

Aus dem Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)  
Gatersleben

Direktor Prof. Dr. U. Wobus

DISSERTATION

**Untersuchungen zu den Folgen der  
Photosensibilisierung durch akkumulierende  
Tetrapyrrole in transgenen Tabakpflanzen**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Ulrich Keetman

geb. am 13.01.1972 in Guben

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter:       1. Prof. Dr. T. Börner  
                      2. Prof. Dr. T. Buckhout  
                      3. Prof. Dr. B. Grimm

Eingereicht am: 17.05.2000

Datum der Promotion: 27.09.2000



Blatt einer porphyrischen Pflanze der Linie 1/41, die Antisense-RNA für Coproporphyrinogen-Oxidase exprimiert. Wegen der erniedrigten Enzymaktivität kommt es zur Akkumulation und nachfolgenden unspezifischen Oxidation des photosensibilisierenden Substrates, was letztendlich zur Ausbildung von Läsionen führt.

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1	OXIDATIVER STREß IN PFLANZEN.....	5
3.1.1	<i>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Schadwirkung .....</i>	<i>5</i>
3.1.1.1	Photosensibilisierung und ROS-Erzeugung .....	7
3.1.2	<i>Antioxidative Schutzmechanismen in Pflanzen .....</i>	<i>8</i>
3.1.2.1	Nicht-enzymatische Schutzmechanismen .....	9
3.1.2.2	Eine Kette von antioxidativen Schutzenzymen - Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus .....	9
3.2	SIGNALTRANSDUKTION BEI OXIDATIVEM STREß UND PATHOGENINFEKTIONEN .....	12
3.2.1	<i>Die Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der Hypersensitivitätsreaktion (HR) und systemisch erworbener Resistenz (SAR) .....</i>	<i>13</i>
3.2.2	<i>Weitere Signalüberträger bei Streß- und Abwehrreaktionen.....</i>	<i>14</i>
3.2.3	<i>Oxidativer Streß und Kontrolle der Genexpression.....</i>	<i>15</i>
3.3	GENERIERUNG VON ROS IN EXPERIMENTELLEN SYSTEMEN – AUSGEWÄHLTE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE .....	16
3.3.1	<i>Blattläsionen infolge von programmiertem Zelltod in unterschiedlichen experimentellen Systemen.....</i>	<i>16</i>
3.4	PORPHYRISCHE PFLANZEN UND OXIDATIVER STREß.....	17
3.4.1	<i>Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen .....</i>	<i>17</i>
3.4.2	<i>Die Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese.....</i>	<i>21</i>
3.4.3	<i>Transgene Pflanzen und Mutanten mit beeinträchtigter Tetrapyrrolbiosynthese.....</i>	<i>22</i>
3.5	NEUERE METHODISCHE ANSÄTZE ZUR UNTERSUCHUNG VON ZELLULÄREN STREß- UND ABWEHRREAKTIONEN .....	23
<b>4</b>	<b>ZIELE DIESER ARBEIT .....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
5.1	CHEMIKALIEN UND ENZYME .....	27
5.2	HÄUFIG VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDPRIMER.....	27
5.3	NÄHRMEDIEN .....	28
5.4	PFLANZENANZUCHT UND PROBENNAHME .....	29
5.4.1	<i>Transgene Pflanzen mit nekrotischem Phänotyp .....</i>	<i>30</i>
5.4.2	<i>Induzierbares ZelltodsysteM - „Lichtshift“-Experimente .....</i>	<i>30</i>
5.4.3	<i>Lichtshift-Experiment bei niedrigem O<sub>2</sub>-Partialdruck.....</i>	<i>31</i>
5.5	STREßEXPERIMENTE AN AUSGESTOCHENEN BLATTSCHLEIBEN.....	31
5.6	KREUZUNG VON TABAKPFLANZEN .....	32
5.7	GENTECHNISCHE ARBEITEN .....	33

5.7.1	<i>Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA</i> .....	34
5.7.2	<i>Transfertechniken für RNA und DNA (Northern und Southern Blot) und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden</i> .....	35
5.7.3	<i>Konstruktion einer subtrahierten cDNA-Bank mittels „Subtraktiver Suppressions-Hybridisierung“ (SSH)</i> .....	36
5.7.3.1	Allgemeine Ausführungen zum Prinzip der Methode.....	36
5.7.3.2	Details der Durchführung.....	39
5.7.4	<i>Vergleich der Expression verschiedener Transkripte durch Reverse Northern Blots</i> .....	39
5.7.4.1	Erzeugen von Membranen mit regelmäßig angeordneter DNA (Arrays): Kolonie-PCR und Southern Blot, Kolonie-Lifts, Spot Blots.....	39
5.7.4.2	Differentielles Durchmusterung (Screening) der subtrahierten cDNA-Bank.....	40
5.7.5	<i>Erststrangsynthese zur Erzeugung von radioaktiv markierten einzelsträngigen cDNA-Sonden</i> .....	41
5.7.6	<i>Durchmusterung einer in Bakteriophagen verpackten Tabak-cDNA-Bank nach Vollängenklonen</i> .....	42
5.7.7	<i>DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse</i> .....	42
5.7.8	<i>Erstellen von Antisense-Konstrukten für GRP und das Tabakhomologe zu Hap5b</i> .....	43
5.7.9	<i>Pflanzentransformation und Regeneration von transgenen Pflanzen in Sterilkultur</i> .....	43
5.7.10	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blots</i> .....	44
5.7.11	<i>Durchmusterung einer A. thaliana-cDNA-Bank im Shuttle-Vektor pFL61 – Allgemeine Methoden bei der Arbeit mit S. cerevisiae</i> .....	44
5.8	BIOCHEMISCH-ANALYTISCHE METHODEN.....	46
5.8.1	<i>Quantitative Analyse von niedermolekularen Verbindungen</i> .....	46
5.8.1.1	Qualitative und quantitative Bestimmung der Chlorophyllvorstufen mittels HPLC.....	46
5.8.1.2	Bestimmung von Chlorophyll- und Gesamtcarotinoidgehalt.....	46
5.8.1.3	Bestimmung des Gehaltes an thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS).....	47
5.8.1.4	Messung der Bildung von Ethan als weiteres Maß für Lipidperoxidation.....	47
5.8.1.5	Niedermolekulare Antioxidantien: Ascorbat, Glutathion, Tocopherol.....	48
5.8.1.6	Quantifizierung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
5.8.1.7	Quantifizierung der phenolischen Verbindungen Salicylat, Chlorogensäure und Scopolin.....	50
5.8.2	<i>Nachweis der Aktivität von Enzymen – Enzymassays</i> .....	52
5.8.2.1	Bestimmung des Gehaltes an löslichem Protein in Extrakten.....	52
5.8.2.2	Trennung und Visualisierung von Isoformen der Superoxid-Dismutase durch nicht-denaturierende PAGE.....	52
5.8.2.3	Bestimmung der Gesamtaktivitäten von APX, MDAR, DHAR und GR.....	53
5.9	WEITERE METHODEN.....	54
5.9.1	<i>Bestimmung der Photosynthese- und Atmungsraten durch Gaswechsellmessungen</i> .....	54
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
6.1	UNTERSUCHUNGEN AN PFLANZEN MIT BEREITS AUSGEPRÄGTEM, PHOTODYNAMISCH VERURSACHTEM PHÄNOTYP.....	56
6.1.1	<i>Der Phänotyp der Pflanzen</i> .....	56

6.1.2	<i>Molekulare Ursachen für den nekrotischen Phänotyp</i> .....	58
6.1.3	<i>Oxidativer Streß und antioxidatives Schutzsystem in UROD- und CPO-AS-Pflanzen</i> .....	59
6.1.3.1	Aktivierung des antioxidativen Schutzsystems infolge von photooxidativem Streß.....	59
6.1.3.1.1	Aktivitätsanstieg der SOD.....	59
6.1.3.1.2	Aktivierung der meisten Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus.....	60
6.1.3.1.3	Anstieg der Transkript- und Proteinakkumulation antioxidativer Schutzenzyme.....	62
6.1.3.1.4	Verringerte Reduktionskapazität der niedermolekularen Antioxidantien.....	64
6.1.3.1.5	Verstärkte Lipidperoxidation als Anzeichen für Membranschädigung.....	66
6.1.4	<i>Physiologische Auswirkungen von tetrapyrrol-induziertem oxidativen Streß auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation</i> .....	67
6.1.4.1	CO <sub>2</sub> -Assimilationsraten in Abhängigkeit der photosynthetisch aktiven Strahlung (Lichtkurven).....	67
6.1.4.2	Nettoassimilation in Abhängigkeit von der CO <sub>2</sub> -Konzentration (A-c <sub>i</sub> -Kurven).....	68
6.1.5	<i>Aktivierung von pathogenese-assoziierten Prozessen in porphyrischen Pflanzen</i> .....	69
6.2	UNTERSUCHUNGEN AN PORPHYRISCHEN PFLANZEN, IN DENEN DER NEKROTISCHE PHÄNOTYP DURCH DIE VERÄNDERUNG VON UMWELTBEDINGUNGEN INDUZIERT WIRD.....	70
6.2.1	<i>Umweltabhängigkeit der Ausbildung von Blattläsionen</i> .....	70
6.2.1.1	Abhängigkeit der Bildung von Nekrosen von der Lichtmenge – das Lichtshift-Experiment.....	70
6.2.1.2	Verstärkung der Lichtabhängigkeit der Nekrosenbildung durch erhöhte Temperaturen.....	73
6.2.1.3	Strikte Abhängigkeit der Bildung von Blattläsionen in porphyrischen Pflanzen vom Sauerstoffpartialdruck.....	73
6.2.2	<i>Identifizierung von frühzeitig induzierten Genen als Reaktion auf photodynamisch erzeugten oxidativen Streß durch Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH)</i> .....	74
6.2.2.1	Daten zur Effizienz der Subtraktion mittels SSH.....	75
6.2.2.1.1	Allgemeine Angaben zur Größe der differentiellen cDNA-Bank.....	75
6.2.2.1.2	Angaben zur Redundanz von cDNA-Klonen.....	75
6.2.2.1.3	Sequenzierung der cDNA-Inserts.....	76
6.2.2.1.4	Erneutes Überprüfen der differentiellen Expression durch Reverse und konventionelle Northern Blots.....	76
6.2.2.2	Liste der differentiell exprimierten Gene.....	79
6.2.2.3	Northern Blot-Analyse ausgewählter, im Lichtshift-Experiment induzierter Gene.....	91
6.2.2.4	Northern Blot-Analyse der Expression von Genen des antioxidativen Schutzsystems im Lichtshift-Experiment.....	94
6.2.2.5	Northern Blot-Analyse ausgewählter Gene aus der subtrahierten cDNA-Bank unter dem Einfluß anderer Stressoren.....	96
6.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM GLY-REICHEN PROTEIN (GRP) UND CHARAKTERISIERUNG VON GRP-AS-PFLANZEN.....	99
6.4	ALTERNATIVER ANSATZ ZUR ISOLATION VON PFLANZLICHEN GENEN, DIE STREßTOLERANZ BZW. -RESISTENZ VERMITTELN.....	102
6.5	ERGEBNISSE DER BEGLEITENDEN BIOCHEMISCHEN ANALYSE WÄHREND DES LICHTSHIFT-EXPERIMENTS.....	104
6.5.1	<i>Veränderungen von Chlorophyll- und Carotinoidgehalt</i> .....	104
6.5.2	<i>Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme und Gehalt an niedermolekularen</i>	

<i>Antioxidantien während des Lichtshift-Experiments</i> .....	106
6.5.2.1    Analyse der Aktivität verschiedener Isoformen der SOD mittels nicht-denaturierender PAGE ....	106
6.5.2.2    Aktivität ausgewählter Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus: APX und GR .....	109
6.5.2.3    Einfluß des Lichtshift-Experiments auf die Proteinmenge von APX und Catalase.....	110
6.5.2.4    Niedermolekulare Antioxidantien im Lichtshift-Experiment: Ascorbat, Glutathion und Tocopherol .....	111
6.5.2.5    Indikatoren für Lipidperoxidation und Membranschädigung im Lichtshift-Experiment: Nachweis von Ethan und TBA-RS .....	115
6.5.3 <i>Kinetik der Akkumulation von pathogenese-assoziierten Substanzen im Lichtshift-Experiment</i> .....	116
6.5.3.1    Untersuchungen zur phenolischen Verbindung Scopolin, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Salicylsäure .....	117
6.5.3.2    Western Blot-Analyse von pathogenese-assoziierten Proteinen im Lichtshift-Experiment .....	120
6.5.4 <i>Versuche zur Detektion von prä-nekrotischen Veränderungen im Blattgewebe porphyrischer Pflanzen durch noninvasive Techniken</i> .....	121
6.5.4.1    Analyse von räumlich aufgelösten Chlorophyll-Fluoreszenzparametern an Blättern (Leaf fluorescence imaging) .....	121
6.5.4.2    Infrarot (IR)-Photographie von Blättern (Thermographie).....	122
6.5.4.3    Gaswechsellmessungen während des Lichtshift-Experiments .....	122
6.6    UNTERSUCHUNGEN AN KREUZUNGSPRODUKTEN ZWISCHEN PORPHYRISCHEN PFLANZEN UND TRANSGENEN LINIEN, DIE ANTIOXIDATIVE SCHUTZENZYME ÜBEREXPRIMIEREN .....	123
<b>7    DISKUSSION</b> .....	<b>125</b>
7.1    PHOTOSENSIBILISIERUNG DURCH DEREGULATION DER TETRAPYRROLBIOSYNTHESE - PHOTODYNAMISCH ERZEUGTER OXIDATIVER STRESS IN PFLANZE UND MENSCH .....	126
7.2    PORPHYRIN-AKKUMULIERENDE TABAKPFLANZEN ALS MODELLSYSTEM DER PHOTOSENSIBILISIERUNG .....	129
7.3    IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON GENEN, DEREN EXPRESSION FRÜHZEITIG ALS REAKTION AUF DIE PHOTOSENSIBILISIERUNG INDUZIERT WIRD .....	130
7.4    CHRONOLOGISCHE BETRACHTUNG DER FOLGEN VON PHOTOSENSIBILISIERUNG IN PORPHYRIN-AKKUMULIERENDEN TABAKPFLANZEN .....	136
7.5    DIE WICHTIGSTEN ERGEBNISSE DER ARBEIT IM ÜBERBLICK .....	143
<b>8    LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>145</b>
<b>9    ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>160</b>

## 1 Zusammenfassung

Transgene Tabakpflanzen, in denen wegen der Expression von Antisense-RNA für zwei Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese die Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase bzw. Coproporphyrinogen-Oxidase vermindert ist, akkumulieren in starkem Ausmaß die Substrate der betroffenen Enzyme. Diese Porphyrinogene werden bei Anwesenheit von Sauerstoff autoxidativ oder durch unspezifische Peroxidasen in ihre photosensibilisierenden Derivate (Porphyrine) umgewandelt, welche die Ursache für zelluläre Schäden darstellen, die sich makroskopisch in Form von Blattläsionen zeigen.

Im Verlauf der durch die angehäuften Porphyrine ausgelösten Reaktionen, die u.a. den Folgen der Behandlung von Pflanzen mit photodynamisch wirksamen Herbiziden und auch den Symptomen von Porphyria-Erkrankungen des Menschen ähneln, werden Membranlipide durch Peroxidation geschädigt und alle lichtexponierten Zellen massivem oxidativen Streß ausgesetzt. Dieser läßt sich anhand der kompartment-übergreifenden und alle Ebenen der Expression umfassenden Aktivierung des antioxidativen Schutzsystems belegen. So können die Transkriptakkumulation und verstärkte Anhäufung der Proteine sowie der damit verbundene Anstieg der Aktivität von Superoxid-Dismutase und Ascorbat-Peroxidase nachgewiesen werden. Die erhöhte Aktivität der Schutzenzyme führt zu beschleunigtem Umsatz und größerem Bedarf an niedermolekularen Antioxidantien wie Ascorbat und Tocopherol.

Gleichzeitig kommt es lokal beschränkt auf Blattgewebe in der Umgebung von Nekrosen zur Kreuzinduktion von pathogenese-assoziierten Prozessen, wie der Akkumulation von "pathogenesis related" (PR)-Proteinen, Salicylsäure und der antimikrobiell wirksamen phenolischen Verbindung Scopolin. Diese Aktivierung der Pathogenabwehr wird durch die verminderte Ausbreitung einer Infektion der Pflanzen mit dem Tabak Mosaikvirus (TMV) widergespiegelt.

Der Prozeß der Photosensibilisierung ist stark licht- und sauerstoffabhängig und wird außerdem durch erhöhte Temperaturen beschleunigt. Wird eine bestimmte Lichtdosis überschritten, werden die Porphyrine durch die dann rasch irreversibel geschädigten Plastiden freigesetzt, und es kommt wegen des nachfolgenden Absterbens von Gewebe zur Ausbildung der Blattläsionen. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Kinetik von Prozessen der antioxidativen und Pathogenabwehr in den Pflanzen zu untersuchen. Mittels Subtraktiver Suppressions-Hybridisierung (SSH) wurde eine subtrahierte cDNA-Bank angelegt, in der Gene vertreten sind, deren Expression bereits sehr früh als Reaktion auf die Photosensibilisierung induziert wird. Unter diesen Genen sind auch vermutete Komponenten von Signaltransduktionskaskaden einschließlich Transkriptionsfaktoren. Etwas überraschend war die Erkenntnis, daß vor allem pathogenese- und zelltod-assoziierte Prozesse frühzeitig aktiviert werden, die klassischen

---

Enzyme der antioxidativen Streßabwehr aber erst später reagieren. Bei letzteren kommt es vor Veränderungen in der Expression zuerst zu einem Anstieg der Aktivität, der sich in verändertem Gehalt und Redoxstatus der niedermolekularen Antioxidantien niederschlägt.

Insgesamt stellt sich die durch Antisense-Expression verursachte Deregulation der Tetrapyrrolbiosynthese und die daraus resultierende Photosensibilisierung als komplexes System dar, in dem antioxidative und Pathogenabwehr kreuzinduziert werden und welches als Modell zur Aufklärung von Mechanismen der Streßabwehr wertvolle Aussagen liefert.

**Schlagworte**

Tetrapyrrolbiosynthese, Photosensibilisierung, antioxidative und Pathogenabwehr, differentielle Genexpression

---

## 2 Abstract

Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for two enzymes of the tetrapyrrole biosynthetic pathway are characterized by decreased enzyme activity of either uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase and accumulate the substrates of these enzymes in large amounts. If oxygen is present the accumulated porphyrinogens are transformed either by autoxidation or unspecific peroxidases into their photosensitizing derivatives (porphyrins). They are the molecular basis for cellular damage which eventually becomes visible as leaf lesions. During photosensitization membrane lipids are damaged due to peroxidation reactions and most of the symptoms observed are similar to the effects caused by the treatment of plants with photodynamic herbicides, or resemble the characteristics of porphyria diseases in human. These plants suffer from oxidative stress which is concluded from the general and intercompartmental activation of the antioxidative stress defense system. Transcripts and proteins of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase accumulate and the corresponding enzyme activities are increased. This increase leads to accelerated turnover and enhanced demand of low molecular weight antioxidants like ascorbate and tocopherol.

Simultaneously, cross induction of pathogenesis-related responses is observed in the plants, like the accumulation of PR proteins, salicylic acid and the antimicrobial phenolic compound scopolin. The activation of the pathogen defense system leads to restricted spread of Tobacco Mosaic Virus (TMV) infection in the transgenic plants.

Photosensitization strongly depends on light and oxygen and is enhanced by elevated temperature. Porphyrins are only released from rapidly damaged plastids into other cellular compartments if a certain light dose is exceeded. Then cell death commences and dead tissue becomes visible as leaf lesions. This light dosage effect was exploited to investigate the kinetics of antioxidative and pathogen defense responses upon light shift. By the use of Suppression Subtractive Hybridization (SSH) a subtracted cDNA library was established that contains genes which are early induced in response to photosensitization. The library also contains putative components of signal transduction chains and transcription factors. Unexpectedly, the expression of genes related to pathogenesis and cell death is rather early induced while the cellular antioxidative stress defense system responds later. The activity of antioxidative enzymes is increased before changes in transcript or protein accumulation occur, resulting in changes of content and redox ratio of low molecular weight antioxidants.

In summary, photosensitization caused by the expression of antisense RNA and resulting in the deregulation of tetrapyrrole biosynthesis is a complex model system in which antioxidative and pathogen defense responses are induced. The approach can be used to further elucidate mechanisms of stress response.

**Keywords**

tetrapyrrol biosynthesis, photosensitization, antioxidative and pathogen defense, differential gene expression

### 3 Einleitung

#### 3.1 Oxidativer Streß in Pflanzen

Höhere Pflanzen sind als sessile Lebewesen im Lauf ihrer Entwicklung einer ganzen Reihe von verschiedenen abiotischen und biotischen Umwelteinflüssen ausgesetzt, denen sie nicht ausweichen, sondern durch entsprechende Anpassung begegnen müssen. Deshalb haben sich in Pflanzen eine Vielzahl von komplexen, stark spezialisierten, aber auch integrativen Systemen zur Erfassung (Perzeption), Weiterleitung (Transduktion) und Verarbeitung von Signalen evolviert. Über dieses Netzwerk von Signalen werden Reaktionen („Response“) ermöglicht, durch die sich die Pflanze den veränderten Bedingungen optimal anpassen kann.

Wichtige abiotische Impulse, die die Pflanze als photosynthetisierendes Lebewesen von außen erfährt, sind vor allem Veränderungen von Lichtqualität und –quantität, Temperatur, Wasser- und Mineralstoffangebot, aber auch das Vorhandensein von Luftschadstoffen, wie z.B. Schwefeldioxid ( $\text{SO}_2$ ) oder Ozon ( $\text{O}_3$ ), wobei letztere im wesentlichen auf anthropogene Einflüsse zurückzuführen sind. Im Boden werden toxische Wirkungen vor allem durch Schwermetalle und andere Xenobiotika hervorgerufen. Auch die zur Kontrolle von Pflanzenbeständen eingesetzten Herbizide gehören zur Gruppe der Xenobiotika. Zu den biotischen Umweltfaktoren zählen Pathogene und Symbionten sowie um Ressourcen konkurrierende Nachbarn (Scheel et al. 1999).

Überschreiten die negativen Umwelteinwirkungen auf die Pflanze einen bestimmten Schwellenwert, spricht man – in Anlehnung an die medizinische Terminologie – von Streß. In Studien der letzten Jahre hat sich herausgestellt, daß die den gesamten Organismus Pflanze betreffenden Streßsymptome vor allem auf oxidativen Streß und die durch freie Radikale eingeleitete Schädigung von Zellen zurückgeführt werden können.

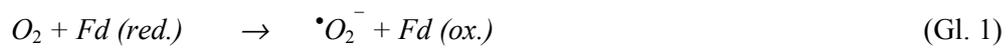
##### 3.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Schädwirkung

Unter oxidativem Streß versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Erzeugung und Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Zu den ROS zählen der Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), das Superoxid-Radikal ( $^{\bullet}\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und andere Peroxide ( $\text{ROOH}$ ) sowie das extrem reaktive und deshalb kurzlebige Hydroxyl-Radikal ( $^{\bullet}\text{OH}$ ). Diese im Vergleich zum „normalen“ Sauerstoff sehr reaktionsfreudigen Sauerstoffderivate entstehen als Nebenprodukte auch im üblichen Stoffwechsel der Zellen in verschiedenen Organellen, werden

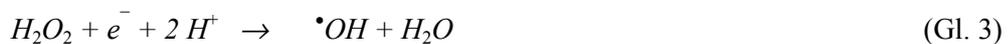
aber unter dem Einfluß von negativen Umwelteinflüssen in verstärktem Maß gebildet und/oder mit verringerter Effizienz beseitigt (Salin et al. 1987, Asada 1994, Alscher et al. 1997).

Durch die Übertragung von nur einem Elektron je O<sub>2</sub>-Molekül kann Sauerstoff zum Superoxid-Radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) mutieren, wenn im zellulären Metabolismus Elektronenakzeptoren in ungenügender Konzentration zur Verfügung stehen. Dies geschieht enzymatisch über Flavoprotein-Dehydrogenasen oder auch ohne Enzymeinfluß durch Autoxidation von Substraten wie z.B. Ferredoxinen, Hydrochinonen, Thiolen oder reduzierten Hämproteinen (Fridovich 1976). Eine wichtige Quelle der univalenten Sauerstoffreduktion im Chloroplasten stellt die stromaexponierte reduzierende Seite des PS I dar, wo vor allem die Eisen-Schwefel-Proteine X und A/B Anteil an der Bildung von Superoxid haben (Asada 1994, Alscher et al. 1997).

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die sog. Mehler-Reaktion (Mehler 1951), die auch pseudo-zyklischer Elektronentransport genannt wird. Hier werden, vor allem dann, wenn die Verfügbarkeit von NADP wegen z.B. geringer interner CO<sub>2</sub>-Konzentration und gleichzeitiger hoher Lichtintensität eingeschränkt ist, die Elektronen von reduziertem Ferredoxin (Fd) direkt auf Sauerstoff übertragen (Gl. 1).



Das resultierende Superoxid kann nun einerseits selbst Schäden hervorrufen, z.B. durch die Bildung von Lipidperoxiden und die daraus resultierende Membranschädigung oder durch das verstärkte Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen (Fridovich 1986). Das Superoxid-Radikal stellt andererseits durch die Möglichkeit seiner schrittweisen weiteren Reduktion und damit Umwandlung in andere Vertreter von ROS eine zusätzliche große Gefahr dar (Gl. 2, 3).

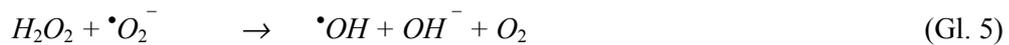


Während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch seine relativ lange Halbwertszeit und ein hohes Oxidationspotential (+1,77 V) vor allem durch die mögliche Oxidation von Thiol-Gruppen schädigend wirkt, zeichnet sich das Hydroxyl-Radikal durch eine ganz besonders hohe Reaktivität aus, welche durch die fast diffusionskontrollierte Rate ( $k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) illustriert wird, mit der es mit den meisten organischen Verbindungen zu reagieren vermag. Es gibt in der Zelle zwei Möglichkeiten für die Bildung dieses Radikals. Die erste ist die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch in

Spuren auftretende, katalytisch wirksame zweiwertige Metallionen ( $\text{Me}^{2+}$ ), wobei hier in einer Fenton-Typ-Reaktion  $\bullet\text{OH}$  und das oxidierte Metallion ( $\text{Me}^{3+}$ ) entstehen (Gl. 4).



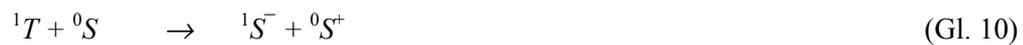
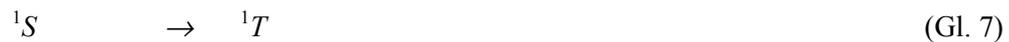
Eine zweite Möglichkeit besteht in der gemeinsamen Redoxreaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  (Gl. 5), welche auch Haber-Weiss-Reaktion genannt wird (Haber und Weiss 1934).



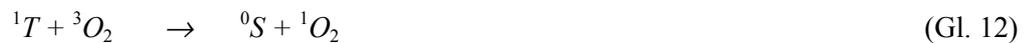
Eine wichtige Quelle von ROS in Pflanzen stellt das in der Troposphäre vorhandene Ozon ( $\text{O}_3$ ) dar, dessen Konzentration in den industriell entwickelten Ländern in den letzten Jahren, vor allem durch die Zunahme des Autoverkehrs, stark angestiegen ist. Ozon reagiert in wässriger Umgebung mit Thiol-Gruppen, Aminen, und phenolischen Verbindungen der Zellwand, aber auch mit ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran und produziert auf diese Weise ROS, Aldehyde und organische Radikale. Makroskopisch werden ozonbedingte Schäden vor allem durch das Auftreten von punktförmigen Nekrosen infolge von lokal begrenztem Zelltod sichtbar (Pell et al. 1997, Langebartels et al. 2000).

### 3.1.1.1 Photosensibilisierung und ROS-Erzeugung

Zusätzlich entstehen durch pigmentvermittelten Energietransfer (Photosensibilisierung) Vertreter der ROS, die für das in dieser Arbeit untersuchte Modellsystem von besonderer Bedeutung sind (s. 3.4). Dies tritt vor allem dann auf, wenn eine adäquate Nutzung der durch die photosynthetisch aktiven Pigmente absorbierten Energie verhindert oder vermindert ist. Pigmentmoleküle wie z.B. Chlorophyll, Protochlorophyllid, Uro- oder Coproporphyrinogen III können unter solchen Umständen verstärkt photosensibilisierend wirken, indem sie aus dem reaktionsträgen Grund- (Singulett,  $^0\text{S}$ ) zuerst in den angeregten Singulett- ( $^1\text{S}$ ) (Gl. 6) und nachfolgend in den sehr reaktiven Triplett-Zustand ( $^1\text{T}$ ) übergehen (Gl. 7). In diesem Zustand sind solche Moleküle über einen sog. Typ I-Mechanismus in der Lage, auch Radikale direkt zu erzeugen, indem sie z.B.  $\text{O}_2$  zu Superoxid reduzieren (Gl. 8). Außerdem können Thiole (R-SH) oxidiert (R-S) oder weitergehende Redoxketten der Pigmentmoleküle initiiert werden (Gl. 9, 10 u. 11, Salin 1987).



Andererseits können Photosensibilisatoren im angeregten Triplet-Zustand auch ihre Anregungsenergie auf  $O_2$  übertragen, wobei dieser über den sog. Typ II-Mechanismus aus dem rel. reaktionsträgen Triplet ( ${}^3O_2$ )- in den sehr reaktiven Singulett-Zustand ( ${}^1O_2$ ) übergeht (Gl. 12, Foote 1968, Salin 1987).



Singulett-Sauerstoff reagiert sehr rasch mit verschiedenen organischen Molekülen und bildet durch Addition an ungesättigte Bindungen Hydroperoxide und Endoperoxide (Foote 1979). So werden auch Doppelbindungen in Fettsäureresten von Membranlipiden angegriffen, was zu einer erhöhten Rigidität und damit zum Verlust an Funktionalität der Membran führt.

Zwei Beispiele sollen die Folgen von Photosensibilisierung illustrieren: Bei den verschiedenen Porphyria-Erkrankungen kommt es aufgrund genetischer Defekte zur Akkumulation von photosensitiven Porphyrinen, die zu schweren Gewebeschäden (Hautläsionen) bei den Patienten führen (Elder 1993). Die hohe Toxizität der Kombination aus Singulett-Sauerstoff und radikalischen Verbindungen wird aber auch in der sog. photodynamischen Therapie (PDT) in der Tumormedizin ausgenutzt (Sharman et al. 1999).

### 3.1.2 Antioxidative Schutzmechanismen in Pflanzen

Das unkontrollierte Auftreten von ROS hat die Peroxidation von Lipiden, daraus resultierende Membranschäden, die Denaturierung von Proteinen sowie Strangbrüche von DNA und

Polysacchariden zur Folge und muß deshalb möglichst verhindert werden. Da außerdem ROS und ihre Folgeprodukte in Abhängigkeit von der Lebensdauer nicht nur die unmittelbare Umgebung ihres Entstehungsortes, sondern auch weiter entfernte Regionen der Zelle schädigen können, haben sich in der Pflanze als Anpassung an aerobe Lebensbedingungen Schutzmechanismen entwickelt, die für die effiziente Entgiftung verantwortlich sind.

Weil das Hydroxyl-Radikal aufgrund seiner Eigenschaften mit jedem verfügbaren Substrat in kürzester Zeit nach seiner Bildung reagiert, gibt es in diesem Falle allerdings keinen Schutz vor dessen aggressiver Wirkung. Die Entstehung dieses Radikals selbst muß also möglichst ausgeschlossen werden. Für die Detoxifizierung der anderen Vertreter von ROS stehen hingegen in den betroffenen Kompartimenten der Zelle enzymatische und nicht-enzymatische Schutzsysteme bereit (Salin 1987, Asada 1994, Alscher et al. 1997, Noctor und Foyer 1998).

### 3.1.2.1 Nicht-enzymatische Schutzmechanismen

Ein wichtiger Mechanismus, der sehr weit am Ursprung der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Prozesse der univalenten Elektronenübertragungen ansetzt, besteht im ungefährlichen Abführen der in Form von Triplett-Zuständen der Pigmente angestauten Energie. Xanthophylle als Vertreter der Carotinoide sind aufgrund ihrer Molekülstruktur zu strahlungsloser Energiedissipation in Form von Wärme fähig. Dieser Prozeß wird Auslöschung ("Quenching") der angeregten Zustände genannt. Auch Singulett-Sauerstoff, der mit Carotinoiden, aber auch mit  $\alpha$ -Tocopherol direkt reagiert, kann auf diese Weise deaktiviert werden (Fryer 1992, Edge et al. 1997). Carotinoide und Hydrochinone können zusätzlich mit dem Superoxid-Radikal reagieren und es so entgiften. Tocopherol spielt eine besonders wichtige Rolle beim Schutz vor Lipid-Radikalen in Membranen, da hier das in wäßrigem Milieu operierende Ascorbat-Glutathion-System (s. 3.1.2.2) nicht effektiv ist. Sowohl reduziertes Ascorbat als auch Glutathion können nicht-enzymatisch mit den verschiedenen ROS reagieren (Sies 1995).

Im folgenden soll aber vor allem auf die Bedeutung dieser beiden niedermolekularen Antioxidantien als Substrat von Enzymreaktionen eingegangen werden.

### 3.1.2.2 Eine Kette von antioxidativen Schutzenzymen - Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus

Die Superoxid-Dismutasen (SOD, E.C. 1.15.1.1), die Kupfer- und Zink-, Eisen- bzw. Manganionen im aktiven Zentrum tragen und als verschiedene Isoformen im Cytosol und/oder Plastiden bzw. in den Mitochondrien vorkommen, beschleunigen enzymatisch die Disproportionierung des Superoxids in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (Abb. 1, Beauchamp

und Fridovich 1973, Kanematsu und Asada 1990, Kliebenstein et al. 1998). Es gibt auch Berichte über das Vorkommen der SOD in anderen pflanzlichen Zellorganellen, z.B. den Peroxisomen (Del Rio et al. 1992).

Das dabei entstehende, ebenfalls schädliche  $H_2O_2$  kann durch Catalasen (E.C. 1.11.1.6, Gl. 13) bzw. Peroxidasen (E.C. 1.11.1.7, Gl. 14) abgefangen werden. Beide Enzyme tragen ein Häm in ihrem aktiven Zentrum.

*Catalase*



*Peroxidase*



Weil die Catalase vor allem in den Peroxisomen vorkommt, nicht aber in den Chloroplasten gefunden wird (Willekens et al. 1995), sind Peroxidasen von besonderer Bedeutung für den Abbau von Wasserstoffperoxid in diesem Organell der Pflanzenzelle. Obwohl in den Chloroplasten sowohl Glutathion als auch die zur Regeneration von reduziertem Glutathion notwendige Glutathion-Reduktase (E.C. 1.6.4.2) vorhanden sind (s.u.), scheint die Bedeutung der zuerst in tierischen Geweben identifizierten Glutathion-Peroxidase für die Entgiftung von  $H_2O_2$  in der Pflanze eher gering zu sein. Allerdings deutet die Tatsache, daß auch in Pflanzen Phospholipidhydroperoxide durch dieses Enzym effektiv entgiftet werden können, vor allem auf eine Funktion beim antioxidativen Schutz von Membranen hin (Drotar et al. 1985, Eshdat et al. 1997). Phospholipidhydroperoxide entstehen bei der Reaktion von Tocopherol mit Phospholipidperoxy-Radikalen.

Guajacol-Peroxidasen spielen durch ihre breite Cosubstratspezifität eine wichtige Rolle bei den Reaktionen in der Zelle, in welchen Wasserstoffperoxid vorrangig als Substrat dient, z.B. bei der Biosynthese von Lignin und Ethylen oder beim Abbau von Indolelessigsäure (Asada 1992).

Die Hauptlast bei der Entgiftung von  $H_2O_2$  in den Chloroplasten und im Cytosol der Pflanzen tragen daher die verschiedenen Isoenzyme der Ascorbat-Peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), die das zweite enzymatische Glied des sog. Ascorbat-Glutathion-Zyklus darstellen (Abb. 1, Foyer und Halliwell 1976, Foyer et al. 1994). Dabei wird reduziertes Ascorbat (ASA) in Monodehydroascorbat ( $MDA^\bullet$ ) umgesetzt, wobei gleichzeitig Wasser entsteht. Dieses erste, radikalische Oxidationsprodukt wird unter Verbrauch von NAD(P)H durch die Monodehydroascorbat-Reduktase (MDAR, E.C. 1.6.5.4) reduziert, wodurch ASA regeneriert werden kann. Durch Disproportionierung entsteht aus  $MDA^\bullet$  hingegen Didehydroascorbat

(DHA). Dieses wird durch die Didehydroascorbat-Reduktase (DHAR, E.C. 1.8.5.1) wieder in ASA umgewandelt, wobei reduziertes (GSH) verbraucht und oxidiertes Glutathion (GSSG) gebildet wird. Am Ende dieser Redoxkette steht die Reduktion von GSSG, welche durch die Glutathion-Reduktase (GR, E.C. 1.6.4.2) unter Verbrauch von NADPH katalysiert wird.

Letztendlich werden also Reduktionsäquivalente aufgewendet, um ROS zu entgiften. Der erhöhte Bedarf an NADPH trägt einerseits dazu bei, die Komponenten der Elektronentransportkette der Photosysteme länger oxidiert zu halten und verringert damit die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Radikalbildung aufgrund von Elektronenstau. Andererseits stehen damit weniger Reduktionsäquivalente für die Fixierung von Kohlenstoff zur Verfügung. Über den Pentose-Phosphatweg kann NADPH unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat zusätzlich bereitgestellt werden. In Abb. 1 sind alle Reaktionen aus dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus noch einmal schematisch zusammengefaßt.

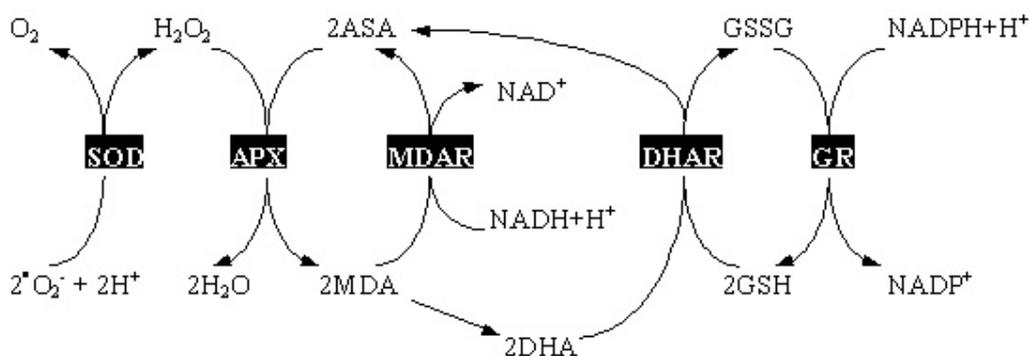


Abb. 1 Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Entgiftung von Superoxid und Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von Ascorbat und Regenerierung von Ascorbat auf Kosten von Glutathion und NADPH; nach Foyer et al. (1994)

Neben den bisher erwähnten antioxidativen Schutzenzymen gibt es noch eine Reihe weiterer enzymatischer Antioxidantien und Entgiftungsenzyme in Pflanzen. Dazu zählt die Glutathion-S-Transferase (GST), die einerseits Glutathion auf Xenobiotika überträgt und sie auf diese Weise z.B. für eine dauerhafte Ablagerung in der Vakuole mobilisiert. Andererseits hat GST auch eine schwache GSH-abhängige Peroxidase-Aktivität (Marrs 1996). Als eigenständige Gruppe unter den Peroxidasen haben 2-Cystein-Peroxiredoxine eine wichtige Aufgabe bei der Beseitigung von toxischen Alkylhydroperoxiden im Chloroplasten (Baier und Dietz 1999a, b).

### 3.2 Signaltransduktion bei oxidativem Streß und Pathogeninfektionen

Die Schutzreaktionen der Pflanze, die sich gegen die Auswirkungen von Streß richten, sind auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die Regelmechanismen müssen dabei einerseits der Komplexität einer Vielzahl von verschiedenen Stressoren gerecht werden. Andererseits münden fast alle Abwehrreaktionen in der aktiven Kontrolle der Gleichgewichtskonzentration („steady state level“) von ROS, weshalb die Verarbeitung von Streßsignalen gleichzeitig integrativ wirken muß.

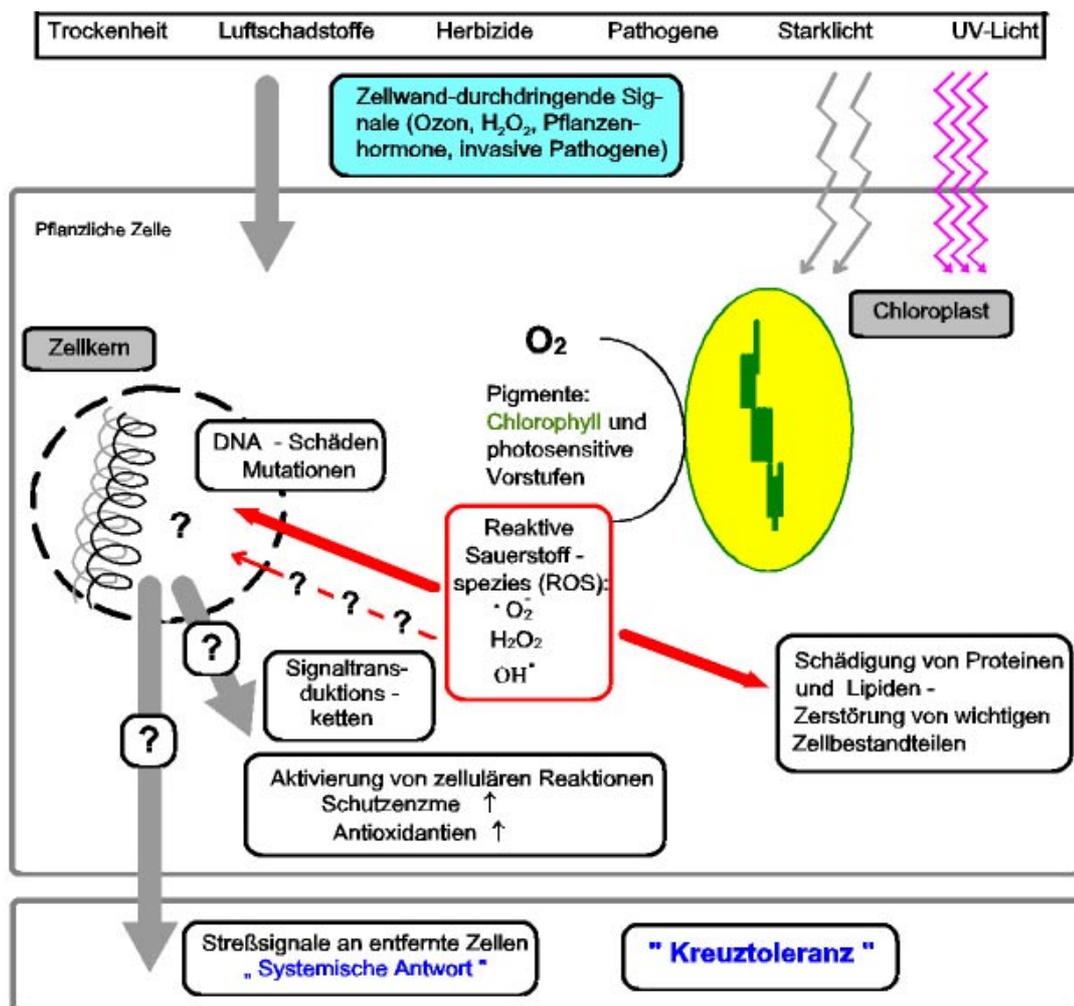


Abb. 2 Die zentrale Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Signaltransduktion bei abiotischem und biotischem Streß. Für die vorliegende Arbeit spielte die massenhafte Erzeugung von ROS, welche durch akkumulierende Chlorophyllvorstufen über photochemische Reaktionen (Photosensibilisierung) hervorgerufen wurde, die entscheidende Rolle. Andere Quellen von ROS sind daher nicht gezeigt. ROS können einerseits zelluläre Komponenten direkt angreifen und aufgrund dieser toxischen Wirkung zu massiven Schäden führen. Andererseits hat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch eine Funktion als Signalmolekül in vielen Streßsituationen. Auf weitere Signaltransduktoren und die ausgelösten zellulären Reaktionen wird im Text näher eingegangen. Generell kann man hierbei zwischen lokalen und systemischen Antworten unterscheiden.

Das Stellwerk der Abwehrmechanismen schließt dabei die Erfassung der Stresssituation (Perzeption), die Weiterleitung und Verarbeitung von Information („Signaling“) und die Kontrolle der ausgelösten Gegenmaßnahmen („Response“) ein. Während über die Schutz- und Abwehrreaktionen in Pflanzen zahlreiche Erkenntnisse vorliegen, sind hingegen die Signalweiterleitung und -verarbeitung, in welche Rezeptoren, Signaltransmitter (z.B. Phytohormone, Protein-Phosphorylierungskaskaden, Ionenströme) und zentrale Schaltglieder (wie z.B. Transkriptionsfaktoren) involviert sind, weit weniger aufgeklärt (Genoud und Métraux 1999). Ein vereinfachtes Modell der komplexen Vorgänge, auf die im weiteren näher eingegangen wird, ist in Abb. 2 gezeigt.

### **3.2.1 Die Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der Hypersensitivitätsreaktion (HR) und systemisch erworbener Resistenz (SAR)**

Sicher ist, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Vertreter der ROS nicht nur als aggressives Agens wirkt, sondern aufgrund seiner relativen Langlebigkeit und guten Durchdringungsfähigkeit auch als Signalmolekül eine wichtige Rolle spielt. Dies betrifft vor allem die Rolle des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Wegbereiter von Reaktionen, in denen sich die Pflanze gegenüber Pathogenen zur Wehr setzt.

Bisher nur in Ansätzen sind die Mechanismen der Pathogenerkennung verstanden, bei der u.a. pflanzliche Resistenzfaktoren (R-Genprodukte) mitwirken. Diese interagieren nach einem strikten Gen-für-Gen-Prinzip mit den vom Pathogen kodierten Avirulenzfaktoren (Avr-Genprodukte), woraus auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Ligand und seinem spezifischem Rezeptor geschlossen wurde. Nur wenn beide Partner vorhanden sind, kann die Resistenz der Pflanze gegenüber dem wirtsspezifischen Pathogen aufrechterhalten werden (Nürnberger 1999). In der Folge kommt es zur Induktion von Abwehrmechanismen, woran H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wesentlich beteiligt ist.

Wasserstoffperoxid wird am Infektionsort in größeren Mengen durch die resistente Wirtspflanze aktiv erzeugt („oxidative burst“) und dient daraufhin mehreren Funktionen (Mehdy 1994, Mehdy et al. 1996, Alvarez et al. 1998): Erstens wirkt es, vor allem im Verbund mit Lipidperoxiden, toxisch gegenüber den invasiven Schädlingen. Zweitens ist Wasserstoffperoxid Substrat bei der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen und damit Voraussetzung für die Verstärkung von Zellwänden, wodurch einem weiteren Vordringen des Schädlings eine verbesserte physikalische Barriere entgegengesetzt wird. Drittens führt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen über einem bestimmten Schwellenwert zusammen mit anderen Signalen zum sog. programmierten Zelltod (Programmed Cell Death, PCD), einem Vorgang, der in tierischen Organismen beschriebenen Apoptose gleicht (Dangl et al. 1996, Greenberg 1996). An der Infektionsstelle wird also von der Pflanze lokal Gewebe „geopfert“, um Pathogene am weiteren

Ein- und Durchdringen der Pflanze zu hindern. Diese Vorgänge faßt man auch unter dem Begriff Hypersensitivitätsreaktion (Hypersensitive Response, HR) zusammen.

Gleichzeitig spielt  $H_2O_2$  eine Signalrolle im umliegenden Gewebe und bewirkt hier durch die Aktivierung von geeigneten Abwehrprogrammen, daß die Resistenz gegenüber dem Pathogen systemisch, d.h. durch die ganze Pflanze hindurch verbreitet wird (Dangl et al. 1996, Alvarez et al. 1998). Zu den Vorgängen, die man als Folge dieser systemisch erworbenen Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR, Ryals et al. 1996) beobachtet, zählen u.a. die Akkumulation von pathogenese-assoziierten Proteinen (Pathogenesis-related (PR)- Proteins), zu denen vor allem lytische Enzyme wie Chitinasen oder Glucanasen gehören. Außerdem kommt es zur Anhäufung von antimikrobiell wirksamen Coumarinen, wie z.B. dem Scopolin, das zur großen Klasse der phenolischen Verbindungen gehört (Jurd et al. 1971, Ahl Goy et al. 1993, Sharan et al. 1998). Die Induktion dieser Schutzmechanismen führt zur Eingrenzung bzw. zum Zurückdrängen von Infektionen und kann die Pflanze gegebenenfalls auch gegenüber andersartigen Stressoren resistenter machen („Kreuzresistenz“, „Kreuzinduktion“).

### 3.2.2 Weitere Signalüberträger bei Streß- und Abwehrreaktionen

Nicht nur  $H_2O_2$  spielt bei solchen Streß- und Abwehrreaktionen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung (Levine et al. 1994), sondern auch die Streßhormone Ethylen und Jasmonsäure, Salicylsäure und deren flüchtiges methyliertes Derivat (Ryals et al. 1996, Fodor et al. 1997, Moeder et al. 1999), sowie generelle Signalmoleküle wie Calcium ( $Ca^{2+}$ , Pauls 1995) oder Stickstoffmonoxid (NO, Durner und Klessig 1999) sind beteiligt. Die Koordination der einzelnen Signalwege, die u.a. Rezeptor-ähnliche Protein-Kinasen (Czernic et al. 1999), regulierte Ionenkanäle (Zimmermann et al. 1999), das  $Ca^{2+}$ /Calmodulinsystem (Rudd und Franklin-Tong 1999), Kaskaden von reversiblen Proteinphosphorylierungen wie z.B. mitogen-aktivierte Protein- (MAP)-Kinase-Kaskaden (Jonak et al. 1999) und GTP-bindende Proteine (G-Proteine) einschließen können (Bischoff et al. 1999), ist noch weitgehend unklar. Es gibt allerdings viele Hinweise darauf, daß in Pflanzen eine ganze Reihe von Signalwegen existieren, die auch in anderen, bereits detaillierter untersuchten Systemen vorkommen (Mulligan et al. 1997). So werden auch in Pflanzen offensichtlich einige Vorgänge über sog. Zwei-Komponenten-Systeme reguliert (Urao et al. 2000), die in Bakterien und Hefen schon gut charakterisiert wurden (Chang und Stewart 1998).

Dieser Mechanismus ist als Phosphat-Transfer-System anzusehen, bei dem die Phosphatgruppe von einem His-Rest der einen Komponente, der Sensor-Kinase, auf einen Asp-Rest der zweiten Komponente, dem Response-Regulator, übertragen wird. Die Sensor-Kinase wird durch die Veränderung eines zellulären Parameters (z.B. der Osmolarität im EnvZ/OmpR-System) in ihrer

Autophosphorylierungsaktivität moduliert und phosphoryliert bei Aktivierung einen His-Rest in der eigenen Kinase-Domäne. Die Phosphatgruppe wird dann auf einen Asp-Rest in der Empfänger-Domäne des zugehörigen Response-Regulators übertragen, worauf sich die DNA-Bindungseigenschaften der Output-Domäne des Response-Regulators ändern. Auf diese Weise wird ein Umweltsignal in eine biochemische Reaktion umgewandelt, weshalb man auch vom Phosphat-Relais spricht (Urao et al. 2000).

### 3.2.3 Oxidativer Streß und Kontrolle der Genexpression

Als Ergebnis (Output) der integrierten Signalketten steht die Anpassung des gestreßten biologischen Systems an die veränderten Umweltbedingungen. Dies kann durch die Modulation der zur Abwehr erforderlichen Menge und/oder Aktivität von bestimmten Genprodukten auf den verschiedenen Ebenen der Genexpression erfolgen. Meist beobachtet man dabei ein Umschalten des Aktivierungszustandes von Transkriptionsfaktoren, was zur Veränderung im Transkriptionsmuster führt. Die Transkription eines bestimmten Sortiments an Genen wird ein-, die eines anderen hingegen ausgeschaltet, wobei auf den jeweiligen Stressor (z.B. Hitze) spezialisierte Transkriptionsfaktoren (Hitzeschockfaktoren, HSF) eine wichtige Rolle spielen (Grossman et al. 1984, Nover 1991). Diese binden nur an entsprechende Hitzeschockelemente (HSE) in der Promotorregion der Hitzeschockproteine (HSP). Auch die Promotoren von anderen Streßabwehrgenen wie z.B. Gene für PR-Proteine sind durch entsprechende Elemente gekennzeichnet, an die bestimmte, streßspezifische Transkriptionsaktivatoren binden können (Lebel et al. 1998).

Neben der Neusynthese bestimmt auch die unter Streßbedingungen veränderte mRNA-Stabilität die Menge an verfügbaren Transkripten (Mehdy und Brodl 1998). Auf der nächsten Regulationsebene hat die Translationskapazität der Zelle Einfluß auf die Synthese der Zielproteine (Vayda und Webster 1998). Und letztendlich kann auch post-translational die Aktivität von Enzymen als Reaktion auf Streßbedingungen reguliert werden. Dies kann z.B. über die Veränderung des Redoxzustandes von Thiol-Gruppen der Proteine erfolgen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Redoxkontrolle von Enzymaktivitäten über das Thioredoxin-System.

Solche durch Streß hervorgerufenen adaptiven Veränderungen sind nicht lokal begrenzt, sondern können über systemische Aktivierung auch in nicht-gestreßten Geweben ausgelöst werden. Hierbei wird seit kurzer Zeit neben der SAR (s. 3.2.1) auch von einer systemisch erworbenen Anpassung (Systemic Acquired Acclimation, SAA) berichtet (Karpinski et al. 1999).

---

### 3.3 Generierung von ROS in experimentellen Systemen – Ausgewählte Untersuchungsergebnisse

ROS entstehen zu jeder Zeit als Nebenprodukt im Stoffwechsel der Pflanze. Die Rate der Erzeugung steigt aber unter Streß stark an (Alscher et al. 1997). Für Analysen der direkten und indirekten Auswirkungen von ROS auf zelluläre Systeme wurden experimentelle Streßbedingungen genutzt, in denen Art und Menge der ROS definiert sind. So wurde die Konzentration von ROS in einer Reihe von experimentellen Modellsystemen durch die Anwendung von Chemikalien erhöht, die zur massiven Bildung von Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Singulett-Sauerstoff führen. Einige dieser Chemikalien (z.B. Methylviologen = Paraquat™) sind gebräuchliche Herbizide, die in den Untersuchungen an ganzen Pflanzen, Organen oder Zellkulturen appliziert wurden (Dodge 1994, Böger und Wakabayashi 1995). Auch die Anwendung von physikalischen Stressoren, wie z.B. erhöhte (Faria et al. 1999) oder erniedrigte (Prasad et al. 1994) Temperaturen, hohe Lichtintensität (Karpinski et al. 1997, Karpinski et al. 1999), Wassermangel (Loggini et al. 1999), Bestrahlung mit UV-Licht (Langebartels et al. 2000) oder die Begasung mit den Luftschadstoffen Ozon (Conklin und Last 1995, Pell et al. 1997, Langebartels et al. 2000) sowie SO<sub>2</sub> (Willekens et al. 1994) führten zu einer Anhäufung von ROS mit entsprechenden Konsequenzen für das komplexe Schutz- und Abwehrsystem der Pflanzen. Wie bereits dargestellt wurde (s. 3.2.1), findet man auch bei der Untersuchung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen Parallelen zu abiotischen Streßsituationen inklusive der Anhäufung von ROS, insbesondere von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dangl et al. 1996).

#### 3.3.1 Blattläsionen infolge von programmiertem Zelltod in unterschiedlichen experimentellen Systemen

Als Folge der Akkumulation von ROS kommt es in vielen Fällen zur Ausbildung von Blattläsionen (Nekrosen), welche in Form und Umfang stark vom verwendeten experimentellen System und dem Ausmaß an oxidativem Streß abhängen. So weisen O<sub>3</sub>-behandelte Pflanzen nach einiger Zeit punktförmige Nekrosen auf (Langebartels et al. 2000), die jenen an transgenen Pflanzen ähneln, in welchen aus der weitgehenden Antisense-Inhibierung der Catalase-Aktivität eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration unter photorespiratorischen Bedingungen resultiert (Chamnongpol et al. 1996, Takahashi et al. 1997). Auch nach TMV-Infektion entwickeln sich in resistenten Tabaksorten, die das *N*-Gen tragen, als Folge von programmiertem Zelltod lokal begrenzte Nekrosen an den Blättern („Local Lesion Host“, Mittler et al. 1997).

Neben den bereits erwähnten Catalase-Antisense-Pflanzen gibt es noch eine ganze Reihe von transgenen Linien, in denen entweder durch die (Über)Expression von heterologen Genen oder die verringerte Verfügbarkeit von Genprodukten aufgrund der Expression von entsprechenden Antisense-Konstrukten so schwerwiegend in den pflanzlichen Metabolismus eingegriffen wurde, so daß es auch in diesen Fällen zu Zelltodereignissen kommt (Dangl et al. 1996). Als Beispiel sei hier noch die Expression von *Saccharomyces cerevisiae*-Invertase im Apoplasten transgener Tabakpflanzen angeführt (Herbers et al. 1996). Die Akkumulation von PR-Proteinen und Salicylsäure sowie die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) als Pathogenese- bzw. Streßmarker weisen auf die Interferenz mit Signalwegen hin, die sonst in der Pathogenabwehr aktiv sind.

In den Spezies *Arabidopsis* und Mais sind Mutanten bekannt, die durch das spontane Auftreten von Nekrosen gekennzeichnet sind, welche ebenfalls durch eine Deregulation des programmierten Zelltodes ausgelöst werden (Dangl et al. 1996). In der „Lesion Simulating Disease“ (LSD)1-Mutante von *A. thaliana* ist ein Transkriptionsfaktor betroffen, der normalerweise als negativer Regulator des Zelltodes dient (Dietrich et al. 1997).

### 3.4 Porphyrische Pflanzen und oxidativer Streß

In der vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles System zur Generierung von oxidativem Streß benutzt, in welchem es aufgrund des gewählten gentechnischen Ansatzes zur Deregulation der Tetrapyrrolbiosynthese und als Folge dessen zur Anhäufung von photosensibilisierenden Tetrapyrrolen kam. Dieser Stoffwechselweg ist von großer Bedeutung für alle Organismen und unterliegt daher einer strikten Kontrolle.

#### 3.4.1 Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen

Chlorophyll ist sehr wahrscheinlich das häufigste Pigment in der Biosphäre, und man schätzt den jährlichen Umsatz auf ca.  $1 \times 10^9$  t (Matile et al. 1996). Dabei gehört Chlorophyll, wie auch das u.a. im respiratorischen Stoffwechsel bedeutsame Häm, zu den Porphyrinderivaten. Der Porphyringrundkörper wird aus 8 Molekülen der nicht-proteinogenen Aminosäure  $\delta$ -Aminolävulinsäure (ALA) gebildet. Aktuelle Übersichten zum Thema geben z.B. Von Wettstein et al. (1995), Porra (1997) oder Grimm (1999).

Die Ausgangsverbindung ALA wird im sog. C<sub>5</sub>-Stoffwechselweg, der in den Chloroplasten der Pflanzen und Algen, aber auch in Cyanobakterien (z.B. *Synechocystis*) und in den meisten

Eubakterien (so z.B. in *E. coli* und *B. subtilis*) abläuft, in einer 3 Teilschritte umfassenden Reaktion aus Glutamat (Glu) gebildet. Die Aminosäure Glu wird dabei im ersten Schritt durch die Glu-tRNA-Synthetase (E.C. 6.1.1.17) an die tRNA<sup>Glu</sup> gebunden und in dieser aktivierten Form durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase unter Verbrauch von NADPH zum Glutamat-1-semialdehyd (GSA) reduziert, wobei gleichzeitig die Ablösung von der t-RNA<sup>Glu</sup> erfolgt (Abb. 3). Durch das Enzym Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase (GSA-AT, E.C. 5.4.3.8) wird im anschließenden Schritt Pyridoxalphosphat-abhängig eine intramolekulare Verschiebung der Aminogruppe katalysiert und dadurch ALA gebildet. In tierischen Organismen, Hefen und einigen Bakterien entsteht ALA hingegen im sog. C<sub>2</sub>-Weg durch eine Kondensationsreaktion aus Succinyl-CoA und Glycin.

Die anschließenden Reaktionen der Chlorophyll- und Hämbiosynthese, bei denen aus jeweils 8 Molekülen ALA Uroporphyrinogen III und nachfolgend Protoporphyrin gebildet werden, sind generell in allen Organismen gleich. Unterschiede bestehen aber in der Lokalisation der einzelnen Biosyntheseschritte: Die Bildung von Chlorophyll findet ausschließlich in Chloroplasten statt, während die letzten beiden Schritte der Hämsynthese in Pflanzen sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien ablaufen. In Tieren hingegen startet die Biosynthese von Häm in Mitochondrien, wird im Cytoplasma bis zur Bildung des Coproporphyrinogens fortgesetzt und wiederum in den Mitochondrien abgeschlossen. Unabhängig von der Lokalisation sind aber alle involvierten Enzyme in Eukaryoten kerncodiert.

Aus 2 Molekülen ALA wird, durch die Aminolävulinat-Dehydratase (od. Porphobilinogen-Synthase, EC 4.2.1.24) katalysiert, der Porphobilinogen-Ring gebildet. Vier dieser Ringe werden nach Bildung des eigenen Cofaktors (Porphobilinogen-Dimer) durch die Porphobilinogen-Deaminase (od. 1-Hydroxymethylbilan-Synthase, EC 4.1.3.8) zum linearen Tetrapyrrol zusammengefügt. Der Ringschluß und die gleichzeitig Isomerisierung des Ringes IV werden durch die Uroporphyrinogen-Synthase (od. Co-Synthase, EC 4.2.1.75) bewirkt.

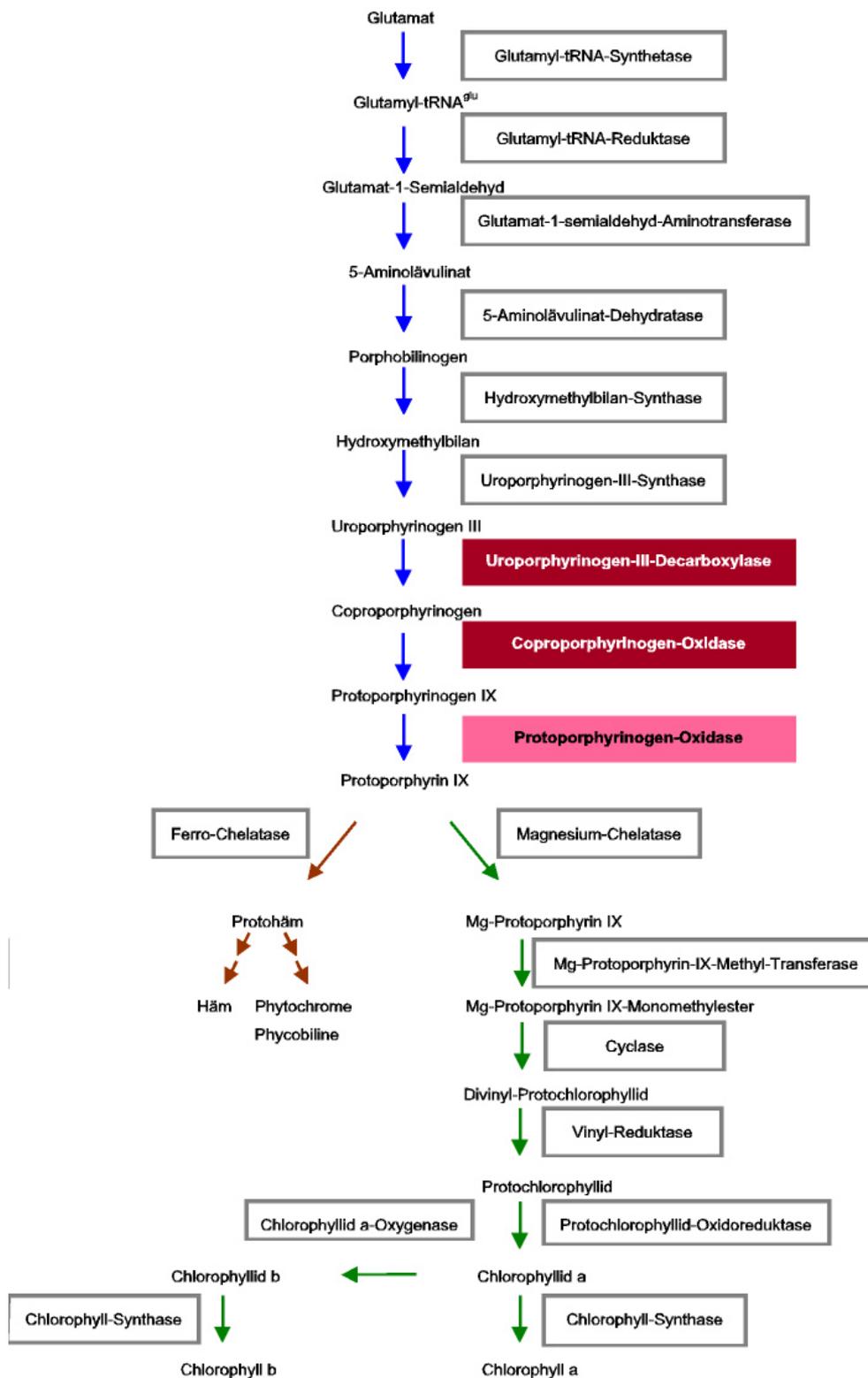


Abb. 3 Schema der Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen (C<sub>5</sub>-Weg, nach Grimm 1998). Werden die hervorgehobenen Enzymschritte (s. auch Abb. 4) durch die Expression von Antisense-Konstrukten in transgenen Pflanzen gehemmt, kommt es wegen der Akkumulation und Autoxidation der jeweiligen Substrate zur Photosensibilisierung der Pflanzen, die u.a. zur Ausprägung von Blattläsionen führt. Transgene Pflanzen, die Antisense-RNA für Uroporphyrinogen-Decarboxylase (UROD) bzw. Coproporphyrinogen-Oxidase (CPO) exprimieren, werden in dieser Arbeit detailliert vorgestellt.

Anschließend werden die Seitenketten der Pyrrolringe modifiziert ("Trimming"), was durch die Ausbildung eines konjugierten Doppelbindungssystems zur roten Farbe der Porphyrin(ogen)e führt (Abb. 4). Im ersten Schritt werden durch die Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UROD, E.C. 4.1.1.37) die Acetat-Seitenketten der Ringe in Methylreste umgewandelt. Die nächste Reaktionssequenz besteht in der Ausbildung von zwei Vinylresten anstelle von Propionatseitenarmen, ein Schritt, der durch die Coproporphyrinogen III-Oxidase (CPO, E.C. 1.3.3.3) katalysiert wird. Das daraus resultierende Protoporphyrinogen IX unterliegt danach einer Sequenz von vier Reaktionen aus drei hintereinander folgenden Desaturierungen und einer Tautomerisierung durch die Protoporphyrinogen IX-Oxidase (PPO, EC 1.3.3.4), wodurch das konjugierte Doppelbindungssystem des Protoporphyrins entsteht.

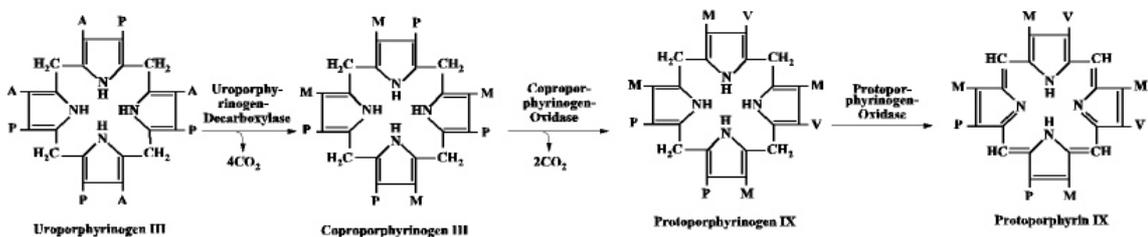


Abb. 4 Trimming der Seitenketten der Tetrapyrrole auf dem Weg zum Protoporphyrin IX. Bei der dargestellten Reaktionssequenz wird das konjugierte Doppelbindungssystem der Porphyrine ausgebildet und damit wesentlich die optischen Eigenschaften der zyklischen Verbindungen beeinflusst. Akkumulieren die gezeigten Intermediate, kommt es zur Photosensibilisierung. A = Acetat-, M = Methyl-, P = Propionat-, V = Vinylreste; nähere Erläuterungen im Text

Die aus drei Untereinheiten zusammengesetzte Mg-Chelatase ist für das Einfügen des Mg<sup>2+</sup> als Zentralion der Komplexverbindung 'Chlorophyll' verantwortlich. Parallel dazu wird in der Hämsynthese durch die Ferro-Chelatase (EC 4.99.1.1) Fe<sup>2+</sup> eingebaut.

Anschließend wird die Propionatseitenkette des Ringes III durch die Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase (EC 2.1.1.11) SAM-abhängig verestert und damit die Voraussetzung für die Cyclisierungsreaktion bei der Bildung des Ringes V geschaffen. Bei dieser, durch die Mg-Protoporphyrin-IX-Monomethylester-Cyclase katalysierten Reaktion entsteht Divinyl-Protochlorophyllid, welches dann durch die Vinyl-Reduktase in Protochlorophyllid umgesetzt wird. Die Reduktion von Protochlorophyllid wird in Angiospermen durch eine thylakoidgebundene, licht- und NADPH-abhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR, EC 1.6.99.1) katalysiert, während in Gymnospermen, Moosen, Lebermoosen, Algen und photosynthetisch aktiven Bakterien zusätzlich ein lichtunabhängiges Enzym aktiv ist. POR macht den Hauptproteinbestandteil der Membranen des Prolamellarkörpers in Etioplasten aus und spielt eine wichtige Rolle bei der lichtabhängigen Regulation der

Chloroplastenentwicklung.

Chlorophyll b (Chl b) besitzt an Position 7 eine Formyl- anstelle der Methylgruppe des Chlorophylls a, welche durch die Chlorophyllid-Oxygenase (CAO) auf der Stufe des Chlorophyllids a eingeführt wird, wobei ein 7-Hydroxymethylintermediat auftritt. Chl a selbst scheint kein Substrat für das Enzym zu sein. Die Interkonversion von Chl a und b über den sog. Chlorophyll-Zyklus (Oster et al. 2000) dient der Einhaltung eines optimalen Verhältnisses zwischen den Komplexen des Reaktionszentrums der Photosysteme (Chl a) und den inneren („core“) und äußeren Antennenpigment-Komplexen (Chl b).

Der letzte Schritt der Biosynthese des Chl a ist die Veresterung des Propionatrests von Ring IV mit der hydrophoben Kette des Phytylpyrophosphats, welche durch die Chlorophyll-Synthase katalysiert wird. In Bacteriochlorophyll a (BChl a) übernimmt Geranylgeraniol die Aufgabe des Phytols, und in BChl b wird der Phytylrest durch Phytadienol ersetzt. Auch in Pflanzen wird in ganz jungem Gewebe geranylgeranyliertes Chl a gefunden.

### 3.4.2 Die Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese

Die Tetrapyrrolbiosynthese unterliegt einer strikten und mehrstufigen Kontrolle sowohl durch innere Faktoren als auch durch Umwelteinflüsse (Grimm 1998, Grimm 1999). Dadurch wird sichergestellt, daß einerseits Chlorophyll, Phytochrom, Häm und andere Produkte des Syntheseweges immer ausreichend zur Verfügung stehen. Dies ist deshalb von besonderer Bedeutung, da Tetrapyrrole, an ihre entsprechenden Apoproteine gebunden, wichtige metabolische Aufgaben erfüllen, so z.B. in der Energieversorgung der Pflanze (Chlorophylle in der Lichtreaktion der Photosynthese, Häm in den Atmungskomplexen), der Entgiftung von ROS (Häm in Catalase und Peroxidasen), der N<sub>2</sub>-Fixierung (Häm im Leghämoglobin), der Versorgung mit reduzierten S- und N-Verbindungen (Sirohäm in Sulfit- bzw. Nitrit-Reduktase) oder der Lichtsignalperzeption (Phytochromobilin im Phytochrom). Andererseits sind die meisten Zwischenprodukte des Biosyntheseweges lichtempfindlich, können photosensibilisierend wirken (s. 3.1.1.1) und dadurch die Pflanze schwer schädigen. Schließlich muß die Aktivität der Tetrapyrrolbiosynthese an andere Stoffwechselflüsse und Synthesewege angepaßt werden, damit z.B. gewährleistet wird, daß in den sich entwickelnden Chloroplasten Chlorophylle, Carotinoide und pigmentbindende Proteine in entsprechendem Verhältnis zueinander vorhanden sind.

Zumindest drei Reaktionen des umfangreichen Syntheseweges dienen als Schlüsselstellen für die Regulation:

1. Die Synthese von ALA ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Reaktionssequenz, welcher durch Dunkelheit gehemmt und durch Licht stimuliert wird. Die Lichtregulation wird durch negative Rückkopplungsschleifen wahrscheinlich über die Menge der Zwischenprodukte Mg-Protoporphyrin, Protohäm und Protochlorophyllid realisiert.
2. In Angiospermen kann Protochlorophyllid (Pchlid) nur im Licht zu Chlorophyllid (Chlid) reduziert werden. In etiolierten Keimlingen akkumuliert Pchlid auf einem begrenzten Niveau bevor die o.a. Repression der ALA-Synthese eine weitere Anhäufung von Pchlid verhindert.
3. Das Endprodukt Häm zeigte in Hefe und tierischem Gewebe ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die Synthese von ALA. Dabei scheint Häm sowohl direkt als Inhibitor als auch indirekt als transkriptioneller Corepressor der Glutamyl-tRNA-Reduktase, dem Eingangsenzym der Tetrapyrrolsynthese, zu wirken.

Umgeht man die natürlichen Rückkopplungsschleifen, z.B. in dem man etiolierte Pflanzen in ALA-Lösung inkubiert, kommt es zur exzessiven Anhäufung von photosensitivem Pchlid mit der Folge von massiven Schäden bei anschließender Belichtung.

### **3.4.3 Transgene Pflanzen und Mutanten mit beeinträchtigter Tetrapyrrolbiosynthese**

Neben den sehr erfolgreich eingesetzten xantha- und albino-Mutanten (Henningsen et al. 1993) trugen in den letzten Jahren zunehmend transgene Pflanzenlinien zur Aufklärung von metabolischen Kontrollmechanismen der Tetrapyrrolbiosynthese bei. Dabei lieferten vor allem Antisense (AS)-Pflanzen für einzelne Enzymschritte der Tetrapyrrolbiosynthese überraschende Erkenntnisse. Neben den chlorotischen Linien, wie z.B. für GSA-AT (Höfgen et al. 1994), die sich durch eine erniedrigte Kapazität der Chlorophyllsynthese auszeichneten, wurden auch nekrotische transgene Linien erzeugt. Diese wiesen unter normalen Lichtbedingungen zwar kaum niedrigere Chlorophyll- oder Hämmengen dafür aber Läsionen an den Blättern auf, wie sie für die HR oder bestimmte abiotische Streßsituationen typisch sind (s. 3.3.1). Hierzu zählen AS-Linien für die Enzyme CPO (Kruse et al. 1995b), UROD (Mock und Grimm 1997) und PPO (Molina et al. 1999, Lermontova et al., unveröffentlicht).

Als die hier vorliegende Arbeit 1996 begonnen wurde, waren bis dahin nur der Phänotyp der CPO- bzw. UROD-AS-Pflanzen beschrieben und erste Analysen der antioxidativen Schutzsysteme durchgeführt worden (Kruse et al. 1995b, Keetman 1995). Es war bekannt, daß

die AS-Pflanzen durch die immense Akkumulation der entsprechenden Enzymsubstrate photosensibilisiert waren, weshalb die beobachteten Blattschäden und die damit in Zusammenhang stehende Retardation der Pflanzenentwicklung auf photodynamische Effekte zurückgeführt werden konnte (s. 3.1.1.1). Somit waren mit den UROD- und CPO-AS-Pflanzen transgene Linien für die ausführliche Analyse verfügbar, bei denen durch Photosensibilisierung oxidativer Streß intrinsisch erzeugt wird.

In der Literatur finden sich weitere Beispiele für photodynamisch hervorgerufenen oxidativen Streß. So weist die Les22-Mutante aus Mais einen „Disease Lesion Mimic“-Phänotyp auf, und es konnte gezeigt werden, daß in diesem Fall ein genetischer Defekt in der Uroporphyrin-Decarboxylase (UROD) vorliegt. Der Anstau von Uroporphyrinogen führt auch hier über Photosensibilisierungsreaktionen zur massiven Erzeugung von ROS und letztendlich zum Zelltod (Hu et al. 1998). Ähnliche Symptome werden beim Einsatz von photodynamisch wirksamen Herbiziden beobachtet, welche die Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO) hemmen und zum Anstau des photosensibilisierenden Substrates mit seinen fatalen Konsequenzen führen (Böger und Wakabayashi 1995, Wakabayashi und Böger 1999).

Auch bei Patienten mit bestimmten Porphyria-Krankheitsformen kommt es zu lichtabhängigen Hautläsionen, die auf vererbare genetische Defekte in der Hämbiosynthese, u.a. im UROD-Gen, zurückzuführen sind (Elder 1993).

### **3.5 Neuere methodische Ansätze zur Untersuchung von zellulären Streß- und Abwehrreaktionen**

In den letzten Jahren hat sich, bedingt auch durch die forcierte Entwicklung von entsprechenden Techniken, die gleichzeitige Durchmusterung der Expression einer großen Anzahl von Genen als effektive Methode erwiesen, um komplexe Veränderungen zu erfassen, die in einzelnen Zellen, Geweben, Organen oder auch ganzen Organismen durch Streß verursacht werden. Als einflußreiche Techniken auf der Ebene der Nukleinsäure haben sich hier verschiedene effektive Methoden der cDNA-Subtraktion (Diatchenko et al. 1999) und des sog. Differentiellen Displays (DD-RT PCR, Liang und Pardee 1992) sowie die Reverse Northern Blot Analyse von hochdicht aufgetragenen cDNAs auf festen Trägern (z.B. Glas) entwickelt (high density arrays; „Genomics“, Graner et al. 1999, Somerville und Sommerville 1999, Cushman und Bohnert 2000). Eine weitere wichtige Säule in diesem Methodengebäude ist die komplette Sequenzierung von pflanzlichen Modellgenomen wie z.B. von *Synechocystis*, *A. thaliana*, Reis oder Mais. Die umfangreichen Datenmengen, die durch solche Studien erzeugt werden, müssen

---

dabei um potente Aussagen ergänzt werden, die sich auf korrespondierende Proteinmengen, zugehörige Enzymaktivitäten und Produkte der Stoffwechselwege beziehen.

Auf dem Niveau der Proteine wurde die Auflösung von zweidimensionalen Gelelektrophoresen immer weiter verbessert, was in Kombination mit der hoch sensitiven Massenspektrometrie bzw. der traditionellen Teilsequenzierung von isolierten Polypeptiden über den Edman-Abbau Informationen über die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt oder Entwicklungszustandes als Protein („Proteom“) vorliegenden genetischen Information liefert (Thiellement et al. 1999). Zusätzlich zu diesem als „Proteomics“ bekannten Ansatz wird neuerdings auch das komplexe, hoch-veränderliche aber ebenfalls als charakteristisch für bestimmte Zustände, Stresssituationen etc. angesehene Muster von metabolischen Zwischen- und Endprodukten durch Methoden mit großem Probendurchsatz untersucht („Metabolics“, „Metabolic Profiling“, Sauter et al. 1991).

Parallel zu diesen „high throughput“-Methoden, mit deren Hilfe wichtige Informationen geliefert werden, haben verschiedene Autoren im kleineren Maßstab versucht, unter Stresswirkung bisher unbekannte, differentiell exprimierte Gene in Pflanzen zu identifizieren. Dabei nahm vor allem die Suche nach früh-induzierten Genen der Pathogenabwehr einen großen Raum ein (Herbers et al. 1995, Eckey-Kaltenbach et al. 1997, Lacomme und Roby 1999). Ebenso liefert die Analyse von Mutanten, die entweder hypersensitiv oder aber tolerant gegenüber Stress reagieren, wertvolle funktionelle Erkenntnisse über relevante Stoffwechsel- und Signalwege (Cushman und Bohnert 2000).

Auch in der vorliegenden Schrift wurde versucht, durch die Kombination von molekularen, biochemischen und physiologischen Methoden die antioxidative und Pathogenabwehr von porphyrischen Tabakpflanzen zu analysieren. Dabei wurden sowohl frühe als auch spätere Zeitpunkte in der Ausbildung von Blattläsionen als Folge von Zelltod in die Untersuchung einbezogen.

#### 4 Ziele dieser Arbeit

Pflanzen reagieren mit komplexen Antworten auf verschiedene Arten von Streß, und die Aufklärung solcher Reaktionen war und ist das Ziel eines wichtigen Zweiges der biologischen Forschung in den letzten Jahren. Hauptziel dieser Arbeit war es, eine detaillierte biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Pflanzen vorzunehmen, die Antisense-RNA für Uroporphyrinogen-Decarboxylase (UROD-AS, Mock und Grimm 1997) bzw. Coproporphyrinogen-Oxidase (CPO-AS, Kruse et al. 1995b) exprimieren. Aufgrund dieses gentechnischen Eingriffs kommt es zur Verringerung der entsprechenden Transkriptmenge in Sense-Orientierung, einer daraus resultierenden Abnahme des Zielproteingehaltes und der Enzymaktivität. Unter geeigneten Umweltbedingungen führen diese Voraussetzungen zur Photosensibilisierung durch die angestauten photosensitiven und autoxidablen Enzymsubstrate Copro- bzw. Uroporphyrin(ogen) und letztendlich zum Absterben von Zellen, was sich in Form von Blattnekrosen phänotypisch äußert.

In dem hier dargestellten experimentellen System wurde zum einen das antioxidative Schutzsystem der transgenen Tabakpflanzen untersucht, bei denen der nekrotische (porphyrische) Phänotyp bereits voll entwickelt war. Exemplarisch werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die UROD-AS-Linie 35/2 vorgestellt. Zum anderen stand die Analyse von Vorgängen, die sehr früh als Reaktion auf photooxidativen Streß ausgelöst werden, im Mittelpunkt des Interesses. Dazu wurde die Lichtdosisabhängigkeit der Ausbildung von Blattnekrosen ausgenutzt und Proben von Pflanzen über einen Zeitraum hin untersucht, in dem durch die Erhöhung der Lichtdosis Zelltodereignisse induziert wurden. Für diesen experimentellen Ansatz werden vor allem die an Pflanzen der CPO-AS-Linie 1/41 gewonnenen Resultate präsentiert.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Wie reagiert das antioxidative Schutzsystem auf den durch akkumulierende Porphyrine ausgelösten photooxidativen Streß?
  - Beobachtet man eine durchgehende Aktivierung der Schutzsysteme von der Transkript- bis hin zur Enzymaktivitätsebene?
  - Inwieweit ist eine Aktivitätssteigerung der regenerativen Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus dazu in der Lage, den erhöhten Bedarf an diesen niedermolekularen Antioxidantien zu decken?
  - Welche Veränderungen treten schon sehr früh während der Übergangsphase auf, die letztendlich mit der Ausbildung von Blattnekrosen abschließt?

- 
2. Welche Auswirkungen hat der photooxidative Streß auf den physiologischen Gesamtzustand der Pflanzen?
    - Gibt es z.B. Veränderungen in der Assimilationskapazität?
  3. Gibt es Gemeinsamkeiten mit anderen unter Streßeinfluß (z.B. bei Pathogenbefall) in der Literatur beschriebenen Abwehrreaktionen der Pflanzen?
  4. Gelingt es, durch die Ausnutzung des induzierbaren Streßsystems sehr zeitige Veränderungen auf der Ebene der Transkription zu erfassen und in Form einer streß- bzw. zelltodspezifischen (subtrahierten) cDNA-Bank verfügbar zu machen?
    - Befinden sich unter diesen frühzeitig induzierten Genen auch solche, die eine zentrale Rolle in der Streßantwort, z.B. als Transkriptionsfaktoren, spielen könnten?

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht gesondert angegeben, wurden alle Grundchemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Applichem (Darmstadt) bezogen. Feinchemikalien wurden fast ausschließlich von der Fa. Sigma (Deisenhofen) erworben. Das zur Markierung von DNA-Sonden verwendete  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP stammte von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) und NEN (Boston MA, USA). Die Herkunft der Kits für genetische Arbeiten ist in Tab. 2 aufgeführt. Die für Sequenzierung und PCR benötigten Oligonukleotidprimer wurden durch die Firmen Metabion (München), Life Technologies (Karlsruhe) und Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) synthetisiert (s. 5.2). DNA-Längenstandards stammten von den Firmen Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig), Quantum Appligene (Heidelberg) und Eurogentec (Seraing, Belgien).

### 5.2 Häufig verwendete Oligonukleotidprimer

Während die Primer UNI, Rev, T7, KS, SK und pQE30 Forward bzw. Reverse zum Sequenzieren eingesetzt wurden, stammen die beiden „nested“ Primer 1 und 2R aus dem PCR-Select Kit der Fa. Clontech (Heidelberg) und dienten der Erstellung und Überprüfung von subtrahierten cDNAs (s. 5.7.3 und 5.7.4.2). Die Primer HAPAS-KPN bzw. -XBA wurden zur Erzeugung eines Antisense-Konstruktes und die Oligonukleotide 288AS-Primer und 35S-Promotor-Primer zur Expressionsanalyse in GRP-AS-Pflanzen eingesetzt.

Tab. 1 Bezeichnung und Sequenz häufig eingesetzter Oligonukleotidprimer

Name	Synonym	Kürzel	Sequenz
Universal	M13 -40	UNI	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'
Reverse	M13 Reverse	REV	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'
T7		T7	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
KS		KS	5' TCG AGG TCG ACG GTA TC 3'

SK		SK	5' CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC 3'
PQE30 Forward			5' CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG 3'
PQE30 Reverse			5' GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3'
Nested PCR Primer 1		N1	5' TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T 3'
Nested PCR Primer 2R		N2R	5' AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT 3'
35S-Promoter-Primer			5' CTA TCC TTC GCA AGA CCC TTC CTC 3'
288AS-Primer		288AS	5' GGA TGC CGC TAT GGT TGC TGC 3'
HAPAS-KPN			5' ACT <u>GGT</u> <u>ACC</u> TAA AGC TTT GAG CTG CTT AAG 3'
HAPAS-XBA			5' GGA <u>TCT</u> <u>AGA</u> TGG AAA TGG ACA GCC TCC AG 3'

### 5.3 Nährmedien

Feste und flüssige Kulturmedien für Bakterien (LB) und Hefen (YPD, YNB +/- ausgewählter Mikronährstoffe zur Komplementation von Auxotrophiemarkern) wurden zubereitet und verwendet wie in der Literatur angegeben (Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1993). Die zur Pflanzentransformation und Sterilkultur benötigten Medien sind nachfolgend aufgeführt:

#### 2YT

- 16 g/l Bacto Trypton (DIFCO, Stuttgart)
- 10 g/l Hefeextrakt (DIFCO)
- 5 g/l NaCl
- pH 7,0 mit NaOH einstellen

zur Verwendung als festes Medium:

- 15 g/l Bacto Agar (DIFCO)

**2MG**

- 4,43 g/l Murashige und Skoog (MS)-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)
- 16 g/l Glucose
- 6 g/l BiTek-Agar (DIFCO)
- pH 5,7 mit NaOH einstellen

**2MS**

- 4,43 g/l Murashige und Skoog-Medium (Duchefa)
- 20 g/l Saccharose
- 8 g/l BiTek-Agar (DIFCO)
- pH 5,7 mit NaOH einstellen

Zugabe von

- 5 ml filtersterilisierter Lösung aus 4 g/l myo-Inositol; 0,1 g/l Nicotinsäureamid; 0,02 g/l Pyridoxin-HCl (Vitamin B<sub>6</sub>); 0,08 g/l Thiamin-HCl (Vitamin B<sub>1</sub>)
- 2,5 ml filtersterilisierter Betabactyllösung (200 g/l)

auf 1 l Medium

Zur Induktion der Wurzelbildung wurden sowohl 2MS als auch 2MG nach dem Autoklavieren 1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) und 0,2 mg/l Naphtylelessigsäure (NAA) zugesetzt.

**2MS-Agar für das Keimen von Samen**

- wie 2MS, nur ohne Saccharose

**5.4 Pflanzenanzucht und Probennahme**

Für die Untersuchungen wurden WT- bzw. transgene Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN (SNN)) eingesetzt. Es wurden die porphyrischen Linien 1/3 und 1/41 der Coproporphyrinogen-Oxidase-Antisense-Pflanzen (CPO-AS, Kruse et al. 1995b) und die Linien 35/2 und 35/12 der Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Antisense-Pflanzen (UROD-AS, Mock und Grimm 1997) verwendet.

Für die Mehrzahl der Experimente wurden mit dem Desinfektionsmittel Meliseptol (Braun, Melsungen) oberflächen-sterilisierte heterozygote F<sub>2</sub>-Samen auf MS-Agar-Platten (+ 50 µg/ml Kanamycin zur Selektion auf Transgene) im Schwachlicht (14 h: 20 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) zum Keimen gebracht und die Keimlinge nach ca. zwei bis drei Wochen in Erde pikiert. Die Pflänzchen wuchsen danach entweder im Gewächshaus bei ca. 25°C und 16 h Zusatzbeleuchtung durch 400W-Hochdruck-Na-Dampflampen, die auch im Winter - je nach Abstand von der Lichtquelle - bis zu 400 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> garantierten, oder in Klimakammern (Heraeus Vötsch, Balingen) heran, in denen Lichtintensität, Dauer der Belichtung, Luftfeuchtigkeit und Temperatur den experimentellen Ansprüchen angepaßt werden konnten. Die Pflanzen wurden während des ca. achtwöchigen Wachstums einmal umgetopft und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen.

Zur Untersuchung von Primärtransformanten und WT-Kontrollpflanzen wurden diese auf 2MS-Agar (+ 50 µg/ml Kanamycin als Selektionsmarker) im Schwachlicht (14 h: 20 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) steril kultiviert und bei ausreichender Bewurzelung auf Erde gepflanzt.

#### 5.4.1 Transgene Pflanzen mit nekrotischem Phänotyp

In ersten Untersuchungen zum oxidativen Schutzsystem wurden der WT und ausgewählte Linien der porphyrin-akkumulierenden Pflanzen (UROD 35/2 bzw. CPO-AS 1/41) im Gewächshaus oder in begehbaren Klimakammern (12 h: 500 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 25°C, 70 % rel. Luftfeuchte) bis zum Eintreten eines nekrotischen Phänotyps der Transgenen angezogen. Blätter gleichen Alters (dies entsprach, außer bei sehr stark photooxidativ geschädigten Pflanzen, auch gleichem Entwicklungszustand) von mehreren Pflanzen der gleichen Linie wurden vereinigt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und in diesem Zustand bis zur Homogenität gemörsert. Vom resultierenden, bei -80°C gelagerten Blattpulver wurden für die biochemischen Tests jeweils 100 mg-Portionen eingesetzt. Die zur Identifizierung verwendete Blattnummer ergab sich durch Zählen der Blätter von der Sproßspitze an in Richtung ältestes Blatt. Die Ergebnisse aus mehreren, unabhängigen Pflanzenanzuchten (≥ 2) wurden gemittelt und Standardabweichungen berechnet (n ≥ 5).

#### 5.4.2 Induzierbares Zelltodsystem - „Lichtshift“-Experimente

Die Ausbildung eines nekrotischen Phänotyps der porphyrischen Pflanzen ist u.a. stark abhängig von der Lichtmenge und läßt sich deshalb gezielt durch die Erhöhung der Lichtdosis auslösen. Mit Hilfe dieses induzierbaren Streßsystems wurden frühzeitige molekulare Veränderungen bei photooxidativem Streß in den transgenen Pflanzen untersucht. Pflanzen, die einem Lichtshift-Experiment unterworfen wurden, wuchsen für ca. 8 Wochen unter

kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer heran (8-14 Uhr (6h):  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 70 % rel. Luftfeuchte), bis sie ca. 15 Blätter ausgebildet hatten.

Unter diesen Umweltbedingungen waren CPO-AS-Pflanzen wegen der nur geringen Lichtdosis phänotypisch praktisch nicht von WT-Pflanzen zu unterscheiden. Die Lichtmenge wurde dann erhöht, indem die Photoperiode um 10 h verlängert wurde (Lichtshift: 8-24 Uhr (16h):  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Temperatur und Luftfeuchtigkeit blieben dabei unverändert. Während der bis zu siebentägigen Experimente (0-168h) wurden zu bestimmten Zeitpunkten Blattscheiben definierter Fläche als Proben ausgestochen und sofort in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren. Die Langzeitlagerung der Blattproben erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Um die Varianz im heterozygoten  $\text{F}_2$ -Probenmaterial zu minimieren, wurden in jeder Probe Blattscheiben aus gleichaltrigen Blättern dreier verschiedener Pflanzen vereinigt. Für die Ergebnisdarstellung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für mehrere (3-5) Proben unabhängiger ( $\geq 2$ ) Experimente berechnet.

#### 5.4.3 Lichtshift-Experiment bei niedrigem $\text{O}_2$ -Partialdruck

Um die Sauerstoff-Abhängigkeit der Photosensibilisierung durch akkumulierende Porphyrine zu untersuchen, wurden Pflanzen bis zu einer Woche in einer Spezialekammer weniger als 1%  $\text{O}_2$  ausgesetzt. Diese aus Plexiglas von der Fa. DMP AG (Fehraltorf, Schweiz) gefertigte gasdichte Kammer wurde mittels der Mischpumpe eines modifizierten Gaswechselmeßgerätes (LI-6400, LICOR, Lincoln NE, USA) mit einem regelbaren Gemisch aus reinem  $\text{N}_2$  und  $\text{CO}_2$  versorgt. Der Restsauerstoffgehalt,  $\text{CO}_2$  und Wasserdampf konnten registriert werden.

#### 5.5 Streßexperimente an ausgestochenen Blattscheiben

Um Streßreaktionen in den tetrapyrrol-akkumulierenden Pflanzen mit solchen zu vergleichen, die in Folge der Einwirkung anderer Stressoren auftreten, wurden Blattscheiben aus gleichaltrigen Blättern von mehreren WT-Pflanzen ausgestochen, die für 8 Wochen unter Gewächshausbedingungen gewachsen waren.

Zwei solcher Streßexperimente wurden durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei Blattscheiben mit einem Durchmesser von je 1 cm gemeinsam auf Pufferlösungen flotiert, die entweder Herbizide oder andere Chemikalien enthielten bzw. starkem Licht oder tiefen Temperaturen ausgesetzt wurden.

Im Streßexperiment I wurden die Blattscheiben am Anfang der Lichtphase im Gewächshaus ausgestochen und auf Pufferlösung (10 mM K-Phosphat, pH 7,0) mit den folgenden Zusätzen

für 24h im Dunkeln und anschließend weitere 5 h im Licht ( $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei RT bzw.  $25^\circ\text{C}$  inkubiert: 1 u.  $10 \mu\text{M}$  Methylviologen (MV), 1 u.  $10 \mu\text{M}$  Acifluorfen (AC), 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 u.  $100 \mu\text{M}$  Salicylsäure (SA). Eine Kältebehandlung (K) erfolgte auf Puffer bei  $6^\circ\text{C}$  (und ca.  $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); Starklichtstreß (HL) sollte durch Dauerbelichtung mit  $1500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei RT ausgelöst werden (Kaltlichtquelle KL 1500, Schott, Mainz). Außerdem wurde in einem Teil der Proben Trockenstreß hervorgerufen, in dem die Blattscheiben ohne Puffer inkubiert wurden. Je drei Blattscheiben wurden als eine Probe jeweils nach der 24-stündigen Dunkel- und der anschließenden 5-stündigen Lichtinkubation in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Im Streßexperiment II wurden der Inkubationsmodus verändert: Die Blattscheiben wurden am Ende der Lichtperiode im Gewächshaus ausgestochen und anschließend zuerst für 12 h im Dunkeln und dann entweder für weitere 6 h im Dunkel oder 6 h im Licht ( $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in den gleichen Pufferlösungen wie im Experiment I inkubiert und danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zusätzlich wurde in beiden Experimenten eine Kontrollprobe am Anfang, d.h. bereits beim Ausstechen der Blattscheiben gewonnen.

Aus den Blattproben wurde Gesamt-RNA isoliert und Northern Blot-Analysen nach Standardprotokollen durchgeführt.

## 5.6 Kreuzung von Tabakpflanzen

Mit dem Pollen von heterozygoten Pflanzen aus der  $F_1$ -Generation der transgenen Linien CPO-AS 1/3 und 1/41 sowie der Linie UROD-AS 35/2 wurden jeweils homozygote Tabakpflanzen bestäubt, deren Samen durch D. Inzé (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Pflanzen der Sorte Petit Havana SR1 exprimieren Überexpressionskonstrukte für Mn-SOD (Slooten et al. 1995), Fe-SOD (Van Camp et al. 1996) bzw. APX (Inzé et al., unveröffentlicht) und weisen im Vergleich zum WT erhöhte Aktivitäten der entsprechenden Zielenzyme im Chloroplasten auf. Aus den Samen der  $3 \times 3$  (=9) Kreuzungsprodukte entwickelten sich im Gewächshaus Pflanzen, deren phänotypische Unterschiede im Vergleich mit den Eltern registriert und von denen Blattproben für biochemische Analysen genommen wurden, nachdem die Pflanzen ca. 13-15 Blätter ausgebildet hatten.

## 5.7 Gentechnische Arbeiten

Standardtechniken wie die

- Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR),
- das Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen,
- die Dephosphorylierung von linearisierten Vektormolekülen mit alkalischer Phosphatase,
- die DNA-Ligation mit Hilfe von Ligasen,
- die chemische Transformation oder Elektroporation von Plasmiden in *E. coli*-, *A. tumefaciens*- oder *S. cerevisiae*-Zellen,
- die Präparation von Plasmiden im kleinen („Miniprep“) oder mittelgroßen Maßstab („Midiprep“),
- die elektrophoretische Trennung und Sichtbarmachung von DNA in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen,
- die Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen oder nach Elektrophoresen und
- die radioaktive Markierung von Fragmenten zum Einsatz als Hybridisierungs-Sonde

erfolgten anhand von veröffentlichten Protokollen (Sambrook et al. 1989). Für eine Reihe von Techniken kamen auch Kits verschiedener Hersteller zum Einsatz:

Tab. 2 Häufig verwendete Reagenzien- und Methodensysteme (Kits) verschiedener Hersteller

Technik	Kit	Hersteller/ regionale Vertriebsfiliale
Direktes Klonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang	TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep), vor allem zur Sequenzierung	GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midiprep)	Midi Plasmid Preparation Kit	Qiagen, Hilden
Reinigung von PCR-Produkten	PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen	Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
Elution und Reinigung von DNA nach Agarosegel-Elektrophorese	Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten als Sonde (s.5.7.4, 5.7.5, 5.7.6)	Random Primers DNA Labeling System RadPrime DNA Labeling System Nick Translation System	GIBCO-BRL Life Technologies, Karlsruhe
Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (s. 5.7.3, 5.7.4)	PCR-Select cDNA Subtraction Kit (PT1117-1) PCR-Select Differential Screening Kit (PT3138-1)* (* nur einige der im Handbuch beschriebenen Techniken angewendet)	Clontech, Heidelberg
Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe	RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
Präparation von polyA <sup>+</sup> -RNA aus Gesamt-RNA im kleinen Maßstab (s. 5.7.1, 5.7.5)	Dynabeads	Deutsche Dynal, Hamburg
Chemiluminometrischer Nachweis von durch Antikörper gebundenem Antigen auf Western Blots (s. 5.7.10)	ECL Western blotting detection agents	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig

Gesamt-RNA aus Blättern und anderen Pflanzenteilen wurde nach einer veröffentlichten Standardmethode präpariert (Chomczynski und Sacchi 1987). Für kohlenhydratreiche Gewebe wurde hoch-reine RNA auch mit dem in Tab. 2 angegebenen Kit der Fa. Qiagen isoliert.

### 5.7.1 Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA

PolyA<sup>+</sup>-RNA wurde sowohl in größeren Mengen für die Erstellung einer subtrahierten cDNA-Bank als auch im Micro-Maßstab für die Erzeugung von einzelsträngigen cDNA-Sonden benötigt. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Techniken zum Einsatz.

Die Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA, die als Ausgangsmaterial bei der Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank diente, wurde mittels oligodT-Cellulose (Roche Diagnostics, Mannheim) direkt aus Blattextrakten in einem kombinierten Zentrifugations („Batch“)- und Säulenverfahren durchgeführt und folgte dabei dem in Apel und Klopstech (1978) beschriebenen und später durch Pötter und Klopstech (1993) modifizierten Protokoll. Diese Methode lieferte ca. 5-10 µg polyA<sup>+</sup>-RNA pro 10 g Frischmasse von jungen Blättern (6. Blatt von der Sproßspitze).

Alle Lösungen wurden mit 0,2 % DEPC angesetzt und doppelt autoklaviert, um mögliche RNase-Kontaminationen zu beseitigen. Je Präparation wurden ca. 12 g des Pflanzenmaterials mit Hilfe von flüssigem Stickstoff im vorgekühlten Mörser mit dem Pistill gründlich homogenisiert. Das gemörserte Material wurde dann in Zentrifugenbecher zu 60°C warmem Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 M NaCl; 3 % SDS; 10 mM EDTA) gegeben und für 10 min bei RT und nach Zugabe von je 120 µl Proteinase K-Lösung (100 mg/ml) weitere 20 min kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 10 000 min<sup>-1</sup> wurde der Überstand durch Nylongaze in neue Gefäße filtriert. Nachdem die NaCl-Konzentration des Filtrates von 0,1 auf 0,4 M erhöht und das resultierende SDS-Präzipitat durch leichtes Erwärmen wieder aufgelöst wurde, konnte die zuvor in Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,4 M NaCl; 0,2 % SDS; 1 mM EDTA) äquilibrierte oligodT-Cellulose für 20 min unter Schütteln der Gefäße an die polyA<sup>+</sup>-RNA des Extraktes binden (ca. 250 mg oligodT-Cellulose/135 ml Extrakt). Nach kurzer Zentrifugation (3 min, 5000 min<sup>-1</sup>) und Resuspendierung des Pellets in 40 ml Bindungspuffer, wurde dieses auf die gleiche Weise zweimal mit Bindungspuffer und einmal mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,2 % SDS; 1 mM EDTA) gewaschen, anschließend in 10 ml Waschpuffer aufgenommen und in eine leere Säule (10x1 cm) mit Glasfrittenboden gefüllt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA mit auf 65°C erwärmtem Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) von der oligodT-Cellulose abgelöst. Aus dem Eluat wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 4 M NaCl und 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C gefällt und das Pellet mit 3x1 ml 0,2 M N-acetat (in 70 % Ethanol) gelöst. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4°C erneut gefällt und nach Entfernen des Überstandes und Trocknen in 100 µl Wasser gelöst. Nach spektralphotometrischer Bestimmung der Konzentration und Kontrolle der Intaktheit im formaldehyd/formamidhaltigen Agarosegel wurde die polyA<sup>+</sup>-RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Präparation von polyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA in Mengen, wie sie zur Erzeugung von radioaktiv markierten, einzelsträngigen cDNA-Sonden benötigt wurden, kam das in Tab. 2 angegebene Dynabead-System unter Einhalten der dazugehörigen Gebrauchsanleitung zum Einsatz. Aus bis zu 75 µg Gesamt-RNA wurde auf diese Weise ca. 1 µg hoch-reine polyA<sup>+</sup>-RNA gewonnen.

### **5.7.2 Transfertechniken für RNA und DNA (Northern und Southern Blot) und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden**

Northern bzw. Southern Blots mit formaldehyd/formamid-denaturierter RNA bzw. mit DNA wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Hybond-N-Membranen

der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) bzw. Nylonmembranen der Marke GeneScreen (NEN, Boston MA, USA) kamen als Trägermaterialien zum Einsatz. Der Transfer von RNA auf die Membran erfolgte vorzugsweise als Kapillarblot über 16 h; DNA hingegen wurde mit einem Vakuumblotter der Fa. Quantum Appligene (Heidelberg) entsprechend der Bedienungsanleitung übertragen. Gleiche Mengen an geladener Nukleinsäure sowie die Integrität wurden vor dem Transfer durch Färben der Gele mit Ethidiumbromid überprüft.

Nach Fixierung der RNA bzw. DNA auf der Trägermembran durch UV-Behandlung („Crosslinken“) und Prä-Hybridisierung wurde mit radioaktiv markierten Sonden unter stringenten Bedingungen hybridisiert (Church und Gilbert 1984) und anschließend bei der gleichen Temperatur mit Na-citrat-gepufferter NaCl-Lösung (SSC) gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die Sonden wurden mittels der in Tab. 2 angegebenen Kits unter Einsatz von jeweils 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert. Nicht-eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) abgetrennt und die so gereinigten Sonden nach thermischer Denaturierung für die Hybridisierung eingesetzt.

Die radioaktiv markierten Banden wurden entweder autoradiographisch auf Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) oder mittels Imaging Plate (Fuji Film Tokyo, Japan; in Deutschland: Raytest, Straubenhardt) und Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) detektiert und mit dem ImageQuant-Software-Paket (Molecular Dynamics) ausgewertet.

### **5.7.3 Konstruktion einer subtrahierten cDNA-Bank mittels „Subtraktiver Suppressions- Hybridisierung“ (SSH)**

#### *5.7.3.1 Allgemeine Ausführungen zum Prinzip der Methode*

Subtraktive Hybridisierung ist eine effiziente Methode, um zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und diejenigen Gene zu klonieren, die spezifisch nur in einer der beiden Populationen exprimiert werden (Diatchenko et al. 1996, 1998, 1999). Auch verschiedene andere Techniken (z.B. Liang und Pardee 1992) sind zu diesem Zweck entwickelt worden, die aber grundsätzlich alle auf dem gleichen Prinzip beruhen. Der Unterschied zwischen den Methoden liegt vor allem in zwei Aspekten:

- Wie werden sehr seltene mit sehr häufigen Transkripten in ihrer Abundanz aufeinander abgeglichen („Normalisierung“)?
- Auf welche Weise werden die differentiell von den gemeinsam exprimierten Transkripten isoliert und anschließend vervielfältigt?

Zuerst werden bei den meisten Verfahren beide mRNA-Populationen in cDNA umgewandelt. Als „Tester“-cDNA wird dabei das cDNA-Gemisch bezeichnet, das die differentiell exprimierten Transkripte beinhaltet, nach denen im konkreten Vergleich z.B. zweier physiologischer Zustände gesucht wird (hier: cDNA aus CPO-AS Linie 1/41). Als „Driver“ dient die cDNA des Referenz-Zustandes (im konkreten Versuch: cDNA aus WT), die vor allem jene Transkriptkopien enthält, die gemeinsam in beiden cDNA-Populationen vorkommen. Diese gilt es aus der Tester-cDNA zu entfernen (d.h. der „Driver“ wird vom „Tester“ „subtrahiert“). Üblicherweise wird dies durch die Hybridisierung beider cDNA-Populationen erreicht, nachdem zuerst durch Denaturierung Einzelstränge erzeugt wurden. Nachfolgend werden die neu geformten Doppelstränge abgetrennt und die verbleibenden cDNA-Einzelstränge, die keinen Hybridisierungspartner gefunden haben, werden als testerspezifisch angesehen.

In der auf Englisch als „Suppression Subtractive Hybridization“ bezeichneten Technik wird die Selektion differentiell exprimierter Transkripte durch die Kombination zweier entscheidender Prozeßabschnitte erzielt (Abb. 5).

Nach der cDNA-Synthese aus polyA<sup>+</sup>-RNA werden Tester- und Driver-cDNA getrennt voneinander mit dem Restriktionsenzym RsaI geschnitten, welches eine Vierernukleotid-Sequenz (GT↓AC) erkennt und Fragmente von durchschnittlich 600 bp mit glatten („blunt“) Enden liefert. Auf diese Weise wird eine erste, längenbezogene Normalisierung der Transkripte erreicht.

Nur die Tester-cDNA wird nun in zwei Fraktionen aufgeteilt und jede mit einem anderen zweiteiligen Adapter ligiert, der wegen der darin vorhandenen Primersequenzen für die spätere PCR-Amplifikation benötigt wird. Im nächsten Schritt hybridisieren in zwei getrennten Reaktionen die beiden Populationen von Tester-cDNA-Einzelsträngen mit in hohem Überschuß zugegebener einzelsträngiger Driver-cDNA, die keine Primer-Bindungsstellen besitzt. Die für die Tester-cDNA-Population spezifischen und damit im Gesamtansatz seltenen Transkripte finden auch nach der sich anschließenden Vereinigung der bisher getrennten Ansätze keinen Hybridisierungspartner in der Driver-cDNA, bilden aber mit ihrer (den jeweils anderen Adapter tragenden) Entsprechung ein doppelsträngiges cDNA-Molekül (Abb. 5, Fall e) mit zwei verschiedenen Primer-Bindungsstellen an den Enden.

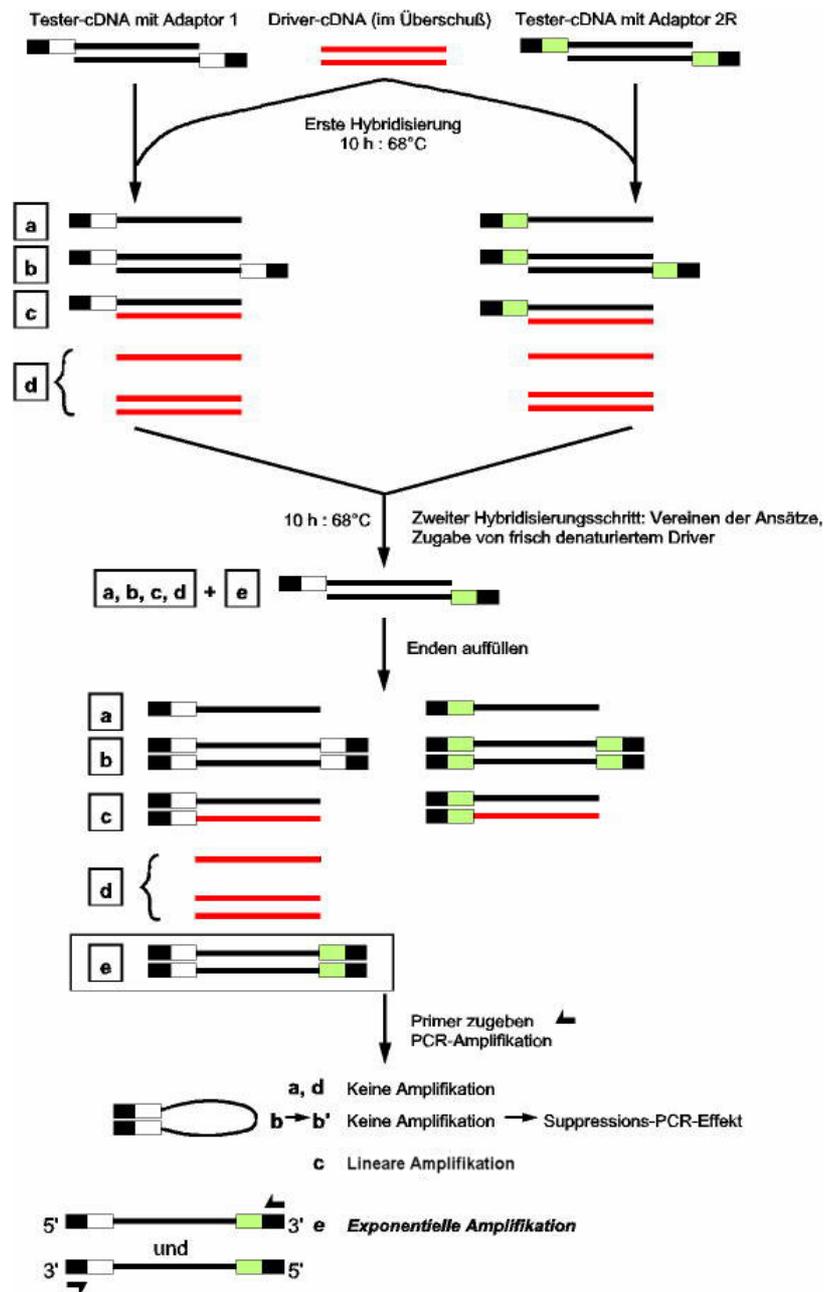


Abb. 5 Schematische Darstellung der subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH). Die Abbildung wurde in modifizierter Form aus dem Handbuch zum PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, Heidelberg) entnommen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Dieses kann in der nun folgenden PCR unter Einsatz der entsprechenden Primer exponentiell amplifiziert werden. Die Amplifikation von sehr häufigen tester-cDNA-spezifischen Doppelsträngen, die sich schon im ersten Hybridisierungsschritt vereinigt haben und an beiden Enden identische Adapter tragen, wird durch die in der PCR bevorzugte Ausbildung einer sog. Pfannenstiel-Struktur („pan handle“) weitestgehend unterdrückt (Abb. 5, Fall b). Diesem Effekt, der für eine weitere „Normalisierung“, d.h. ein quantitatives Angleichen von seltenen und häufigen Transkripten in der Tester-cDNA sorgt, wird durch den Begriff „Suppression“ im

Namen der Methode Rechnung getragen. In einer weiteren PCR wird mit einem nach innen versetzten Primerpaar („nested PCR“) die Spezifität der Amplifikation noch einmal erhöht. Obwohl auch hier der äußere Abschnitt der Adapter an beiden Enden identisch ist, verhindert in diesem Fall die aufgrund der zweigeteilten Struktur kürzere Gesamthomologie der Adapter (außer bei sehr kurzen, und für die weitere Analyse eher uninteressanten) Molekülen den Suppressionseffekt.

#### 5.7.3.2 Details der Durchführung

Die gesamte Prozedur wurde zuerst mit Enzymen und Reagenzien verschiedener Hersteller versucht. Bei der Wiederholung fiel die Wahl aber auf den von der Fa. Clontech (Heidelberg) angebotenen PCR Select cDNA Subtraction Kit, in dem sämtliche Komponenten und Schritte (von der cDNA-Synthese bis zur PCR) aufeinander abgestimmt bzw. optimiert sind. Ausgangsmaterial waren je 2 µg polyA<sup>+</sup>-RNA des sechstjüngsten Blattes von WT-(Driver) und CPO-AS 1/41 (Tester), die aus Proben extrahiert wurden, welche einem modifizierten Lichtshift-Experiment entstammten (s. Abschn. 5.4.2). Zusätzlich zur Verlängerung der Lichtperiode wurde in diesem Experiment auch die Lichtintensität von 200 auf 400 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> verdoppelt, um die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Blattläsionen zu maximieren. Die Pflanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Probennahme seit 12 h in der verlängerten Lichtphase, d.h. sie hatten zum ersten Mal eine im Vergleich zu den vorherigen Bedingungen (6h: 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) auf das Vierfache erhöhte Lichtdosis erhalten.

Das aus dem zweiten PCR-Schritt resultierende Gemisch aus cDNA-Amplifikaten wurde lt. Herstellervorschrift mit Hilfe des in Tab. 2 angegebenen T/A-Klonierungskits in den Vektor pCRII (Invitrogen, Groningen, Niederlande) eingesetzt und die Plasmide in den *E. coli*-Stamm DH5α (Life Technologies, Karlsruhe) transformiert. Glycerinkulturen aus den Einzelkolonien dienten als Grundlage sowohl für die Langzeitlagerung der cDNA-Klone als auch für die Präparation von Plasmid-DNA bzw. von PCR-Amplifikaten der cDNA-Inserts.

### 5.7.4 Vergleich der Expression verschiedener Transkripte durch Reverse Northern Blots

#### 5.7.4.1 Erzeugen von Membranen mit regelmäßig angeordneter DNA (Arrays): Kolonie-PCR und Southern Blot, Kolonie-Lifts, Spot Blots

Um die tatsächliche differentielle Expression der Gene zu überprüfen, die durch die SSH-Methode identifiziert werden konnten (s. 5.7.3), wurden die klonierten cDNAs

Filterhybridisierungen unterworfen. Einige dieser cDNAs wurden durch PCR mit den Primerpaaren UNI und REV bzw. N1 und N2R (s. 5.2) und hitze-denaturierter Bakterienkultur als Matrize („colony PCR“) zuerst amplifiziert und die PCR-Produkte nach der Trennung im Agarosegel und Denaturierung auf Nylonmembranen übertragen (Sambrook et al. 1989, s. auch Handbücher diverser Hersteller von Transfermedien, z.B. Hybond N von Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig).

Für eine weitaus größere Anzahl von cDNA-Klonen wurde dieses Verfahren umgangen und regelmäßig angeordnete, numerierte, plasmidhaltige Bakterienkolonien wurden direkt in einem sog. Kolonie-Lift auf Nylonmembranen übertragen und dort durch Alkalibehandlung denaturiert (Sambrook et al. 1989, s. auch Handbuch zum PCR-Select Differential Screening Kit, Clontech, Heidelberg).

Alternativ zu den beiden genannten Möglichkeiten wurden definierte Volumina inserthaltiger Plasmid-DNA mit bekannter Konzentration entweder mit Hand oder automatisch (BioGrid, BioRobotics, Cambridge, UK) auf mehrere Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) nach einem bestimmten Muster aufgetropft („spotting“) und auf diese Weise auch eine gleichzeitige quantitative Auswertung der Expression einer Vielzahl von Genen möglich. Eine genaue Anleitung ist den Handbüchern zum PCR-Select cDNA Subtraction Kit bzw. Differential Screening Kit zu entnehmen (Clontech, Heidelberg).

#### 5.7.4.2 *Differentielles Durchmustern (Screening) der subtrahierten cDNA-Bank*

Die so erstellten Nylonmembranen wurden nach Fixierung der DNA und Prä-Hybridisierung nach Empfehlung des Handbuches zum PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech, Heidelberg) unter hoch-stringenten Bedingungen mit speziellen cDNA-Mischsonden hybridisiert (s.u.). Diese Verfahrensweise steigert die Sensitivität und die Selektivität des Nachweises von wirklich differentiell exprimierten Genen. Setzt man hingegen die normale „Kopie“ der polyA<sup>+</sup>-RNA der beiden zu vergleichenden Zustände als Sonde ein (s. Abschnitt 5.7.5), müssen die entsprechenden Transkripte relativ häufig (> 0,2 %) in der Ausgangs-polyA<sup>+</sup>-RNA vorliegen, um ein nachweisbares Hybridisierungssignal mit der korrespondierenden cDNA auf der Nylonmembran zu erzeugen (James und Higgins 1985, Wang und Brown 1991). Wenig abundante aber doch differentiell exprimierte Transkripte, deren Identifikation oft ein Ziel der Subtraktion ist, lassen sich auf diese Weise nicht nachweisen.

Es kamen zwei subtrahierte cDNA-Sonden zur Anwendung, die das Subtraktionsergebnis in gewünschter Richtung („forward“, d.h. Tester – Driver = CPO-AS 1/41 – WT) bzw. in umgekehrter Richtung („reverse“, Tester‘ – Driver‘ = WT – CPO-AS 1/41) darstellten. Die

„forward“ subtrahierte Sonde war somit mit der cDNA identisch, die auch als subtrahierte cDNA-Bank kloniert wurde. Um einen starken Hintergrund bei der Hybridisierung wegen der auch in der cDNA-Bank vorhandenen Adaptersequenz zu vermeiden, wurden von beiden als Sonde vorgesehenen Subtraktionsprodukten die Adapter mit den Restriktionsenzymen RsaI, EagI und SmaI entfernt. Nach Markierung der Sonden mit einem der in Tab. 2 angegebenen Kits und Abgleich auf gleiche Radioaktivität (s. auch 5.7.5) wurden die Membranen mit den geordneten cDNA-Klonen parallel mit beiden Sonden unter hoch-stringenten Bedingungen hybridisiert und anschließend gewaschen.

Alle nur mit der „forward“ subtrahierten Sonde hybridisierenden cDNAs sollten tatsächlich differentiell exprimierte Transkripte repräsentieren. Diejenigen Vertreter der Bank, die auch mit der „reverse“ subtrahierten Sonde ein deutliches Hybridisierungssignal geben, können als nicht-signifikant, d.h. als Hintergrund abgetan werden (Wang und Brown 1991, Lukyanov et al. 1996, s. auch Handbücher des PCR-Select cDNA Subtraction Kit bzw. Differential Screening Kit (Clontech, Heidelberg).

Nach gründlichem Entfernen der Hybridisierungspartner (Strippen) wurden die Membranen nachträglich mit einer Sonde hybridisiert, die homolog zu Vektorsequenzen (pCRII) der auf den Membranen gebundenen Plasmide ist. Mit diesem Basiswert, der ein Maß für die vorhandene DNA-Menge darstellt, konnten die spezifischen Hybridisierungssignale mit den „forward“ bzw. „reverse“ subtrahierten Sonden abgeglichen werden. Die Quantifizierung der radioaktiven Hybridisierungssignale erfolgte in allen Fällen mit dem zum Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) zugehörigen Analyseprogramm ImageQuant.

#### **5.7.5 Erststrangsynthese zur Erzeugung von radioaktiv markierten einzelsträngigen cDNA-Sonden**

Nylonmembranen, auf die denaturierte cDNAs in geordneter Weise aufgetragen worden waren (Spot Blots), wurden anschließend mit einem komplexen Gemisch einzelsträngiger cDNA hybridisiert („Reverse Northern Blots“). Dieses Verfahren ermöglicht das gleichzeitige Durchmusterung der Transkriptakkumulation einer Vielzahl von Genen.

Die Sonden wurden aus ca. 1 µg polyA<sup>+</sup>-RNA (Präparation wie in 5.7.1) hergestellt, welche mittels 50 U Reverser Transkriptase (Expand RT, Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Erststrangsynthese zu cDNA umgeschrieben wurde. Als Primer dienten in einem 20 µl Ansatz 100 pmol oligodT (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig). Je 50 µCi α-<sup>32</sup>P-dCTP wurden zur radioaktiven Markierung des Erstranges für 1 h bei 42°C eingesetzt. Die

Konzentration der anderen Komponenten (Reaktionspuffer, dATP, dGTP, dTTP, RNase-Inhibitor und Wasser) entsprach dem Expand RT-Beipackzettel. Der weitere Prozeß der Abtrennung von nicht-inkorporierten dNTPs, Denaturierung, Hybridisierung und Waschen der Blots folgte dem o.a. Verlauf (s. 5.7.2). Bevor die Sonden für die Hybridisierung Verwendung fanden, wurde der radioaktive Einbau durch „Zählen“ der  $^{32}\text{P}$ -Cerenkov-Strahlung im Scintillations-Zähler (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac, Turku, Finnland) bestimmt und auf Basis dieser Werte identische Mengen an Radioaktivität in parallelen Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

Von den Membranen wurden nach autoradiographischer Auswertung mit Hilfe des Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) die Radioaktivität entfernt (Strippen) und die Filter danach, wie in Abschnitt 5.7.4.2 beschrieben, mit einer vektorspezifischen Sonde erneut hybridisiert, um eine Grundlage für die quantitative Auswertung der Autoradiogramme zu haben.

#### **5.7.6 Durchmustern einer in Bakteriophagen verpackten Tabak-cDNA-Bank nach Vollängenklonen**

Sowohl für das aus Tabak bekannte Gen *Salicylic Acid Responsive* SAR8.2 als auch für das zum Transkriptionsfaktor *Heme Activated Protein* Hap5b aus *A. thaliana* homologe Gen wurde in einer  $\lambda$  ZAP II-Bank (Stratagene Europe, Amsterdam, NL) nach vollständigen cDNA-Klonen gesucht. Diese cDNA-Bank repräsentiert  $2 \times 10^6$  unabhängige mRNA-Spezies aus Blättern von *N. tabacum* var. SR1, deren cDNAs in den Bakteriophagen  $\lambda$  verpackt sind. Plattieren der Bank, Filter(Plaque)-Lifts, die Identifizierung der mit den eingesetzten Sonden hybridisierenden Plaques, *in vivo*-Excission und anschließende Klonierung der resultierenden Plasmid-DNA erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1993) bzw. den Handbüchern zur cDNA-Bank und dem Exassist/SOLR-*in vivo*-Excissions-System (Stratagene Europe, Amsterdam, NL).

#### **5.7.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse**

Sämtliche Sequenzierungen wurden als Serviceleistung im Sequenzierlabor des IPK Gatersleben auf Geräten des Typs ABI Prism 377 DNA Sequencer (ABI, Foster City CA, USA) nach ABI-Protokollen durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte vor allem am Computer mit den Programmpaketen PC/GENE (IntelliGenetics, Oxford, UK), Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA) und dem im Internet verfügbaren „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.gov>).

### 5.7.8 Erstellen von Antisense-Konstrukten für GRP und das Tabakhomologe zu Hap5b

Auf Grundlage der Sequenz der Vollängenklone von *Glycine Rich Protein* (GRP) und *Heme Activated Protein* (Hap5b) wurden zwei unterschiedliche Strategien gewählt, um Konstrukte zu erzeugen, in denen die kodierende Sequenz in Antisense-Orientierung vorliegt.

Im Fall von GRP konnte ein 435 bp großes Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme KpnI und XbaI aus dem Vektor pCRII ausgeschnitten und dieses danach gerichtet in den ebenfalls mit KpnI/XbaI linearisierten Vektor BinAR-TX (Höfgen und Willmitzer 1990) inseriert werden. Das Insert setzt sich aus der 297 bp langen Antisense-GRP-cDNA und den die cDNA links und rechts einschließenden SSH-Adaptoren ( $\equiv$  Nested Primern N1 und N2R mit einer Länge von 22 bzw. 20 bp, s. Tab. 1) sowie 45 bzw. 50 bp des beidseitig vorhandenen Polylinkers von pCRII zusammen.

Bei der zum Transkriptionsfaktor Hap5b homologen cDNA wurden zuerst entsprechende Schnittstellen für KpnI und XbaI durch eine PCR-Amplifikation mit den in der Tab. 1 angegebenen PCR-Primern HAPAS-KPN und HAPAS-XBA eingeführt, die den interessierenden cDNA-Abschnitt flankierten. Die nach der Behandlung mit KpnI und XbaI noch 705 bp langen PCR-Produkte wurden nachfolgend in den ebenfalls mit KpnI und XbaI linearisierten Vektor BinAR-TX in Antisense-Orientierung eingesetzt.

### 5.7.9 Pflanzentransformation und Regeneration von transgenen Pflanzen in Sterilkultur

Die Transformation von Tabak (*N. tabacum* var. Samsun NN) erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV 2260)-vermittelten Gentransfer (Horsch et al. 1985). Übernachtkulturen der mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Agrobakterien wurden abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml 2YT resuspendiert. Sterile Stücke von jungen Tabakblättern wurden in der Agrobaktériensuspension inkubiert und in Petrischalen mit festem 2MG ohne Selektionsmarker (Antibiotika) für zwei Tage im Dunkeln inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte auf 2MG mit den entsprechenden Antibiotika (Kanamycin und Betabactyl) und Vitaminen bis zur Regeneration von Sprossen mit ca. 1 cm Länge. Diese wurden zur Induktion der Wurzelbildung auf BAP- und NAA-haltiges 2MS-Medium mit entsprechenden Antibiotika umgesetzt.

### 5.7.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blots

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Proteinextraktion wurde tiefgefrorenes Probenmaterial in einem modifizierten Extraktionspuffer (56 mM DTT, 2 mM EDTA, 56 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 12 % Saccharose, 2 % SDS) homogenisiert, und nach Konzentrationsbestimmung und Denaturierung der Proben für 10 min bei 95°C wurden gleiche Mengen an Protein (10–20 µg) in 12 oder 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen getrennt. Der Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) erfolgte mit Hilfe eines Semi-Dry Blotters (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) nach veröffentlichten Protokollen (s. z.B. Handbuch zu Hybond C). Die gleichmäßige Beladung der Gele und gelungener Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch reversibles Anfärben der Proteine auf der Nitrocellulose mit Ponceau S kontrolliert.

Zum immunologischen Nachweis der Zielproteine auf der Membran wurden die primären Antikörper (Tab. 3) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Handhabung der sekundären Antikörper (Sigma, Deisenhofen) erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Tab. 3 Herkunft der verwendeten primären Antikörper

primärer Antikörper gegen:	freundlicherweise zur Verwendung überlassen von:
cytosolische APX	H. Saji (Onagawa, Japan)
Catalase	D. Klessig (Piscataway, USA)
PR-S	B. Fritig (Strasbourg, Frankreich)
Sesquiterpen-Cyclase	J. Chappel (Lexington, USA)

Durch Antikörper markiertes Antigen wurde mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) sichtbar gemacht. Die Größenabschätzung erfolgte anhand von Markerproteinen mit bekannten Molekularmassen (LMW Electrophoresis Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig).

### 5.7.11 Durchmustern einer *A. thaliana*-cDNA-Bank im Shuttle-Vektor pFL61 – Allgemeine Methoden bei der Arbeit mit *S. cerevisiae*

Ein zum Hauptprojekt alternativer methodischer Ansatz zur Suche nach Genen aus *A. thaliana*, die auch in Hefezellen funktionell sind und diese durch ihre Expression toleranter gegenüber oxidativen Streßbedingungen machen, wurde durch die Arbeiten von E. Babiychuk und anderen

---

angeregt (Babiychuk et al. 1995, Kushnir et al. 1995, Kampfenkel et al. 1995).

Dazu wurde zuerst ermittelt, bis zu welchen Konzentrationen von Oxidationsmitteln im Medium Zellen des eingesetzten *S. cerevisiae*-Stammes YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-901 ade1-101 ura3-52*; Yeast Genetic Stock Center, University of California at Berkeley, USA) noch zu wachsen in der Lage sind. Getestet wurden z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Butylhydroperoxid oder Menadion, ein Vitamin K-Derivat, das zur vermehrten Bildung von Superoxid beiträgt. Anschließend wurde der Stamm mit einer cDNA-Bank aus *A. thaliana* im Vektor pFL61 (Minet et al. 1992) bzw. mit dem leeren Plasmid mittels Elektroporation transformiert und Transformanten anhand ihrer komplementierten Ura-Defizienz auf Minimalmedium selektiert. Der eingesetzte Vektor besitzt alle zur Expression in *S. cerevisiae*, aber auch alle zur Replikation in *E. coli* nötigen Elemente und gehört deshalb zu den sog. Shuttle-Vektoren (Bonneaud et al. 1991). Nach Abschwämmen der Transformanten vom Ura-Selektionsmedium wurden mit ihnen frische Flüssigkulturen angeimpft und diese nach Erreichen der frühen stationären Phase auf Minimalmedium ausgebracht, welches zusätzlich zum Ura-Selektionsmarker noch mit Konzentrationen der Oxidationsmittel supplementiert war, welche von Zellen, die nur mit dem Plasmid pFL61 transformiert waren, nicht toleriert wurden.

Aus den wegen der Überexpression des pflanzlichen Gens toleranten Einzelkolonien wurden neue Flüssigkulturen angezogen und diese nach Erreichen der frühen stationären Phase schrittweise mit Wasser so verdünnt, daß jeweils gleiche Zellanzahlen in gleichen Volumina enthalten waren. Anschließend wurden diese Verdünnungsreihen auf festes Minimalmedium aufgetropft, welches erneut die vom WT nicht tolerierte Konzentration der Oxidationsmittel enthielt, und das Wachstum der Koloniehäufen wurde in diesem semiquantitativen Test miteinander verglichen.

Aus Kolonien, die eine signifikant erhöhte Toleranz der Hefezellen gegenüber den Chemikalien aufwiesen, wurde durch Standardtechniken das Plasmid isoliert, in *E. coli* (Stamm DH5α) vermehrt und nach Re-Isolation erneut in Hefezellen des Stammes YPH250 eingeführt, um die plasmid- (d.h. cDNA)-abhängige Toleranz der Zellen gegenüber dem oxidativen Streß zu bestätigen (Ausubel et al. 1993). Die cDNAs in den Plasmiden der auf diese Weise positiv getesteten Transformanten wurden sequenziert und Homologievergleiche mit bekannten Genen unternommen.

## 5.8 Biochemisch-analytische Methoden

### 5.8.1 Quantitative Analyse von niedermolekularen Verbindungen

#### 5.8.1.1 Qualitative und quantitative Bestimmung der Chlorophyllvorstufen mittels HPLC

Die Probenaufarbeitung, chromatografische Trennung und Auswertung folgte der Methode von Kruse et al. (1995b). Alle Arbeiten wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Ca. 100 mg der gefrorenen Proben wurden zweimal mit 200 µl des Extraktionsmittels (Methanol : Aceton : 0,1 M NH<sub>4</sub>OH = 9 : 10 : 1) extrahiert und die Überstände nach Zentrifugation (10 000 g, 5 min) vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 200 µl des Überstandes mit 5 µl 1 M Essigsäure und 5 µl Butan-2-on-peroxid oxidiert und die Porphyrine eines Aliquots auf einer Waters-HPLC-Anlage (Millipore, Eschborn; Säule: RP Novapak C 18, 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 4 µm) mit einer Flußrate von 1 ml/min und dem in Tab. 4 angegebenen Gradienten getrennt. Das Eluat wurde fluorimetrisch (Fluoreszenzdetektor RF 551, Shimadzu, Japan;  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 625 \text{ nm}$ ) untersucht und die Trennprodukte und deren Quantität anhand von gereinigten Standards (Uro- und Coproporphyrin III, Protoporphyrin IX) ermittelt. Zur Auswertung und zur Steuerung des Gerätes wurde das Programmpaket Millenium (Millipore, Eschborn, Deutschland), genutzt.

Tab. 4 Laufmittelzusammensetzung und -gradient bei der HPLC-Trennung der Porphyrine

Laufmittel	A	B
Laufzeit	10 % Methanol, 0,1 M NH <sub>4</sub> acetat, pH 5,2	90 % Methanol, 0,1 M NH <sub>4</sub> acetat, pH 5,2
0-15 min	100 %	0 %
15-20 min	100 % → 0 %	0 % → 100 %
20-40 min	0 %	100 %
40-43 min	0 % → 100 %	100 % → 0 %

#### 5.8.1.2 Bestimmung von Chlorophyll- und Gesamtcarotinoidgehalt

Zur quantitativen Bestimmung dieser Pigmente wurde der 100 %ige methanolische Extrakt (enthält 10 µM KOH) genutzt, der auch der Tocopherolmessung (s. 5.8.1.5) diene. Die Konzentration von Chlorophyll a (C<sub>a</sub>), b (C<sub>b</sub>) und a+b (C<sub>a+b</sub>) sowie die der Xanthophylle und Carotinoide (C<sub>x+c</sub>) ergibt sich lt. Lichtenthaler und Wellburn (1983) aus den Gleichungen 15-18, in welche die Absorptionswerte (A) bei 470 nm, 652,4 nm, 665,2 nm und 750 nm eingehen:

$$C_a = 16,72 \times (A_{665,2} - A_{750}) - 9,16 \times (A_{652,4} - A_{750}) \quad \text{Gl. 15}$$

$$C_b = 34,09 \times (A_{652,4} - A_{750}) - 15,28 \times (A_{665,2} - A_{750}) \quad \text{Gl. 16}$$

$$C_{a+b} = 1,44 \times (A_{665,2} - A_{750}) + 24,93 \times (A_{652,4} - A_{750}) \quad \text{Gl. 17}$$

$$C_{x+c} = (1000 \times (A_{470} - A_{750}) - 1,63 \times C_a - 104,96 \times C_b) / 221 \quad \text{Gl. 18}$$

### 5.8.1.3 Bestimmung des Gehaltes an thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS)

Der Gehalt an TBA-RS stellt ein einfach zu bestimmendes Maß für Lipidabbau infolge von Peroxidation und damit einen Parameter für Membranschädigung in biologischen Systemen dar. Einen großen Anteil der entstehenden Abbauprodukte macht dabei Malondialdehyd (MDA) aus. Extraktion und Messung wurden nach De Vos et al. (1989) durchgeführt. 100 mg Probenmaterial wurden in 1 ml Extraktionsmittel (0,25 % 2-Thiobarbitursäure in 10 % Trichloressigsäure) homogenisiert und die Proben für 30 min bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlen und Zentrifugation (15000 g für 15 min) wurde die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes bei 532 nm (korrigiert um die Trübung bei 600 nm) photometrisch bestimmt und die Konzentration der TBA-RS mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{532} = 0,155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  berechnet.

### 5.8.1.4 Messung der Bildung von Ethan als weiteres Maß für Lipidperoxidation

Ethan wurde von Hans-Peter Mock bei einem Arbeitsaufenthalt am Centre d'Etudes de Cadarache (CEA, Cadarache, Frankreich) unter Anleitung von Christian Triantaphylidès nach einer beschriebenen Methode (Degoussée et al. 1995) gaschromatographisch bestimmt. Im Standardexperiment wurde 1 g Blattmaterial in einem 25 ml Kolben unter He-Atmosphäre in einem Microwellenofen für 80 s erhitzt ( $210 \text{ J g}^{-1}$ ), um aus Hydroperoxy-Fettsäuren Alkylradikale und letztendlich der Analyse zugängliche flüchtige Alkane thermisch zu erzeugen. Nach einer Ruhephase von 10 min bei 20°C wurden mit Hilfe einer Spritze Gasproben von 2 x 1 ml aus dem Kolben entnommen und der gaschromatographischen Trennung zugeführt. Die Proben wurden mit 120°C in eine GC-Anlage injiziert (Delsi Di200, Frankreich), und der Ethangehalt wurde bei 80°C Säulentemperatur auf einer Al-Säule (1,5 m x 3,2 mm) mit  $30 \text{ ml min}^{-1}$  He als Trägergas und Detektion über Flammenionisation bei 250°C analysiert. Eichkurven mit 1 ml 10 ppm Ethan ermöglichten die Quantifizierung. Ethan (Retentionszeit (RT) = 0,8 min) konnte mit den obigen Bedingungen sehr gut vom

Nebenprodukt Ethylen (RT = 1,2 min) getrennt werden.

#### 5.8.1.5 *Niedermolekulare Antioxidantien: Ascorbat, Glutathion, Tocopherol*

Für die Bestimmung von Ascorbat wurde die Methode von Law et al. (1983) leicht verändert. Proben von je 100 mg Blattmaterial wurden in 1 ml 5 % Sulfosalicylsäure homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der pH-Wert des Überstandes durch Zugabe von 150 mM Phosphatpuffer (pH 6,4) und 5 M NaOH auf 5,5-6,5 eingestellt. Zu Aliquots von je 200 µl des Extraktes wurden dann nacheinander 100 µl H<sub>2</sub>O, 200 µl 10 % Trichloressigsäure, 200 µl 44 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 200 µl 4 % Bipyridyl (in 70 % Ethanol) und 100 µl 3 % FeCl<sub>3</sub> zugegeben und der Inhalt der Reaktionsgefäße nach jedem Schritt gut gemischt. Nach Inkubation für eine Stunde bei 30°C wurde die Absorption bei 525 nm bestimmt. Um die Gesamtmenge an Ascorbat zu bestimmen, mußte der oxidierte Anteil durch die Zugabe von je 50 µl 10 mM DTT und anschließende Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur reduziert werden. Der Überschuß an DTT wurde danach durch Zumischen von 50 µl 0,5 % N-ethylmaleimid entfernt und der so reduzierte Extrakt wurde dann (mit Ausnahme der Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O) wie o.a. behandelt. Mit reduziertem und oxidiertem Ascorbat wurden Eichgeraden aufgestellt, und die gemessenen Absorptionswerte konnten so in Konzentration umgerechnet werden.

Um Glutathion zu messen, wurde Blattmaterial in 10 %iger Perchlorsäure (+1 mM Bathophenanthrolindisulfonsäure) homogenisiert und durch Zentrifugation ein klarer Überstand gewonnen. GSH und GSSG konnten in diesem nach HPLC-Trennung gemeinsam nach der Methode von Siller-Cepeda et al. (1991) bestimmt werden. Diese Technik beruht auf der Carboxymethylierung mit Jodessigsäure, der eine Derivatisierung der Reaktionsprodukte mit 2,4-Dinitro-1-fluorobenzen folgt. Die Dinitrophenolderivate wurden durch HPLC mit einem Laufmittelfluß von 1 ml/min auf einer 3-Aminopropyl-Spherisorb-Säule (VDS, Berlin) getrennt und die Absorption des Eluats wurde bei 365 nm gemessen. Standardkurven mit GSH und GSSG im Bereich von 0,125 bis 2,5 nmol pro 100 µl injizierten Volumens dienen der Quantifizierung von Glutathion in den Probenextrakten. Als interner Standard wurde  $\gamma$ -Glutamylglutamat eingesetzt.

Tab. 5 Laufmittelzusammensetzung und -gradient bei der HPLC-Trennung von Thiolen (Glutathion)

Laufmittel	A	B
Laufzeit	80 % Methanol	64 % Methanol, 0,5 M Na-acetat, pH 5,2
0-5 min	80 %	20 %
5-10 min	80 % → 1 %	20 % → 99 %
10-20 min	1 %	99 %
20-25 min	1 % → 80 %	99 % → 20 %
25-35 min	80 %	20 %

In den Untersuchungen zum Glutathion-Gehalt von Pflanzen mit bereits vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp (s. 6.1.3.1.4, Mock et al. 1998) wurde auf eine photometrische Methode von Smith et al. (1984) zurückgegriffen. Proben von ca. 100 mg wurden in 5 %iger Sulfosalicylsäure extrahiert und die Extrakte für 12 min bei 18 000 g zentrifugiert. Extraktaliquots wurden zu einem Meßansatz (125 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 6,3 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,6 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) und 0,83 Units GR / Ansatz) gegeben und die Extinktionszunahme bei 412 nm infolge der Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) über mindestens 3 min photometrisch verfolgt (Gl. 19, 20;  $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*GR*



Um nur das oxidiert vorliegende Glutathion (GSSG) bestimmen zu können, wurde GSH durch Inkubation von 1,5 ml des Extraktes mit 120  $\mu\text{l}$  2-Vinylpyridin für 60 min und nachfolgendes dreimaliges Ausschütteln mit je 1 ml Ethylether entfernt und der so vorbereitete Extrakt im Assay eingesetzt. Als Standards wurden reduziertes und oxidiertes Glutathion eingesetzt.

Im Gegensatz zur HPLC-Analytik ist es mit dieser Methode nicht möglich, zwischen Glutathion und anderen  $\gamma$ -Glutamylcysteinyl-Tripeptiden (wie z.B. Homoglutathion oder Hydroxymethylglutathion) zu unterscheiden.

Tocopherol wurde aus 100 %igen methanolischen Extrakten ebenfalls durch HPLC bestimmt (Tanaka et al. 1999). Die Extrakte wurden auf einer  $C_{18}$ -Säule (3,9 x 150 mm, Novapak, Waters,

Eschborn) getrennt und die Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$ ) des Eluats aufgezeichnet. Peaks wurden anhand von authentischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol-Standards (Merck, Darmstadt) identifiziert und quantifiziert.

Tab. 6 Laufmittelzusammensetzung und -gradient bei der HPLC-Trennung der Tocopherole

Laufmittel	A	B
Laufzeit	30 % Methanol 0,01 M $\text{NH}_4$ -acetat, pH 5,2	100 % Methanol
0-10 min	6 % $\rightarrow$ 1 %	94 % $\rightarrow$ 99 %
10-18 min	1 %	99 %

#### 5.8.1.6 Quantifizierung von $\text{H}_2\text{O}_2$

Aliquots von 100 mg Probenmaterial wurden in 1 ml 0,2 N Perchlorsäure homogenisiert (Okuda et al. 1991). Nach Zentrifugation (10 min 15000 g) wurde der Überstand mit 1 M Tris-HCl (pH 7,5) und 4 M KOH auf einen pH-Wert von 7,5-8,0 eingestellt. Bei der Messung wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige Oxidation von N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (Amplex Red, Molecular Probes Europe, Leiden, NL) in Anwesenheit von Meerrettich-Peroxidase in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät (Fluostar, Tecan, SLT Crailsheim) verfolgt (Zhou et al. 1997). Fluoreszenzleerwerte wurden ohne Peroxidase bestimmt, und die Quantifizierung erfolgte anhand von Eichkurven mit bekannten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen.

#### 5.8.1.7 Quantifizierung der phenolischen Verbindungen Salicylat, Chlorogensäure und Scopolin

Die Analytik für phenolische Verbindungen wurde von Hans-Peter Mock in unserer Gruppe etabliert (Mock et al. 1999). Die von Meuwley und Metraux (1993) für die Bestimmung von Salicylsäure ursprünglich beschriebene Methode wurde dabei geringfügig modifiziert. Freie und gebundene Salicylsäure wurden aus je 200 mg pulverisierten Blattmaterials zuerst mit 70 % und anschließend mit 90 % Methanol extrahiert. Die vereinten, von festen Bestandteilen durch Zentrifugation befreiten Überstände wurden bei Raumtemperatur unter Vakuum eingedampft. 20 %ige Ameisensäure wurde zur verbleibenden wässrigen Phase zugesetzt, und der nach Zentrifugation verbliebene Überstand wurde zweimal für 10 min mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Die organische Phase enthielt die freie Salicylsäure. Die methanol-lösliche gebundene Salicylsäure hingegen befand sich noch in der wässrigen Phase, die mit

8 N HCl auf eine Endkonzentration von 4 N HCl eingestellt wurde. Die saure Hydrolyse wurde durch einstündige Inkubation bei 80°C beschleunigt. Die Hydrolyseprodukte wurden danach ebenfalls zweimal mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Direkt vor der HPLC-Analyse wurden beide Präparationen unter Vakuum eingedampft und in 20 % Methanol resuspendiert. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer auf 30°C temperierten C<sub>18</sub>-Säule (LicroSphere, Merck, Darmstadt) mit einer Waters-HPLC-Anlage, die zum Nachweis mit einem Fluoreszenzdetektor (FP-920, JASCO, Groß-Umstadt) ausgerüstet war. Die Anregungswellenlänge ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) war auf 300 nm und die Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\text{em}}$ ) auf 400 nm eingestellt. Eluiert wurde bei einer Flußrate von 1 ml min<sup>-1</sup> mit einem hyperbolischen Gradienten wie er mit Kurve #5 der Millenium-HPLC-Software vorgegeben ist. Salicylsäure erschien unter diesen Bedingungen nach 16,4 min im Elugramm und konnte anhand von authentischen Standards eindeutig identifiziert und quantifiziert werden.

Tab. 7 Laufmittelzusammensetzung und -gradient bei der HPLC-Trennung der phenolischen Verbindungen zur Quantifizierung von Salicylsäure

Laufmittel	A	B
Laufzeit	0,1 % NH <sub>4</sub> -formiat in 2 % Ameisensäure	80 % Methanol und 10 % Acetonitril in Laufmittel A
0-25 min	90 % → 55 % (hyperbolisch)	10 % → 45 %

Aliquots der Überstände von mit 0,25 Vol. H<sub>2</sub>O verdünnten methanolischen Blattextrakten wurden auf dem oben beschriebenen HPLC-System getrennt, welches zum Nachweis von Chlorogensäure und Scopolin mit einem Photodioden-Array (PDA)-Detektor (Typ Waters 996, Eschborn) ausgestattet war. Aus den aufgenommenen Spektren wurde die Absorption bei 280 nm extrahiert. Laufmittel und Gradient sind in Tab. 8 angegeben. Chlorogensäure, welche den prominentesten Peak bei 280 nm unter diesen Bedingungen bei Extraktion aus Tabakblättern oder -wurzeln darstellt, wurde ebenso wie Scopolin als HPLC-Fraktion aufgefangen und anschließend massenspektrometrisch identifiziert (Mock et al. 1999).

Tab. 8 Laufmittelzusammensetzung und -gradient bei der HPLC-Trennung der phenolischen Verbindungen zur Quantifizierung von Chlorogensäure und Scopolin

Laufmittel	A	B
Laufzeit	0,1 % NH <sub>4</sub> -formiat in 2 % Ameisensäure	90 % Methanol in Laufmittel A
0-5 min	100 %	0 %
5-30 min	100 → 60 %	0 → 40 %
30 -50 min	60 → 0	40 → 100 %

## 5.8.2 Nachweis der Aktivität von Enzymen – Enzymassays

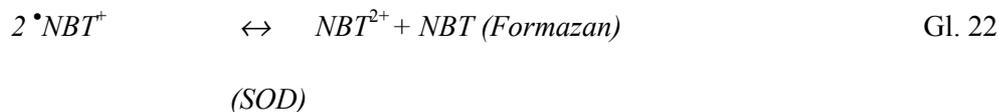
### 5.8.2.1 Bestimmung des Gehaltes an löslichem Protein in Extrakten

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Dabei kam teilweise auch das von BioRad (München) als Proteinassay angebotene gebrauchsfertige Reagenz zum Einsatz. Für die Erstellung von Eichgeraden wurde 0,1 %ige BSA-Lösung verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig).

### 5.8.2.2 Trennung und Visualisierung von Isoformen der Superoxid-Dismutase durch nicht-denaturierende PAGE

Je 100 mg Blattmaterial wurden mehrfach mit insgesamt 300 µl 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8), 5 mM Ascorbat, 7 mM Mercaptoethanol und 0,2 % Triton X-100 extrahiert. Aliquots der durch Zentrifugation geklärten Proteinextrakte wurden nach Einstellen gleicher Proteinmenge (20-40 µg) auf nicht-denaturierende PAA-Gele nach Laemmli (1970) aufgetragen (Gerät: Mini-Protean II, BioRad, München; PAA-Konzentration im Sammelgel: 5 %, im Trenngel: 13 %, 10 % Glycerol in Sammel- und Trenngel) und einer elektrophoretischen Trennung bei 125 V und 4°C für 7,5 h unterworfen. Die Gele wurden danach im Dunkeln in einer Färbelösung aus 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 0,2 % TEMED, 2,6 µM Riboflavin und 1,2 mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid für 30 min unter leichter Bewegung inkubiert (Beauchamp und Fridovich 1971). Nach Abwaschen überschüssiger Färbelösung mit H<sub>2</sub>O wurden die Gele dem Licht ausgesetzt, was an allen Stellen, an denen keine SOD im Gel präsent ist, zur Bildung des unlöslichen blauschwarzen Formazan (*NBT*, Gl. 21-23) führte. Nachdem der Kontrast zwischen achromatischen Banden und dunklem Hintergrund optimal war, wurden von den Gelen digitale Videoaufnahmen gemacht und diese mit Hilfe der Bio1D-Software (Vilber-Lourmant, Marne la Vallée, Frankreich) ausgewertet. Zur Quantifizierung

wurden auf die Gele in einer Spur definierte Mengen von SOD aus Rindererythrozyten aufgetragen. Die Zuordnung der Aktivitätsbanden zu den aus Tabak bekannten SOD-Isoformen erfolgte nach Van Camp et al. 1994.



### 5.8.2.3 Bestimmung der Gesamtaktivitäten von APX, MDAR, DHAR und GR

In Vorexperimenten hatte sich gezeigt, daß APX und GR bzw. MDAR und DHAR jeweils aus den gleichen Enzymextrakten bestimmt werden konnten. Alle Extrakte wurden auf Eis bzw. bei 4°C gehandhabt. Ca. 100 mg Blattmaterial wurde in den folgenden eiskalten Puffern homogenisiert:

- APX (EC 1.11.1.11) und GR (EC 1.6.4.2) in 50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,8) mit 5 mM Ascorbat, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 100 mM NaCl und 2 % PVP (Aono et al. 1995);
- MDAR (EC 1.6.5.4) und DHAR (EC 1.8.5.1) in 50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,8) mit 0,2 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol und 2,5 % PVP (Moran et al. 1994).

Die Extrakte wurden für 15 min bei 15000 g zentrifugiert und die Überstände für die nachfolgend beschriebenen Enzymassays genutzt.

Zur Bestimmung der APX-Aktivität wurden Aliquots der Extrakte zum neunfachen Volumen an Reaktionspuffer (50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,1 mM EDTA) gegeben, so daß die Ascorbatkonzentration im Assay 0,5 mM betrug. Die Reaktion (Gl. 24) wurde durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Endkonzentration von 44 µM gestartet (Nakano und Asada 1981) und der Verbrauch von Ascorbat bei 290 nm für ca. 20 s verfolgt. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> berechnet und um die Rate vor der Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berichtigt.

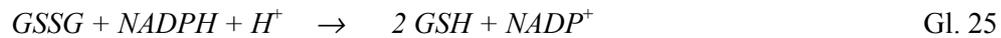
(APX)



Für die Quantifizierung der GR-Aktivität wurde der von Aono et al. (1991) vorgeschlagene 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) mit 0,2 mM NADPH verwendet. Die Enzymreaktion (Gl. 25) wurde durch die Zugabe von 0,2 mM GSSG gestartet und die lineare Abnahme der Absorption

bei 340 nm wurde für 10 min aufgezeichnet. Die mit dem Extinktionskoeffizient von  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  berechnete Enzymaktivität wurde um den GSSG-unabhängigen Verbrauch von NADPH korrigiert.

(GR)



Die Quantifizierung der Aktivität der MDAR erfolgte in einem aus 50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 0,1 mM NADPH und 2,5 mM Ascorbat zusammengesetztem Meßpuffer (Foyer et al. 1989). Die Reaktion (Gl. 26) wurde durch Zugabe von 1 U Ascorbat-Oxidase (AO) gestartet, und die durch Verbrauch von NADPH verursachte Absorptionsänderung bei 340 nm wurde verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde für die Aktivitätsberechnung unter Einbeziehen der AO-unabhängigen Rate verwendet.

(MDAR)



Die Aktivität der DHAR wurde im von Hossain und Asada (1984) beschriebenen Assaypuffer (50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 2,5 mM GSH, 0,2 mM DHA) bestimmt. Der Anstieg der Absorption bei 265 nm aufgrund der Bildung von reduziertem Ascorbat (Gl. 27) wurde aufgezeichnet, und die Aktivität wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von  $14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  unter Abzug der extrakt-unabhängigen Rate berechnet.

(DHAR)



## 5.9 Weitere Methoden

### 5.9.1 Bestimmung der Photosynthese- und Atmungsraten durch Gaswechselfmessungen

Sowohl an Pflanzen, die durch entsprechende Wahl der Anzuchtbedingungen ihren charakteristischen Phänotyp bereits vollständig ausgeprägt hatten, als auch an Pflanzen während des Lichtshift-Experiments wurden mittels eines tragbaren Gaswechselfmeßgerätes (LI-6400, Licor, Lincoln, NE, USA) Photosynthese bzw. Dunkelatmung bestimmt. Dabei wurden bei ausgewählten Messungen entweder die Lichtbedingungen verändert („Lichtkurven“, d.h. die Photoassimilation in Abhängigkeit der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) bestimmt)

---

oder aber bei konstanter Lichtmenge die Konzentration von verfügbarem CO<sub>2</sub> modifiziert („A-c;-Kurven“). Meßwerte wurden jeweils nach dem Erreichen von konstanten Daten für Assimilation und Transpiration aufgenommen, was normalerweise nach ca. 10-20 min der Fall war.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Untersuchungen an Pflanzen mit bereits ausgeprägtem, photodynamisch verursachtem Phänotyp

#### 6.1.1 Der Phänotyp der Pflanzen

Tabakpflanzen, die Antisense-Konstrukte für UROD (Mock et al. 1995, Mock und Grimm 1997) bzw. CPO (Kruse et al. 1995a, Kruse et al. 1995b) exprimieren, zeichnen sich unter Gewächshausbedingungen (16 h ca.  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ca.  $25^\circ\text{C}$ ) durch einen nekrotischen Phänotyp aus (Abb. 6, Abb. 7). Bereits frisch pikierete Pflanzen weisen Blattgewebe auf, das schnell austrocknet und nachfolgend in Form von gelbbraunen Läsionen bestehen bleibt. Nur die jeweils jüngsten Blätter sind WT-artig. Dabei unterscheiden sich die UROD- von den CPO-AS-Pflanzen durch die Form der Nekrosen: Während diese an den UROD-AS-Pflanzen eher großflächige Bereiche toten Gewebes innerhalb der Intercostalfelder ausmachen (Abb. 6B), zeigen CPO-AS-Pflanzen hingegen netzartig auftretende Nekrosen, die sich entlang der Leitgefäße entwickeln (Abb. 7). Wegen des unterschiedlichen Wassergehaltes in totem, gerade austrocknendem und grünem Gewebe kommt es zu Spannungen innerhalb des Blattes, die zu Verformungen der Blattoberfläche führen.

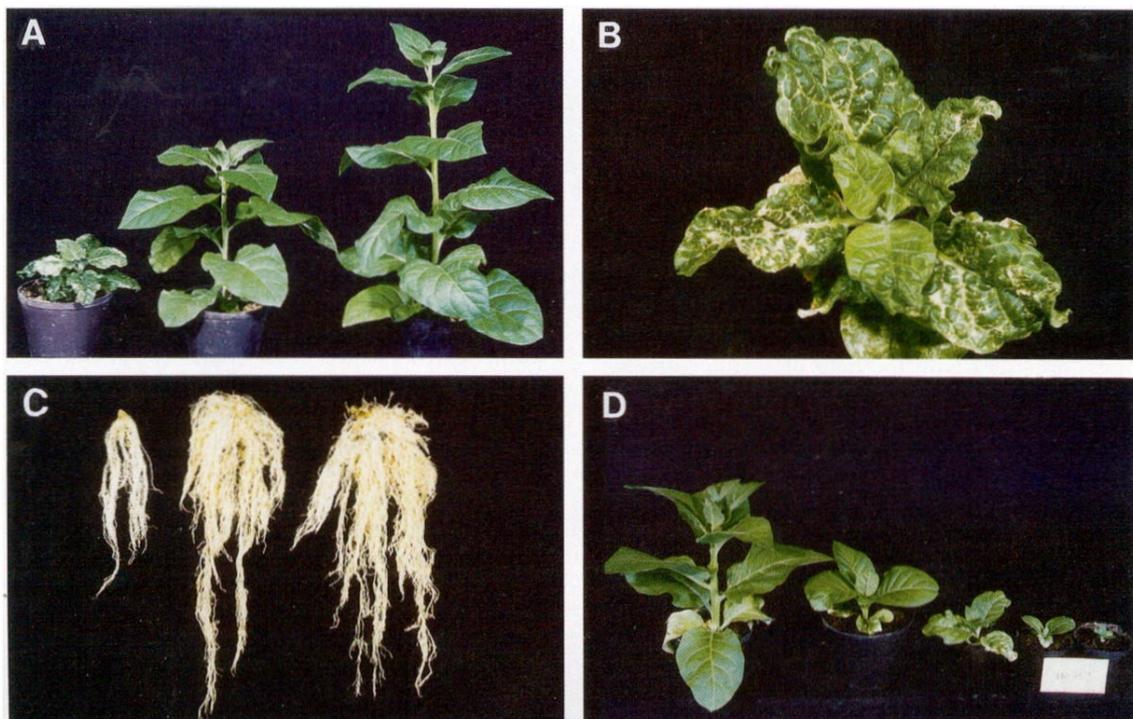


Abb. 6 Phänotyp transgener Pflanzen, die Antisense-RNA für UROD exprimieren. **A** Acht Wochen alte Primärtransformanten der Linie 35/2 (links) und 35/12 (Mitte) im Vergleich mit WT (rechts). **B** Aufsicht auf die Primärtransformante 35/2. **C** Wurzeln der in **A** gezeigten Pflanzen. **D**

Nachkommen der F<sub>1</sub>-Generation der Primärtransformante 35/2 nach acht Wochen Wachstum auf Erde. (Abb. entnommen aus Mock und Grimm 1997)

Im Vergleich der transgenen Linien fallen deutliche Unterschiede beim Grad der Schädigung auf. Unter den Primärtransformanten fanden sich sowohl Pflanzen, die nicht vom WT zu unterscheiden waren als auch Individuen, die aufgrund der extremen Schäden die Reife nicht erreichten und daher keinen Samen produzierten. Mit dem Grad der Ausprägung von Läsionen an den Blättern geht auch ein genereller Entwicklungsrückstand im Vergleich zum WT oder phänotypisch gering betroffenen Pflanzen einher, was auch für das Wurzelsystem gilt (Abb. 6C). Der nekrotische Phänotyp wird auf die folgenden Generationen vererbt, wobei unter den kanamycin-resistenten Nachkommen eine Aufspaltung in Individuen mit schwächerer oder stärkerer Ausprägung des Phänotyps zu beobachten ist (Abb. 6D). Für die hier vorgestellten Analysen dienten F<sub>2</sub>-Nachkommen vor allem der UROD-AS-Linie 35/2 bzw. der CPO-AS-Linie 1/3 und 1/41 als Untersuchungsobjekt. Diese heterozygoten Linien zeichnen sich durch eine hohe Konstanz des Phänotyps aus, der im Vergleich mit den beobachteten Extrema als intermediär zu bezeichnen ist.



Abb. 7 Phänotyp von transgenen Tabakpflanzen, die Antisense-RNA für CPO exprimieren. **Links:** Aufsicht auf einen Nachkommen der F<sub>2</sub>-Generation der Linie 1/41. **Rechts:** Detailansicht eines Blattes eines anderen Nachkommens der gleichen Linie. Die Pflanzen wurden für 8 Wochen auf Erde unter kontrollierten Umweltbedingungen kultiviert, welche die Ausbildung von Nekrosen fördern (25°C, 16 h: 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 6.1.2 Molekulare Ursachen für den nekrotischen Phänotyp

Sowohl für CPO-AS- als auch für UROD-AS-Pflanzen konnte gezeigt werden, daß die Expression der Antisense-RNA zur starken Reduktion an translatierbarer RNA in Sense-Orientierung und daraus resultierend zur verringerten Akkumulation des jeweiligen Zielenzym führte. Damit einher ging eine deutliche Erniedrigung der meßbaren Enzymaktivität. In den jüngsten sechs Blättern der CPO-AS-Linie 1/3 konnten noch 29 % (bezogen auf Proteingehalt) bzw. 40 % Restaktivität (bezogen auf Chlorophyllgehalt) im Vergleich zum WT ermittelt werden (Kruse et al. 1995b). In der UROD-AS-Linie 35/2 waren in diesem Entwicklungszustand der Blätter noch ca. 60 % der WT-Aktivität nachweisbar (Mock und Grimm 1997).

Die Verringerung der Aktivität dieser Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese hat keine weitreichenden Konsequenzen für den Gehalt an Endprodukten des Stoffwechselweges wie Chlorophyll und Häm. In der CPO-AS-Linie 1/3 betrug die maximale Reduktion in der Chlorophyllkonzentration ca. 20 % im Vergleich zum WT, und der Hämgehalt war in diesen Pflanzen eher erhöht als erniedrigt (Kruse et al. 1995b). Auch in den UROD-AS-Pflanzen kommt es weder zu einer schwerwiegenden Abnahme im Chlorophyll- noch im Hämgehalt (jeweils max. 10-15 %, Mock und Grimm 1997). Das Verhältnis von Chlorophyll a zu b ist in allen Fällen unverändert.

Die Ursache für den nekrotischen Phänotyp wird vielmehr in der sowohl Blätter als auch Wurzeln betreffenden massiven Akkumulation und Autoxidation des jeweiligen Substrates der Enzyme gesehen. So kommt es in der CPO-AS-Linie 1/3 zur vielhundertfachen Akkumulation von Coproporphyrin(ogen) I und III, zwei Intermediaten der Tetrapyrrolsynthese, die im WT nur in Spuren nachzuweisen sind (Kruse et al. 1995b). In den UROD-AS-Pflanzen beobachtet man folgerichtig die massive Anhäufung von Uroporphyrin(ogen) III, wobei auch hier die stärkste Akkumulation (ca. 300x) in den jüngsten Blättern eintritt. Da aus technischen Gründen die Extrakte oxidiert werden müssen, damit ein fluorimetrischer Nachweis möglich ist (s. 5.8.1.1), kann auf diese Weise nicht zwischen den reduzierten (Porphyrinogene) und den oxidierten Formen (Porphyrine) unterschieden werden.

Porphyrine wirken photosensibilisierend (Salin 1987; s. 3.1.1.1) und führen bei ihrer Akkumulation in vielen experimentellen Systemen zur massenhaften Generierung von ROS, zur Zellschädigung und letztendlich zum Zelltod, der in Form von Nekrosen sichtbar wird (s. 3.4.3). Nachdem in ersten Untersuchungen sowohl in den UROD- als auch in den CPO-AS-Pflanzen deutliche Hinweise auf oxidativen Streß und eine Aktivierung der antioxidativen Schutzsysteme erhalten worden waren (Keetman 1995, Kruse et al. 1995b), sollten diese Befunde mit der vorliegenden Arbeit bestätigt und die Analysen vertieft werden. Wesentliche Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits veröffentlicht (Mock et al. 1998, Mock et al. 2000) und sollen an

dieser Stelle noch einmal zusammenfassend dargestellt werden.

### 6.1.3 Oxidativer Streß und antioxidatives Schutzsystem in UROD- und CPO-AS-Pflanzen

#### 6.1.3.1 Aktivierung des antioxidativen Schutzsystems infolge von photooxidativem Streß

##### 6.1.3.1.1 Aktivitätsanstieg der SOD

Die SOD katalysiert die Dismutation von Superoxid, welches vor allem unter Streß vermehrt gebildet wird (s. S.11, Abb. 1). Dabei entsteht neben  $O_2$  das ebenfalls gefährliche  $H_2O_2$ . Nachdem schon durch Kruse et al. (1995b) gezeigt werden konnte, daß in CPO-AS-Pflanzen die Gesamtaktivität der SOD im Vergleich zum WT 80 % höher war, lag es nahe, die Aktivität der einzelnen Isoformen durch nicht-denaturierende PAGE und anschließende Färbung der Gele genauer zu analysieren. SOD-Banden bleiben hell, und die Gele können anschließend densitometrisch ausgewertet werden (s. 5.8.2.2).

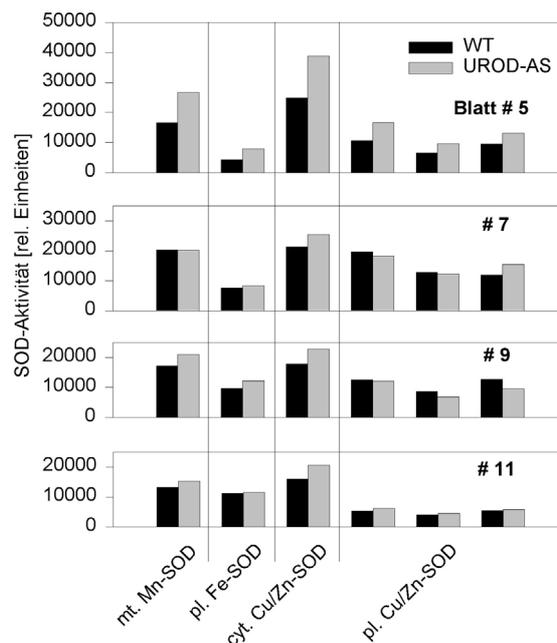


Abb. 8 Aktivitätsanalyse der SOD-Isoformen in Blättern von WT und UROD-AS-Pflanzen der Linie 35/2. Proteinextrakte wurden durch nicht-denaturierende PAGE aufgetrennt und SOD-Aktivität anschließend durch Anfärben der Gele nachgewiesen (s. 5.8.2.2). Die Quantifizierung der Banden mit SOD-Isoformaktivität mit Hilfe eines automatischen Bildauswertesystems wurde für n=9 Gele mit Extrakten aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (SD < 10%). Die ermittelte SOD-Aktivität ist in rel. Einheiten angegeben. mt. = mitochondriale; pl. = plastidäre, cyt. = cytosolische Isoform (modifiziert nach Mock et al. 1998).

Obwohl auch in den UROD-AS-Pflanzen ein über alle Isoformen berechneter Aktivitätsanstieg von 57 % zu verzeichnen war, wurde ebenfalls festgestellt, daß nicht alle untersuchten Isoformen gleichmäßig in ihrer Aktivität im Vergleich zum WT differierten (Abb. 8). Der größte Aktivitätsunterschied wurde in den jüngsten Blättern (Blatt 5) gemessen. Hier wies die mitochondriale Mn-SOD eine im Vergleich zum WT um 60 % höhere Aktivität auf, während die der plastidären Fe-SOD fast verdoppelt war. Auch die im Gel trenn- und meßbare Aktivität der cytosolischen Cu/Zn-SOD lag im Blatt 5 um 60 % höher als im WT. Die drei nachweisbaren Aktivitätsbanden der plastidären Cu/Zn-SOD ergaben zusammen eine um 50 % höhere Aktivität als die der korrespondierenden Banden der WT-Proben. Diese sehr deutlichen Unterschiede in der SOD-Aktivität wurden mit zunehmendem Blattalter schwächer und gingen für die beiden plastidären SOD-Isoformen im Lauf der Entwicklung praktisch vollständig verloren. Dies deutet auf eine breite Aktivierung von zellkompartiment-übergreifenden Schutzsystemen bereits in jungen Blattentwicklungsstadien hin, bei denen Blattläsionen entweder sehr schwach oder gar nicht zu beobachten sind. Mit fortschreitender Blatt- und damit Nekrosenentwicklung (Blatt 7, 9, 11) blieb eine Aktivierung der mitochondrialen und cytosolischen SOD-Isoformen bestehen, obwohl der Stoffwechselweg bis zum relevanten Schritt und daher auch die akkumulierenden, photosensibilisierenden Porphyrin(ogen)e (letztere zumindest anfänglich) plastidär lokalisiert sein sollten (Mock et al. 1998). Ähnliche (hier nicht gezeigte) Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der Aktivität der SOD-Isoformen in CPO-AS-Pflanzen erzielt.

#### 6.1.3.1.2 Aktivierung der meisten Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus

Die enzymatische Kette des Ascorbat-Glutathion-Zyklus übernimmt in Pflanzen in jenen Kompartimenten, in denen  $H_2O_2$  durch Catalase nicht wirksam entgiftet werden kann, den überwiegenden Teil dieser essentiellen Aufgabe (s. 3.1.2.2).

Im ersten Schritt wird durch die Ascorbat-Peroxidase (APX)  $H_2O_2$  unter Verbrauch von Ascorbat zu Wasser umgesetzt (s. S.11, Abb. 1). Auch aufgrund der erhöhten SOD-Aktivität war im untersuchten Blattgewebe von UROD- und CPO-AS-Pflanzen mit einer höheren Rate von  $H_2O_2$ -Bildung zu rechnen. Tatsächlich lag die gemessene Aktivität der löslichen APX-Isoformen in allen untersuchten Blättern der porphyrischen Pflanzen höher als in denen des WT (Abb. 9). Im Gegensatz zur SOD beobachtete man hier allerdings besonders in den Blättern 7 und 9 einen zwei- bis dreifachen Aktivitätsanstieg, d.h. also in den stärker nekrotischen Blättern, in denen sich die SOD-Aktivität vor allem in den Plastiden schon wieder dem WT-Niveau annäherte (s. Abb. 8).

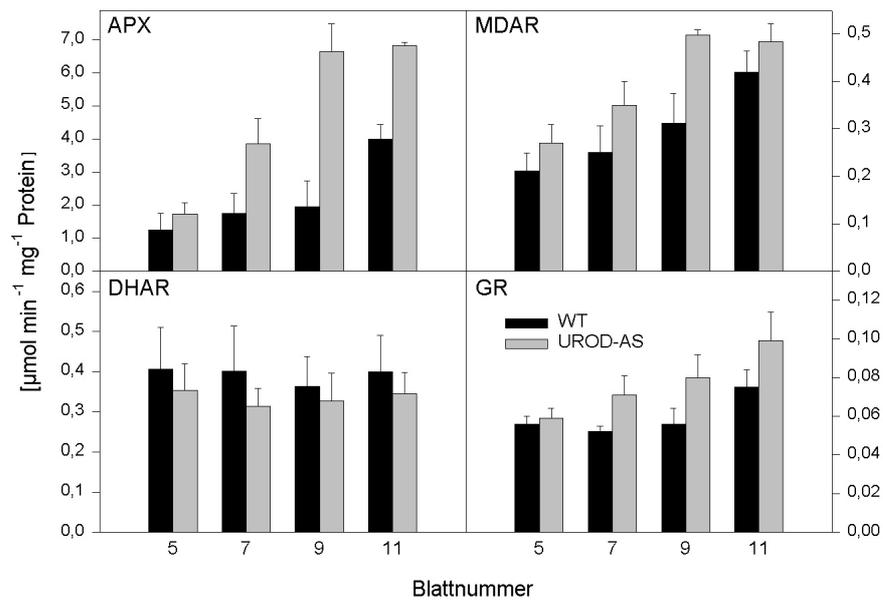


Abb. 9 Vergleich der Aktivität von löslichen Isoformen der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus APX, MDAR, DHAR und GR zwischen WT und UROD-AS-Pflanzen der Linie 35/2. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und Standardabweichungen berechnet.

Der Anstieg der APX-Aktivität und der damit verbundene höhere Verbrauch an reduziertem Ascorbat wurde durch eine Aktivierung des ascorbat-regenerierenden Enzyms Monodehydroascorbat-Reduktase (MDAR) begleitet (Abb. 9). In der durch die MDAR katalysierten Reaktion wird aus dem Monodehydroascorbat-Radikal unter Verbrauch von NAD(P)H wieder Ascorbat gebildet, das dann für einen neuen Kreislauf zur Verfügung steht (s. S.11, Abb. 1). Mit 160 % im Vergleich zum WT wurde auch hier der größte Anstieg in der Aktivität im Blatt 9 beobachtet, während in den anderen untersuchten Blättern mit ca. 30% eine geringere Aktivitätszunahme zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit dem ebenfalls im Blatt 9 gemessenen Maximum an APX-Aktivität.

Wird das Monodehydroascorbat-Radikal (MDA) nicht hinreichend schnell durch die MDAR recycelt, entsteht in einer spontanen Disproportionierung Didehydroascorbat (DHA) und Ascorbat (ASA). Aus DHA kann unter Verbrauch von GSH in der Didehydroascorbat-Reduktase (DHAR)-Reaktion ebenfalls ASA regeneriert werden (s. S. 11, Abb. 1). Man könnte schlußfolgern, daß die Aktivität dieses Enzyms den Fluß durch den Reaktionskreislauf nicht limitiert, da in allen untersuchten Blättern der porphyrischen Pflanzen eine um ca. 15% geringere Aktivität im Vergleich zum WT festgestellt wurde (Abb. 9). Eine andere

Interpretation dieser Beobachtung wird in einer Arbeit von Knörzer et al. (1996) geliefert. Sie untersuchten das antioxidative Schutzsystem einer Sojabohnen (*G. max*)-Zellkultur während der Behandlung mit dem PPO-Inhibitor Oxyfluorfen und der daraus entstehenden Photosensibilisierung und stellten ebenfalls eine Abnahme der Aktivität fest. Diese Autoren gehen entweder von einer peroxidativen Schädigung und Inaktivierung des Enzyms oder aber von der unterdrückten Expression durch einen bisher nicht aufgeklärten Regelmechanismus aus.

Der letzte Schritt in der Ascorbat-regenerierenden Reaktionskette wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) katalysiert (s. S.11, Abb. 1). Auch hier konnte ein Aktivitätsanstieg vor allem in den älteren Blättern der tetrapyrrol-akkumulierenden Pflanzen festgestellt werden (Abb. 9). Alle den Ascorbat-Glutathion-Zyklus betreffenden Daten, die hier für UROD-AS-Pflanzen dargestellt wurden, gelten grundsätzlich auch für die untersuchten CPO-AS-Linien.

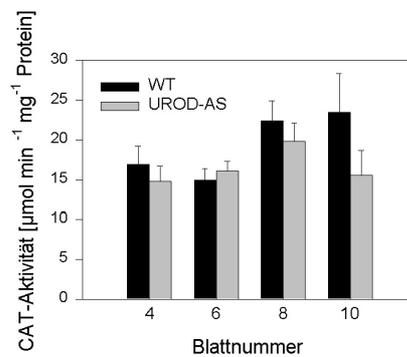


Abb. 10 Aktivität der Catalase in Blättern von WT- und UROD-AS-Pflanzen der Linie 35/2. Die Ergebnisse für Enzymextrakte aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und Standardabweichungen berechnet. (modifiziert nach Mock et al. 1998)

Im Gegensatz zum bisher, mit Ausnahme der DHAR, beschriebenen Anstieg der Aktivität von antioxidativen Schutzenzymen wurde für die Catalase (CAT) ein Aktivitätsverlust im Vergleich zum WT festgestellt. Während die Aktivität in den älteren WT-Blättern anstieg, blieb sie in den UROD-AS- bzw. CPO-AS-Pflanzen (Daten nicht gezeigt) mit fortschreitender Entwicklung und auf Proteingehalt bezogen relativ konstant (Abb. 10).

#### 6.1.3.1.3 Anstieg der Transkript- und Proteinakkumulation antioxidativer Schutzenzyme

Das antioxidative Schutzsystem der Pflanzen wird durch tetrapyrrol-induzierten oxidativen Streß nicht nur auf Aktivitäts- sondern auch auf den anderen Expressionsebenen beeinflusst. So kommt es zur Akkumulation von Transkripten fast aller untersuchter Isoformen der SOD und CAT sowohl in CPO- als auch in UROD-AS-Pflanzen (Abb. 11). Während im WT die mRNA

für SOD-Isoenzyme vor allem in den jüngeren Blättern akkumulierte und in den älteren Blättern (ab Blatt 7) kaum noch nachzuweisen war, fand man in den porphyrischen Pflanzen mit Ausnahme der plastidären Cu/Zn-SOD auch in den älteren Blättern erhebliche Mengen von Transkript, die aber ebenfalls im Lauf der Blattentwicklung abnahmen. Die mRNA-Mengen der Mn- und Fe-SOD waren auch in den jüngeren Blättern von CPO- und UROD-AS-Pflanzen größer als in den korrespondierenden WT-Organen. Die im Vergleich zum WT besonders verstärkte Transkriptakkumulation für die mitochondriale Mn- bzw. die cytosolische Cu/Zn-SOD stimmt sehr gut mit den gemessenen Aktivitätsunterschieden gerade dieser Isoformen überein, die auch in älteren Blättern der porphyrischen Pflanzen Bestand haben (s. 6.1.3.1.1).

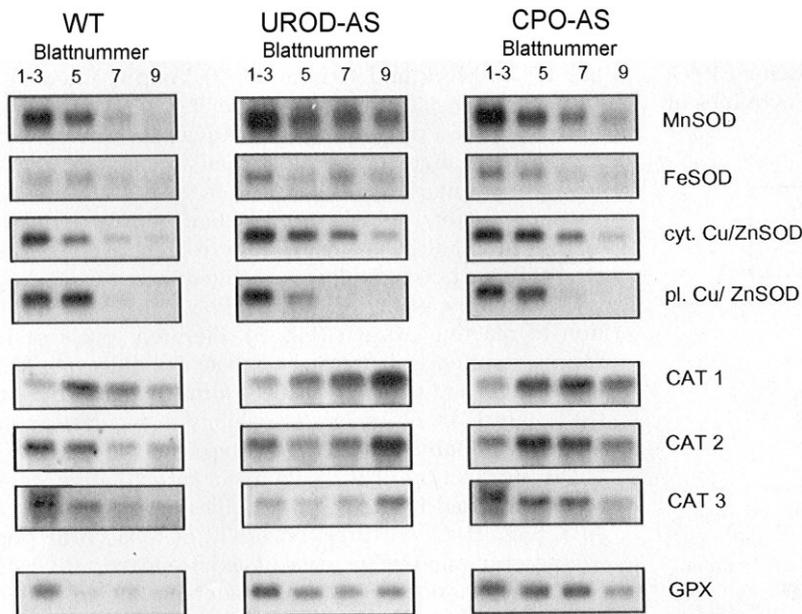


Abb. 11 Northern Blot-Analyse der RNA-Gehalte ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme in unterschiedlich alten Blättern des **WT**, von **UROD-AS** 35/2 und **CPO-AS** 1/3. Gleiche Mengen von RNA (10 µg) wurden in formaldehydhaltigen Agarosegelen separiert und anschließend auf Nylonmembranen überführt. Diese wurden mit spezifischen Sonden für mitochondriale Mn-SOD (MnSOD), plastidäre Fe-SOD (FeSOD), cytosolische (cyt.) und plastidäre (pl.) Cu/Zn-SOD sowie für drei Isoformen der Catalase (CAT1-3) und Glutathion-Peroxidase (GPX) hybridisiert. Ein repräsentatives Autoradiographie-Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die Sonden wurden freundlicherweise von H. Willekens (Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Abb. ist der Veröffentlichung von Mock et al. (1998) entnommen.

Anders ist die Situation für die Catalase: Auch hier beobachtete man eine Akkumulation von CAT1- bzw. CAT2-Transkript vor allem in den älteren untersuchten Blättern (Abb. 11), während die extrahierbare Aktivität des Enzyms in diesen Blättern niedriger war als im WT (Abb. 10). Die Kombination beider Indizien spricht für einen beschleunigten Umsatz an Catalaseprotein, wobei der erhöhte Bedarf trotz der beobachteten Transkriptakkumulation offensichtlich nicht gedeckt werden kann.

Sowohl die Ergebnisse für SOD als auch für CAT decken sich sehr gut mit veröffentlichten Daten zur Induktion der verschiedenen Isoformen dieser Gene bei unterschiedlichen Streßeinflüssen (z.B. Willekens et al. 1994).

Der drastische Anstieg der mRNA-Akkumulation für die Glutathion-Peroxidase (GPX, Abb. 11), die höchstwahrscheinlich eine Substratspezifität für Phospholipidhydroperoxide besitzt (Willekens et al. 1994), weist auf einen akuten Bedarf zur Entgiftung solcher reaktiven Substanzen und damit auf tetrapyrrol-induzierte Membranschädigung hin (s. S. 9, 3.1.2.2). Im Gegensatz zum WT blieb das Transkript-Niveau in den porphyrischen Pflanzen über den gesamten betrachteten Blattentwicklungszeitraum hinweg sehr hoch.

Die deutlich erhöhte Aktivität der löslichen APX-Isoformen (s. 6.1.3.1.2, Abb. 9) wurde nicht durch eine erhöhte Akkumulation der entsprechenden mRNA begleitet (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigen Western Blots für die cytosolische APX, daß der hohen Aktivität in den porphyrischen Pflanzen auch eine vergrößerte Menge an APX-Protein zugrunde liegt (Abb. 12).

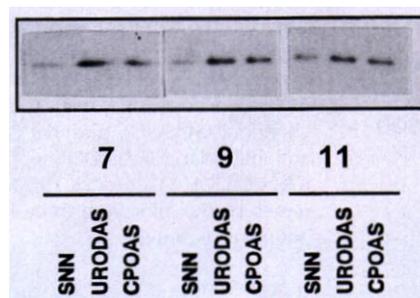


Abb. 12 Western Blot-Analyse von Blattextrakten des WT (SNN) und von porphyrischen Pflanzen der Linien UROD-AS 35/2 (URODAS) sowie CPO-AS 1/3 (CPOAS). Gleiche Mengen an Protein (10 µg) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Der zum Anfärben der APX verwendete monoklonale Antikörper, der gegen cytosolische APX aus Spinat erzeugt wurde, war freundlicherweise durch H. Saji (Onagawa, Japan) zur Verfügung gestellt worden. (Abb. entnommen aus Mock et al. 1998)

#### 6.1.3.1.4 Verringerte Reduktionskapazität der niedermolekularen Antioxidantien

Bereits durch Kruse et al. (1995b) konnte gezeigt werden, daß sich oxidativer Streß in CPO-AS-Pflanzen u.a. durch stark erniedrigte Gehalte an  $\alpha$ -Tocopherol widerspiegelt; ein Befund der in Richtung eines deutlich erhöhten und unbefriedigten Bedarfs an Membran-Schutzpotential interpretiert wurde (s. 3.1.2.1). Besonders in jüngeren Blättern der porphyrischen Pflanzen trat ein dramatisches Defizit an verfügbarem Tocopherol zu Tage (nur 25% der WT-Menge in Blatt 4), welches im Lauf der weiteren Blattentwicklung eine der Ursachen für die aufkommenden Läsionen zu sein scheint (Kruse et al. 1995b). Auch für die UROD-AS-Pflanzen konnte ein Mangel an Tocopherol bestätigt werden, der hier allerdings erst in älteren Blättern auftritt, wo z.B. im Blatt 11 weniger als 10% des aus dem vergleichbaren WT-Blatt

extrahierbaren Tocopherols gemessen werden konnten (Abb. 13).

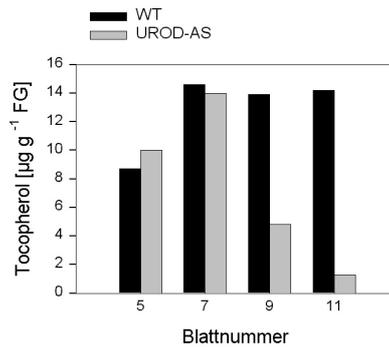


Abb. 13 Vergleich des Tocopherolgehalts zwischen WT und UROD-AS Linie 35/2. Tocopherol wurde mittels HPLC quantifiziert (s. 5.8.1.5), und Mittelwerte aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente wurden berechnet (SD < 10%) (H.-P. Mock, unveröffentlichte Daten).

Trotz der moderat erhöhten Kapazität des ASA-regenerierenden Zyklus (s. 6.1.3.1.2) ist vermutlich der vielfach vergrößerte Bedarf an ASA (u.a. für die verstärkte APX-Reaktion) Ursache für den im Vergleich zum WT verringerten Gesamtgehalt an reduziertem und oxidiertem Ascorbat und das absinkende Redoxverhältnis von reduziertem zu Gesamt-Ascorbat (Abb. 14). So standen im Blatt 5 nur 60% und im Blatt 11 der UROD-AS-Pflanzen nur ca. 50% des in WT-Pflanzen verfügbaren ASA bereit. Diese Daten weisen vor dem Hintergrund von erhöhten Enzymaktivitäten des Ascorbat-Glutathion-Systems deutlich auf einen vergrößerten Umsatz an Antioxidantien und damit auf oxidativen Streß hin.

Die photometrisch (s. 5.8.1.5) ermittelten Verluste an Gesamt-Glutathion in den UROD-AS-Pflanzen im Vergleich zum WT waren weniger stark ausgeprägt als die für Ascorbat (Abb. 14). Auch gab es keine Unterschiede im Redoxverhältnis, welches über den untersuchten Entwicklungszeitraum hinweg auf höchstem Niveau bemerkenswert konstant blieb. Der aus einer leicht erhöhten GR-Aktivität (s. 6.1.3.1.2) resultierende gesteigerte Bedarf an GSH zeigte hier offenbar nur geringe Auswirkungen.

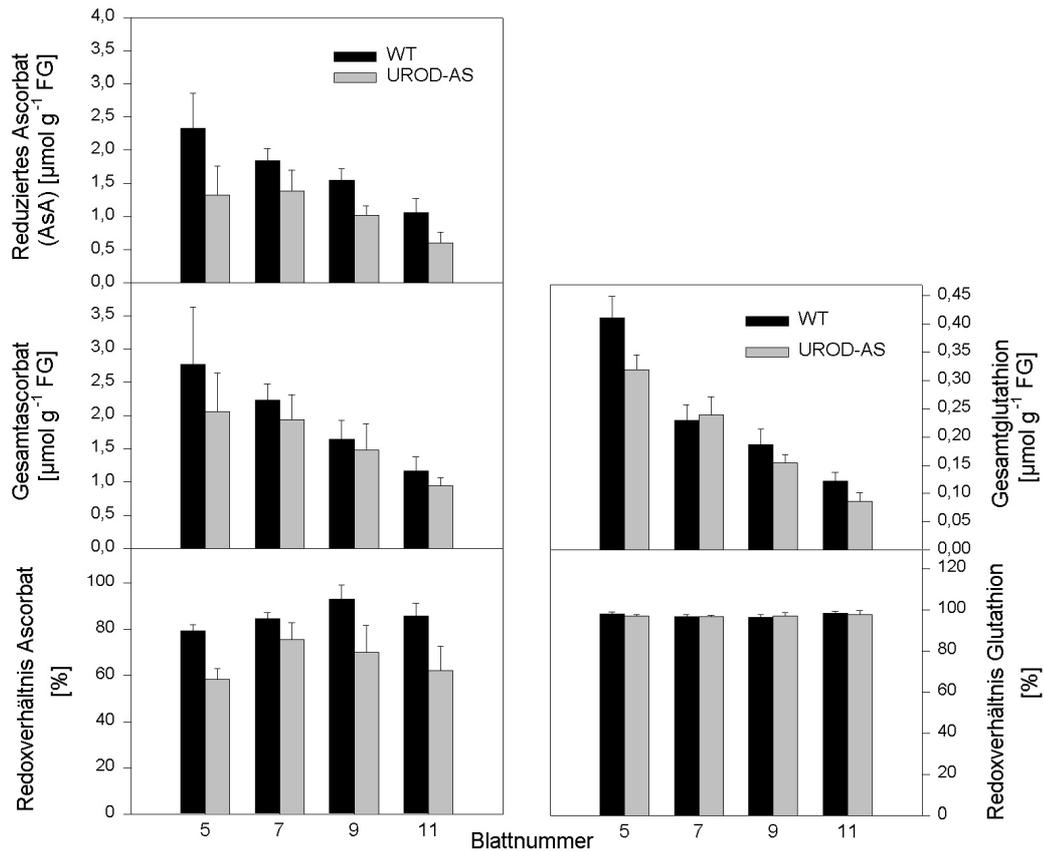


Abb. 14 **Links:** Reduziertes (oben) und Gesamtascorbat (Mitte) sowie daraus berechnetes Redoxverhältnis (unten) im Vergleich zwischen Blättern von WT und UROD-AS 35/2. **Rechts:** Gesamt-Glutathion-Gehalt (oben) und Redoxverhältnis (unten) der gleichen Blattproben, aus denen auch Ascorbat bestimmt wurde. Weil praktisch 100% des Glutathions in der reduzierten Form vorliegen, wurde auf eine entsprechende Teilgrafik verzichtet. Glutathion wurde in diesen Experimenten in einem photometrischen Test (und nicht mittels HPLC; s. 5.8.1.5, Smith et al. 1984) gemessen, und Mittelwert sowie Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen wurden berechnet.

#### 6.1.3.1.5 Verstärkte Lipidperoxidation als Anzeichen für Membranschädigung

Die Menge an thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS) gilt als Indikator für das Ausmaß an Membranschädigung infolge von Lipidperoxidation (s. 5.8.1.3). In der Tat wiesen die Blätter 7 und 9 der UROD-AS-Pflanzen 50% mehr an TBA-RS auf als vergleichbare WT-Blätter (Abb. 15). Auch in den anderen untersuchten Blättern wurden erhöhte TBA-RS-Gehalte ermittelt. Diese Befunde treffen gleichfalls auf die CPO-AS-Pflanzen zu (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis dieser Analyse wird indirekt durch die Induktion der GPX-Expression unterstützt (s. 6.1.3.1.3), was ebenfalls auf massiven oxidativen Streß innerhalb oder im Umfeld von Membranen hindeutet.

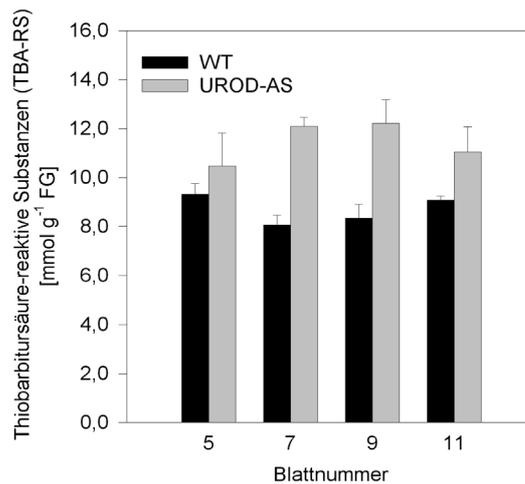


Abb. 15 Vergleich der Gehalte an thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) als Indikator für Lipidperoxidation in WT und UROD-AS Linie 35/2. Mittelwerte und Standardabweichungen für drei unabhängige Experimente sind gezeigt.

#### 6.1.4 Physiologische Auswirkungen von tetrapyrrol-induziertem oxidativen Streß auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation

Werden Reduktionsäquivalente in verstärktem Maß für die Regenerierung des antioxidativen Schutzsystems benötigt (s. 3.1.2.2), sollte ein geringerer Anteil für die Fixierung von CO<sub>2</sub> zur Verfügung stehen. Diese Annahme wurde in Gaswechsellmessungen überprüft.

##### 6.1.4.1 CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in Abhängigkeit der photosynthetisch aktiven Strahlung (Lichtkurven)

Bei ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration trat tatsächlich bereits bei relativ niedrigen Lichtintensitäten (ca. 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) eine deutliche Limitierung in der Assimilationsrate bei CPO- und UROD-AS-Pflanzen auf (Abb. 16). Die Sättigung lag im unter gleichen Bedingungen (300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) kultivierten WT bei bedeutend höheren Quantenflußraten und trat erst bei ca. 1500  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR ein. Die Messungen erfolgten an ausgewachsenen Blättern, bei denen an den porphyrischen Pflanzen ein nicht unerheblicher Teil der Blattfläche durch Nekrosen eingenommen wurde. Bezieht man die CO<sub>2</sub>-Fixierungsraten hingegen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, relativieren sich die gemessenen Unterschiede zwischen WT- und tetrapyrrol-akkumulierenden Pflanzen (Abb. 16).

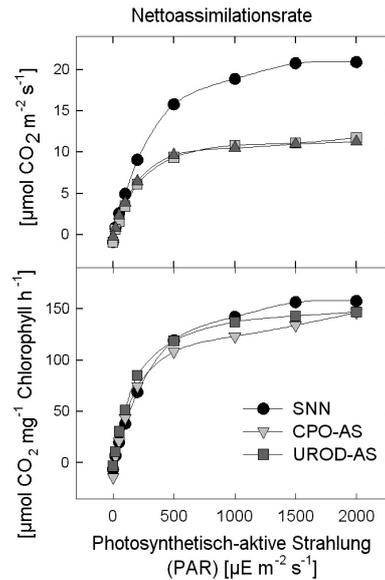


Abb. 16 Nettoassimilationsrate im Blatt 10 von WT- und porphyrischen Pflanzen der Linien CPO-AS 1/3 und UROD-AS 35/2 bei einer externen  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 400 ppm in Abhängigkeit der eingestrahlt photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR). Die Nettoassimilationsraten bei diesen ambienten  $\text{CO}_2$ -Bedingungen wurden sowohl auf Blattfläche (oben) als auch auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bezogen (unten). Die Mittelwerte aus den Messungen an jeweils 5 Pflanzen sind gezeigt.

#### 6.1.4.2 Nettoassimilation in Abhängigkeit von der $\text{CO}_2$ -Konzentration (*A-c<sub>i</sub>-Kurven*)

Durch die Variation der  $\text{CO}_2$ -Konzentration wurde versucht, eindeutige Unterschiede in der Assimilationsrate zwischen WT und den porphyrischen Pflanzen sichtbar zu machen (Abb. 17). Zusätzlich wurde die Gaswechselrate sowohl bei  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR (der Lichtintensität im Anzuchttraum) als auch bei  $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR gemessen, um sowohl ambiente als auch maximal erreichbare Assimilationsraten der Pflanzen untereinander vergleichen zu können.

Bei diesen Messungen wurden große Differenzen zwischen Blättern mit unterschiedlich schweren Läsionen festgestellt: Blätter mit sehr stark ausgeprägten Nekrosen (UROD-AS in Abb. 17 A und B) erreichten auch nach Berechnung der Assimilationsrate auf Chlorophyllgehalt bei  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR bei keiner  $\text{CO}_2$ -Konzentration die Raten von porphyrischen Pflanzen mit schwächer ausgeprägten Läsionen (CPO-AS in Abb. 17 A und B) bzw. vom WT. Mäßig nekrotische Pflanzen hingegen zeigten wiederum stark verminderte  $\text{CO}_2$ -Fixierungsraten unter Maximal-Photosynthese-Bedingungen ( $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR und Hoch- $\text{CO}_2$ ) im Vergleich zum WT, wenn auf Blattfläche bezogen wurde (Abb. 17 C). Erfolgte die Berechnung auf Basis des Chlorophyllgehaltes, nivellierten sich diese Unterschiede (Abb. 17 D).

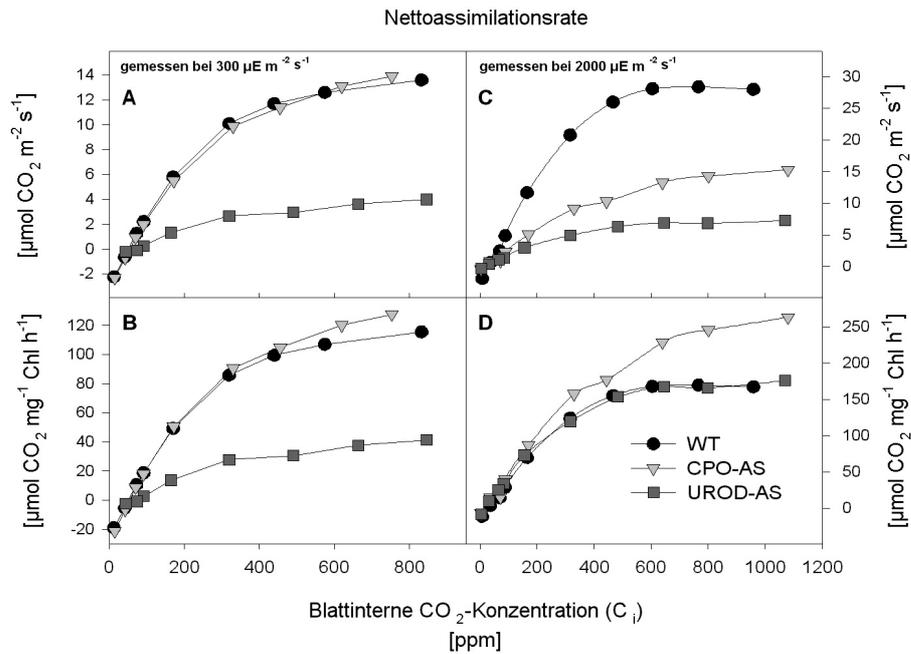


Abb. 17 Nettoassimilationsraten von Blättern des WT und der porphyrischen Linien CPO-AS 1/3 und UROD-AS 35/2 in Abhängigkeit von der internen CO<sub>2</sub>-Konzentration (A-c<sub>i</sub>-Kurven). Die Gaswechsellmessungen wurden sowohl bei der Lichtintensität durchgeführt, an welche die Pflanzen seit Wochen adaptiert waren (A, B; 300 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), als auch bei 2000 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, (C, D), um photosynthetische Maximalraten zu bestimmen. Die Raten wurden auf Blattfläche (A, C) bzw. auf Chlorophyllgehalt der Blätter (B, D) bezogen. Gezeigt sind repräsentative, gemittelte Gaswechsellmessungen des jeweils 10. Blattes ausgewählter Pflanzen, die sowohl schwächer (UROD-AS in C und D sowie CPO-AS in A-D) als auch stärker ausgeprägte (UROD-AS 35/2 in A und B) Nekrosen aufwiesen.

Zusammengefaßt implizieren die Ergebnisse dieser Gaswechsellanalysen eine fast vollständige photosynthetische Intaktheit der nicht-nekrotischen Bereiche, obwohl auch hier durch photosensibilisierende Prozesse oxidativer Streß ausgelöst werden sollte. In den untersuchten, ausgewachsenen Blättern läßt sich aber wegen der nur noch basalen Rate an Tetrapyrrolbiosynthese auf ein vergleichsweise niedriges Niveau der Porphyrinanhäufung schließen.

### 6.1.5 Aktivierung von pathogenese-assoziierten Prozessen in porphyrischen Pflanzen

Zusätzlich zu den bisher dargelegten Anzeichen für eine deutliche Aktivierung der antioxidativen Schutzsysteme in deren Zuge es wahrscheinlich zu einer Limitierung an niedermolekularen Antioxidantien kommt (s. 6.1.3.1), wurde in den tetrapyrrolakkumulierenden Pflanzen auch die Induktion von Pathogenabwehr-Programmen beobachtet (Mock et al. 1999). Dazu zählen sowohl die verstärkte Bildung und Anhäufung von PR-

Proteinen verschiedener Klassen und deren mRNA, als auch die massive Synthese und Ablagerung der phenolischen Verbindung Scopolin, die antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Dabei kam es besonders in den nekrotischen Bereichen der Blätter porphyrischer Pflanzen zur massiven Akkumulation von Scopolin, welche zu einer intensiven bläulichen Autofluoreszenz im UV-Licht führt (Mock et al. 1999). Zusätzlich beobachteten Mock et al. (1999) eine im Vergleich zum WT bis auf das 30x erhöhte Konzentration von Salicylsäure, einer Verbindung, die in der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) der Pflanzen eine entscheidende Rolle als Transmitter spielt (s. 3.2). Die Aktivierung dieser Komponenten der Pathogenabwehr führte letztendlich zu einer vergrößerten Resistenz gegenüber einer TMV-Infektion, was anhand der niedrigeren viralen RNA-Spiegel in infizierten UROD- bzw. CPO-AS-Pflanzen im Vergleich zum getesteten WT geschlußfolgert wurde (Mock et al. 1999).

## **6.2 Untersuchungen an porphyrischen Pflanzen, in denen der nekrotische Phänotyp durch die Veränderung von Umweltbedingungen induziert wird**

Neben der Analyse der antioxidativen Schutzsysteme von porphyrischen Pflanzen mit bereits vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp stand die Untersuchung von Prozessen während der Ausbildung von Blattläsionen im Vordergrund dieser Dissertation. Dafür wurde die Abhängigkeit der Nekrosenformation von den Umweltbedingungen ausgenutzt.

### **6.2.1 Umweltabhängigkeit der Ausbildung von Blattläsionen**

#### *6.2.1.1 Abhängigkeit der Bildung von Nekrosen von der Lichtmenge – das Lichtshift-Experiment*

Werden UROD- und CPO-AS-Pflanzen unter Bedingungen kultiviert, in denen sie einer relativ geringen Lichtmenge ausgesetzt sind, sind sie phänotypisch praktisch nicht vom WT zu unterscheiden (Abb. 18). Dabei spielt es grundsätzlich keine Rolle, ob diese Lichtmenge innerhalb kurzer Zeit mit hohen Lichtintensitäten oder aber über eine längere Photoperiode mit einer niedrigen Quantenflußrate aufgebracht wird. Als nekrose-unterdrückende Bedingungen haben sich  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  über eine Photoperiode von 6 h bewährt. Wahrscheinlich aufgrund der besseren genetischen Homogenität läßt sich unter diesen Bedingungen in den Nachkommen der CPO-AS-Linie 1/41 besonders sicher die Formation von Nekrosen verhindern, weswegen diese Pflanzen bevorzugt in den im Folgenden dargestellten Analysen eingesetzt wurden. Allerdings weist auch ein großer Prozentsatz der Pflanzen der UROD-AS-Linien 35/2 und 35/12 diese

Eigenschaft auf.

Durch die Erhöhung der eingestrahelten Lichtmenge, was entweder durch die Verlängerung der Lichtperiode bei gleicher –intensität oder aber durch Erhöhung der Quantenflußrate bei unveränderter Photoperiode erfolgen kann, kommt es zur rapiden Ausbildung von Blattläsionen. Wird z.B. die Photoperiode von 6 auf 16 h bei gleicher Lichtintensität ( $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) verlängert, beobachtet man innerhalb der nächsten 24-48 h die Formation von Nekrosen an den porphyrischen Pflanzen, wohingegen WT-Pflanzen keinerlei Schaden nehmen (Abb. 18).

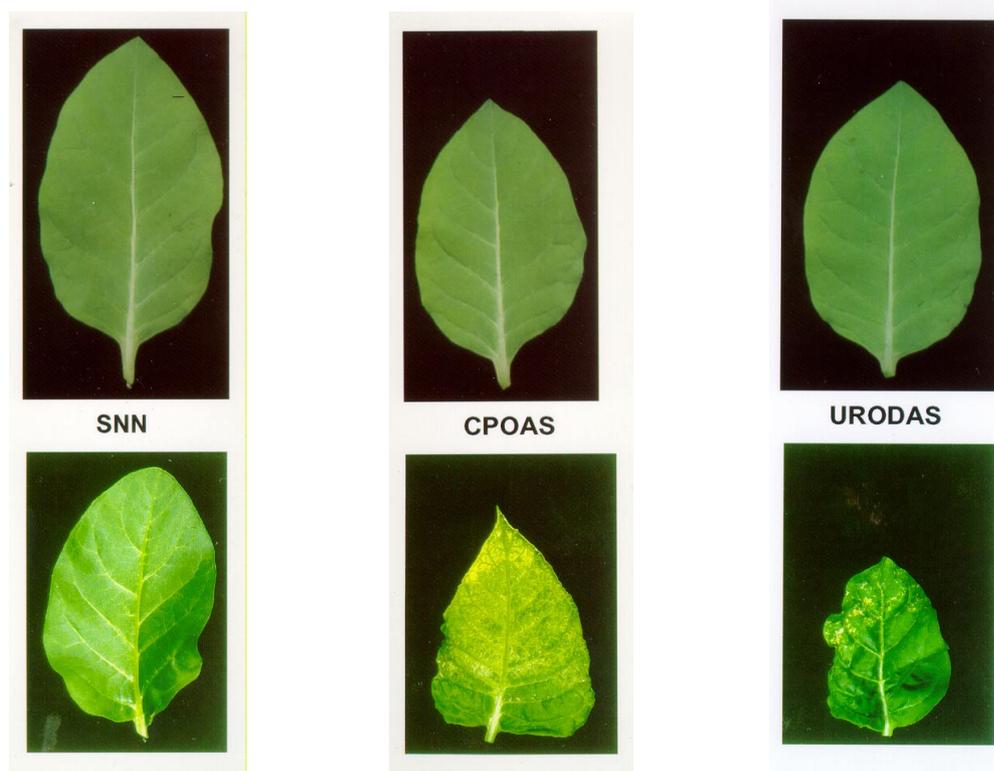


Abb. 18 Lichtshift-Experiment (s. auch 5.4.2). WT- (SNN), CPO-AS- (Linie 1/41) und UROD-AS- Pflanzen (Linie 35/2) wurden für 8 Wochen bei  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer Photoperiode von 6 h angezogen (**oben**). Die Photoperiode wurde anschließend auf 16 h verlängert (**unten**), was innerhalb von 24-48 h zur Ausbildung von Blattnekrosen an den transgenen, porphyrischen Pflanzen führt. Das jeweils 6. Blatt von repräsentativen Pflanzen ist gezeigt. Werden porphyrische Pflanzen in den Kurztag zurückgeführt, stoppt die Nekrosenbildung beim erreichten Stand.

Auch unter Kurztagbedingungen kommt es wegen des Antisense-Effektes in den transgenen Pflanzen während der Lichtphase zur Akkumulation von photosensitiven Porphyrin(ogen)en. Die Konzentration sinkt aber bereits in den ersten zwei Stunden der anschließenden Dunkelphase vermutlich wegen der relativ raschen Umwandlung in ungefährliche(re) Folgeprodukte wieder auf WT-Niveau ab (Hans-Peter Mock, persönliche Information). Wahrscheinlich gibt es daher einen bestimmten sub-toxischen Schwellenwert der Gleichgewichts („steady state“-)Konzentration der photosensibilisierenden Intermediate, der

nicht überschritten werden darf. Unterschwellige Konzentrationen, die einerseits durch lichtstimulierte Tetrapyrrolbiosynthese und damit den weiteren Zustrom von Intermediaten, andererseits durch den Abfluß in Endprodukte beeinflusst werden, lösen ebenfalls unterschwelligen oxidativen Streß aus. Dieser wird allerdings erst akut und überwältigt letztendlich die *per se* sehr potenten antioxidativen Schutzbarrieren der Chloroplasten, wenn durch erhöhte Lichtmengen die Photosensibilisierung des Systems überhand nimmt. Danach kommt es wahrscheinlich zum unkontrollierten Ausstrom der Tetrapyrrole in die Zelle, wo ihre oxidierten Folgeprodukte schnell zum Zelltod und makroskopisch zu Nekrosen führen.

Bei zuvor mit 6h Licht pro Tag angezogenen UROD- und CPO-AS-Pflanzen, die anschließend in einem modifizierten Lichtshift-Experiment im Tagesgang dreimal dem Wechsel von 6h Licht und 2h Dunkel ausgesetzt sind, entwickelt sich ein sehr viel schwächerer nekrotischer Phänotyp als bei Pflanzen, welche einem 18h Licht/6h Dunkelrhythmus exponiert werden (Hans-Peter Mock, persönliche Mitteilung).

Werden porphyrische Pflanzen zu einem beliebigen Zeitpunkt während eines normalen Lichtshift-Experiments aus Langtag- (16h Licht) in Kurztagbedingungen zurückgeführt (6h Licht), stoppt die bis dahin eingetretene Nekrosenformation im erreichten Stadium (Daten nicht gezeigt). Auch beobachtet man keine systemische Ausbreitung der Nekrosen in Gewebe hinein, die nicht der vergrößerten Lichtmenge ausgesetzt sind. Werden Blatthälften z.B. mit Aluminiumfolie abgedeckt, kommt es nur in den lichtexponierten Teilen zur Ausbildung der Läsionen. Die geschützten Blatthälften hingegen bleiben WT-artig (Abb. 19).

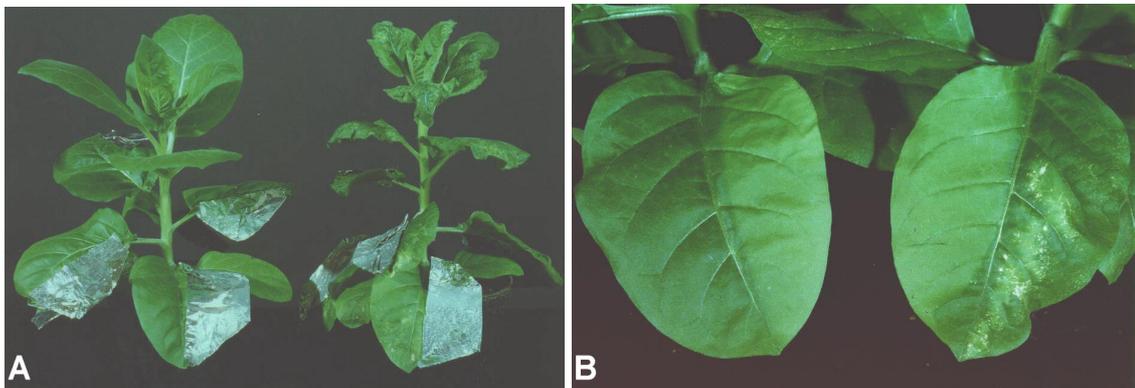


Abb. 19 Lichtshift-Experiment mit teilweise durch Aluminiumfolie abgedeckten Blättern. **A)** Vor der Vergrößerung der Lichtperiode von 6 h auf 16 h bei  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurden Blätter der WT- (links) und der porphyrischen Pflanzen der Linie CPO-AS 1/41 (rechts) jeweils zur Hälfte abgedeckt und erst nach 3 Tagen erhöhter Lichtdosis zum Fotografieren wieder freigelegt. **B)** Detailansicht von Blättern der Pflanzen aus (A) nach Entfernen der Abdeckung. Die lichtexponierten Blatthälften sind dunkler und weisen im Falle der CPO-AS-Pflanze (rechts) Nekrosen auf.

Trotz der Einschränkung, daß auch schon unter Bedingungen mit geringer Lichtdosis mit

schwachem oxidativen Streß zu rechnen ist, ist dieses licht-induzierbare Zelltodsystem ein lohnenswertes Untersuchungsobjekt, an dem sowohl frühe als auch spätere Reaktionen auf photodynamisch hervorgerufenen oxidativen Streß untersucht werden können.

#### 6.2.1.2 *Verstärkung der Lichtabhängigkeit der Nekrosenbildung durch erhöhte Temperaturen*

Werden porphyrische Tabakpflanzen unter erhöhten Temperaturen angezogen (32°C), kommt es auch unter Schwachlichtbedingungen zum verstärkten Auftreten von Blattläsionen. Wird zusätzlich die eingestrahlte Lichtmenge vergrößert (Lichtshift-Experiment bei 32°C) beobachtet man die im Vergleich zum Standard-Lichtshift bei 25°C extrem beschleunigte und in ihren Auswirkungen sehr viel massivere Formation von Nekrosen („super-nekrotischer Phänotyp“, Abb. 20). Sehr wahrscheinlich ist die bei 32°C erhöhte chemische Reaktivität der Porphyrine die Ursache für dieses Phänomen.



Abb. 20 Lichtshift-Experiment bei erhöhter Temperatur. WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 wurden für 7 Wochen bei 25°C und 6 h 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen und die Temperatur daraufhin für 1 Woche auf 32°C erhöht. Unter dem Einfluß der erhöhten Temperatur bildet sich im Lichtshift-Experiment (16 h 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) innerhalb von 2-3 Tagen ein sehr viel massiverer („super“)nekrotischer Phänotyp der CPO-AS-Pflanzen heraus, während an den WT-Pflanzen keine Veränderungen beobachtet werden (nicht gezeigt).

#### 6.2.1.3 *Strikte Abhängigkeit der Bildung von Blattläsionen in porphyrischen Pflanzen vom Sauerstoffpartialdruck*

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob Sauerstoff für die Formation von Nekrosen unabdingbar ist (s. 5.4.3). Wenn, wie vermutet, vor allem die massive, durch

Photosensibilisierung hervorgerufene Bildung von ROS die Ursache für die Schäden an den Pflanzen sein sollte, müßte dies durch den Ausschluß von Sauerstoff während des Lichtshift-Experiments verhindert werden können. Zu diesem Zweck wurden WT- und tetrapyrrolakkumulierende Pflanzen in einer praktisch O<sub>2</sub>-freien Kammer (< 1%) für ca. 1 Woche erhöhten Lichtdosen ausgesetzt, und tatsächlich blieb das Auftreten von Blattläsionen aus (Abb. 21). Kontrollpflanzen unter normoxischen Bedingungen entwickelten, wie gewöhnlich, Nekrosen, und auch die zuerst anoxisch behandelten porphyrischen Pflanzen wurden nach Wiedereintritt von Sauerstoff rasch nekrotisch (Daten nicht gezeigt).



Abb. 21 Lichtshift-Experiment mit WT-Pflanzen (links) und Pflanzen der CPO-AS Linie 1/41 (rechts) unter niedrigem O<sub>2</sub>-Partialdruck. **A**) Blatt 6 nach 8 Wochen Anzucht in der Klimakammer (6 h: 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 21% O<sub>2</sub>); **B**) Lichtshift: nach einer weiteren Woche unter geänderten Lichtbedingungen (16 h: 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) und erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck (< 1%) bzw. **C**) Lichtshift unter normoxischen Bedingungen (16 h: 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 21% O<sub>2</sub>). Deutlich ist die Ausbildung von Nekrosen am porphyrischen Blatt bei 21% O<sub>2</sub> zu erkennen (C), während diese bei Niedrigsauerstoffbedingungen ausbleibt (B).

### 6.2.2 Identifizierung von frühzeitig induzierten Genen als Reaktion auf photodynamisch erzeugten oxidativen Streß durch Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH)

Da das Entstehen von nekrotischem Gewebe an den porphyrischen UROD- bzw. CPO-AS-Pflanzen durch einfache Manipulation der eingestrahlten Lichtmenge gesteuert werden kann, bot sich dieses experimentelle System zur Identifizierung von frühzeitig induzierten Genen als Reaktion auf photodynamisch erzeugten oxidativen Streß an.

Nachdem mehrere erfolglose Versuche unternommen worden waren, eine subtrahierte cDNA-Bank mit Hilfe von an Latexkügelchen (Oligotex, Qiagen, Hilden) gebundenen Driver-cDNA- und in flüssiger Phase befindlichen Tester-cDNA-Einzelsträngen zu konstruieren (Hara et al. 1991), wurde dieser Ansatz zugunsten der Subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH) aufgegeben (Diatchenko et al. 1996, 1998, 1999; s. 5.7.3.1, 5.7.3.2). Die SSH erwies sich als effiziente Methode, um Expressionsunterschiede zwischen Pflanzen der CPO-AS-Linie 1/41 und dem WT ausfindig zu machen, welche als Folge einer vergrößerten Lichtmenge resultierten.

Die Pflanzen waren bis dahin unter Kurztagbedingungen gewachsen ( $6 \text{ h } 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), und die Lichtphase wurde nach ca. 8 Wochen um 10 auf 16 h verlängert, wobei gleichzeitig die Lichtintensität auf  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  verdoppelt wurde. Blattmaterial zur Konstruktion der subtrahierten cDNA-Bank wurde am ersten Tag der veränderten Bedingungen 12 h nach Beginn der Lichtperiode gewonnen, zu einem Zeitpunkt also, als noch keinerlei Nekrosen an den CPO-AS-Pflanzen zu erkennen waren.

#### 6.2.2.1 Daten zur Effizienz der Subtraktion mittels SSH

##### 6.2.2.1.1 Allgemeine Angaben zur Größe der differentiellen cDNA-Bank

Für die Erzeugung der subtrahierten cDNA-Bank wurde der PCR Select-Kit der Fa. Clontech verwendet, der auf der SSH-Technik beruht (s. 5.7.3). Dabei wurde die aus dem WT gewonnene cDNA als Driver genutzt, d. h. von der Tester-cDNA aus den Blättern der CPO-AS-Linie 1/41 abgezogen („vorwärts subtrahiert“, forward subtracted, FS). Im umgekehrten Versuch, der zur Erzeugung von „reverse subtrahierten (RS) Sonden“ diente, wurden Driver und Tester miteinander vertauscht (s. 5.7.4.2). In der FS-cDNA sollten also solche Vertreter angereichert sein, die spezifisch für diesen frühen Zeitpunkt von photodynamisch ausgelöstem oxidativen Streß sind, welcher wenig später zu Zelltodereignissen führt.

Die durch PCR amplifizierte und in den pCRII-Vektor ligierte FS-cDNA wurde in zwei Aliquots geteilt (*Ansatz I* und *II*) und durch Hitzeschock (*Ansatz I*) bzw. Elektroporation (*Ansatz II*) in entsprechend präparierte *E. coli*-Zellen transformiert (Tab. 9).

Die resultierenden 812 insertenthaltenden Kolonien aus *Ansatz I* wurden über Kolonie-PCR und anschließender Hybridisierung der „Reversen Northern Blots“ mit FS- und RS-Sonden auf wirkliche differentielle Expression getestet, wobei 81 Klone identifiziert wurden. Die 1181 Kolonien aus *Ansatz II* wurden hingegen direkt einer Koloniehybridisierung mit FS- und RS-Sonden unterworfen, einem Verfahren, in dem weitere 153 Klone identifiziert werden konnten (s. 5.7.4). Insgesamt enthielten also 234 aus 1993 *E. coli*-Kolonien Plasmide mit differentiell exprimierten cDNA-Inserts, was einem Anteil von 11,7 % entspricht (Tab. 9).

##### 6.2.2.1.2 Angaben zur Redundanz von cDNA-Klonen

Um die in *Ansatz I* sehr redundant auftretenden Klone des Gly-reichen Proteins (GRP) und des Salicylsäure-responsiven Proteins 8.2 („salicylic acid responsive; SAR8.2) in den 153 Klonen aus *Ansatz II* für die weitere Analyse auszuschließen, wurden die Koloniefilter mit Sonden für GRP bzw. SAR 8.2 hybridisiert. Dadurch konnten unter den 153 Klonen 15x GRP und 25x

SAR 8.2 identifiziert werden. Zusammen mit den 19 Klonen aus *Ansatz I* und den trotz Kontrollhybridisierung mit der GRP-Sonde nicht identifizierten weiteren 8 GRP-Klonen im *Ansatz II* ergibt sich eine Gesamtzahl von 42 GRP-Klonen aus 234 (17,9%). Für SAR 8.2 lassen sich 15 Klone aus *Ansatz I* und die durch Hybridisierung mit Sonde 659 identifizierten 25 Klone aus *Ansatz II* sowie 4 zusätzliche in *Ansatz II* enthaltene Klone zusammenzählen, so daß sich eine Gesamtzahl von 44 SAR 8.2.-Klonen aus 234 ergibt (18,8%).

Weitere redundante cDNA-Klone unter den 234 analysierten Klonen waren PR-P bzw. Q mit insgesamt 11 Vertretern (4,7%), 9 ribosomale Protein (3,8%), die Hydroxymethyl-glutaryl-CoA-(HMG-CoA)-Reduktase mit 8 Klonen (3,4 %) sowie die 4 Hitzeschockprotein-cDNAs für HSP70/80 (1,7%). Ungefähr die Hälfte der differentiellen cDNA-Bank bestand aus unikalen bzw. niedrig redundanten cDNA-Klonen (Tab. 9).

#### 6.2.2.1.3 Sequenzierung der cDNA-Inserts

Für alle 81 cDNAs aus *Ansatz I* sowie 113 cDNAs aus *Ansatz II* (153 abzüglich der bereits als GRP bzw. SAR 8.2 identifizierten 15 bzw. 25 cDNAs), für insgesamt also 194 cDNA-Klone gab es Sequenzierbedarf. Für insgesamt 174 Klone konnten auswertbare DNA-Sequenzen bestimmt werden, die nicht in allen Fällen vollständig die komplette DNA abdecken. Für die restlichen 20 Klonen scheiterte die Sequenzierung aus unterschiedlichen (technischen) Gründen.

Für 11 der 70 im Reversen Northern Blot als differentiell bestätigten cDNA-Klone aus *Ansatz II* ist die Sequenz nicht bekannt bzw. konnten durch Sequenzvergleiche in den Datenbanken keine oder nur sehr schwache Homologien identifiziert werden (Tab. 9).

#### 6.2.2.1.4 Erneutes Überprüfen der differentiellen Expression durch Reverse und konventionelle Northern Blots

Vor allem anhand der Sequenzinformation wurden aus *Ansatz I* 35 und aus *Ansatz II* 106 cDNA-Klone ausgewählt, um deren differentielle Expression noch einmal im Reversen Northern Blot zu überprüfen (insgesamt 152). Die Filter zum Testen der Klone aus *Ansatz I* wurden in einem Gemeinschaftsprojekt innerhalb des IPK mit den AG Phytoantikörper (Dr. U. Conrad) und Molekulare Pflanzenphysiologie (Prof. U. Sonnwald) durch einen Spotting-Roboter erzeugt. Auf diesen Filtern wurden zusätzlich cDNAs für andere streß-induzierte Gene aufgetragen, die in o.a. AG isoliert worden waren.

Die ausgewählten 106 insertenthaltenden Plasmide aus *Ansatz II* wurden manuell auf jeweils 2 Nylonfilter doppelt gespottet (Abb. 22). Einer der beiden Filter wurde dann mit der vorwärts

(FS)-, der andere mit der revers subtrahierten (RS)-Sonde unter hoch-stringenten Bedingungen hybridisiert (s. 5.7.4.2). Die Hybridisierungssignale wurden anschließend am Phosphorimager quantifiziert. Nach dem Entfernen der Sonde (Strippen der Membranen) wurden diese zur Ermittlung einer DNA-Ladekontrolle mit einem radioaktiv markierten Vektorfragment erneut hybridisiert. Die resultierenden Signale wurden als Normalisierungsgrundlage genutzt, um auch schwächer differentiell exprimierte cDNAs zu identifizieren (s. 5.7.4.2).

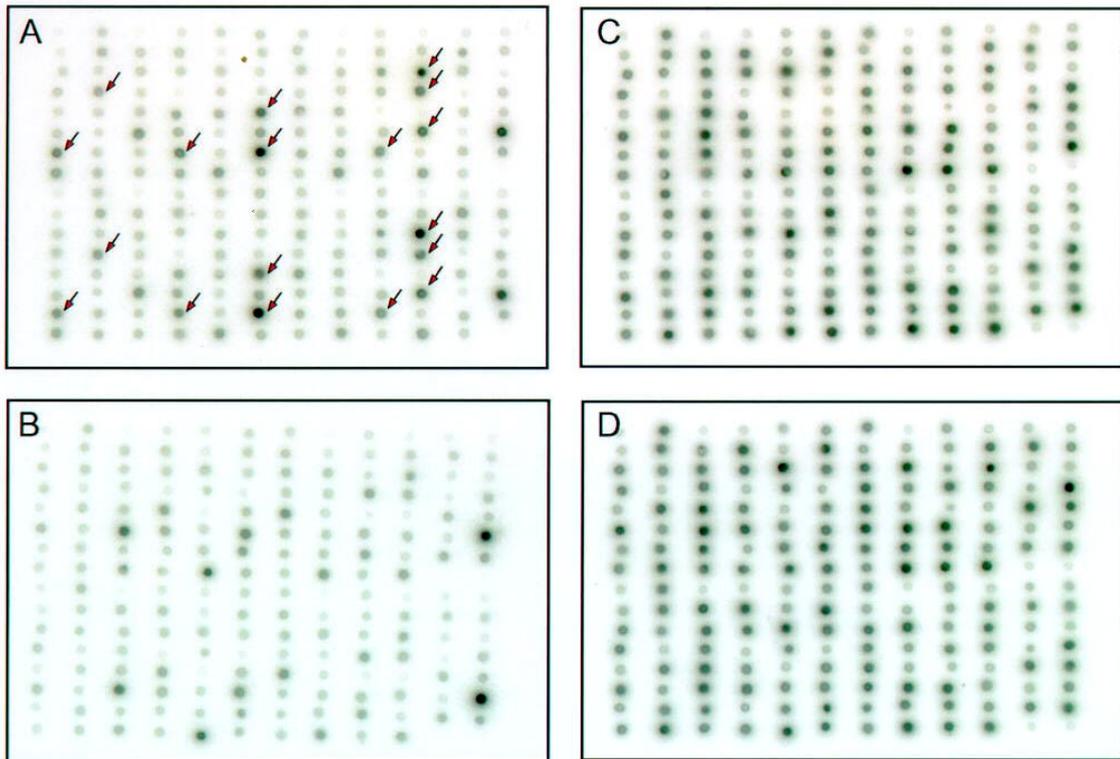


Abb. 22 Reverser Northern (Spot) Blot zur Überprüfung von differentieller Genexpression. Aliquots von Plasmid-Mini-Präparationen wurden in vierfacher Ausführung an Nylonmembranen gebunden. Die zwei Nylonmembranen, auf denen die cDNA-haltigen Plasmide jeweils als Duplikat vorhanden waren, wurden zuerst mit den FS-(A) und RS-Sonden (B) und anschließend, nach vollständigem Strippen der Membranen, mit einer vektorspezifischen Sonde hybridisiert (C, D), um quantitative Auftragefehler auszugleichen und die digital-radiometrische Auswertung der Hybridisierungssignale am Phosphorimager zu ermöglichen. Einige der am stärksten differentiell exprimierten cDNA-Klone sind markiert.

Auf diese Weise konnten 16 aus 35 Klonen des *Ansatz I* (45,7%) und 70 aus 106 Klonen des *Ansatz II* (66,0%) als differentiell exprimiert bestätigt werden. Für *Ansatz I* und *II* zusammen ergab sich daraus eine Bestätigungsquote von 61,0 %. Unter den 70 bestätigten Klonen des *Ansatz II* waren 44 stärker differentiell exprimiert, d.h. das auf gleiche DNA-Menge normalisierte Verhältnis beider FS-Hybridisierungssignale zu den entsprechenden RS-Hybridisierungssignalen war größer als 1,5. Zu diesen kamen 26 schwächer differentiell exprimierte cDNAs, bei denen das normalisierte Verhältnis von FS/RS-Hybridisierungssignalen

zwischen 1,1 und 1,5 lag. Für 10 der insgesamt 106 getesteten cDNA-Klone *aus Ansatz II* konnte auf diese Weise kein eindeutiges Ergebnis bestimmt werden, da nur eines der beiden abgeglichenen Hybridisierungssignale der als Duplikat aufgetragenen Spots differentielle Expression zeigte.

Für 36 ausgewählte cDNA-Klone wurde eine konventionelle Northern Blot-Analyse durchgeführt (s. Abb. 23). Diese umfaßte RNA-Proben, die über einen weiten Zeitrahmen des Lichtshift-Experiments gewonnen wurden. Die Ergebnisse der herkömmlichen Northern Blots waren nicht immer deckungsgleich mit denen der Reversen Northern Blots. Für 25 von 36 auf diese Weise überprüften Genen konnte eine differentielle Expression nachgewiesen werden. Da z.Zt. unter den Spezialisten für Reverse Northern Blots noch über die Aussagekraft des konventionellen Northern im Vergleich zum Reversen Northern Blot diskutiert wird (L. Altschmied, IPK, persönliche Mitteilung), sollten nicht in allen Fällen eines fehlenden Nachweises der differentiellen Expression bestimmter Klone im konventionellen Northern Blot diese cDNA-Fragmente unbedingt und sofort als „falsch-positive“ verworfen werden.

Zusätzlich wurde im Northern Blot für eine kleinere Auswahl von Genen (19) auch das Expressionsverhalten nach Einwirken von anderen Stressoren (z.B. Trockenheit, Hitze, Kälte, Methylviologen, s. 5.5) auf Tabak untersucht, und in den meisten Fällen konnte ebenfalls eine Transkriptakkumulation festgestellt werden (s. Abb. 25).

Die zahlenmäßigen Angaben zum Erfolg der Subtraktion mittels SSH sind in Tab. 9 noch einmal zusammenfaßt.

Tab. 9 Statistische Daten zur SSH. Weitere Informationen im Text.

	<i>Ansatz I</i>	<i>Ansatz II</i>
Transformation von <i>E. coli</i> durch	Hitzeschock	Elektroporation
Menge des zur Ligation in den pCRII-Vektor eingesetzten PCR-Produkts (ca.)	30 ng	90 ng
Anzahl der weißen <i>E.coli</i> -Kolonien (Blau/Weiß-Screening)	812	1181
Weißer Kolonien insgesamt	1993	
Anzahl der tatsächlich differentiell exprimierten Klone; Identifizierung durch Reverse Northern Blots ( <i>Ansatz I</i> ) bzw. Koloniehybridisierung ( <i>Ansatz II</i> ) mit FS- und RS-cDNA-Sonden	81	153
Anzahl differentiell exprimierter Klone lt. erster Überprüfung insgesamt	234 (= 11,7 % von 1993)	
Anzahl von zwei im <i>Ansatz I</i> vorkommenden, sehr redundanten cDNAs (GRP, SAR8.2)	19 (GRP) 15 (SAR8.2)	
Anzahl dieser beiden, durch Hybridisierung mit		15 (GRP)

entsprechenden Sonden im <i>Ansatz II</i> ermittelten Klone		25 (SAR8.2)
Anzahl weiterer, durch vorhergehende Hybridisierung nicht identifizierter cDNA-Vertreter dieser beiden Gene		8 (GRP) 4 (SAR8.2)
Gesamtanzahl der cDNA-Klone von GRP und SAR8.2 in beiden Ansätzen	42 (GRP; = 17,9 % von 234) 44 (SAR8.2; = 18,8 % von 234)	
Weitere redundante cDNA-Klone	11 (PR-P/Q; = 4,7 % von 234) 9 (ribosomale Proteine; = 3,8 % von 234) 8 (HMG-CoA-Reduktase; = 3,4 % aus 234) 4 (HSP70/80; = 1,7 % von 234)	
Anteil unikalere bzw. kaum redundanter cDNA-Klone, ca.	50 %	
Sequenzierung in Auftrag gegeben für insgesamt 194 Klone, davon:	81 Klone	113 (153-40 GRP bzw. SAR)
Auswertbare Sequenzen	174	
Erneutes Überprüfen der differentiellen Expression im Reversen Northern Blot von 141 (anhand der vorliegenden Sequenzinformation) ausgewählten Klonen, davon	35 maschinell gespottet	106 von Hand gespottet
Bestätigung der differentiellen Expression für	16 aus 35 (45,7 %)	70 aus 106 (66,0 %)
Bestätigungsquote insgesamt	86 aus 141 = 61,0 %.	
Details der quantitativen Auswertung der differentiellen Expression der cDNA-Klone aus Ansatz II (jeweils Doppelspots):		
Stark differentiell exprimiert ( $FS/RS > 1,5$ )		44 aus 70
Schwach differentiell ( $1,1 < FS/RS < 1,5$ )		26 aus 70
Uneindeutig ( $FS/RS$ beider Spots differiert stark)		10 aus 106
Unter den differentiell Exprimierten: Fehlende Sequenzinformation bzw. keine oder mangelhafte Homologie mit bekannten Genen		11 aus 70
Überprüfen der differentiellen Expression im Northern Blot (Einbeziehen mehrerer Zeitpunkte während des Lichtshifts) für	36 cDNA-Klone	
Bestätigungsquote	25 aus 36 (69,4 %)	
Differentielle Expression auch unter anderen Umweltstreeinflüssen (s. 5.5) im Northern Blot untersucht für	19 cDNA-Klone	

### 6.2.2.2 Liste der differentiell exprimierten Gene

Nach wiederholter Expressionsanalyse im Reversen bzw. für ausgewählte Klone zusätzlich im konventionellen Northern Blot wurde in Tab. 10 eine Liste von 72 individuellen Genen

zusammengestellt, welche zu einem frühen Zeitpunkt von photodynamisch erzeugtem oxidativen Streß und daraus resultierenden Zelltodprozessen in Tabakblättern induziert werden. Aufgrund von Redundanzen innerhalb der subtrahierten cDNA-Bank werden diese 72 Gene durch 186 cDNA-Klone repräsentiert. Einige unter ihnen sind auch Bestandteil von Fusionsklonen. Für einen Großteil der Gene lagen in der Literatur bereits beschriebene Befunde zur Funktion und Bedeutung unter unterschiedlichen Streßbedingungen vor.

In Tab. 10 sind cDNA-Klone aufgelistet, die auch in der zweiten Kontrollhybridisierung von normalisierten Spot-Blots mit den FS- und RS-Sonden ein differentielles Hybridisierungssignal aufwiesen (Reverser Northern Blot, s. 6.2.2.1.4). Es wurden außerdem einige cDNA-Klone in die Tabelle aufgenommen, die homolog mit sehr interessanten Genprodukten sind, aber nicht wiederholt als differentiell exprimiert bestätigt werden konnten. Weiterhin sind cDNA-Klone aufgeführt, für die die Sequenz nicht oder nur sehr fehlerhaft ermittelt werden konnte bzw. für die die Sequenzanalyse keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen aufzeigte, für welche aber im Reversen Northern Blot wiederholt eine differentielle Expression gezeigt werden konnte.

Durch photodynamisch hervorgerufenen oxidativen Streß und frühe Zelltodprozesse werden Gene unterschiedlichster Klassen und Familien induziert. Neben den zahlreich vertretenen Genen für den Primär- und Sekundärstoffwechsel fallen besonders Gene für Chaperone, Hitzeschockproteine (HSPs) und andere Proteine mit proteinstruktur-stabilisierenden oder -wiederherstellenden Eigenschaften auf. Die Präsenz dieser Gene in der subtrahierten cDNA-Bank spricht für Verschiebungen im Redoxstatus der Zellen als Konsequenz von oxidativem Streß.

Durch den subtraktiven Ansatz konnten die Ergebnisse vorheriger Experimente bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, daß in porphyrischen Pflanzen Pathogenabwehr-Reaktionen ablaufen, die u.a. zur Akkumulation von PR-Proteinen führen (Mock et al. 1999). Die subtrahierte cDNA-Bank umfaßt eine ganze Reihe von Genen für unterschiedliche PR-Proteine und PR-Protein-Ähnliche. Ebenfalls in Richtung einer Pathogenabwehr oder Verwundungsreaktion läßt sich das Vorkommen von Genen in der Bank interpretieren, die für Proteine mit zellwandmodifizierender Funktion kodieren.

Die Präsenz z.B. der cDNA für die Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase (ACO) in der Bank weist auf allgemeine Streß- und Seneszenzprozesse hin, die in den porphyrischen Pflanzen ablaufen. Andere apoptose-assoziierte Gene deuten an, daß bereits zu einem frühen Zeitpunkt Zelltod initiiert wird.

Tab. 10 Liste der Klone in der subtrahierten cDNA-Bank. Angegeben ist jeweils die **Anzahl** aller cDNAs einer Klasse (inkl. redundanter Klone) und die Anzahl unikalier Genprodukte. Besonders redundante cDNAs (wie GRP, SAR8.2) sind in Tab. 9 bereits erwähnt worden. Bis auf 7 cDNA-Klone, für die entweder keine Sequenzinformation vorlag bzw. beim Sequenzvergleich keinerlei Homologien zu bereits beschriebenen Genen erkannt werden konnte, ist für jede cDNA der Homologiepartner mit dem wahrscheinlichsten **BLAST**-Ergebnis aufgelistet. Die in der Literatur bereits beschriebene **Bedeutung** oder Funktion einer Vielzahl der Genprodukte unter Streßbedingungen ist stichpunktartig angegeben. Die **Länge der cDNA-Inserts** ist in den meisten Fällen aus der Sequenz abgeleitet; nur bei langen Inserts bzw. stark fehlerhaften u./o. das Insert nicht komplett abdeckenden Sequenzen ist die Insertgröße nach Restriktionsabbau der Plasmide mit EcoRI und Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt worden. Die **Induktion im Lichtshift** bzw. durch **andere Stressoren** wurde wiederholt durch Reverse Northern Blots bzw. durch konventionelle Northern Blots überprüft (s. 6.2.2.1.4). Das Ergebnis dieser Überprüfung ist jeweils in Form von Abkürzungen angegeben: **n.d.**: nicht ermittelt; **nein**: kein differentielles Hybridisierungssignal für beide Spots (cDNA-Klone wurden als Duplikate gespottet, s. 5.7.4, 6.2.2.1.4); (✓): schwach differentiell exprimiert ( $1,1 < FS/RS < 1,5$ ; s. 6.2.2.1.4); ✓: differentiell ( $FS/RS > 1,5$ , s. 6.2.2.1.4); **0**: kein eindeutiges Ergebnis (normalisiertes Signalverhältnis FS/RS beider Spots war umgekehrt zueinander, s. 6.2.2.1.4); **andere Stressoren** (s. 5.5): **HL**: Starklicht; **MV**: Methylviologen; **AC**: Acifluorfen; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**; **SA**: Salicylat; **TR**: Trockenstreß; **K**: Kältestreß

Klone insg./ individuelle Klone (=Gene)	It. BLAST- Datenbank- Recherche homolog mit:	aus der Literatur bekannte - physiologische Bedeutung - Expression unter Streß	Länge der cDNA- Inserts [bp]	Induktion ausgewählter Klone im Licht- shift bestätigt durch		Induk- tion auch durch andere Stres- soren im Northern Blot?
				Reversen Northern Blot?	Nor- thern Blot?	
<b>Enzyme des Primärstoffwechsels: 18/13</b>						
3	Triosephosphat- Isomerase	- Glycolyse; auf Proteinebene induziert z.B. durch Trockenstreß in Mais (Riccardi et al. 1998)	281 307 ca. 1000	✓	nein	HL, MV, AC
1	Enolase	- Glycolyse, (2-PGA → PEP); durch Anaerobiose, Trocken-, Kälte und Salzstreß sowie nach ABA-Behandlung induziert (Riccardi et al. 1998, Lal et al. 1998, Forsthoefel et al. 1995)	365	nein	n.d.	n.d.
2	Pyruvat- Dehydrogenase	- Letzter Schritt der Glycolyse (→ Acetyl-CoA); mitochondrial lokalisiert; durch Streß (vor allem Ischemie/ Reperfusions-Streß) in tierischen Systemen beeinflusst (Janero et al. 1994)	217 ca. 800	✓	n.d.	n.d.
2	ATP-Citrat- Lyase	- Eingangsenzym der Fettsäure-synthese (→ Bereitstellung von Acetyl-CoA im Cytosol tierischer bzw. in den Chloroplasten pflanzlicher Zellen)	198	✓	✓	n.d.
1	Transketolase	- u.a. plastidär lokalisierter oxidativer Pentosephosphat-Weg (→ Bereitstellung von NADPH); komplementiert Hefe-SOD1-	595	✓	n.d.	n.d.

		Mutanten; andererseits sind transketolase-defiziente Hefe-Mutanten O <sub>2</sub> -sensitiv (Slekar et al. 1996, Juhnke et al. 1996)				
1	lösliche saure $\beta$ -Fructosidase (Invertase)	- Bereitstellung von Hexosen; in Mais wird eine vakuoläre lösliche saure Invertase in Folge von Trockenstreß induziert ( $\rightarrow$ Invertase ist Streß-QTL und Schlüsselenzym der Sink-Source-Regulation, Roitsch 1999, Pelleschi et al. 1999)	630	✓	n.d.	n.d.
2	plastidäre Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase)	- Glucose/Stärkesynthese im Chloroplasten; aktivierbar durch das Thioredoxin-System, d.h. selbst sensitiv gegenüber oxidativem Streß (Loggini et al. 1999)	177 403	nein (✓)	n.d.	n.d.
1	Formiat-Dehydrogenase	- Formiat-Gärung in Bakterien und Algen; prominentes mitochondriales Protein in nicht-grünem, selten in grünem Gewebe; induzierbar in Blättern durch Hypoxie, Formiat- und Ethanolapplikation, in Wurzeln durch Fe-Defizienz (Hourton-Cabassa et al. 1998, Suzuki et al. 1998)	381	(✓)	(✓)	MV, AC, SA
2	P- und H-Proteine des Glycin-Decarboxylase-Multienzymkomplexes	- P-Protein katalysiert die eigentliche Decarboxylierung von Glycin und überträgt das Produkt (Methylamin) auf die H-Untereinheit des Komplexes; mitochondrial lokalisierter Abschnitt des C <sub>2</sub> -Zyklus (Photorespiration); lichtinduzierte, blattspezifische Transkriptakkumulation (Douce und Neuburger 1999)	227 (P) 206 (H)	(✓) 0	n.d.	n.d.
1	Thymidin-diphosphoglucose-4,6-Dehydratase	- TDP-Glucose-4,6-Dehydratase (GDH, EC 4.2.1.46); Enzym des Desoxyzuckermetabolismus (Linton et al. 1995); verleiht Hefezellen erhöhte Toleranz gegenüber SH-Oxidants Diamid (Kushnir et al. 1995)	568	✓	n.d.	n.d.
1	PAPS-Reduktase-ähnliches Protein	- Reduktion von Sulfat zu Sulfit unter Verbrauch von 2 mol Thioredoxin; induziert durch Cd <sup>2+</sup> (wie auch $\gamma$ -EC-Synthase) $\rightarrow$ Deckung des erhöhten Bedarfs an Cys und Phytochelatinen unter Streßbedingungen (Heiss et al. 1999)	314	✓	n.d.	n.d.
1	unbekanntes Protein aus <i>A. thaliana</i>  GeneBank Acc.# AC004484	- AC004484 ist homolog mit Na <sup>+</sup> /Glu-Transportern/ Symportern	408	(✓)	n.d.	n.d.

Enzyme des Sekundärstoffwechsels: 11/4						
1	Porphobilinogen-Deaminase ( <i>hem C</i> )	- Tetrapyrrolbiosynthese; induziert durch Hypoxie-Streß in Knochenmarks- und roten Blutzellen der Ratte (Heiss et al. 1986); Aktivität (nicht aber Protein) reduziert in UROD-AS-Pflanzen (Mock und Grimm 1997)	363	✓	nein	nein
6+2 (Fusion mit cDNA für Gly-reiches Protein)	Hydroxymethylglutaryl (HMG)-CoA-Reduktase	- Eingangsenzym der Isoprenoidbiosynthese im Cytosol (HMG-CoA → Mevalonat); induzierbar durch Pathogeninfektion, Verwundung, Arachidonsäure und Hg <sup>2+</sup> (Genschik et al. 1992, Choi et al. 1992)	175 - 621	✓	✓	n.d.
1	Flavonol-3-Sulfotransferase	- katalysiert Transfer von Sulfat des PAPS auf 3'-OH des Flavonols; Flavonidstoffwechsel wird (wie auch PAL und CHS) durch Elicitoren induziert (Logemann et al. 2000)	ca. 750	✓	n.d.	n.d.
1	Geranyl-geranyl-pyrophosphat-Synthase	- Isoprenoidstoffwechsel; plastidäre und cytosolische Isoformen induziert durch Verwundungsstreß und Elicitorapplikation (Hugueney et al. 1996)	504	(✓)	nein	nein
Proteine mit strukturerhaltender oder wiederherstellender Funktion (Chaperone, HSPs, SH-aktive Proteine): 14/10						
1	Proteindisulphid-Isomerase (EC 5.3.4.1)	- zählt zu den Chaperonen (und hier zu den „Foldasen“); lokalisiert im ER; öffnet und verknüpft S-S-Bindungen; essentiell für Hefewachstum; hat DHAR-Aktivität in Tieren (Boston et al. 1996, Wells und Xu 1994)	256	(✓)	✓	n.d.
1	Chaperonin-60 $\alpha$	- groES/L-ähnliches Chaperonin; involviert in Assemblierung der Rubisco-UE im Plastiden; → „Rubisco-Untereinheit-bind. Protein“ (Hemmingsen et al. 1988)	ca. 550	✓	nein, generell licht-induziert	(AC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , SA)
1	Chaperonin 10	- Cofaktor von Chaperonin 60; praktisch konstitutiv exprimiert; zusätzliche Induktion durch Hitzeschock (Viitanen et al. 1995)	ca. 650	nein	n.d.	n.d.
1	Streß-responsives Cyclophilin	- Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase (EC 5.2.1.8); involviert in Proteinfaltung und Proteininteraktionen; bindet z.B. das humane thiol-spezifische Antioxidants-Protein Aop1, bindet auch Cyclosporin A; dadurch wird das Öffnen von Poren in der Mitochon-	545	✓	✓	n.d.

		drienmembran beeinflusst (Gasser et al. 1990, Jaschke et al. 1998, Connern und Halestrap 1994); → mitochondrialer Energiestoffwechsel spielt eine wichtige Rolle beim PCD tierischer Zellen (Green und Kroemer 1998)				
3	Thioredoxin	- universell verbreitetes redoxaktives Protein (Proteindisulfid-Oxidoreduktase); DHAR-Aktivität; aktiviert/deaktiviert eine Reihe von lichtregulierten Enzymen im Plastiden; induziert durch Trockenstreß (Rey et al. 1998)	410 461	✓	✓	n.d.
1	Glutaredoxin (Grx) (Thioltransferase)	- kleine, hitzestabile Proteine mit GSH-abh. Disulfid-Oxidoreduktase-Aktivität; lösen die S-S-Brücken gemischter Disulfide auf (Wells et al. 1993); Hefe-Deletionsmutanten sind sensitiv gegenüber O <sup>2-</sup> bzw. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Luikenhuis et al. 1998); Induktion durch oxidativen Streß in <i>E.coli</i> ist oxyR-abh. aber gleichzeitig wird oxyR durch Grx deaktiviert (→ Autoregulation, Zheng et al. 1998); Reporte über Vorkommen und Funktion in Pflanzen, z.B. <i>Ricinus</i> liegen vor (Szederkenyi et al. 1997)	544	✓	nein, starke diurnale + circadiane (?) Rhythmik	K
1	Calnexin	- ER-lokalisiertes Chaperon (Boston et al. 1996), das vor allem die Faltung von unter Streßbedingungen synthetisierten und zu exportierenden Proteinen unterstützt; in tierischen Zellen mit dem Immunoglobulin-bindenden Protein (BiP, gehört zur HSP70-Familie) assoziiert; zählt, da Proteine über ihre Zuckerreste erkannt werden, wie auch Calreticulin zu den Lectinen; essentiell für Überleben von <i>S. pombe</i> (Jannatipour und Rokeach 1995)	314	(✓)	✓	nein
1+2*	HSP70	- gehören als molekulare Chaperone zur HSP70-Familie; auch in Chloroplasten u. Mitochondrien lokalisiert; hitze- und starklicht-induziert, z.B. Schutz des PSII-Reaktionszentrums während Photoinhibition (Schroda et al. 1999)  * Fusion mit cDNA für SAM-Synthetase bzw. Steaoryl-Coa-Desaturase	Ca. 1000 436 277	(✓) ✓	✓ + gene- rell licht- indu- ziert	K, TR, MV, AC, (SA)
1	HSP80	- gehören zur HSP90-Familie; ubiquitär auch unter normalen Bedingungen exprimiert (Yabe et al.	229	(✓)	✓ + gene- rell	n.d.

		1994)			licht-induziert	
1	14-3-3-ähnliches Protein 9	- 14-3-3's binden phosphorylierte Proteine; Funktion als Adaptor, Chaperon, Aktivator und Repressor beschrieben (Chung et al. 1999); u.a. 10 Isoformen aus <i>A. thaliana</i> bekannt; pathogen-responsiv (→ Aktivierung der Plasmamembran-H <sup>+</sup> -ATPase); neuerdings auch im Zusammenhang mit der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren diskutiert; Report über Vorkommen und mögliche Funktion in Chloroplasten (Sehnke et al. 2000)	327	(✓), -	✓ + generell licht-induziert	nein
<b>Andere redoxaktive Proteine: 3/2</b>						
1+1 (Fusion mit cDNA für Gly-reiches Protein)	Ubichinon-abh. NADH-Dehydrogenase	- Enzym des mitochondrialen Atmungskomplexes I; im Plastiden in zyklischen Elektronentransport und Plastidenatmung im Dunklen involviert; wird durch kleine HSPs vor oxidativen Schäden (z.B. bei Hitzestress) geschützt (Downs und Heckathorn 1998); im Tiermodell durch Anoxie induziert (Cai und Storey 1996)	ca. 950 ca. 800	✓	✓	HL, MV, AC, SA
1	Phytocyanin	- kleine, bläuliche Kupfer-Proteine; vermutlich in Redoxreaktionen während primärer Pathogenabwehr und/oder Ligninsynthese involviert (Nersissian et al. 1998)	354	(✓)	✓	AC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , SA
<b>Proteine mit zellwandmodifizierender Funktion: 44/3</b>						
1	Pro-reiches Protein	- vermutlich (wie auch Hydroxy-Pro- und Gly-reiche Proteine) ZW-Bestandteil; allgemein streßresponsibel (z.B. Trockenstress); vermutlich in ZW-Modifikation bei Verwundung involviert (Yu et al. 1996, Yasuda et al. 1997, Neale et al. 2000)	137	✓	✓	n.d.
42*	(Virus-induzierbares) Gly-reiches Protein	- wahrscheinlich ZW-assoziert; TMV-, ABA, Ethylen-, trocken- und verwundungsstress-induzierbar (sowohl lokal als auch systemisch); ähnlich Pro-reicher Proteine und Extensine an ZW-Modifikation beteiligt (Van Kan et al. 1988, Showalter et al. 1992, Brady et al. 1993, Neale et al. 2000)  * davon zwei Fusionen mit cDNA für HMG-CoA-Red. bzw. NADH-DH, 15 durch Koloniehybridisierung identifiziert	ca. 250 ca. 290 ca. 600 ca. 550 ca. 1000	✓	✓	AC

1	Extensin-ähnliches Protein	- ZW-Proteine; regulieren vermutlich über eigenen intra- und intermolekularen Quervernetzungs-zustand mechanische Eigenschaften der ZW; Isoformen sind entwicklungsabhängig reguliert und werden durch hypoosmotischen Streß, Verwundung und Elicitorbehandlung induziert (Showalter et al. 1992, Cazale et al. 1998)	163	✓	n.d.	n.d.
<b>PR-Proteine, PR-Protein-Ähnliche und Resistenzgene: 62/10</b>						
1	PR-1(a, b oder c)	- Extrazelluläres, saures PR-Protein mit unbekannter Funktion; häufigstes PR-Protein in Tabak; PR-1a, b und c sind zu über 90% identisch miteinander; ozon-, pathogen- und elicitorinduzierbar (Ward et al. 1991, Ryals et al. 1996)	245	✓	✓	n.d.
8	PR-P	- Extrazelluläre, saure Chitinase; 90% identisch mit PR-Q; auch als PR-3 bekannt; induzierbar durch Pathogene, Elicitor- und Ethylenbehandlung (Ryals et al. 1996)	238 - 818	(✓) ✓	✓	n.d.
3	PR-Q	- s. PR-P	369 408 ca. 900	✓	✓	n.d.
1	Thaumatins-ähnliches Protein (PR-R)	- Thaumatins: süß schmeckendes Protein aus der Frucht des westafrikanischen monocotylen Regenwald-Strauches <i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth; Amylase/Proteinase-Inhibitor; ähnlich dem PR-S (PR-5), induzierbar durch TMV-Infektion; antifungale Wirkung (Ryals et al. 1996)	494	✓	✓	n.d.
43* (*davon 24 durch Kolo-niehybridisierung identifiziert)	„Salicylic Acid Responsive“ (SAR) 8.2	- unbekannte Funktion; zählt praktisch zu den PR-Proteinen, da SA-, INA- und TMV-induzierbar; Isoformen SAR 8.2a-1 beschrieben (Alexander et al. 1992); auch in Pyrophosphatase-Überexpressionspflanzen (→ Akkumulation von löslichen Zuckern) differentiell exprimiert (Badur et al. 1994)	ca. 200 - ca. 330	✓	✓	SA, HL, MV, AC, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1	Photoassimilationsresponsives Protein (PAR)-1b	- durch akkumulierende lösliche Zucker (z.B. infolge von Pyrophosphatase-Überexpression) induziertes PR-Protein-ähnliches Protein (Herbers et al. 1995); induzierbar durch SA und in Kartoffel durch PV-Y (lokal und systemisch) - auch andere Isoformen sind nach Lichtshift im Spot-Blot verstärkt	ca. 600	✓	✓	n.d.

1	Proteinase-Inhibitor II	- Expressionsmuster ähnelt oft dem von PR-Proteinen; → (systemisch) induzierbar durch TMV, Verwundung (→Jasmonsäure), ABA, UV, Ethephon (→Ethylen) (Balandin et al. 1995); PI werden auch als Modulatoren des PCD diskutiert (Solomon et al. 1999)	202	✓	✓ + generell licht-induziert	n.d.
1	Ubiquitin-Extensions-Protein	- Vorläufer des durch Proteolyse gebildeten Ubiquitins; durch Hitzeschock in Tabak (Park et al. 1997) und <i>Chlamydomonas</i> reprimiert; nach Salzbehandlung in <i>Aspergillus</i> induziert (Redkar et al. 1996); wird in <i>A. thaliana</i> allerdings auch zu den HSPs gezählt und frühzeitig durch Trockenstreß, in <i>Trypanosoma</i> hingegen durch UV induziert; Überexpression von Polyubiquitin erhöht die Resistenz gegenüber H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Hefe (Cheng et al. 1994)	306	(✓) ✓	✓ + generell licht-induziert	K, TR, MV, (AC)
1	RPP8	-Pathogen-Resistenz- (R)-Gen der NBS-LRR-Klasse („nucleotide-binding site and leucine-rich repeat“); Existenz dieses Locus verleiht in <i>A. thaliana</i> Resistenz gegen <i>Peronospora parasitica</i> (Mehltau) (McDowell et al. 1998, Speulman et al. 1998)	319	(✓)	n.d.	n.d.
1	Resistenz-Gen-Kandidat aus <i>Lactuca sativa</i>  GeneBank Acc.# AF017751	- höchste Homologie des Salat-Resistenz-Gens zu Genen der „nucleotide-binding site and leucine-rich repeat“-Superfamilie; I2C aus Tomate verleiht z.B. Resistenz gegenüber <i>Fusarium oxysporum</i> (Ori et al. 1997)	208 (3'-Bereich)	nein	n.d.	n.d.
<b>Andere Proteine, die im Zusammenhang mit Apoptose, Seneszenz oder Verwundungsstreß beschrieben wurden: 2/2</b>						
1*	„Defender against Cell Death“ (DAD1)  *Fusion mit Aminosäure-Permease	- homolog zur Ost2p-Untereinheit des ER-lokaliserten Oligosaccharyl-Transferase-Komplexes (OST); letal (Apoptose) in DAD1-defizienten Hefen und Hamster-Zelllinien wegen des Ausbleibens von N-Glycosylierung (Gallois et al. 1997, Tanaka et al. 1997, Sanjay und Kreibich 1998)	ca. 1000 (DAD1: 358)	nein	✓	HL, AC
1	Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase (ACO1)	- „Ethylen-bildendes Enzym“; katalysiert den 2. (letzten) Schritt der Ethylenbiosynthese aus SAM; reife-(seneszenz)-spezifische Expression von Isoformen neben der Induktion durch (a)biotische Streßfaktoren, wie z.B. Verwundung, SA, Ethylen, Jasmonat, CuSO <sub>4</sub> (Kim et al. 1998)	303	✓	✓	n.d.

Proteine mit vermuteter Funktion in der Signaltransduktion/ Transkriptionsfaktoren: 15/13						
1	Transkriptionsfaktor Hap5 (NFY-C)	- homolog mit C-Untereinheit des humanen „Nukleären Faktors (NF)-Y“ (NFY-C, auch CBF od. CP1); bindet an die CAATT-Box vieler (auch streß-spezifischer) Promotoren; reguliert z.B. Aktivität des humanen SOS-Gens MDR1 u. des Frosch-hsp70; Hefe-Homologes (Hap5) ist Teil eines Komplexes aus Hap2, 3 und 5; im Genom von <i>A. thaliana</i> multiple Formen von jeder Hap-Untereinheit codiert (Edward et al. 1998); sowohl Zusammenlagerung des heterotrimeren Transkriptionsfaktors als auch DNA-Bindung sind redox-kontrolliert (Nakshatri et al. 1996)	699 Voll-längen-klon:13 20	✓	nein	nein
1	Homeobox-Protein Cux1 (Maus)	- homolog mit hCut/CDP (Mensch; CDP = CCAAT displacement protein), Cut ( <i>D. melanogaster</i> ) und Clox (Kaninchen); Antisense in transgenen Nieren-Zelllinien verursacht Apoptose (Quaggin et al. 1997)	320	✓	nein, starke diurnale + circadiane? Rhythmik	n.d.
1	Befruchtungs-unabhängiges Endospermprotein FIE ( <i>A. thaliana</i> ), GeneBank Acc.# AF129516.1	- gehört zu den WD-Repeat-Proteinen bzw. den Proteinen der Polycomb-Gruppe; zu letzteren zählen z.B. „Extra sex combs“ ESC ( <i>D. melanogaster</i> , Van Lohuizen et al. 1998) und „Embryonic ectoderm development“ EED (Maus); reprimieren zum gegebenen Zeitpunkt nicht benötigte Homeobox-Gene; WD-Repeat-Protein WAIT-1 (Mensch) interagiert mit Integrinen (Rietzler et al. 1998)	474	(✓)	n.d.	n.d.
1	putative Ser/Thr-Protein-Kinase aus <i>Thermonospora curvata</i>	- <i>Thermonospora</i> -Protein enthält ebenfalls WD-Repeats; Funktion und Bedeutung ansonsten unklar (Janda et al. 1996)	109	0	n.d.	n.d.
je 1* *cDNA-Klon für UE 6A Fusion mit cDNA für Rubisco	26S Proteasom-Regulations-Untereinheiten 8 und 6A	- regulatorische Untereinheit p45 des 26S Proteasoms mit ATPase-Aktivität; homolog zum Transkriptionsfaktor Sug1p aus Hefe (Tripl aus Mensch); auch homolog zum humanen HIV-TAT-bindenden TBP1; proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms ist notwendig für das Fortschreiten des Zellzyklus in Hefe (Aliyama et al. 1995, Kitashiba und Toriyama 1997)	ca. 750 (UE 8) ca. 1300 (UE 6A)	(✓) nein	nein n.d.	nein n.d.
2+1*	ADP-Ribosylierungs-	- kleines GTP-bindendes Protein; strukturelle Ähnlichkeiten zu <i>ras</i> -	ca. 600 ca. 950	✓	n.d.	n.d.

*Fusion mit cDNA für cab-6b	faktor	Faktoren (Regad et al. 1993, Sewell und Kahn 1998); Deletion beider bekannter Hefe-Isoformen ist letal; Deletion von ARF1 steigert Kältesensitivität; induzierbar durch Ischemie (Hypoxie) in tierischen Zellen (Katayama et al. 1998)	(Fusion mit cab-6b)	(✓)		
1	Cys2/His2-Zink-Finger Protein aus <i>Petunia</i> ZPT2-9; hoch-homolog mit putativen Proteinen aus <i>A. thaliana</i>	- gehört zur EPF-Familie von ca. 10 verschiedenen. Cys2/His2 Zink-Finger Proteinen mit 2, 3 oder 4 Zinkfingern; binden AGT-Kern-motive der DNA in abstands-spezifischer Weise (Kubo et al. 1998)	170	0	n.d.	n.d.
1	unbekanntes Protein aus <i>A. thaliana</i> GeneBank Acc.# CAA22994	- CAA22994 hat starke Homologie zu humanen Krebsmarkerproteinen und zu Nbr1 aus Maus, welches eine B-Box besitzt und sich in der Nähe von BRCA1 befindet, dessen Funktion aber noch ungeklärt ist (Chambers und Solomon 1996).	409	0	n.d.	n.d.
1	unbekanntes Protein aus <i>A. thaliana</i> GeneBank Acc.# AAC00624	- AAC00624 hat schwache Homologien u.a. sowohl mit dem Transkriptionsfaktor E2F-4 (Maus, Mensch; → Regulation der Zellproliferation, Sardet et al. 1995) als auch mit einem 23kD-Protein des wasser-spaltenden Komplexes des PSII	406	✓	nein	nein
1	unbekanntes Protein aus <i>A. thaliana</i> GeneBank Acc.# AF007269	- AF007269 hat Homologien mit weiteren putativen Proteinen aus <i>A. thaliana</i> aber auch mit einem <i>Myb</i> -verwandtem Transkriptionsfaktor (CCA-1)	198	nein	n.d.	n.d.
1	Protein-Phosphatase 2C (PP2C)	- Genfamilie (mit z.B. 10 Mitgliedern in <i>M. crystallinum</i> ); in ABA-induzierte Signalprozesse involviert; unterschiedliche Reaktion auf Kälte und Trockenheit (je nach Isoform ↑↓); negativer Regulator des MAPK-Weges in Hefe, Tier und Pflanze (Meskiene et al. 1998, Sheen 1998, Neale et al. 2000, Gabbita et al. 2000)	ca. 1100	nein	nein	n.d.
1	Protein B2	- in Karotten-Zellen während der Embryogenese exprimiert; Homologes aus Erbse (GDA-1) induzierbar durch verkürzte Photoperiode und GA (Li et al. 1998)	493	✓	n.d.	n.d.
<b>Proteine mit Funktion bei der post-transkriptionellen Modifikation oder Translation: 10/8</b>						
2	Ribosomales Protein L17	- gehört, wie auch L18 u. L28 zur cytosolischen 60S ribosomalen	183 270	✓ (✓)	n.d.	n.d.

		Untereinheit; besonders die Initiations- und Elongationsfaktoren der ribosomalen Komplexe werden durch Streß (UV, Hitze) sowohl transkriptional als auch post-translational modifiziert (variierender Phosphorylierungszustand) (Mizoguchi et al. 1996, Brosche und Strid 1999, Lee et al. 1999)				
2	Ribosomales Protein L18	s. L17	252 554	(✓), nein ✓	n.d.	n.d.
1	Ribosomales Protein L28	s. L17	475	✓	n.d.	n.d.
1	Ribosomales Protein L37	s. L17	155	nein	n.d.	n.d.
1	Ribosomales Protein L1B	s. L17	280	nein	n.d.	n.d.
1	Ribosomales Protein L15	gehört zur plastidären ( kerncodierten) 50S ribosomalen Untereinheit	ca. 500	✓	n.d.	n.d.
1	Ribosomales Protein L27	s. L15	548	nein	n.d.	n.d.
1	Spliceosom-assoziiertes Protein 145 (SAP145)	- Bestandteil des snRNA-Protein-Komplexes, der die Verzweigungspunkt-Sequenz im Intron bindet (Gozani et al. 1996)	674	✓	n.d.	n.d.
cDNA-Sequenzen ohne Homologe in den Datenbanken bzw. Klone mit nicht auswertbarer Sequenz: 7						
	Klon Nr.					
	663		289	(✓)	nein	n.d.
	1062		?	(✓)	n.d.	
	1303		ca. 1100	(✓)	n.d.	
	1318		ca. 550	✓	n.d.	
	1497		159	(✓)	n.d.	
	1505		227	0	n.d.	
	1822		?	(✓)	n.d.	

Eine sehr interessante Klasse von Genen wurde unter dem Begriff „Komponenten von Signaltransduktions-Kaskaden“ zusammengefaßt, zu denen auch eine Anzahl von putativen Transkriptionsfaktoren gehört. Der relativ große Anteil dieser eher seltenen Transkripte in der cDNA-Bank weist erstens darauf hin, daß die SSH-Methode tatsächlich auch Expressionsunterschiede von schwach exprimierten Genen sichtbar machen kann, und daß zweitens der Zeitpunkt der Probennahme und Konstruktion der cDNA-Bank innerhalb des Zeitrahmens des Lichtshift-Experiments gut gewählt wurde. Offensichtlich ermöglicht die cDNA-Bank durch ihre Zusammensetzung eine Momentaufnahme in einer transkriptionell sehr aktiven Phase, in der sowohl zentrale als auch terminale Komponenten von Signalkaskaden gebildet werden.

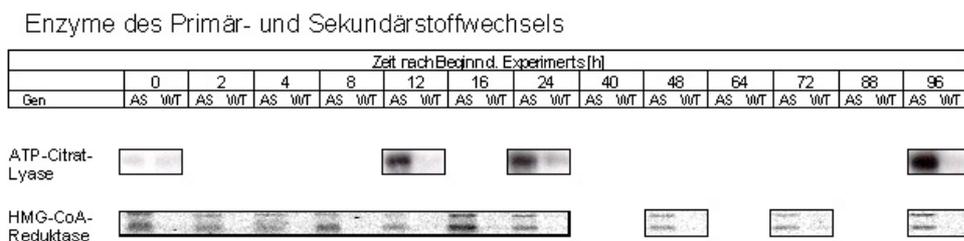
Auch in der Translationsmaschinerie kommt es offenbar zu größeren Umstellungen, was durch die Anzahl von Genen für ribosomale Proteine belegt wird.

Nur 7 aus 72 (bzw. 186) cDNAs verbleiben ohne vorliegende Sequenz- bzw. Homologieinformation. Dies ist ein erfreulich geringer Anteil und spricht einerseits erneut für die SSH-Methode, da hier (im Gegensatz z.B. zur DD-RT-PCR) zentrale und relativ große Abschnitte der cDNAs verfügbar gemacht werden. Andererseits ist dies auch Zeugnis für die inzwischen sehr umfangreichen und ständig aktualisierten Sequenzdatenbanken.

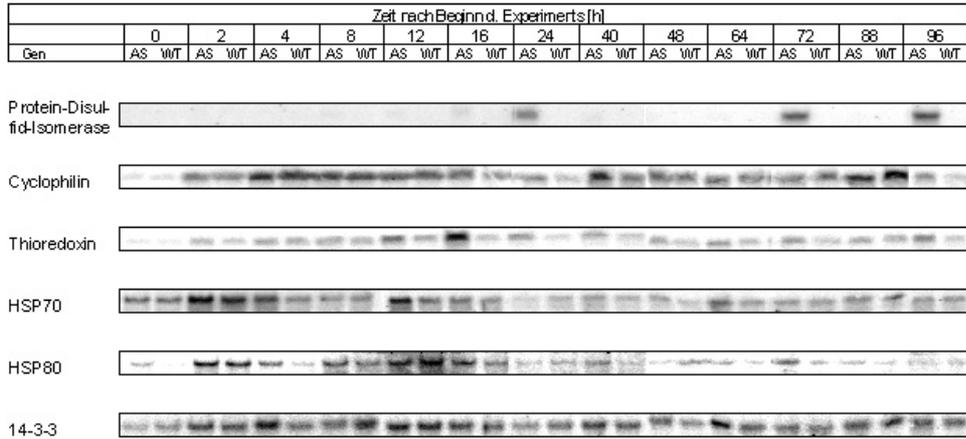
Bemerkenswert ist das Fehlen von Genen in der cDNA-Bank, die für klassische Schutzenzyme wie SOD, APX oder CAT kodieren. Die Induktion solcher Gene war nach den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse an vollständig nekrotischen Pflanzen erwartet worden (s. Abb. 11, Mock et al. 1998). Sehr wahrscheinlich wird die Expression dieser Gene aber erst zu einem späteren Zeitpunkt verstärkt, während die Veränderung der Lichtbedingungen bereits am Anfang des Experiments erhöhte Aktivitäten der Schutzenzyme hervorruft (s. 6.5.2).

### 6.2.2.3 Northern Blot-Analyse ausgewählter, im Lichtshift-Experiment induzierter Gene

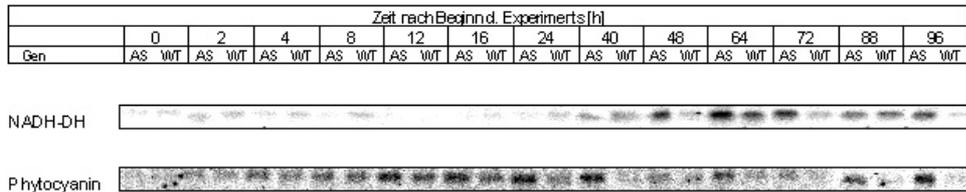
Nachdem die meisten cDNAs aus der subtrahierten Bank im Reversen Northern Blot als differentiell exprimiert bestätigt werden konnten (s. 6.2.2.1.4), sollte durch konventionelle Northern Blot-Analyse a) dieses Ergebnis zusätzlich überprüft und b) die Expression ausgewählter Gene über den gesamten zeitlichen Verlauf des Lichtshift-Experiments untersucht werden. Die Auswertung von 25 aus insgesamt 36 Northern Blots, bei denen cDNA-Fragmente aus der subtrahierten Bank als Sonde Verwendung fanden, erbrachte die Bestätigung der Ergebnisse der Reversen Northern Blots, d.h. sie zeigte, daß das entsprechende Transkript sich tatsächlich in den CPO-AS-Pflanzen im Vergleich zum WT anreicherte. Beginn, Dauer und Grad der sichtbaren Akkumulation von Transkript waren für die untersuchten Gene unterschiedlich (Abb. 23).



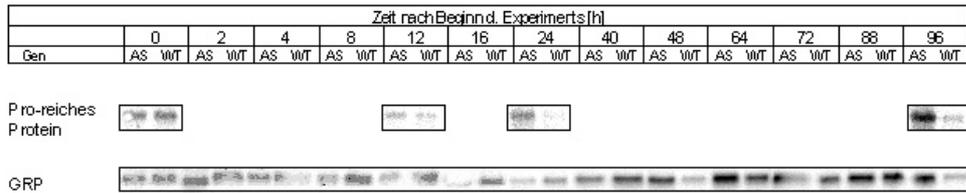
Chaperone, HSP, SH-aktive Proteine



Andere redoxaktive Proteine



Proteine mit ZW-modifizierender Funktion



PR-Proteine und PR-Protein-Ähnliche

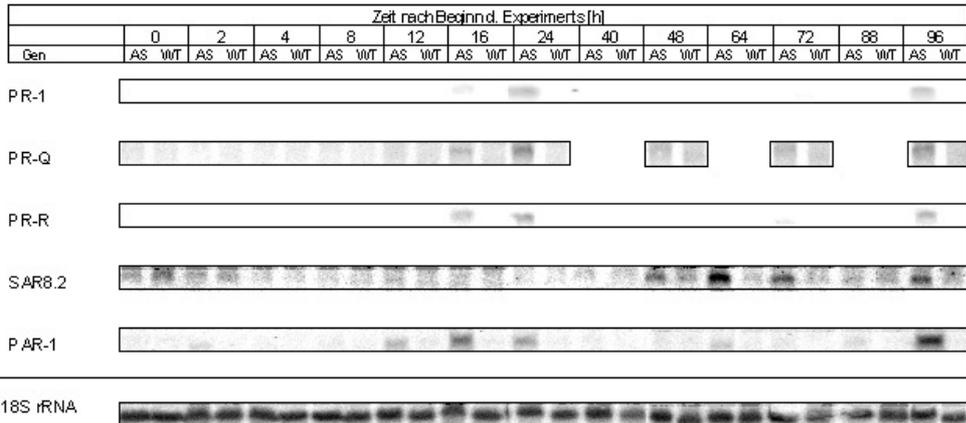


Abb. 23 Northern Blot-Analyse ausgewählter Gene über den Zeitraum des Lichtshift-Experiments (0-96h). Das repräsentative Ergebnis mehrerer Wiederholungen ist gezeigt. Am ersten Tag des Experiments wurden an 6, an den weiteren 3 Tagen jeweils an 2 und am letzten Tag an 1 Zeitpunkt Blattproben genommen. Der Zeitpunkt "0h" bezeichnet den Beginn der Lichtperiode am ersten Tag, an dem die Lichtphase von 6 auf 16 h (bei unveränderten  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) verlängert wurde. Die Zeitpunkte "24", "48", "72" und "96h" entsprechen demzufolge dem Anfang der

Lichtperiode am Tag 2, 3, 4 und 5. Die Zeitpunkte "16", "40", "64" und "88h" sind dementsprechend das jeweilige Ende der Lichtperiode am Tag 1, 2, 3 und 4. In einigen Fällen wurden bei den wiederholt durchgeführten Lichtshift-Experimenten seltener Proben genommen, so daß auf Northern Blots dieser Experimente Zeitpunkte fehlen. Je 10 µg Gesamt-RNA pro Spur (WT bzw. CPO-AS 1/41) wurden elektrophoretisch in formamid/formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt und nach Überführen auf Nylonmembranen mit den angegebenen homologen cDNA-Sonden unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert. Nach stringentem Waschen der Blots (je nach Sonde bis zu 0,1 x SSC bei 65 °C) wurden diese mittels Fuji-Image Plate und Phosphorimager autoradiografisch analysiert. Die Gene sind analog zur Reihenfolge in Tab. 10 und unter den gleichen Oberbegriffen geordnet. Zu den Abkürzungen: 14-3-3: 14-3-3-ähnliches Protein; NADH-DH: NADH-Dehydrogenase; GRP: Gly-reiches Protein; PR: Pathogenesis-related (Protein); SAR: Salicylic Acid Responsive (Protein); PAR: Photoassimilate-responsive (Protein). Alle Blots wurden nach Entfernen der cDNA-Sonden mit einer Sonde für die 18S rRNA hybridisiert, um zu kontrollieren, ob gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden.

Während sich die Transkripte der ATP-Citrat-Lyase als Vertreter der Enzyme des Primär- und Sekundärmetabolismus am Anfang nicht, 12, 24 und 96 h nach Beginn des Lichtshift-Experiments aber stark in den CPO-AS-Pflanzen anhäufen (andere Zeitpunkte wurden bei diesem Beispiel nicht untersucht), beobachtet man bei der HMG-CoA-Reduktase von Anfang an eine unterschiedliche Expression zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen (Abb. 23). Dies spricht dafür, daß die HMG-CoA-Reduktase als Eingangsenzym in den streß-responsiven Isoprenoidstoffwechsel bereits im prä-nekrotischen Zustand der CPO-AS-Pflanzen bei niedriger Lichtdosis aktiviert ist, wohingegen der vermutlich steigende Bedarf und folglich die Bereitstellung von Acetyl-CoA durch die ATP-Citrat-Lyase erst mit Veränderung der Lichtbedingungen Bedeutung erlangt.

Im Hinblick auf die Kinetik der Transkriptakkumulation zeigt sich auch bei den Chaperonen, HSP und thiol-aktiven Proteinen ein uneinheitliches Bild (Abb. 23). Während die RNA der Protein-Disulfid-Isomerase erst durch den im Verlauf des Lichtshift-Experiments wachsenden tetrapyrrol-bedingten oxidativen Streß in den CPO-AS-Pflanzen nachweisbar wird, zeigen die anderen ausgewählten Vertreter dieser Proteingruppe sowohl in WT- als auch in CPO-AS-Pflanzen zu fast allen Zeitpunkten eine sichtbare Transkriptakkumulation. Einige Gene dieser Gruppe sind offenbar licht-induzierbar und reagieren daher vor allem am Tag 1 auf die veränderten Lichtbedingungen mit einer Transkriptanhäufung (Cyclophilin, Thioredoxin, HSP70, HSP80). Ab einem bestimmten Zeitpunkt (Cyclophilin: 40h; Thioredoxin: ab 12h; HSP70: 4, 12, 64h; HSP80: 4, 16, 40, 72h) akkumuliert - auch im Northern Blot sichtbar - mehr Transkript in den CPO-AS-Pflanzen. Da alle diese cDNAs Bestandteil der zum Zeitpunkt „12h“ angelegten, subtrahierten Bank sind und durch Reverse Northern Blots mit komplexen cDNA-Sonden, die diesen Zeitpunkt repräsentieren, als differentiell exprimiert bestätigt werden konnten, sollte für die untersuchten Gene auch zu diesem Zeitpunkt bereits ein (wenn auch nur graduell quantitativer) Unterschied in der Menge der Transkripte zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen bestehen.

Die NADH-Dehydrogenase zeigt erst zu einem relativ späten Zeitpunkt (48h nach Beginn des Experiments) die Anhäufung ihrer Transkripte in den CPO-AS-Pflanzen, und dies wiederholt sich auch einen (72h) und zwei Tage später (96h). Der zu diesen Zeitpunkten jeweils am Beginn der Lichtperiode deutliche Unterschied in der mRNA-Akkumulation verliert sich dabei im Verlauf der Lichtphase und ist nach 64 bzw. 88h praktisch nicht mehr sichtbar (Abb. 23). Der erhöhte Bedarf an Transkript für diese Komponente des mitochondrialen Atmungskomplexes I, der Plastidenatmung und des zyklischen Elektronentransportes in den Chloroplasten legt nahe, daß sowohl der mitochondriale als auch der plastidäre Energiestoffwechsel in den photosensibilisierten Pflanzen eine wichtige Rolle spielen. Die mRNA für das Phycocyanin als zweitem untersuchtem redoxaktivem Protein akkumuliert während der ersten Lichtphase, wobei in den CPO-AS-Pflanzen ab 12h nach Beginn des Experiments mehr Transkript nachweisbar ist.

Die differentielle Expression der zwei analysierten Gene für ZW-modifizierende Proteine (Pro- bzw. Gly-reiches Protein (GRP), Abb. 23) läßt sich erst am 2. bzw. 3. Tag des Lichtshift-Experiments im Northern Blot nachweisen. Dies läßt eine Assoziation mit dem Auftreten der Blattläsionen vermuten, die sich im gleichen Zeitraum entwickeln.

Während die mRNA für die PR-Proteine 1, Q und R sowie das Photoassimilat-responsive Protein (PAR) 1 bereits während der ersten verlängerten Lichtphase verstärkt in den CPO-AS-Pflanzen sichtbar wird (Abb. 23), läßt sich dies für das Salicylsäure-responsive Protein (SAR8.2) erst zu einem Zeitpunkt feststellen, an dem die Ausbildung von Nekrosen praktisch ihren Höhepunkt erreicht (48h). Da alle diese Gene SA-induzierbar sind, ist die Reaktionskinetik auf erhöhte SA-Gehalte (s. auch Abb. 43) offensichtlich unterschiedlich. Die zeitlichen Expressionsmuster von PR-1 und PR-R sind allerdings sehr ähnlich zueinander.

Die Northern Blots, mit denen die differentielle Expression von putativen Faktoren der Signaltransduktion, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, untersucht wurde, lieferten bei ihrer Wiederholung für mehrere Lichtshift-Experimente keine reproduzierbaren Ergebnisse, was vor allem auf die (trotz vermuteter Induktion) wahrscheinlich niedrige Transkripthäufigkeit zurückzuführen ist. Die für die Reversen Northern Blots verwendeten FS- bzw. RS-Sonden, mit denen die differentielle Expression dieser Gene gezeigt wurde, eliminieren das Problem der geringen Abundanz von Transkripten in der Gesamt-mRNA (s. 5.7.4, 6.2.2.1.4).

#### *6.2.2.4 Northern Blot-Analyse der Expression von Genen des antioxidativen Schutzsystems im Lichtshift-Experiment*

Zusätzlich wurde auch die Kinetik der Expression von ausgewählten klassischen antioxidativen Schutzenzymen im Northern Blot untersucht, die nicht Bestandteil der subtrahierten cDNA-

Bank sind (Abb. 24). Diese Sonden für verschieden Isoformen der SOD und der Catalase sowie der APX, die bereits bei der Analyse von porphyrischen Pflanzen mit ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp eingesetzt wurden (s. Abb. 11, Kruse et al. 1995b), stammen aus dem Labor von Dirk Inzé an der Universität Gent.

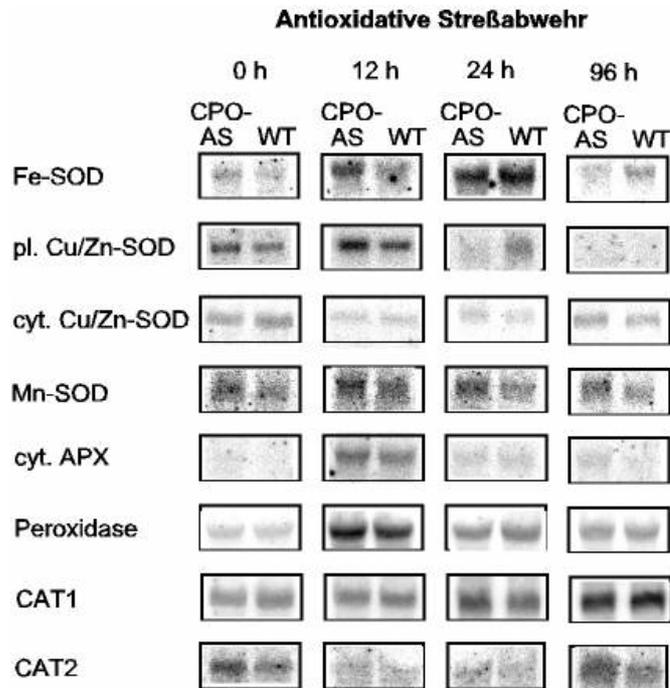


Abb. 24 Northern Blot-Analyse von Genen der antioxidativen Schutzenzyme Fe-SOD, plastidären bzw. cytosolischen Cu/Zn-SOD, mitochondrialen Mn-SOD, cytosolischen APX, einer Peroxidase mit breiter Substratspezifität (keine APX) und zweier Catalase-Isoformen während des Lichtshift-Experiments. Die vier dargestellten Zeitpunkte entsprechen dem Beginn des Lichtshift-Experiments (0h), dem Zeitpunkt der Probennahme für die Konstruktion der subtrahierten cDNA-Bank (12h) und dem Beginn der Lichtphase am 2. bzw. 5. Tag des Lichtshift-Experiments (24 bzw. 96h), an dem die sichtbare Bildung von Nekrosen an den Blättern der CPO-AS-Pflanzen (Linie 1/41) gerade beginnt bzw. abgeschlossen ist. Die methodischen Einzelheiten entsprechen den Angaben aus Abb. 23. Die Sonden wurden freundlicherweise von D. Inzé (Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Während sich die mRNA der plastidären Cu/Zn-SOD, der mitochondrialen Mn-SOD, der APX und der Peroxidase während des Lichtshift-Experiments sowohl in WT- als auch in CPO-AS-Pflanzen transient anreicherte, konnte für die cytosolische Cu/Zn-SOD praktisch keine Veränderung im Transkript-Niveau beobachtet werden. Die mRNA-Menge für die CAT1 nimmt hingegen über den untersuchten Zeitraum in beiden Pflanzenpopulationen konstant zu. Dieses Verhalten scheint die allgemeine Reaktionen auf die veränderten Lichtbedingungen zu repräsentieren. Eine zu bestimmten Zeitpunkten für WT- und CPO-AS-Pflanzen unterschiedliche Expression konnte allerdings für die plastidäre Fe-SOD und die CAT2 nachgewiesen werden. Dabei könnte das sehr frühe (0h) bzw. späte (96h) Auftreten der differentiellen Expression der CAT2 das Fehlen dieses Gens in der zum Zeitpunkt „12h“

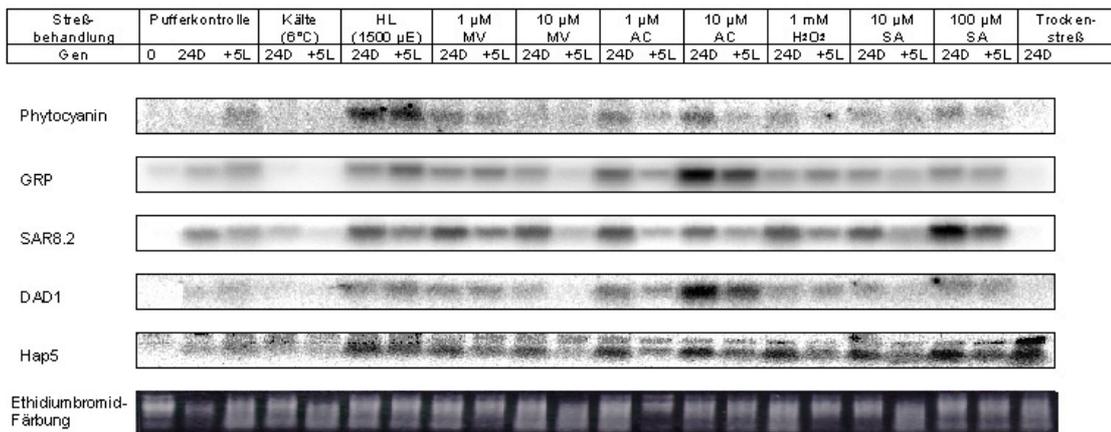
angelegten subtrahierten Bank erklären. Die mRNA-Mengen der plastidären Fe-SOD sind aber 12h nach Beginn des Lichtshift-Experiments so unterschiedlich, daß die mit Blattproben von diesem Zeitpunkt durchgeführte SSH die Isolation der entsprechenden cDNA hätte ermöglichen sollen. Dieses Beispiel zeigt, daß die in Tab. 10 zusammengefaßten Gene wahrscheinlich nur einen Ausschnitt der als Reaktion auf Photosensibilisierung aktivierten Genexpression darstellen.

#### 6.2.2.5 Northern Blot-Analyse ausgewählter Gene aus der subtrahierten cDNA-Bank unter dem Einfluß anderer Stressoren

Ausgewählte Vertreter der durch tetrapyrrol-bedingten oxidativen Streß induzierten Gene sollten auf ihr Expressionsverhalten unter dem Einfluß anderer Streßfaktoren hin untersucht werden. Dazu wurden Blattscheiben von WT-Pflanzen z.B. dem Einfluß von Herbiziden, Kälte oder hoher Lichtintensität ausgesetzt (s. 5.5). Northern Blots von RNA aus diesen Versuchen wurden mit aus der subtrahierten cDNA-Bank stammenden markierten Sonden hybridisiert, um Aussagen über die unter Streß allgemeingültige Bedeutung einzelner Gene zu treffen.

Für alle 10 ausgewählten Gene läßt sich aus dem Northern Blot die induzierbare Expression unter dem Einfluß unterschiedlicher Stressoren ableiten. Die Pufferkontrolle zeigt, daß wahrscheinlich als Folge der Verwundung für die meisten untersuchten Gene nach mehreren Stunden Inkubation ebenfalls das entsprechende Transkript akkumuliert (Abb. 25).

#### Streßexperiment I



## Streßexperiment II

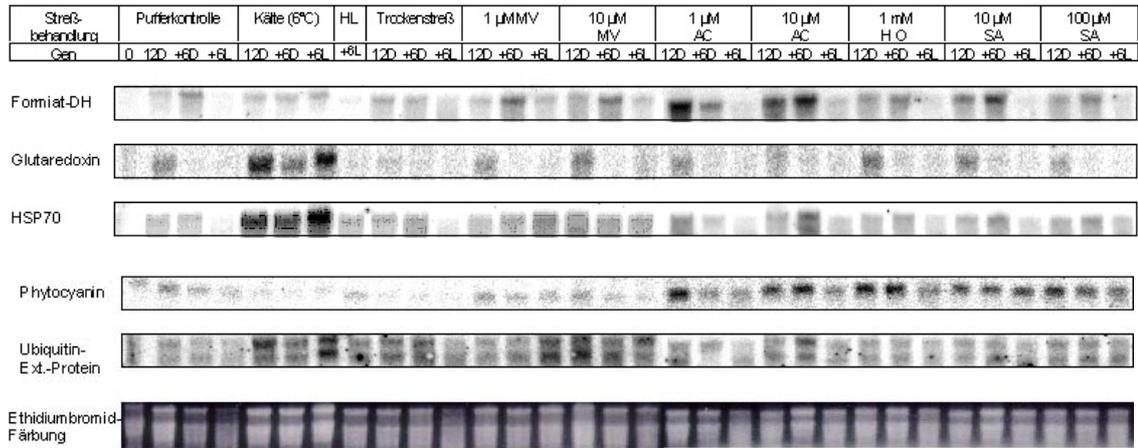


Abb. 25 Northern Blot-Analyse ausgewählter Gene (GRP: Gly-reiches Protein; SAR8.2: Salicylic Acid Responsive; DAD1: Defender Against Cell Death; Hap5: Heme Activated Protein; Formiat-DH: Formiat-Dehydrogenase; Ubiquitin-Extensions-Protein) unter dem Einfluß unterschiedlicher Stressoren. Die cDNA-Sonden stammen aus der subtrahierten Bank (s. Tab. 10). Blattscheiben von 8 Wochen alten WT-Pflanzen wurden zu Beginn (Experiment I) bzw. zum Ende der Lichtphase (Experiment II) im Gewächshaus ausgestochen und für die angegebenen Zeiten auf 10 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) mit folgenden Zusätzen inkubiert: 1 bzw. 10 µM Methylviologen (MV); 1 bzw. 10 µM Acifluorfen (AC); 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10 bzw. 100 µM Salicylsäure (SA). Die Starklichtbehandlung erfolgte bei 1500 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, die Kältebehandlung bei 6°C, und beim Trockenstreßversuch wurden die Blattscheiben ohne Puffer inkubiert. Im **Streßexperiment I** wurden die Blattscheiben nach 24h Dunkel- (24D) sowie nach weiteren 5h Lichtinkubation (+5L; 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) eingefroren. Im **Streßexperiment II** schloß sich einer Inkubation von 12h im Dunkeln (12D) entweder ein um 6h verlängertes Verweilen im Dunkeln (+6D) oder im Licht an (+6L; 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), bevor die Blattscheiben ebenfalls in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren wurden. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt 0h, d.h. beim Ausstechen der Blattscheiben, Proben als Kontrolle gewonnen. Je 10 µg der aus den Blattscheiben gewonnenen Gesamt-RNA wurden pro Spur auf formamid/formaldehydhaltige Agarose-Gele aufgetragen und diese elektrophoretisch getrennt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Gelspuren wurde die RNA in den Gelen mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Blotting, Hybridisieren und Waschen entsprach den Angaben aus Abb. 23. Zu weiteren experimentellen Details s. Abschnitt 5.5.

Kältebehandlung hat nur bei den Genen für Grx, HSP70 und das Ubiquitin-Extensions-Protein eine induzierende Wirkung. Allen drei Proteinen wird eine Funktion unter extremen Temperaturbedingungen zugeschrieben (s. auch Tab. 10).

Die Starklichtbehandlung führt vor allem beim Phytoeyanin zur Akkumulation des Transkripts. Da diese aber schon (wie auch beim GRP, SAR und Hap) bei der Dunkel(vor)inkubationsphase sichtbar ist, scheint hier eine Überlagerung von Verwundungs- und HL-Effekt vorzuliegen. Die Expression von Phytoeyanin ist als pathogen- und daher wahrscheinlich auch verwundungs-induzierbar beschrieben worden (s. auch Tab. 10).

Trockenstreß führt unter den Bedingungen des Experiments I nur beim Transkriptionsfaktor Hap5 zur verstärkten Expression, während im Experiment II nur das Ubiquitin-Extensions-Protein mit Transkriptakkumulation reagierte. Beide Gene sind allgemein als streß-responsiv

beschrieben. Beim Hap5 ist nicht bekannt, wie viele Isoformen in Tabak existieren (Genfamilie bei *A. thaliana*) und ob die verwendete Sonde möglicherweise mit anderen Hap-Transkripten kreuzreagiert (s. auch Tab. 10).

Das Herbizid Methylviologen, daß vor allem im Licht zur vermehrten Bildung von Superoxid am PS I und bereits im Dunkeln in den Mitochondrien führt, zeigt vor allem bei der Expression von SAR, HAP, Formiat-Dehydrogenase und Grx sowie bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auch beim Ubiquitin-Extensions-Protein Wirkung. Dabei werden die jeweils größten Transkriptmengen am Ende der Dunkelinkubation beobachtet. Dies bedeutet, daß bereits vor Eintritt der lichtabhängigen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion die Gene von Schutz- und Abwehrenzymen aktiviert werden.

Für fast alle analysierten Gene wird eine starke Expression in Anwesenheit des Herbizids Acifluorfen beobachtet. Dieser Inhibitor der PPO vom Diphenylether-Typ der 2. Generation (s. 3.1.1.1, 3.4.3) bewirkt die Akkumulation und Autoxidation von Protoporphyrinogen, dessen oxidierte Form ebenfalls ein potenter Photosensibilisator ist (Böger und Wakabayashi 1995, Wakabayashi und Böger 1999). Deshalb ist der Einsatz dieses Hemmstoffes direkt mit den Auswirkungen des Lichtshift-Experiments vergleichbar. Es ist interessant, daß auch hier die stärkste Akkumulation der Transkripte bereits während der Dunkelinkubation erfolgt, d.h. bevor der eigentliche photodynamische Schaden entsteht.

Wasserstoffperoxid induziert vor allem die Expression der Gene SAR8.2, Hap5, Grx und Phytocyanin. Da  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion von Infektionsereignissen zugeschrieben wird (s. 3.2.1) überrascht der Einfluß auf die Transkriptmengen dieser pathogen- bzw. verwundungs-responsiven Gene nicht. Grx-defiziente Hefe-Mutanten sind z.B. hypersensitiv gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  (s. Tab. 10). Die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgelösten zellulären Redoxverschiebungen wirken direkt auf die DNA-Bindeeigenschaften des Transkriptionsfaktors HAP5 (s. Tab. 10), so daß vermutet werden könnte, daß auch die Transkriptmenge in Abhängigkeit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reguliert wird.

Erwartungsgemäß wird die Expression des bereits als „Salicylsäure-responsiv“ beschriebenen Proteins 8.2 durch Salicylsäure positiv beeinflusst. Aber auch DAD1, Hap5 und die Gene für Formiat-Dehydrogenase, Glutaredoxin und Phytocyanin reagieren auf die Applikation dieser als Signaltransmitter bei der Ausprägung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) bedeutenden Substanz (s. 3.2.2). Diese SA-abhängige Induktion der getesteten Gene aus der subtrahierten cDNA-Bank läßt sich sehr gut mit dem meßbaren Anstieg von Salicylsäure während des Lichtshift-Experiments vereinbaren (s. 6.5.3.1).

Insgesamt zeigen diese Versuche, daß viele der in der photosensibilisierungsspezifischen, subtrahierten cDNA-Bank zusammengefaßten Gene auch auf andere Streßfaktoren mit der

Verstärkung ihrer Expression reagieren. Das gewählte Modellsystem der porphyrischen Pflanzen unter veränderlichen Lichtbedingungen war daher bei der Identifizierung von Genen erfolgreich, die generell als streß-responsiv zu bezeichnen sind.

### 6.3 Untersuchungen zum Gly-reichen Protein (GRP) und Charakterisierung von GRP-AS-Pflanzen

Die cDNAs für dieses Protein waren einerseits sehr zahlreich in der subtrahierten Bank vertreten (s. 6.2.2.1.2), und andererseits war nur wenig zur Funktion dieses als virus-induzierbar beschriebenen Proteins bekannt (Van Kan et al. 1988, Showalter et al. 1992, Brady et al. 1993) Zusätzlich zu den in Abschnitt 6.2.2.5 beschriebenen Analysen zur Streßinduzierbarkeit wurde auch die Transkriptakkumulation in den unterschiedlichen Pflanzenorganen und zu verschiedenen Tageszeiten untersucht. Dazu wurde die vorliegende cDNA als Sonde in Northern Blot-Analysen an WT-Pflanzen eingesetzt (Abb. 26 - Abb. 28).

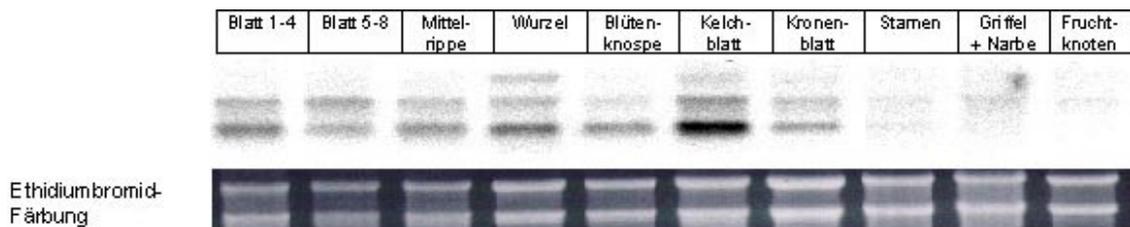


Abb. 26 Northern Blot-Analyse der Expression des Gly-reichen Proteins (GRP) in unterschiedlichen Organen von WT-Tabakpflanzen. Je 10 µg Gesamt-RNA aus den in der Mitte der Lichtperiode geernteten Organen von acht (Blätter 1-4, 5-8, Mittelrippe, Wurzel) bzw. zwölf Wochen alten Tabakpflanzen (alle übrigen Organe), die unter Gewächshausbedingungen angezogen worden waren, wurden elektrophoretisch in formamid/formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nylonmembranen wurde mit einem 297 bp langen und radioaktiv markierten cDNA-Fragment von GRP unter hoch-stringenten Bedingungen hybridisiert und die Filter anschließend gewaschen. Die autoradiografische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels mit RNA diente die Färbung mit Ethidiumbromid (s. auch 5.7.2).

GRP-Transkripte konnten in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Abb. 26). Nur in den Stamina, Griffeln und Narben sowie den Fruchtknoten war die detektierbare Transkriptmenge sehr gering. Offenbar hybridisierte die verwendete Sonde mit mehreren (2-3) Isoformen von GRP, da Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht erkennbar waren. Dabei war die Bande, die dem niedrigsten Molekulargewicht entsprach, diejenige mit dem stärksten Hybridisierungssignal, weswegen es sich bei den anderen Banden auch um Splicing-Zwischenprodukte handeln könnte.

Die Feinanalyse der Expression von GRP in den Blättern ergab eine Transkriptakkumulation vor allem in den jungen (Blatt 1-9) und wahrscheinlich auch in den ältesten Blättern (ab Blatt 15), wohingegen die nachweisbaren Transkriptmengen in den Blättern 10-14 geringer waren (Abb. 27).

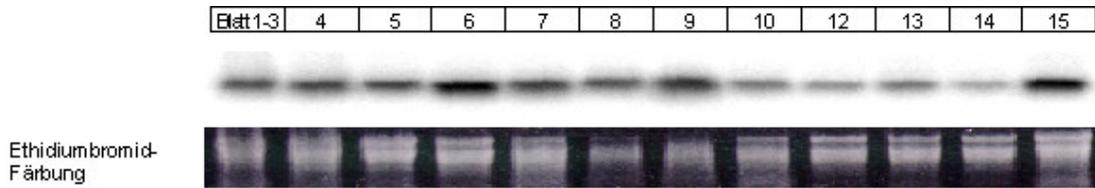


Abb. 27 Northern Blot-Analyse der Expression des Gly-reichen Proteins (GRP) in unterschiedlich alten Blättern von WT-Tabakpflanzen. Die Position der Blätter beim Zählen von der Spitze zur Basis ist angegeben. Die Proben wurden in der Mitte der Lichtperiode von Pflanzen geerntet, die seit acht Wochen unter Gewächshausbedingungen gewachsen waren. Weitere technische Details in der Legende zur Abb. 26.

Die Untersuchung zur Akkumulation von GRP-Transkript im Licht/Dunkelrhythmus ergab Hinweise, daß sich die Menge von GRP-mRNA zum Ende der Dunkelperiode verringert und innerhalb der ersten Hälfte der Lichtperiode wieder auf das Normalniveau ansteigt (Abb. 28). Für eine detaillierte Aussage zum diurnalen Rhythmus sind aber weitere Analysen nötig, die eine größere Anzahl von Zeitpunkten umfassen.

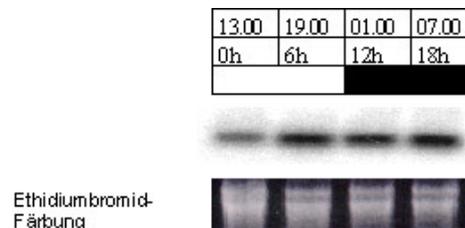


Abb. 28 Northern Blot-Analyse der Expression des Gly-reichen Proteins (GRP) zu unterschiedlichen Tageszeiten im fünfjüngsten Blatt von WT-Tabakpflanzen. Die Pflanzen wurden für acht Wochen in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen angezogen (13.00-01.00 Uhr (12h):  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durchgehend  $25^\circ\text{C}$ , 70% rel. Luftfeuchte). Die Proben wurden zu Beginn (0h), in der Mitte (6h) und zum Ende der Lichtperiode (12h) sowie in der Mitte der Dunkelperiode (18h) gewonnen. Weitere technische Details in der Legende zur Abb. 26.

Um Hinweise auf die Funktion des GRP zu erhalten, wurden transgene Pflanzen erzeugt, die das cDNA-Fragment für GRP in Antisense-Orientierung enthalten (s. 5.7.8, 5.7.9). Die Primärtransformanten und  $F_1$ -Nachkommen ausgewählter transgener Individuen unterschieden sich phänotypisch nicht von den WT-Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Die PCR-Analyse der genomischen DNA von Primärtransformanten unter Einsatz des 35S-Promoter- und des 288AS-Primers zeigte, daß 98 der untersuchten 110 Primärtransformanten tatsächlich transgen waren,

da entsprechende Fragmente amplifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden 13 Individuen für eine Northern Blot-Analyse ausgewählt, um den Einfluß des Antisense-Konstruktes auf das GRP-Expressionsniveau zu untersuchen (Abb. 29). Auch in den WT-Pflanzen gab es deutliche Unterschiede in der Menge an GRP-Transkript, die z.T. ebenso groß waren, wie zwischen den GRP-AS- und WT-Pflanzen. Nur die GRP-AS-Pflanze 27 wies weniger Transkript auf als die drei WT-Kontrollen. Da das GRP-cDNA-Fragment im zur Transformation eingesetzten Antisense-Konstrukt fast die volle Länge des endogenen Sense-Transkriptes hat, und bei der Hybridisierung keine strangspezifische Sonde eingesetzt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich hinter den starken Hybridisierungssignalen in den GRP-AS-Pflanzen 47 und 52 auch Antisense-RNA verbirgt.

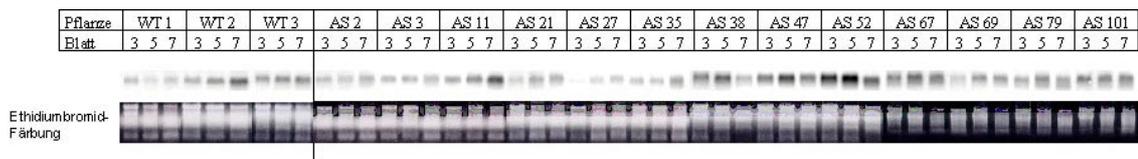


Abb. 29 Northern Blot-Analyse der Expression des Gly-reichen Proteins (GRP) in den Blättern 3, 5 und 7 (gezählt von der Spitze in Richtung Basis) von 3 WT-Pflanzen und 13 ausgewählten Primärtransformanten, die mit einem GRP-AS-Konstrukt transformiert sind (s. 5.7.8, 5.7.9). Von den Pflanzen, die für 6 Wochen unter Gewächshausbedingungen angezogen worden waren, wurden in der Mitte der Lichtperiode Blattproben genommen und Gesamt-RNA präpariert. Weitere technische Details in der Legende zur Abb. 26.

Für die vier ausgewählten GRP-AS-Pflanzen 21, 27, 35 und 52 wurde in einer Southern Blot-Analyse versucht, die Anzahl der Transgen-Kopien zu ermitteln. Das Ergebnis der Hybridisierung von mit Xba I bzw. Hind III fragmentierter genomischer DNA zeigte, daß in den WT-Pflanzen zwischen 4 und 8 Genkopien und/oder Isoformen existieren (Abb. 30).

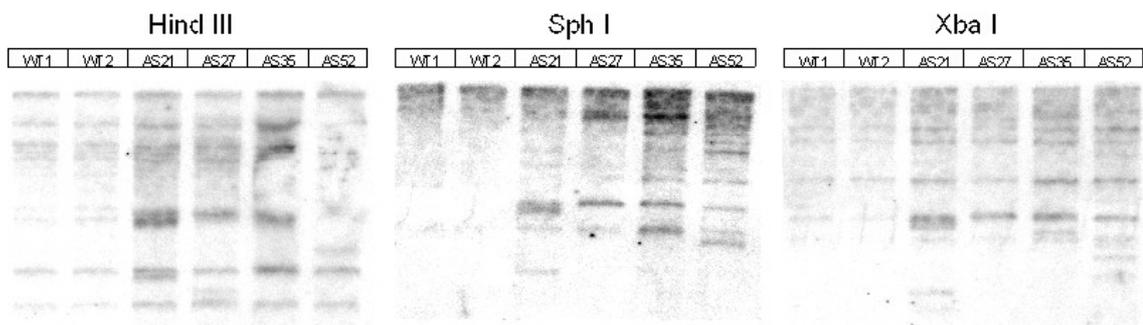


Abb. 30 Southern Blot-Analyse der DNA von zwei WT-Pflanzen und von vier GRP-AS-Primärtransformanten. Je 10 µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen Hind III, Sph I bzw. Xba I vollständig fragmentiert und die Fragmente anschließend in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer und Fixierung der DNA auf Nylonmembranen wurden diese unter stringenten Bedingungen mit einer radioaktiv markierten GRP-Sonde hybridisiert und gewaschen. Weitere Angaben in 5.7.2.

Die GRP-AS-Pflanzen wiesen zusätzliche Hybridisierungsbanden in allen drei Telexperimenten auf (Hind III, Sph I und Xba I), wobei die Bestimmung einer genauen Anzahl von Transgenen nicht möglich ist. Der Southern Blot bestätigte jedoch, daß die vier ausgewählten Pflanzen das GRP-AS-Konstrukt tragen.

Zusammengefaßt ergab die Analyse der Expression von GRP in Tabakpflanzen folgende Ergebnisse:

GRP wird in allen untersuchten Organen exprimiert, wobei die Expression in den reproduktiven Organen (Stempel, Stamina) sehr niedrig ist. Die größeren Transkriptmengen sind vor allem in jüngeren Blättern nachweisbar, in denen es zum Ende der Dunkelperiode hin zu einem Absinken des GRP-mRNA-Gehaltes kommt. Transgene Pflanzen, in deren Genom GRP-AS-Konstrukte integriert sind, weisen unter normalen Umweltbedingungen keinerlei Unterschiede zu WT-Pflanzen auf. Mit der eingesetzten cDNA-Sonde konnte nur in einem Fall eine im Vergleich zu WT-Pflanzen verringerte Transkriptmenge festgestellt werden. Weitere Analysen unter Bedingungen, bei denen die Pflanzen gezielt Stressoren ausgesetzt werden, könnten Hinweise auf die Funktion der GRP-Isoformen geben. In Experimenten mit Blattscheiben wurde bereits gezeigt, daß die Expression von GRP unter dem Einfluß von Umweltstreß ansteigt (s. 6.2.2.5).

#### **6.4 Alternativer Ansatz zur Isolation von pflanzlichen Genen, die Streßtoleranz bzw. -resistenz vermitteln**

In einem Nebenprojekt der Arbeit wurde versucht, Gene aus *A. thaliana* zu identifizieren, die durch ihre Expression in *S. cerevisiae* Toleranz bzw. Resistenz gegenüber chemisch induziertem oxidativen Streß verleihen (s. 5.7.11). Dies setzte voraus, daß die pflanzliche cDNA auch in den Hefezellen in aktiver Form exprimiert wird. Der WT-Stamm YPH250 von *S. cerevisiae* wurde dazu mit einer im Hefe-Expressionsvektor pFL61 klonierten cDNA-Bank aus *A. thaliana* (Minet et al.1992) transformiert. Bei der anschließenden Suche nach Transformanten mit gesteigerter Toleranz gegenüber chemisch erzeugtem oxidativen Streß kamen mehrere Oxidationsmittel zur Anwendung, u.a. das Vitamin K-Derivat Menadion, das zur vermehrten Bildung von Superoxid beiträgt. Die Selektion von Transformanten-Kolonien, die sich tolerant gegenüber ansonsten letalen Dosen von Menadion im Medium zeigten, waren ein erster Schritt hin zur Isolation einer Transformante, deren Plasmid auch nach Isolation und Re-Transformation in andere YPH250-Zellen diese neue Eigenschaft vermittelte (Abb. 31). In semiquantitativen Tests konnte gezeigt werden, daß die Transformante in hoher Zelldichte im

Gegensatz zur WT-Form des Stamms YPH250 120  $\mu\text{M}$  Menadion toleriert. Die Sequenzierung des cDNA-Inserts ergab eindeutige Homologien mit einer Pectinacetyl-Transferase (Breton et al. 1996). Es wird darüber spekuliert, daß die Funktion dieser Isoform des Enzyms darin besteht, die Fähigkeit der Zusammenlagerung der Acetyl-Seitenketten des Homogalacturonan-Rückrades der pflanzlichen Zellwand zu beschneiden, was zu einer Einschränkung der Flexibilität führt, da die Galacturonan-Ketten dann selbst verstärkt aggregieren können (Breton et al. 1996). Für die pilzliche Zellwand könnten aus der massiven Überexpression des Enzyms ebenfalls Einflüsse auf die Struktur resultieren, die diese, vor allem im dichten Zellverband, undurchlässiger gegenüber Xenobiotika macht. Dies könnte erklären, warum die Transformanten im Titrationsversuch nur in sehr dichten Zellhaufen in der Lage sind, die Menadion-Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  zu tolerieren (Abb. 31).

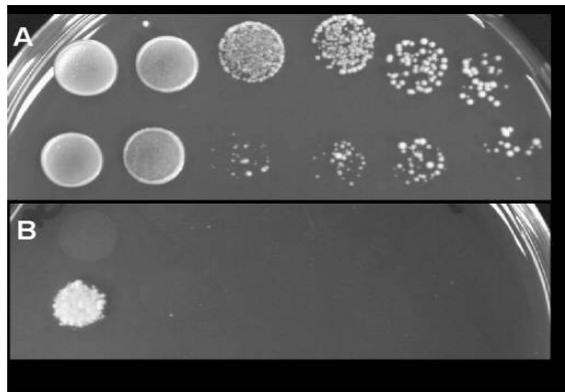


Abb. 31 Ergebnis der Komplementationsversuche von Hefezellen mit einer cDNA-Bank aus *A. thaliana*. Das Wachstum des mit dem leeren Plasmid pFL61 transformierten Stamms YPH250 (jeweils obere Reihe) und des transformierten Stamms #3, bei dem das Plasmid die cDNA für eine Pectinacetyl-Esterase beinhaltet (jeweils untere Reihe) wurde auf unterschiedlichen Medien getestet: **A**) Minimalmedium (YNB + Glc – Uracil) und **B**) gleiches Minimalmedium mit 120  $\mu\text{M}$  Menadion. Dieses Vitamin K-Derivat führt zur verstärkten Produktion von Superoxid. Die Flüssigkulturen beider Stämme in der frühen stationären Phase wurden nach photometrischer Bestimmung bei 600 nm durch die Zugabe von Medium auf gleiche Zelldichte eingestellt und anschließend mit sterilem Wasser schrittweise 1:10 verdünnt. Je 20  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen, die ca.  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  ... 10 Zellen enthielten, wurden auf festes Minimalmedium getropft und die Petrischalen anschließend für 84 h bei 30°C inkubiert. Nur die Transformante #3 ist in der Lage, auch in Anwesenheit von erhöhten Menadionkonzentrationen zu wachsen.

Dieses Projekt wurde wegen des wachsenden Arbeitsaufwandes und steigenden Erfolgs der parallel unternommenen Konstruktion und Analyse einer subtrahierten cDNA-Bank mittels SSH aufgegeben. Mit dem Hefe-Komplementationsansatz wäre auch die Konzentration auf frühe Zeitpunkte von Streß schwieriger zu bewerkstelligen gewesen.

## 6.5 Ergebnisse der begleitenden biochemischen Analyse während des Lichtshift-Experiments

Neben der Analyse der Kinetik der Transkriptakkumulation für die durch subtraktive Hybridisierung identifizierten Gene, standen biochemische Untersuchungen vor allem hinsichtlich der antioxidativen Schutzsysteme im Mittelpunkt der Arbeiten mit dem Lichtshift-System. Aber auch andere Parameter wie die Gehalte von Chlorophyll, Carotinoiden und phenolischer Verbindungen wurden in quantitativen Tests bestimmt.

### 6.5.1 Veränderungen von Chlorophyll- und Carotinoidgehalt

Sowohl UROD- als auch CPO-AS-Pflanzen mit ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp unterscheiden sich hinsichtlich ihres Chlorophyllgehaltes in den Blättern nur unwesentlich von WT-Pflanzen (s. 6.1.1, Kruse et al. 1995b, Mock und Grimm 1997). Die Resultate der Untersuchung von Blattproben, die während des Lichtshift-Experiments gewonnen wurden, bestätigten dieses Ergebnis (Abb. 32). Hier wurden in den transgenen Pflanzen teilweise größere Chlorophyllmengen bestimmt, als in den WT-Pflanzen. Der allgemeine Eindruck, daß die Blätter durch die verlängerten Lichtphasen dunkelgrün wurden, während sie vorher unter dem Einfluß der Kurztagbedingungen eher hellgrün waren, läßt sich offenbar mit der Zunahme der Blattdicke erklären, da nur der Gesamt-Chlorophyllgehalt pro Blattfläche innerhalb der ersten drei Tage von ca. 130 auf 160-200 mg m<sup>-2</sup> anstieg, der auf Frischgewicht bezogene Wert hingegen keine klare Tendenz aufwies. Vielmehr beobachtet man hier Schwankungen in den Werten, die vor allem auf die relative Inhomogenität des Probenmaterials hinweisen, die auch durch den Modus der Probennahme nicht ausgeschlossen werden konnte (s. auch 5.4.2, 6.2.2.3). Nach drei Tagen schien die Anpassung der Blattmorphologie an die veränderten Lichtbedingungen abgeschlossen zu sein, da der auf Blattfläche berechnete Chlorophyllgehalt eine Art Plateau erreichte.

Das Chlorophyll a/b-Verhältnis blieb im Verlauf des Lichtshift-Experiments relativ unverändert, lag aber in den CPO-AS-Pflanzen vor allem ab dem 2. Tag höher als in den WT-Pflanzen.

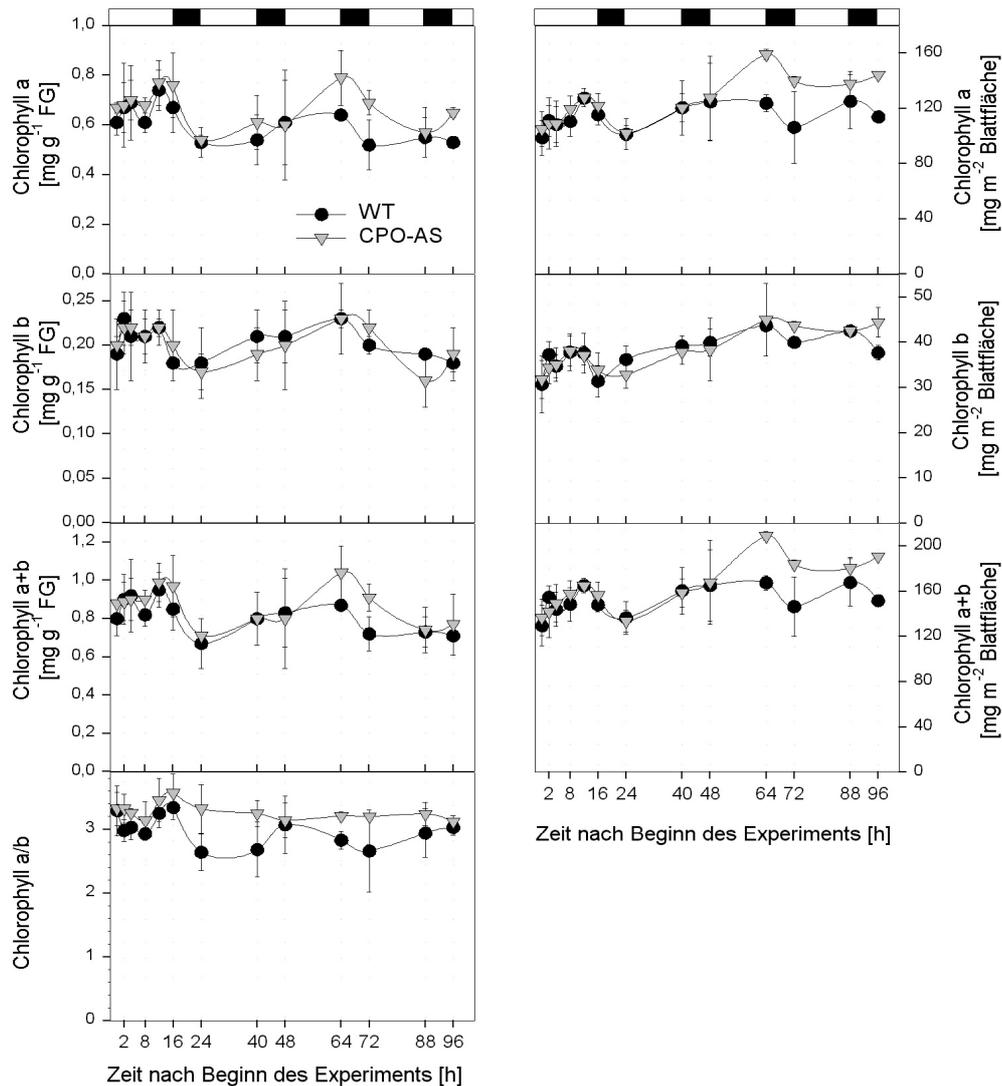


Abb. 32 Chlorophyllgehalt und Verhältnis von Chlorophyll a/b in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 während des Lichtshift-Experiments. Chlorophyll- und Carotinoidgehalte (s. Abb. 33) wurden in methanolischen Extrakten photometrisch bestimmt und nach Formeln von Lichtenthaler und Wellburn (1983) berechnet (s. auch 5.8.1.2). Links sind die Gehalte in Bezug zum Frischgewicht, rechts auf der Basis von Blattfläche angegeben. Die Zeitachse beginnt am Anfang der ersten von 6 auf 16h verlängerten Lichtphase am Tag 1 des Lichtshift-Experiments und endet am Beginn der Lichtperiode am 5. Tag des Versuchs (96h). Am oberen Rand der Abb. wird durch schwarze die Dunkel- und durch weiße Rechtecke die Lichtphase symbolisiert. Mittelwerte und Standardabweichungen für die Ergebnisse von sechs Blattextrakten aus mehreren Lichtshift-Versuchen sind gezeigt.

Die unterschiedlichen, in Pflanzen vorkommenden Carotinoide übernehmen sowohl Lichtsammel- als auch protektive Funktionen in den Photosystemen. Hier konnte ebenfalls im Verlauf des Lichtshift-Experiments eine Anpassung an die erhöhten Lichtdosen beobachtet werden (Abb. 33). Der auf Blattfläche bezogene Carotinoidgehalt zeigte diurnale

Schwankungen und nahm mit der Dauer der Lichtperiode zu. Am Ende der Lichtphase des dritten Tages (64h) erreichte der Gehalt an Carotinoiden (wie auch der von Chlorophyll, Abb. 32) sein Maximum in WT- und CPO-AS-Pflanzen. Mit der fortschreitenden Nekrotisierung von Blättern der CPO-AS-Pflanzen waren keine Veränderungen im Carotinoidgehalt verbunden.

Das Verhältnis von Carotinoiden zu Chlorophyll zeigte am Ende der Lichtphase des 2. Lichtshift-Tages ein Maximum, was ebenfalls eine allgemeine Reaktion auf veränderte Lichtbedingungen zu sein scheint, da der Wert für die WT-Pflanzen höher lag als der für CPO-AS-Pflanzen.

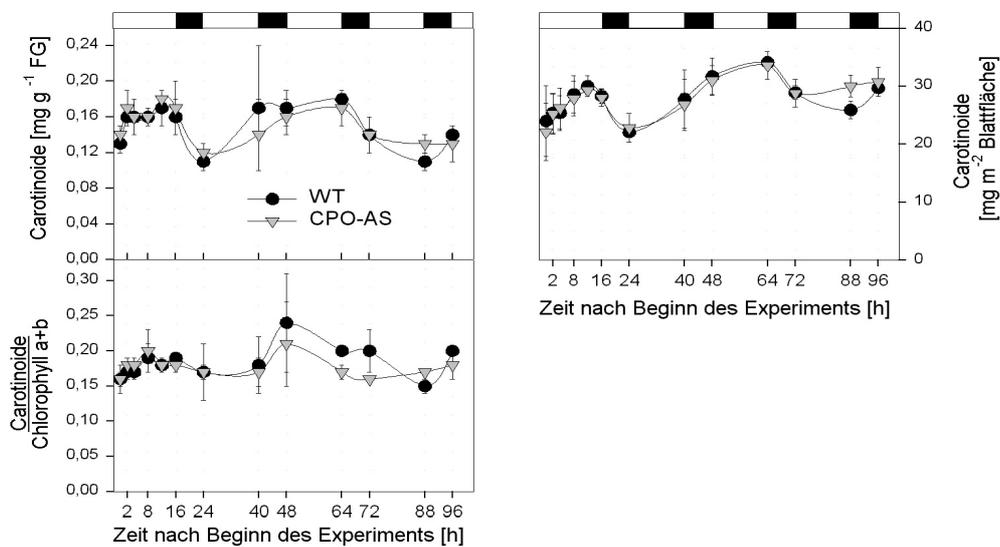


Abb. 33 Carotinoidgehalt und Verhältnis von Carotinoiden zu Gesamt-Chlorophyll in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Verlauf des Lichtshift-Experiments. Weitere Details sind in der Legende zur Abb. 32 beschrieben.

## 6.5.2 Aktivität ausgewählter antioxidativer Schutzenzyme und Gehalt an niedermolekularen Antioxidantien während des Lichtshift-Experiments

### 6.5.2.1 Analyse der Aktivität verschiedener Isoformen der SOD mittels nicht-denaturierender PAGE

Analog zur Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Isoenzyme der SOD an bereits nekrotischen Pflanzen (s. 6.1.3.1.1), wurden auch Blattproben aus den Lichtshift-Experimenten durch native PAGE und Aktivitätsfärbung der SOD-Banden im Gel analysiert (s. 5.8.2.2).

Die Gesamtaktivität aller SOD-Isoformen war ab dem Ende der Lichtphase am ersten Tag des

Lichtshift-Experiments in den CPO-AS-Pflanzen im Vergleich zu gleichaltrigen Blättern von WT-Pflanzen erhöht (Abb. 34). Den größten Anteil an diesem Anstieg hatten dabei am ersten Tag die cytosolische und die plastidäre Cu/Zn-SOD. Der Aktivitätsunterschied zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen bildete sich erst in den letzten 4 Stunden der Lichtperiode des ersten Lichtshift-Tages heraus. Ab dem Beginn der zweiten verlängerten Lichtperiode zeigte auch die plastidäre Fe-SOD eine im Vergleich zum WT erhöhte Isoenzym-Aktivität. Die cytosolische Cu/Zn- und die plastidäre Fe-SOD erreichten zu Beginn (40h) bzw. am Ende (48h) der zweiten Dunkelphase ihr Aktivitätsmaximum, welches mehr als 200% der Aktivität der entsprechenden Isoenzyme in den WT-Pflanzen betrug. Auch die mitochondriale Mn-SOD zeigte am Beginn der Lichtphase am 3. Tag (48h) eine den korrespondierenden WT-Wert um ca. 100% überragende Aktivitätsspitze, so daß Beginn und Ende der 2. Dunkelphase das Maximum der Gesamt-SOD-Aktivität in den CPO-AS-Pflanzen markierten. Zu diesem Zeitpunkt wurden im Lichtshift-Experiment die Nekrosen offenbar. Während sowohl die Aktivität der plastidären Fe- als auch die der mitochondrialen Mn-SOD im Verlauf des dritten Versuchstages auf oder sogar unter das WT-Niveau sanken und dort auch bis zum Ende des Experiments verblieben, beobachtete man für beide Cu/Zn-SOD-Isoformen weiterhin eine im Vergleich zum WT erhöhte Aktivität.

Über den gesamten Zeitraum des Lichtshift-Experiments hinweg trat ausschließlich in den CPO-AS-Pflanzen zusätzliche SOD-Aktivität in Form einer schwachen Bande auf, die im Gel kurz oberhalb der plastidären Fe-SOD sichtbar wurde. Die Kinetik dieser Aktivität folgte der der plastidären Fe-SOD, machte aber nur 30-50% dieser Isoform-Aktivität aus.

Zusammenfassend betrachtet, wurde in den CPO-AS-Pflanzen im Vergleich zum WT eine erhöhte Isoenzym-Aktivität der SOD ab dem Ende der ersten verlängerten Lichtphase sichtbar, die ihr Maximum ca. 48h nach Beginn des Lichtshift-Experiments aufwies und damit zeitlich mit der Ausbildung von Blattläsionen zusammenfiel. Die Aktivierung der SOD betraf zu verschiedenen Zeitpunkten die Isoformen aller Zellorganellen, so daß auf einen die ganze Zelle betreffenden Bedarf an Entgiftungspotential für Superoxid geschlossen werden kann. Die teilweise gegensätzlich im Tagesgang schwingenden Aktivitäten der verschiedenen SOD-Isoformen ergaben für die aus der Summe der Einzelaktivitäten berechnete Gesamt-SOD-Aktivität ein arhythmisches Bild. Die größten Unterschiede in der Gesamtaktivität bestanden zwischen 48 und 64h nach Beginn des Experiments und markieren damit den Zeitraum rascher Nekrotisierung von Blattgewebe der CPO-AS-Pflanzen.

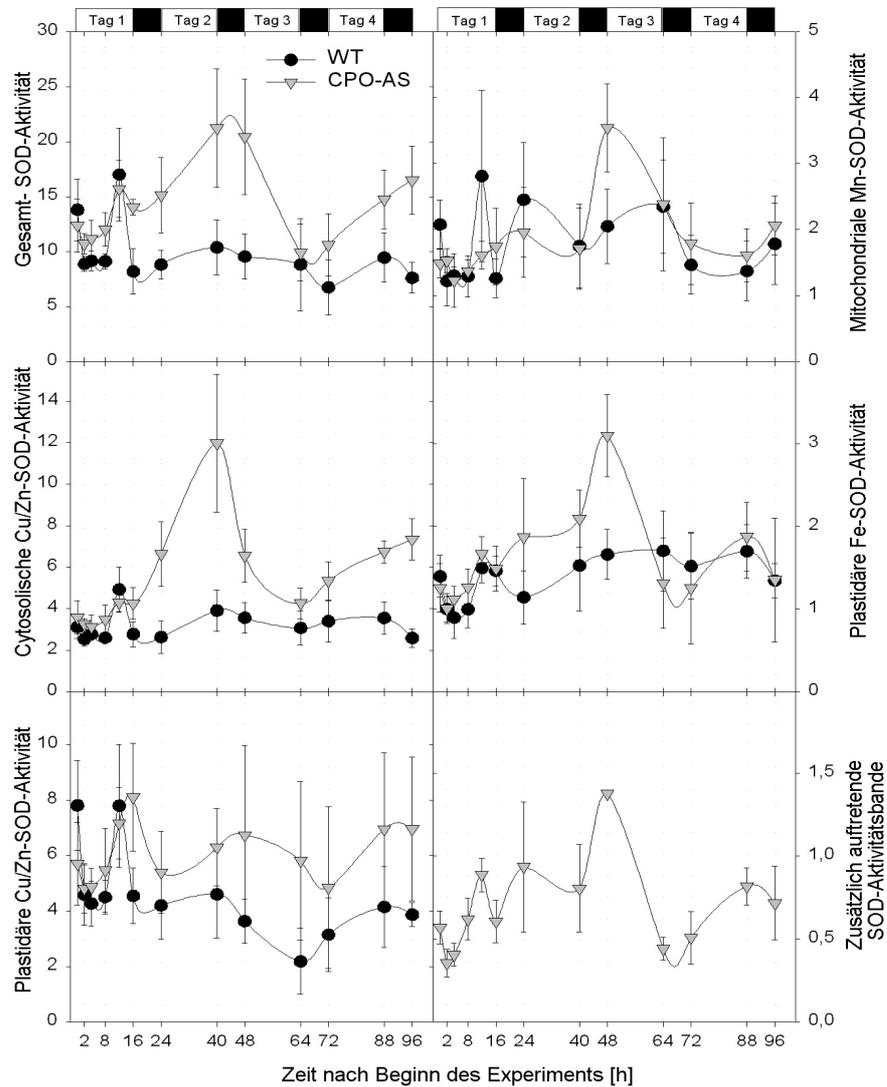


Abb. 34 Enzymaktivität einzelner Isoformen der SOD in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Lichtshift-Experiment. Aliquots von Proteinextrakten mit je 40  $\mu\text{g}$  Protein aus Blattproben von drei Lichtshift-Experimenten wurden gelelektrophoretisch unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Enzymaktivität in den SOD-Banden durch Färbung sichtbar gemacht. Die Gele wurden anschließend densitometrisch ausgewertet (s. 5.8.2.2), und Mittelwerte sowie Standardabweichungen der anhand eines aufgetragenen Mn-SOD-Standards in Units/Aktivitätsbande berechneten Enzymaktivitäten sind angegeben. Die Abb. zeigt Daten für die Summe aller Isoenzym-Aktivitäten, die cytosolische bzw. plastidäre Cu/Zn-SOD, die mitochondriale Mn-SOD, die plastidäre Fe-SOD und eine zusätzliche Aktivitätsbande, die nur in den CPO-AS-Pflanzen auftrat. Die Angaben zum zeitlichen Rahmen des Experiments entsprechen den Details aus Abb. 32.

### 6.5.2.2 Aktivität ausgewählter Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus: APX und GR

Die während des Lichtshift-Experiments auftretende Aktivierung von Isoenzymen der SOD in den CPO-AS-Pflanzen (s. 6.5.2.1) könnte auch eine Erhöhung der Aktivität der im Ascorbat-Glutathion-Zyklus nachgeschalteten Enzyme nach sich ziehen, damit das vermehrt als Produkt der SOD-Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid entgiftet werden kann (s. 3.1.2.2). Tatsächlich wurde der bereits am Ende der ersten Lichtperiode sichtbare Aktivitätsanstieg der SOD (s. Abb. 34) durch eine erhöhte Aktivität der APX begleitet. Dieser Anstieg setzte sich im Verlauf des Experiments in den CPO-AS-Pflanzen fort, wobei die APX-Aktivität am Ende des 4. Versuchstages fast 300 % des zum Beginn des Experiments gemessenen Wertes und damit auch das Dreifache des WT-Wertes betrug (Abb. 35).

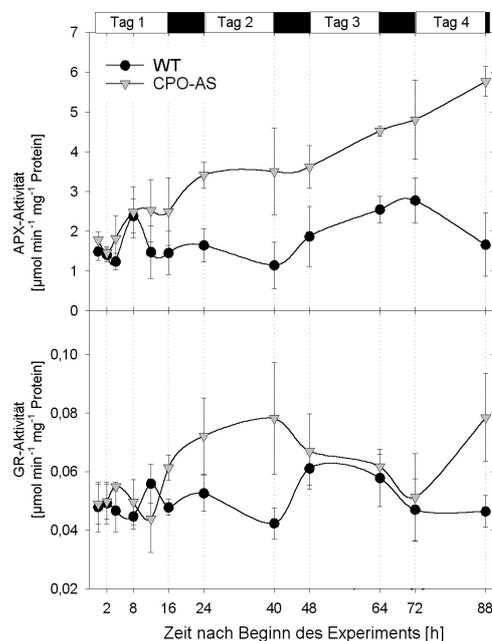


Abb. 35 Aktivität der löslichen Isoformen von Ascorbat-Peroxidase (APX) und Glutathion-Reduktase (GR) in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Lichtshift-Experiment. Die Details zum zeitlichen Rahmen der Experimente sind in der Legende zur Abb. 32 beschrieben. Der letzte, hier dargestellte Zeitpunkt (88h) entspricht dem Ende der vierten verlängerten Lichtperiode. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und Standardabweichungen berechnet.

Nur transient, und bei weitem im Umfang nicht so ausgeprägt, waren die Veränderungen der gemessenen GR-Aktivität (Abb. 35). Hier beobachtete man nur vom Ende der ersten bis zum Ende der zweiten Lichtperiode einen Anstieg der Aktivität um ca. 50 % in den CPO-AS-Pflanzen, in denen in diesem Zeitbereich erste Nekrosen sichtbar wurden. Beginnend mit dem Wert bei 88h traten allerdings auch zum Ende des Lichtshift-Experiments hin wieder erhöhte

Werte in den CPO-AS-Pflanzen auf, die relativ starken Schwankungen unterlagen (96h, 168h nach Beginn des Experiments; Daten nicht gezeigt). Die Befunde an den CPO-AS-Pflanzen mit der zu diesen späten Zeitpunkten abgeschlossenen Nekrosenbildung entsprechen jenen, die bereits für Pflanzen mit vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp beschrieben wurden (s. 6.1.3.1.2, Abb. 9). Auch hier wird eine in den porphyrischen Pflanzen um das Zwei- bis Dreifache erhöhte APX-Aktivität von einem moderateren Anstieg der Aktivität der GR flankiert.

### 6.5.2.3 Einfluß des Lichtshift-Experiments auf die Proteinmenge von APX und Catalase

Neben der Aktivität wurde für ausgewählte Enzyme auch die Proteinmenge während des Lichtshift-Experiments untersucht. Trotz der Steigerung der Gesamtaktivität aller löslichen APX-Isoformen in den CPO-AS-Pflanzen während des Lichtshift-Experiments (Abb. 35), konnten für die cytosolische APX praktisch keine Unterschiede in der Menge zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen oder im zeitlichen Verlauf festgestellt werden (Abb. 36).



Abb. 36 Repräsentatives Ergebnis der Western Blot-Analyse von Proteinextrakten aus Blättern von WT- (W) und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 (T) im Lichtshift-Experiment. Gleiche Mengen an Protein (10 µg) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Der zum Nachweis der APX verwendete monoklonale Antikörper, der gegen cytosolische (cyt.) APX aus Spinat erzeugt wurde, war freundlicherweise durch H. Saji (Onagawa, Japan) zur Verfügung gestellt worden. Das Serum gegen Catalase (CAT) aus Tabak stammt aus dem Labor von D. Klessig (Piscataway, USA). Zusätzlich zu den Daten für die 16h der ersten verlängerten Lichtperiode (0-16h) sind die Zeitpunkte 24, 48, 72, 96 und 168h nach Beginn des Lichtshift-Experiments gezeigt, die dem Beginn der Lichtperiode am Tag 2, 3, 4, 5 und 8 entsprechen. (Daten von H.-P. Mock, unveröffentlicht)

Im Gegensatz dazu wurde für die Catalase eine deutliche Zunahme der Proteinmenge innerhalb

der ersten 12h beobachtet. Dabei wurde zumindest zu einem frühen Zeitpunkt (2h nach Beginn der Lichtphase am ersten Tag des Lichtshift-Experiments) in den CPO-AS-Pflanzen die Tendenz einer gewissen Akkumulation von Catalaseprotein ersichtlich. Auch zu Beginn der verlängerten Lichtperiode am zweiten Versuchstag (24h) war die nachweisbare CAT-Menge in den CPO-AS-Pflanzen etwas größer als in den WT-Pflanzen. Zu späteren Zeitpunkten während des Lichtshift-Experiments traten hingegen keine Unterschiede mehr im Expressionsniveau zwischen den porphyrischen und den WT-Pflanzen auf. Wie die Western Blot-Analyse von Proben aus Pflanzen mit vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp (Abb. 12) zeigte, war der Unterschied in der CAT-Menge zwischen CPO-AS- und WT-Pflanzen ebenfalls geringer als zwischen UROD-AS- und den WT-Pflanzen.

#### 6.5.2.4 Niedermolekulare Antioxidantien im Lichtshift-Experiment: Ascorbat, Glutathion und Tocopherol

Wegen der unter Schwachlicht- im Vergleich zu Gewächshausbedingungen geringeren Biosynthesekapazität beobachtete man in den Pflanzen zu Beginn des Experiments sehr niedrige Werte für reduziertes und Gesamt-Ascorbat (Abb. 37, vgl. auch Abb. 14).

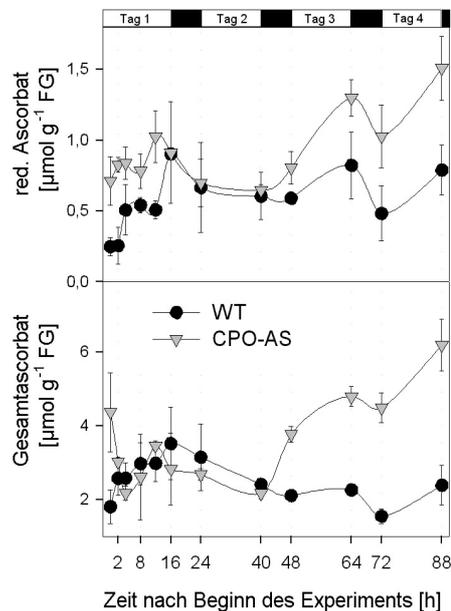


Abb. 37 Reduziertes und Gesamtascorbat in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 in den ersten 88h des Lichtshift-Experiments. Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Für Details zu den Probenahmezeitpunkten s. Abb. 32.

Besonders in den WT-Pflanzen ließen sich anfänglich nur relativ geringe Mengen an reduziertem Ascorbat nachweisen, die sich aber im Verlauf der ersten verlängerten Lichtperiode verdreifachten. In den CPO-AS-Pflanzen konnten während der ersten 12 h Lichtphase im Vergleich zu den WT-Pflanzen bis zu 100 % mehr an reduziertem Ascorbat gemessen werden, wobei dessen Menge bis zum Ende der Lichtperiode im Gegensatz zum Wert des WT aber nur wenig anstieg. WT- und CPO-AS-Pflanzen zeigten anschließend in der ersten Dunkel- und zweiten Lichtphase (16-40h) annähernd konstante Mengen von reduziertem und Gesamt-Ascorbat. Erst mit Beginn der Lichtphase am 3. Versuchstag stiegen beide Werte in den CPO-AS-Pflanzen wieder an, während die des WT fast unverändert blieben. Der sich zu diesem Zeitpunkt des Lichtshift-Experiments in voller Stärke herausbildende nekrotische Phänotyp der CPO-AS-Pflanzen geht daher mit erhöhten Mengen an Ascorbat einher, wobei das Redoxverhältnis jedoch niedrig blieb (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu sind sowohl Gesamtascorbatgehalt als auch Redoxverhältnis in porphyrischen Pflanzen, die seit Wachstumsbeginn bei erhöhten Lichtdosen angezogen wurden und einen vollständig ausgeprägten nekrotischen Phänotyp aufweisen, im Vergleich zum WT-Niveau erniedrigt (s. Abb. 14). Diese Befunde an Gewächshauspflanzen könnten den Endpunkt einer Entwicklung darstellen, die länger dauert, als der im Lichtshift-Experiment untersuchte Zeitraum.

Die Kinetik der Glutathiongehalte wies ein ähnliches Profil auf (Abb. 38). Auch hier konnte ein Anstieg sowohl für reduziertes als auch für Gesamt-Glutathion in WT- und CPO-AS-Pflanzen im Verlauf der ersten verlängerten Lichtperiode beobachtet werden (0-16h). Diese Steigerung im Gehalt von GSH war beim Bezug der Werte auf die Blattfläche deutlicher als bei der Berechnung auf der Basis von Frischgewicht. Wie bereits für den Ascorbatgehalt festgestellt wurde, kehrten auch die Mengen von reduziertem und oxidiertem Glutathion am Tag 2 des Lichtshift-Experiments auf das jeweilige Ausgangsniveau zurück. Während sich das Redoxverhältnis am ersten Tag des Versuchs noch einschwang, wies es an den folgenden Tagen eine deutliche Anpassung an den Tag/Nacht-Rhythmus auf. Dabei wurden die stärker reduzierten Werte stets am Ende und die stärker oxidierten Werte immer am Anfang der Dunkelperiode gemessen. Ab dem Beginn der Lichtperiode am 3. Versuchstag (48h) wurde ein um 4-5 % stärker oxidiertes Redoxverhältnis in den CPO-AS-Pflanzen als in den WT-Pflanzen offenbar.

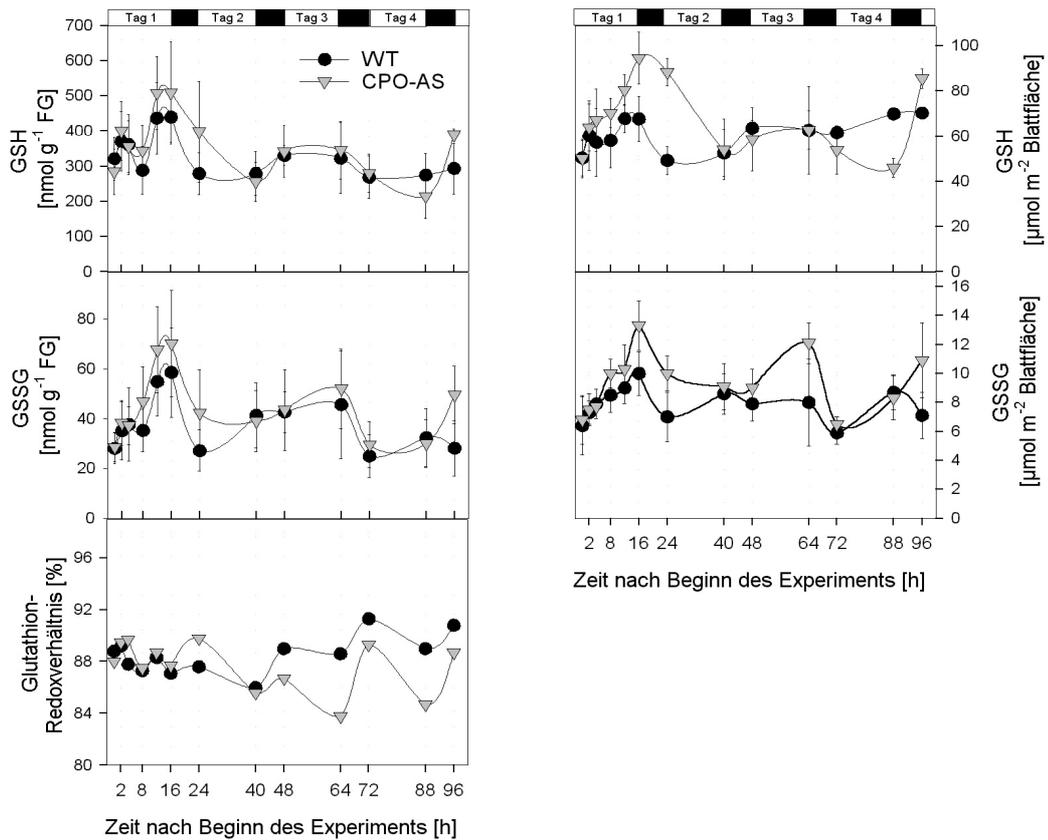


Abb. 38 Reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) sowie das daraus resultierende Redoxverhältnis in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Lichtshift-Experiment. Die Werte sind in Bezug auf Frischgewicht (links) bzw. Blattfläche (rechts) dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Für Details zu den Zeitpunkten der Probenahme s. Abb. 32. Im Gegensatz zu den in Abb. 14 als Resultat eines photometrischen Tests präsentierten Daten sind die hier gezeigten Werte Ergebnisse von HPLC-Analysen, in denen GSH und GSSG gleichzeitig gemessen werden konnten.

Als besonders in der hydrophoben Umgebung von Membranen essentielles Antioxidans wurde die Kinetik des Tocopherolgehalts im Lichtshift-Experiment untersucht (Abb. 39). Hierbei wurde durch die HPLC-Analyse zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol unterschieden. Sowohl in WT- als auch in CPO-AS-Pflanzen kam es innerhalb der ersten verlängerten Lichtphase des Experiments zu einem drastischen Anstieg im  $\alpha$ -Tocopherolgehalt. Dabei waren bereits zu Beginn der Lichtperiode in den CPO-AS- im Vergleich zu WT- Pflanzen auf das Dreifache erhöhte Spiegel vorhanden, die nach 16h Belichtung schließlich ein ähnliches Niveau erreichten. Bereits mit Beginn bzw. dem Ende der zweiten Lichtperiode (24 bzw. 40h) wurden in WT bzw. CPO-AS-Pflanzen wieder niedrige  $\alpha$ -Tocopherolgehalte erreicht, die sich auf dem Niveau der Anfangswerte für die WT-Pflanzen bewegten. Die Werte, die 48, 64 und 96h nach

Beginn des Experiments in den CPO-AS-Pflanzen gemessen wurden, lassen sich nicht in den Gang der übrigen Daten einpassen. Der plötzliche Anstieg des  $\alpha$ -Tocopherol, der keine Entsprechung beim  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol fand, reflektiert wahrscheinlich erneut die großen Unterschiede, die zwischen gerade nekrotisierendem, bereits nekrotischem oder noch weitgehend ungeschädigtem Blattgewebe bestanden, welche jeweils unterschiedlich große Anteile an den als Proben gewonnenen Blattscheiben ausmachten. Einschränkend muß bemerkt werden, daß die hier vorgestellten Daten aus mehreren Proben nur eines Lichtshift-Experiments ermittelt wurden.

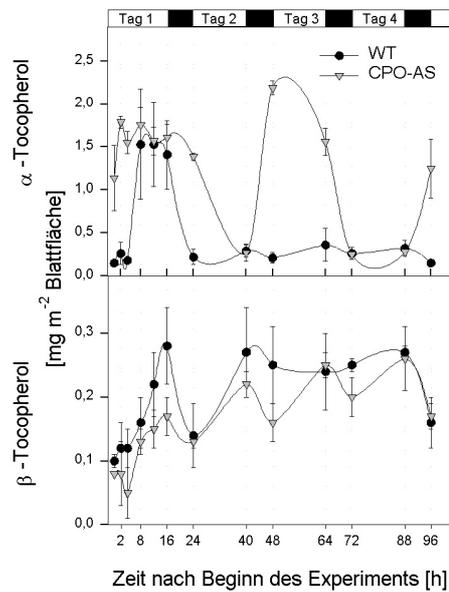


Abb. 39  $\alpha$ - und  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Lichtshift-Experiment. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Extrakten aus Proben eines Lichtshift-Experiments. Tocopherol wurde durch HPLC bestimmt. Für Details zu den Zeitpunkten der Probennahme s. Abb. 32.

Für  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol konnte wiederum eine ausgeprägte diurnale Rhythmik beobachtet werden, die durch die Zunahme des Gehaltes im Verlauf der Lichtphase und jeweils leicht absinkendes Konzentrationsniveau in den Dunkelphasen gekennzeichnet war. Dabei stieg die Konzentration in den Blättern mit zunehmender Dauer des Lichtshift-Experiments an und erreichte am 3. Versuchstag ein Plateau. In den Blättern der untersuchten WT-Pflanzen ließen sich zu den meisten Zeitpunkten höhere Gehalte an  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol nachweisen als in den CPO-AS-Pflanzen. Außer während der ersten verlängerten Lichtperiode, in der  $\alpha$ -Tocopherol in WT- und CPO-AS-Pflanzen bis zu fünffach höhere Werte als für  $\beta$ + $\gamma$ -Tocopherol aufwies, waren die

Mengen für die verschiedenen Tocopherole vergleichbar. Die später auftretenden starken Schwankungen des  $\alpha$ -Tocopherolgehalts scheinen vor allem mit dem Erscheinen der Blattläsionen in Verbindung zu stehen.

*6.5.2.5 Indikatoren für Lipidperoxidation und Membranschädigung im Lichtshift-Experiment: Nachweis von Ethan und TBA-RS*

Mit der Bestimmung von Ethan und der thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBA-RS) wurden zwei unabhängige Marker für Membranschädigung infolge von Lipidperoxidation ermittelt (s. 5.8.1.3, 5.8.1.4). In Form von Ethan wird dabei ein direktes Endprodukt und mit dem Malondialdehyd als Hauptbestandteil der TBA-RS ein Zwischenprodukt des Lipidabbaus nachgewiesen. Bereits in den Untersuchungen an porphyrischen Pflanzen mit vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp hatte sich herausgestellt, daß die Akkumulation von photosensibilisierenden Tetrapyrrolen erhöhte Spiegel an TBA-RS verursacht, d.h. daß das Auftreten von Blattläsionen von einer verstärkten Lipidperoxidation begleitet wird (s. 6.1.3.1.5, Mock et al. 1998). Diese Ergebnisse konnten mit der Analyse der Anreicherungskinetik von Lipidperoxidationsprodukten in zwei unterschiedlichen Lichtshift-Experiment bestätigt werden (Abb. 40). In einem gemeinsamen Versuch von H.-P. Mock und C. Triantaphylidès (CEA Cadarache, Frankreich) mit CPO-AS-Pflanzen wurde gezeigt, daß die Menge an nachweisbarem Ethan sofort ansteigt, wenn den Pflanzen eine größere Lichtmenge verabreicht wird. Im Verlauf dieses Experiments, in dem nicht die Länge der Lichtperiode vergrößert sondern die Lichtintensität erhöht wurde, stieg die Ethanbildung auf das Fünffache des WT-Wertes.

Auch im wie üblich durchgeführten Lichtshift-Experiment konnte man bereits 8h nach Beginn der Lichtperiode am ersten Tag einen im Vergleich zum WT deutlich erhöhten Wert für die Menge an TBA-RS nachweisen (Abb. 40). Bis zu 4h nach Beginn der Lichtphase war hingegen noch kein Unterschied zu WT-Pflanzen festzustellen, was dafür spricht, daß eine verstärkte Lipidperoxidation tatsächlich erst durch die Verlängerung der Lichtperiode ausgelöst wird. Die in den CPO-AS-Pflanzen gemessene Menge an TBA-RS nimmt bis zum Ende der Lichtperiode am 2. Tag (40h) stetig zu, um danach, wie auch für die WT-Pflanzen beobachtet, in eine Art diurnalen Rhythmus zu fallen. Die Werte bleiben dabei in den CPO-AS- immer höher als in den WT-Pflanzen und entsprachen den Konzentrationen, die von porphyrischen Pflanzen mit vollständig nekrotischem Phänotyp bekannt waren (s. Abb. 15).

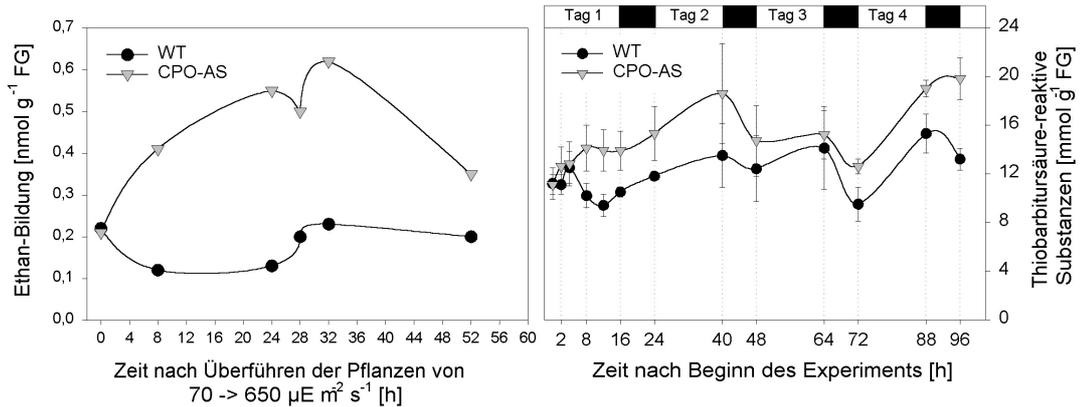


Abb. 40 Bildung von Ethan (links) und TBA-RS (rechts) als Indikatoren der verstärkten Lipidperoxidation infolge der Veränderung der Lichtbedingungen in porphyrischen Pflanzen der Linie CPO-AS 1/41 und Vergleich mit Daten für WT-Pflanzen. In einem modifizierten Lichtshift-Experiment wurde die den Pflanzen verabreichte Lichtdosis durch Erhöhen der Intensität von 70 auf 650  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  vergrößert und das gebildet Ethan gaschromatografisch quantifiziert. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und Mittelwerte aus den Daten berechnet. Die Standardabweichungen waren  $< 10\%$ . Die Details zu den Lichtshift-Experimenten, bei denen Probenmaterial für die Bestimmung der TBA-RS gewonnen wurde, sind in der Legende zur Abb. 32 beschrieben. Die dargestellten Werte verkörpern Mittelwert und Standardabweichung für mehrere unabhängige Lichtshift-Experimente.

In weitergehenden HPLC-Analysen der Lipidperoxidationsprodukte, die unter den Bedingungen des Lichtshift-Experiments in den porphyrischen Pflanzen entstehen, wurden Hinweise darauf erhalten, daß der Großteil dieser Produkte nicht-enzymatischen Ursprungs ist. Da fast ausschließlich racemische Gemische der auch Oxylipine genannten Produkte vorliegen, kann die Beteiligung von Lipoxygenasen (LOX) weitgehend ausgeschlossen werden (I. Feußner, H.-P. Mock, persönliche Mitteilung).

### 6.5.3 Kinetik der Akkumulation von pathogenese-assoziierten Substanzen im Lichtshift-Experiment

Wie bereits dargestellt wurde, zeichnen sich tetrapyrrol-akkumulierende Tabakpflanzen durch die Aktivierung von zellulären Programmen aus, die normalerweise bei der Abwehr von Pathogeninfektionen oder Verwundung eingeschaltet werden. Dazu zählt die besonders in den nekrotischen Abschnitten von Blättern nachweisbare Anhäufung von PR-Proteinen, Scopolin und Salicylat (s. 6.1.5, Mock et al. 1999). Das zeitliche Verhältnis dieser Prozesse zur Ausbildung der Blattläsionen sollte zusätzlich durch Lichtshift-Experimente untersucht werden.

### 6.5.3.1 Untersuchungen zur phenolischen Verbindung Scopolin, $H_2O_2$ und Salicylsäure

Während Chlorogensäure, die die quantitative Hauptkomponente der phenolischen Verbindungen in Tabak darstellt, als Reaktion auf die erhöhte Lichtdosis sowohl in WT- als auch in CPO-AS-Pflanzen gleichermaßen auf das Dreifache anstieg, konnte für das Scopolin nur in den porphyrischen Pflanzen die dramatische Zunahme auf das mehrere Hundertfache konstatiert werden (Abb. 41). Diese Verbindung, die in den WT-Pflanzen nur in Spuren nachweisbar war, hat antimikrobielle Eigenschaften und läßt sich bei dieser massiven Akkumulation durch seine blaue Autofluoreszenz nachweisen (Mock et al. 1999).

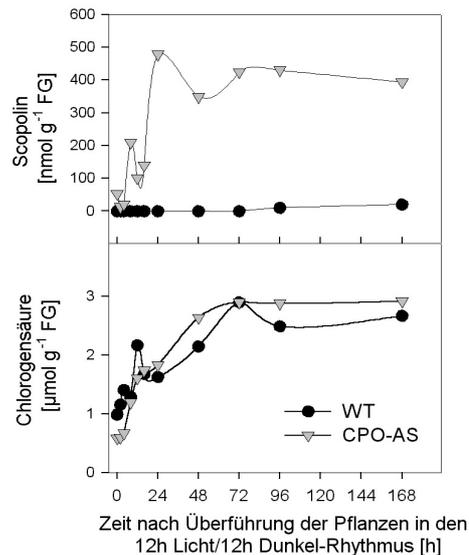


Abb. 41 Gehalt von Scopolin und Chlorogensäure in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 bei Veränderung der Lichtbedingungen. Die Lichtshift-Experimente wurden in modifizierter Form durchgeführt: Nach achtwöchigem Wachstum unter Schwachlichtbedingungen ( $6h:200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ) wurden die Pflanzen in Klimakammern mit  $12h:400 \mu E m^{-2} s^{-1}$  überführt und die phenolischen Verbindungen in den methanolischen Blattextrakten durch HPLC analysiert. Der Zeitpunkt 0h entspricht dem Transfer der Pflanzen und damit gleichzeitig dem Beginn der veränderten Lichtbedingungen. Das repräsentative Ergebnis für die Extrakte eines Lichtshift-Experiments ist gezeigt. Mehrere Wiederholungen lieferten eine grundsätzlich gleiche Kinetik der Gehalte beider Substanzen mit allerdings stark schwankenden Absolutwerten, so daß auf die Berechnung von Mittelwerten verzichtet wurde. (Daten von H.-P. Mock, unveröffentlicht)

Wasserstoffperoxid hat mehrere Funktionen im Stoffwechsel der Pflanzen (s. 3.1.1, 3.2.1). So wird es bei Pathogenbefall im infektionsnahen Gewebe aktiv gebildet („oxidative burst“) und ist essentieller Bestandteil der Hypersensitivitätsreaktion (HR). Es entsteht aber auch als Zwischenprodukt bei der Entgiftung von Superoxid, welches z.B. in der Lichtreaktion der Photosynthese gebildet wird, und es ist außerdem Substrat von Peroxidationsreaktionen.

Der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt in WT- und CPO-AS-Pflanzen wies ebenso wie der der meisten anderen untersuchten Substanzen rhythmische Schwankungen als Reaktion auf die Licht/Dunkel-Wechsel auf (Abb. 42). Dabei konnte ein im Verlauf der Lichtperiode ansteigendes und während der Nacht abfallendes Konzentrationsniveau beobachtet werden. Am Ende der Lichtperiode des ersten Tags des Lichtshift-Experiments überstieg die Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  im WT den Ausgangswert (0h) um das Doppelte und lag damit auch um 100% über dem Wert der CPO-AS-Pflanzen. Bereits in der ersten Dunkelphase normalisierte sich die Konzentration des Wasserstoffperoxid in den WT-Blättern wieder und war an allen anderen Meßpunkte fast identisch mit der der CPO-AS-Pflanzen. Zum Fehlen einer ähnlichen Konzentrationsspitze innerhalb der ersten verlängerten Lichtperiode in den CPO-AS-Pflanzen könnte die zu diesem Zeitpunkt bereits im Vergleich zum WT verdoppelte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftungsaktivität der APX beigetragen haben (s. Abb. 35).

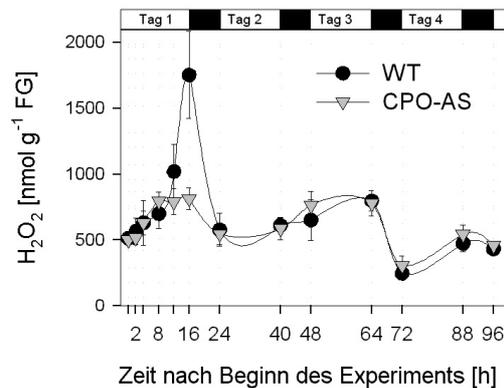


Abb. 42 Wasserstoffperoxidgehalt in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 während des Lichtshift-Experiments.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde durch einen fluorimetrischen Test bestimmt (5.8.1.6), und Mittelwert und Standardabweichungen für drei unabhängige Lichtshift-Experimente wurden berechnet. Für die Details zum Lichtshift-Experiment s. Legende zu Abb. 32.

Salicylsäure (SA) ist eine wichtige Signalsubstanz bei der Etablierung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR, s. 3.2.2), die als Folge von Pathogeninfektionen an Pflanzen beobachtet wird. Auch in porphyrischen Pflanzen mit nekrotischem Phänotyp wurde ein massiver Anstieg von freier und vor allem von gebundener (konjugierter) SA im Vergleich zu WT-Pflanzen gemessen (s. 6.1.5, Mock et al. 1999). Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse von Blattproben bestätigt, die während des Lichtshift-Experiments gewonnen wurden (Abb. 43).

In der zweiten Hälfte der ersten verlängerten Lichtperiode kam es zu einem kurzzeitigen steilen

Anstieg der Menge von freier SA in den CPO-AS-Pflanzen mit anschließendem raschen Absinken auf WT-Niveau. Gleichzeitig konnte eine ebenso schnelle aber anhaltende, bis zu tausendfache Steigerung im Gehalt von konjugierter SA in den porphyrischen Pflanzen nachgewiesen werden. Erst mit der zunehmenden Nekrotisierung der Blätter von CPO-AS-Pflanzen am 3. und 4. Tag des Lichtshift-Experiments traten hier stärkere Schwankungen in der Konzentration auf, die wohl vor allem auf die steigende Inhomogenität des Blattgewebes zurückzuführen sind. Vor allem in der direkten Umgebung von Blattläsionen waren erhöhte Mengen an konjugierter SA nachweisbar (Mock et al. 1999). Zusammengefaßt bedeutet dies, daß die starke Akkumulation von SA dem Auftreten von sichtbaren Blattnekrosen vorhergeht und erst bei einer Licht-Schwellendosis einsetzt ( $8\text{-}12\text{h: } 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), die knapp über der liegt, der die Pflanzen zuvor ohne die Entwicklung phänotypischer Symptome ausgesetzt war ( $6\text{h: } 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

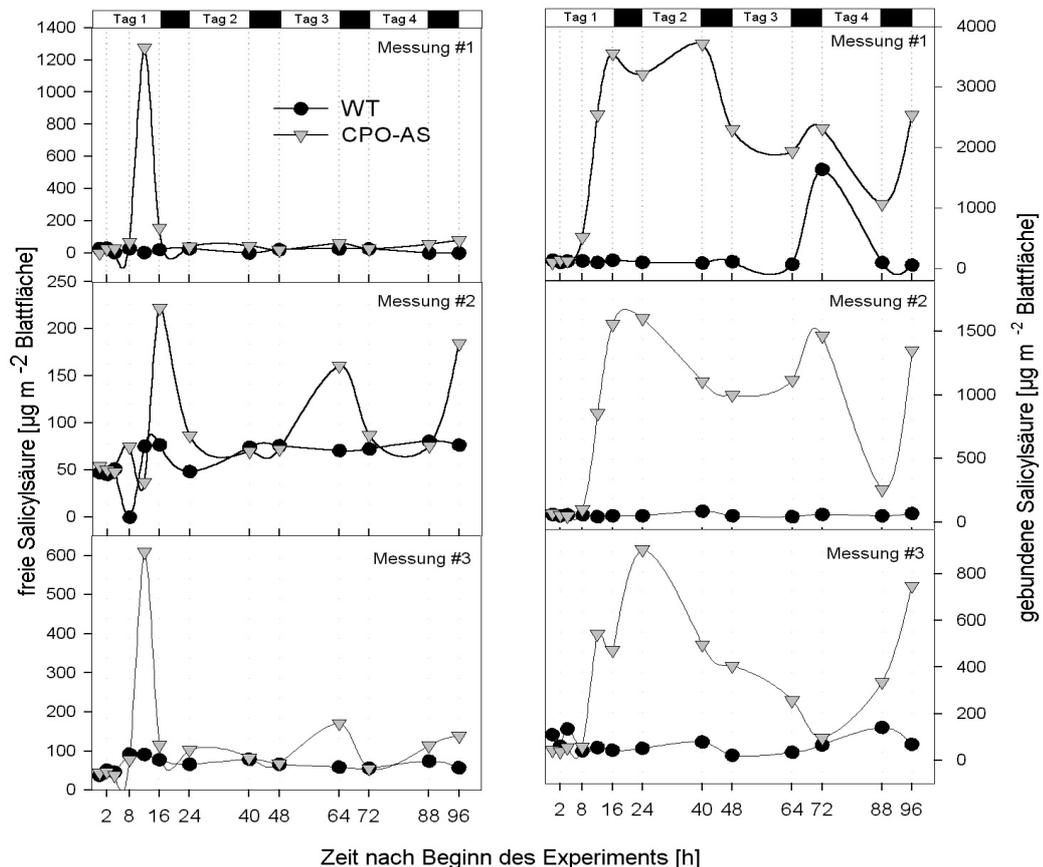


Abb. 43 Gehalt von freier (links) und gebundener (konjugierter) Salicylsäure (rechts) in WT- und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 im Lichtshift-Experiment. Gezeigt werden repräsentative Einzelmessungen aus drei unabhängigen Versuchen, die zwar die gleiche Tendenz der Meßdaten aber stark differierende Absolutwerte aufwiesen. Deshalb wurde auf die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung aus den HPLC-Daten verzichtet. Zu den Details des zeitlichen Rahmens des Lichtshift-Experiments s. Legende zu Abb. 32.

### 6.5.3.2 Western Blot-Analyse von pathogenese-assoziierten Proteinen im Lichtshift-Experiment

Die nach Pathogeninfektionen beobachtete systemisch erworbene Resistenz (SAR) umfaßt u.a. die verstärkte Bildung und Akkumulation von pathogenese-assoziierten (PR-) Proteinen (s. 3.2.1). Auch in porphyrischen Pflanzen mit nekrotischem Phänotyp wurde die Anreicherung von PR-Proteinen beobachtet (s. 6.1.5, Mock et al. 1999). Zusätzlich lieferte der SSH-Ansatz Hinweise auf die Aktivierung der Expression von mehreren PR-Genen zu einem frühen Zeitpunkt des Lichtshift-Experiments, der vor dem Auftreten erster Blattläsionen liegt (s. 6.2.2.2, Tab. 10, 6.2.2.3).

Auch die Western Blot Analyse von Proteinextrakten der Blattproben von Lichtshift-Experimenten zeigte eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge von PR-S und der Sesquiterpen-Cyclase in Blättern von CPO-AS Pflanzen bereits am ersten Tag des Versuchs 8-12h nach Beginn der Belichtung. In WT-Pflanzen hingegen wurde im Verlauf des gesamten Experiments nur ein leichter Anstieg im Gehalt von PR-S sichtbar (Abb. 44). Auch andere PR-Proteine (PR-1, PR-2, PR-Q) zeigten ein ähnliches Muster (H.-P. Mock, persönliche Mitteilung). Die Sesquiterpen-Cyclase katalysiert die Konversion von Farnesyldiphosphat in 5-Epi-aristolochen, welches ein Intermediat bei der Synthese von Sesquiterpen-Phytoalexinen, so z.B. dem Capsidiol, in Tabak ist. Die Kinetik der PR-Protein-Akkumulation entspricht sehr gut den zeitlichen Änderungen in der SA-Konzentration und der Anhäufung von Scopolin (s. Abb. 41 u. Abb. 43) als zwei weiteren Indizien für pathogenese-assoziierte Abwehrreaktionen, die bereits zu prä-nekrotischen Zeitpunkten offenbar werden.

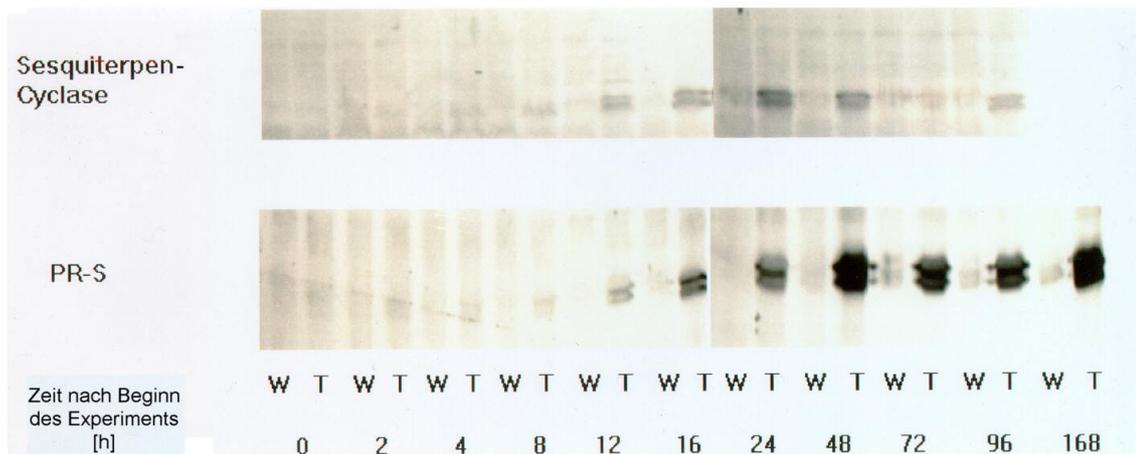


Abb. 44 Repräsentativer Western Blot von den zwei pathogenese-assoziierten Proteinen Sesquiterpen-Cyclase und PR-S in WT- (W) und CPO-AS-Pflanzen der Linie 1/41 (T). Die experimentellen Details entsprechen denen aus Abb. 36. Der Antikörper gegen die Sesquiterpen-Cyclase wurde freundlicherweise von J. Chappel (Lexington, USA), der gegen PR-S von B. Fritig (Strasbourg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. (Daten von H.-P. Mock, unveröffentlicht)

Das Fehlen der cDNAs für beide PR-Proteine in der differentiellen Bank könnte zumindest zwei Ursachen haben: Erstens bedeutet die Zunahme des Proteingehalts nicht auch automatisch das gleichzeitige Ansteigen der entsprechenden Transkriptmenge, obwohl für eine Reihe von anderen PR-Proteinen sowohl Transkript als auch Protein verstärkt akkumulieren (vgl. Tab. 10). Zweitens wird für die in dieser Arbeit vorgestellte differentielle cDNA-Bank nicht der Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

#### **6.5.4 Versuche zur Detektion von prä-nekrotischen Veränderungen im Blattgewebe porphyrischer Pflanzen durch noninvasive Techniken**

Durch zwei verschiedene Ansätze wurde versucht, den genauen Ort von Läsionen an den Blättern der CPO-AS-Pflanzen im Lichtshift-Experiment vorherzusagen. Durch den Einsatz dieser noninvasiven Methoden sollte vor allem ermöglicht werden, bereits vor dem Sichtbarwerden von Nekrosen zwischen Blattgewebe zu unterscheiden, welches nach der Erhöhung der Lichtdosis nekrotisch werden würde und welches WT-artig bliebe, um gezielt spezifisches Probenmaterial gewinnen zu können.

##### *6.5.4.1 Analyse von räumlich aufgelösten Chlorophyll-Fluoreszenzparametern an Blättern (Leaf fluorescence imaging)*

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Katharina Siebke am Lehrstuhl von Prof. Weis an der Universität Münster wurde versucht, mit Hilfe des dort etablierten Systems an Blättern von CPO- und UROD-AS-Pflanzen die Kinetik von lokal begrenzten Veränderungen der Chlorophyll-Fluoreszenz als Reaktion auf veränderte Lichtbedingungen zu untersuchen (Siebke und Weis 1995). Aus diesen Daten wurde auf zeitlich und örtlich aufgelöste Veränderungen im photosynthetisch getriebenen Elektronentransport geschlossen, die infolge des Lichtshift-Experiments in den Blättern der porphyrin-akkumulierenden Pflanzen auftraten. Die Ergebnisse waren allerdings nicht immer reproduzier- und interpretierbar. Sichtbare Veränderungen in Parametern des photosynthetisch getriebenen Elektronentransports wurden nur manchmal von der Ausbildung von Läsionen an der gleiche Stelle gefolgt. Andererseits traten später auch Nekrosen an Blattabschnitten auf, die sich zuvor nicht durch Veränderungen von Fluoreszenzdaten angekündigt hatten (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche sollen mit der jetzt auch am IPK zur Verfügung stehenden Fluoreszenz-Imaging-Technik noch einmal wiederholt werden.

#### 6.5.4.2 *Infrarot (IR)-Photographie von Blättern (Thermographie)*

Ein vorläufiger Versuch, die spätere Ausbildung von Nekrosen an Blättern präsymptomatisch durch ein thermographisches Verfahren sichtbar zu machen, wurde zusammen mit Laury Chaerle in der Gruppe von Dr. D. van der Straeten an der Universität von Gent (Belgien) unternommen. Dabei kam die von Chaerle et al. (1999) beschriebene Technik an CPO-AS-Pflanzen zum Einsatz. In diesem Verfahren wird mit Hilfe einer hochauflösenden IR-Kamera die lokale Erwärmung von Blattgewebe dargestellt. Dieser Anstieg der Temperatur um ca. 0,4 K tritt z.B. nach TMV-Infektion von Tabakblättern mehrere Stunden vor dem Sichtbarwerden von totem Blattgewebe auf und läßt sich durch die verstärkte alternative Atmung und das SA-abhängige Schließen der Stomata mit daraus resultierender erniedrigter Transpirationsrate erklären (Chaerle et al. 1999). Da auch in den porphyrischen Pflanzen erhöhte SA-Gehalte gemessen wurden (s. 6.5.3.1) und weitere Parallelen zu pathogenese-assoziierten Prozessen bestehen (s. 6.5.3), bestand die Hoffnung, mit der IR-Technik die Entstehungsorte von Nekrosen an CPO-AS-Pflanzen während des Lichtshift-Experiments voraussagen zu können. Aber auch hier konnten – ähnlich wie mit der Fluoreszenz-Imaging-Technik (s. 6.5.4.1) – keine reproduzierbaren Daten gewonnen werden, was vor allem auf die sehr schwache Ausprägung des nekrotischen Phänotyps zurückgeführt wurde. Sowohl die Lichtquellen als auch die Lichtintensität in der Pflanzenanzucht- und IR-Versuchskammer (Leuchtstoffröhren mit max.  $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Gent, Na-Dampflampen mit  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  am IPK) waren sehr verschieden voneinander. Nach dem z.Zt. durchgeführten Austesten von optimalen nekrose-induzierenden Bedingungen für CPO- und UROD-AS-Pflanzen im Genter Labor sollen diese Versuche noch einmal wiederholt werden.

#### 6.5.4.3 *Gaswechselfmessungen während des Lichtshift-Experiments*

An Blättern von WT- und CPO-AS-Pflanzen wurden an den ersten 4 Tagen von Lichtshift-Experimenten zu je zwei Zeitpunkten mittels Gaswechselfmessung die Nettoassimilationsraten bestimmt. Hierbei wurde die Photosyntheseleistung sowohl unter ambienten ( $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 350 ppm  $\text{CO}_2$ ) als auch unter Bedingungen gemessen, die maximale Raten ermöglichen sollten ( $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 1000 ppm  $\text{CO}_2$ ). Das Auftreten von Nekrosen an den CPO-AS-Pflanzen im Verlauf der Experimente wurde allerdings von keinem signifikanten Unterschied in der Nettoassimilationsrate begleitet (Daten nicht gezeigt). Die Raten am Ende der Lichtperiode lagen sowohl für WT- als auch für CPO-AS-Pflanzen immer etwas niedriger als die Raten zu Beginn der Lichtphasen. Die maximale Rate unter optimalen Bedingungen war ca. 80-100% höher als die meßbare Photosyntheseleistung unter ambienten Bedingungen.

## 6.6 Untersuchungen an Kreuzungsprodukten zwischen porphyrischen Pflanzen und transgenen Linien, die antioxidative Schutzenzyme überexprimieren

Nachdem die Bedeutung des antioxidativen Schutzsystems und besonders dessen Limitierung für die Ausprägung des nekrotischen Phänotyps der porphyrischen Pflanzen bekannt war (s. 6.1.3, 6.5), wurde versucht, die Kapazität der antioxidativen Abwehr in den porphyrischen Pflanzen durch das Kreuzen mit transgenen Linien zu vergrößern, die sich durch die erhöhte Expression für ausgewählte Schutzenzyme auszeichnen. Pollen der heterozygoten Linien CPO-AS 1/3 und 1/41 sowie UROD-AS 35/2 wurde verwendet, um Blüten von homozygoten Tabakpflanzen zu bestäuben, die entweder Mn-SOD (Slooten et al. 1995), Fe-SOD (Van Camp et al. 1996) oder APX (D. Inzé et al., unveröffentlicht) überexprimieren (s. 5.6).

Je 10 Pflanzen der  $3 \times 3 = 9$  Kreuzungsprodukte sowie je 4 Pflanzen der Parental-Linien wurden anschließend im Hinblick auf ihren Phänotyp, die Akkumulation von Porphyrin(ogen)en und die Aktivität des jeweiligen antioxidativen Schutzenzym untersucht. Dazu wurden Blätter unterschiedlicher Entwicklungsstadien nach ca. 6 Wochen Anzucht unter Gewächshausbedingungen als Proben gewonnen. Diese bisher nur einmal durchgeführten und daher vorläufigen Analysen wurden zusammen mit Dr. Sandeep Aurora am IPK durchgeführt.

Die Mn-SOD-überexprimierenden Pflanzen wiesen das Doppelte, die Fe-SOD-Überexprimierer sogar das Zehnfache der Aktivität auf, die in den WT-, CPO- oder UROD-AS-Pflanzen für das jeweilige Enzym gemessen wurden (Daten nicht gezeigt). Die APX-Aktivität war in allen untersuchten Pflanzen der Parental-Linien praktisch identisch, zeigte aber in den Pflanzen der APX-Überexpressionslinie die geringste Varianz, was auf den homozygoten Zustand hinweist. Die CPO- und UROD-AS-Linien akkumulierten ca. 300-2000% des in den WT-, Mn- oder Fe-SOD- bzw. APX-überexprimierenden Pflanzen vorhandenen Copro- bzw. Uroporphyrin(ogen)s. Diese Anhäufung der photosensibilisierenden Intermediate führte unter den Gewächshausbedingungen zu Nekrosen an den Blättern der meisten AS-Pflanzen.

Unter den verschiedenen Kreuzungsprodukten wurden Pflanzen identifiziert, die trotz der meßbaren Akkumulation von Uro- bzw. Coproporphyrin(ogen) keine oder nur sehr schwache Nekrosen aufwiesen. Ob die Unterdrückung des nekrotischen Phänotyps reproduzierbar auf die durch Überexpression des entsprechenden antioxidativen Schutzenzym erhöhte Aktivität von Mn- oder Fe-SOD bzw. APX zurückzuführen ist, konnte aufgrund der nicht ausreichenden Datenmenge nicht bewiesen werden. Ausführlichere Untersuchungen sind nötig, die erstens an einer größeren Anzahl von Individuen der Kreuzungsprodukte durchgeführt und in die, zweitens, auch die Analyse von anderen Parametern der antioxidativen Streßabwehr einbezogen werden muß. Solche erweiterten Analysen werden vermutlich die Identifikation von

Kreuzungsprodukten erlauben, in denen der durch akkumulierende Tetrapyrrole ausgelösten Photosensibilisierung durch die erhöhte antioxidative Schutzkapazität entgegengewirkt und somit die Ausbildung von Blattläsionen verhindert wird.

---

## 7 Diskussion

Oxidativer Streß und seine Auswirkungen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen waren und sind ein wichtiges Forschungsgebiet der biologischen Wissenschaften. Die Liste der Veröffentlichungen, in denen die verschiedenen Aspekte der Streßforschung an Pflanzen dargestellt werden, ist lang und umfaßt Analysen der molekularen Ursachen für abiotisch verursachten oxidativen Streß, die Mechanismen der Schädwirkung sowie Regulation und Umfang der antioxidativen Streßabwehr (s. Zitate in den Abschnitten 3.1, 3.2, 3.3 und 3.5). Hinzu kommt die Vielzahl von Untersuchungen zu biotisch hervorgerufenen Streß- und Abwehrreaktionen, die als Folge von Pathogen-Pflanze-Interaktionen beobachtet werden (s. Referenzen im Kapitel 3.2).

Durch abiotische Ursachen hervorgerufen und durch exogene Faktoren beeinflusst wird oxidativer Streß z.B. durch die Kombination von ungünstigen Umweltbedingungen, wie Kälte (Prasad et al. 1994), Trockenheit (Loggini et al. 1999), Salzbelastung von Böden (Dionisio-Sese und Tobita 1998), intensive Lichteinstrahlung (Karpinski et al. 1997), erhöhte UV-Dosis (Langebartels et al. 2000) oder Luft- bzw. andere Schadstoffe (Willekens et al. 1994, Langebartels et al. 2000) erzeugt. Solche Faktoren fördern das Entstehen von ROS im Metabolismus der pflanzlichen Zelle, weil Elektronen- und/oder Energietransportketten gestört werden. ROS und Radikale anderer Herkunft, die nun in erhöhter Konzentration vorliegen, schädigen wichtige zelluläre Komponenten (Lipide, Proteine, DNA), wenn sie nicht hinreichend schnell durch das antioxidative Schutzsystem entgiftet werden.

Zusätzlich bergen endogene Faktoren ein Risiko für die Bildung von ROS und anderen Radikalen in sich. Dazu zählen vor allem die Pigmente, die Lichtenergie absorbieren und weiterleiten können. Porphyrine stellen die wichtigste Klasse von Pigmenten in Pflanzen dar und spielen vor allem in Form von Chlorophyll, Häm und Phytochromobilin eine essentielle Rolle für die Konservierung und Umwandlung von (Licht)energie, die Perzeption von Lichtsignalen sowie den Schutz vor Xenobiotika und ROS. Dabei besitzen Porphyrine aber auch ein phototoxisches Potential, welches im normalen Metabolismus durch die strikte Kontrolle der Porphyrinbiosynthese und die stete Bindung der Porphyrinintermediate an Proteine gering gehalten wird. Freie Porphyrine sind in sehr viel stärkerem Umfang durch Photosensibilisierungsreaktionen zur massiven Erzeugung von Radikalen befähigt (s. 3.1.1.1).

Pathogeninfektionen sind ein Beispiel für biotische Stressoren, welche im Zuge der HR ebenfalls die massive Bildung von ROS, vor allem von  $H_2O_2$ , auslösen können. Die durch den „oxidative burst“ hervorgerufenen antioxidativen Reaktionen der Pflanze sind ein integraler Bestandteil der Pathogenabwehr, bei der durch programmierten Zelltod lokal Gewebe geopfert

wird, um das weitere Vordringen der Infektion einzuschränken (Mehdy 1994, Dangl et al. 1996, Greenberg 1996, Alvarez et al. 1998).

### **7.1 Photosensibilisierung durch Deregulation der Tetrapyrrolbiosynthese - photodynamisch erzeugter oxidativer Streß in Pflanze und Mensch**

Im Mittelpunkt der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen stand ein Modellsystem zur endogenen Erzeugung von oxidativem Streß. Genutzt wurden transgene Tabakpflanzen, in denen es wegen der Expression von Antisense-RNA für je ein Enzym der Porphyrinbiosynthese (CPO, UROD) im Vergleich zu WT-Pflanzen zum Absinken des entsprechenden Proteingehaltes und der zugehörigen Enzymaktivität kam (6.1.2, Kruse et al. 1995b, Mock und Grimm 1997). Die aus der Deregulation des Stoffwechselweges resultierende Akkumulation der Substrate und deren (per)oxidierten und photosensibilisierenden Derivaten führt sehr wahrscheinlich zur verstärkten Bildung von ROS und anderen Radikalen, die sich aus methodischen Gründen bisher einer genaueren qualitativen und quantitativen Bestimmung entzogen.

Das phototoxische Potential von isoliertem Chlorophyll auf Zellen wurde schon 1908 durch Hausmann beschrieben. Seitdem gab es vor allem bei der Analyse von Mechanismen der Photosensibilisierung an tierischen Modellsystemen große Fortschritte. Die photochemischen und -physikalischen Charakteristika von verschiedenen Tetrapyrrolen wurden in neueren Reviews durch Spikes und Bommer (1991) sowie Ochsner (1997) zusammengefaßt. Wie bereits in der Einleitung in Abschnitt 3.1.1.1 erklärt wurde, sind Porphyrine und deren Mg-haltige Derivate potente Photosensibilisatoren. Wird hingegen  $\text{Fe}^{2+}$  durch Protoporphyrin chelatiert, geht diese Eigenschaft verloren.

Die cytotoxischen Folgen der Photosensibilisierung werden normalerweise durch die strenge Kontrolle der Porphyrinbiosynthese vermieden. Wird diese Kontrolle umgangen, kommt es wie in den hier untersuchten UROD- und CPO-AS-Pflanzen zur Akkumulation von phototoxischen Intermediaten. Die Aktivität der Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO) kann durch Diphenylether-Derivate, wie z.B. Acifluorfen oder Oxyfluorfen, gehemmt werden, woraus die Anhäufung von Protoporphyrinogen und nachfolgend dessen unspezifische Oxidation zum photosensibilisierenden Protoporphyrin resultiert (Böger und Wakabayashi 1995, Knörzer et al. 1996). Diphenylether-Derivate zählen daher zu den photodynamisch wirksamen Herbiziden und werden in der Landwirtschaft zur Unkrautbekämpfung eingesetzt. Auch in Tabakpflanzen, die in ihrer PPO-Aktivität durch die Expression eines entsprechenden Antisense-Konstruktes für die

plastidäre Isoform (Lermontova et al. 1997) gehemmt sind, kommt es zu einer maximal drei- bis vierfachen Akkumulation von Protoporphyrin(ogen) mit sehr starken photodynamischen Folgen (I. Lermontova, unveröffentlicht). Die an diesem Modell beobachtete Photosensibilisierung, die im Vergleich zu den CPO- oder UROD-AS-Pflanzen vergleichbare oder sogar stärkere Auswirkungen hat, obwohl in jenen Pflanzen die Enzymsubstrate bis zum Tausendfachen des WT-Niveaus akkumulieren, steht wahrscheinlich mit zwei wichtigen Eigenschaften des Protoporphyrin(ogen)s in Verbindung. Erstens hat dieses im Vergleich zu Uro- oder Coproporphyrin(ogen) die größte Lipophilie, d. h. kann besonders wirkungsvoll Membranschäden durch die Initiierung von Lipidperoxidation auslösen. Zweitens muß ein Transportmechanismus postuliert werden, der in den Mitochondrien benötigtes Protoporphyrinogen für den dort lokalisierten Zweig der Hämbiosynthese aus den Plastiden ausschleust (s. 3.4.1). Somit wird die schnelle Verbreitung von photosensibilisierendem Protoporphyrin(ogen) in der ganzen Zelle möglich, zumal das bisher unbekannte Transportsystem wegen der Anhäufung von Protoporphyrin(ogen) im Plastiden überlastet wird. Wahrscheinlich sind vor allem Peroxidasen für die Oxidation der Porphyrinogene außerhalb des Plastiden verantwortlich (Jacobs et al. 1996).

Photosensibilisierung wird auch nach der Inkubation von Blattgewebe mit der frühen Zwischenverbindung ALA beobachtet (Härtel et al. 1996). Hier kommt es zur Anhäufung von größeren Mengen an photosensibilisierendem Protochlorophyllid in der Dunkelphase, weil die *feedback*-Regulation der geschwindigkeitsbestimmenden ALA-Synthese umgangen wird. Protochlorophyllid als spätes Intermediat mit photodynamischen Potential kann nun akkumulieren, da dessen enzymatische Reduktion durch die POR ebenfalls in einer lichtabhängigen Reaktion erfolgt, alle anderen Reaktionsschritte zwischen ALAD und POR hingegen nicht licht-reguliert sind (s. Biosyntheseweg in Abb. 3 und Abschnitt 3.4.2.).

Seit längerem ist eine Reihe von Mutanten bekannt, in denen es zur Deregulation der Porphyrinbiosynthese kommt. Durch die Mutation in vier unterschiedlichen Genen der Gerste (*tigrina-b*, *-d*, *-n* und *-o*) wird die Synthese von ALA dereguliert, so daß bereits in etiolierten Keimlingen Protochlorophyllid vorliegt, dessen Menge normalerweise durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ALA-Synthese bestimmt wird. Der Überschuß an ungebundenem Protochlorophyllid führt bei der Belichtung der Pflanzen zu photodynamischen Schäden, da aus Kapazitätsgründen der sofortige enzymatische Umsatz durch die POR nicht möglich ist. Die resultierenden gebleichten und oft nekrotischen Streifen, die den Mutanten ihren Namen geben, sind, wie auch die Effekte, die bei der Inkubation von Blättern mit ALA auftreten (s.o.), auf die phototoxische Wirkung des Protochlorophyllids zurückzuführen (Nielsen 1974).

Bei den ebenfalls bei Gerste beschriebenen Gendefekten *xantha-I* und *viridis-k* handelt es sich

wahrscheinlich um Mutationen in einem Gen, welches homolog zum *bchE* (d.h. der Cyclase) aus *Rhodobacter* ist. Wird dessen Expression in den Bakterien unterdrückt, kommt es nicht zur Ausbildung von Ring V des Porphyringerüsts, und Mg-Protoporphyrin-Monomethylester wird sekretiert (Henningsen et al. 1993).

Bereits in der Einleitung erwähnt wurde die Les22-Mutante bei Mais, die einen genetischen Defekt im UROD-Gen hat. Daraus resultiert ein Anstau von Uroporphyrin(ogen), der zu lokal begrenztem Zelltod und deshalb zum „Disease Lesion Mimic“-Phänotyp führt (Hu et al. 1998).

Porphyrien sind vererbare Erkrankungen, die durch Defekte in einem der acht Gene der Hämbiosynthese im Menschen (und Tier) verursacht werden (Elder 1993). Porphyrien können auch chemisch ausgelöst werden (Ockner und Schmid 1961). Die Leber und erythropoetische Zellen haben den höchsten Bedarf an Häm und sind deshalb vorrangig bei der Ausprägung von Porphyria-Erkrankungen betroffen. In Porphyria-Patienten kann die Konzentration von Protoporphyrin in den Erythrozyten im millimolaren Bereich liegen, und akkumulierende Pigmente mit den charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften der Porphyrine können sich z.B. in der Leber in Form von kristallinen Strukturen ablagern (s. Referenzen in Mock et al. 2000). Die meisten Porphyrien beim Menschen sind von Lichtempfindlichkeitssymptomen der Haut begleitet, da die Porphyrine im ganzen Körper verteilt werden. Endothelzellen können auf diese Weise photosensibilisiert werden. Während in Pflanzen praktisch alle überirdischen Teile dem Licht ausgesetzt sind und damit die Entwicklung von photodynamischen Schäden bis hin zum Absterben des gesamten Organismus begünstigt wird, bleiben die Symptome beim Menschen vorrangig auf die Haut beschränkt.

Wird die photosensibilisierende Wirkung von Porphyrinen hingegen in der photodynamischen Therapie (PDT) ausgenutzt, werden die von Tumoren betroffenen und deshalb zu behandelnden Organe nach der direkten Verabreichung oder durch Inhibitoren verursachten Akkumulation der Porphyrine z.B. endoskopisch mit Licht versorgt, wodurch ROS und andere Radikale im Gewebe entstehen. Neoplastisches Gewebe, das metabolisch sehr aktiv ist und deshalb große Mengen der Porphyrine anhäuft, wird auf diese Weise zerstört (s. Referenzen in Mock et al. 2000).

Der relative Anteil des Typ I bzw. Typ II-Mechanismus der Photosensibilisierung (s. Gl. 6-12) an der toxischen Wirkung hängt stark von der lokalen Sauerstoffkonzentration, d.h. von der Mikroumgebung der Porphyrine ab. Während die Photoinaktivierung von Enzymen der Hämbiosynthese in Erythrozyten-Hämolysat durch Uroporphyrin vorrangig über einen Typ I-, d.h. radikalischen Mechanismus verlief (Alfonso et al. 1996), zeigten Studien an Erythrozyten-Hüllen („ghosts“), daß die porphyrin-induzierte Lipidperoxidation durch einen Typ II-Mechanismus, d.h. unter Einbeziehung von Singulett-Sauerstoff erfolgte (Bachowski et al.

1988). Die Lipophilität der verschiedenen Porphyrine bestimmt in hohem Maße deren zelluläre Verteilung und phototoxische Effizienz. In einem Vergleich der photodynamisch verursachten Schäden an Gefäßen durch Uro-, Copro- und Protoporphyrin zeigte nur das am meisten lipophile Protoporphyrin *in vitro* einen phototoxischen Effekt auf Endothelzellen (Strauss et al. 1995). Dies stimmt gut mit der bereits erwähnten Beobachtung überein, daß eine im Vergleich zum WT nur drei- bis vierfache Akkumulation von Protoporphyrin(ogen) in PPO-AS-Pflanzen gleich starke photodynamische Folgen hat (I. Lermontova, unveröffentlicht), wie die bis zu tausendfache Anhäufung von Uro- bzw. Coproporphyrinogen in jenen Pflanzen, die Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen waren.

## 7.2 Porphyrin-akkumulierende Tabakpflanzen als Modellsystem der Photosensibilisierung

Auch die Ausbildung von Blattläsionen an UROD- und CPO-AS-Pflanzen war entscheidend von den Faktoren Licht und Sauerstoff abhängig. So kommt es erst bei Überschreitung eines bestimmten Grenzwertes der eingestrahlt Lichtmenge zur Entwicklung von Nekrosen (Lichtshift-Experiment, s. 6.2.1.1). Diese können aber nur entstehen, wenn Sauerstoff verfügbar ist, was daraufhin deutet, daß ROS und deren Folgeprodukte in hohem Ausmaß für die photodynamisch ausgelösten Schäden verantwortlich sind (s. 6.2.1.3). Zusätzlich werden die photochemischen Reaktionen durch erhöhte Temperaturen (z.B. 32°C anstatt 25°C) beschleunigt, wobei es in Verbindung mit vergrößerten Lichtdosen praktisch zum völligen Absterben der Blätter und damit rasch zum Tod der Pflanze kommt (s. 6.2.1.2).

Durch die Kombination von molekularbiologischen, biochemisch-analytischen und physiologischen Methoden sollten die Auswirkungen von photodynamisch ausgelöstem oxidativen Streß in UROD- und CPO-AS-Pflanzen untersucht werden. Es wurden dabei sowohl Pflanzen analysiert, die bereits den charakteristisch nekrotischen Phänotyp ausgebildet hatten als auch Pflanzen, in denen durch die Verlängerung der Lichtperiode die Ausprägung von Blattläsionen erst induziert wurde.

Dieser als Lichtshift-Experiment bezeichnete Versuch bietet als induzierbares Modellsystem Vor- und Nachteile: Oxidativer Streß kann in den bis dahin dem WT phänotypisch gleichen UROD- bzw. CPO-AS-Pflanzen durch einfache Erhöhung der Lichtdosis ausgelöst werden. Es kommt zur raschen Ausbildung von Nekrosen, die bei anschließender Verringerung der Lichtintensität oder Verkürzung der Lichtperiode gestoppt wird, d.h. die Photosensibilisierung des Blattgewebes kann in gewissem Umfang ein- und ausgeschaltet werden (6.2.1.1). Dabei

bedarf dieses System keiner externen Applikation von Chemikalien wie z.B. Herbiziden oder Luftschadstoffen. Einschränkend muß bemerkt werden, daß es auch in den kurzen Lichtperioden bereits zur Anhäufung von Uro- bzw. Coproporphyrin(ogen) kommt (H.-P. Mock, unveröffentlicht), die aber offensichtlich nicht zu photodynamischen Konsequenzen führen. In den jeweils folgenden Dunkelperioden werden die Porphyrin(ogen)e wahrscheinlich in Richtung der Endprodukte metabolisiert, wenn der Zustrom weiterer Substrate wegen der Lichtabhängigkeit der ALA-Synthese unterbrochen, der weitere Biosyntheseweg bis zur POR aber auch im Dunkeln aktiv ist. So wird z.B. bei der HPLC-Analyse von Porphyrinen aus Extrakten von UROD-AS-Pflanzen kurz nach Beginn der Dunkelperiode neben dem schnell abfallenden Niveau von Uroporphyrin(ogen) auch die transiente Akkumulation von Protoporphyrin(ogen) beobachtet (H.-P. Mock, persönliche Mitteilung). Beim Vergleich von UROD-AS-Pflanzen, die aus einem Tagesrhythmus von 6h Licht/18h Dunkel entweder in 18h Licht/6h Dunkel oder 3x (6h Licht/2h Dunkel) überführt wurden, weisen letztere trotz der insgesamt gleichen Gesamtblichtungsdauer von 18h weniger Nekrosen auf als die Vergleichsgruppe, was ebenfalls für eine rasche Metabolisierung und/oder Entgiftung der innerhalb der 6h Lichtphase angestauten Porphyrin(ogen)e spricht (H.-P. Mock, persönliche Mitteilung).

Somit scheint die Auslösung von massivem, photodynamisch verursachtem oxidativen Streß unter veränderlichen Lichtbedingungen ein Schwellenwerteffekt zu sein. Bis zu einem bestimmten Niveau der Akkumulation von Uro- bzw. Coproporphyrin(ogen) sind die Chloroplasten in der Lage, Photosensibilisierungsreaktionen zu verhindern. Bei der Überschreitung der Konzentrationsschwelle kommt es hingegen sehr schnell zu den phototoxischen Wirkungen der Porphyrine.

### **7.3 Identifizierung und Charakterisierung von Genen, deren Expression frühzeitig als Reaktion auf die Photosensibilisierung induziert wird**

Ein wesentliches Ziel der Arbeit bestand darin, Gene zu identifizieren, die zu einem frühen Zeitpunkt der Photosensibilisierung exprimiert werden, so daß ihre Transkripte akkumulieren. Zu diesem Zweck wurde mittels der Subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH; Clontech PCR-Select Kit) eine subtrahierte cDNA-Bank angelegt und diese auf tatsächliche differentielle Expression der Gene überprüft (s. 5.7.3,6.2.2). Die Bestätigungsrate von 11,7 % (s. 6.2.2.1) liegt im Rahmen dessen, was im Handbuch zum Kit beschrieben wird. In der Literatur finden sich bisher nur zwei Berichte über den erfolgreichen Einsatz dieser Methode bei der Isolation von differentiell exprimierten Genen aus Pflanzen (Kim et al. 1999a, b). Allerdings wurden bei

einem PCR-Select-Anwenderseminar, das durch die Fa. Clontech im November 1999 in Heidelberg organisiert wurde (1<sup>st</sup> Heidelberg Application Meeting) von verschiedenen Teilnehmern Zahlen zur Effizienz der Methode beim Einsatz in ihren Modellsystemen genannt. Während beim Vergleich der Genexpression in tierischen Zelllinien, die entweder mit Chemikalien oder Effektoren behandelt oder aber auch durch Herpesviren infiziert worden waren, sehr hohe Bestätigungsraten von bis zu 70 % berichtet wurden (z.B. Böhm 1999), war die Effizienz der Methode bei der Subtraktion von cDNA aus verschiedenen Pflanzenorganen deutlich geringer (z.B. 10 % Bestätigungsquote der differentiellen Genexpression beim Vergleich von WT- mit *Arabidopsis*-Pflanzen, die einen Hitzeschockfaktor konstitutiv exprimieren; Prandl et al. 1998, Leisgen et al. 1999). Wie auf dem Seminar durch die an der Entwicklung der Technik wesentlich beteiligte L. Diatchenko bestätigt wurde, hängt die Effizienz der Subtraktion mit dieser Methode stark von der Komplexität der zu vergleichenden cDNA-Populationen ab und ist um so besser, je geringer die Unterschiede sind (z.B. Zelllinien, einzellige Grünalgen; Happe 1999).

Die in den photosensibilisierten Pflanzen frühzeitige Transkriptakkumulation von Genen unterschiedlichster Funktion weisen auf die breit angelegte Aktivierung verschiedenster Stoffwechselwege hin. Dabei dienen die wahrscheinlich wegen erhöhter mRNA-Synthese akkumulierenden Transkripte sowohl dem Ausgleich von Verlusten an redox-sensitiven Proteinen, als auch der *de novo* Aktivierung von zusätzlichen Schutzkomponenten. Die besonders häufig vorhandenen Vertreter von Chaperonen, PR-Proteinen sowie ZW-modifizierenden oder zelltod-assoziierten Proteinen deuten an, daß in den Pflanzen nach der Verlängerung der Lichtphase einerseits den photodynamisch verursachten Schäden unmittelbar begegnet werden muß, andererseits aber auch Pathogenabwehr-Reaktionen kreuzinduziert werden. Für letzteres spricht auch das Vorhandensein von Resistenzgen-Homologen in der subtrahierten cDNA-Bank (s. 6.2.2.2).

Die Präsenz von Genen, die Homologien mit Transkriptionsfaktoren aufweisen, belegt die Fähigkeit der SSH, sehr seltene Gene zu identifizieren. Gleichwohl können jene Transkriptionsfaktoren, die für die schnelle Aktivierung der Expression der in der Bank befindlichen Gene verantwortlich sind, mit dem gewählten methodischen Ansatz vermutlich nicht nachgewiesen werden, da sie zu Beginn der Photosensibilisierung bereits als inaktive Proteine vorliegen, welche sehr rasch aktiviert werden können. Die in die cDNA-Bank aufgenommenen Transkriptionsfaktoren stellen somit wahrscheinlich erst das Folglied einer Transkriptionsaktivierungs-Kaskade dar, in der in einem ersten Schritt von Anfang an vorhandene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Durch deren Wirkung wird dann die Transkription von Zielgenen induziert, welche entweder eine direkte Funktion in Schutzsystemen haben (Chaperone, PR-Proteine) oder wiederum als Transkriptionsaktivatoren

für die nächste Stufe des regulatorischen Netzwerkes wirken. In diesem komplexen Netzwerk spielt eine Vielzahl von teilweise noch unbekanntem Nicht-Protein-Komponenten (z.B. niedermolekulare Signale wie  $\text{Ca}^{2+}$ , GTP,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hormone) eine wichtige Rolle (s. 3.2), die mit der SSH-Methode ebenfalls nicht erfaßt werden können.

Ausgewählte Gene der differentiellen cDNA-Bank waren auch durch andere Stressoren induzierbar (s. 6.2.2.5), was darauf hinweist, daß die Genprodukte eine allgemeine Funktion bei oxidativem Streß haben. Für eine Vielzahl der Klone wurde die Streßinduzierbarkeit in der Literatur bereits beschrieben (s. Zitate in Tab. 10).

Der anfänglich verfolgte Ansatz der Komplementation von Hefezellen mit pflanzlicher cDNA zur Erhöhung der Toleranz gegenüber Oxidationsmitteln (s. 5.7.11, 6.4) ist generell nur bedingt dazu in der Lage, auch Komponenten zu identifizieren, die in frühen Stadien von oxidativem Streß von essentieller Bedeutung sind. Da keine normalisierte cDNA-Bank transformiert wurde, in der auch seltene Gene, wie z.B. Transkriptionsfaktoren ausreichend vertreten wären, ist es eher wahrscheinlich, daß Strukturkomponenten, wie z.B. die ZW-modifizierende Pectinacetyltransferase, isoliert werden (s. 6.4). Auch in den veröffentlichten Berichten gelang mit dieser Technik unter unterschiedlichen Streßbedingungen, welchen die Hefezellen ausgesetzt waren, ausschließlich die Identifizierung von Enzymen, die das Überleben der Transformanten ermöglichten. So verliehen eine NADPH-Oxidoreduktase (Babiychuk et al. 1995), ein DnaJ-homologes Chaperon, die dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase (s. auch cDNA-Klon in Tab. 10) sowie eine  $\gamma$ -Glutamyltransferase aus *A. thaliana* (Kushnir et al. 1995) wachsenden Hefezellen eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Thiol-Oxidationsmittel Diamid. Ein bisher unbekannter Transmembran-Kupfer-Transporter machte die Zellen hingegen resistenter gegenüber erhöhten und deshalb für den WT letalen Kupferkonzentrationen im Medium (Kampfinkel et al. 1995).

Konnten interessante Gene identifiziert werden, die vielleicht sogar regulatorische Bedeutung haben, bietet es sich an, ihre Funktion in transgenen Pflanzen zu untersuchen. Dafür stehen sowohl der Antisense- als auch Überexpressionsansatz zur Verfügung. Während bei letzterem untersucht wird, was die Auswirkungen des nun vermehrt vorkommenden und meistens unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors stehenden Zielproteins in der Pflanze sind, werden bei der Antisense-Strategie die Folgen einer abgestuften Defizienz analysiert. Hierbei wird die Untersuchung von Folgen des graduellen Mangels auch an absolut essentiellen Proteinen möglich und das Überleben der Transformanten gesichert, während der komplette Ausfall des Genprodukts in Mutanten oft letal ist.

Die Untersuchung von UROD- und CPO-AS-Pflanzen erwies sich als äußerst ergebnisreich, weswegen für die zwei aus der cDNA-Bank ausgewählten Gene GRP und HAP5 zuerst auch der Antisense-Ansatz gewählt wurde. Das GRP-Gen war vor allem deshalb für eine genauere

Analyse in transgenen Pflanzen ausgewählt worden, weil es in so großer Kopienzahl in der cDNA-Bank vorlag, woraus auf eine besondere Bedeutung des Proteins unter Streßbedingungen geschlossen wurde. Bei den bisher vorgenommenen Untersuchungen an GRP-AS-Pflanzen konnten allerdings keine auffälligen Veränderungen im Vergleich zu WT-Pflanzen beobachtet werden (s. 6.3). Mehrere, strukturell unterschiedliche Familien von GRP-Genen sind bekannt, von denen einige ZW-assoziert, andere aber cytosolisch lokalisiert sind (Keller et al. 1988). Vertreter einer dritten Gruppe besitzen ein N-terminales RNA-Bindemotiv (Mortenson und Dreyfuss 1989, Sturm 1992). Vor allem die ZW-assozierten Genprodukte sind durch verschiedene Stressoren induzierbar (s. Tab. 10; Van Kan et al. 1988, Showalter et al. 1992, Brady et al. 1993, Neale et al. 2000). Bei der Vielzahl von GRP-Genen mit teilweise redundanter Funktion kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere Vertreter der Genfamilie die Funktion des durch Antisense-Suppression inhibierten Genprodukts übernehmen.

Mit der Manipulation des Expressionsniveaus der Untereinheit 5 des Transkriptionsfaktors HAP/NF-Y war die Hoffnung verbunden, ein wesentliches Stellglied in der zweiten Reihe von aktivierenden Faktoren zu beeinflussen und damit einer funktionellen Untersuchung zugänglich zu machen. Aus Pflanzen liegen bisher nur wenige Erkenntnisse zu streßregulierten Transkriptionsfaktoren vor. Bereits erwähnt wurden die HSF, welche die Expression von HSP unter den Bedingungen des Hitzeschocks regulieren (s. 3.2.3). Aus den sehr viel genauer charakterisierten mikrobiellen und tierischen Modellsystemen ist aber bekannt, daß Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt durch den zellulären Redoxzustand aktiviert bzw. deaktiviert werden können (Jamieson und Storz 1997, Gabbita et al. 2000).

In *E. coli* wird die Expression von mindestens 9 Genen, unter ihnen *gorA*, welches die GR codiert, durch den Transkriptionsfaktor OxyR kontrolliert. OxyR, der auch als Repressor, z.B. bei seiner eigenen Transkription wirken kann und der sich somit autoreguliert, ist nur in seiner oxidierten Form ein Transkriptionsaktivator. Direkte Oxidation ist der wahrscheinlichste Mechanismus, durch den die Zellen  $H_2O_2$  quantifizieren und letztendlich das *oxyR*-Regulon induziert wird. Ein weiteres Beispiel für redox-responsible Kontrolle der prokaryotischen Transkriptionskontrolle ist das ebenfalls in *E. coli* am besten untersuchte SoxR/SoxS-System, welches die Hauptkomponente der Adaptation an erhöhte Mengen von Superoxid darstellt. Die direkt an der Entgiftung von  $\bullet O_2^-$  beteiligte Mn-SOD sowie die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, welche für die Erhöhung der Reduktionskapazität in Form von zusätzlich bereitgestelltem NADPH in der Zelle verantwortlich ist, zählen zu den Genprodukten des *soxRS*-Regulons. Die Kontrolle der Transkription ist ein zweistufiger Mechanismus: Zuerst wird das Eisen-Schwefel-Protein SoxR entweder durch  $\bullet O_2^-$ -vermittelte Oxidation des Fe-S-Zentrums oder aber Akquirierung von zusätzlichem Fe aktiviert, welches aus  $\bullet O_2^-$ -geschädigten, Fe-haltigen Proteinen freigesetzt wird. Durch die Aktivierung wahrscheinlich in seiner

Konfirmation verändertes OxyR sorgt dann für eine Verstärkung der Transkription von oxyS, welches letztendlich die Expression der Zielgene reguliert. OxyS scheint ebenfalls die Fähigkeit zur Autoregulation zu besitzen (s. Review von Jamieson und Storz 1997 und die darin zitierten Referenzen).

Zwei sehr gut untersuchte Beispiele für eukaryotische, redox- und deshalb ROS-responsible Transkriptionsfaktoren sind NF- $\kappa$ B und AP-1. Der nukleäre Faktor (NF)- $\kappa$ B ist ein oligomeres Protein, das eine Vielzahl von Genen aktiviert, die in die frühe Phase von zellulären Abwehrreaktionen in tierischen Zellen involviert sind. Das NF- $\kappa$ B-Dimer liegt im Cytoplasma an den Inhibitor I $\kappa$ B gebunden in inaktivem Zustand vor. Bei der Stimulierung, die vielfältige Ursachen haben kann (u.a. Behandlung mit IL-1, TNF, UV), wird der Inhibitor phosphoryliert, und der Komplex aus NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B löst sich auf. Daraufhin kann NF- $\kappa$ B in den Kern wandern, wo es die Transkription von verschiedenen Genen induziert. Dieses Transkriptionssystem kann direkt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert und durch Reduktionsmittel (wie z.B. N-Acetyl-L-Cystein) deaktiviert werden. Für die redoxabhängige (De)phosphorylierung von I $\kappa$ B ist eine komplexe Kaskade von Protein-Kinasen und -phosphatasen verantwortlich (s. Review von Gabbita et al. 2000 und die darin vorhandenen Zitate).

Auch die Aktivität des aus Homo- bzw. Heterodimeren von Jun- und Fos-Proteinen zusammengesetzten Transkriptionsfaktors AP-1 ist strikt redox-reguliert. Unter der Kontrolle von AP-1 stehen Gene, die für Zellproliferation und Apoptose verantwortlich sind. Mehrere unabhängige Wege der Regulation von AP-1 sind bekannt. Die c-Jun-Untereinheit (in *S. cerevisiae* auch als YAP1 bekannt) wird durch die c-Jun-spezifische NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK) an mehreren Resten phosphoryliert und damit AP-1 aktiviert. JNK gehört zur großen Gruppe der MAP-Kinasen und unterliegt wiederum selbst einer redoxabhängigen Kontrolle der Aktivität. Endprodukte der Lipidperoxidation, wie z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal können das auslösende Moment für diese Art der Aktivierung sein (Uchida et al. 1999). Ein unabhängiger Mechanismus, der die AP-1-Aktivität beeinflusst, besteht in der reversiblen Oxidation eines konservierten Cys-Restes in der DNA-Bindedomäne von Fos und Jun. Schließlich wurde auch die Existenz eines ubiquitären, nukleären Redoxfaktors bekannt (Ref-1), der den Redoxzustand von Fos und Jun zusätzlich beeinflusst. Ref-1 ist in der Lage, die Bindung von AP-1 an DNA thioredoxin-abhängig zu induzieren. Zu diesem Zweck wird Thioredoxin, das sich normalerweise im Cytoplasma befindet, nach bestimmten Stimuli in den Kern transportiert, wo es mit Cys-Resten von AP-1 interagiert und diese dabei reduziert. Somit gibt es in tierischen Zellen mit dem Cytosol und Kern mindestens zwei Kontrollstellen, an welchen der Aktivierungszustand von AP-1 reguliert werden kann (s. Review von Gabbita et al. 2000 und die darin vorhandenen Zitate).

Auch die Oligomerisierung des heterotrimeren Transkriptionsfaktors NF-Y/HAP und dessen DNA-Bindeeigenschaften sind redox-kontrolliert (s. Tab. 10; Nakshatri et al. 1996), worauf auch der aus Untersuchungen in Hefe stammende Name „Heme activated protein“ (HAP) bereits hinweist. Die Transkription einer Vielzahl von Genen steht unter der Kontrolle von HAP, wobei die spezifische CAATT-Box nicht nur in den Promotoren von Genen vorkommen, die unter Streßbedingungen von Bedeutung sind. Im Genom von *A. thaliana* sind multiple Formen von jeder Hap-Untereinheit codiert (Edward et al. 1998). Neben einem weiteren Gen, dessen Produkt mit der CAATT-Box in unmittelbarem Zusammenhang steht (CAATT Displacement Protein (CDP), s. Tab. 10) befindet sich in der subtrahierten cDNA-Bank ein Klon, der homolog zur Isoform Hap5b der Untereinheit 5 (=NF-YC) ist. Durch die Expression eines Antisense-Konstruktes von Hap5b unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in Tabak sollen Einblicke in die Funktion dieser Untereinheit ermöglicht werden. Zu diesem Zeitpunkt wird gerade die Regeneration von transgenen Pflänzchen nach der Transformation von Blattscheiben abgewartet (s. 5.7.8, 5.7.9).

In Erweiterung der Untersuchung von AS-Pflanzen für GRP und Hap5 wird es auch interessant sein, die Folgen von Überexpression dieser Proteine auf Pflanzen zu studieren und außerdem durch die Herstellung von rekombinanten Proteinen in Bakterien die Herstellung von spezifischen Antikörpern zu ermöglichen. Die Erstellung und funktionelle Überprüfung von entsprechenden Konstrukten ist ein Nahziel der weiteren Arbeit. Aus der wissenschaftlichen Literatur sind Beispiele bekannt, bei denen durch die Überexpression von Transkriptionsfaktoren die Streßtoleranz von Pflanzen deutlich erhöht werden konnte. Der Faktor DREB1A bindet an das „Dehydrierungs-responsible Element“ (DRE) vieler in das System der Trockentoleranz involvierten Gene und aktiviert deren Transkription. Durch die Überexpression von DREB1A unter der Kontrolle des ebenfalls streß-induzierbaren rd29A-Promotors in *A. thaliana* und die dadurch nur unter Streßbedingungen verstärkte Expression der Zielgene sind die transgenen Pflanzen toleranter gegenüber Trockenheit, erhöhter Salinität und Kälte (Kasuga et al. 1999). Die unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehende und damit konstitutive Expression eines wurzelspezifischen Transkriptionsfaktors Alfin1 in Lupine (*M. sativa*), der u.a. die Aktivität des salz-induzierbaren MsPRP2-Gens reguliert, hatte ebenfalls eine positive Wirkung auf die Salztoleranz dieser Kulturpflanzenart und verbesserte außerdem noch das Wurzelwachstum unter streßarmen Umweltbedingungen (Winicov und Bastola 1999, Winicov 2000).

Im Zusammenhang mit den Ausführungen zur Redoxkontrolle von Transkriptionsfaktoren, die Thioredoxin und redox-regulierte Protein-Kinasen bzw. -Phosphatasen einbezieht, soll an dieser Stelle noch einmal die Tatsache erwähnt werden, daß durch Photosensibilisierung in den CPO-AS-Pflanzen auch die Expression von Thioredoxin, einer Protein-Kinase und einer Protein-

Phosphatase 2C induziert wird und cDNA-Klone dieser Gene deshalb Bestandteil der cDNA-Bank sind (s. Tab. 10).

#### **7.4 Chronologische Betrachtung der Folgen von Photosensibilisierung in porphyrin-akkumulierenden Tabakpflanzen**

Die biochemisch-physiologischen Analysen hatten das Ziel, generelle Auswirkungen der Photosensibilisierung zu untersuchen und vor allem Aussagen über den Aktivierungszustand des antioxidativen und Pathogenabwehr-Systems zu ermöglichen. An dieser Stelle sollen die bisher getrennt dargestellten Ergebnisse zusammengefaßt werden, die aus den Untersuchungen an Pflanzen stammen, die einen bereits vollständig ausgeprägten nekrotischen Phänotyp aufweisen (s. 6.1) oder die diesen Phänotyp im Lichtshift-Experiment gerade entwickeln (s. 6.2).

Nach Verlängerung der Lichtperiode, noch vor dem Auftreten erster sichtbarer Nekrosen kommt es zu Symptomen, die normalerweise vor allem als Folge von Pathogeninfektionen beobachtet werden. Die differentielle cDNA-Bank enthält z.B. eine Reihe von Genen für PR-Proteine, Resistenzfaktoren und andere zelltod-assoziierte Proteine (s. 6.2.2.2), die bereits 12-16h nach Beginn des Lichtshift-Experiments auch im Northern Blot als differentiell exprimiert erkennbar sind (s. 6.2.2.3). Auch die PR-Proteinmenge steigt rasch an, wie z.B. im Western Blot für PR-1 und Sesquiterpen-Cyclase bereits nach 12h gezeigt wurde (s. 6.5.3.2). Phenolische Verbindungen, die in Zusammenhang mit Pathogenese-Prozessen stehen (s. 3.2), akkumulieren ebenfalls sehr schnell, nachdem die Pflanze durch veränderte Lichtbedingungen photosensibilisiert wird. So ist die Anhäufung von Scopolin und SA bereits nach 12-16h nachweisbar (s. 6.5.3.1). Diese Indizien deuten an, daß bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt durch Photosensibilisierung eine Kreuzinduktion der Pathogenabwehr erfolgt. Eine solche gemeinsame Reaktion des Systems von antioxidativer und Pathogenabwehr wird auch bei der Behandlung von Pflanzen mit Ozon beobachtet (Langebartels et al. 2000).

In diesem frühen Stadium von photodynamisch verursachtem Streß im Modellsystem des Lichtshift-Experiments reagieren die klassischen antioxidativen Schutzenzyme auf Transkriptebene noch nicht bzw. weniger ausgeprägt (s. 6.2.2.4). Alternativ kann auch spekuliert werden, daß die im Kurztag jeweils vorübergehend auftretende Akkumulation von Porphyrin(ogen)en bereits im Vorfeld des Lichtshift-Experiments zu einer ebenfalls nur transienten Aktivierung der Genexpression geführt hat. Diese könnte ausreichen, um dem unter Kurztagbedingungen nur unterschwellig existenten, oxidativen Streß zu begegnen.

Erst mit der Veränderung der Lichtbedingungen während des Lichtshift-Experiments entwickelt sich oxidativer Streß in größerem Ausmaß, auf den anfänglich aber nur wenige Gene des antioxidativen Schutzsystems reagieren. So kommt es nur bei der plastidären Fe-SOD 12h nach Beginn des Lichtshift-Experiments zur Transkriptakkumulation in den CPO-AS-Pflanzen. Bei der CAT2 beobachtet man bereits von Anfang an eine Anhäufung von Transkript in den CPO-AS-Pflanzen. Andere Gene des antioxidativen Abwehr reagieren hingegen nur transient und in WT- und CPO-AS-Pflanzen gleichermaßen auf die veränderten Lichtbedingungen (s. 6.2.2.4).

Die korrespondierenden Enzymaktivitäten hingegen zeigen bereits an den ersten Tagen des Lichtshift-Experiments Unterschiede zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen. So steigt die Aktivität verschiedener Isoformen der SOD in den porphyrischen Pflanzen schon innerhalb der ersten 24h nach Veränderung der Lichtbedingungen an (s. 6.5.2.1), und auch die APX reagiert bereits am ersten Tag des Experiments auf die einsetzende Photosensibilisierung (s. 6.5.2.2).

Beim Vergleich der Proteinmengen für cytosolische APX und CAT1 im Western Blot sind allerdings in den ersten Tagen der Photosensibilisierung keine Unterschiede zwischen WT- und CPO-AS-Pflanzen sichtbar (s. 6.5.2.3).

Es gibt bereits in den ersten Stunden des Lichtshift-Experiments Unterschiede in den Gehalten bzw. Redoxverhältnissen der niedermolekularen Antioxidantien Ascorbat, Glutathion und Tocopherol, die latent vorhandenen, oxidativen Streß vermuten lassen (s. 6.5.2.4). Auch bei der durch die Inhibition der PPO durch Oxyfluorfen verursachten Photosensibilisierung einer Sojabohnen-Zellkultur kommt es rasch zu Veränderungen im Redoxverhältnis und Gesamtgehalt der Antioxidantien (Knörzer et al. 1996). Die meisten Autoren berichten von Veränderungen in diesen Parametern unter verschiedenen Streßbedingungen (s. Zitate in 3.3).

Als weiterer Indikator für den bereits sehr früh einsetzenden oxidativen Streß weisen die ansteigenden Mengen von TBA-RS bzw. Ethan auf verstärkte Lipidperoxidation und daraus resultierende Membranschäden hin (s. 6.5.2.5). Der Gefahr von Mißfaltung und anderen oxidativen Schäden an Proteinen wird in den CPO-AS-Pflanzen auch durch die Induktion von Genen begegnet, die für Chaperone kodieren. Die Akkumulation von Transkripten z.B. für Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels aber auch für ribosomale Proteine zeigt, daß durch die einsetzende Photosensibilisierung umfassende Veränderungen im zellulären Metabolismus ausgelöst werden (s. 6.2.2.2, 6.2.2.3).

Die Konzentration von  $H_2O_2$  steigt als Reaktion auf die veränderten Lichtbedingungen innerhalb der ersten 24h des Lichtshift-Experiment sowohl in WT- als auch in CPO-AS-Pflanzen an und schwingt danach – wie auch die Mehrzahl der anderen biochemischen Parameter – im weiteren Verlauf des Experiments im Tagesgang (s. 6.5.3.1). Dabei kann aber vermutet werden, daß besonders in den Zellen und Blattabschnitten, die kurz vor dem Absterben stehen, die

Konzentration des Wasserstoffperoxids besonders hoch ist. Dieser „oxidative Burst“ wird jedenfalls lokal im Bereich der Infektion von Pathogenen (s. 3.2.1; Mehdy 1994, Mehdy et al. 1996, Alvarez et al. 1998), aber auch vor anderen Ereignissen beobachtet, die mit dem Tod von Zellen enden (z.B. die Ausbildung von Läsionen infolge der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation in CAT-AS-Pflanzen, Chamnongpol et al. 1996, Takahashi et al. 1997). Weil die präsymptomatische Visualisierung von zukünftigen Nekroseorten bisher ohne Erfolg blieb (s. 6.5.4.1, 6.5.4.2), wurde für die Analysen Probenmaterial eingesetzt, das sich aus mehreren Blättern von verschiedenen Pflanzen zusammensetzt. Daher ist im Einzelnen nicht bekannt, wie groß der Anteil des kurz vor der Nekrotisierung stehenden Blattgewebes ist (s. 5.4.2).

Jedenfalls könnte die schnelle Aktivierung von Pathogenabwehr-Reaktionen (Induktion und Akkumulation von PR-Proteinen, SA und Scopolin) durch die massenhafte Erzeugung von ROS, insbesondere von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöst werden. Dabei bleibt die Anhäufung von Scopolin und SA (Mock et al. 1999) sowie von PR-Proteinen (H.-P. Mock, unveröffentlicht) auf die nekrotischen Bereiche im Blatt beschränkt. Eine systemische Ausbreitung, wie sie bei der SAR beobachtet wird (s. 3.2.1), findet hingegen nicht statt.

Schreitet die Nekrotisierung im Verlauf des Lichtshift-Experiments voran, bzw. wurden die porphyrischen Pflanzen von Anfang an unter nekrose-induzierenden Bedingungen kultiviert, beobachtet man neben der erhöhten Aktivität der meisten von den untersuchten Enzyme der antioxidativen Streßabwehr (s. 6.1.3.1.2) auch eine deutliche Induktion der Genexpression auf Transkript- und Proteinebene (s. 6.1.3.1.3). Auf diese Weise soll offensichtlich der permanent erhöhte Bedarf an Entgiftungskapazität gedeckt werden. Wegen der gesteigerten APX-Aktivität (s. 6.1.3.1.2) ist auch der Bedarf an Ascorbat erhöht, wobei Gesamtgehalt und Redoxverhältnis aber trotz der Aktivierung des regenerativen Systems (MDAR, GR) nicht aufrechterhalten werden (s. 6.1.3.1.4). Die Menge an verfügbarem reduzierten Ascorbat sinkt so in den porphyrischen Pflanzen auf ca. 50 % des WT-Niveaus ab. Schuld daran könnte auch die verringerte Aktivität der DHAR tragen (s. 6.1.3.1.2), die im bereits erwähnten Photosensibilisierungsmodell von Knörzer et al. (1996) nach der Behandlung einer Sojabohnen-Zellkultur mit einer hohen Konzentration des PPO-Inhibitors Oxyfluorfen ebenfalls eine niedrigere Aktivität aufwies. Diese Autoren berichten von einem deutlichen Unterschied im Verhalten des antioxidativen Schutzsystems in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitorkonzentration. Während 100 nM Oxyfluorfen eine allgemeine Stimulation der Schutzkapazität, und damit z.B. einen Anstieg der meßbaren Ascorbat- und Glutathionmenge sowie verschiedener Enzymaktivitäten zur Folge hatten, führte die Behandlung der Zellen mit 500 nM des PPO-Inhibitors zur Überbeanspruchung des Systems und deshalb trotz der weiter gesteigerten Enzymaktivitäten zu deutlich verminderten Redoxverhältnissen der Antioxidantien.

Während in den UROD-AS-Pflanzen beim Tocopherol dramatische Einbrüche zu verzeichnen

sind, bleiben Konzentration und Redoxverhältnis des Glutathions trotz der offensichtlichen Schädigung des Blattgewebes bemerkenswert konstant (s. 6.1.3.1.4). Die Catalase unterliegt wegen ihrer bekannten Empfindlichkeit gegenüber photodynamischen Prozessen (Feierabend und Engel 1986, Gantchev und Vanlier 1995) einem erhöhten Umsatz („Turnover“) in den porphyrischen Pflanzen, der sich durch erhöhte Transkript- aber gleichbleibende Proteinmengen und im Vergleich zu WT-Pflanzen in den älteren Blättern absinkende Enzymaktivität bemerkbar macht.

Die lokal begrenzte Aktivierung des Pathogenabwehr-Systems im Bereich der Blattläsionen bleibt bestehen, wie anhand der weiterhin erhöhten Mengen von PR-Proteinen, SA und Scopolin abgelesen werden kann (s. 6.1.5). Sie ist ausreichend, um die Ausbreitung einer TMV-Infektion stark zu behindern (Mock et al. 1999). Dies eröffnet interessante biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten. Würde die Expression von Antisense-Konstrukten für Gene der Tetrapyrrolbiosynthese und die damit einhergehende Photosensibilisierung unter die Kontrolle eines strikt pathogen-responsiblen Promotors gestellt, könnte das antioxidative und Pathogenabwehr-System der Pflanzen wegen der verstärkten Bildung von ROS nach beginnender Infektion und daraus resultierender Induktion der Antisense-Expression sehr viel stärker und schneller aktiviert werden, als dies durch die Infektion allein möglich ist. Unter Umständen könnten auch nicht-resistente Arten auf diese Weise gegen die negativen Auswirkungen von Pathogenbefall „geimpft“ werden. Diese Art von „Immunisierung“ wurde in einem anderen Modellsystem bereits gezeigt. Hier wurde durch die Expression einer pilzlichen Glucose-Oxidase in Kartoffelpflanzen die interne  $H_2O_2$ -Konzentration gesteigert und wegen der dadurch verstärkt aktivierten Pathogenabwehr auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *Erwinia* und *Phytophthora* erreicht (Wu et al. 1995). Auf einen ähnlichen Effekt stützt sich die Erklärung der Tatsache, daß *A. thaliana*-Pflanzen, die eine bakterielle Cholin-Oxidase exprimieren, resistenter gegen Starklichtstreß sind (Alia et al. 1999). Studien an CAT- und APX-AS-Pflanzen weisen darauf hin, daß die Suppression von ROS-detoxifizierenden Enzymen während der Hypersensitivitätsreaktion eine wichtige Rolle bei der Beschleunigung und Verstärkung von programmiertem Zelltod und damit der Verhinderung einer weiteren Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze spielt. Solche Pflanzen mit permanent verringerter Entgiftungskapazität sind hyperresponsibel gegenüber Pathogeninfektionen (Mittler et al. 1999).

Eine moderate photodynamische Schädigung des Gewebes der CPO- bzw. UROD-AS-Pflanzen hat nur geringe Auswirkungen auf die durch Gaswechselfmessungen bestimmte Nettoassimilationsrate, wenn diese auf den Chlorophyllgehalt des Blattes, d.h. auf den funktionsfähigen Anteil des Blattgewebes bezogen wird (s. 6.1.4). Wird hingegen die gesamte Blattfläche als Berechnungsgrundlage gewählt, sind die porphyrischen Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen weitaus weniger in der Lage, Kohlenstoff zu assimilieren. Bei sehr stark

nekrotischen Pflanzen beobachtet man zudem den zunehmenden Verlust, auf ein wechselndes CO<sub>2</sub>-Angebot zu reagieren (s. 6.1.4.2). Generell liegen die größten physiologischen Auswirkungen der Photosensibilisierung in Hinblick auf die Assimilationskapazität also beim schnellen Verlust von photosynthetisch aktivem Blattgewebe.

**In komprimierter Darstellung läßt sich die zeitliche Reihenfolge der Ereignisse so zusammenfassen (Abb. 45):**

In den UROD- und CPO-AS-Pflanzen kommt es auch unter Kurztag- bzw. Schwachlichtbedingungen zur transienten Akkumulation von Uro- bzw. Coproporphyrinogen in den Chloroplasten. Wird die Lichtdosis erhöht und ein bestimmter Grenzwert der Photosensibilisierung überschritten, setzen zellschädigende Prozesse ein, die vor allem von der Lichtmenge, Temperatur und von Sauerstoff abhängig sind und das antioxidative Abwehrsystem überfordern. Im Zuge der Peroxidationsreaktionen, bei denen sehr schnell Membranlipide angegriffen werden, entstehen lokal ROS, u.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in großer Menge. Das antioxidative Schutzsystem, welches in den Chloroplasten eine hohe Kapazität hat, wird als Reaktion auf den beginnenden oxidativen Streß aktiviert. Sehr früh kommt es zu einem Anstieg der Enzymaktivitäten der SOD und APX. Erste Auswirkungen sind auch bei den niedermolekularen Antioxidantien Ascorbat, Glutathion und Tocopherol zu beobachten. Etwas später, aber noch innerhalb des ersten Tages des Lichtshift-Experiments, scheinen die akkumulierten Porphyrin(ogen)e in einigen Zellen die bereits irreversibel geschädigten Chloroplasten zu verlassen, wodurch die gesamte Zelle von photooxidativem Streß betroffen wird. Dies ist z.B. anhand der Aktivierung von nicht-plastidären Isoformen der SOD erkennbar. Die unspezifische Oxidation der aus den Plastiden freigesetzten Porphyrinogene wird durch die Wirkung von membran-assoziierten Peroxidasen beschleunigt. Auf der Ebene der Transkription werden Gene unterschiedlichster Klassen aktiviert, wozu auch eine Reihe von vermutlichen Komponenten von Signaltransduktionskaskaden gehören. Bereits innerhalb der ersten 24h nach Veränderung der Lichtbedingungen kommt es zu lokalen Zelltodereignissen. Wahrscheinlich spielt in diesem Zusammenhang, wie auch nach Pathogeninfektionen oder Ozonbegasung die verstärkte Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine entscheidende Rolle, was wiederum im umliegenden Gewebe HR-ähnliche Reaktionen auslöst. Dazu zählen die sehr zeitig auftretende Synthese und Anhäufung von SA, Scopolin und PR-Proteinen. Der Anteil an bereits totem oder sehr stark geschädigtem Gewebe ist noch gering, und erst in der zweiten verlängerten Lichtphase werden erste Läsionen sichtbar. Die Aktivität von antioxidativen Schutzenzymen steigt als Reaktion auf anhaltenden oxidativen Streß weiter an, die Gehalte bzw. Redoxzustände von Ascorbat, Glutathion und Tocopherol unterscheiden sich aber bisher nur wenig von den Verhältnissen in

den WT-Pflanzen.

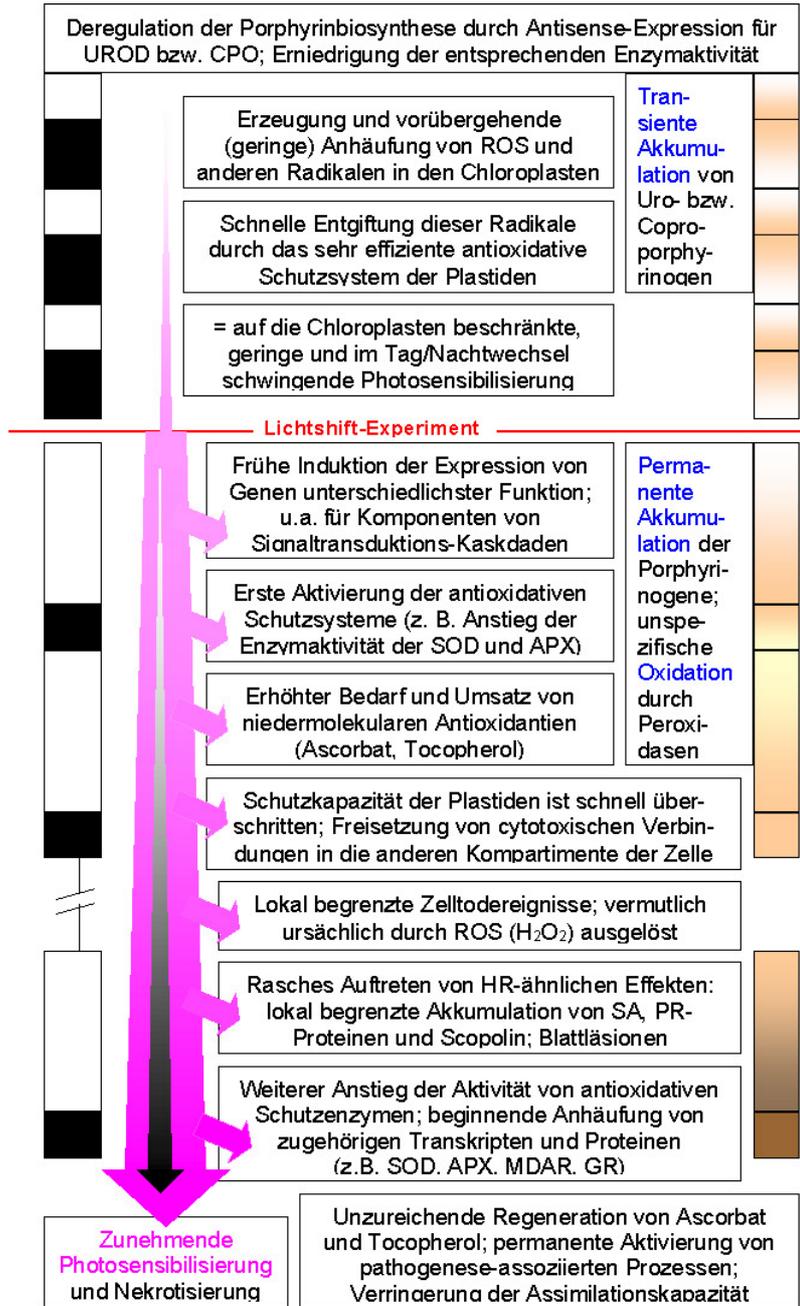


Abb. 45 Fließschema der durch Photosensibilisierung ausgelösten Prozesse in transgenen Tabakpflanzen, die Antisense-RNA für UROD bzw. CPO exprimieren. Die Abfolge von schwarzen und weißen Balken auf der linken Seite stellt nicht-maßstäblich die Länge der Dunkel- bzw. Lichtphasen dar, unter denen die Pflanzen angezogen wurden. Der rote Querstrich symbolisiert den Beginn der ersten verlängerten Lichtphase im Lichtshift-Experiment. Mit dem dicker werdenden violetten Pfeil wird die zunehmende Photosensibilisierung und mit dem darin eingesetzten grauen Balken das verstärkte Auftreten von nekrotischem Blattgewebe dargestellt. Orange Färbung in den Balken auf der rechten Seite der Abb. symbolisiert die zuerst nur transiente, später aber permanente Akkumulation von Uro- bzw. Coproporphyrin(ogen) in den UROD- bzw. CPO-AS Pflanzen. Die über bzw. unter dem roten Trennstrich aufgezählten Symptome treten unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen teilweise auch zeitgleich ein, weswegen aus der grafischen Reihenfolge nicht automatisch auf die zeitliche Abfolge der Ereignisse geschlossen werden kann. Weitere Erläuterungen im Text.

---

Im weiteren Verlauf des Lichtshift-Experiments und bei Pflanzen, die unter Lichtbedingungen angezogen wurden, welche die Photosensibilisierung permanent fördern, beobachtet man die zunehmende Nekrotisierung von Blattgewebe. Neben der erhöhten Aktivität von Enzymen des antioxidativen Schutzsystems (SOD, APX, MDAR, GR), findet nun auch die vermehrte Bildung von Transkript bzw. Protein der Schutzenzyme statt. Wegen des erhöhten Bedarfs an und der nicht ausreichenden Regeneration von Ascorbat, beobachtet man ein Absinken des verfügbaren reduzierten Anteils. Die Aktivierung von pathogenese-assoziierten Prozessen bleibt bestehen, was sich funktionell durch eine erhöhte Resistenz gegenüber TMV-Infektion zeigt. Der größer werdende Anteil an totem Blattgewebe führt zu Einschränkungen in der Assimilationskapazität, die allerdings nur bei sehr stark nekrotischen Pflanzen auch die grünen Areale der Blätter betreffen. Reduktionsäquivalente aus der Lichtreaktion der Photosynthese werden nun verstärkt für Detoxifizierungsreaktionen aufgewendet und stehen damit nicht mehr zur Fixierung von CO<sub>2</sub> bereit. Es wird im Cytosol sogar zusätzliche Reduktionskapazität durch eine Erhöhung der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bereitgestellt (Mock et al., unveröffentlicht), wie es auch in *E. coli* nach der Behandlung mit superoxid-generierenden Chemikalien beobachtet wird. Diese Erhöhung der Reduktionskapazität in Bakterien steht unter der Kontrolle des redox-regulierten soxR/soxS-Systems (Jamieson und Storz 1997). Auch in Hefezellen (*S. cerevisiae*) spielt der Pentosephosphat-Weg eine wichtige Rolle bei der oxidativen Streßabwehr (Slekar et al. 1996).

---

## 7.5 Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit im Überblick

und damit die Antworten auf die in Abschnitt 4 formulierten Fragen sollen hier noch einmal zusammengefaßt herausgestellt werden:

1. Das antioxidative Schutzsystem der transgenen Pflanzen wird als Reaktion auf den durch akkumulierende Porphyrine ausgelösten oxidativen Streß aktiviert. Seine Kapazität reicht aber in Abhängigkeit von der Stärke des Antisense-Effektes und den die Photosensibilisierung stark beeinflussenden Umweltfaktoren wie Licht oder Temperatur nicht aus, um das Absterben von Zellen zu verhindern, was makroskopisch als Ausprägung eines nekrotischen Phänotyps sichtbar wird. Durch die Verlängerung der Lichtperiode (Lichtshift-Experiment) kann die Ausbildung von Blattläsionen an porphyrischen Pflanzen induziert werden, die bis dahin wegen der niedrigen empfangenen Lichtdosis von WT-Pflanzen nicht zu unterscheiden waren. Mit diesem schaltbaren experimentellen System lag ein biologisches Modell vor, in dem die molekularen Folgen von photodynamisch verursachtem oxidativen Streß in Pflanzen zu beliebigen Zeitpunkten untersucht werden konnten. Die untersuchten Enzyme des antioxidativen Schutzsystems reagieren direkt nach dem Beginn der Photosensibilisierung mit dem Anstieg ihrer Aktivität und zeigen erst später, im weiteren Verlauf der photodynamischen Prozesse, auch Veränderungen in ihrer Transkript- und Proteinakkumulation. Vor allem die Gesamtmengen der niedermolekularen Antioxidantien reagieren anfänglich mit einem Anstieg auf die Photosensibilisierung. In den transgenen Pflanzen mit vollständig ausgeprägtem nekrotischen Phänotyp scheint dann vor allem die verfügbare Menge an reduziertem Ascorbat limitierend zu sein, was sich in einem Absinken sowohl des Redoxverhältnisses als auch der Konzentration des gesamten Ascorbats widerspiegelt.

2. Die negativen Auswirkungen der Photosensibilisierung auf den Metabolismus der Pflanze zeigen sich auch anhand des verringerten Wachstums und der verlangsamten Entwicklung der porphyrin-akkumulierenden Pflanzen. Dabei korreliert die Stärke der Expression des Antisense-Konstruktes mit der Menge an akkumulierten photosensitiven Intermediaten und der Ausprägung eines nekrotischen Phänotyps der Pflanzen. Wird die Blattfläche als Basis zur Berechnung der CO<sub>2</sub>-Assimilationskapazität gewählt, fällt diese im Vergleich zu WT-Pflanzen sowohl unter unterschiedlichen Licht- als auch CO<sub>2</sub>-Verhältnissen deutlich ab. Allerdings wird dieser Einbruch fast ausschließlich durch den Anteil an totem Blattgewebe verursacht, während die grünen Areale funktionstüchtig bleiben.

3. Die Folgen der Photosensibilisierung zeigen deutliche Parallelen mit pflanzlichen Pathogenabwehr-Reaktionen, wie sie in Form der raschen aber lokal auf den Bereich des nekrotisierenden Gewebes begrenzten Akkumulation von PR-Proteinen, Salicylsäure und

---

Scopolin festgestellt wurde. Die zelluläre Reaktion in den porphyrin-akkumulierenden Pflanzen weisen somit starke Ähnlichkeiten mit der Hypersensitivitätsreaktion (HR) auf. Die Kreuzinduktion von Prozessen der antioxidativen und der Pathogenabwehr durch Porphyrine führt folgerichtig zu erhöhter Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber einer Infektion mit TMV.

4. Unter Ausnutzung des durch Vergrößerung der Lichtdosis induzierbaren Systems der Photosensibilisierung von transgenen Pflanzen war es möglich, eine differentielle cDNA-Bank anzulegen, mit der sehr zeitige Veränderungen auf der Ebene der Transkriptakkumulation erfaßt wurden. Die Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) erwies sich als sehr effizient, um streß- bzw. zelltodspezifische Gene zu identifizieren. Darunter sind Gene für Effektorproteine, wie Enzyme des Primär- und Sekundärmetabolismus, Chaperone, Hitzeschockproteine, PR-Proteine und andere direkt in die antioxidative und Pathogenabwehr involvierte Genprodukte. Aber auch seltene Transkripte für mögliche Regulatoren der zellulären Streßantwort, wie Transkriptionsfaktoren, Protein-Kinasen und Phosphatasen sowie andere mögliche Signaltransmitter befinden sich in der differentiellen cDNA-Bank.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahl Goy P., Signer P., Aichholz R. (1993) Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. *Planta* 191: 200-206
- Alexander D., Stinson J., Pear J., Glascock C., Ward E., Goodman R. M., Ryals J. (1992) A new multigene family inducible by tobacco mosaic virus or salicylic acid in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 513-515
- Alfonso S. G., Polo C. F., De Salamanca R. F. (1996) Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 415-420
- Alia, Kondo Y., Sakamoto A., Nonaka H., Hayashi H., Saradhi P. P., Chen T. H. H., Murata N. (1999) Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Mol. Biol.* 40: 279-288
- Aliyama K., Yokota K., Kagawa S., Shimbara N., DeMartino G. N., Slaughter C. A., Noda C., Tanaka K. (1995) cDNA cloning of a new putative ATPase subunit p45 of the human 26S proteasome, a homologue of yeast transcriptional factor Sug1p. *FEBS Lett.* 363: 151-156
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100: 224-233
- Alvarez M. E., Pennell R. I., Meijer P.-J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784
- Aono M., Kubo A., Saji H., Aatori T., Tanaka K., Kondo N. (1991) Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 32: 691-697
- Aono M., Saji H., Fujiyama K., Sugita M., Kondo N., Tanaka K. (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 107: 645-648
- Apel K., Kloppstech K. (1978) The plastid membrane of barley (*Hordeum vulgare*). Light induced appearance of mRNA coding for the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.* 85: 581-588
- Asada K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241
- Asada K. (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Hrsg.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 77-104
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (1993) Current protocols in molecular biology. *Current Protocols Vol. 2* New York
- Babiychuk E., Kushnir S., Belles-Boix E., Van Montagu M., Inzé D. (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologues confer tolerance of yeasts towards the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.* 270: 26224-26231
- Bachowski G. J., Thomas J. P., Girotti A. W. (1988) Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23: 580-586
- Badur R., Herbers K., Mönke G., Ludewig F., Sonnewald U. (1994) Induction of pathogenesis-related proteins in sugar accumulating tobacco leaves. *Photosynthetica* 30: 575-582

- Baier M., Dietz K.-J. (1999a) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* 119: 1407-1414
- Baier M., Dietz K.-J. (1999b) Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 4: 166-168
- Balandin T., van der Does C., Albert J. M., Bol J. F., Linthorst H. J. (1995) Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of tobacco. *Plant Mol. Biol.* 27: 1197-1204
- Beauchamp C. O., Fridovich I. (1973) Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta* 317: 50-64
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287
- Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C. S. V., Palme K. (1999) GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 233-256
- Böger P., Wakabayashi K. (1995) Peroxidizing herbicides (I): Mechanism of action. *Z. Naturforsch.* 50c: 159-166
- Böhm U. (1999) Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN- $\gamma$ . Clontech Abstract Booklet 1st Heidelberg Application Meeting
- Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos O., Li G., La Bouesse M., Minvielle-Sebastia L., Lacroute F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7: 609-615
- Boston R. S., Viitanen P. V., Vierling E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 191-222
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brady K. P., Darvill A. G., Albersheim P. (1993) Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. *Plant J.* 4: 517-524
- Breton C., Bordenave M., Richard L., Pernollet J. C., Huet J. C., Pérez S., Goldberg R. (1996) PCR cloning and expression analysis of a cDNA encoding a pectinacetyl esterase from *Vigna radiata* L. *FEBS Lett.* 388: 139-142
- Brosche M., Strid A. (1999) The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. *Biochem. Biophys. Acta* 1445: 342-344
- Cai Q., Storey K. B. (1996) Anoxia-induced gene expression in turtle heart. Upregulation of mitochondrial genes for NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 5 and cytochrome c oxidase subunit 1. *Eur. J. Biochem.* 241: 83-92
- Cazale A. C., Rouet-Mayer M. A., Barbier-Brygoo H., Mathieu Y., Lauriere C. (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol.* 116: 659-669
- Chaerle L., van Caeneghem W., Messens E., Lambers H., van Montagu M., van der Straeten D. (1999) Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nat. Biotechnol.* 17: 813-816
- Chambers J. A., Solomon E. (1996) Isolation of the murine Nbr1 gene adjacent to the murine Brcal gene. *Genomics* 38: 305-313
- Chamngpol S., Willekens H., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1996) Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10: 491-503
- Chang C., Stewart R. C. (1998) The two-component system. *Plant Physiol.* 117: 723-731

- Cheng L., Watt R., Piper P. W. (1994) Polyubiquitin gene expression contributes to oxidative stress resistance in respiratory yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mol. Gen. Genet.* 243: 358-362
- Choi D., Ward B. L., Bostock R. M. (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell.* 4: 1333-1344
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Chung H.-J., Sehne P. C., Ferl R. J. (1999) The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 4: 367-371
- Church G. M., Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (7):1991-1995
- Conklin P. L., Last R. L. (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol.* 109: 203-212
- Connern C. P., Halestrap A. P. (1994) Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem. J.* 302: 321-324
- Cushman J. C., Bohnert H. J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 117-124
- Czernic P., Visser B., Sun W., Savouré A., Deslandes A., Marco Y., Van Montagu M., Verbruggen N. (1999) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *Plant J.* 18: 321-327
- Dangl J. L., Dietrich R. A., Richberg M. H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807
- De Vos C. H. R., Schat H., Vooijs R., Ernst W.H.O. (1989) Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* 135: 164-169
- Degoussée N., Triantaphylidès C., Starek S., Iacazio G., Martini D., Bladier C., Voisine R., Montillet J.-L. (1995) Measurement of thermally produced volatile alkanes: an assay for plant hydroperoxy fatty acid evaluation. *Anal. Biochem.* 224: 524-531
- Del Rio L. A., Sandalio L. M., Palma J. M., Bueno P., Corpas F. J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad. Biol. Med.* 13: 557-580
- Diatchenko L., Chenchik A., Siebert P. (1998) Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly(A<sup>+</sup>) or total RNA. In: Siebert P., Larrick J. (Hrsg.) *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. BioTechniques Books MA, 213-239
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A. P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. D., Siebert P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030
- Diatchenko L., Lukyanov S., Lau Y. F., Siebert P. D. (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303: 349-380
- Dietrich R. A., Richberg M. H., Schmidt R., Dean C., Dangl J. L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death *Cell* 88: 685-694
- Dionisio-Sese M. L., Tobita S. (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1-9
- Dodge A. D. (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes. In: Foyer C. H., Mullineaux P. M. (Hrsg.) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in*

- plants. CRC Press Boca Raton, 219-236
- Douce R., Neuburger M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 214-222
- Downs C. A., Heckathorn S. A. (1998) The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett.* 430: 246-250
- Drotar A., Phelps P., Fall R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* 42: 35-40
- Durner J., Klessig D. F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 369-374
- Eckey-Kaltenbach H., Kiefer E., Grosskopf E., Ernst D., Sandermann H. Jr. (1997) Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. *Plant Mol Biol.* 33: 343-350
- Edge R., McGarvey J., Truscott T. G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J. Photochem. Photobiol.* 41: 189-200
- Edward D., Murray J. A. Smith A. G. (1998) Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117: 1015-1022
- Elder G. H. (1993) Molecular genetics of disorders of haem biosynthesis. *J. Clin. Pathol.* 46: 977-981
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G. (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 100: 234-240
- Faria T., Vaz M., Schwanz P., Polle A., Pereira J.S., Chaves M. M. (1999) Responses of photosynthetic and defence systems to high temperature stress in *Quercus suber* L. seedlings grown under elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Biol.* 1: 365-371
- Feierabend J., Engel S. (1986) Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 567-576
- Fodor J., Gullner G., Ádám A. L., Barna B., Kőmives T., Király Z. (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* 114: 1443-1451
- Foote C. S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* 162: 963-970
- Foote C. S. (1979) Quenching of singlet oxygen. In: Wasserman H. H., Murray R. W. (Hrsg.) Singlet oxygen. Academic Press New York, 129-171
- Forsthoefel N. R., Cushman M. A., Cushman J. C. (1995) Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* 108: 1185-1195
- Foyer C. H., Descourvieres P., Kunert K. J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523
- Foyer C. H., Dujardyn M., Lemoine Y. (1989) Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate-glutathione cycles to changes in irradiance, photoinhibition and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 751-760
- Foyer C. H., Halliwell C. (1976) The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Fridovich I. (1986) Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11
- Fridovich I. (1976) Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: Pryor W.A. (Hrsg.) Free radicals in biology. Academic Press New York, 239-277
- Frydman R. B., Tomaro M. L., Sburlati A., Gutnisky A. (1986) The regulation of porphobilinogen

- oxygenase and porphobilinogen deaminase activities in rat bone marrow under conditions of erythropoietic stress. *Biochim Biophys Acta*. 870: 520-529
- Fryer M. J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15: 381-392
- Gabbita S. P., Robinson K. A., Stewart C. A., Floyd R. A., Hensley K. (2000) Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 1-13
- Gallois P., Makishima T., Hecht V., Despres B., Laudie M., Nishimoto T., Cooke R. (1997) An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant J.* 11: 1325-1331
- Gantchev T. G., Vanlier J. E. (1995) Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol.* 62: 123-134
- Gasser C. S., Gunning D. A., Budelier K. A., Brown S. M. (1990) Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9519-9523
- Genoud T., Métraux J.-P. (1999) Crosstalk in plant cell signaling: Structure and function of the genetic network. *Trends Plant Sci.* 4: 503-507
- Genschik P., Criqui M. C., Parmentier Y., Marbach J., Durr A., Fleck J., Jamet E. (1992) Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol.* 20: 337-341
- Gozani O., Feld R., Reed R. (1996) Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev.* 10: 233-243
- Graner A., Lahaye T., Keller B. (1999) Plant genomics and the genetics of disease resistance: 4th Gatersleben Research Conference: Plant Genomics - Structural Function and Applied Aspects. *Trends Genet.* 15: 391-392
- Green D., Kroemer G. (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8: 267-271
- Greenberg J. T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12094-12097
- Grimm B. (1998) Novel insights in the control of tetrapyrrole metabolism of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 245-250
- Grimm B. (1999) The metabolic pathway of tetrapyrrole biosynthesis. In: Böger P., Wakabayashi K. (Hrsg.) *Peroxidizing herbicides*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 213-244
- Grossman A., Erickson J., Gross C. (1984) The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 37: 383-390
- Haber F., Weiss J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London Ser. A* 147: 331-352
- Happe T. (1999) Differential gene expression during anaerobic adaptation in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Clontech 1st Heidelberg Application Meeting
- Hara E., Kato T., Nakada S., Sekiya S., Oda K. (1991) Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Research* 19: 7097-7104
- Härtel H., Walter G., Haseloff R. F., Hoffmann P., Renger G. (1996) Photochemical and non-photochemical energy dissipation in response to 5-aminolevulinic acid-induced photosensitization of green leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Photochem. Photobiol.* 32: 115-126

- Hausmann W. (1908) Über die photodynamische Wirkung chlorophyll-haltiger Pflanzenextrakte. *Biochem. Z.* 12: 331
- Heiss S., Schafer H. J., Haag-Kerwer A., Rausch T. (1999) Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol. Biol.* 39: 847-857
- Hemmingsen S. M., Woolford C., van der Vies S. M., Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperon oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334
- Henningsen K. W., Boynton J. E., von Wettstein D. (1993) Mutants at xantha and albina loci in relation to chloroplast biogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Royal Dan. Acad. Sci. Lett. (Biologiske Skrifter)* 42: 1-349
- Herbers K., Mönke G., Badur R., Sonnewald U. (1995) A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 29: 1027-1038
- Höfgen R., Axelsen K. B., Kannangara C. G., Schüttke I., Pohlentz H. D., Willmitzer L., Grimm B., von Wettstein D. (1994) A visible marker for antisense mRNA expression in plants: inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1726-1730
- Höfgen R., Willmitzer L. (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various cultivars of potato. *Plant Sci.* 66: 221-230
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 288: 1229-1231
- Hossain M.A., Asada K. (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterisation as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25: 85-92
- Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F., Davy de Virville J., Remy R., Francis-Small C. C. (1998) Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiol.* 116: 627-635
- Hu G., Yalpani N., Briggs S., Johal G. (1998) A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell* 10: 1095-1105
- Huguency P., Bouvier F., Badillo A., Quennemet J., d'Harlingue A., Camara B. (1996) Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 111: 619-626
- Jacobs J. M., Jacobs N. J., Kuhn C. B., Gorman N., Dayan F. E., Duke S. O., Sinclair J. F., Sinclair P. R. (1996) Oxidation of porphyrinogens by horseradish peroxidase and formation of a green pyrrole pigment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 195-199
- James B.D., Higgins S. J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization* IRL Press Ltd. Oxford
- Jamieson D. J., Storz G. (1997) Transcriptional activators of oxidative stress responses. In: Scandalios J. G. (Hrsg.) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, 91-115
- Janda L., Tichy P., Spizek J., Petricek M. (1996) A deduced *Thermonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains. *J. Bacteriol.* 178: 1487-1489
- Janero D. R., Hreniuk D., Sharif H. M., Prout K. C. (1994) Hydroperoxide-induced oxidative stress impairs heart muscle cell carbohydrate metabolism. *Am J Physiol.* 266: C179-188
- Jannatipour M., Rokeach L. A. (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J. Biol. Chem.* 270: 4845-4853
- Jaschke A., Mi H., Tropschug M. (1998) Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant

- protein Aop1 and stimulates its activity. *J. Mol. Biol.* 277: 763-769
- Jonak C., Ligterink W., Hirt H. (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 204-213
- Juhnke H., Krems B., Kotter P., Entian K. D. (1996) Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet.* 252: 456-464
- Jurd L., Corse A. D., King Jr. A. D. (1971) Antimicrobial properties of 6,7-dihydroxy-, 7,8-dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarins. *Phytochem.* 10: 2971-2974
- Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., Inze D., Van Montagu M. (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486
- Kanematsu S., Asada K. (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-Superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol.* 31: 99-112
- Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Mullineaux P. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291
- Katayama T., Imaizumi K., Tsuda M., Mori Y., Takagi T., Tohyama M. (1998) Expression of an ADP-ribosylation factor like gene, ARF4L, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 56: 66-75
- Keetman U. (1995) Physiologische und biochemische Untersuchungen an rekombinanten Tabakpflanzen mit beeinträchtigter Chlorophyllbiosynthese. Diplomarbeit Humboldt-Universität zu Berlin
- Keller B., Sauer N., Lamb C. J. (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean; gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7: 3625-3633
- Kim J. Y., Chung Y. S., Ok S. H., Lee S. G., Chung W. I., Kim I. Y., Shin J. S. (1999a) Characterization of the full-length sequences of phospholipase A2 induced during flower development. *Biochim. Biophys. Acta* 1489: 389-392
- Kim J. Y., Chung Y. S., Paek K. H., Park Y. I., Kim J. K., Yu S. N., Oh B. J., Shin J. S. (1999b) Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Mol. Cells* 9: 392-397
- Kim Y. S., Choi D., Lee M. M., Lee S. H., Kim W. T. (1998) Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Cell Physiol.* 39: 565-573
- Kitashiba H., Toriyama K. (1997) Expression of a gene for a protein similar to HIV-1 Tat binding protein 1 (TBP1) in floral organs of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.* 38: 966-969
- Kliebenstein D. J., Monde R.-A., Last R. (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118: 637-650
- Knörzer O., Durner J., Böger P. (1996) Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.* 97: 388-396
- Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. (1995a) Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco - sequence analysis and initial expression studies. *Planta* 196: 796-803

- Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. (1995b) Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system. *EMBO J.* 14: 3712-3720
- Kubo K., Sakamoto A., Kobayashi A., Rybka Z., Kanno Y., Nakagawa H., Takatsuji H. (1998) Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res.* 26: 608-615
- Kushnir S., Babiychuk E., Kampfenkel K., Belles-Boix E., Van Montagu M., Inze D. (1995) Characterization of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that render yeasts tolerant toward the thiol-oxidizing drug diamide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10580-10584
- Lacomme C., Roby D. (1999) Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 459: 149-153
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lal S. K., Lee C., Sachs M. M. (1998) Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. *Plant Physiol.* 118: 1285-1293
- Langebartels C., Schraudner M., Heller W., Ernst D., Sandermann H. Jr. (2000) Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: Inzé D., Van Montagu M. (Hrsg.) *Oxidative stress in plants*. Harwood Amsterdam (in press)
- Law M.Y., Charles S.A., Halliwell B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. *Biochem. J.* 210: 899-903
- Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J., Ward E. (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16: 223-233
- Lee H. S., Mun J. H. Kim S. G. (1999) Characterization of cDNAs encoding cytoplasmic ribosomal protein L15 and L27a in petunia (*Petunia hybrida*): primary structures and coordinate expression. *Gene* 226: 155-163
- Leisgen C., Prändl R., Schöffl F. (1999) The PCR Select Kit is useful of gene expression analysis in transgenic plants. Clontech 1st Heidelberg Application Meeting
- Lermontova I., Kruse E., Mock H.-P., Grimm B. (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 94: 8895-8900
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Li H. Y., Guo Z. F., Zhu Y. X. (1998) Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. *Mol. Gen. Genet.* 259: 393-397
- Liang P., Pardee A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-970
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592
- Linton K. J., Jarvis B. W., Hutchinson C. R. (1995) Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3,5-epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* 153: 33-40
- Logemann E., Tavernaro A., Schulz W., Somssich I. E., Hahlbrock K. (2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1903-1907
- Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E., Navari-Izzo F. (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant*

- Physiol. 119: 1091-1100
- Luikenhuis S., Perrone G. Dawes I. W. Grant C. M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9: 1081-1091
- Lukyanov K. A., Matz, M. V., Bogdanova, E. A., Gurskaya, N. G., Lukyanov, S. A. (1996) Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: An approach to in vitro cloning. *Nucleic Acids Res.* 24: 2194-2195
- Marrs K. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H., Krautler B. (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* 112: 1403-1409
- McDowell J. M. Dhandaydham M., Long T. A., Aarts M. G., Goff S., Holub E. B., Dangl J. L. (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1861-1874
- Mehdy M. C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472
- Mehdy M. C., Brodl M. R. (1998) The role of stress in regulating mRNA stability. In: Bayley-Serres J., Gallie D. R. (Hrsg.) *A look beyond transcription - Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants.* ASPP Rockville, 54-63
- Mehdy M. C., Sharma Y. K., Kanagasabapathi S., Bays N. W. (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98: 365-374
- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65-77
- Meskiene I., Bogre L., Glaser W., Balog J., Brandstotter M., Zwerger K., Ammerer G., Hirt H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1938-1943
- Meuwley P., Metraux J.P. (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214: 500-505
- Minet M., Dufour M. E., Lacroute F. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2: 417-422
- Mittler R., Herr E. H., Orvar B. L., van Camp W., Willekens H., Inzé D., Ellis B. E. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14165-14170
- Mittler R., Simon L., Lam E. (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333-1344
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 765-769
- Mock H.-P., Grimm B. (1997) Reduction of uroporphyrinogen decarboxylase by antisense RNA expression affects activities of other enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis and leads to light-dependent necrosis. *Plant Physiol.* 113: 1101-1112
- Mock H.-P., Heller W., Molina A., Neubohn B., Sandermann Jr. H., Grimm B. (1999) Expression of uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase antisense RNA in tobacco induces pathogen defense responses conferring resistance to tobacco mosaic virus. *J. Biol.*

Chem. 274: 4231-4238

- Mock H.-P., Keetman U., Grimm B. (2000) Photosensitizing tetrapyrroles induce antioxidative and pathogen defense responses in plants. In: Inzé D., Van Montagu M. (Hrsg.) Oxidative stress in plants. Harwood Amsterdam (in press)
- Mock H.-P., Keetman U., Kruse E., Rank B., Grimm B. (1998) Defense responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress in transgenic tobacco plants with reduced uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase activity. *Plant Physiol.* 116: 107-116
- Mock H.-P., Trainotti L., Kruse E., Grimm B. (1995) Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley. *Plant Mol. Biol.* 28: 245-256
- Moeder W., Anegg S., Thomas G., Langebartels C., Sandermann Jr. H. (1999) Signal molecules in ozone activation of stress proteins in plants. In: Bowles D. J., Smallwood M. F., Calvert C. M. (Hrsg.) Plant responses to environmental stress. BIOS Scientific Publishers Oxford, 43-49
- Molina A., Volrath S., Guyer D., Maleck K., Ryals J., Ward E. (1999) Inhibition of protoporphyrin oxidase expression in Arabidopsis causes a lesion-mimic phenotype that induces systemic acquired resistance. *Plant J.* 17: 667-678
- Moran J. F., Becana M., Iturbe-Ormatex I., Frechilla S., Klucas R. V., Aparicio-Tejo P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352
- Mortenson E., Dreyfuss G. (1989) RNP in maize protein. *Nature* 337: 312
- Mulligan R. M., Chory J., Ecker J. R. (1997) Signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2793-2795
- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 22: 867-880
- Nakshatri H., Bhat-Nakshatri P., Currie R. A. (1996) Subunit association and DNA binding activity of the heterotrimeric transcription factor NF-Y is regulated by cellular redox. *J. Biol. Chem.* 271: 28784-28791
- Neale A. D., Blomstedt C. K., Bronson P., Le T.-N., Guthridge K., Evans J., Gaff D. F., Hamill J. D. (2000) The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant Cell Environ.* 23: 265-277
- Nersissian A. M., Immoos C., Hill M. G., Hart P. J., Williams G., Herrmann R. G., Valentine J. S. (1998) Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci.* 7: 1915-1929
- Nielsen O. F. (1974) Macromolecular physiology of plastids. XII. Tigrina mutants of barley. *Hereditas* 76: 269-304
- Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279
- Nover L. (1991) Induced thermotolerance. In: Nover L. Heat shock response. Boca Raton CRC Press 409-452
- Nürnberg T. (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 167-182
- Ochsner M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J. Photochem. Photobiol.* 39: 1-18
- Ockner R. K., Schmid R. (1961) Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorbenzene intoxication. *Nature* 189: 499
- Okuda T., Matsuda Y., Yamanaka A., Shonosuke S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267

- Ori N., Eshed Y., Paran I., Presting G., Aviv D., Tanksley S., Zamir D., Fluhr R. (1997) The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* 9: 521-532
- Oster U., Tanaka R., Tanaka A., Rüdiger W. (2000) Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 21: 305-310
- Park S. M., Kim J. H., Lee Y. K., Pyee J. H., Cheon C. I., Hong C. B. (1997) Nucleotide sequence of a ubiquitin-extension protein gene in *Nicotiana tabacum* and its expression pattern upon heat shock. *Mol. Cells.* 7: 125-130
- Pauls T. L. (1995) Versatile functions of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in signal transduction and Ca<sup>2+</sup>-homeostasis. In: Packer L., Wirtz K. (Hrsg.) *Signaling Mechanisms - from transcription factors to oxidative stress*. NATO ASI Series, Vol. H 92, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 11-21
- Pell E. J., Schlaghaufer C.D., Arteca R. N. (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* 100: 264-273
- Pelleschi S., Guy S., Kim J. Y., Pointe C., Mahe A., Barthes L., Leonardi A., Prioul J. L. (1999) *Ivr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol.* 39: 373-380
- Porra R. J. (1997) Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *J. Photochem. Photobiol.* 65: 492-516
- Pötter E., Kloppstech K. (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur. J. Biochem.* 214: 779-786
- Prandl R., Hinderhofer K., Eggers-Schumacher G., Schöffl F. (1998) HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 258: 269-278
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- Quaggin S E., Yeger H., Igarashi P. (1997) Antisense oligonucleotides to *Cux-1*, a Cut-related homeobox gene, cause increased apoptosis in mouse embryonic kidney cultures. *J. Clin. Invest.* 99: 718-724
- Redkar R. J., Lemke P. A., Singh N. K. (1996) Isolation of differentially expressed cDNA clones from salt-adapted *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 29: 130-135
- Regad F., Bardet C., Tremousaygue D., Moisan A., Lescure B., Axelos M. (1993) cDNA cloning and expression of an *Arabidopsis* GTP-binding protein of the ARF family. *FEBS Lett.* 316: 133-136
- Rey P., Pruvot G., Becuwe N., Eymery F., Rumeau D., Peltier G. (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J.* 13: 97-107
- Riccardi F., Gazeau P., de Vienne D., Zivy M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol.* 117: 1253-1263
- Rietzler M., Bittner M., Kolanus W., Schuster A., Holzmann B. (1998) The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J. Biol. Chem.* 273: 27459-27466
- Roitsch T. (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 198-206
- Rudd J. J., Franklin-Tong V. E. (1999) Calcium signaling in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 214-232
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H.-Y., Hunt M. D. (1996)

- Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- Salin M. (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York
- Sanjay A., Fu J., Kreibich G. (1998) DAD1 is required for the function and the structural integrity of the oligosaccharyl transferase complex. *J. Biol. Chem.* 273: 26094-26099
- Sardet C., Vidal M., Cbrinik D., Geng Y., Onufryk C., Chen A., Weinberg R. A. (1995) E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2403-2407
- Sauter H., Lauer M., Fritsch H. (1991) Metabolic profiling of plants - A new diagnostic technique. In: Baker D. R., Fenyes J. G., Moberg W. K. (Hrsg.) *Synthesis and chemistry of agrochemicals II*. ACS Symposium Series 443 American Chemical Society Washington, D.C., 288-299
- Scheel D., Batschauer A., Nürnberger T., Zimmermann S., Jonak C., Ligerink W., Hirt H., Rudd J. J. Franklin-Tong V. E., Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C. S. V., Palme K. (1999) Multi-author review on signaling in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 151-256
- Schroda M., Vallon O., Wollman F. A., Beck C. F. (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11: 1165-1178
- Sehnke P. C., Henry R., Cline K., Ferl R. J. (2000) Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiol.* 122: 235-241
- Sewell J. L., Kahn R. A. (1998) Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4620-4624
- Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki M. (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* 132: 13-19
- Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *DDT* 4: 507-517
- Sheen J. (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 975-980
- Showalter A. M., Butt A. D., Kim S. (1992) Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol. Biol.* 19: 205-215
- Siebke K., Weis E. (1995) Assimilation images of leaves of *Glechoma hederacea*: Analysis of non-synchronous stomata related oscillations. *Planta* 196: 155-165
- Sies H. (1995) Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress. In: Packer L., Wirtz K. *Signaling mechanisms - from transcription factors to oxidative stress*. NATO ASI Series, Vol. H 92 Berlin Heidelberg Springer-Verlag 165-186
- Siller-Cepeda J. H., Chen T. H. H., Fuchigami L. H. (1991) High performance liquid chromatography analysis of reduced and oxidized glutathione in woody plant tissue. *Plant Cell Physiol.* 32: 1179-1185
- Slekar K. H., Kosman D. J., Culotta V. C. (1996) The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* 271: 28831-28836
- Slooten L., Capiou K., van Camp W., van Montagu M., Sybesma C., Inzé D. (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese

- superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol.* 107: 737-750
- Smith I. K., Kendal, A. C., Keys A. J., Turner J. C., Lea P.J. (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci. Lett.* 37: 29-33
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-444
- Somerville C, Somerville S. (1999) Plant functional genomics. *Science* 285: 380-383
- Speulman E., Bouche D., Holub E. B., Beynon J. L. (1998) Disease resistance gene homologues correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14: 467-474
- Spikes J. D., Bommer J. C. (1991) Chlorophyll and related pigments as photosensitizers in biology and medicine. In: Scheer H. (Hrsg.) *Chlorophylls*. CRC Press Boca Raton, 1181-1204
- Strauss W. S. L., Gschwend M. H., Sailer R. (1995) Intracellular fluorescence behaviour of meso-tetra(4-sulphonatophenyl)porphyrin during photodynamic treatment of various growth phases of cultured cells. *J. Photochem. Photobiol.* 28: 155-161
- Sturm A. (1992) A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins. *Plant Physiol.* 99: 1689-1692
- Suzuki K., Itai R., Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N. K., Yoshimura E., Mori S. (1998) Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol.* 116: 725-732
- Szederkényi J., Komor E., Schobert C. (1997) Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from *Ricinus communis* L. and characterisation of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* 202: 349-356
- Takahashi H., Chen Z., Du H., Liu Y., Klessig D. F. (1997) Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* 11: 993-1005
- Tanaka R., Oster U., Kruse E., Rüdiger W., Grimm B. (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* 120: 695-704
- Tanaka Y., Makishima T., Sasabe M., Ichinose Y., Shiraishi T., Nishimoto T., Yamada T. (1997) Dad-1, a putative programmed cell death suppressor gene in rice. *Plant Cell Physiol.* 38: 379-383
- Thiellement H., Bahrman N., Damerval C., Plomion C., Rossignol M., Santoni V., de Vienne D., Zivy M. (1999) Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* 20: 2013-2026
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 274: 2234-2242
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2000) Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 5: 67-74
- Van Camp W., Capiou K., van Montagu M., Inzé D., Slooten L. (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112: 1703-1714
- Van Camp W., Willekens H., Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., Reupold-Popp P., Sanderman Jr. H., Langebartels C. (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* 12: 165-168
- Van Kan J. A., Cornelissen B. J., Bol J. F. (1988) A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose biphosphate carboxylase small

- subunit gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1: 107-112
- Van Lohuizen M., Tijms M., Voncken J. W., Schumacher A., Magnuson T., Wientjens E. (1998) Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. *Mol. Cell Biol.* 18: 3572-3579
- Vayda M. E., Webster C. (1998) Translational regulation during periods of environmental stress. In: Bayley-Serres J., Gallie D. R. (Hrsg.) *A look beyond transcription - Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants.* ASPP Rockville, 102-114
- Viitanen P. V., Schmidt M., Buchner J., Suzuki T., Vierling E., Dickson R., Lorimer G. H., Gatenby A., Soll J. (1995) Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J. Biol. Chem.* 270: 18158-18164
- Von Wettstein D., Gough S., Kannangara C.G. (1995) Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1039-1057
- Wakabayashi K., Böger P. (1999) General physiological characteristics and mode of action of peroxidizing herbicides. In: Böger P., Wakabayashi K. (Hrsg.) *Peroxidizing herbicides.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 163-190
- Wang Z., Brown, D. D. (1991) A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11505-11509
- Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Ryals J. A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094
- Wells W. W., Xu D. P. (1994) Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg. Biomembr.* 26: 369-377
- Wells W. W., Yang Y., Deits T. L., Gan Z. R. (1993) Thioltransferases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 66: 149-201
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995) Catalases in plants. *Mol. Breeding* 1: 207-228
- Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Langebartels C., Sandermann Jr. H. (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 106: 1007-1014
- Winicov I. (2000) Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta* 210: 416-422
- Winicov I., Bastola D. R. (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol.* 120: 437-480
- Wu G., Shortt B. J., Lawrence D. B., Levine E. B., Fitzsimmons K. C., Shah D. M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368
- Yabe N., Takahashi T., Komeda Y. (1994) Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol.* 35: 1207-1219
- Yasuda E., Ebinuma H., Wabiko H. (1997) A novel glycine-rich/hydrophobic 16 kDa polypeptide gene from tobacco: similarity to proline-rich protein genes and its wound-inducible and developmentally regulated expression. *Plant Mol. Biol.* 33: 667-678
- Yu L. X., Chamberland H., Lafontaine J. G., Tabaeizadeh Z. (1996) Negative regulation of gene expression of a novel proline-, threonine-, and glycine-rich protein by water stress in *Lycopersicon chilense*. *Genome* 39: 1185-1193
- Zheng M., Aslund F., Storz G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfid bond formation. *Science* 279: 1718-1721

- 
- Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorimetric determination of trace hydrogen peroxide. Application in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* 253: 162-168
- Zimmermann S., Ehrhardt T., Plesch G., Müller-Röber B. (1999) Ion channels in plant signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 183-203

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Nettoassimilationsrate	$c_i$	CO <sub>2</sub> -Konzentration [ppm] im Interzellularraum
ABA	Abcissinsäure		
AC	Acifluorfen (Diphenylether-Typ-Herbizid der 2. Generation)	CoA	Coenzym A
Acc.#	Zugriffsnummer („Accession number“)	CPO	Coproporphyrinogen III-Oxidase (E.C. 1.3.3.3)
ACO	Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase	CPO-AS	CPO-Antisense
AG	Arbeitsgruppe	<b>DAD</b>	„Defender against cell death“
ALA	Aminolävulinsäure	dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
ALAD	Aminolävulinat-Dehydratase (Porphobilinogen-Synthase, EC 4.2.1.24 )	DD-RT-PCR	„Differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction“
AO	Ascorbat-Oxidase	DEPC	Diethylpyrocarbonat
APX	Ascorbat-Peroxidase (E.C. 1.11.1.11)	DHA	Didehydroascorbat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor	DHAR	Didehydroascorbat-Reduktase (E.C. 1.8.5.1)
ASA	Ascorbat (reduziert)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagenz
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase	DTT	Dithiotreitol
<b>BAP</b>	Benzylaminopurin	$\epsilon\lambda$	Millimolarer Extinktionskoeffizient (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) bei einer bestimmten Wellenlänge
BChl	Bacteriochlorophyll	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	ECL	Verstärkte Chemolumineszenz („enhanced chemoluminescence“)
bp	Basenpaare	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BSA	Rinderserumalbumin	ER	Endoplasmatisches Retikulum
<b>c</b>	Konzentration	Fa.	Firma
CaMV 35S	35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)	FBPase	Fructose-1,6-Bisphosphatase
CAO	Chlorophyllid-Oxygenase	Fd	Ferredoxin
CAT	Catalase (E.C. 1.11.1.6)	FG	Frischgewicht
cDNA	„copy, complementary“ DNA	FS	Vorwärts subtrahiert („forward subtracted“)
Chl	Chlorophyll	<b>GA</b>	Gibberellinsäure
Chl a/b	Verhältnis von Chlorophyll a zu b	$\gamma$ -EC	$\gamma$ -Glutamylcystein
Chlid	Chlorophyllid	GC	Gas-Chromatografie
CHS	Chalcon-Synthase		

G-Protein	GTP-bindendes Protein	$\mu\text{E}$	$\mu$ -Einstein, Einheit für Quantenflüsse, $\equiv \mu\text{mol}$ Photonen
GR	Glutathion-Reduktase (E.C. 1.6.4.2)		
GRP	Glycin-reiches Protein („Glycine rich protein“)	MG	Medium nach Murashige und Skoog mit Glucose
GRP-AS	GRP-Antisense	MS	Medium nach Murashige und Skoog
Grx	Glutaredoxin	MV	Methylviologen (Paraquat™)
GSA-AT	Glutamatssemialdehyd-Aminotransferase (E.C. 5.4.3.8)	NAA	Naphtylelessigsäure
GSH	Glutathion (reduziert)	NAD(H)	Nicotinamidadeninukleotid, oxidiert (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert; Glutathiondisulfid)	NADH-DH	Nicotinamidadeninukleotid-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase	NADP(H)	Nicotinamidadeninukleotid-2'-phosphat, oxidiert (reduziert)
HAP	Häm-aktiviertes Protein („heme activated protein“)	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethansulfonsäure	n.d.	nicht bestimmt („not determined“)
H	Starklicht („high light“)	NF-Y	Nukleärer Faktor Y
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA	oligodT	Oligo-Desoxythymidin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie („High-Performance Liquid Chromatography“)	OST	Oligosaccharyl-Transferase
HR	Hypersensitivitätsreaktion („hypersensitive response“)	PAA	Polyacrylamid
HSE	Hitzeschockelement	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
HSF	Hitzeschockfaktor	PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
HSP	Hitzeschockprotein	PAPS	3-Phospho-adenosinmonophosphat-sulfat
INA	Isonicotinsäure	PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung („photosynthetically active radiation“)
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung		Photoassimilat-responsives Protein („Photoassimilate responsive“)
kD	Kilo-Dalton, Molekülmasseneinheit	PchlId	Protochlorophyllid
$\lambda_{\text{em}}$	Fluoreszenz-Emissionswellenlänge	PCD	Programmierter Zelltod („programmed cell death“)
$\lambda_{\text{ex}}$	Fluoreszenz-Anregungswellenlänge	PDA	Photodioden-Array
LSD	„Lesion simulating disease“	PDT	Photodynamische Therapie
MAP-	Mitogen-aktiviert(e) Protein-	PEP	Phosphoenolpyruvat
MAPK	MAP-Kinase	PGA	Phosphoglycerat
MDA	Malondialdehyd	PI	Proteinase-Inhibitor
MDA <sup>*</sup>	Monodehydroascorbat-(Radikal)	POR	Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (E.C. 1.6.99.1)
MDAR	Monodehydroascorbat-Reduktase (E.C. 1.6.5.4)	ppm	Konzentrationsangabe („parts per million“)

PPO	Protoporphyrinogen-Oxidase (E.C. 1.3.3.4)	(„Salicylic acid responsive“)	
			<i>S. cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PR	Pathogenese-assoziiert („pathogenesis related“)	SD	Standardabweichung (n-1) („standard deviation“)
PS	Photosystem	SDS	Natriumdodecylsulfat
PV-Y	Kartoffelvirus Y („Potato virus Y“)	SH	Thiol-Gruppe, Mercapto-Gruppe
QTL	Locus eines quantitativen Merkmals („Quantitative trait locus“)	SNN	Samsun NN; Name einer Tabaksorte
R-	Molekülrest in verallgemeinernden Gleichungen	snRNA	kleine, kernlokalisierte RNA („small nuclear RNA“)
R-Gen	Resistenzgen	SOD	Superoxid-Dismutase (E.C. 1.15.1.1)
RNA	Ribonukleinsäure	SSH	Subtraktive Suppressions-Hybridisierung („Suppression Subtractive Hybridization“)
RNase	Ribonuklease	TBA	2-Thiobarbitursäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	TBA-RS	TBA-reaktive Substanzen
RP	Umkehrphase („Reverse phase“)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
RS	Revers subtrahiert („Reverse subtracted“)	TMV	Tabak Mosaikvirus
RT	Raumtemperatur	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	Retentionszeit	tRNA <sup>Glu</sup>	Transfer-RNA mit Glutaminsäurespezifität
	Reverse Transkriptase	UROD	Uroporphyrinogen III-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.37)
S	(z.B. 50S): Svedberg-Konstante, Einheit der Molekülgröße	UROD-AS	UROD-Antisense
SA	Salicylsäure („Salicylic acid“)	UV	Ultraviolett
SAA	Systemisch erworbene Anpassung („systemic acquired acclimation“)	WD-Repeat	Wiederholung von Tryptophan- und Aspartat-Aminosäureresten
SAM	S-Adenosyl-Methionin	WT	Wildtyp
SAR	Systemisch erworbene Resistenz („systemic acquired resistance“)		
SAR 8.2	Salicylsäure-responsives Protein		

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. Bernhard Grimm für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema in seiner Arbeitsgruppe am IPK Gatersleben arbeiten zu können. Bei der Entwicklung von Ideen und der Durchführung der Arbeiten hatte ich viel Freiraum, der nach stimulierenden Diskussionen mit spannenden Experimenten und deren Resultaten gefüllt werden konnte. Vielen Dank auch für die Hinweise nach dem kritischen Lesen des Manuskripts dieser Arbeit.

Prof. Dr. T. Börner und Prof. Dr. T. Buckhout von der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für ihre Bereitschaft, die Betreuung von Seite der Humboldt-Universität bzw. die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen.

Großer Dank gebührt Dr. Hans-Peter Mock für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit am Thema über die gesamte Zeit hinweg, für die vielen Tips und Ratschläge zu technischen Problemen und neuen Experimenten sowie die Interpretation von Ergebnissen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Chlorophyllbiosynthese möchte ich für die Unterstützung bei meiner Arbeit danken, für anregende Diskussionen und Seminare aber auch für nette Frühstücksrunden, Exkursionen oder Kegelabende, die einen gewissen Ausgleich zur Laborarbeit darstellten. Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Elisabeth Kruse für Tips und Tricks zu molekularbiologischen Techniken, bei Petra Linow für die Transformation von Tabakpflanzen, bei Elena Barthel für die Bestimmung von Scopolin und Salicylsäure, sowie die generelle Hilfe bei HPLC-Analysen und gemeinsam mit H.-P. Mock geplanten Experimenten, bei Elis Fraust für die Messungen zum Tocopherol- und die Hilfe bei der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Proben aus den Lichtshift-Experimenten und bei Thomas Grasses, dem Dauergast aus Düsseldorf, für die Gesellschaft bei ausgleichenden Pausen mit „Käffchen“. Auch andere wissenschaftliche Gäste aus aller Welt bereicherten durch Diskussionen und gemeinsame Experimente meinen Arbeitsalltag am IPK.

Vielen Dank an Dr. Katharina Siebke von der Universität Münster und Laury Chaerle von der Universität Gent (Belgien) für die Bereitschaft, mit mir zusammen und unter Einsatz der ihnen zur Verfügung stehenden technischen Ausrüstung zu versuchen, die Bildung von Blattläsionen präsymptomatisch vorherzusagen zu können. Die Arbeiten in Gent werden z. Z. durch Laury Chaerle allein fortgesetzt, wofür ich ihm besonders dankbar bin.

Bei den Gärtnern der Abteilung Molekulare Zellbiologie des IPK möchte ich mich an dieser Stelle für die gute Pflege der Pflanzen in den Gewächshäusern und Klimakammern bedanken und bei den Mitarbeitern der Werkstatt für viele kleinere, größere und prompt ausgeführte Reparaturen, ohne die die Arbeit oft verlangsamt worden wäre. Vielen Dank auch an Fr. A. Kilian und Fr. U. Tiemann im Grafikbüro des Instituts, die bei der Erstellung einer ganzen Reihe von Abbildungen halfen. Ebenso gilt mein Dank Fr. H. Ernst und Fr. B. Schäfer für ihre fotografischen Arbeiten. Ohne die meistens schnelle und erfolgreiche Sequenzierung aller cDNAs vor allem im ABI-Labor von Dr. W. Michalek und Fr. B. Brückner wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank! Generell gilt mein Dank all denen am IPK, die die hervorragende wissenschaftliche Infrastruktur, von der ich profitieren konnte, auf- bzw. ausgebaut haben und zur Aufrechterhaltung beitragen.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. Sophia Biemelt danken, mit der mich nicht nur die erfolgreiche Kooperation zum antioxidativen Schutzsystem in anoxischen, hypoxischen und wiederbelüfteten Wurzeln sondern seit Beginn der Promotion ein gemeinsames Leben verbindet. Vielen Dank an dieser Stelle vor allem für die konstruktive Kritik an der Dissertation!

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

## Lebenslauf

Name: Ulrich Keetman  
Anschrift: Pölle 38, 06484 Quedlinburg  
Geburtsdatum: 13.01.1972  
Geburtsort: Guben  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung:

09/1978 - 08/1988 Polytechnische Oberschule in Guben  
09/1988 - 08/1990 Spezialklassen für Chemie der Technischen Hochschule Leuna-Merseburg (Abitur)  
  
09/1990 - 09/1991 Grundwehrdienst auf dem Fliegerhorst Jänschwalde

### Studium:

10/1991 - 12/1995 Biochemiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Abschluß: Diplom (Sehr gut)  
Diplomthema: „Physiologische und biochemische Untersuchungen an rekombinanten Tabakpflanzen mit beeinträchtiger Chlorophyllbiosynthese“  
Diese Arbeit entstand im Rahmen einer Kooperation des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der HU Berlin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Chlorophyllbiosynthese am IPK Gatersleben unter gemeinsamer Betreuung durch Doz. Dr. habil. B. Rank und PD Dr. habil. B. Grimm.  
  
09/1993 - 03/1994 Aufenthalt an der University of Sheffield, Anfertigung der Studienjahresarbeit im Labor von Dr. P. Quick  
  
10/1992 - 03/1993, Tätigkeit als studentische Hilfskraft und später als Tutor am  
10/1994 - 09/1995 Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der HU Berlin unter Prof. Dr. habil. P. Hoffmann  
  
seit 01/1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Chlorophyllbiosynthese am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben mit finanzieller Unterstützung durch das Innovationskolleg „Zellspezialisierung: Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei Redoxkontrolle, Signalübertragung und Streßantwort in Pflanze, Tier und Mensch“

## Liste der Veröffentlichungen

### Publikationen

- Mock H.-P., Lermontova I., Keetman U., Grimm B.** (1997) Consequences of photo-oxidation in transgenic tobacco with co-suppression of coproporphyrinogen oxidase. *Phyton* **37**: 169-174
- Mock H.-P., Keetman U., Kruse E., Rank B., Grimm B.** (1998) Defense responses to tetrapyrrol-induced oxidative stress in transgenic plants with reduced uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase activity. *Plant Physiol* **116**:107-116
- Biemelt S., Keetman U., Albrecht G.** (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* **116**: 651-658
- Biemelt S., Keetman U., Mock H.-P., Grimm B.** (2000) Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell Environ.* **23**: 135-144
- Mock H.-P., Keetman U., Grimm B.** (2000) Photosensitizing tetrapyrroles induce antioxidative and pathogen defense responses in plants. *In: Oxidative stress in plants*, D. Inzé and M. Van Montagu (Hrsg.), Harwood, Amsterdam (*in press*)
- Keetman U., Mock H.-P., Grimm B.** Kinetics of defense responses to photosensitization in transgenic tobacco plants that express antisense RNA for enzymes of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. Manuskript in Vorbereitung
- Keetman U., Mock H.-P., Grimm B.** Genes induced early upon photosensitization in transgenic tobacco plants with de-regulated tetrapyrrole biosynthesis. Manuskript in Vorbereitung

### Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen

(der Name des Vortragenden ist unterstrichen)

- U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Molekulare Prozesse in der Frühphase von tetrapyrrol-induziertem oxidativen Streß. Havel-Spree-Kolloquium der Berliner Universitäten, der Universität Potsdam und des MPI-MOPP Golm, Berlin, 21.11.1998
- U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Early molecular responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress. Cell Specialization and Redox Controlled Signaling - International Meeting of the Innovationskolleg „Cell Specialization: Similarities and Differences of Redox Control, Signal Transfer and Stress Response in Plant, Human and Animal“, Halle, 10.-13.12.1998
- U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Early molecular responses to oxidative stress in transgenic tobacco. Winter Meeting 1998 of the Society for Free Radical Research (European Region) – Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Granada, Spanien, 17.-19.12.1998
- H.-P. Mock, U. Keetman, B. Grimm:** Photosensitizing tetrapyrroles induce antioxidative and pathogen defense responses in plants. Winter Meeting 1998 of the Society for Free Radical Research (European Region) – Oxygen, free radicals and oxidative stress in

plants, Granada, Spanien, 17.-19.12.1998

**U. Keetman, H.-P. Mock, N. Shalygo, B. Grimm:** Molecular and biochemical responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress. Rundgespräch Photosynthese, Wallenfels, 07.-09.05.1999

**U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Porphyrin-akkumulierende Tabakpflanzen zeigen starke Gemeinsamkeiten mit der Hypersensitivitätsreaktion (HR). 13. Arbeitstagung Molekularbiologie der Pflanze, Dabringhausen, 8.-11.3.2000

#### Posterbeiträge

**H.-P. Mock, U. Keetman, B. Grimm:** Induced response of the defense system against oxidative stress as a consequence of deregulated tetrapyrrole metabolism. Winter Meeting 1995 of the Society for Free Radical Research (European Region) – Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Aberdeen, Schottland, November 1995

**U. Keetman, H.-P. Mock, E. Kruse, B. Grimm:** Deregulation of tetrapyrrole biosynthesis leads to defense responses against oxidative stress. Photosynthesetagung, Eggendorf, März 1996

**U. Keetman, H.-P. Mock, E. Kruse, B. Grimm:** Deregulation of tetrapyrrole biosynthesis leads to defense responses against oxidative stress. Botanikertagung, Düsseldorf, August 1996

**H.-P. Mock, U. Keetman, E. Kruse, B. Grimm:** Tetrapyrrole-induced cellular antioxidative defense response. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Halle, März 1997

**H.-P. Mock, U. Keetman, C. Triantaphylidès, E. Kruse, B. Grimm:** Tetrapyrrole-induced cellular antioxidative and pathogen defense responses. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiology (ASPP), Vancouver, Kanada, August 1997

**U. Keetman, E. Kruse, B. Grimm:** cDNA sequences related to early events of oxidative stress are potential candidates for components of the transduction pathway signaling oxidative stress. Winter Meeting 1997 of the Society for Free Radical Research (European Region) – Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Pisa, Italien, September 1997

**U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Induktion der antioxidativen Streßabwehr und HR-ähnlicher Reaktionen als Folge der Akkumulation von photoreaktiven Tetrapyrrolen in transgenen Tabakpflanzen. 11. Arbeitstagung Molekularbiologie der Pflanze, Dabringhausen, März 1998

**U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Early molecular responses to oxidative stress in transgenic tobacco plants accumulating photosensitizing porphyrins. Botanikertagung, Bremen, August 1998

**H.-P. Mock, U. Keetman, B. Grimm:** Photosensitizing tetrapyrroles induce antioxidative and pathogen defense responses in plants. Botanikertagung, Bremen, August 1998

**H.-P. Mock, U. Keetman, B. Grimm:** Photosensitizing tetrapyrroles induce antioxidative and pathogen defense responses in plants. Conference on plant-pathogen interaction, Edinburgh, Schottland, August 1998

**U. Keetman, H.-P. Mock, B. Grimm:** Molekulare Prozesse in der Frühphase von tetrapyrrol-induziertem oxidativen Streß. 12. Arbeitstagung Molekularbiologie der Pflanze, Dabringhausen, März 1999