoto T, Park Y-M, Kubo A, Tanaka K (1998) The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of *Cucumis sativus*, a chilling-sensitive plant. *Physiol Plant* **103**: 295-303
- Tevini M, Steinmüller D (1985) Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta* **163**: 91-96
- Thomas M, Foote CS (1978) Chemistry of oxygen. XXVI. Photooxygenation of phenols. *Photochem Photobiol* **27**: 683-693
- Thompson JE, Legge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* **105**: 317-344
- Ting JTL, Wu SSH, Ratnayake C, Huang AHC (1998) Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant J* **16**: 541-551
- Tjus SE, Møller BL, Scheller HV (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiol* **116**: 755-764
- Tjus SE, Scheller HV, Andersson B, Møller BL (2001) Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiol* **125**: 2007-2015
- Tomoeda K, Awata H, Matsuura T, Matsuda I, Ploechl E, Milovac T, Boneh A, Scott R, Danks DM, Endo F (2000) Mutations in the 4-Hydroxyphenylpyruvic acid Dioxygenase gene are responsible for Tyrosinemia Type III and Hawkinsinuria. *Mol Genet Metab* **71**: 506-510
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **516**: 156-160
- Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D (2003) Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* **40**: 913-920

- van Kooten O, Snell JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* **25**: 147-150
- Wang X, Quinn PJ (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* **38**: 309-336
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer B, von Linting J (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 523-534
- Whistance GR, Threlfall DR (1970) Biosynthesis of phytoquinones; homogentisic acid: a precursor of plastoquinones, tocopherols and alpha-tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue-green algae. *Biochem J* **117**: 593-600
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, Martinez de Ilarduya O, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C (2000) A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol* **124**: 1582-1594
- Wise RR, Naylor AW (1987) Chilling enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol* **83**: 278-282
- Wu SSH, Platt KA, Ratnayake C, Wang T-W, Ting JTL, Huang AHC (1997) Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12711-12716
- Yamauchi R, Matsushita S (1977) Quenching effect of tocopherols on the methyl linoleate photooxidation and their oxidation products. *Agric Biol Chem* **41**: 1425-1430

## Liste der eigenen Veröffentlichungen:

Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves.

*FEBS Lett* **540**: 35-40

## Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Falk J, Andersen G, Krauß N, Krupinska K (2000) Expression der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase während der Seneszenz und unter Streßbedingungen. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Jena*, S. 310

Falk J, Andersen G, Dähnhardt D, Krupinska K (2001) Expression of the barley gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is related to senescence and stress. *In: Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Tagungsband der Society for free radical research, Nizza*, S. 99

Falk J, Andersen G, Brosch M, Krupinska K (2002) Molecular strategies to elucidate the biosynthesis and functions of vitamin E in plants. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Freiburg*, S. 166

Andersen G, Falk J, Krupinska K (2003) Elevating the vitamin E content in tobacco seeds by constitutive overexpression of barley 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Tagungsband des 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona*, S. 185

Andersen G, Falk J, Krupinska K (2003) Characterization of transgenic tobacco plants with enhanced capacity for vitamin E biosynthesis. *Free Rad Res 37 (Supplement 2)*, S. 40

Andersen G, Falk J, Krupinska K (2004) Transgenic tobacco with elevated biosynthetic capacity of vitamin E show increased protection of photosystem II under stress conditions. *Acta Physiol Plant 26 (Supplement 3)*, S. 190

Andersen G, Falk J, Krupinska K (2004) Transgenic tobacco with elevated biosynthetic capacity of vitamin E show increased protection of photosystem II under stress conditions. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig*, S. 432

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Überlassung des Themas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken. Ganz ausdrücklich danke ich ihr für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für ihre jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jon Falk für die Betreuung bei der Bearbeitung des Themas sowie für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Sein Enthusiasmus, seine Motivation und auch seine Kritik haben in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bilger danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, in seiner Abteilung PAM-Messungen durchführen zu können.

Dr. Christine Desel danke ich für ihren wertvollen Tipps und Anregungen sowie für ihr stets „offenes“ Ohr für meine Probleme und Problemchen.

Herrn Pfeiffer danke ich für die Hilfestellung bei der Anfertigung und Visualisierung der Querschnitte der Tabaksamen.

Bei Anke, Susanne und Ulrike möchte ich mich für die Rat & Tat-Unterstützung in allen Laborfragen bedanken. Susanne und Ulrike danke ich im besonderen für die Hilfe bei der Pflege der Tabakpflanzen.

Anne-Kathrin, Evelyn, Isabell, Jens, Kirsten, Lenard, Mostafa, Nicole, Thorsten sowie allen anderen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Krupinska danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und eine tolle Zeit im Labor und anderswo. Mario möchte ich außerdem für seine Hilfestellung bei der Anfertigung des *Dot Blots* danken.

Bei Frau Uhing-de Moll möchte ich mich für ihre Einsatzbereitschaft und Hilfe bei allen bürokratischen Fragen und Problemen bedanken.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 820 sei an dieser Stelle ganz ausdrücklich für die tollen Seminare, insbesondere in Salza, und die vielen bereichernden Gespräche und Diskussionen gedankt.

Ein großer Dank gilt Markus, der mir in dieser nicht immer leichten Zeit der Promotion mit viel Verständnis und Geduld zur Seite stand.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die mich stets unterstützt und darin bestärkt hat, meine Ziele zu verfolgen. Die vielen gemeinsamen Sonntag-Nachmittage, die mich zumindest kurzfristig meine Arbeit vergessen ließen, haben mir sehr geholfen, durchzuhalten. Meiner Mutter danke ich im besonderen dafür, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht hat.

Es ist vollbracht!

Ihnen und Euch allen: Vielen Dank!!!

# Lebenslauf

**Gaby Andersen**

## Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 25.02.1972  
Geburtsort: Kappeln/Schlei  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung:

08/1978-06/1982 Grundschule Steinbergkirche  
08/1982-06/1988 Realschule Sterup  
Abschluss: mittlere Reife  
08/1990-06/1991 Fachoberschule für Sozialwirtschaft und Sozialpädagogik, Flensburg  
Abschluss: Fachhochschulreife

## Weitergehende Ausbildung und berufliche Tätigkeiten:

08/1988-07/1990 Ausbildung zur Apothekenhelferin in der Angler Apotheke, Steinbergkirche  
Abschluss: Apothekenhelferbrief  
10/1991-09/1992 Apothekenhelferin in der Ostsee-Apotheke, Glücksburg  
10/1992-05/1999 Studium der Lebensmittelchemie an der Bergischen-Universität-Gesamthochschule Wuppertal  
Hochschulabschluss: 1. Staatsexamen  
seit 06/1999 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. Krupinska am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation enthalten:

Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves.

FEBS Lett 540: 35-40

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den 15.09.04

(Gaby Andersen)