
DIE REGULATION DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS IN HÖHEREN PFLANZEN

**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADMISCHEN GRADES
DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

an der Universität Konstanz
Fachbereich für Biologie

vorgelegt von

BARBARA LEDERER

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2002

Referent : Prof. Dr. Peter Böger

Referent : Prof. Dr. Volker Ullrich

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	V
--	----------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
------------------------------	-------------

1 EINLEITUNG	1
---------------------	----------

1.1 DAS ANTIOXIDATIVE SYSTEM HÖHERER PFLANZEN	1
1.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Beteiligung am Stress	1
1.1.2 Komponenten der antioxidativen Abwehr und ihr Zusammenspiel	2
1.1.3 Wirkungsweise von peroxidierenden Herbiziden	7
1.2 VERÄNDERUNGEN DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS IN TRANSGENEN PFLANZEN	8
1.3 DIE ROLLE DER GLUTATHION S-TRANSFERASE IN DER STRESSANTWORT	9
1.4 ZIELSETZUNG	12

2 MATERIAL UND METHODEN	14
--------------------------------	-----------

2.1 ANZUCHT DER VERWENDETEN ORGANISMEN	14
2.1.1 Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i> var. BelW3)	14
2.1.2 Mais (<i>Zea mays</i>)	14
2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.2 CHLOROPHYLLEXTRAKTION	15
2.3 LEITFÄHIGKEITSMESSUNG	15
2.4 WASSERSTOFFPEROXIDBESTIMMUNG	16
2.5 MESSUNG DER ETHAN- UND ETHYLENFREISETZUNG	16
2.6 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON ASCORBAT UND GLUTATHION	16
2.6.1 Ascorbat und Dehydroascorbat	16
2.6.2 Reduziertes und oxidiertes Glutathion	17
2.7 HPLC-ANALYSE VON PROTOPORPHYRIN IX	17
2.8 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON PROTOPORPHYRIN IX	17
2.9 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG DER PROTEINE	18
2.9.1 Enzymextraktion	18
2.9.2 Proteinbestimmung	18
2.10 ENZYMATISCHE TESTSYSTEME	19

2.10.1	Ascorbatperoxidase	19
2.10.2	Catalase.....	19
2.10.3	Dehydroascorbatreduktase.....	19
2.10.4	Glutathionreduktase.....	19
2.10.5	Glutathion S-Transferase	20
2.10.5.1	Aktivitätsmessung.....	20
2.10.5.2	Hemmstudien.....	20
2.10.5.3	Auswirkung der GSTs auf die Protoporphyrinogen-Oxidation.....	20
2.10.5.4	Auswirkung der GSTs auf die Häm-in-Degradation.....	20
2.10.6	Monodehydroascorbatreduktase	20
2.10.7	Peroxidasen	21
2.11	NATIVE POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UND AKTIVITÄTSFÄRBUNGEN	
	VON ENZYMEN (ZYMOGRAMME)	21
2.11.1	Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....	21
2.11.2	Aktivitätsfärbungen der Ascorbatperoxidasen	21
2.11.3	Aktivitätsfärbungen der Peroxidasen.....	22
2.11.4	Aktivitätsfärbungen der Superoxiddismutasen.....	22
2.12	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN (WESTERN-BLOTS).....	22
2.12.1	Verwendete Antiseren	22
2.12.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.12.3	Immunologische Identifikation der Proteine durch Western-Blots	23
2.12.4	Amidoschwarzfärbung.....	24
2.13	mRNA - NACHWEIS (NORTHERN-BLOTS)	24
2.13.1	Herstellung von Gensonden	25
2.13.1.1	Verwendete Gene und Plasmide.....	25
2.13.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	25
2.13.1.3	Isolierung, Verdau und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.13.1.4	Sondenherstellung zur mRNA-Detektion.....	26
2.13.1.4.1	Enzymatische Markierung.....	26
2.13.1.4.2	PCR Markierung.....	27
2.13.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus Tabak und Mais.....	28
2.13.3	Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA	28
2.13.4	Transfer der RNA auf die Hybridisierungsmembran (Northern-Blotting)	28
2.13.5	Hybridisierung mit DIG-markierten Gensonden und Chemilumineszenz- nachweis.....	29
2.14	TRANSFORMATION VON TABAK	29
2.14.1	Klonierungsstrategie	29
2.14.2	Transformation und Regeneration	30
2.15	CHEMIKALIEN.....	31
2.16	STATISTISCHE AUSWERTUNG	31

3 ERGEBNISSE**32**

3.1	CHARAKTERISIERUNG DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS IN TABAK.....	32
3.1.1	Bestimmung des Schadensausmaßes unter oxidativem Stress	32
3.1.2	Veränderung des Ascorbat- und Glutathion- Gehaltes unter oxidativem Stress	36
3.1.3	Veränderung antioxidativer Enzyme unter oxidativem Stress	37
3.1.3.1	Einfluss von Oxyfluorfen auf die Enzymaktivitäten.....	38
3.1.3.2	Einfluss von Paraquat auf die Enzymaktivität	39
3.1.4	Veränderungen des Isoenzymmusters durch oxidativen Stress.....	41
3.1.4.1	Peroxidasen	41
3.1.4.2	Superoxiddismutasen	42
3.1.4.3	Ascorbatperoxidasen.....	42
3.1.5	Veränderungen des D1-Proteins	43
3.1.6	Veränderungen der mRNA unter oxidativem Stress	44
3.1.6.1	Einfluss von Paraquat auf den mRNA-Gehalt	44
3.1.6.2	Einfluss von Oxyfluorfen auf den mRNA-Gehalt	48
3.1.7	Induktion antioxidativer Schutzenzyme in verschiedenen Tabakvarietäten unter Schwach- und Starklicht	53
3.2	VERHALTEN VON TABAK MIT ÜBEREXPRESSION DER GLUTATHION S-TRANSFERASE.....	
	GST27 AUS MAIS UNTER OXIDATIVEM STRESS.....	55
3.2.1	Kanamycinresistenz	55
3.2.2	Verhalten unter oxidativem Stress.....	55
3.2.2.1	Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Oxyfluorfen.....	55
3.2.2.2	Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Paraquat oder Wasserstoff-peroxid	57
3.2.2.3	Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Protoporphyrin IX	60
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER ROLLE VON GLUTATHION S-TRANSFERASEN IN MAIS	61
3.3.1	Induktion der Glutathion S-Transferasen.....	61
3.3.1.1	Induktion durch Safener.....	61
3.3.1.2	Induktion durch Metazachlor	62
3.3.1.3	Induktion durch peroxidierende Herbizide: Veränderung der Glutathion S-Transferasen unter oxidativem Stress	63
3.3.1.4	Aktivität der Glutathion S-Transferasen in ergrünem und etioliertem Mais..... bei Oxyfluorfenbehandlung.....	65
3.3.1.5	Schädigung von Mais unter oxidativem Stress	68
3.3.2	Interaktion der Glutathion S-Transferasen mit Tetrapyrrolen.....	69
3.3.2.1	Enzymatische Umsetzung von Protoporphyrin durch Glutathion S-Transferasen	69
3.3.2.2	Bindung von Porphyrinen an Glutathion S-Transferasen	71
3.3.2.3	Hemmung der Glutathion S-Transferase - Aktivität durch Porphyrine.....	72
3.3.2.4	Enzymatische Bestimmung des Bindungsorts von Protoporphyrin an Glutathion S-Transferasen	75
3.3.2.5	Bindungsaffinität von Porphyrinen an Glutathion S-Transferasen	78
3.3.3	Schutzfunktion der Glutathion S-Transferasen gegenüber Tetrapyrrolen.....	81

4 DISKUSSION **84**

4.1	REGULATION DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS BEI BEHANDLUNG MIT UNTERSCHIEDLICH WIRKENDEN STRESSOREN	84
4.1.1	Einfluss des Pflanzenalters und der Inkubationsart auf physiologische Parameter...	84
4.1.2	Reaktion des antioxidativen Systems auf Paraquat-Behandlung.....	86
4.1.3	Reaktion des antioxidativen Systems auf Oxyfluorfen-Behandlung	88
4.2	UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSION DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME IN VERSCHIEDENEN TABAKKULTIVAREN - HINWEISE AUF DIE OZONSENSITIVITÄT DES BELW3.....	90
4.3	VERÄNDERUNGEN IM ANTIOXIDATIVEN NETZWERK BEI ÜBEREXPRESSION DER GLUTATHIONREDUKTASE.....	92
4.4	ROLLE DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN IN DER HERBIZIDENTGIFTUNG UND UNTER OXIDATIVEM STRESS.....	95
4.4.1	Expressionsmuster der Glutathion S-Transferase-Isoformen.....	95
4.4.2	Expression der Glutathion S-Transferasen nach Herbizidbehandlung und unter oxidativem Stress	96
4.5	AUSWIRKUNGEN AUF DAS ANTIOXIDATIVE SYSTEM BEI ÜBEREXPRESSION DER GST27 IN BELW3	98
4.6	MÖGLICHE BETEILIGUNG DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN AM TETRAPYRROL- STOFFWECHSEL	99
4.7	SCHUTZFUNKTION DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN IM TETRAPYRROL- METABOLISMUS – EINE NEUE PHYSIOLOGISCHE ROLLE?	101

5 ZUSAMMENFASSUNG **104**

6 LITERATURVERZEICHNIS **106**

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des antioxidativen Systems höherer Pflanzen.....	3
Abbildung 2:	Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus.	5
Tabelle 1:	Physiologische Parameter von BelW3 und BelW3gor unter Lichtstress.	33
Abbildung 3:	Physiologische Parameter von BelW3 und BelW3gor unter oxidativem Stress.....	34
Abbildung 4:	H ₂ O ₂ - Entgiftung durch BelW3 und BelW3gor.	36
Abbildung 5:	Gehalt an reduziertem und oxidiertem Ascorbat bzw. reduziertem und oxidiertem Glutathion in BelW3 und BelW3gor nach Paraquatbehandlung.	37
Abbildung 6:	Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus nach Oxyfluorfenbehandlung.	38
Abbildung 7:	Aktivitäten antioxidativer Schutzenzyme nach Oxyfluorfenbehandlung.	39
Abbildung 8:	Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus nach Paraquatbehandlung.	40
Abbildung 9:	Aktivitäten antioxidativer Schutzenzyme nach Paraquatbehandlung.....	40
Abbildung 10:	Isoenzymmuster der Superoxiddismutase und der anionischen Peroxidase in BelW3 und BelW3gor nach Paraquatbehandlung.....	41
Abbildung 11:	Superoxiddismutase-Isoformen verschiedener Kultivare von Tabak und Mais.....	42
Abbildung 12:	Isoenzymmuster der Ascorbatperoxidase aus BelW3 nach Paraquat- oder Oxyfluorfenbehandlung.	43
Abbildung 13:	D1-Protein aus BelW3 und BelW3gor nach Paraquat- oder Oxyfluorfenbehandlung.	44
Abbildung 14:	mRNA der Catalasen aus BelW3 und BelW3gor nach Behandlung mit Paraquat.	45
Abbildung 15:	mRNA der Ascorbatperoxidase, Glutathionperoxidase und des Pathogenesis Related Proteins 1a bei Behandlung von BelW3 und BelW3gor mit Paraquat.....	46
Abbildung 16:	mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase, der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase, der β -Carotinhydroxylase und der Violaxanthin-deepoxidase nach Paraquatbehandlung von BelW3 und BelW3gor.	47
Abbildung 17:	mRNA der Catalasen aus BelW3 und BelW3gor nach Oxyfluorfenbehandlung.	48

Abbildung 18: Kinetik der mRNA-Veränderung von Ascorbatperoxidase, Catalase1 und Catalase2 bei Oxyfluorfenbehandlung von BelW3.....	49
Abbildung 19: mRNA der Ascorbatperoxidase, der Glutathionperoxidase und der bakteriellen Glutathionreduktase in BelW3 und in BelW3gor nach Behandlung mit Oxyfluorfen.	50
Abbildung 20: mRNA des Pathogenesis Related Protein 1a und der Protoporphyrinogen-oxidase bei Behandlung von BelW3 und BelW3gor mit Oxyfluorfen.....	51
Abbildung 21: mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase und der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase nach Oxyfluorfenbehandlung von BelW3 und BelW3gor.	52
Abbildung 22: mRNA der Catalase1, der Catalase2 und der β -Carotinhydroxylase in Keimlingen von BelW3 und Samsun.....	53
Abbildung 23: Vergleich des D1-Gehaltes und der Transkriptionsmenge antioxidativer Enzyme in BelW3, Belw3gor und Samsun unter Schwach- und Starklicht.	54
Abbildung 24: Veränderung des Chlorophyllgehaltes 7 Tage alter Keimlinge von BelW3, BelW3gst27 und Samsun nach Oxyfluorfenbehandlung.	56
Abbildung 25: Veränderung des Chlorophyllgehaltes 4 Tage alter Keimlinge von BelW3 und BelW3gst27 nach Oxyfluorfenbehandlung.	57
Abbildung 26: Physiologische Parameter von BelW3 und BelW3gst27 unter oxidativem Stress bei Paraquat- oder H ₂ O ₂ -Behandlung.	58
Abbildung 27: Vergleich des Chlorophyllgehaltes von BelW3, BelW3gst27 und Samsun nach Protoporphyrin-Behandlung im Licht oder im Dunkeln.....	60
Abbildung 28: Veränderung der mRNA- und Proteinmenge der Glutathion S-Transferase Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 durch potentielle Induktoren in Maisblättern.....	61
Abbildung 29: Einfluss von Metazachlor auf die mRNA- und Proteinmenge der Glutathion S-Transferase Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 in Blättern und in Wurzeln von Mais	62
Abbildung 30: Einfluss des Paraquats auf die Transkription und Expression der GST27- und GST29-Untereinheit in Blättern von Mais bei Dunkel- oder Lichtbehandlung.	64
Abbildung 31: Kinetik der Oxyfluorfen-induzierten GST27-Induktion bei in belichteten Maisblättern.....	64
Abbildung 32: Veränderungen der Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 durch Behandlung mit Oxyfluorfen im Licht oder im Dunkeln.	65

Tabelle 2:	Vergleich der Glutathion S-Transferase-Gesamtaktivität aus Blättern und Wurzeln etiolierter oder grüner Maispflanzen mit und ohne Oxyfluorfenbehandlung.	67
Tabelle 3:	Vergleich des Chlorophyll- und Protoporphyringehaltes in Blättern etiolierter oder grüner Maispflanzen mit und ohne Oxyfluorfenbehandlung.	68
Tabelle 4:	Leitfähigkeitsveränderung von unbehandeltem oder durch Naphtylsäureanhydrid gesafetem Mais bei Protoporphyrin-vermitteltem Photostress.	69
Abbildung 33:	Chromatogramm des Protoporphyrin IX und möglicher Glutathionkonjugate bzw. Abbauprodukte nach Inkubation mit Glutathion S-Transferasen.	70
Abbildung 34:	Native Gelelektrophorese verschiedener Proteine nach Protoporphyrin-Vorinkubation.	71
Abbildung 35:	Native Gelelektrophorese der Glutathion S-Transferase-Isoformen nach Inkubation mit Mesoporphyrin, Coproporphyrin, Uroporphyrin oder Mg-Protoporphyrin.	72
Abbildung 36:	Hemmung der GST29/29 durch Tetrapyrrole und Diphenylether.	73
Abbildung 37:	Hemmung der Aktivität verschiedener Glutathion S-Transferase-Isoformen durch Protoporphyrin.	74
Abbildung 38:	Prozentuale Hemmung der Glutathion S-Transferase-Isoformen durch Mesoporphyrin und Mg-Protoporphyrin.	75
Abbildung 39:	Lineweaver-Burk-Diagramm bei variabler CDNB-Konzentration mit Hemmung der Aktivität der Glutathion S-Transferasen durch Protoporphyrin.	76
Abbildung 40:	Lineweaver-Burk-Diagramm bei variabler GSH-Konzentration mit Hemmung der Aktivität der Glutathion S-Transferasen durch Protoporphyrin.	77
Abbildung 41:	Fluoreszenzveränderung der Porphyrine bei Titration mit GST26/26.	79
Abbildung 42:	Bindungskonstanten der Glutathion S-Transferase-Isoformen gegenüber Mesoporphyrin und Coproporphyrin.	80
Abbildung 43:	Verminderung der Autoxidation von Protoporphyrinogen durch die GST26/26.	82
Abbildung 44:	GST27/27-vermittelte Verringerung des H ₂ O ₂ - katalysierten Abbaus von Hämin.	83
Abbildung 45:	Plastidäre und extraplastidäre Verteilung der Antioxidantien.	85
Abbildung 46:	Erweiterte Funktion der Glutathion S-Transferasen im Zellstoffwechsel.	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μE	μEinstein (μmol Photonen)
APX	Ascorbatperoxidase
ASA	Ascorbat
ABC	ATP-binding cassette
ALA	Aminolaevulinat
BelW3	Kultivar (Varietät) von <i>Nicotiana tabacum</i>
BelW3 _{gor}	Transformante von BelW3 mit Überexpression einer bakteriellen Glutathionreduktase
BelW3 _{gst27}	Transformante von BelW3 mit Überexpression der Glutathion S-Transferase-Untereinheit 27 aus Mais
bhy	β-Carotinhydroxylase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Catalase
cDNA	copy-DNA
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
chlFeSOD	plastidäre Eisen-Superoxiddismutase
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo(3.3.1.1 ^{3,7})decan)-4-yl)phenylphosphat
CuZnSOD	Kupfer-Superoxiddismutase
cytAPX	cytosolische Ascorbatperoxidase
cytSOD	cytosolische Superoxiddismutase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
FeCy	Kaliumhexacyanoferrat(III)
FeSOD	Eisen-Superoxiddismutase
GOR	bakterielle Glutathionreduktase
G-POD	Guajacol-umsetzende Peroxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GST	Glutathion S-Transferase
GPX	Glutathionperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KPP _i	Kaliumphosphatpuffer
MDA	Monodehydroascorbat
MDAR	Monodehydroascorbatreduktase
MesoPP	Mesoporphyrin
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MOPS	(N-Morpholino)-propanylsulfonsäure
NA	Naphthylsäureanhydrid
NBT	p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
O ₂ ^{-•}	Superoxidanionradikal
[•] OH	Hydroxylradikal
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung (phosphate buffered saline)
Pgen	Protoporphyrinogen
POD	Peroxidase
P-POD	Pyrogallol-umsetzende Peroxidase
PPIX	Protoporphyrin
PPOX	Protoporphyrinogenoxidase
PR1a	Pathogenesis Related Protein 1a
PSI	Photosystem I
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuclease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sAPX	im Stroma gelöste Ascorbatperoxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
tAPX	thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
Tween 20	Poly(oxyethylen) _n -Sorbitan-Monolaurat
Tween 80	Poly(oxyethylen) _n -Sorbitan-Monooleat
UroPP	Uroporphyrinogen
VDE	Violaxanthinde-Epoxidase
GST26/26	Glutathion S-Transferase mit zwei 26 kD Proteinuntereinheiten (GSTIII/III; <i>ZmGSTIII</i>)
GST27/27	Glutathion S-Transferase mit zwei 27 kD Proteinuntereinheiten (GSTII/II; <i>ZmGSTII</i>)
GST27/29	Glutathion S-Transferase mit 27 kD und 29 kD Proteinuntereinheit (GSTI/II, <i>ZmGSTIV</i>)
GST29/29	Glutathion S-Transferase mit zwei 29 kD Proteinuntereinheiten (GSTI/I; <i>ZmGSTI</i>)

1 EINLEITUNG

1.1 DAS ANTIOXIDATIVE SYSTEM HÖHERER PFLANZEN

1.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Beteiligung am Stress

Einer der Widersprüche des Lebens auf diesem Planeten ist die Tatsache, dass Sauerstoff einerseits für aerobes Leben notwendig, andererseits aber für alle Lebensformen toxisch ist (Davies 1995).

Molekularer Sauerstoff ist ein freies Bi-Radikal und kann tetravalent bis zur Stufe des Wassers reduziert werden. Als Zwischenstufen treten durch schrittweise Reduktion das Superoxid-anionradikal, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal auf. Ein aktiver Zustand des Sauerstoffes ist der Singulett-Sauerstoff. Er wird durch Energietransfer gebildet, in photosynthetisch aktiven Organismen vor allem nach Lichtanregung des Chlorophylls. Seine Entgiftung erfolgt nicht-enzymatisch durch physikalisches oder chemisches Löschen des Anregungszustandes mittels niedermolekularer Antioxidantien.

Durch univalente Reduktion von Sauerstoff wird das Superoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) erzeugt. Dieses Radikal ist wenig reaktiv, ein Grossteil seines schädigenden Potentials wird der Reduktion von Übergangsmetallen zugeschrieben (Haber-Weiss-Reaktion).

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist, im Gegensatz zu anderen aktiven Sauerstoffspezies, relativ stabil und membrangängig. In vielen Stresssituationen übernimmt H_2O_2 offensichtlich eine bifunktionale Rolle: zum einen als toxisches Produkt, zum anderen als Signalmediator. Obgleich H_2O_2 selbst nicht sehr reaktiv ist, muss es schnell entgiftet werden, da mit reduzierten Metallionen, insbesondere Fe^{2+} , über die Fenton-Reaktion Hydroxylradikale entstehen (Wardman und Candeias, 1996).

Das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) ist das stärkste bekannte Oxidans und reagiert diffusionskontrolliert mit Molekülen, die dem Entstehungsort nahe sind. Spezifische Abwehrmechanismen sind folglich ineffizient; lediglich eine Verhinderung der Bildung von $\cdot OH$ - beispielsweise durch Entgiftung von Superoxid-anionen und Wasserstoffperoxid, wodurch die Fenton-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion unterbunden wird - kann das Risiko unkontrollierter oxidativer Schäden vermindern.

Oxidativer Stress beinhaltet das Auftreten verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Kompartimenten pflanzlicher Zellen und die daraus resultierenden oxidativen Angriffe auf Membransysteme, Proteine und Nukleinsäuren (Davies, 1995). Ganz allgemein bezeichnet der Terminus „Stress“ sublethale Belastungssituationen, die in einem Organismus Abweichungen vom Normalverhalten auslösen (Larcher, 1987).

Die Beteiligung aktiver Sauerstoffspezies wird in vielen unterschiedlichen Stresssituationen als wiederkehrendes Phänomen beobachtet, so z. B. bei Absorption überschüssiger Lichtenergie (Foyer und Noctor, 2000), bei erhöhter Ozonbelastung (Conklin, 1995; Sandermann, 1996; Wellburn und Wellburn, 1996; Schraudner et al., 1996), unter Salzstress (Streb und Feierabend, 1996; Lopez et al., 1996), Temperaturstress (Hodges et al., 1996; O’Kane et al., 1996) und im Kontakt mit Xenobiotika (Donahue et al., 1997; Knörzer et al., 1999; Shaaltiel et al., 1988a). Die Reaktion der Pflanzen auf natürliche und anthropogene Umweltbelastungen resultiert immer in oxidativer Schädigung, wenn nicht als primärer Effekt, so doch als Folge-reaktion der Zellschädigung (Larcher, 1994).

Aktive Sauerstoffspezies sind allerdings auch für eine Vielzahl physiologischer Grundreaktionen unabdingbare Reaktionsprodukte oder -partner. Lignifizierung, Fettsäuremetabolismus, Photorespiration und eine Vielzahl von enzymatischen Umsetzungen beinhalten das Auftreten von ROS im Zuge des pflanzlichen Primärstoffwechsels (Elstner, 1990). Auch bei der Abwehr von Pathogenen (Baker und Orlandi, 1995; Mehdy et al., 1996) kommt den ROS eine elementare Rolle zu, hier übernehmen sie sowohl Signalfunktion als auch direkte antibiotische Wirkung.

Oxidativer Stress ist infolgedessen für Pflanzen weder vermeidbar noch verzichtbar. Die Entgiftung der auftretenden Radikale und ihrer Folgeprodukte erfordert eine differenzierte Reaktion auf die spezifischen Stressbedingungen. Sie wird durch niedermolekulare Antioxidantien und ein komplexes Enzymsystem bewirkt (Inzé und van Montagu, 1995; vgl. auch Abbildung 1, S. 3; Abbildung 2, S. 5; Abbildung 45, S. 85).

1.1.2 Komponenten der antioxidativen Abwehr und ihr Zusammenspiel

Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren die Dismutation von Superoxidanionen zu O_2 und H_2O_2 . Die Isoformen der SODs in höheren Pflanzen lassen sich anhand des Metallcofaktors und der Kompartimentierung unterscheiden. In Tabak existieren cytosolische CuZnSOD (u. U. auch plastidär), mitochondriale MnSOD und plastidäre FeSOD. Die Chloroplasten ausdifferenzierter Blätter beinhalten SODs in einer Konzentration von 70 μM (Polle, 2001). Superoxidanionen können in wässriger Lösung auch nicht-enzymatisch disproportionieren, werden aber durch die SODs drei- bis viermal schneller entgiftet, was zusätzlich durch deren spezifische Lokalisierung an den Entstehungsorten erleichtert wird.

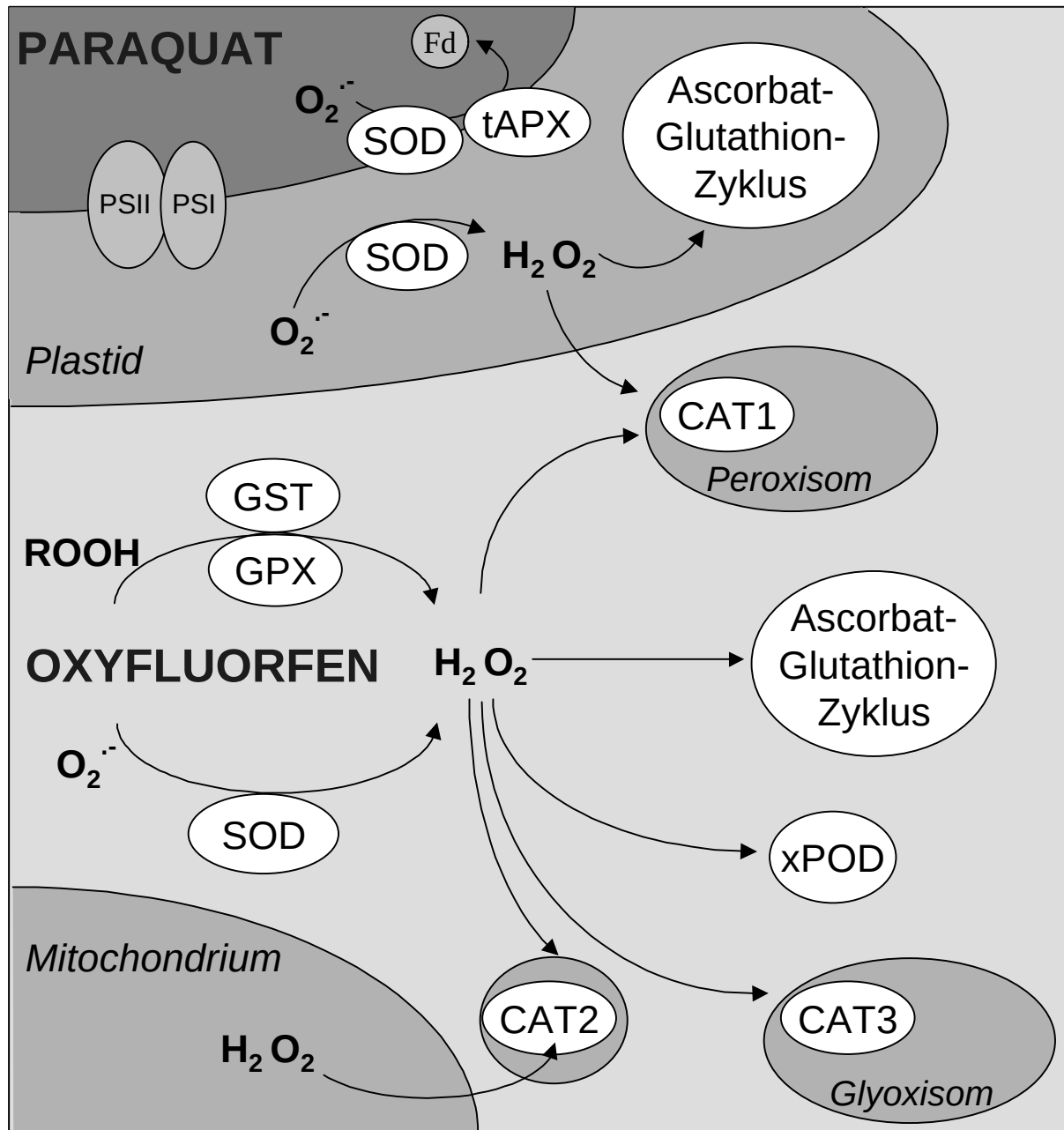


Abbildung 1: Schematische Darstellung des antioxidativen Systems höherer Pflanzen.

Kompartimentspezifische Verteilung der wichtigsten antioxidativen Schutzenzyme und Wirkorte der eingesetzten peroxidierenden Herbizide. Die am Ascorbat-Glutathion-Zyklus beteiligten Enzyme sind in Abbildung 2, S. 5 dargestellt.

Die Entgiftung von H_2O_2 wird durch Catalasen und Peroxidasen bewerkstelligt. Catalasen (CAT; $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$) benötigen, im Gegensatz zu den Peroxidasen, keine zusätzlichen Reduktionsäquivalente. Sie treten als tetramere Hämproteine in allen aeroben Organismen auf. Pflanzen besitzen mehrere Catalase-Isoformen, die anhand ihrer enzymatischen Eigenschaften und des Induktionsprofils klassifiziert werden können. Die Isoformen sind mit etwa 4 mM in

hohen Konzentrationen in physiologisch spezialisierten Peroxisomen lokalisiert. Diese können aber auch plastiden- oder mitochondrien-assoziiert vorliegen. Catalasen sind primär an der extraplastidären Entfernung überschüssiger H_2O_2 -Mengen beteiligt, da sie aufgrund ihrer relativ geringen Substrataffinität nur bei hohen Konzentrationen effizient arbeiten können (Baker und Orlandi, 1996). Bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen (je nach Isoform weniger als ca. 10 μM) sind Catalasen in der Lage, die H_2O_2 -Reduktion unter Verbrauch eines Wasserstoffdonors, wie z. B. Ethanol, Ameisensäure oder Ascorbat, zu katalysieren. In Tabak (*Nicotiana plumbaginifolia*) werden drei Catalase-Gene exprimiert (Willekens et al., 1994). Die CAT1 ist in photosynthetisch aktiven Geweben die häufigste Isoform und ist an der Entfernung des photorespiratorisch gebildeten H_2O_2 beteiligt. Die CAT2 erfährt ihre höchste Expression in vaskulären Geweben und wird schnell durch Ozon, Schwefeldioxid und UV-B induziert (Willekens et al., 1995). Daher wird ihr eine Rolle in der Abwehr oxidativen Stresses zugeschrieben, wobei ihre physiologische Rolle ebenso wie ihre Lokalisation (peroxisomal oder mitochondrial) nicht vollständig geklärt ist (Chamnongpol et al., 1996). CAT3 entgiftet wahrscheinlich vor allem durch die Fettsäuredegradation in Keimlingen entstehendes H_2O_2 in den Glyoxisomen.

Ascorbatperoxidasen (APX; $2 \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{Ascorbat} \rightarrow 2 \text{Monodehydroascorbat} + 2 \text{H}_2\text{O}$) kommen v.a. im Cytosol (cytAPX) und den Chloroplasten vor. In Letzteren werden mit einer Gesamtkonzentration von ca. 50 μM (Polle, 2001) sowohl thylakoidgebundene (tAPX) als auch im Stroma gelöste Isoformen (sAPX) gefunden.

Die für die APX notwendige Regeneration von Ascorbat (ASA) wird durch eine Enzymkaskade vermittelt, welche im Chloroplastenstroma, aber auch im Cytosol und Mitochondrium lokalisiert ist. Dieser sogenannte Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Halliwell-Asada-Zyklus) umfasst das konkordante Zusammenspiel der Enzyme Ascorbatperoxidase, Monodehydroascorbatreduktase, Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase (Abbildung 2, S. 5). In seiner Summengleichung führt er zu einer Reduktion des H_2O_2 zu H_2O unter Verbrauch von NAD(P)H.

Die Monodehydroascorbatreduktase (MDAR) reduziert das Monodehydroascorbat mittels NADP(P)H zum Ascorbat. Monodehydroascorbat (MDA) kann aber auch nicht-enzymatisch zu Ascorbat regeneriert werden, z. B. durch Reduktion mit Ferredoxin. Reduziertes Ferredoxin reagiert etwa 40mal schneller mit MDA als mit dem physiologischen Elektronenakzeptor NADP. Daher wird MDA, welches an den Thylakoiden entsteht, wahrscheinlich durch Ferredoxin umgesetzt; die MDAR entsorgt dann überschüssiges oder im Stroma entstandenes MDA.

Wenn MDA nicht mittels Ferredoxin oder NAD(P)H über die MDAR zu ASA reduziert wird, disproportioniert es nicht-enzymatisch zu Dehydroascorbat (DASA) und ASA, insbesondere bei niederem pH. DASA wiederum ist instabil und wird bei hohen pH-Werten schnell zersetzt, was zu einem irreversiblen Ascorbatverlust führt. Um dem vorzubeugen, wird das

Dehydroascorbat über die Dehydroascorbatreduktase (DHAR) durch Glutathion zum Ascorbat regeneriert, wobei Glutathion oxidiert wird. Die Spezifität der enzymatischen Reduktion des Dehydroascorbats durch die DHAR ist allerdings umstritten. Winkler et al. (1994) folgern darüber hinaus aus kinetischen Daten, dass eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen GSH und DASA der physiologisch relevantere Weg zur Reduktion des DASA ist.

Resultierendes oxidiertes Glutathion wird über das Flavoprotein Glutathionreduktase (GR) mittels NADPH reduziert. Die Hauptaktivität der GR tritt im Plastiden auf, wo sie in einer Konzentration von ca. 2 μM vorliegt (Polle, 2001). Im Cytosol finden sich etwa 15 %, im Mitochondrium ca. 5 % der Gesamtaktivität.

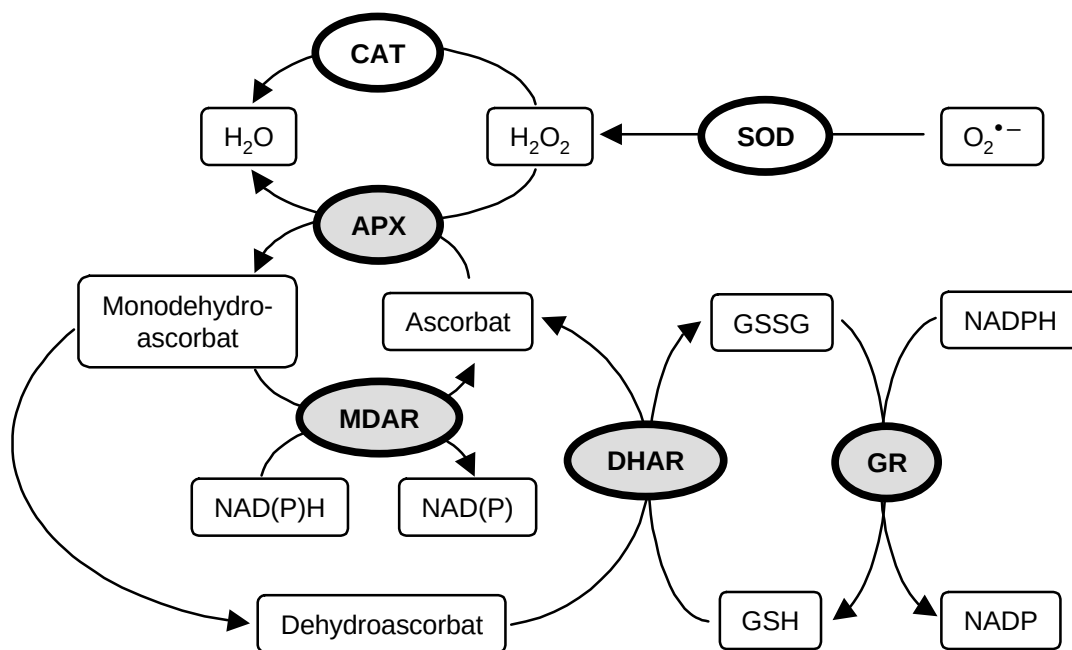


Abbildung 2: Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus.

Die Reaktionssequenz des Ascorbat-Glutathion-Zyklus besteht aus Ascorbatperoxidase (APX), Monodehydroascorbatreduktase (MDAR), Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und Glutathionreduktase (GR). Die funktional eng mit dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus verbundenen Enzyme Catalase (CAT) und Superoxid-dismutase (SOD) sind zur Vervollständigung ebenfalls dargestellt, aber weiss unterlegt (angelehnt an Knörzer und Böger, 1999).

An den Thylakoidmembranen (insbesondere mit dem Photosystem I [PS I] verbunden) tritt eine dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus funktional analoge Reaktionssequenz auf. Dieser sogenannte Wasser-Wasser-Zyklus (Mehler-Peroxidase-Reaktion) dient ursächlich der Beseitigung des bei Photoreduktion von Sauerstoff (der sogenannten Mehler-Reaktion) auftretenden Superoxids bzw. Wasserstoffperoxids. Hierbei wird durch eine mit dem PS I assoziierte tAPX Wasserstoffperoxid *in situ nascendi* abgefangen und eine Regeneration des entstehenden MDHA durch Elektronenübernahme vom Ferredoxin ermöglicht (Polle, 1996).

Ergänzend zum Abbau von Wasserstoffperoxid durch Peroxidasen müssen Pflanzen auch organische Hydroperoxide entgiften. Diese können – z. B. in Membranen – bis zu 80 % der Endprodukte einer durch Radikale ausgelösten Kettenreaktion ausmachen (Saran et al., 1998). Organische Hydroperoxide werden in Pflanzen vermutlich durch spezifischen Isoformen der Glutathion S-Transferasen (GST) reduziert. Im Gegensatz zu den glutathionabhängigen Peroxidasen können diese allerdings kein H_2O_2 umsetzen.

Die physiologischen Abwehrmechanismen der Pflanzen beschränken sich nicht allein auf enzymkatalysierte Reaktionen, sondern schliessen auch spontane chemische Reaktionen der aktiven Sauerstoffspezies mit niedermolekularen Schutzsubstanzen ein. Im Gegensatz zum zellulären Entgiftungssystem für die stabilen Peroxide und das relativ langlebige Superoxid-anion konnten bislang keine spezifischen enzymatischen Abwehrmechanismen gegenüber kurzlebigen Radikalen (wie Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikalen) nachgewiesen werden, was die Relevanz der niedermolekularen Antioxidantien betont.

Die hydrophilen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion sind über ihre Beteiligung als Co-substrate z. B. im Ascorbat-Glutathion-Zyklus hinaus in der Lage, nicht-enzymatisch mit ROS zu reagieren. Ascorbat kann *in vitro* Superoxidanionen und Hydroxylradikale abfangen, auch Glutathion kann *in vitro* direkt mit Hydroxylradikalen reagieren (Hamlyn, 1989). Durch ihre sehr hohe intrazelluläre Konzentration im millimolaren Bereich vermögen sie effizienten Schutz vor radikalischen Kettenreaktionen zu bieten und tragen dazu bei, den Redoxstatus der Zelle aufrechtzuerhalten.

Carotinoide und α -Tocopherol wirken als lipophile Antioxidantien und sind in der Membran lokalisiert. α -Tocopherol reduziert entstandene Lipidperoxide und wird nicht-enzymatisch über Ascorbat und den Ascorbat-Glutathion-Zyklus regeneriert (Niki et al., 1982). Die Carotinoide, und darunter insbesondere die Xanthophylle, sind als Pigmentkomponenten der photosynthetisch aktiven Membranen in der Lage, entweder über Energiedissipation oder über Elektronenübernahme die Entstehung aktiver Sauerstoffspezies zu vermindern bzw. diese direkt abzufangen. Da Ascorbat auch für die Deepoxidation des Violaxanthin zu Zeaxanthin im Xanthophyllzyklus essentiell ist, besteht eine enge Vernetzung der niedermolekularen lipophilen und hydrophilen Antioxidantien.

Das Wirkungsgefüge der antioxidativen Abwehr kann auf mannigfaltige Weise moduliert werden, z. B. über die Induktion oder Degradation der beteiligten Enzyme auf transkriptionaler und translationaler Ebene, oder über die Kompartimentierung der beteiligten Enzyme bzw. niedermolekularen Metabolite. Die Vielfalt der Szenarien der ROS-Bildung erfordert darüber hinaus eine differenzierte Antwort. Eine grundlegende regulatorische Komponente stellt möglicherweise der Ort der Entstehung der ROS dar. Die kompartimentspezifische Induktion der antioxidativen Antwort wird zwar vermutet, wurde bislang allerdings experimentell nicht detailliert untersucht.

1.1.3 Wirkungsweise von peroxidierenden Herbiziden

Um die Wirkung spezifischer Sauerstoffspezies in unterschiedlichen Kompartimenten zu untersuchen, kann auf chemische Agenzien zurückgegriffen werden, insbesondere auf peroxidierende Herbizide. Als Initiatoren für die Bildung aktiver Sauerstoffspezies sind unter den Herbiziden u.a. die Bipyridyliumsalze und substituierte Diphenylether bekannt.

Die Wirkung von Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridyliumsalz, Methylviologen) beruht auf lichtabhängiger Bildung eines stabilen Radikales durch Elektronenübernahme vom Photosystem I (PSI) bzw. von Agenzien mit geeignetem Redoxpotential, z. B. Flavoproteinen. Da die reduzierte Form der Methylviologene autoxidabel ist, entstehen im Chloroplasten bei Reaktion mit molekularem Sauerstoff toxische Sauerstoffradikale. Für die beobachteten Wirkungen – Lipidperoxidation (Boehler-Kohler et al., 1981) und Pigmentzerstörung (Böger und Kunert, 1978) – scheinen die primär gebildeten Superoxidanion und v. a. in Folge entstehende Hydroxylradikale und Peroxide verantwortlich zu sein (Kirtiara und Talbot, 1996).

Die Toxizität des Diphenylethers Oxyfluorfen hingegen beruht auf der Hemmung eines zentralen Schrittes der Chlorophyll- und Hämsynthese, katalysiert durch die Protoporphyrinogenoxidase (PPOX). Deren Substrat, das nicht-toxische Protoporphyrinogen (Pgen), wird in Folge aus dem Plastiden exportiert und dort entweder nicht-enzymatisch (Jakobs und Jakobs, 1983) oder durch eine am Endoplasmatischen Reticulum gebundene Oxidase (Retzlaff und Böger, 1996) zu Protoporphyrin (PPIX) umgesetzt. Dennoch ist nicht die verminderte plastidäre und mitochondriale PPIX-Bildung auf Kosten der Chlorophyll- und Hämsynthese, sondern die cytosolische Bildung und Akkumulation des toxischen PPIX (Sandmann und Böger, 1988) als ursächlicher Auslöser des oxidativen Stresses zu sehen. Dieses lipophile photodynamische Tetrapyrrol bildet einerseits nach Lichtaktivierung in Reaktion mit molekularem Sauerstoff den stark reaktiven Singulett-Sauerstoff. Andererseits kann nach Aktivierung durch Lichtenergie in Gegenwart eines geeigneten Reduktanten das Protoporphyrinradikal und in Folge das Superoxidanion gebildet werden (Retzlaff und Böger, 1996).

Mit diesen Ansätzen, oxidativen Stress in pflanzlichen Zellkompartimenten zu erzeugen, kann eine differenzierte Betrachtung der Entgiftung verschiedenener aktiver Sauerstoffspezies im Cytosol bzw. im Chloroplasten auf Ebene der antioxidativen Schutzenzyme vorgenommen werden.

1.2 VERÄNDERUNGEN DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS IN TRANSGENEN PFLANZEN

Transgene höhere Pflanzen, die Enzyme des oxidativen Schutzes überexprimieren, sind in den letzten Jahren als unverzichtbare Hilfsmittel zur Charakterisierung der komplexen Zusammenhänge in diesem Wirksystem eingesetzt worden (Allen, 1995).

Der Eliminierung von Superoxidanionen als zentralem Ausgangspunkt weiterer radikalischer Kettenreaktionen wurde hierbei besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Durch Überexpression verschieden lokalisierter SOD-Isoformen (Pitcher et al., 1991; Sen Gupta et al., 1993a; Sen Gupta et al., 1993b; van Camp et al., 1996) ließ sich allerdings keine einheitliche Erhöhung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch Ozon oder Paraquat, erkennen. Zumindest in *Nicotiana tabacum* sind vermutlich nicht die SODs, sondern Enzyme, welche aus Superoxidanionen entstehendes Wasserstoffperoxid abbauen, als limitierende Faktoren der Stressresistenz zu sehen, zumal plastidäre und cytosolische SODs durch H₂O₂ inaktiviert werden.

Diese Annahme wird durch die erhöhte Paraquatresistenz von Tabakpflanzen mit plastidär überexprimierter Catalase aus *E. coli* gestützt (Miygawa et al., 2000). Die Erhöhung der Catalaseaktivität führte jedoch zu einer Verminderung der plastidären APX-Aktivität und war nicht in der Lage, die Reduktion des Ascorbatpools unter Stress zu verhindern.

Eine gentechnische Erhöhung der APX-Aktivität führte nur bei cytosolischer, nicht aber bei plastidärer Überexpression zum Schutz gegen Paraquat-induzierten oxidativen Stress, obgleich dieser initial im Plastiden auftritt (Pitcher et al., 1994). Plastidäre Überexpression der APX im ozonsensitiven Tabakkultivar BelW3 bewirkte des Weiteren keine verbesserte Ozonresistenz (Torsethaugen et al., 1997).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass auch die cytosolische Reduktion von Wasserstoffperoxid bzw. Ascorbat bei Erschöpfung des plastidären Ascorbatpools einen wichtigen Schutzmechanismus gegenüber plastidär initiiertem oxidativem Stress darstellt. Die enzymatische Regeneration des Ascorbats über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus unter Beteiligung der GR könnte somit den limitierenden Faktor der Stressresistenz darstellen, zumal die GR im Plastiden das am geringsten konzentrierte antioxidative Enzym ist.

Die plastidäre oder cytosolische Überexpression der GR aus *E. coli* in *Nicotiana tabacum* cv. SR1 L. resultierte in beiden Fällen in einem vergleichbaren Schutz gegenüber Paraquat, nicht aber gegen Ozon (Aono et al., 1993). Bei cytosolischer Überexpression der GR in Samsun (Foyer et al., 1991) und BelW3 (Aono et al., 1991) wurde eine etwas geringere Schädigung nach Paraquatbehandlung bei unveränderter Ozonresistenz festgestellt. Auch Creissen et al. (1996) fanden bei cytosolischer oder plastidärer Expression einer GR aus *Pisum sativum* im Tabakkultivar Samsun eine verbesserte Paraquatresistenz gegenüber dem Wildtyp, die allerdings nicht in allen transgenen Linien auftrat und nicht mit der GR-Aktivität korrelierte.

Die hier angeführten Beispiele lassen zum Einen vermuten, dass eine umfassende Resistenz gegen oxidativen Stress nicht allein durch die hier erwähnten Elemente vermittelt wird, sondern weitere Schutzenzyme hierzu notwendig sind. Zum Anderen deutet die in den meisten Transformanten fehlende Kreuzresistenz gegenüber anderen Formen von oxidativem Stress eine kompartimentspezifische Balance der antioxidativen Enzymkaskaden an, was möglicherweise durch ein bislang uncharakterisiertes Element reguliert wird. Des Weiteren ist ebenso denkbar, dass bei punktueller Veränderung des antioxidativen Systems auch pleiotrope Effekte auftreten, was die teilweise widersprüchliche Wirksamkeit der Überexpression antioxidativer Schutzenzyme erklären könnte.

1.3 DIE ROLLE DER GLUTATHION S-TRANSFERASE IN DER STRESSANTWORT

In den meisten Untersuchungen zum antioxidativen System liegt der Hauptaugenmerk auf den "klassischen" antioxidativen Enzymen (vgl. Abbildung 1, S. 3), welche die primär entstehenden ROS (im engeren Sinne $O_2^{\cdot -}$ und H_2O_2) entgiften. Die nicht minder wichtige Rolle der Entgiftung von Folgeprodukten des radikalischen Angriffes, wie beispielsweise Lipidhydroperoxiden oder giftiger Alkenale, ist weniger gut erforscht. In den letzten Jahren hat sich in Analogie zum tierischen System eine Beteiligung der Glutathion S-Transferasen (GSTs) bezüglich des Umsatzes dieser toxischen Substrate herauskristallisiert (Bartling et al., 1993).

Untersuchungen zur Induktion der GSTs in Pflanzen legen nahe, dass sie eine wichtige Funktion in der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress besitzen (Zusammenfassung bei Droog, 1997; Resultate bei Zhou und Goldsbrough, 1993; Droog et al., 1993; Ulmasov et al., 1995; Hahn et al., 1994; Edwards, 1996). Die postulierte Rolle der GSTs in der antioxidativen Antwort (Tenhaken et al., 1995; Levine et al., 1994; Pell et al., 1997) wird durch eine Reihe von biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten gestützt. So konnte belegt werden, dass pflanzliche GSTs durch Schwermetalle (Takahashi et al., 1991), Ethylen (Bartling et al., 1993), Methyljasmonat und H_2O_2 (Ulmasov et al., 1995), Salicylsäure (Knörzer et al., 1999), Paraquat (Mauch und Dudler, 1993), Oxyfluorfen (Knörzer et al., 1996) und Ozon (Sharma et al., 1996) induziert werden.

Ein direkter schützender Effekt der GSTs bei oxidativem Stress wurde bislang nicht mittels molekularbiologischer Methoden untersucht. Anhand einer Transformante mit Überexpression einer GST aus Tabak konnte aber gezeigt werden, dass diese transgenen Tabaksämlinge unter Kälte- und Salzstress besser keimen (Roxas et al., 1997). Eine andere Tabaktransformante mit Überexpression der GST27 aus *Zea mays* zeigte eine geringere Schädigung bei Behandlung mit Metolachlor (Jepson et al., 1997), welches als Herbizid der Chloracetamidgruppe die Verlängerung sehr langkettiger Fettsäuren unterbindet. In keiner der Veröffentlichungen über

Pflanzen mit transgen erhöhter GST-Aktivität wurde eine Untersuchung des antioxidativen Systems durchgeführt.

Ganz allgemein repräsentieren Glutathion S-Transferasen eine Gruppe von multifunktionalen Enzymen, welche die Konjugation einer Vielzahl von elektrophilen Substraten mit Glutathion (GSH) katalysieren (Dean et al., 1995, Marrs, 1996; Marrs et al., 1995), wodurch diese entgiftet bzw. hydrophiler werden (Lamoureux und Rusness, 1993; Droog, 1997). Die S-Konjugate werden auf diese Weise der transmembrären Überführung durch ‚ATP-binding-cassette‘ (ABC)-Transporter zugänglich gemacht, die spezifische GSH-Konjugate in den Vakuolen ablagern können (Gaillard et al., 1994; Edwards et al., 2000).

Die in dieser Studie untersuchten GST-Isoformen aus Mais unterscheiden sich hinlänglich ihrer biochemischen Eigenschaften und Expression. Sie können als Homo- oder Heterodimere auftreten, wobei sich ihre Benennung in der Literatur entweder nach dem Molekulargewicht der Untereinheiten oder nach dem Elutionsverhalten bei chromatographischer Trennung richtet. Dixon et al. (1997) haben deswegen eine Revision der Nomenklatur vorgeschlagen, hier seien zur Orientierung alle Versionen angeführt. GST29/29 (aus zwei 29 kDa- Untereinheiten aufgebaut, = GST I, *Zm* GSTI/I) ist eine mengenmäßig prominente Isoform, sie verfügt über ein weites Substratspektrum bezüglich Herbiziden und Xenobiotika und zeigt keine Aktivität gegenüber Hydroperoxiden. Die GST27/27 (ein Homodimer aus 27 kDa, = GST IV, *Zm* GSTII/II) zeigt nur geringe Aktivität gegenüber CDNB, ist durch Safener induzierbar und kann organische Hydroperoxide entgiften. Die GST27/29 (29 und 27 kDa, = GSTII, *Zm* GSTI/II) besitzt ebenfalls eine peroxidaseähnliche Aktivität mit Cumenhydroperoxid als Substrat, welche auf die Aktivität der 27 kDa Untereinheit zurückzuführen ist (Sommer und Böger, 1999). Wie die GST27/27 scheint sie in Wurzeln konstitutiv, in Sprossen nur nach Induktion durch Safener oder Salicylsäure und während der Seneszenz exprimiert zu werden. Das Homodimer aus zwei 26 kDa Untereinheiten, die GST26/26 (GSTIII, *Zm* GSTIII/III, Moore et al., 1986, Grove et al., 1988), wird in Mais konstitutiv exprimiert, was auf eine natürliche physiologische Aufgabe dieser GST in der Pflanze hindeutet.

Obgleich sie in großer Anzahl (über 40 klonierte GSTs in Mais, McGonigle et al., 2000) und Menge (bis zu 1 % des löslichen Gesamtproteins) auftreten, gibt es über die physiologischen Aufgaben der GSTs pflanzlicher Organismen nur spärliche Informationen. Die Aktivität der GSTs gegenüber xenobiotischen Substraten, insbesondere im Zuge der Herbizidentgiftung, ist gut charakterisiert (Kreuz et al., 1996, Neufeind et al., 1997). Zu den durch Konjugation mit Glutathion entgifteten Herbiziden zählen Chloracetamide, Chloracetanilide, Sulfonylharnstoffe, Triazine und Diphenylether (Cole et al., 1997). Es wurden darüber hinaus spezifische Nebenaktivitäten der GSTs nachgewiesen, insbesondere eine Isomeraseaktivität, welche zur Aktivierung von Proherbiziden führen kann (Nicolaus et al., 1996).

Die Rolle der GSTs gegenüber peroxidierenden Herbiziden ist möglicherweise nicht auf deren Entgiftung bzw. die Entgiftung der toxischen Folgeprodukte beschränkt. Im Falle der Diphenylether, die eine Akkumulation des Protoporphyrin auslösen, könnten die GSTs am Umsatz des Tetrapyrroles beteiligt sein. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass eine Korrelation zwischen GST-Aktivität und Porphyrindegradation besteht. So zog eine Induktion der GST-Aktivität durch Salicylsäure in Soja-Zellkulturen eine deutlich verminderte Protoporphyrinakkumulation bei anschließender Behandlung mit dem Diphenylether Oxyfluorfen nach sich (Knörzer et al., 1999). Desgleichen wurde in Maispflanzen, die mit GST-induzierenden Safenern behandelt waren, bei Gabe von Diphenylethern weniger Protoporphyrin nachgewiesen als bei unbehandelten Pflanzen. Die Hemmung der Protoporphyrinogenoxidase und damit die Akkumulation des Protoporphyrin war in den Safener-behandelten Pflanzen nicht beeinträchtigt (Böger und Miller, 1994). Der Abbau von Protoporphyrin wird von einer Glutathion-abhängige Peroxidase bewerkstelligt, die allerdings noch nicht näher charakterisiert werden konnte (Dayan et al., 1999). Diese Untersuchungen lassen den Schluß zu, dass die bei Induktion der GSTs beobachtete verminderte Akkumulation des Protoporphyrin nicht auf verminderte Biosynthese, sondern auf verstärkte Degradation zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zur Vielzahl der bekannten artifiziellen Substrate sind nur wenige endogene Substrate der GSTs bekannt. Bislang konnten nur Medicarpin, Isoliquirtigenin, Ferulasäure, Ethacrynsäure und Caftarinsäure zweifelsfrei als natürlich auftretende Substrate der GSTs identifiziert werden (Edwards et al., 2000). Diese Metabolite treten allerdings in relativ spezifischen Nebenreaktionen des Sekundärmetabolismus auf und können so schwerlich für das ubiquitäre Auftreten und die Vielfalt der GSTs verantwortlich zeichnen.

Für viele der potentiellen Substrate, deren Vakuolentransport durch GSTs erleichtert wird oder die mit GSTs interagieren, konnte bei genauerer chemischer Analyse keine Glutathionisierung durch GSTs nachgewiesen werden. So werden endogene Phenylpropanoide wie Zimtsäure oder Cumarsäure zwar von GSTs gebunden, nicht aber mit GSH konjugiert (Dean et al., 1995; Dean und Devarenne, 1997). Auch Auxine binden an spezifische GSTs (Watahiki et al., 1995), werden aber nicht chemisch modifiziert. Die Sequestrierung von Anthocyanen in die Vakuole wird durch GSTs vermittelt (Alfenito et al., 1998), ohne dass eine Glutathionisierung auftritt (Mueller et al., 2000).

Aufgrund dieser und anderer Befunde scheint sich in jüngerer Zeit eine alternative Funktion der GSTs als Binde- und Transportproteine anzudeuten (Walbot et al., 2000). Welche Rolle die GSTs aufgrund ihrer Fähigkeiten im pflanzlichen Stoffwechsel übernehmen, ist bislang allerdings unklar.

1.4 ZIELSETZUNG

Die vorliegende Arbeit sollte zur Charakterisierung des antioxidativen Systems höherer Pflanzen durch den Einsatz biochemischer und molekularbiologischer Methoden beitragen.

- 1.) Am ozonsensitiven Tabakkultivar BelW3 sollte geklärt werden, inwiefern eine kompartimentspezifische Induktion des antioxidativen Systems physiologische Änderungen hervorruft. Hierzu sollten die peroxidierenden Wirkstoffe Paraquat und Oxyfluorfen mit primär plastidärem bzw. cytosolischem Effekt eingesetzt werden. Ziel war es, durch die Bestimmung

der Antioxidantien Ascorbat und Glutathion,
der Aktivitäten der wichtigsten antioxidativen Enzyme
und deren Transkriptionsniveau

Einblick in die Regulation des antioxidativen Systems zu gewinnen.

- 2.) Zudem sollte eine vergleichende Charakterisierung der ozonsensitiven Tabakvarietät BelW3 und einer daraus abgeleiteten Transformante BelW3gor mit Überexpression der Glutathionreduktase durchgeführt werden. Ziel war es,

durch Bestimmung physiologischer Parameter die Resistenz gegenüber verschiedenen Stressoren zu bestimmen,
im Vergleich des Transkriptionsmusters antioxidativer Enzyme mögliche pleiotrope Effekte der Überexpression zu erfassen sowie
die Veränderung des Transkriptionsniveaus der Gene für antioxidative Enzyme in transgenen Pflanzen und Wildtyp nach Paraquat- oder Oxyfluorfenbehandlung zu analysieren. Daraus sollten Rückschlüsse gezogen werden, inwieweit die Überexpression eines Enzyms das restliche antioxidative System modulieren kann.

- 3.) Das antioxidative System wird möglicherweise durch die biochemische Fähigkeit der Glutathion S-Transferasen zur Entgiftung von organischen Hydroperoxiden ergänzt. Hierbei ist bislang noch ungeklärt, inwiefern diese Funktion physiologische Bedeutung besitzt.

Ziel war es, das Expressionsmuster und die antioxidative Rolle von GSTs in Mais zu charakterisieren. Im besonderen sollte die duale Funktion der GSTs in der Herbizidentgiftung und in der Entgiftung von Folgeprodukten peroxidierender Herbizide abgegrenzt werden. Auf Basis der Ergebnisse zur Regulation der GSTs *in vivo* sollte eine GST-Isoform für die geplante

gentechnische Veränderung der Tabakvarietät BelW3 ausgewählt werden.

Eine transgene Tabakpflanze mit Überexpression einer GST-Isoform sollte hergestellt werden. Hierzu war eine geeignete Klonierungsstrategie zu entwickeln. Auf deren Grundlage sollte die cDNA in einen binären Vektor umklontiert und über *Agrobacterium tumefaciens* -vermittelte Transformation in *Nicotiana tabacum* cv. BelW3 eingebracht werden.

Dadurch sollte die Voraussetzung geschaffen werden, um über die physiologische Charakterisierung der GST-Transformante die postulierte Rolle der GSTs in der antioxidativen Abwehr zu testen.

- 4.) Ergänzend zu den physiologischen Untersuchungen sollte die biochemische Funktion der GSTs in der Verminderung von Oxyfluorfen-induziertem Stress untersucht werden.

Es war zu prüfen, ob eine Interaktion der GSTs mit Porphyrinen möglich ist. Die Fähigkeit der GST-Isoenzyme, Protoporphyrin zu binden, war zu testen und die Art der Bindung sollte gegebenenfalls charakterisiert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob auch andere Tetrapyrrole oder strukturverwandte Substanzen von GSTs gebunden werden können.

Des weiteren war von Interesse, inwiefern GSTs die Oxyfluorfen-induzierte Protoporphyrinakkumulation beeinflussen können. Hier war zu klären, ob Reinformen der GSTs in der Lage sind, Protoporphyrin zu degradieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ANZUCHT DER VERWENDETEN ORGANISMEN

2.1.1 Tabak (*Nicotiana tabacum* var. BelW3)

Alle Versuche mit Tabak (*Nicotiana tabacum* var. BelW3) wurden mit steril angezogenen Pflanzen durchgeführt. Hierzu wurden die Samen 1 min in 70 %igem Ethanol und 10 min in 1,3 % Natriumhypochlorit, 1 ‰ Detergenz sterilisiert und dreimal in sterilem Wasser gewaschen. Die Anzucht erfolgte unter sterilen Bedingungen in Weckgläsern (500 ml Volumen) auf ca. 50 ml MS-Agar (Murashige & Skoog Basal Salt Medium, Sigma, Deisenhofen; 0,9 % [w/v] Agar, Difco Lab., Detroit; pH 5,7) als Kultursubstrat in einer Klimakammer bei 24 °C, 16/8 h Tag/Nacht-Rhythmus bei ca. 50-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Schwachlicht) oder 400-500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Starklicht) während der Lichtperiode.

Bei der Behandlung mit Herbiziden wurden ca. 6 - 8 Wochen alte Pflanzen (7 - 10 cm groß) drei Tage lang inkubiert. Für die Oxyfluorfenbehandlung wurden die Pflanzen in Gläser mit Oxyfluorfen (vorgelöst in Aceton) im MS-Agar umgesetzt. Paraquat (vorgelöst in Methanol) wurde über die Blätter appliziert, indem die Pflanzen in eine wässrige Lösung mit 1 ‰ Tween 20 getaucht wurden und in Gläser mit MS-Agar umgesetzt wurden. Der Anteil an Lösungsmittel in der Inkubationslösung betrug jeweils 1‰.

Für die Untersuchungen an Keimlingen wurde das Saatgut wie oben angegeben sterilisiert. Die Anzucht erfolgte in sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben. Etwa 20 - 30 Samen wurden in 25 ml MS-Medium (Murashige & Skoog Basal Salt Medium, Sigma, Deisenhofen; pH 5,7) unter Schütteln (150 rpm) in der Klimakammer angezogen (Kulturbedingungen wie oben angegeben).

2.1.2 Mais (*Zea mays*)

Imprägnierte Samen von Mais (*Zea mays* cv. Anjou) wurden für 6 h (MS-Agar als Kultursubstrat) respektive 12 h (Vermiculite als Kultursubstrat) gewässert. Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Reaktion auf verschiedene Wirkstoffe wurden die Samen daraufhin mit 1,3 % Natriumhypochlorit, 1 ‰ Detergenz sterilisiert und auf MS-Agar kultiviert (analog zu den Bedingungen bei Tabak, siehe oben). Hiermit wurde sichergestellt, dass keine Nebeneffekte durch Pilzbefall die gemessenen Größen beeinflussten. Die Behandlung erfolgte über die Wurzel, wobei 4 Tage alte Pflanzen in wirkstoffhaltigen Agar umgesetzt und drei weitere Tage im Licht oder gegebenenfalls im Dunkeln gehalten wurden.

Für die Untersuchung der Enzymkinetik (Abschnitt 3.3.1.4, S. 65 ff.) wurden die Pflanzen nach dem Wässern auf Vermiculite ausgesät, bis zur Keimung im Dunklen mit einem feuchten

Filterpapier bedeckt und dann 4 Tage im Licht oder im Dunkeln ohne Filterpapier gehalten. Die Behandlung mit Oxyfluorfen erfolgte über die Wurzel 4 Tage alter Pflanzen, die in Gläser mit je 25 ml wirkstoffhaltigem MilliQ-Wasser gestellt und für weitere 3 Tage im Dunkeln inkubiert wurden. Nach sieben Tagen insgesamt wurden die Pflanzen ins Licht gebracht und zu den angegebenen Zeiten geerntet. Dabei wurden Wurzel und Blatt (inklusive Hypokotyl) getrennt verarbeitet.

2.1.3 *Escherichia coli*

Flüssigkulturen vom *Escherichia coli*-Stamm DH5 α (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA) wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g l⁻¹ Casein, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt 10 g l⁻¹ NaCl, pH 7,5) bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Für Festmedien wurde dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar beigemischt. Den Medien wurden zur Selektion je nach verwendetem Plasmid Ampicillin (100 μ g ml⁻¹) Kanamycin (50 μ g ml⁻¹) oder Neomycin (30 μ g ml⁻¹) zugesetzt.

2.1.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (Stamm LBA 4404) wurde in LB-Medium mit Kanamycin (50 μ g ml⁻¹) und Rifampicin (50 μ g ml⁻¹) bei 24 °C unter Schütteln angezogen.

2.2 CHLOROPHYLLEXTRAKTION

Für die Extraktion des Chlorophylls wurde unter flüssigem Stickstoff pulverfein gemörstertes Material eingesetzt. Chlorophyll wurde 10 min bei 60 °C in Methanol quantitativ extrahiert. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt, das Volumen bestimmt und der erkaltete Überstand bei 650 und 665 nm photometriert. Die Probentrübung wurde durch die Absorption bei 720 nm gemessen und vom Wert der Chlorophyllabsorption abgezogen. Anhand der korrigierten Absorptionskoeffizienten nach McKinney (in Böger, 1964) wurden Gesamtchlorophyllgehalt sowie die Konzentrationen an Chlorophyll a und Chlorophyll b berechnet.

2.3 LEITFÄHIGKEITSMESSUNG

Zur Bestimmung der Membranschädigung wurden kreisrunde Blattstücke (Durchmesser 7 mm) in MilliQ-Wasser gegeben. Die Leitfähigkeit wurde mittels eines Konduktivimeters (WTW, TFK LF530) gemessen. Um Veränderungen der Leitfähigkeit durch das Ausstechen der Blattstücke zu normalisieren, wurden die gestanzten Proben für eine viertel Stunde vorinkubiert, die dann gemessene Leitfähigkeit als Nullwert notiert und daraufhin der jeweilige Wirkstoff zugegeben (Veränderungen der Leitfähigkeit durch den Wirkstoff selbst wurden ebenfalls gemessen und gegebenenfalls abgezogen).

2.4 WASSERSTOFFPEROXIDBESTIMMUNG

Die H_2O_2 -Bestimmung aus dem wässrigen Medium der Leaf-disk-Inkubation wurde nach Schwacke und Hager (1992) durchgeführt. Hierzu wurden 100 μl Probe, 50 μl Luminol (1,1 mM) und 750 μl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,9) in Szintillationsröhrchen (Sarstedt, Numbrecht) gemischt. Luminol wurde in 10 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ DMSO angelöst und in Kaliumphosphatpuffer, 50 mM pH 7,9 verdünnt, frische Luminollösungen zur Stabilisierung des Fluoreszenzsignales mindestens drei Tage im Kühlschrank gelagert. Nach Zugabe von 50 μl FeCy (14 mM) wurde im Luminometer (1250, LKB Wallac, Freiburg) die Chemilumineszenz gemessen. Das durch einen Schreiber als relative Lumineszenzeinheiten aufgezeichnete Signal wurde mithilfe einer Eichgerade aus kommerzieller H_2O_2 -Lösung für jede Messreihe neu relativiert. Hierzu wurde die H_2O_2 -Lösung (30 %) 1000fach verdünnt, ihre Konzentration photometrisch bestimmt und in der Chemilumineszenzreaktion eingesetzt.

2.5 MESSUNG DER ETHAN- UND ETHYLENFREISETZUNG

Zur Messung von Ethan und Ethylen wurden kreisrunde Blattstücke ($\varnothing$ 7mm) in 5 ml MilliQ-Wasser mit den entsprechenden Wirkstoffen (Oxyfluorfen, Paraquat oder H_2O_2) in 10,4 ml-Glasgefäßen (ESWE Analystechnik, Sinsheim) behandelt und mit PTFE-Septen (ESWE) gasdicht verschlossen. Die Proben wurden über 24 h in einer thermostatisierten Warburg-Apparatur (wissenschaftliche Werkstätten, Univ. Konstanz) bei 21 °C und einer Lichtintensität von 400-500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Schütteln inkubiert.

Die kurzketigen Kohlenwasserstoffe im Gasraum der Proben wurden bei automatischer Probenaufgabe durch das 'DANI HS 86.50 Head-Space-System' (ESWE) mit einem Perkin Elmer Gaschromatographen Modell F 22 vermessen (1 ml Einspritzvolumen, Injector-Temperatur 120 °C, Ofen-Temperatur 70 °C, Flammenionisationsdetektor-Temperatur 140 °C, Säule Alumina F1 (3 m, 1/8"; Supelco, Bellefonte, USA), Integrator Shimadzu, Mod. C-R 6A).

2.6 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON ASCORBAT UND GLUTATHION

Unter flüssigem Stickstoff pulverfein gemörserte Tabakblätter (0,2 g) wurden in 1 ml Metaphosphorsäure (5 % [w/v]) im Mörser auf Eis extrahiert und der Zelldebris durch Zentrifugation 30 min bei 19.000 g und 4 °C entfernt. Aus dem Überstand wurden von Ascorbat und Glutathion jeweils der Gesamtgehalt und der Reduktionszustand bestimmt.

2.6.1 Ascorbat und Dehydroascorbat

Zur Bestimmung des Ascorbatgehalts (modifiziert nach Okamura 1980) wurde in Parallelansätzen je 83,3 μl Metaphosphorsäure-Extrakt mit 16,6 μl Triethanolamin (1,5 M) neutralisiert. Anschließend wurde eine Probe zur Bestimmung des reduzierten Ascorbates mit 100 μl

Natriumphosphat (pH 7,4; 150 mM) mit 100 µl H₂O versetzt. Für die Gesamtascorbatbestimmung wurde der anderen Probe 100 µl Natriumphosphat (pH 7,4; 150 mM) und 50 µl DTT (20 mM) zugegeben, beide Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 50 µl *N*-Ethylmaleimid (0,5 % [w/v]) für mindestens weitere 30 sec bei Raumtemperatur behandelt. Beide Reaktionsansätze wurden mit 200 µl Trichloressigsäure (10 % [w/v]), 200 µl Phosphorsäure (44 % [v/v]), 200 µl 2,2'-Bipyridyl (4 % [w/v] in 70 % Ethanol) und 100 µl FeCl₃ (3 % [w/v]) versetzt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die Absorption bei 525 nm im Spektralphotometer (Hitachi U-2000) gemessen.

Generell wurden, wie bei der Glutathionmessung, Doppelbestimmungen für jeden Ansatz durchgeführt.

2.6.2 Reduziertes und oxidiertes Glutathion

Die Glutathionbestimmung erfolgte mit der enzymatischen Methode von Griffith (1980) und Law *et al.* (1983). 100 µl-Aliquots der nach Abschnitt 2.6 hergestellten Metaphosphorsäure-Extrakte wurden mit 36 µl Triethanolamin (1 M) neutralisiert. Daraufhin wurden entweder 4 µl H₂O (zur Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts) oder 4 µl 2-Vinylpyridin (zur Bestimmung von GSSG) zugegeben und beide Ansätze 1 h bei 25 °C inkubiert. Der anschließende enzymatische Nachweis von Glutathion erfolgte mit 20 µl der Probe für die Gesamtglutathionbestimmung bzw. 50 µl der Probe für die GSSG-Bestimmung. Die Absorptionzunahme bei 412 nm wurde in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 2,5 mM EDTA, 1 mM DTNB, 1 Unit Glutathionreduktase (Sigma, Type III), 0,2 mM NADPH bei einem Gesamtvolumen von 1 ml für für 3,5 min (Hitachi U-2000 Spektralphotometer) gemessen. Die GSH-Konzentration wurde anschließend als Differenz der gemessenen Gesamtglutathion- und der GSSG-Konzentration errechnet.

2.7 HPLC-ANALYSE VON PROTOPORPHYRIN IX

Die Trennung des PPIX von möglichen Abbauprodukten durch den Umsatz mit GSTs wurde nach der Methode von Dayan *et al.* (1999) durchgeführt. Über 20 min wurde ein linearer Gradient von 70 % bis 100 % Methanol angelegt, weitere 15 min wurde bei konstant 100 % Methanol über die Umkehrphasensäule abz+ Supelco (Supelco, Taufkirchen, Germany) eluiert. Die Absorption des PPIX wurde bei 410 nm mit einem variablen Wellenlängenmonitor, und die Fluoreszenz bei 400 nm Anregungs- und 600 nm Emissionswellenlänge detektiert.

2.8 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON PROTOPORPHYRIN IX

Zur Extraktion des Protoporphyrin IX wurde die Methode von Böger und Miller (1994) leicht verändert. Je ca. 125 mg unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenzellpulver wurde in

4,75 ml alkalischem Aceton (80 % [v/v] Aceton, 10 mM HEPES pH 8,0 und 10 mM Ammoniak) überführt, gevortext und bei 60 °C für 2 h im Dunkeln extrahiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde das ebenfalls extrahierte Chlorophyll in Hexan (5 ml) ausgeschüttelt (30 sec). Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 3000 g zentrifugiert und der Hexan-Chlorophyll-Überstand verworfen, gefolgt von einer Wiederholung der Partitionierung gegen Hexan, allerdings nunmehr mit 1,25 ml Hexan. Nach Volumenbestimmung wurde der Protoporphyrin IX-Gehalt der Proben im Fluoreszenzspektrophotometer (Hitachi Mod. F-2000) entsprechend Nicolaus et al. (1993) quantifiziert (Anregung bei 409 nm, Emissionsmaximum bei 630 nm, zur Kontrolle der Restfluoreszenz des Chlorophylls Spektren von 600 bis 700 nm bei 409 nm Anregungswellenlänge). Die relative Fluoreszenz wurde für jede Messreihe mit einer Protoporphyrin-Standard-Lösung normiert. Deren Konzentration wurde in Aceton mit 0,5 % (v/v) Tween 80 über den Extinktionskoeffizienten bestimmt und in verschiedenen Konzentrationen analog zu den Proben extrahiert und vermessen.

2.9 EXTRAKTION UND QUANTIFIZIERUNG DER PROTEINE

2.9.1 Enzymextraktion

Das geerntete Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert und anschließend portioniert. Je ca. 0,2 g des gefrorenen Pulvers wurde in einen gekühlten Mörser überführt und mit 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer für zwei Minuten extrahiert. Dem Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0) waren 20 % (v/v) Glycerin und je 1 mM Ascorbat, DTT, EDTA, GSH, 1 % (v/v) Triton X-100 und 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 10.000 zugesetzt, um alle untersuchten Enzyme funktional extrahieren zu können. Vom Rohhomogenat wurden anschließend durch Zentrifugation (20 min bei 26.900 g und 4 °C) die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine und wurde für die Bestimmung der Enzymaktivitäten sowie die Auftrennung der Proteinen in Polyacrylamidgelen herangezogen. Auf diese Weise gewonnene Proteinextrakte konnten ohne Verluste der Enzymaktivitäten bei -196 °C über längere Zeit gelagert werden.

2.9.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dreifach verdünnte Enzymextrakte (25 µl) wurden jeweils in Doppelbestimmungen mit dem Farbreagenz (1,25 ml 5fach verdünnte BIO-RAD Protein Assay-Lösung, BIO-RAD) versetzt. Die Absorption wurde bei 595 nm gegen eine Referenz mit 25 µl Extraktionspuffer gemessen. Die Normierung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte anhand einer mit bovinem Serumalbumin erstellten Eichgeraden.

2.10 ENZYMATISCHE TESTSYSTEME

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde die Absorptionsveränderung durch den Substratumsatz über einen Zeitraum von 3,5 min im Spektralphotometer (Hitachi U-2000) in 1-ml-Küvetten gemessen (bis 340 nm Quarzküvetten von Hellma Suprasil[®], Kummer, Freiburg; ab 340 nm Polystyrolküvetten von Sarstedt, Nümbrecht; Schichtdicke je 1 cm). Substrate, Cofaktoren und Hilfsenzyme wurden jeweils in nichtlimitierenden Konzentrationen eingesetzt.

2.10.1 Ascorbatperoxidase

Die Aktivität der Ascorbatperoxidase (APX, EC 1.11.1.11) wurde anhand der Abnahme der Absorption bei 290 nm, verursacht durch die Oxidation von Ascorbat, bestimmt (Nakano und Asada, 1981). Die Reaktionsansätze enthielten in 1 ml Gesamtvolumen 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 1 mM Natriumascorbat, 2,5 mM H₂O₂ und Proteinrohextrakt. Die gemessene Absorptionsänderung wurde um die chemische Rate der Ascorbatoxidation und um die enzymatische Rate ohne Peroxidzugabe korrigiert.

2.10.2 Catalase

Die Catalase-Aktivität (CAT, EC 1.11.1.6) wurde durch Messung der Abnahme der H₂O₂-Konzentration bei 240 nm verfolgt (Aebi, 1983). Die Ansätze enthielten in 1 ml Gesamtvolumen 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0 und 10 mM H₂O₂ sowie Proteinrohextrakt. Der unspezifische Umsatz ohne Substrat bzw. Extrakt wurde von der gemessenen Rate subtrahiert.

2.10.3 Dehydroascorbatreduktase

Die Aktivitätsbestimmung der Dehydroascorbatreduktase (DHAR, EC 1.8.5.1) erfolgte über die Messung der Ascorbatbildung bei 265 nm entsprechend Hossain und Asada (1984). Die 1 ml Küvette enthielt 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 0,5 mM Dehydroascorbat, 2,5 mM Glutathion und Proteinrohextrakt. Die gemessene Absorptionsänderung wurde um die chemische Rate der Dehydroascorbatreduktion ohne Enzymquelle sowie die enzymatische Rate ohne zugesetztes Glutathion korrigiert.

2.10.4 Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase-Aktivität (GR, EC 1.6.4.2) wurde mittels der Abnahme der Absorption bei 340 nm, verursacht durch die Oxidation von NADPH, gemessen (Halliwell und Foyer, 1978). Die Testansätze enthielten in 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM oxidiertes Glutathion (GSSG), 0,2 mM NADPH und Proteinrohextrakt. Es wurden jeweils die chemische Rate der NADPH-Oxidation ohne Extrakt und die enzymatische Rate ohne GSSG von der gemessenen Aktivität subtrahiert.

2.10.5 Glutathion S-Transferase

2.10.5.1 Aktivitätsmessung

Die spezifische Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18) wurde mit dem artifiziellen Substrat 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) anhand der spezifischen Absorption des gebildeten Glutathion-CDNB-Konjugates bei 340 nm bestimmt (Drotar et al., 1985). Die 1 ml-Ansätze enthielten 100 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 2 mM CDNB, 2 mM Glutathion und Proteinrohextrakt respektive GST-Reinenzyme. Die chemische Rate der Glutathion-Konjugation mit CDNB ohne Enzymquelle und die enzymatische Rate ohne Zugabe von Glutathion wurden von der gemessenen Aktivität subtrahiert.

2.10.5.2 Hemmstudien

Die Hemmbarkeit rekombinanter GSTs wurde nach 5-minütiger Vorinkubation mit potentiell-lem Inhibitor anhand verminderten Umsatzes von CDNB vermessen. Für jede Inhibitor-konzentration wurde die nicht-enzymatische Hintergrundsaktivität und die enzymatische Aktivität ohne das Substrat Glutathion abgezogen. Sofern organische Lösungsmittel oder Detergentien zur Solubilisierung des Inhibitors verwendet werden mussten, wurde ihre Kon-zentration in allen Versuchsansätzen konstant eingesetzt. Die Konzentration der verwendeten Porphyrine wurde über den jeweiligen Absorptionskoeffizienten bestimmt. Bis auf diese Er-weiterungen entsprach das Testsystem dem der Aktivitätsmessung der GSTs (siehe 2.10.5.1).

2.10.5.3 Auswirkung der GSTs auf die Protoporphyrinogen-Oxidation

Die Autoxidation des nichtfluoreszierenden Protoporphyrinogen (Pgen) wurde anhand des Umsatzes zum fluoreszierenden PPIX bei einer Exzitationswellenlänge von 410 nm und einer Emissionswellenlänge von 632 nm bestimmt. Pgen (ca. 2 μ M) wurde mit GSTs (0,2 μ M) oder dem entsprechenden Volumen Probenaufbewahrungspuffer in O₂-gesättigtem PBS-Puffer (pH 7,4) im Fluorimeter inkubiert und die Fluoreszenz alle 30 sec aufgezeichnet.

2.10.5.4 Auswirkung der GSTs auf die Hämin-Degradation

Der Abbau des Hämin (0,2 μ M) wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0), 1 mM GSH und 10 μ M H₂O₂ gemessen. GSTs (1 μ M) oder das entsprechende Volumen Proben-auftragspuffer wurden zugegeben und alle 90 sec Absorptionsspektren von 240 bis 475 nm aufgezeichnet, zudem wurde jeweils die Absorption bei 395 nm bestimmt.

2.10.6 Monodehydroascorbatreduktase

Die enzymatische Aktivität der Monodehydroascorbatreduktase (MDAR, EC 1.6.5.4) wurde in einem gekoppelten Testsystem als Absorptionsänderung bei 340 nm aufgrund der NADH-Oxidation bestimmt (Hossain et al., 1984). Das Substrat der MDAR, Monodehydroascorbat,

wird in diesem Testsystem durch eine Ascorbatoxidase (aus *Cucurbita* spec., Sigma, Deisenhofen) produziert. In eine 1 ml Küvette wurden jeweils 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2 mM NADH, 2,5 mM Ascorbat, 0,15 Units Ascorbatoxidase sowie Proteinrohextrakt pipettiert. Die gemessene Rate der Ascorbatreduktion wurde um die chemische Rate der Reduktion ohne Extrakt sowie um die enzymatische Rate ohne Zugabe von Ascorbat korrigiert.

2.10.7 Peroxidasen

Die Aktivität der Peroxidasen (POD, EC 1.11.1.7) wurde mit Guaiacol oder Pyrogallol als Substrat gemessen (Chance und Maehly, 1955). Der Umsatz von Guaiacol wurde durch die photometrische Bestimmung der Absorptionsänderung bei 470 nm in einem Reaktionsansatz mit 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 18 mM Guaiacol (0,25 % [v/v]), 5 mM H₂O₂ und Proteinrohextrakt (Gesamtvolumen 1 ml) bestimmt. Mit Pyrogallol als Substrat wurde die POD-Aktivität anhand der Absorptionserhöhung bei 430 nm in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 20 mM Pyrogallol, 2 mM H₂O₂ und Proteinrohextrakt bei einem Gesamtvolumen von 1 ml gemessen. Für beide Tests wurden Kontrollraten ohne Enzymquelle bzw. ohne Zugabe von H₂O₂ bestimmt und von der gemessenen Rate im jeweils kompletten Ansatz subtrahiert.

2.11 NATIVE POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE UND AKTIVITÄTSFÄRBUNGEN VON ENZYMEN (ZYMOGRAMME)

2.11.1 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Um die Aktivitäten der einzelnen Isoformen eines Enzyms bestimmen zu können, wurden die Proteine unter nichtdenaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels einer Farbreaktion ein spezifischer Nachweis im Gel durchgeführt. Die native Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) ermöglicht zudem eine Trennung von Proteinen aus verschiedenen Untereinheiten nach Größe und Eigenladung, die somit als intakte Dimere nachgewiesen werden können.

Die native PAGE entsprach im Wesentlichen in Durchführung und in Zusammensetzung der verwendeten Lösungen der SDS-PAGE (2.12.2, S. 23), mit dem Unterschied, dass weder die Gele noch Laufpuffer SDS enthielten. Zur Steigerung der Trennschärfe wurde den Gelen 10 % Glycerin zugesetzt. Außerdem wurden die Proben in 1/5 Volumen Nativprobenpuffer (0,4 M Tris/HCl pH 6,8; 4 mM DTT; 50 % (v/v) Glycerin; 0,05 % Bromphenolblau) aufgenommen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und 12,5 mA bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, im Trenngel wurden dann konstante 20 mA angelegt.

2.11.2 Aktivitätsfärbungen der Ascorbatperoxidasen

Die Methode der Ascorbatperoxidase-Färbung im Zymogramm wurde von Mittler und Zillins-

kas (1993) adaptiert. Um die APX während der Auftrennung nicht durch Ascorbatverlust zu inaktivieren, wurde dem Laufpuffer 2 mM Ascorbat zugegeben und die unbeladenen Gele zur Äquilibration 20 min probenlos vorlaufen gelassen. Nach der Separation der Proteine wurde das Gel 3mal 10 min in 50 mM KPP_i, pH 7,0; 2 mM Ascorbat und 20 min 50 mM KPP_i, pH 7,0; 4 mM Ascorbat, 2 mM H₂O₂ unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde 1 min mit 50 mM KPP_i, pH 7,0 gewaschen und die Färbelösung (50 mM KPP_i, pH 7,8; 2,45 mM NBT, 28 mM TEMED) zugegeben. Die APX-Aktivität zeigte sich als farblose Bande im auberginefarbenen Gel.

2.11.3 Aktivitätsfärbungen der Peroxidasen

Gesamtproteinextrakte wurden im 10 % Nativgel aufgetrennt und anionische Peroxidasen durch den Umsatz von Benzidin mittels H₂O₂ sichtbar gemacht (Rao et al., 1996). Die Gele wurden dafür 10 min bei RT in Färbelösung (100 ml 0,1 M Na-Acetat, pH 4,5, mit 2 mM Benzidin in 0,5 ml DMSO gelöst) auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mM H₂O₂ gestartet, Peroxidase-Isoenzyme werden hierbei als anfangs königsblaue, später braun gefärbte Banden im Gel sichtbar.

2.11.4 Aktivitätsfärbungen der Superoxiddismutasen

Für die Aktivitätsfärbung der Superoxiddismutasen wurde eine Modifikation (McKersie et al., 1993) der von Beauchamp und Fridovitch (1971) entwickelten Methode verwendet. Die Gele wurden zunächst 20 min im Dunkeln auf einem Schüttler bei RT in 2,45 mM NBT (*p*-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) inkubiert. Daraufhin wurden die Gele ebenfalls im Dunkeln bei 37 °C für 15 min in Färbelösung (50 mM K-Phosphat pH 7,8, 30 µM Riboflavin und 28 mM TEMED) gehalten. Anschließend wurden die Gele in 50 mM KPP_i, pH 7,8 bei normalem Umgebungslicht solange belichtet, bis die Superoxiddismutase-Banden als achromatische Zonen im violett gefärbten Gel sichtbar wurden.

2.12 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN (WESTERN-BLOTS)

Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen erfolgt nach dem Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proben auf Nylonmembranen. Verwendet wurden einerseits (im Falle der Glutathion S-Transferasen) durch Nativgele (s. 2.11.1, S.21) aufgetrennte Proben, andererseits (bei monomeren Proteinen oder zur Untersuchung der Expression von Untereinheiten) durch SDS-PAGE (s. 2.12.2, S.23) getrennte Proteine.

2.12.1 Verwendete Antiseren

Folgende Antiseren aus Hasen wurden für die Immunodetektion von Proteinen verwendet:

- Anti-D1: gegen das D1-Protein des Photosystems II

- Anti-GR (pea): gegen die Glutathionreduktase aus Erbse
- Anti-GR (spinach): gegen die Glutathionreduktase aus Spinat
- Anti-MDHR (citrus)
- Anti-SOD
- Anti-GST26 (corn): gegen die 26 kD Glutathion S-Transferase-Untereinheit aus Mais
- Anti-GST27 (corn): gegen die 27 kD Glutathion S-Transferase-Untereinheit aus Mais
- Anti-GST29 (corn): gegen die 29 kD Glutathion S-Transferase-Untereinheit aus Mais

2.12.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung denaturierter Proteine wurde angelehnt an die Methode von Lämmli (1970, modifiziert nach dem Cold Spring Harbor Method Manual) elektrophoretisch in einer Acrylamidmatrix (denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, SDS-PAGE) durchgeführt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS - Probenpuffer (80 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 2 % DTT, 20 % Glycerin und 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 100° C inkubiert. Aufgetrennt wurden sie in einer vertikalen Elektrophoreseeinheit (Hoefer Mighty Small Mod. SE 250, Pharmacia, Freiburg). Als Laufpuffer wurde 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS, pH 8,7 eingesetzt. Die räumliche Ankonzentrierung der Proben wurde durch ein ca. 1,5 cm langes Sammelgel (5 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulfat und 6 µl TEMED in 12 ml) erreicht. Die Auftrennung erfolgte im Trenngel, welches - je nach Größe der zu trennenden Proteine - unterschiedliche prozentuale Anteile an Acrylamid respektive Bisacrylamid enthielt (i.A. 10 - 12,5 % Acrylamid, 0,066 – 0,083 % Bisacrylamid, 0,37 M Tris/HCl pH 8,7, 0,1 % SDS, 0,04 % Ammoniumpersulfat und 6 µl TEMED in 15 ml). Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C, die angelegte Spannung betrug für 2 Gele 50 V, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und wurde dann auf 150 – 160 V heraufgesetzt.

2.12.3 Immunologische Identifikation der Proteine durch Western-Blots

Die in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden in einem Stapel zwischen zwei Lagen Schaumstoff und zwei Lagen Filterpapier (GB02, Schleicher & Schuell, Dassel) auf eine Immobilon-P Membran (PVDF, 0,45 µm Porengröße; Millipore; Eschborn) gebettet (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer auf die Membran erfolgte für 1 h bei einer konstanten Spannung von 150 V in Blotting Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris und 20 % Methanol, pH 8,7) in einer Hoefer TE 22 Apparatur (Pharmacia, Freiburg).

Die Immunodetektion erfolgte nach Durner *et al.* (1993). Die Membranen wurden zunächst zweimal 15 min in PBS-Tween (4,1 mM NaH₂PO₄, 3,3 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl und 0,05 % Tween 20, pH 6,8) mit 5 % Magermilchpulver (Rapilait, Migros, Zürich) geschwenkt,

und anschließend kurz in PBS-Tween gewaschen. Über Nacht wurde der Blot mit dem jeweiligen primären Antikörper in PBS-Tween (s. 2.12.1, S. 22) bei 4 °C inkubiert. Je nach Intensität des zu erwartenden Signals wurde zur Detektion entweder eine Farbreaktion oder Chemilumineszenz (Angaben jeweils in eckigen Klammern) eingesetzt. Ungebundener oder unspezifisch gebundener primärer Antikörper wurde für zweimal 15 min mit PBS-Tween [NET] abgewaschen. Die Bindung des sekundären Antikörpers, alkalische-Phosphatase-konjugierter-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) [Peroxidase-konjugierter-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma, Deisenhofen)], erfolgte dann 1/20.000 (v/v) in PBS-Tween [1/25.000 (v/v) in NET] während 2 h [1 h]. Nach zwei 10minütigen Waschschritten in PBS-Tween [NET] wurden die Blots 10 min in Glycinpuffer, 0,1 M Glycin/NaOH pH 9,6, 1 mM MgCl₂ und 1 mM ZnCl₂ [NET] umgepuffert. Die enzymatische Farbreaktion durch die alkalische Phosphatase erfolgte in 30 ml Glycinpuffer mit 75 µl NBT [50 mg ml⁻¹ *p*-Nitroblau Tetrazoliumchlorid in 70 % Dimethylformamid] und 125 µl BCIP [5 mg ml⁻¹ 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat]. Nach 5 - 10 min wurde die Reaktion durch Überführen der Blots in bidestilliertes Wasser abgestoppt. Die enzymatische Chemilumineszenzreaktion wurde mit ECL - Plus (Amersham, Braunschweig) als Substrat nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das Lumineszenzsignal wurde als Filmschwärzung (Hyperfilm™ - ECL, Amersham, Braunschweig) dokumentiert.

2.12.4 Amidoschwarzfärbung

Um die gleichmäßige Beladung der Gele und den Transfer auf die Membranen zu kontrollieren, wurde das Gesamtprotein nach der Antikörperdetektion mit Amidoschwarz gefärbt. Hierzu wurden die Immobilon-P-Membranen 3 bis 5 min in Färbelösung (0,1 % Amidoschwarz (Merck), 20 % Isopropanol und 7 % Essigsäure) inkubiert und anschließend ungebundener Farbstoff mit 20 % Isopropanol und 7 % Essigsäure abgewaschen.

2.13 mRNA - NACHWEIS (NORTHERN-BLOTS)

Zur Verhinderung des RNA-Abbaus durch RNasen wurden bidestilliertes Wasser und alle Lösungen, sofern als möglich, für mehrere Stunden unter Rühren mit 0,1 % (v/v) DMPC (Dimethylpyrocarbonat) behandelt und autoklaviert (30 min bei 120 °C). Für die Herstellung von Lösungen (z.B. Tris, EDTA, SDS), die nicht mit DMPC behandelt werden respektive autoklaviert werden können, wurden zertifiziert RNase-freie Chemikalien verwendet und in DMPC-behandeltem, bidestilliertem Wasser gelöst. Alle Glasgefäße wurden im Trockenschrank 10 h bei 200 °C sterilisiert. Alle verwendeten Kunststoffkleinteile (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) wurden zweifach autoklaviert, alle anderen Kunststoff-Apparaturen (Gelkammer und Blotting-Apparatur) wurden zur Inaktivierung der RNasen mit RNaseAway (Molecular Bio-Products, San Diego, USA) nach Anleitung behandelt.

2.13.1 Herstellung von Gensonden

2.13.1.1 Verwendete Gene und Plasmide

Folgende Plasmide wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet (dankenswerterweise von Dr. K.-J. Kunert¹ [AECI Biotechnology, Modderfontein, Südafrika], Prof. I. Jepson² [ZENECA Seeds, Bracknell, UK], Prof. D. Klessig³ [Rutgers University, Piscataway, USA] und Prof. D. Inzé⁴ [Belgien] überlassen):

- pGOR, enthält das *gor*-Gen (Glutathionreduktase) aus *E. coli* als 1,3 kb EcoRI/HindIII-Fragment ¹
- pIJ312, enthält die *gst29*-cDNA (29-kD-Untereinheit der Glutathion S-Transferase) aus *Z. mays* als 900 bp EcoRI-Fragment ²
- pIJ321, enthält die *gst27*-cDNA (27-kD-Untereinheit der Glutathion S-Transferase) aus *Z. mays* als 900 bp EcoRI-Fragment ²
- pIJ321, enthält die *gst26*-cDNA (26-kD-Untereinheit der Glutathion S-Transferase) aus *Z. mays* als 800 bp EcoRI-Fragment ²
- pCAT1, enthält die *cat1*-cDNA (Catalase 1) aus Tabak als 1,8 kb EcoRI-Fragment ³
- pCAT2, enthält die *cat2*-cDNA (Catalase 2) aus Tabak als 1,8 kb EcoRI-Fragment ³
- pCAT3, enthält die *cat3*-cDNA (Catalase 3) aus Tabak als 1,071 kb SpeI/KpnI-Fragment ⁴
- pAPX, enthält die *apx*-cDNA (Ascorbatperoxidase) aus Tabak als 1 kb EcoRI/XhoI-Fragment ³
- pSOD1, enthält die *MnSOD*-cDNA (Mangan-Superoxiddismutase) aus Tabak als 1 kb PstI-Fragment ⁴
- pSOD2, enthält die *chlFeSOD*-cDNA (Eisen- Superoxiddismutase) aus Tabak als 0,98 kb PstI-Fragment ⁴
- pSOD3, enthält die *cytCuZn*-cDNA (cytosolische Kupfer-Zink-Superoxiddismutase) aus Tabak als ca. 584 bp PstI/SpeI-Fragment ⁴
- pSOD4, enthält die *chlCuZnSOD*-cDNA (plastidäre Kupfer-Zink-Superoxiddismutase) aus Tabak als 305 bp AccI/HindIII-Fragment ⁴
- pGPX, enthält die *GPX*-cDNA (Glutathionperoxidase) aus Tabak als 0,82 kb EcoRI-Fragment ⁴

2.13.1.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Für die Amplifizierung der DNA zur Herstellung von Gensonden und für die Transformation des Tabak mussten die entsprechenden Plasmide in kompetente *E. coli* eingebracht werden.

E. coli DH5 α wurden nach der Methode von Tung (Boehringer, Technical tips online) elektrokompotent gemacht. Hierzu wurde 1 l Kultur (angeimpft mit 1 ml Ausgangskultur) unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 angezogen und 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g geerntet, zweimal mit 50 ml eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen und in eiskaltem GYT (10 % Glycerin, 0,125 % Hefeextrakt und 0,25 % Trypton) bis zu einem Gesamtvolumen von 0,2 ml resuspendiert. Die so gewonnenen kompetenten Zellen konnten aliquotiert bei -70 °C über mehrere Monate gelagert werden.

Zur Einbringen von Fremd-DNA wurden 50 μ L elektrokompente *E. coli* mit 1 μ L Plasmid-DNA gemischt und in einer vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec, Seraing, Belgien) mithilfe eines Stromstoßes von 2400 V für 5,28 ms transformiert (Elektroporationsgerät Cellject Basic, EquiBio, Angleur, Belgien). Sofort wurde dann 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Bakterien 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden geeignete Mengen davon auf selektive LB-Agarplatten (Antibiotikumswahl je nach transgenem Plasmid) ausgestrichen, die gewachsenen Transformanten nochmals auf Platten vereinzelt und schließlich als Stammkulturen (5 ml Übernachtskulturen, mit 10 % Glycerin versetzt) bei -80 °C eingefroren.

2.13.1.3 Isolierung, Verdau und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Plasmidreinigung aus *E. coli* wurden alternativ das kommerzielle ‘QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit’ von Qiagen (Hilden, Durchführung nach Herstellerangabe) oder die klassische Plasmidreinigung verwendet. Der enzymatische Verdau der Plasmid-DNA erfolgte mit geeigneten Restriktionsendonukleasen der Firma Boehringer (Mannheim) im jeweils empfohlenen Restriktionspuffer (Boehringer, Mannheim). Die DNA wurde mit 1/10 Volumen Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 15 % Ficoll Typ 400) versetzt und in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch bei 75 V aufgetrennt (Agarosegele: 0,8 bis 1,2 % (w/v) Agarose, 40 mM Tris/Acetate, pH 8,0; 1 mM EDTA; Laufpuffer TAE: 40 mM Tris/Acetate, pH 8,0; 1 mM EDTA). Nach 5minütiger Inkubation der Gele in Ethidiumbromidlösung (1 μ g ml⁻¹) wurde die DNA auf einem UV-Leuchtschirm (Transilluminator TM-20, UVP Inc., San Gabriel, USA) sichtbar gemacht und das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde mit dem ‘QIAEX II Gel Extraction Kit’ von Qiagen (Heidelberg) entsprechend der beigelegten Anleitung durchgeführt.

2.13.1.4 Sondenherstellung zur mRNA-Detektion

Zur Gewinnung von Sonden zur mRNA-Detektion wurden DNA-Fragmente mit Digoxigenin markiert. Die Methoden der Digoxigenin-Markierung und der Hybridisierung membrangebundener Nucleinsäuren mit den markierten Sonden folgte im wesentlichen den Angaben des Herstellers (The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization, Boehringer).

2.13.1.4.1 Enzymatische Markierung

Für die Markierungsreaktionen wurden 16 µl DNA (0,5-1 µg) 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend im Eiswasserbad auf 0 °C abgekühlt, mit 4 µl DIG-High Prime (Boehringer) ca. 20 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch 2 µl EDTA (0,2 M; pH 8,0) beendet. Die Markierungseffizienz wurde im Vergleich mit markierter λ-DNA (Boehringer) laut Herstellerangaben im Tüpfeltest bestimmt.

2.13.1.4.2 PCR Markierung

Alternativ zur enzymatischen Markierung wurde PCR-Markierung eingesetzt. Zur Amplifikation der cDNA-Sonden aus den jeweiligen Plasmiden wurden folgende Primer verwendet:

T3 :	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	CAT3, GPX
T7 :	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	CAT3, GPX, SOD4
SP6 :	5'-GCG TAT TTA GGT GAT ACT ATA G-3'	SOD4
pSOD1-3' :	5'-GCC TTT GCG CTC AAA CGA TAG AG-3'	SOD1
pSOD1-5' :	5'-CGC CTG GCC TCT CTG GGC ATG-3'	SOD1
pSOD2-3' :	5'-GCG CAT TCT AAT TCT AAA ATT AGG GC-3'	SOD2
pSOD2-5' :	5'-CGC CTA AAT TTG AAC TCC AGC CTC-3'	SOD2
pSOD3-3' :	5'-GCG CCC TGG AGG CCG ATG ATA CC-3'	SOD3
pSOD3-5' :	5'-GCG GGT GAA GGC CGT TGC CGT CC-3'	SOD3

Die Ansätze enthielten jeweils 5 µl PCR-Puffer, 38 µl H₂O, 5 µl markierte dNTPs, 1 µl DNA-Template, je 0,4 µl Primer und 0,5 µl Taq-Polymerase, die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

CAT3, GPX, SOD1, SOD2, SOD3

SOD4

Zeit	Temperatur	Zyklen	Zeit	Temperatur	Zyklen
5 min	94 °C	x 1	4 min	94 °C	x 1
0,45 min	55 °C		1 min	94 °C	x 31
1,30 min	72 °C		1 min	49 °C	
1 min	94 °C	x 30	1,5 min	72 °C	
2 min	55 °C				
5 min	72 °C				

2.13.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Tabak und Mais

Gesamt-RNA wurde mit TriStar™-Reagenz (AGS, Heidelberg) nach leicht modifiziertem Original-Protokoll von AGS extrahiert. Unter flüssigem Stickstoff gemörseretes, gefrorenes Pflanzenmaterial (ca. 200 mg) wurde mit 1,5 ml TriStar™-Reagenz in 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter intensivem Schütteln homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 0,3 ml Chloroform, anschließend wurden die Proben für 15 sec intensiv geschüttelt und weitere 7 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 12.000 g, 4 °C) wurde die wässrige obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol 10 min bei RT und 1 h bei –70 °C präzipitiert. Die gefällte RNA wurde 10 min mit 12.000 g und bei 4 °C pellettiert und anschließend zweimal mit 4 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die RNA 5 min bei RT luftgetrocknet und anschließend in 22,5 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen, 10 min bei 55 °C gelöst und ggf. bei –20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über Messung der Absorption bei 260 nm, der Reinheitsgrad der extrahierten RNA wurde mittels des Absorptionsverhältnisses $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ abgeschätzt.

2.13.3 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung der RNA wurden 4 µl RNA (4 bzw. 8 µg) mit 2 µl 10fach konzentriertem MOPS-Puffer (200 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0), 10 µl deionisiertem Formamid und 3,5 µl Formaldehyd (37%) gemischt, 15 min bei 65 °C denaturiert und 5 min auf Eis gestellt. Die denaturierten RNA-Proben wurden mit 2 µl Proben-Reagenz (50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA) versetzt und in Formaldehyd-Agarose-Gelen (1 % (w/v) Agarose, 2 M Formaldehyd in MOPS-Puffer) bei einer konstanten Spannung von 70 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.13.4 Transfer der RNA auf die Hybridisierungsmembran (Northern-Blotting)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel dreimal 7 min in Wasser und einmal 15 min in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat) äquilibriert. Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembranen (Boehringer, Mannheim) erfolgte durch die abwärts-gerichtete Kapillarstrommethode in einer TurboBlotter-Einheit (Schleicher & Schuell, Dassel) über 4 h nach Herstellerangaben. Die RNA wurde für 30 min bei 120 °C im Trockenschrank, bzw. alternativ für 120 sec unter UV-Licht auf der Membran fixiert.

2.13.5 Hybridisierung mit DIG-markierten Gensonden und Chemilumineszenznachweis

Zur Entfernung von Salz- und Agaroseresten wurde die Membran 1 min in 5 x SSC gewaschen. Die Prähybridisierung zur Absättigung freier Bindungsstellen auf den Membranen erfolgte in einer Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) im Hybridisierungssofen (Biometra) bei 42 °C für 1 h mit 20 ml Hybridisierungslösung (50 mM Na-Phosphat pH 7,0; 5 x SSC; 50 % (v/v) Formamid; 7 % (w/v) SDS; 2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer); 0,1 % N-Lauroylsarcosin).

Die markierten Gensonden (s. 2.13.1.4, S. 26) wurden hitzedenaturiert (10 min bei 100 °C, 5 min bei 0 °C) und in 10 ml Hybridisierungslösung gegeben. Anschließend wurde die Prähybridisierungs- durch die Hybridisierungslösung ersetzt und die Membran über Nacht bei 42 °C inkubiert.

Im Anschluß wurde die Membran zweimal je 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal je 15 min bei 65 °C in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Nach Äquilibrierung in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure pH 7,5; 0,15 M NaCl) mit 0,3 % Tween 20 wurden die Membranen für 1 h in 50 ml Blockierungslösung (Maleinsäurepuffer mit 1 % Blockierungsreagenz) bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Kopplung des primären Antikörpers (Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase, Boehringer, 1:20.000 in Blockierungslösung verdünnt) fand für 30 min bei RT statt. Es folgten zwei Waschschrte von je 15 min in Waschlösung. Anschließend wurden die Membranen für einige Minuten in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl) äquilibriert und mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD-StarTM (Boehringer) benetzt. Zur Detektion des Hybridisierungssignals wurde dann für 5 bis 30 min Chemilumineszenzfilm (HyperfilmTM-ECL, Amersham, Braunschweig) exponiert.

2.14 TRANSFORMATION VON TABAK

2.14.1 Klonierungsstrategie

Die cDNA der GST27 aus *Zea mais* lag als 672 bp-Fragment in pJI321 vor und sollte in den 13 kb großen binären Vektor pBI121GS inkloniert werden. Hierzu mussten zwei neue Schnittstellen in pJI321 mittels PCR eingeführt werden.

Mit dem hierfür konstruierten Primerpaar

MinusGST27-SmaI: 5'-CGA TCG CTC CCG GGT CAC TC-3'

PlusGST27-XbaI: 5'-GCA GAG ATC TAG ACA TAT GGC TAC GCC-3'

wurden mit jeweils 5 µl PCR-Puffer, 25 µl H₂O, 10 µl Puffer Q, 1 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, 1 µl DNA-Template, je 2,5 µl Primer und 0,5 µl Taq-Polymerase unter folgenden PCR-Bedingungen:

Zeit	Temperatur	Zyklen
5 min	94 °C	x 1
0,45 min	55 °C	
1,30 min	72 °C	
1 min	94 °C	x 30
2 min	55 °C	
5 min	72 °C	

die Schnittstellen SmaI und XbaI eingeführt und das PCR-Produkt aufgereinigt. Der Vektor pBI12GS wurde aus *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4044 isoliert, geschnitten, über Agarosegele und Gelextraktion gereinigt und dephosphoryliert. Die mit neuen Schnittstellen versehene cDNA wurde in den binären Vektor pBI12GS umkloniert, nach Ligation der Fragmente wurde das Plasmid durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht.

Die Überprüfung der Klone fand über PCR und wiederholten Verdau statt, die richtige Orientierung wurde mittels Verdau kontrolliert.

Die so gewonnenen pBI-GST27-Konstrukte wurden amplifiziert und extrahiert, um sie in *Agrobacterium tumefaciens* einbringen zu können. Die Transformation von *Agrobacterium* LBA 4044 mit dem Plasmid pBI-GST27 wurde durch 'Gefrier-Tau'-Methode erreicht. Im Anschluss wurde die Transformation mittels PCR und Verdau überprüft.

2.14.2 Transformation und Regeneration

Die Anzucht der Agrobakterien erfolge im Selektivmedium (Rifampicin und Streptomycin → Ti-Plasmid, Kanamycin → pBI-GST27).

Zur Transfizierung wurden sterile Tabak-Blattstücke (ca. 1 cm²) 5 min mit Bakterien inokuliert, und für 2 d auf saccharosehaltigem MS-Medium mit Hormonen zur Sprossbildung kultiviert. Daran folgte über 14 d Selektion (2x) mit Carbenicilin (→ Argobakterien) und Kanamycin (→ nichtinfiziertes Gewebe). Im Anschluss wurden die Sprösslinge auf kanamycinhaltigem Agar regeneriert. All diese Arbeiten mussten mit äußerster Sorgfalt unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, aufgrund des zu jungen Pflanzenmaterials und Hefekontaminationen war die Transformationseffizienz gering.

2.15 CHEMIKALIEN

Es wurden hochreine Chemikalien der Firmen Riedel-de-Haen (Seelze), Merck (Darmstadt), Sigma Chemicals Co. (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Boehringer (Mannheim) und Aldrich-Chemie (Steinheim) verwendet. Oxyfluorfen (2-chloro-1-(3-ethoxy-4-nitrophenoxy)-4-(trifluoromethyl)-benzen) wurde von Ehrenstorfer (Augsburg) geliefert.

2.16 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Generell wurde das Datenmaterial im Sinne der „good laboratory praxis“ in Mehrfachbestimmungen und -versuchen erhoben. Die Standardabweichungen der numerischen Daten sind i. A. angegeben, falls sie nicht ermittelt wurden, ist dies explizit vermerkt. Ergebnisse graphischer Natur sind in exemplarischen Abbildungen dargestellt. Die Verarbeitung des Datenmaterials wurde computerunterstützt mit dem Programm Microcal Origin durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS IN TABAK

3.1.1 Bestimmung des Schadensausmaßes unter oxidativem Stress

Das antioxidative Potential des Wildtyps BelW3 und der daraus abgeleiteten Transformante BelW3gor mit Überexpression einer bakteriellen Glutathionreduktase wurde anhand mehrerer physiologischer Parameter verglichen. Im Folgenden soll kurz erläutert werden, inwiefern diese Messungen geeignet sind, das Schadensausmaß widerzuspiegeln.

Oxidativer Stress beinhaltet die Bildung von reaktivem Sauerstoff. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist relativ stabil und lässt sich im Exsudat bestimmen. Hierdurch kann Aufschluss über die peroxidative Belastung der Zelle gewonnen werden. Bei Gabe von exogenem H_2O_2 kann zudem das Entgiftungspotential und die Kapazität des antioxidativen Systems bestimmt werden. Der peroxidative Abbau ungesättigter Fettsäuren unter Einwirkung von Radikalen führt zur Freisetzung von Ethan. Die Ethanbildung lässt sich nichtinvasiv im Gasraum bestimmen. Demgegenüber lässt sich durch die Messung der Ethylenfreisetzung das Ausmaß an unspezifischer Stressabwehr und die aktive Induktion von Verteidigungsmechanismen abschätzen. Aufgrund der Fettsäuredegradation und der resultierenden Zerstörung der Membranintegrität kann Vakuoleninhalt bzw. Cytosol der Pflanzenzelle in das umgebende Medium austreten. Dies lässt sich durch Leitfähigkeitsveränderungen nachweisen. Als optisch prominentester Effekt bei starker oxidativer Schädigung ist der Abbau pflanzlicher Pigmente zu beobachten, welcher mittels Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung quantifizierbar ist.

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Schadensausmaßes wurden an steril in einer Klimakammer angezogenen Stecklingen von BelW3 und BelW3gor durchgeführt, welche für 4 Wochen unter moderatem (ca. $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, "Schwachlicht") bzw. stärkerem Licht (ca. $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, "Starklicht") gehalten wurden. Im Schwachlicht herangezogene Pflanzen besaßen einen Habitus mit gestreckter Sprossachse und kleinen, dunkelgrünen Blättern. Pflanzen, die unter höheren Lichtintensitäten angezogen wurden, wiesen einen Phänotyp mit gestauchtem Spross, rosettenartiger Anordnung der Blätter und verminderter Pigmentierung auf. Die Bestimmung der oxidativen Belastung erfolgte in sogenannten Leaf-Disk-Assays, wobei Blattstücke definierter Größe ausgestochen und in einer Warburgapparatur bei hohem Lichteinfall (ca. $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert wurden.

Oxidativer Stress wurde in den Blattstücken durch die relativ hohe Lichtquantität während der Inkubation hervorgerufen. Blattstücke schwachlichtangezogener Pflanzen zeigten in beiden Kultivaren eine geringere Schädigung als Blattstücke von starklichtangezogenen Pflanzen

(Tabelle 1). BelW3gor zeigte im Vergleich zu BelW3 allerdings bei beiden Anzuchtvarianten eine größere Leitfähigkeitsveränderung, einen leicht verminderten Gehalt an Chlorophyll und eine verstärkte Ethanbildung. Die Ethylenemission und die Menge an ins Medium abgegebenem H_2O_2 unterschieden sich in den Tabaklinien BelW3 und BelW3gor wenig. Diese Daten geben einen Hinweis auf eine verminderte Resistenz in den BelW3gor-Transformanten gegenüber Lichtstress.

Tabelle 1: Physiologische Parameter von BelW3 und BelW3gor unter Lichtstress.

Vergleich der oxidativen Belastung von BelW3 und BelW3gor durch Lichtstress anhand der Ethan- und Ethylenemission, der Leitfähigkeitsveränderung, exogenem H_2O_2 im Medium, dem Chlorophyllgesamtgehalt, dem Chlorophyll a zu Chlorophyll b-Verhältnis und dem Frischgewicht. Die Bestimmung der Parameter erfolgte an Blattstücken von im Schwachlicht ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. Starklicht ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogenen, zwei Monate alten Tabakstecklingen nach Belichtung bei $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 24 h in einer Warburg-Apparatur.

	BelW3			BelW3gor			BelW3/ BelW3gor
Schwachlicht- Anzucht							
Ethan (pmol/Ansatz)	51	±	11	104	±	13	203 %
Ethylen (pmol/Ansatz)	700	±	90	500	±	136	71 %
Leitfähigkeit (mS/Ansatz)	3	±	1	6	±	1	182 %
H₂O₂ (pmol/Ansatz)	47	±	4	54	±	3	115 %
Chlorophyll (µg/Ansatz)	90	±	12	85	±	15	94 %
Chl a / b	3,0	±	0,2	3,0	±	0,2	99 %
Frischgewicht (mg/Ansatz)	91	±	9	104	±	5	114 %
Starklicht – Anzucht							
Ethan (pmol/Ansatz)	76	±	12	200	±	32	263 %
Ethylen (pmol/Ansatz)	845	±	94	796	±	161	94 %
Leitfähigkeit (mS/Ansatz)	17	±	4	30	±	1	173 %
H₂O₂ (pmol/Ansatz)	25	±	4	24	±	0	98 %
Chlorophyll (µg/Ansatz)	37	±	9	30	±	3	81 %
Chl a / b	3,1	±	0,1	2,2	±	0,1	70 %
Frischgewicht (mg/Ansatz)	109	±	13	67	±	0	61 %

Bei zusätzlicher Behandlung mit peroxidierenden Agenzien zeigte *BelW3gor* gegenüber dem Wildtyp hingegen eine verminderte Schädigung durch oxidativen Stress.

Es wurde ein geringerer Anstieg der Leitfähigkeit, eine bessere H_2O_2 -Entgiftung und eine verminderte Freisetzung von Ethan bei der Transformante im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Abbildung 3). Diese bessere Resistenz der Transformante trat sowohl bei der Behandlung mit Paraquat als auch bei der Behandlung mit H_2O_2 zutage.

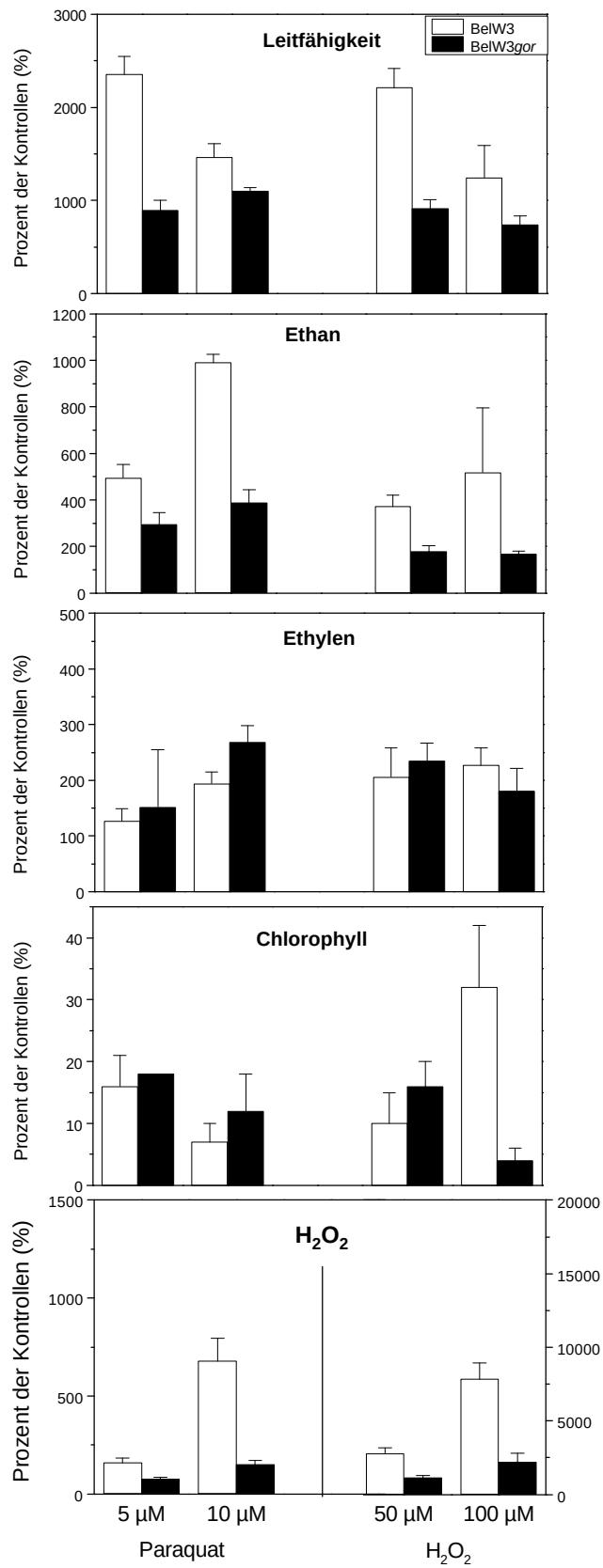
Die Gabe von Oxyfluorfen in einer Dosis von bis zu $2\text{ }\mu\text{M}$ zeigte im Leaf-Disk-Assay keinerlei Auswirkung auf Pigmentgehalt, Leitfähigkeitsveränderung, Ethan- und Ethylenbildung. Dennoch war bei dieser Konzentration, die noch nicht zu physiologisch messbaren Schäden führte, eine Erhöhung des H_2O_2 -Gehaltes erfassbar. Die ins Medium abgegebene Menge an H_2O_2 war in der Transformante *BelW3gor* geringer als im Wildtyp (Daten ohne Abbildung).

Folgende Seite:

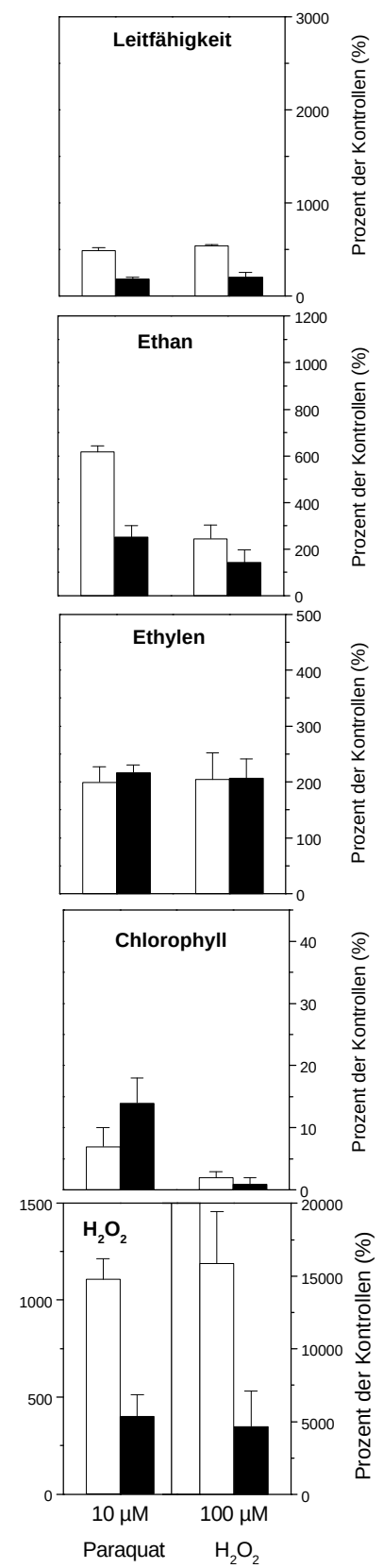
Abbildung 3: Physiologische Parameter von *BelW3* und *BelW3gor* unter oxidativem Stress.

Blattstücke von im Schwachlicht ($100\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) bzw. Starklicht ($500\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) angezogenen, zwei Monate alten Tabakstecklingen wurden mit Paraquat ($5\text{ }\mu\text{M}$ bzw. $10\text{ }\mu\text{M}$) oder H_2O_2 , ($50\text{ }\mu\text{M}$ bzw. $100\text{ }\mu\text{M}$) für 24 h bei $500\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ in einer Warburg-Apparatur behandelt. Im Anschluss wurde die Schädigung von *BelW3* und *BelW3gor* anhand der Ethan- und Ethylenemission, der Leitfähigkeitsveränderung, dem Chlorophyllgesamtgehalt und dem H_2O_2 im Medium bestimmt. Die Parameter sind als prozentuale Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Kultivars angegeben (vgl. Tabelle 1, S.33).

Schwachlicht-Anzucht



Starklicht-Anzucht



Die H_2O_2 -Entgiftungskapazität der beiden Tabaklinien wurde mit exogen zugegebenem H_2O_2 im Leaf-Disk-Assay bestimmt (Abbildung 4). An den Blattstückrändern von *BelW3gor* entwickelten sich nach wenigen Minuten Gasbläschen, die bei *BelW3* nur in geringerem Ausmaß und weitaus kleiner auftraten. Es handelt sich hierbei möglicherweise um molekularen Sauerstoff, wie er bei der Zersetzung von H_2O_2 freigesetzt wird. Nach 10 min waren durch *BelW3gor* 22 % einer 10 μM H_2O_2 -Lösung entgiftet, durch den Wildtyp wurden 17 % entgiftet. Nach 1 h waren durch die Transformante 55 %, durch *BelW3* 31 % des H_2O_2 abgebaut. Dieser Effekt beruhte nicht auf chemischem Quenching durch in das Medium abgegebenes Exsudat (Daten nicht gezeigt).

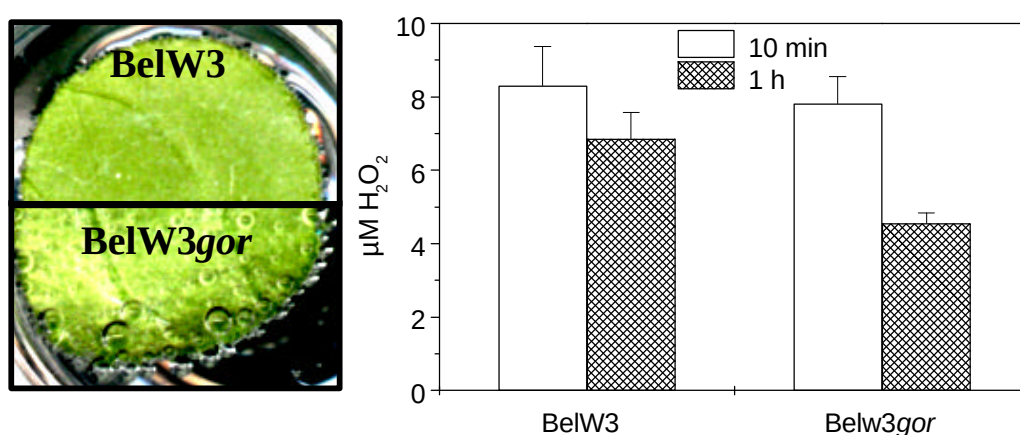


Abbildung 4: H_2O_2 - Entgiftung durch *BelW3* und *BelW3gor*.

Blattstücke des Wildtyps *BelW3* und der Transformante *BelW3gor* wurden in 10 μM H_2O_2 inkubiert und die H_2O_2 -Konzentration nach den angegebenen Zeiten bestimmt. Die Ordinatenhöhe entspricht der zu Beginn zugegebenen H_2O_2 -Konzentration. Im linken Teil ist die nach H_2O_2 -Behandlung auftretende Gasentwicklung des Wildtyps (obere Hälfte) und der Transformante (unten) exemplarisch abgebildet.

3.1.2 Veränderung des Ascorbat- und Glutathion- Gehaltes unter oxidativem Stress

Die niedermolekularen Antioxidantien Glutathion (GSH) und Ascorbat (ASA) tragen im hydrophilen Milieu sowohl als Enzymsubstrate als auch durch chemisches Abfangen von Radikalen zur Stressabwehr bei. Veränderungen des Gehaltes und des Reduktionszustandes von GSH und ASA wurden anhand ca. zwei Wochen alter Tabakpflänzchen nach dreitägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Paraquat bzw. Oxyfluorfen bestimmt.

Der Gesamtascorbatgehalt des Wildtyps *BelW3* stieg unter Paraquateinfluss um ca. 35 % an, die oxidierte Form DASA wurde nur wenig erhöht. In der Transformante *BelW3gor* lagen vergleichbare Verhältnisse vor (Abbildung 5). Der GSH-Gehalt wurde ebenfalls erhöht (um ca. 50 %), der Gehalt an oxidiertem GSH kaum verändert. In der Transformante fiel der Anstieg

der GSH-Konzentration tendenziell geringer aus, hier war eine Steigerung um ca. 30 % bei der höchsten Paraquatkonzentration zu beobachten (Abbildung 5). Eine signifikante Verschiebung des Reduktionszustandes von GSH trat, wie beim Wildtyp, bei den eingesetzten Konzentrationen an Paraquat nicht zutage.

Auch die Behandlung mit 500 nM Oxyfluorfen führte zu einem Anstieg des ASA um ca. 50 %, DASA wurde leicht erhöht. Die Inkubation mit Oxyfluorfen bewirkte gleichfalls einen Anstieg des GSH- und des GSSG- Gehaltes um ca. 30 %, ohne dass eine signifikante Verschiebung des Redoxzustands auftrat (Daten nicht gezeigt).

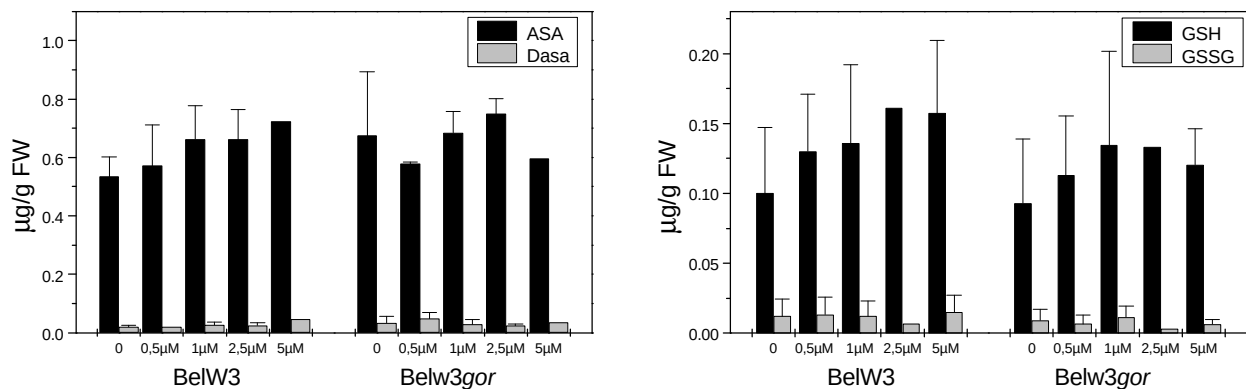


Abbildung 5: Gehalt an reduziertem und oxidiertem Ascorbat bzw. reduziertem und oxidiertem Glutathion in BelW3 und BelW3gor nach Paraquatbehandlung.

Zwei Monate alte Tabakpflanzen wurden für drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen (0; 0,5; 1; 2,5 und 5 µM) an Paraquat behandelt. Anschließend wurden Gehalt und Reduktionszustand der niedermolekularen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion bestimmt.

3.1.3 Veränderung antioxidativer Enzyme unter oxidativem Stress

Die Auswirkung von Paraquat und Oxyfluorfen auf das antioxidative System wurde anhand der Veränderung der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Ascorbatperoxidase APX, Monodehydroascorbatreduktase MDHR, Dehydroascorbatreduktase DHAR, Glutathionreduktase GR) und weiterer Schutzenzyme (Catalase CAT, Guajacol- bzw. Pyrogallol-umsetzende Peroxidasen G-POD bzw. P-POD, Glutathion S-Transferase GST) untersucht. Zum Einen wurde hierzu die Gesamtaktivität der Enzyme gemessen (Abschnitte 3.1.3.1 und 3.1.3.2), zum Anderen mögliche Veränderungen im Isoenzymmuster anhand von Zymogrammen überprüft (Abschnitte 3.1.4.1 bis 3.1.4.3).

3.1.3.1 Einfluss von Oxyfluorfen auf die Enzymaktivitäten

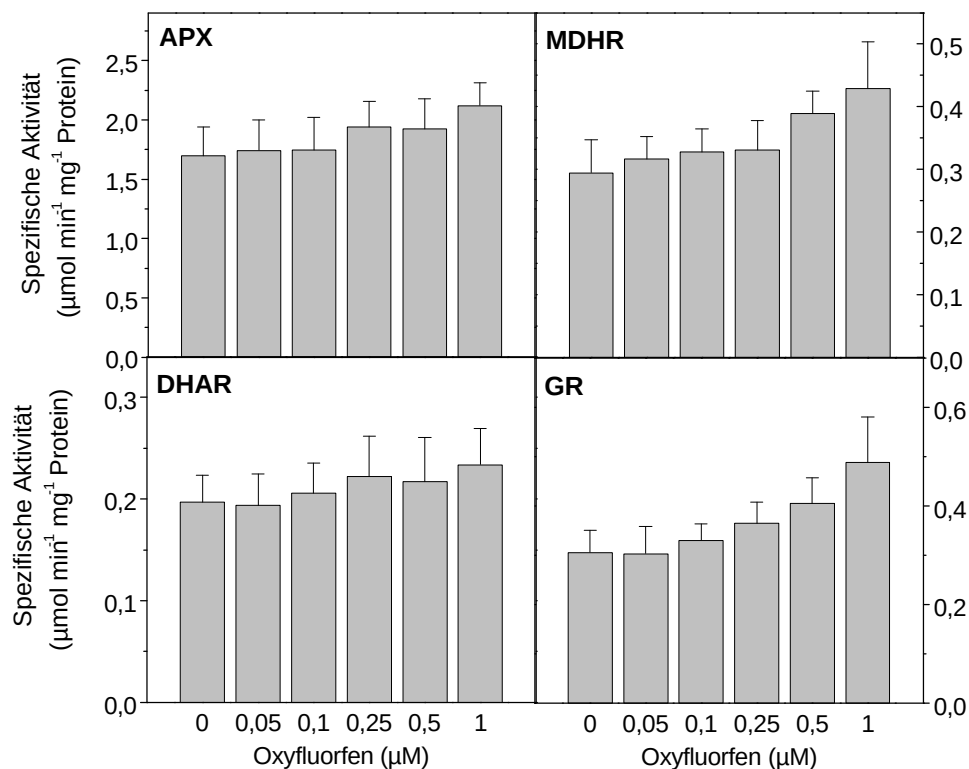


Abbildung 6: Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus nach Oxyfluorfenbehandlung.

Die spezifische Aktivität der Ascorbatperoxidase (APX), der Monodehydroascorbatreduktase (MDHR), der Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und der Glutathionreduktase (GR) von zwei Monate alten Tabakpflanzen wurde nach dreitägiger Behandlung mit Oxyfluorfen (Konzentrationen 0, 50, 100, 250, 500 und 1000 nM) bestimmt.

Unter Einfluss von Oxyfluorfen stiegen die Aktivitäten der am Ascorbat-Glutathion-Zyklus beteiligten Enzyme konzentrationsabhängig an. So wurde die Gesamtaktivität der APX um maximal 25 %, der MDAR um maximal 45 %, der DHAR um maximal 20 % und der GR um maximal 60 % gesteigert (Abbildung 6).

Weitere Enzyme der antioxidativen Abwehr wurden ebenfalls durch Oxyfluorfenbehandlung beeinflusst. Die Aktivität der G-POD stieg um maximal 70 %, die P-POD um 30 % und die GST um 20 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle an (Abbildung 7). Die Gesamtaktivität der CAT hingegen wurde nicht verändert.

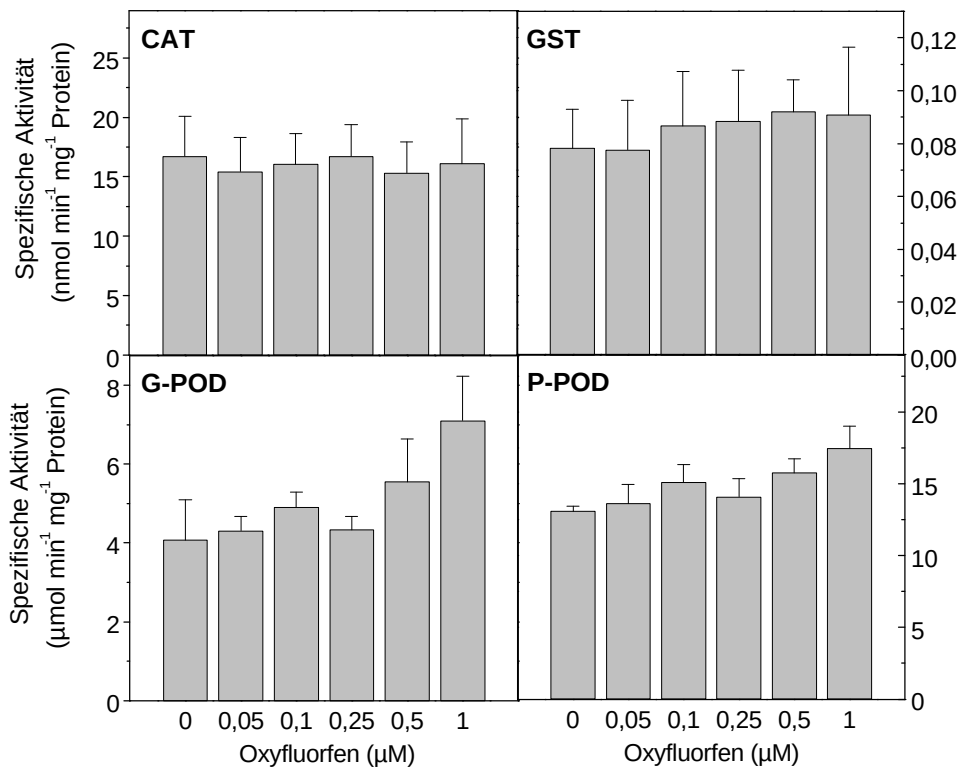


Abbildung 7: Aktivitäten antioxidativer Schutzenzyme nach Oxyfluorfenbehandlung.

Die spezifische Aktivität der Catalase (CAT), der Guajacol-Peroxidase (G-POD), der Pyrogallol-Peroxidase (P-POD) und der Glutathion S-Transferase (GST) von zwei Monate alten Tabakpflanzen wurde nach dreitägiger Behandlung mit Oxyfluorfen (Konzentrationen 0, 50, 100, 250, 500 und 1000 nM) bestimmt.

3.1.3.2 Einfluss von Paraquat auf die Enzymaktivität

Unter Paraquateinfluss wurden die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme weniger eindeutig verändert (Abbildung 8 und 9). Durch die Behandlungsform der Pflanzen (Eintauchen in Wirkstofflösung) wurden möglicherweise Läsionen hervorgerufen, was die Schwankungsbreite der Grundaktivitäten erklären könnte. Die Veränderung der beiden Peroxidasen ist z. T. auf die Oberflächenbehandlung der Blätter mit Tween zurückzuführen, wie aus dem Vergleich der Kontrollaktivitäten von Paraquat- und Oxyfluorfenansätzen hervorgeht, und somit nur begrenzt aussagekräftig.

Die Transformante BelW3gor besaß eine deutlich höhere Aktivität an GR (Faktor 3 – 4) als der Wildtyp BelW3. In der Transformante waren APX und MDHR leicht erhöht, die Gesamt-Catalaseaktivität leicht vermindert (Daten ohne Abbildung).

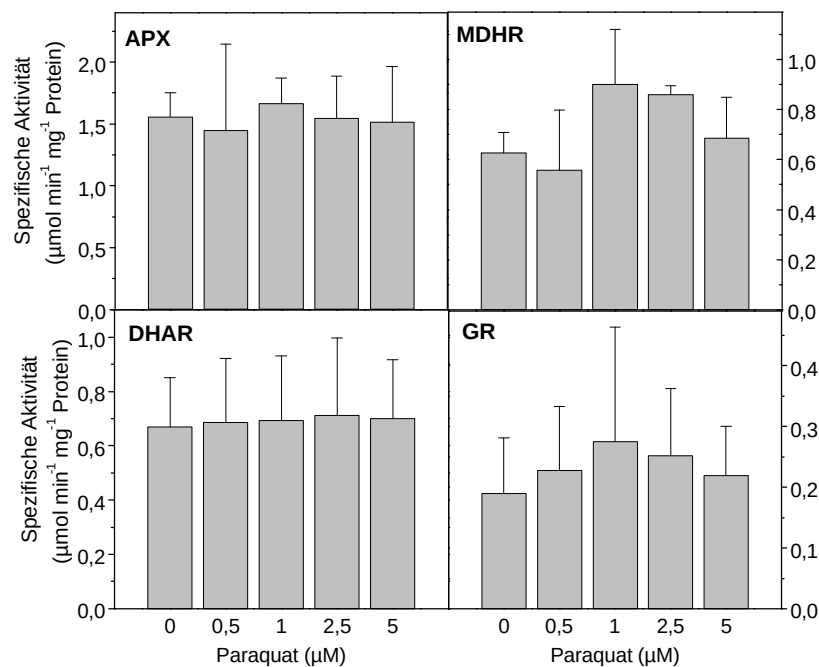


Abbildung 8: Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus nach Paraquatbehandlung.

Veränderungen der spezifischen Aktivität von Ascorbatperoxidase (APX), Monodehydroascorbatreduktase (MDHR), Dehydroascorbatreduktase (DHAR) und Glutathionreduktase (GR) wurden an zwei Monate alten Tabakpflanzen nach dreitägiger Paraquatbehandlung (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μM) bestimmt.

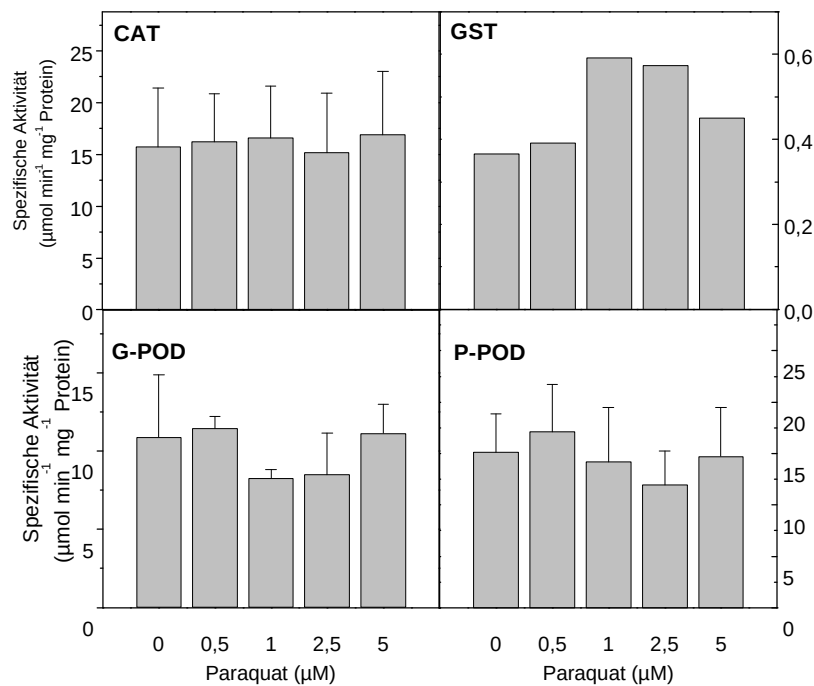


Abbildung 9: Aktivitäten antioxidativer Schutzenzyme nach Paraquatbehandlung.

Die Veränderung der spezifischen Aktivität von Catalase (CAT), Guajacol-Peroxidase (G-POD), Pyrogallol-Peroxidase (P-POD) und Glutathion S-Transferase (GST) wurde nach dreitägiger Paraquatbehandlung (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μM) von zwei Monate alten Tabakpflanzen bestimmt.

3.1.4 Veränderungen des Isoenzymmusters durch oxidativen Stress

Enzyme treten meist in verschiedenen Isoformen auf, die sich in Lokalisation, Induktionsmuster und/oder physiologischen Eigenschaften stark unterscheiden können. Es ist oft möglich, Isoenzyme unter nichtdenaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufzutrennen und nach Umsetzung eines geeigneten Substrates anhand ihrer Aktivität zu detektieren (Zymogramme).

3.1.4.1 Peroxidasen

Anionische Peroxidasen treten in großer Vielzahl in Pflanzen auf. Im Zymogramm ließ sich keine bedeutende Veränderung des Peroxidasemusters bei Behandlung mit Paraquat (Abbildung 10) oder Oxyfluorfen (ohne Abbildung) in verschiedenen Konzentrationen erkennen. Auch zwischen den beiden Kultivaren gab es keine nennenswerten Unterschiede.

Daraus ist zu folgern, dass die anhand der spektroskopischen Enzymtests gemessene Induktion der Peroxidasen (vgl. Abbildung 10, S. 41) nicht primär auf anionische Peroxidasen zurückzuführen ist oder dass die unterschiedlichen Substrate (Benzidin bzw. Guajacol und und Pyrogallol) für diese Diskrepanz verantwortlich zeichnen.

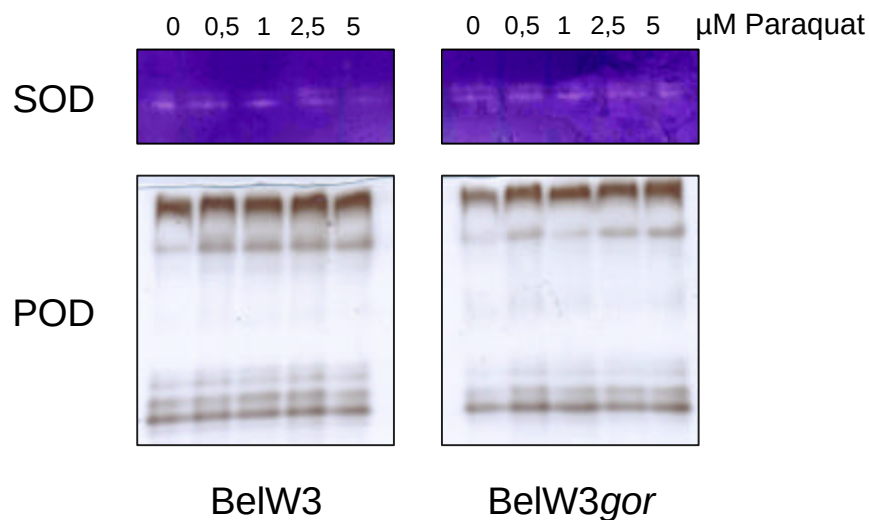


Abbildung 10: Isoenzymmuster der Superoxiddismutase und der anionischen Peroxidase in *BelW3* und *BelW3gor* nach Paraquatbehandlung.

Zwei Monate alte Tabakpflanzen wurden für drei Tage mit Paraquat (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 µM) behandelt und die Proteinrohextrakte in Nativgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß wurden Isoformen der Superoxiddismutasen (SOD; oben) und der anionischen Peroxidasen (POD, unten) durch spezifische Aktivitätsfärbung visualisiert. Die Proben des Wildtypes *BelW3* und der Transformante *BelW3gor* wurden im selben Gel aufgetrennt und nachgewiesen, sie sind lediglich graphisch getrennt dargestellt.

3.1.4.2 Superoxiddismutasen

Aus den Zymogrammen der SODs nach Behandlung der Tabakpflanzen mit Oxyfluorfen oder Paraquat ließ sich keine Aktivitätsveränderung ablesen (Abbildung 10).

In den Zymogrammen waren allerdings nur zwei Isoformen deutlich sichtbar, in Tabak sind die Superoxiddismutasen hingegen mit mindestens vier verschiedenen Isoformen nachweisbar.

Deswegen wurde überprüft, ob unvollständige Detektion auf verminderte Expression im verwendeten Tabakkultivar BelW3 zurückzuführen ist oder ein Artefakt der Proteinisolierung bzw. Enzymreaktion darstellt. In analogem Vorgehen wurden deswegen SODs aus dem Tabakkultivar Samsun und aus Mais (Kultivar Anjou) aufgetrennt und mit Zymogrammen aus der Literatur verglichen. Aus diesen Versuchen konnte weder ein Rückschluss auf einen Mangel an SOD Isoformen im BelW3 noch auf mögliche methodische Fehler gezogen werden, da im Vergleichstabakkultivar Samsun ebenfalls nur zwei Banden detektiert werden konnten, in Mais hingegen alle aus der Literatur bekannten Banden (Abbildung 11).

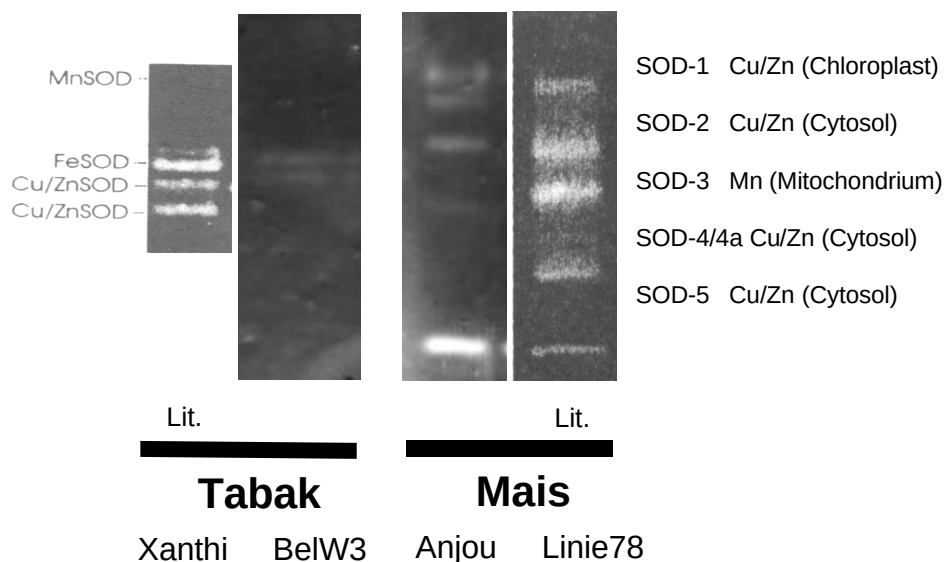


Abbildung 11: Superoxiddismutase-Isoformen verschiedener Kultivare von Tabak und Mais.

Die Verteilung der SOD-Isoformen in Tabak (BelW3) und Mais (Anjou) wurde mit von anderen Kultivaren veröffentlichten Zymogrammen verglichen (rechts außen Tabak cv. Xanthi, und links außen Mais cv. Linie 78; Scandalios, 1997).

3.1.4.3 Ascorbatperoxidasen

Auch die Ascorbatperoxidasen treten in verschiedenen Isoformen auf. Die cytosolische APX aus Tabak besitzt ein geringeres Molekulargewicht als die übrigen Isoformen und ist relativ stabil gegenüber Ascorbatverlust. Plastidäre und thylakoidgebundene Isoform hingegen sind nach wenigen Sekunden ohne Ascorbat irreversibel inaktiviert, insbesondere in Anwesenheit

von H_2O_2 . Um dies zu verhindern, wurde sowohl dem Extraktionspuffer als auch dem Laufpuffer Ascorbat zugegeben.

Die dominierende Bande in APX-Zymogrammen ist nach Mittler und Zillinskas (1993) der cytosolischen Isoform zuzuordnen. Nach Paraquatbehandlung veränderte sich die im Gel nachweisbare Aktivität der cytosolischen APX kaum. Eine andere Isoform, der Größe nach zu urteilen vermutlich die plastidäre, zeigte im Zymogramm eine leichte Reduktion (Abbildung 12).

Nach Oxyfluorfenbehandlung im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,25 μM wurde die cytosolische APX in ihrer Aktivität stark gesteigert. Bei den höchsten Oxyfluorfenkonzentrationen (0,5 und 1 μM) war hingegen ein Rückgang der Aktivität zu erkennen.

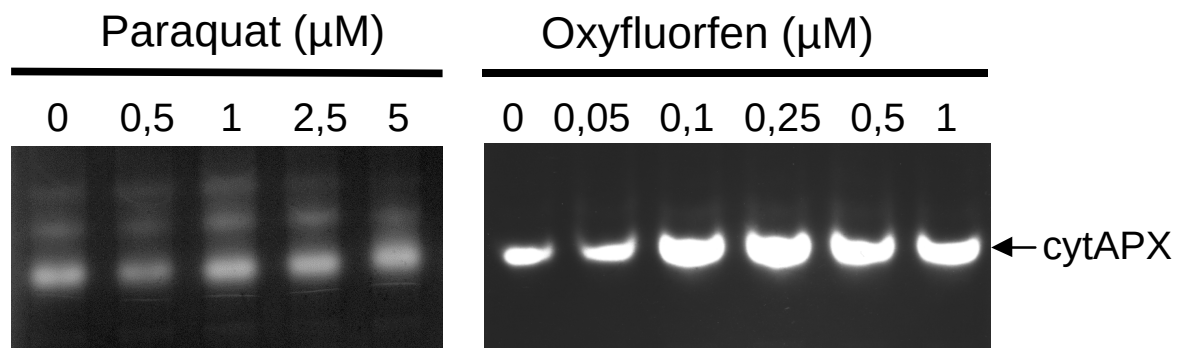


Abbildung 12: Isoenzymmuster der Ascorbatperoxidase aus BelW3 nach Paraquat- oder Oxyfluorfenbehandlung.

Zwei Monate alte Tabakpflanzen wurden für drei Tage mit Paraquat (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μM) bzw. Oxyfluorfen (Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 μM) behandelt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteinrohextrakte in mit Ascorbat supplementierten Nativgelen wurden die Isoformen der Ascorbatperoxidase durch Negativfärbung sichtbar gemacht. Die putative cytosolische Isoform (cytAPX) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.1.5 Veränderungen des D1-Proteins

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt das D1-Protein zwar einem hohen Umsatz, ist aber in seiner Konzentration relativ konstant. Allerdings ist es anfällig gegenüber oxidativer Degradation, beispielsweise bei erhöhtem photosynthetischen Elektronentransport oder Überreduktion des antioxidativen Systems.

Generell war die Menge an D1-Protein im Wildtyp und in der Transformante vergleichbar. Durch die Behandlung mit Oxyfluorfen trat im verwendeten Konzentrationsbereich keine Veränderung im Gehalt des D1-Proteins auf (Abbildung 13). Paraquat hingegen führte zu einer starken Verminderung des D1-Proteins. Diese war größtenteils auf eine spezifische Degradation des Proteins zurückzuführen, ersichtlich am Auftreten einer immunologisch spezifisch detektierbaren, kleineren Proteinbande.

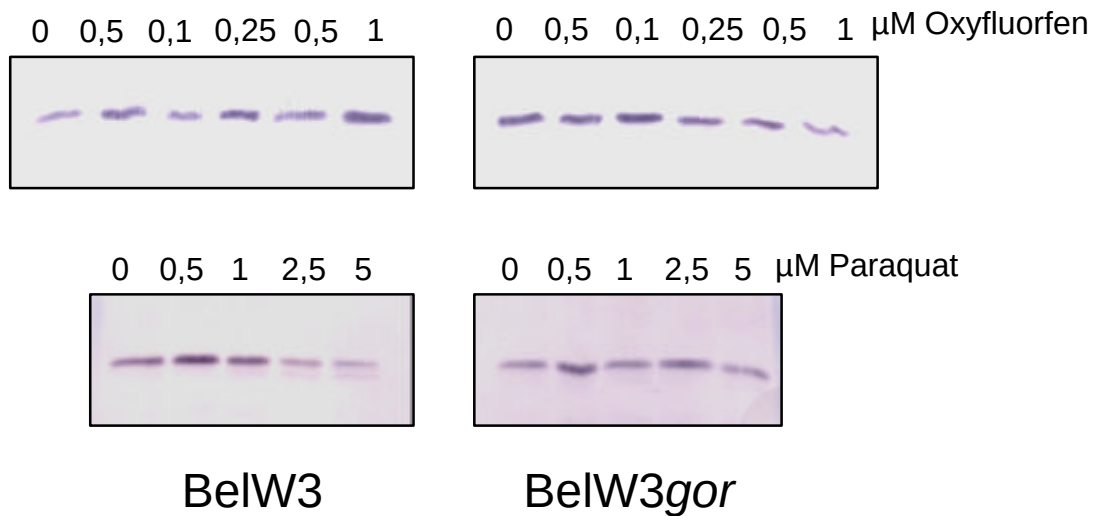


Abbildung 13: D1-Protein aus BelW3 und BelW3gor nach Paraquat- oder Oxyfluorfenbehandlung.

Der Wildtyp BelW3 und die Glutathionreduktase-überexprimierende Transformante BelW3gor (jeweils zwei Monate alte Pflanzen) wurden für drei Tage mit Paraquat (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μM) bzw. Oxyfluorfen (Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 μM) behandelt. Die Veränderung im Gehalt des D1-Proteins wurde durch spezifische immunologische Detektion über Western Blots visualisiert, die Entwicklung erfolgte auf einer Membran (BelW3 und BelW3gor).

Der Nachweis weiterer antioxidativer Enzyme mit Antikörpern gegen die GR aus Spinat, die GR aus Erbse, die MDAR aus Citrus und gegen SOD blieb wegen mangelnder Spezifität ohne verwertbares Ergebnis.

3.1.6 Veränderungen der mRNA unter oxidativem Stress

Durch reaktive Sauerstoffspezies werden nicht nur oxidationsempfindliche Zellbestandteile wie Membranen oder DNA geschädigt, sondern auch Proteine und damit die Schutzenzyme selbst. Im Extremfall kann so, obgleich eine Induktion auf Translationsebene antioxidativer Enzyme als Antwort auf den Stress erfolgt, durch gegenläufige Abbauprozesse nur eine marginale Veränderung der Proteinmenge oder -aktivität resultieren.

Um zu überprüfen, inwieweit die Behandlung mit Paraquat oder Oxyfluorfen die Regulation antioxidativer Schutzenzyme beeinflusst, wurde deswegen ergänzend zu den Messungen der Veränderung der Enzymaktivität die Expression der mRNA betrachtet.

3.1.6.1 Einfluss von Paraquat auf den mRNA-Gehalt

Die drei bekannten Isoenzyme der Catalase in Tabak erfüllen distinkte Aufgaben im Stoffwechsel und spiegeln somit nicht nur den antioxidativen Status einer Zelle wider, sondern geben auch einen Hinweis auf physiologische Umstrukturierungen im Grundstoffwechsel.

Unter dem Einfluss von Paraquat wurde die Transkriptionsmenge der CAT1 nur im oberen Konzentrationsbereich leicht reduziert. In der mRNA-Menge der CAT2 und CAT3 traten mit den eingesetzten Konzentrationen kaum Veränderungen auf, weder im Wildtyp noch in der Transformante *BelW3gor* (Abbildung 14).

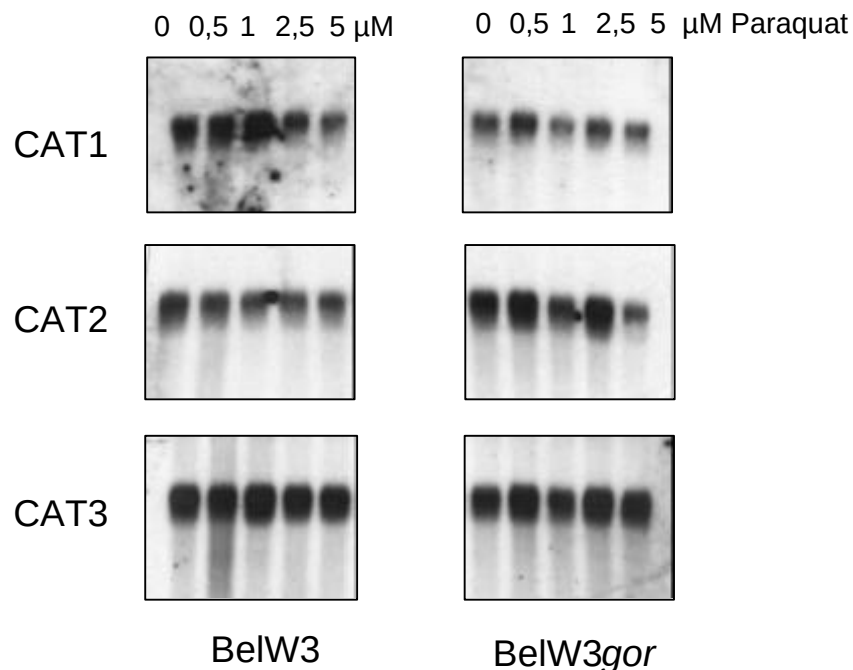


Abbildung 14: mRNA der Catalasen aus *BelW3* und *BelW3gor* nach Behandlung mit Paraquat.

Der Gehalt an mRNA von Isoformen der Catalase (CAT1, CAT2, CAT3) wurde nach dreitägiger Paraquatbehandlung (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 µM) von zwei Monate alten Tabakpflanzen bestimmt. Die Gesamt-RNA des Wildtypes *BelW3* und der Transformante *BelW3gor* wurde im selben Gel aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen cDNA-Sonden die mRNA detektiert. Der besseren Übersicht wegen wurde der jeweils resultierende Northern Blot lediglich zur Darstellung der Kultivare getrennt.

Ergänzend zur Entgiftung von H_2O_2 durch Catalasen können auch Peroxidasen mit Hilfe eines enzymspezifischen Reduktanten H_2O_2 umsetzen. Hierbei spielt im pflanzlichen antioxidativem Stoffwechsel insbesondere die Ascorbatperoxidase als Eingangsenzym des Ascorbat-Glutathion-Zyklus eine wichtige Rolle.

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, wurde durch Paraquatbehandlung in beiden Tabakkultivaren keine Induktion der mRNA der cytosolischen APX hervorgerufen. Eine weitere, Glutathion-abhängige Peroxidase - die cytosolische GPX - wurde unter den angeführten Bedingungen ebenfalls gleichbleibend exprimiert; im Transgen *BelW3gor* war bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Paraquat ein leichter Anstieg der mRNA-Menge zu verzeichnen.

Nicht nur der Anstieg der Translation antioxidativer Enzyme gibt Aufschluss über die oxidative Belastung, sondern auch die Induktion von Enzymen, welche in die Stressabwehr im weiteren

Sinne involviert sind. Hierzu zählt das Pathogenesis Related Protein 1a (PR1a), ein Protein unbekannter enzymatischer Funktion, welches bei Pathogenbefall und unter oxidativem Stress vermehrt gebildet wird. Bei Behandlung mit Paraquat war im Wildtyp eine starke, konzentrationsabhängige Induktion von PR1a augenfällig. Auch in der Transformante *BelW3gor* wurde PR1a durch Paraquatbehandlung induziert, allerdings weniger stark.

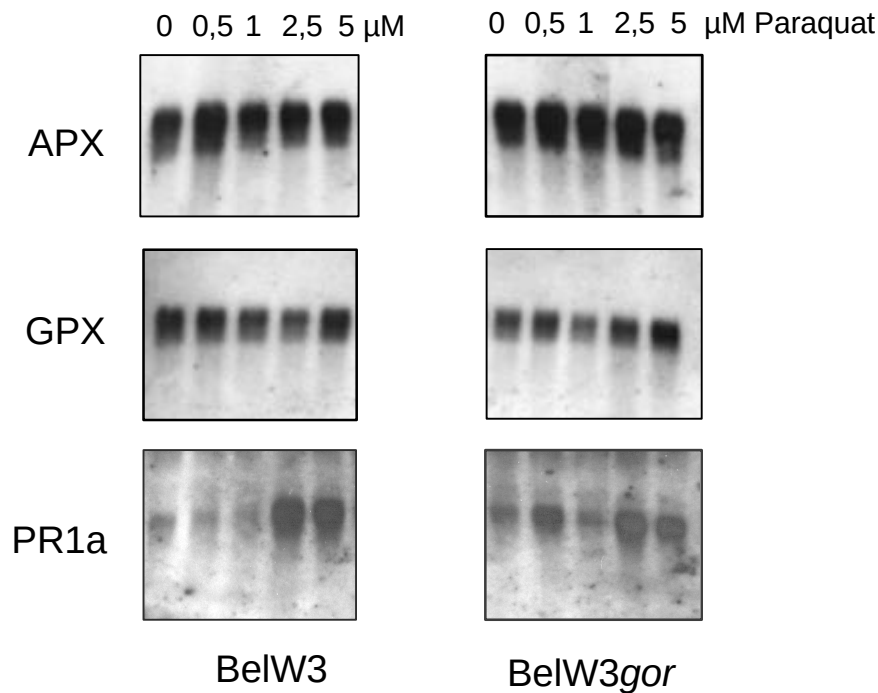


Abbildung 15: mRNA der Ascorbatperoxidase, Glutathionperoxidase und des Pathogenesis Related Proteins 1a bei Behandlung von *BelW3* und *BelW3gor* mit Paraquat.

Der mRNA-Gehalt der cytosolischen Ascorbatperoxidase (APX), der Glutathionperoxidase (GPX) und des Pathogenesis Related Protein 1a (PR1a) von zwei Monate alten Tabakpflanzen wurde nach dreitägiger Paraquatbehandlung (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μM) nachgewiesen. Die resultierenden Northern Blots wurden rein optisch in der Darstellung der Kultivare *BelW3* und *BelW3gor* getrennt, experimentell jedoch im selben Gel aufgetrennt, geblottet und detektiert.

Das organellgebundene Auftreten der Superoxiddismutase-Isoformen ermöglicht einen kompartimentspezifischen Nachweis auf enzymatischer Ebene und auf transkriptionaler Ebene.

Eine plastidär lokalisierte Isoform der SODs in Tabak, die chlFeSOD, wurde unter dem Einfluss von Paraquat nicht induziert, ebenso wenig die cytosolische Isoform cytCuZnSOD. In der Glutathionreduktase-überexprimierenden Transformante *BelW3gor* war das konstitutive Expressionsniveau der cytCuZnSOD allerdings weitaus geringer als im Wildtyp *BelW3* (Abbildung 16).

Zum Schutz des plastidären Thylakoidsystems vor reaktiven Sauerstoff- und Chlorophyllspezies dienen auch Carotinoide. Insbesondere β -Carotin, gebildet durch die β -Carotinhydroxylase (bhy), und das Folgeprodukt Zeaxanthin, welches im Xanthophyllzyklus durch die

Violaxanthindeepoxidase (vde) regeneriert wird, gelten als wichtige Schutzpigmente. Bei einer photooxidativen Belastung des Plastiden kann die Aktivierung des Violaxanthinzyklus die Stressabwehr unterstützen, weswegen die mRNA-Induktion der bhy und vde untersucht wurde.

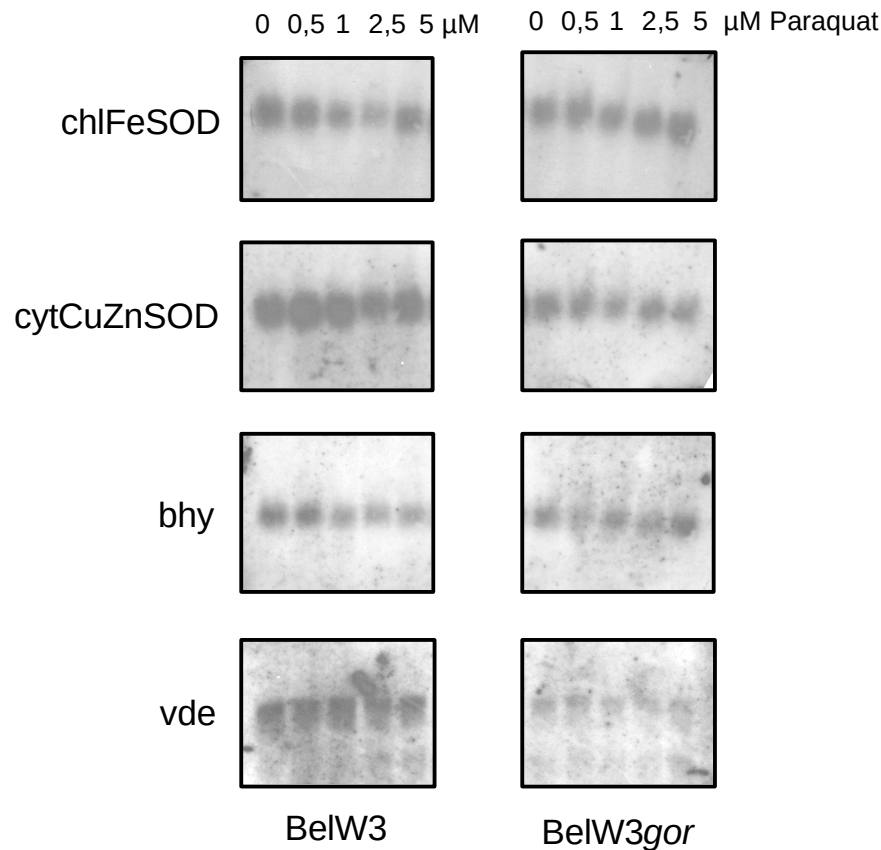


Abbildung 16: mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase, der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase, der β -Carotinhydroxylase und der Violaxanthindeepoxidase nach Paraquatbehandlung von BelW3 und BelW3gor.

Der Gehalt an mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase (chlFeSOD), der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase (cytCuZnSOD), der β -Carotinhydroxylase (bhy) und der Violaxanthindeepoxidase (vde) wurde durch Northern Blots nachgewiesen. Hierfür wurden zwei Monate alte Tabakpflanzen von BelW3 und BelW3gor für drei Tage mit Paraquat (Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5 und 5 μ M) behandelt. Die jeweilige mRNA von BelW3 und BelW3gor wurde auf demselben Blot detektiert, in der Abbildung jedoch getrennt dargestellt.

Die Behandlung mit Paraquat resultierte nicht in einer vermehrten Bildung der bhy- und der vde-mRNA. Wildtyp und Transformante unterschieden sich allerdings in der konstitutiv vorhandenen Menge an vde-Transkript. In der Gutathionreduktase-überexprimierenden Pflanze BelW3gor wurde eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Menge an vde-mRNA nachgewiesen (Abbildung 16).

3.1.6.2 Einfluss von Oxyfluorfen auf den mRNA-Gehalt

Durch Oxyfluorfenbehandlung wurde die Gesamtzymaktivität der Catalase nicht verändert (Abbildung 7, S. 39). Auf mRNA-Ebene hingegen zeigten die einzelnen Isoformen eine differenzierte Regulation (Abbildung 17).

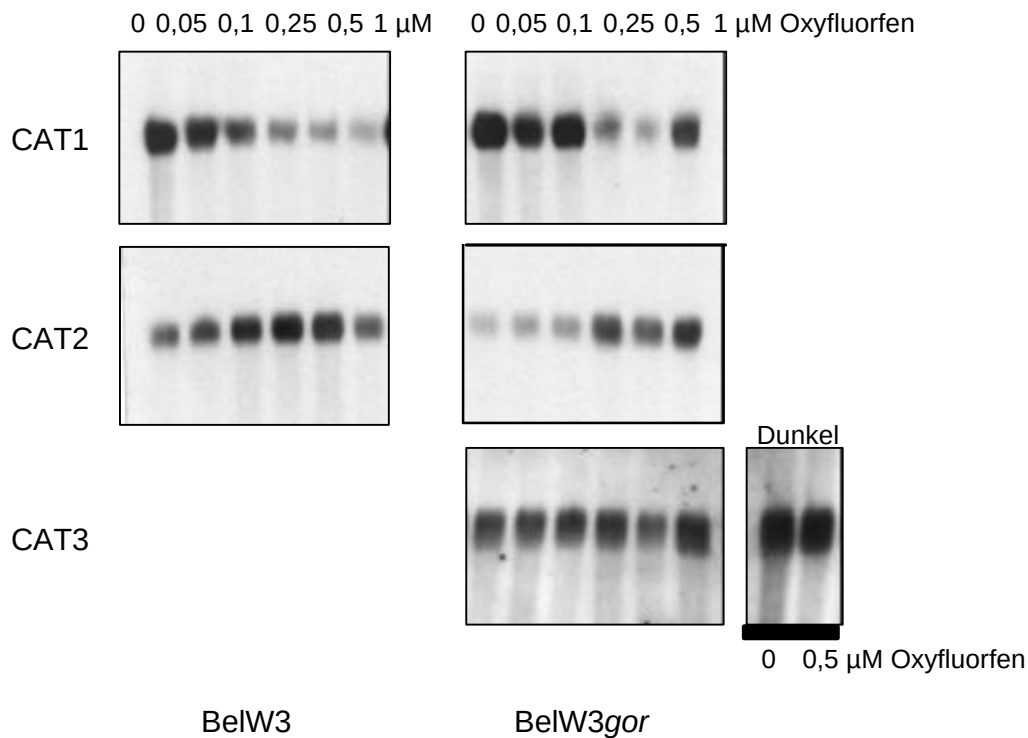


Abbildung 17: mRNA der Catalasen aus BelW3 und BelW3gor nach Oxyfluorfenbehandlung.

Die Gesamt-RNA des Wildtypes BelW3 und der Transformante BelW3gor wurde im selben Gel aufgetrennt, geblottet und die mRNA mit Sonden gegen die Catalase-Isoformen CAT1, CAT2 und CAT3 detektiert. Als Proben dienten zwei Monate alte Tabakpflanzen, die für drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Oxyfluorfen (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 µM) im Licht oder im Dunkeln (0 und 1 µM) behandelt wurden. Zur besseren Übersicht wurden die auf einem Northern Blot entwickelten Transkriptmengen nach Kultivar separiert abgebildet.

Die CAT1-mRNA wurde durch Oxyfluorfenfengabe sehr stark reprimiert. Dieser Effekt trat sowohl im Wildtyp als auch in der GR überexprimierenden Transformante auf, obgleich hier eine etwas abgeschwächte Antwort auftrat. Gegensätzlich zur CAT1 wurde die mRNA der CAT2 nach Oxyfluorfenbehandlung konzentrationsabhängig stark erhöht. Die Isoform CAT3 zeigte keine Reaktion auf den Diphenylether, besaß aber im Dunkeln eine höhere Transkriptmenge als im Licht.

Die zeitliche Abfolge der H₂O₂-abbauenden Enzyme APX und CAT wurde über den Behandlungszeitraum von drei Tagen verfolgt. Um den Effekt dirunaler Schwankungen auszuschliessen, wurden die Proben jeweils zur gleichen Tageszeit genommen. Die APX-mRNA

wurde innerhalb von 24 h durch Oxyfluorfen maximal induziert (Abbildung 18). Veränderungen im mRNA Gehalt der Catalasen traten erst nach zweitägiger Oxyfluorfungabe auf.

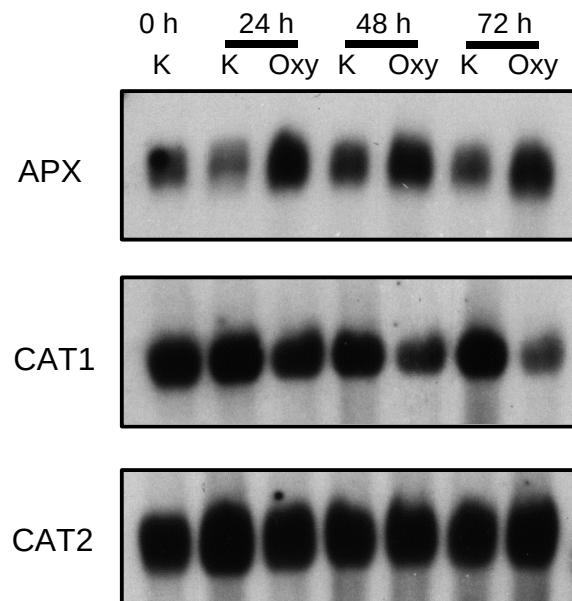


Abbildung 18: Kinetik der mRNA-Veränderung von Ascorbatperoxidase, Catalase1 und Catalase2 bei Oxyfluorfenbehandlung von BelW3.

Die Gesamt-RNA des Wildtypes BelW3 wurde aus zwei Monaten alte Tabakpflanzen bei Behandlung mit 0,5 μ M Oxyfluorfen (Oxy; unbehandelte Kontrolle: K) zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert (0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlungsbeginn).

Die mRNA der cytosolischen Ascorbatperoxidase erfuhr durch Behandlung der Tabakpflanzen mit Oxyfluorfen eine starke, konzentrationsabhängige Induktion (Abbildung 19). Um zwischen Veränderungen im Expressionsniveau durch Oxyfluorfen selbst und durch Oxyfluorfenbedingten oxidativen Stress unterscheiden zu können, wurden Parallelansätze im Licht und im Dunkeln gehalten. Die cytAPX-mRNA wurde im Dunkeln weitaus schwächer als im Licht exprimiert und bei Oxyfluorfenbehandlung nicht verändert exprimiert. Unter Oxyfluorfungabe bei Belichtung trat eine starke und konzentrationsabhängige Induktion der APX-mRNA auf. Die Menge an APX-mRNA war in den beiden Tabaklinien vergleichbar, wenn auch die APX-mRNA unter cytosolischem Stress durch Oxyfluorfen in der Transformante etwas stärker induziert wurde als im Wildtyp.

Auch die mRNA-Menge der GPX zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung bei Oxyfluorfungabe unter Belichtung. Im Gegensatz zu der beobachteten verminderten Expression der APX-mRNA im Dunkeln war bei der GPX kein Unterschied in der Transkription im Licht und Dunkel manifest.

Ferner wurde die Expression der in BelW3gor überexprimierten bakteriellen Glutathionreduktase GOR nachgeprüft (Abbildung 19). Die pflanzliche, endogene Glutathionreduktase GR weist eine zu geringe Homologie zur bakteriellen GOR auf, um unter den gewählten

Bedingungen kreuzreagieren zu können. Im Wildtyp war mit der spezifischen Sonde der GOR cDNA kein Genprodukt nachweisbar. In der Transformante hingegen konnte die bakterielle GOR mithilfe der Sonde nachgewiesen werden. Obgleich das transformierte Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven viralen Promotors steht, trat durch Behandlung mit Oxyfluorfen eine leichte Induktion der GOR auf.

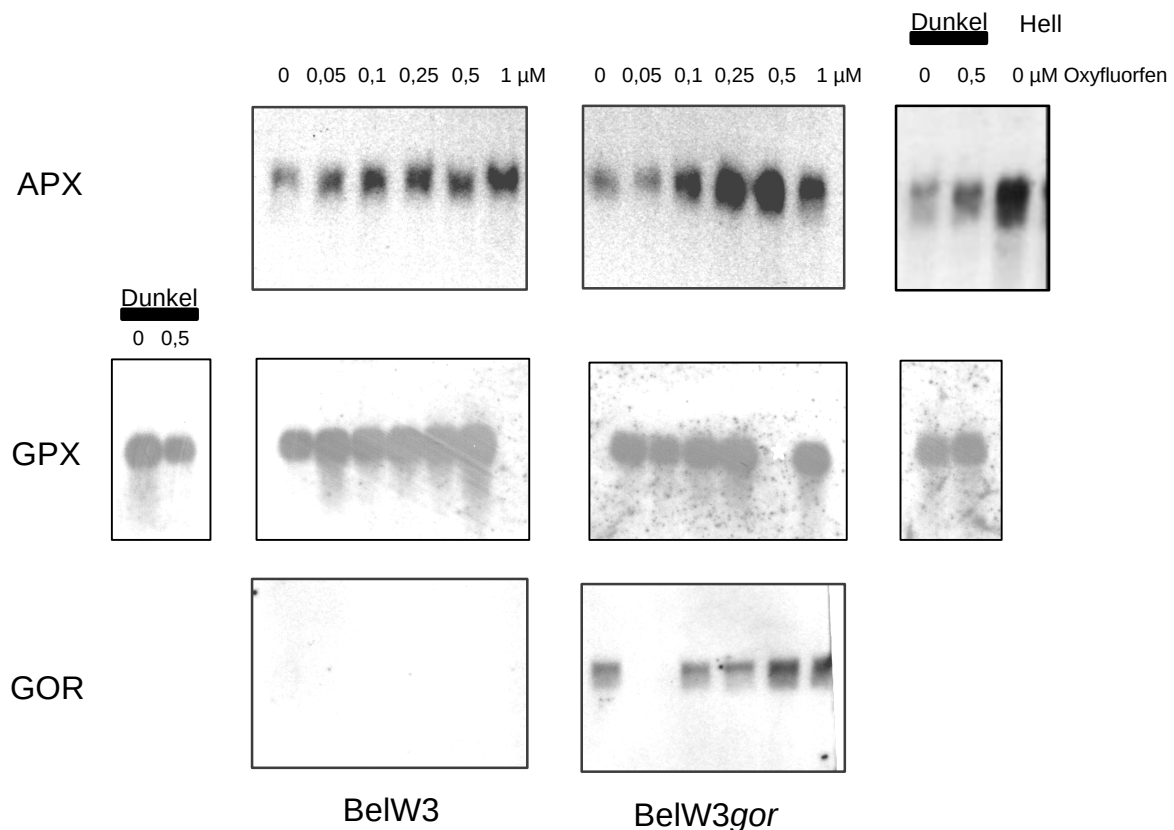


Abbildung 19: mRNA der Ascorbatperoxidase, der Glutathionperoxidase und der bakteriellen Glutathionreduktase in BelW3 und in BelW3gor nach Behandlung mit Oxyfluorfen.

Der Wildtyp BelW3 und die Transformante BelW3gor mit Überexpression der bakteriellen Glutathionreduktase (jeweils zwei Monate alte Pflanzen) wurden für drei Tage mit Oxyfluorfen im Licht (Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 μM) bzw. im Dunkeln (Konzentrationen 0 und 0,5 μM) behandelt. Die Veränderung im mRNA-Gehalt der Ascorbatperoxidase (APX), der Glutathionperoxidase (GPX) und der bakteriellen Glutathionreduktase (GOR) wurde über Northern Blots nachgewiesen, wobei die Trennung der Kultivare und die Abtrennung der GPX-Dunkelproben nur optischer Natur ist. Die Dunkelproben der APX wurden auf einer getrennten Membran nachgewiesen, weswegen hier eine zusätzliche unbehandelte Lichtkontrolle aufgetragen wurde, um einen Vergleich zu ermöglichen.

Analog zur Induktion des PR1a unter Paraquatstress wurde auch bei Oxyfluorfenbehandlung eine verstärkte Transkription des PR1a nachgewiesen, wobei das mRNA-Niveau im Wildtyp etwas höher lag als in der transgenen Pflanze (Abbildung 20).

Des Weiteren wurde überprüft, ob die - durch Oxyfluorfen auf enzymatischer Ebene inhibierte - (plastidäre) Protoporphyrinogenoxidase eine kompensatorische Induktion erfährt.

Die PPOX besaß im Dunkeln eine geringere Expression als im Licht. Durch Oxyfluorfen wurde ihre mRNA nicht verstärkt induziert.

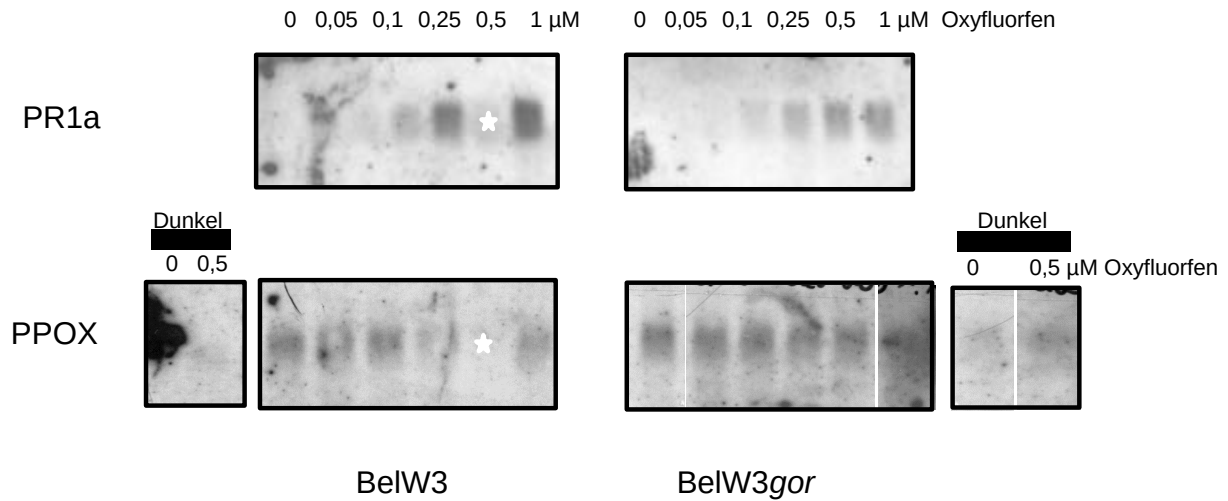


Abbildung 20: mRNA des Pathogenesis Related Protein 1a und der Protoporphyrinogenoxidase bei Behandlung von BelW3 und BelW3gor mit Oxyfluorfen.

Die mRNA-Gehalte des Pathogenesis Related Protein 1a (PR1a) und der Protoporphyrinogenoxidase (PPOX) wurden in zwei Monate alten Tabakpflanzen nach Oxyfluorfenbehandlung im Licht (Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 µM) bzw. im Dunkeln (Konzentrationen 0 und 0,5 µM) nachgewiesen. Die resultierenden Northern Blots wurden optisch in der Darstellung der Kultivare BelW3, BelW3gor und der jeweiligen Licht- und Dunkelbehandlungen getrennt.

Nach Oxyfluorfenbehandlung zeigte die plastidäre Isoform der SODs, die chlFeSOD, kaum eine Veränderung (Abbildung 21). Ein Hinweis auf die Regulation der chlFeSOD ergab sich aus dem Vergleich der Transkriptionsmenge von belichteten und dunkeladaptierten Pflanzen. Im Licht wurde die chlFeSOD stark induziert, im Dunkeln hingegen war das Genprodukt nicht nachweisbar.

Die mRNA der cytCuZnSOD wurde, wie aus Abbildung 21 ersichtlich, in den Tabaklinien in unterschiedlichem Maße gebildet. BelW3 besaß konstitutiv einen höheren Gehalt an cytCuZnSOD-mRNA, der nach Oxyfluorfenbehandlung kaum erhöht wurde. Demgegenüber war diese SOD-Isoform in BelW3gor in unbehandelten Kontrollpflanzen zwar in geringerer Menge vertreten, wurde aber durch Diphenylethergabe leicht induziert.

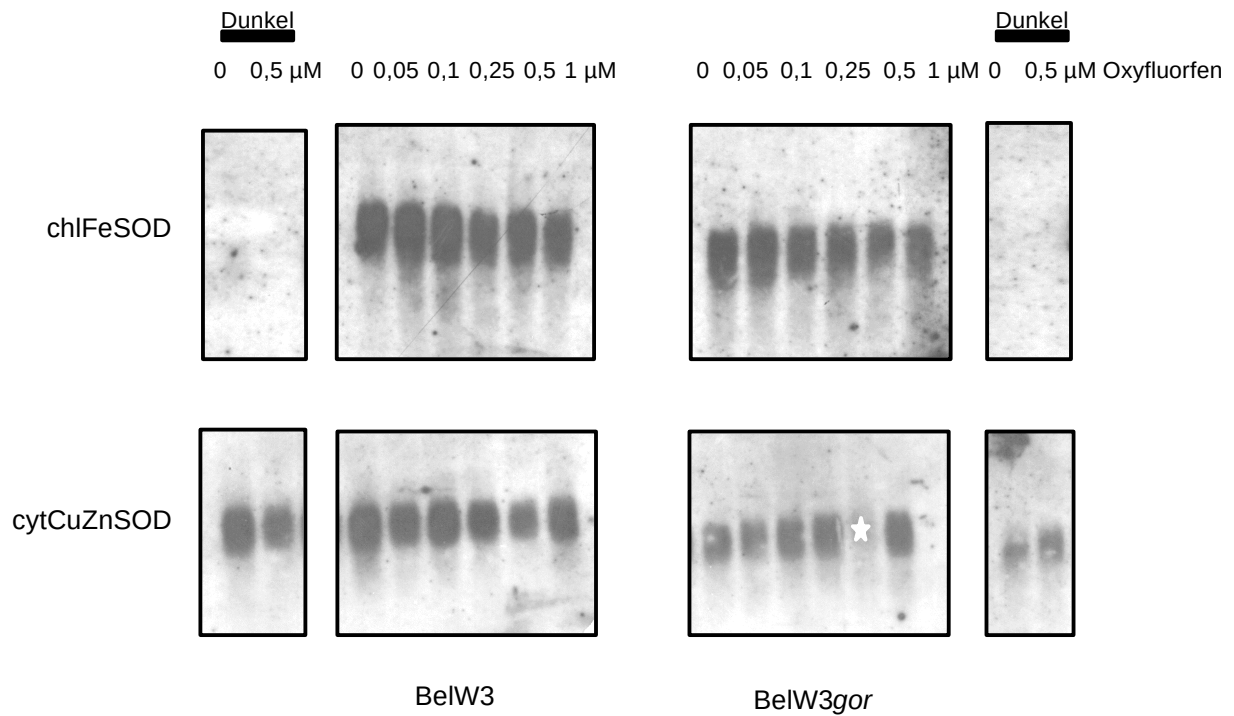


Abbildung 21: mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase und der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase nach Oxyfluorfenbehandlung von *BelW3* und *BelW3gor*.

Die Gesamt-RNA des Wildtypes *BelW3* und der Transformante *BelW3gor* wurde im selben Gel aufgetrennt, geblottet und die mRNA mit Sonden gegen die plastidäre Fe-Superoxiddismutase (*chlFeSOD*) und die cytosolische CuZn-Superoxiddismutase (*cytCuZnSOD*) detektiert. Als Proben dienten zwei Monate alte Tabakpflanzen, die für drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Oxyfluorfen (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 μM) im Licht oder im Dunkeln (0 und 1 μM) behandelt wurden. Zur besseren Übersicht wurden die auf einem Northern Blot entwickelten Transkriptmengen nach Kultivar und Inkubation separiert abgebildet.

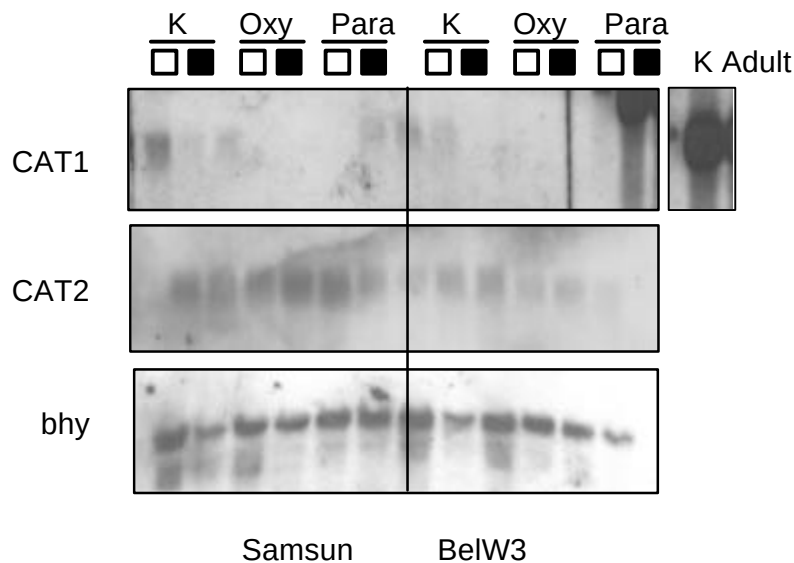


Abbildung 22: mRNA der Catalase1, der Catalase2 und der β -Carotinhydroxylase in Keimlingen von BelW3 und Samsun.

Keimlinge (14 Tage alt) wurden für 3 Tage mit 100 nM Oxyfluorfen (Oxy) oder 1 μ M Paraquat (Para) behandelt und die mRNA der Catalasen1 und 2 (CAT1 bzw. CAT2) und der β -Carotinhydroxylase (bhy) nachgewiesen. Auf der Membran der CAT1-Proben war als zusätzliche Probe die RNA zwei Monate alter, unbehandelter Pflanzen (K Adult) aufgetragen.

3.1.7 Induktion antioxidativer Schutzenzyme in verschiedenen Tabakvarietäten unter Schwach- und Starklicht

Durch die vergleichende Untersuchung verschiedener Tabaklinien kann auf die Balance des antioxidativen Systems rückgeschlossen werden. Hierzu wurden Tabakpflanzen der Kultivare BelW3, BelW3gor und Samsun (ein relativ pigmentreicher und ozontoleranter Biotyp) entweder unter moderaten ("Schwachlicht", ca. 100 μ E m⁻² s⁻¹) oder normalen Lichtbedingungen ("Starklicht", ca. 500 μ E m⁻² s⁻¹) angezogen (vgl. Abschnitt 3.1.1, S.32).

Der Gehalt an D1-Protein war in allen drei Kultivaren vergleichbar. Bei Schwachlichtanzucht wurde das D1-Protein gegenüber der Starklichtanzucht deutlich erhöht (Abbildung 23), ein Hinweis auf vermehrte Bildung von PSII Komplexen. Gegenläufig verändert war der Gehalt an cytosolischer APX. Die cytAPX-mRNA war im stärkeren Licht deutlich höher als im schwächeren Licht, und zwar in allen drei Tabaklinien in gleichem Maße. Der Effekt korrelierte mit der Enzymaktivität der cytAPX. Diese stieg bei höheren Lichtintensitäten ebenfalls an, allerdings im Kultivar BelW3gor weniger stark.

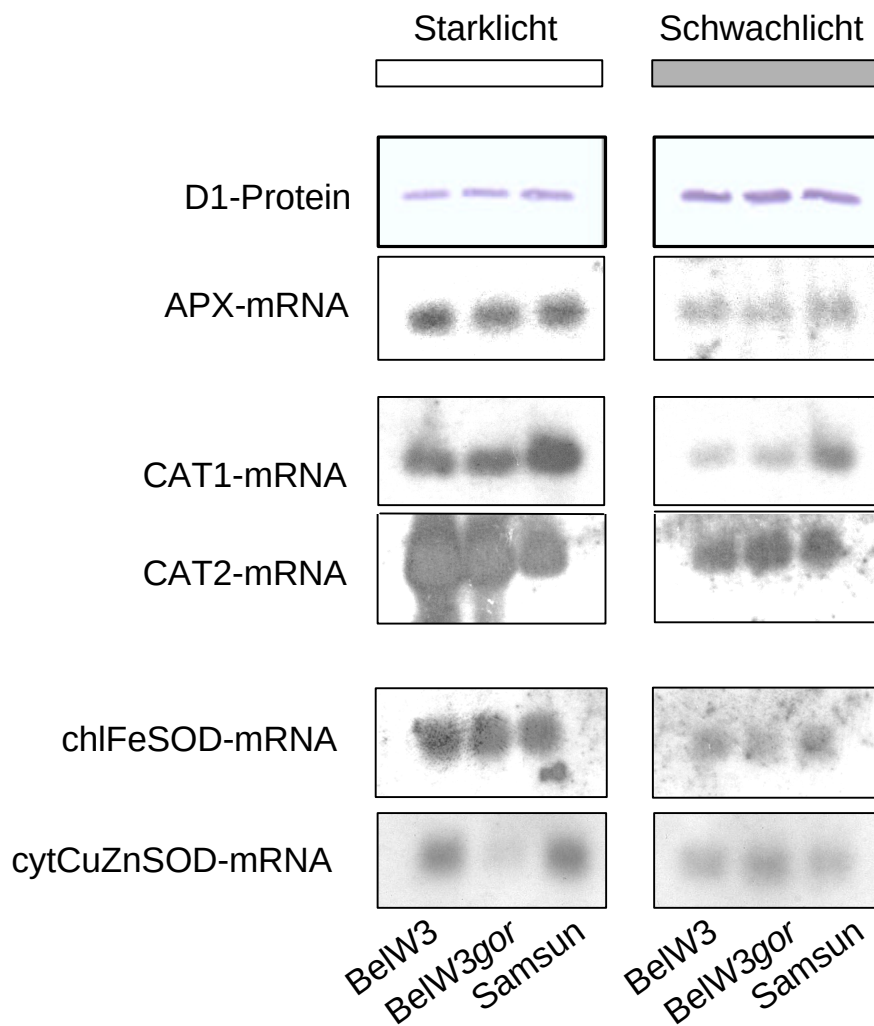


Abbildung 23: Vergleich des D1-Gehaltes und der Transkriptionsmenge antioxidativer Enzyme in BelW3, BelW3gor und Samsun unter Schwach- und Starklicht.

Zwei Monate alte Stecklinge der Takakkultivare BelW3, BelW3gor und Samsun wurden während der Anzucht unter Schwachlicht (ca. $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder Starklicht (ca. $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gehalten. Dargestellt sind die Proteinmenge des D1 und die mRNA der Ascorbatperoxidase (APX), der Catalase1 (CAT1), der Catalase2 (CAT2), der plastidären Fe-Superoxiddismutase (chlFeSOD) und der cytosolischen CuZn-Superoxiddismutase (cytCuZnSOD). Die Detektion des D1 durch Western Blot und der unterschiedlichen mRNAs durch Northern Blots wurde für die Stark- und Schwachlichtproben im jeweils selben Gel und auf derselben Membran durchgeführt, zur einfacheren Übersicht allerdings optisch getrennt dargestellt.

In allen drei Kultivaren war die mRNA der CAT1 im Schwachlicht gegenüber dem Starklicht proportional vermindert, was ihrer Funktion in der Photorespiration entspricht. Allerdings wurde in BelW3 und BelW3gor unter beiden Lichtbedingungen nur etwa die Hälfte der CAT1-mRNA-Menge von Samsun gebildet. Die CAT2-mRNA war im Schwachlicht in allen drei Kultivaren in vergleichbarer Menge nachweisbar. Im Starklicht wurde die CAT2-mRNA in BelW3 und BelW3gor verstärkt exprimiert. In Samsun hingegen fand keine Veränderung ihrer Expression im Vergleich zum Schwachlicht statt.

Ergänzend wurden die SOD-Aktivitäten im Nativgel untersucht. Im Schwachlicht war die SOD-Aktivität in den drei Kultivaren etwas geringer als im Starklicht. Bezüglich der mRNA-Menge an chlFeSOD war eine starke Abhängigkeit von der Lichtintensität feststellbar. Bei geringerem Lichtfluß wurde sie in geringerem Masse exprimiert, bei höherem Lichtfluß vermehrt. Hierbei war das Expressionsmuster in allen drei Kultivaren identisch. Eine Lichtabhängigkeit der Expression der cytCuZnSOD-mRNA war nur bei BelW3 und Samsun zu beobachten, bei BelW3gor wurde die cytCuZnSOD im Starklicht nicht verstärkt transkribiert.

3.2 VERHALTEN VON TABAK MIT ÜBEREXPRESSION DER GLUTATHION S-TRANSFERASE GST27 AUS MAIS UNTER OXIDATIVEM STRESS

3.2.1 Kanamycinresistenz

Die Glutathion S-Transferase GST27 aus *Zea mays* wurde, wie in Abschnitt 2.14 beschrieben, nach Entwicklung einer geeigneten Klonierungsstrategie mittels eines binären Vektors in BelW3 transformiert. Die resultierende Tabaklinie wurde BelW3gst27 genannt. Zur Überprüfung der Insertion der Genkassette in das pflanzliche Genom wurde die im binären Vektor übertragene Antibiotikaresistenz verwendet. Die Resistenz der Pflanzen gegen Kanamycin kann als molekularer Marker eingesetzt werden, da deren codierende Region nach dem zu übertragenen Fremdgen liegt. Sämlinge der transformierten Pflanze wurden hierzu auf Selektionsmedium mit Kanamycin angezogen und anhand ihres Phänotyps ausgezählt. Nach der hieraus berechneten Verteilung folgt die Vererbung den Mendelschen Gesetzen für einen normal dominanten Erbgang mit einmaliger Insertion des Genes (pro Rekombinationseinheit).

3.2.2 Verhalten unter oxidativem Stress

3.2.2.1 Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Oxyfluorfen

Die Auswirkung der GST27-Überexpression in BelW3 bei Oxyfluorfen-induziertem Stress wurde anhand dem Vergleich der Linien BelW3, BelW3gst27 und Samsun betrachtet.

Sieben Tage alte Tabakkeimlinge wurden für drei Tage 0,1 µM Oxyfluorfen unter Belichtung ausgesetzt. Der Chlorophyllgehalt wurde in BelW3 und BelW3gst27 (im Gegensatz zu Samsun) durch Oxyfluorfen leicht vermindert, war aber in den beiden Linien vergleichbar groß (Abbildung 24). Allerdings wurde die Chlorophyllbiosynthese bei Dunkelinkubation nicht

vollständig gehemmt, so daß bei der eingesetzten Oxyfluorfenkonzentration endogene Schutzmechanismen überwiegen könnten.

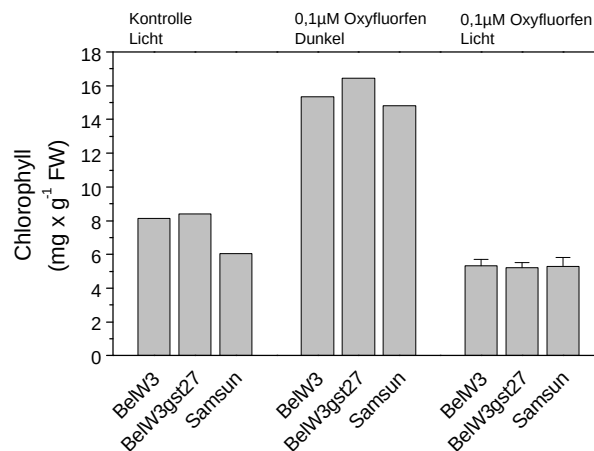


Abbildung 24: Veränderung des Chlorophyllgehaltes 7 Tage alter Keimlinge von BelW3, BelW3gst27 und Samsun nach Oxyfluorfenbehandlung.

Takakkeimlinge im Alter von 7 Tagen wurden für drei Tage mit 0,1 µM Oxyfluorfen behandelt und anschließend der Chlorophyllgehalt gemessen. Die Kontrollansätze ohne Oxyfluorfen im Licht und mit Oxyfluorfen im Dunkeln wurden nur in Einfachbestimmung mit 40 Keimlingen durchgeführt.

Im einem anderen experimentellen Ansatz mit jüngeren Keimlingen zeigte BelW3gst27 verglichen mit BelW3 eine gegenüber Oxyfluorfen verbesserte Resistenz. In der Transformante wurde nach Behandlung mit 0,1 µM Oxyfluorfen ein geringerer Chlorophyllverlust als im Wildtyp beobachtet (Abbildung 25).

Allerdings wurden in diesen Studien die Samen der heterozygoten F1 Generation verwendet, die aufgrund der Verteilung der Gene nach Mendel im GST27-Lokus aufspalten. Eine weitere Untersuchung zur Oxyfluorfenresistenz unter Verwendung von homozygoten Samen der F2 Generation und anderen Versuchsbedingungen ist für eine abgesicherte Aussage vonnöten.

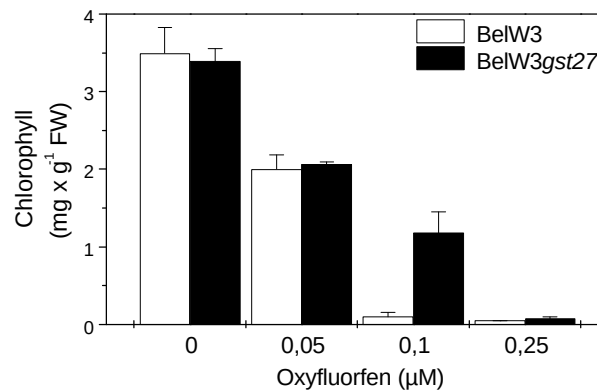


Abbildung 25: Veränderung des Chlorophyllgehaltes 4 Tage alter Keimlinge von BelW3 und BelW3gst27 nach Oxyfluorfenbehandlung.

Tabakkeimlinge im Alter von 4 Tagen wurden mit Oxyfluorfen (0, 0,05; 0,1, und 0,25 µM) behandelt und der Chlorophyllgehalt bestimmt.

3.2.2.2 Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Paraquat oder Wasserstoffperoxid

Analog zur Bestimmung physiologischer Stressparameter in den Tabaklinien BelW3 und BelW3gst27 (vgl. Abschnitt 3.1.1, S. 32ff.) wurden Blattstücke schwach- und starklichtangezogener Pflanzen von BelW3gst27 im Vergleich mit dem Ausgangsgenotyp untersucht. Die Blattstücke wurden zudem mit Paraquat und H₂O₂ behandelt, um das antioxidative Potential beider Linien vergleichen zu können.

Im Starklicht oder Schwachlicht angezogener, unbehandelter BelW3 unterschied sich hinsichtlich der Grundbelastung mit oxidativem Stress nicht signifikant von der transgenen Linie BelW3gst27. Chlorophyllgehalt, Ethan- und Ethylenemission, Leitfähigkeit und Wasserstoffperoxidbildung waren in den beiden Linien unter den zur Anzucht verwendeten Lichtbedingungen vergleichbar (Daten ohne Abbildung).

Der Vergleich von schwach- und starklichtadaptierten Pflanzen zeigte, dass unter identischen Inkubationsbedingungen die H₂O₂-Entgiftungskapazität in beiden Kultivaren bei Schwachlichtpflanzen nahezu doppelt so groß war wie bei Starklichtpflanzen. Die Lipidperoxidation durch H₂O₂, gemessen anhand der Ethanbildung, war in den Schwachlichtpflanzen deutlich höher als in den Starklichtpflanzen. Auch Ethylenbildung und Leitfähigkeitsanstieg waren in den schwachlichtadaptierten Pflanzen nach H₂O₂-Behandlung stärker.

Die durch Paraquat oder H₂O₂ hervorgerufene Schädigung war zumindest bei Starklichtanzucht in beiden Kultivaren ähnlich (Abbildung 26). Leitfähigkeit, Ethan- und Ethylen-

emission und Wasserstoffperoxidbildung stiegen in BelW3 und dem daraus abgeleiteten Transgen in vergleichbarem Maße an. BelW3gst27 allerdings zeigte deutlich weniger Chlorophyllverlust durch H₂O₂-Behandlung im Starklicht als BelW3.

Die Behandlung schwachlichtadaptierter Blattstücke mit Paraquat führte in der Transformante BelW3gst27 zu einer schwächeren Belastung durch oxidativen Stress als in BelW3. Im Transgen waren Ethylenemission, Ethanbildung, Chlorophyllverlust, Leitfähigkeitsveränderung und ins Medium abgegebene Menge an H₂O₂ geringer.

Bei Behandlung mit H₂O₂ war das Transgen in der Summe der gemessenen Parameter tendenziell weniger sensitiv als der Wildtyp. Allerdings war hier ein größerer Verlust an Chlorophyll zu verzeichnen, bei der höheren H₂O₂-Konzentration zudem eine größere Ethylenemission.

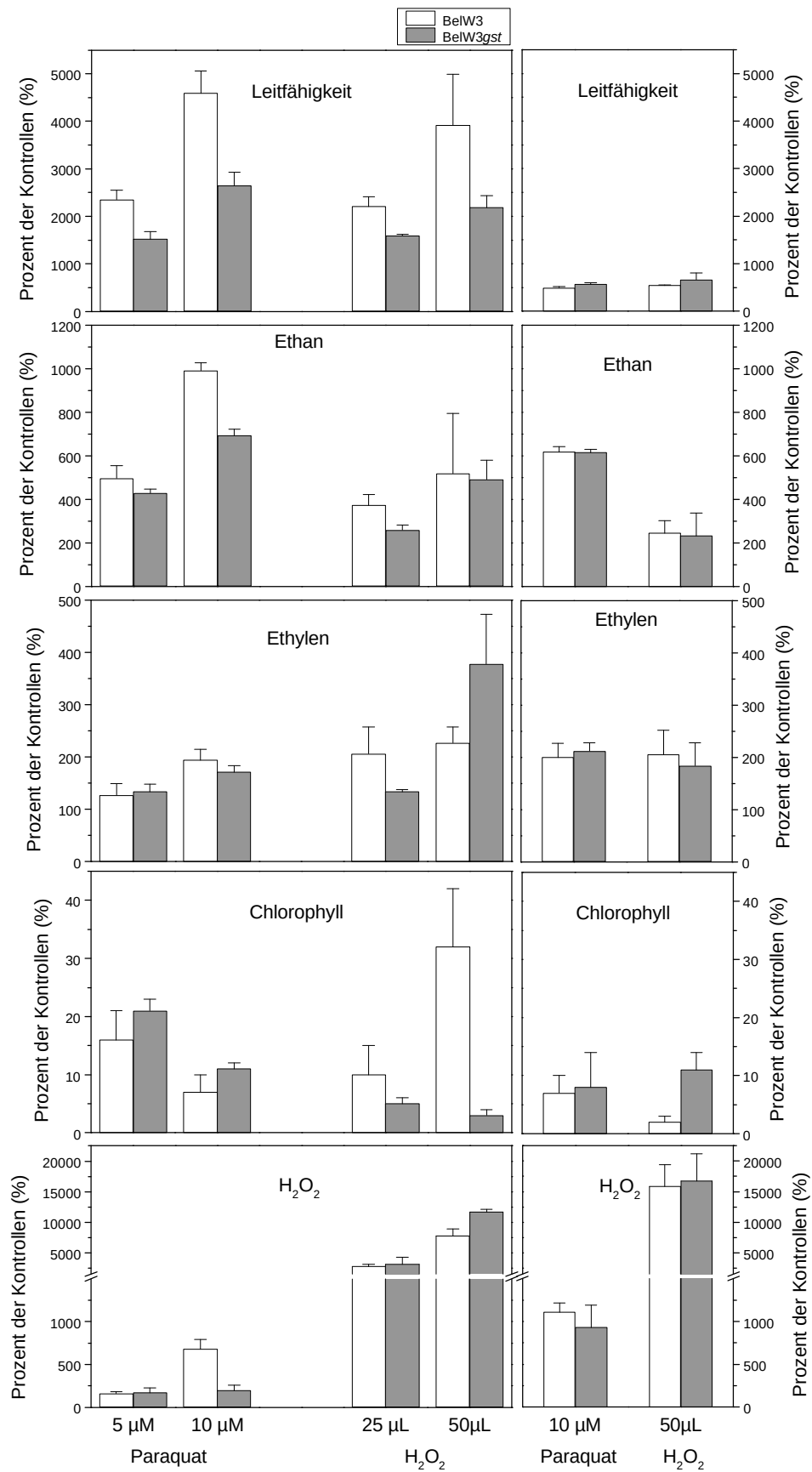
Folgende Seite:

Abbildung 26: Physiologische Parameter von BelW3 und BelW3gst27 unter oxidativem Stress bei Paraquat- oder H₂O₂-Behandlung.

Blattstücke von im Schwachlicht (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bzw. Starklicht (500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) angezogenen, zwei Monate alten Tabakstecklingen wurden mit Paraquat (5 μM bzw. 10 μM) oder H₂O₂ (50 μM bzw. 100 μM) für 24 h bei 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in einer Warburg-Apparatur behandelt. Im Anschluss wurde die Schädigung von BelW3 und der Primärtransformante BelW3gst27 anhand der Ethan- und Ethylenemission, der Leitfähigkeitsveränderung, dem Chlorophyllgesamtgehalt und dem H₂O₂ im Medium bestimmt. Die Parameter sind als prozentuale Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Kultivars angegeben.

Schwachlicht-Anzucht

Starklicht-Anzucht



3.2.2.3 Behandlung von BelW3 und BelW3gst27 mit Protoporphyrin IX

Durch Porphyrine hervorgerufener oxidativer Stress kann durch endogene Akkumulation des PPIX nach Oxyfluorfenbehandlung, aber auch durch exogene Applikation von PPIX hervorgerufen werden. Die peroxidierende Wirkung wird in beiden Fällen durch Lichtanregung des Tetrapyrrols vermittelt.

Im Chlorophyllgehalt 14 Tage alter Tabakkeimlinge von Samsun, BelW3 und BelW3gst27 war nach zehntägiger Inkubation mit PPIX im Dunkeln keine Abnahme zu verzeichnen. Bei Inkubation im Licht hingegen wurde der Chlorophyllgehalt der Kultivare BelW3 und Samsun stark vermindert. Die GST27 überexprimierende Linie BelW3gst27 zeigte eine verbesserte Resistenz gegenüber PPIX-Gabe, ihr Chlorophyllgehalt wurde im Licht nicht reduziert.

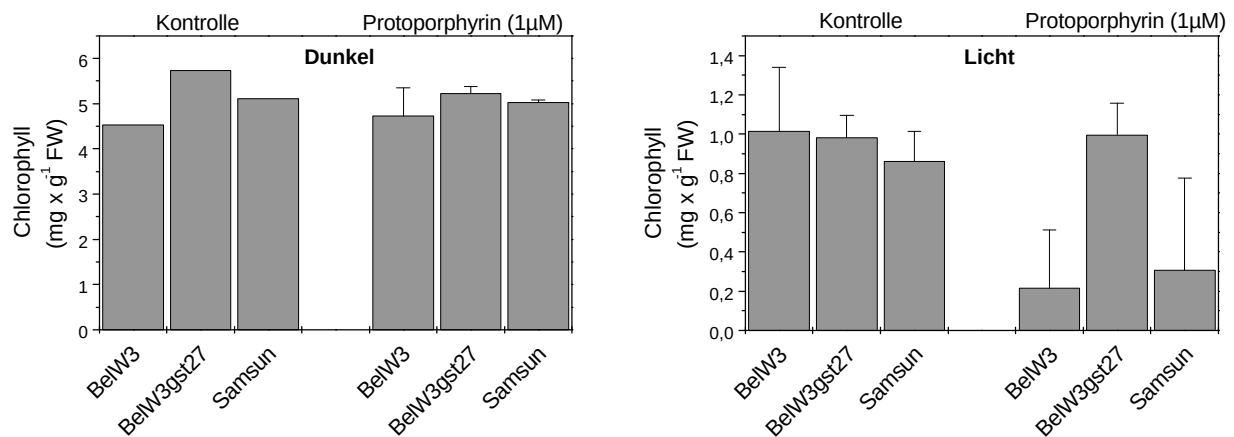


Abbildung 27: Vergleich des Chlorophyllgehaltes von BelW3, BelW3gst27 und Samsun nach Protoporphyrin-Behandlung im Licht oder im Dunkeln.

Zwei Wochen alte Tabakkeimlinge wurden zehn Tage lang mit 0,1 µM Protoporphyrin (PPIX) entweder im Dunkeln (linke Seite) oder im Licht (rechte Seite) behandelt, im Anschluß wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt. Der Kontrollansatz im Dunkeln wurde nur einmal vermessen.

3.3 CHARAKTERISIERUNG DER ROLLE VON GLUTATHION S-TRANSFERASEN IN MAIS

In Ergänzung zum molekularbiologischen Ansatz durch Überexpression einer GST in Tabak wurde parallel bzw. im Vorfeld die physiologische Rolle verschiedener GST-Isoformen in Mais untersucht. Hierbei sollte das Induktionsprofil der GSTs unter oxidativem Stress geklärt werden und eine Funktion der GSTs über die Xenobiotikaentgiftung hinaus validiert werden.

3.3.1 Induktion der Glutathion S-Transferasen

3.3.1.1 Induktion durch Safener

Um die physiologische Bedeutung und Regulation der GST-Isoformen zu beleuchten, wurde deren Expressionsniveau und die Induktion durch verschiedene Wirkstoffen auf mRNA- und Protein-Ebene betrachtet. Verwendung fanden Salicylsäure, Glutathion (reduziert und oxidiert) sowie Naphtylsäureanhydrid.

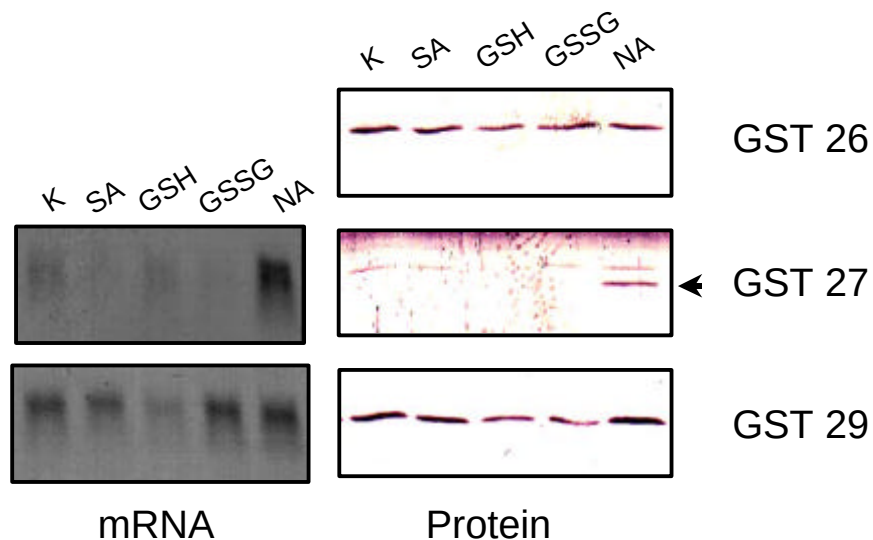


Abbildung 28: Veränderung der mRNA- und Proteinmenge der Glutathion S-Transferase Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 durch potentielle Induktoren in Maisblättern.

4 Tage alte Maispflanzen wurden über einen Zeitraum von drei Tage mit Salicylsäure (1 mM), reduziertem (GSH, 1 mM) bzw. oxidiertem (GSSG, 1 mM) Glutathion oder mit Naphtylsäureanhydrid (NA, 2,5 µM) behandelt. Die Transkriptmengen bzw. die Proteinexpression der GST-Isoformenuntereinheiten in Blättern wurde durch Northern bzw. Western Blots nachgewiesen.

GST26 wurde im Blattgewebe konstitutiv exprimiert und zeigte bei keiner der Behandlungsformen eine nennenswerte Veränderung im Proteingehalt (Abbildung 28). Die GST27-Untereinheit war in unbehandelten Blättern kaum nachweisbar, durch Behandlung mit dem Safener NA wurde sowohl ihre mRNA als auch das resultierende Protein sehr stark induziert. Die

GST29 wurde konstitutiv exprimiert, NA-Gabe bewirkte hier eine leichte Steigerung der Translation und Transkription.

3.3.1.2 Induktion durch Metazachlor

GSTs sind in der Lage, eine Vielzahl von Herbiziden durch Konjugation zu entgiften, wobei die einzelnen Isoformen oft eine Substratspezifität gegenüber phytotoxischen Substanzklassen besitzen. Deswegen wurde untersucht, ob die GST-Isoformen durch Herbizide differenziert induziert werden.

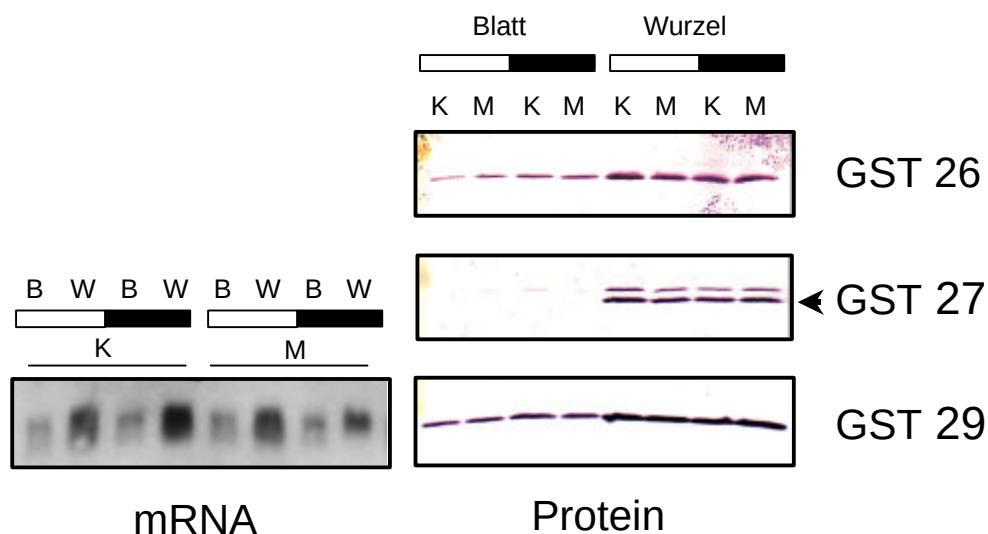


Abbildung 29: Einfluss von Metazachlor auf die mRNA- und Proteinmenge der Glutathion S-Transferase Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 in Blättern und in Wurzeln von Mais

Maispflanzen (4 Tage im Licht gewachsen) wurden drei Tage lang mit 100 μ M Metazachlor (M; unbehandelte Kontrolle: K) alternativ im Licht (weisse Balken) oder im Dunkeln (schwarze Balken) behandelt. In Wurzeln und in Blättern wurden mRNA- bzw. Proteinmenge der Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 durch Northern bzw. Western Blots bestimmt.

Maiskeimlinge, die mit Metazachlor in einer Konzentration von 100 μ M behandelt wurden, zeigten eine Wachstumseinbuße von ca. 20 % mit der für Chloracetamide charakteristischen Verkrümmung der Blattgewebe (ohne Abbildung). Durch Metazachlorbehandlung wurde keine der untersuchten GST-Untereinheiten induziert (Abbildung 29). Auch die GST27, welche die größte Enzymaktivität gegenüber Metazachlor besitzt (Sommer und Böger, 1999), zeigte keine veränderte Expression.

Der Vergleich von Wurzel- und Blattextrakten belegte eine unterschiedliche Expression in den Pflanzenorganen. Alle Isoformen wurden weitaus stärker in der Wurzel exprimiert als im Blatt. Am deutlichsten war dieser Effekt für die GST27-Untereinheit, deren Protein im Blatt kaum nachweisbar war, in der Wurzel hingegen konstitutiv exprimiert wurde.

Die Expression der GSTs könnte auch durch verminderte Verfügbarkeit von GSH verändert werden, zumal GSH zur Herbizidkonjugation benötigt wird. Deshalb wurden Ansätze mit Inkubation des Herbizides im Dunkeln angesetzt, da hier weniger GSH akkumuliert wird. Bei keiner der untersuchten GST-Isoformen wurde eine veränderte Expression nach dreitägiger Dunkeladaptation im Vergleich zur Lichtkontrolle festgestellt.

3.3.1.3 Induktion durch peroxidierende Herbizide: Veränderung der Glutathion S-Transferasen unter oxidativem Stress

GSTs sind in der Lage, organische Hydroperoxide und weitere durch oxidative Degradation entstandene Abbauprodukte, wie z. B. toxische Alkenale, zu entgiften. In Mais sind hierfür insbesondere Isoformen, die mindestens eine Untereinheit der GST27 (also GST27/27 und GST27/29) besitzen, verantwortlich (Sommer und Böger, 1999).

Durch die Verwendung von peroxidierenden (Oxyfluorfen) bzw. bleichenden (Paraquat) Herbiziden zur Initiation oxidativer Belastung sollte die Beteiligung der verschiedenen GST-Isoformen an der Stressabwehr beleuchtet werden. Allerdings muss hierbei unterschieden werden, ob eine Reaktion der GSTs ursächlich aufgrund der Herbizidentgiftung oder aufgrund der oxidativen Belastung hervorgerufen wird. Da die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei Behandlung mit Oxyfluorfen oder Paraquat ein (primär) lichtabhängiger Prozess ist, wurden in Parallelansätzen Behandlungen im Dunkeln vorgenommen. Somit war es möglich, die Rolle der GSTs unter oxidativem Stress und in der Herbizidentgiftung (Lichtinkubation) der Beteiligung an der "reinen" Herbizidentgiftung (Dunkelinkubation) gegenüberzustellen.

Paraquat wurde über die Wurzel appliziert und die Auswirkung auf die GSTs in Blatt und Wurzel untersucht (Abbildung 30). Der immunologische Nachweis der Proteine ergab im Falle der GST29 und GST26 (Daten zu dieser Isoform ohne Abbildung) keinerlei Veränderung in der Expression. Die Isoform GST27 hingegen wurde bei Paraquatbehandlung im belichteten Blatt konzentrationsabhängig vermehrt gebildet. In dunkelinkubierten Blättern trat keine vergleichbare Induktion der GST27 auf, nur bei der höchsten Paraquatkonzentration war ein leichter Anstieg der Proteinmenge zu verzeichnen. Die Proteinmenge der GST27 in der Wurzel blieb sowohl im Licht als auch im Dunkeln unverändert auf verglichen mit den Blattextrakten konstitutiv hohem Expressionsniveau.

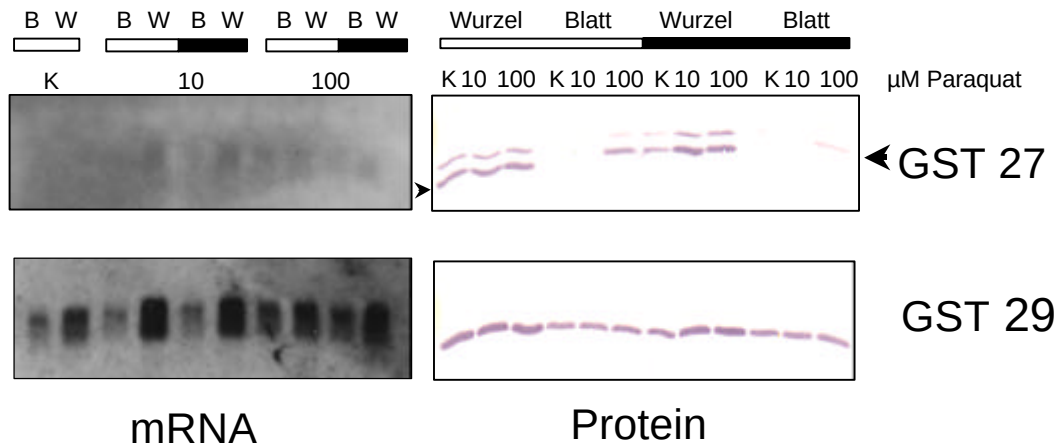


Abbildung 30: Einfluss des Paraquats auf die Transkription und Expression der GST27- und GST29-Untereinheit in Blättern von Mais bei Dunkel- oder Lichtbehandlung.

Vier Tage im Licht gewachsene Maispflanzen wurden für weitere drei Tage entweder im Licht oder im Dunkeln mit Paraquat (0, 10 und 100 μM) behandelt und die mRNA- bzw. Proteinmenge der Untereinheiten GST27 und GST29 in Blättern (B) und Wurzeln (W) bestimmt.

Ergänzend zur Behandlung mit Paraquat, das primär die plastidäre lichtabhängige Entstehung von ROS zur Folge hat, wurden Maispflanzen auch mit Oxyfluorfen oder Chlorophthalim behandelt, wobei der phytotoxische Effekt primär auf der Bildung von ROS im Cytosol bei Belichtung beruht.

Bei Behandlung mit dem zyklischen Imid Chlorophthalim wurde die Expression der GST-Isoformen nicht verändert (Daten ohne Abbildung). Dies lag möglicherweise an zu geringer eingesetzter Konzentration (1 μM), zumal Chlorophthalim, verglichen mit Oxyfluorfen, eine deutlich schwächere Hemmung der PPOX hervorruft (Böger und Miller, 1994).

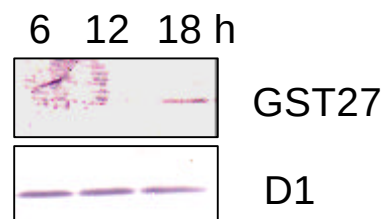


Abbildung 31: Kinetik der Oxyfluorfen-induzierten GST27-Induktion bei in belichteten Maisblättern.

Maispflanzen (4 Tage im Licht gewachsen) wurden für 6, 12 und 18 h mit 500 nM Oxyfluorfen behandelt und die Proteinmengen der GST27 und des D1 in den Blättern bestimmt.

Oxyfluorfen hingegen führte zu einer vermehrten Bildung des GST27-Proteins. Im Licht wurde die Expression der GST27 innerhalb von 18 h induziert (Abbildung 31).

Die Untereinheiten GST26 und GST29 zeigten keine Veränderung der Proteinmenge bei Oxyfluorfenbehandlung (Daten ohne Abbildung und Abbildung 32).

Um auszuschließen, dass die beobachtete Induktion nach Behandlung mit Oxyfluorfen auf die GST-katalysierte Detoxifikation des Agens selbst zurückzuführen ist, wurde auch hier eine Inkubationsserie im Dunkeln durchgeführt. Die GST27 wurde im Dunkeln nur bei der höchsten Konzentration an Oxyfluorfen marginal induziert.

Die verstärkte Expression der GST27-Untereinheit resultierte in einer vermehrten Bildung von Homodimeren. Sie führte nicht zur verstärkten Dimerisierung der Untereinheiten GST27 und GST29 (Heterodimerisierung auf Kosten des Homodimers aus zwei GST29 Untereinheiten), wie die immunologische Detektion der Isoformenverteilung im Nativgel ergab (Daten nicht gezeigt.).

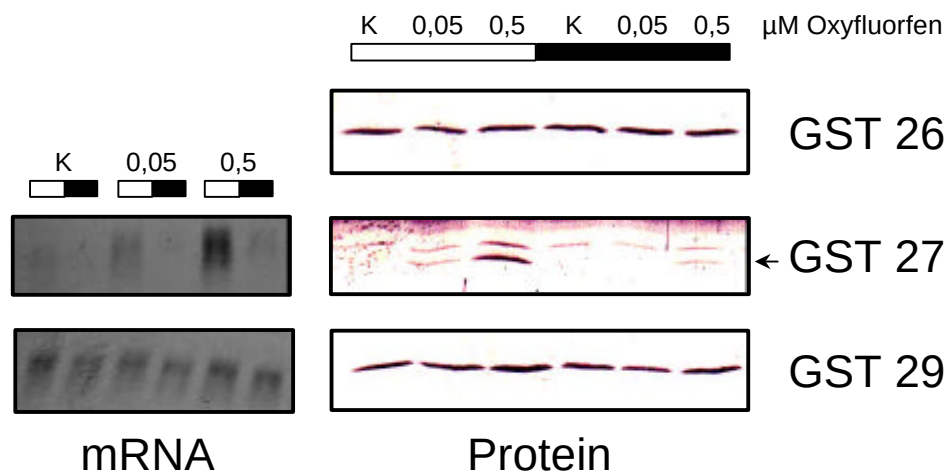


Abbildung 32: Veränderungen der Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 durch Behandlung mit Oxyfluorfen im Licht oder im Dunkeln.

Maispflanzen (4 Tage im Licht gewachsen) wurden für weitere drei Tage entweder im Licht oder im Dunkeln mit Oxyfluorfen (0, 50 und 500 nM) behandelt. Die mRNA- bzw. Proteinmenge der Untereinheiten GST26, GST27 und GST29 wurde aus Blättern bestimmt.

3.3.1.4 Aktivität der Glutathion S-Transferasen in ergrünem und etioliertem Mais bei Oxyfluorfenbehandlung

Die Untersuchungen zur Expression der einzelnen GST-Isoformen wurden durch Bestimmung der Gesamtzymaktivität der GSTs ergänzt. Im experimentellen Ansatz sollte geklärt werden, inwiefern sich das unterschiedliche Expressionsniveau der GSTs in Wurzel und Blatt in der Enzymaktivität widerspiegelt. Des Weiteren wurde die kurzfristige Veränderung der Enzymaktivität nach Vorinkubation mit Oxyfluorfen im Dunkeln bei anschließender Belichtung gemessen. Etioliertes Blattgewebe, wie z. B. Chicoree, besitzt relativ hohe GST-Aktivitäten, weswegen ein Vergleich von etioliert angezogenem und ergrünem Mais angestellt wurde. Hierbei wurden die etiolierten und ergrünten Parallelansätze drei Tage im Dunkeln gehalten, und daraufhin einer Belichtung ausgesetzt.

Das unterschiedliche Expressionsniveau der GST-Isoformen im Blatt und in der Wurzel spiegelte sich in der Gesamtzymaktivität der GSTs in den verschiedenen Organen der Maispflanzen wieder.

Die Aktivität der GSTs in Wurzeln war in etwa fünfmal höher als die Aktivität in ergrüntem Blättern (Tabelle 2). Bei Anzucht im Dunkel oder im Licht war die Enzymaktivität der Wurzel in etwa gleich groß. Demgegenüber zeigten die Blätter bei den verschiedenen Anzuchtbedingungen (ergrünt oder etioliert) einen drastischen Unterschied in der GST-Enzymaktivität. In etiolierten Mais-Blättern war die GST-Gesamtaktivität in etwa doppelt so groß wie in grünen Blättern. Durch Belichtung der etiolierten Pflanzen sank die GST-Aktivität zwischen 6 und 24 h nach Beginn der Ergrünung langsam und lag nach 24 h im Bereich der Aktivität grüner Blätter.

Bei Vorinkubation mit Oxyfluorfen und anschließender Belichtung wurde die Gesamtaktivität der GSTs innerhalb der ersten 6 h nicht verändert, erst nach 24 h trat eine leichte Erhöhung auf.

Generell muss bei der Bestimmung der Enzymaktivität aber in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Isoformen sehr unterschiedliche spezifische Aktivitäten gegenüber dem verwendeten Modellsubstrat CDNB besitzen (vgl. Abbildung 37, S. 74), weswegen Veränderungen auf enzymatischer Ebene mitunter durch geringen Substratumsatz kaschiert werden.

Tabelle 2: Vergleich der Glutathion S-Transferase-Gesamtaktivität aus Blättern und Wurzeln etiolierter oder grüner Maispflanzen mit und ohne Oxyfluorfenbehandlung.

Mais wurde unsteril für 4 Tage entweder im Licht ("grün") oder im Dunkeln ("etioliert") angezogen. Die Ansätze wurde daraufhin drei weitere Tage unbehandelt oder mit Oxyfluorfen (500nM) im Dunkeln gehalten und nach diesen insgesamt sieben Tagen ins Licht gestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Blatt und Wurzel getrennt extrahiert. Da in einigen Fällen keine Mehrfachbestimmung durchgeführt werden konnte, wurde auf die Angabe der Standardabweichung generell verzichtet.

	Blatt		Wurzel	
	Etioliert	Grün	Etioliert	Grün
Kontrolle				
0 h	319	168	1188	1094
30 min	235	157	1321	952
1 h	320	165	703	1302
2 h	363	168	1285	1347
4 h	380	182	944	860
6 h	357	206	1221	871
24 h	192	162	1601	1188
Oxyfluorfen				
0 h	305	129	1059	1078
30 min	341	164	1016	915
1 h	367	151	885	1277
2 h	431	225	971	1868
4 h	314	175	1254	1006
6 h	362	218	1337	1081
24 h	236	167	1080	2499

Tabelle 3: Vergleich des Chlorophyll- und Protoporphyringehaltes in Blättern etiolierter oder grüner Maispflanzen mit und ohne Oxyfluorfenbehandlung.

Die Anzucht und Behandlung der Maispflanzen erfolgte wie in Tabelle 2, S. 67 angegeben.

Blatt	Etioliert		Grün
	Chlorophyll mg/g FW	PPIX nmol/g FW	PPIX nmol/g FW
Kontrolle	4	6,9	2,1
0 h	3	3,8	1,2
30 min	14	4,1	1,4
1 h	10	5,0	4,2
2 h	24	8,5	4,0
4 h	35	7,9	4,5
6 h	55	8,8	2,9
24 h	175	3,6	2,6
Oxyfluorfen	3	7,6	2,9
0 h	4	6,4	3,8
30 min	6	4,8	3,5
1 h	13	8,8	
2 h	29	9,6	3,6
4 h	35	11,2	3,5
6 h	63	9,9	4,7
24 h	187	5,7	

3.3.1.5 Schädigung von Mais unter oxidativem Stress

Die Isoformen der GSTs können, wie in Abbildung 28 gezeigt, exogen durch NA induziert werden. Die Behandlung mit diesem als Antidot gegen Herbizide wirkenden Safener erlaubt es, die Wirkung erhöhter GST-Aktivität auf den Schutz vor oxidativem Stress zu untersuchen.

Um auszuschließen, dass der Schutz bei Safener-Gabe auf der Entgiftung des Herbizides beruht, wurde die phytotoxische Wirkung des Oxyfluorfens durch PPIX oder Erhöhung des endogenen PPIX durch die Vorstufe Aminolaevulinat (ALA) imitiert. Das Schadensausmaß wurde anhand der durch Membranzerstörung veränderten Leitfähigkeit bestimmt. In Kontrollansätzen wurde die peroxidierende Wirkung des PPIX vermindert, indem das Licht durch eine Schicht aus PPIX-Lösung gefiltert wurde. Hierdurch werden durch Absorption nur diejenigen Wellenlängen eliminiert, die ursächlich für eine lichtvermittelte Radikalbildung des PPIX und damit den toxischen Effekt sind, ohne dass – wie bei Dunkelinkubation – die Tetrapyrrolsynthese vermindert wird.

In allen Ansätzen wurde die Leitfähigkeit stark reduziert, wenn das einfallende Licht durch eine Schicht aus PPIX-Lösung gefiltert wurde (Tabelle 4). Die Inkubation in PPIX-haltigem Medium bewirkte bei unbehandelten Blattstücken einen starken Anstieg der Leitfähigkeit um nahezu das Doppelte, die Leitfähigkeit bei Safener-behandelten Blattstücken wurde hingegen kaum verändert. Nach Herausfiltern der phytotoxischen Wellenlängen mittels der PPIX-Schicht trat in beiden Ansätzen ein vergleichbarer, geringerer Anstieg der Leitfähigkeit auf. Ein analoger Schutz durch Safener wurde auch bei ALA-vorinkubierten Blattstücken vermittelt. Somit beruht die schützende Wirkung der Safener nicht auf der Oxyfluorfenentgiftung, sondern auf direkter oder indirekter Verminderung der PPIX-Toxizität.

Tabelle 4: Leitfähigkeitsveränderung von unbehandeltem oder durch Naphtylsäureanhydrid gesafetem Mais bei Protoporphyrin-vermitteltem Photostress.

Mais wurde unsteril für 7 Tage mit und ohne NA-Zugabe (2,5 μM) im Licht angezogen. Etwa 1 cm lange Blattabschnitte wurden mit und ohne PPIX (1 μM) im Licht inkubiert und nach 24 h die Leitfähigkeitsveränderung bestimmt. In Parallelansätzen wurde das einfallende Licht durch eine 1 cm dicke 1 μM PPIX-Lösung gefiltert. Die Werte sind als Prozent der ungefilterten Kontrollen angegeben.

	Unbehandelt	NA-Behandelt
Kontrolle	100 $\pm$ 48	100 $\pm$ 22
Kontrolle gefiltert	42 $\pm$ 9	46 $\pm$ 23
PPIX	182 $\pm$ 18	105 $\pm$ 22
PPIX gefiltert	72 $\pm$ 25	53 $\pm$ 16
ALA	134 $\pm$ 7	94 $\pm$ 16
ALA gefiltert	28 $\pm$ 10	49 $\pm$ 6

3.3.2 Interaktion der Glutathion S-Transferasen mit Tetrapyrrolen

3.3.2.1 Enzymatische Umsetzung von Protoporphyrin durch Glutathion S-Transferasen

Die beobachteten Effekte legten nahe, dass zwischen GSTs und Protoporphyrin IX eine Interaktion stattfindet. Ein möglicher enzymatischer Umsatz durch GSTs kann sich in der Glutathionisierung von PPIX oder in der Degradation von PPIX äußern. Um diese Möglichkeiten zu testen, wurde auf rekombinant gewonnene Reinformen der Mais-GSTs zurückgegriffen (Einzelheiten zur Überexpression der GSTs in *E. coli* und zur Aufreinigung bei Sommer und Böger, 1999).

Zum Test auf Bildung von GSH-Konjugaten wurden rekombinante Proteine der GST26/26, GST27/27, GST27/29 und GST29/29 mit PPIX inkubiert. Spektroskopische Enzymtests (modifiziert nach Drotar et al., 1985) mit den Reinformen der GSTs gaben keinen Hinweis auf eine Veränderung des Absorptionsspektrums des PPIX oder des GSH. Ebenfalls negativ verliefen analoge Messungen bei Ermittlung des Fluoreszenzspektrums (alle Ergebnisse ohne Abbildung).

Zudem wurde geprüft, ob ein Abbau des PPIX durch GSTs stattfinden kann. GST-Reinenzyme wurden nach der Methode von Dayan et al. (1999) mit PPIX und GSH inkubiert und im Enzymtest vermessen. Ergänzend wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben über Säulenchromatographie analysiert (Abbildung 33). Die HPLC-Auftrennung wurde hierbei mit zwei unterschiedlichen Trennsystemen durchgeführt; nach der Methode von Dayan et al. (1999) und nach der Methode von Mock et al. (1998; Ergebnisse hierzu ohne Abbildung). Die Retentionszeiten des PPIX und des GSH erfuhren unter keiner der gewählten Bedingungen eine Veränderung. Hieraus ist zu folgern, dass die untersuchten GSTs weder in der Lage sind, PPIX zu degradieren noch mit GSH zu konjugieren.

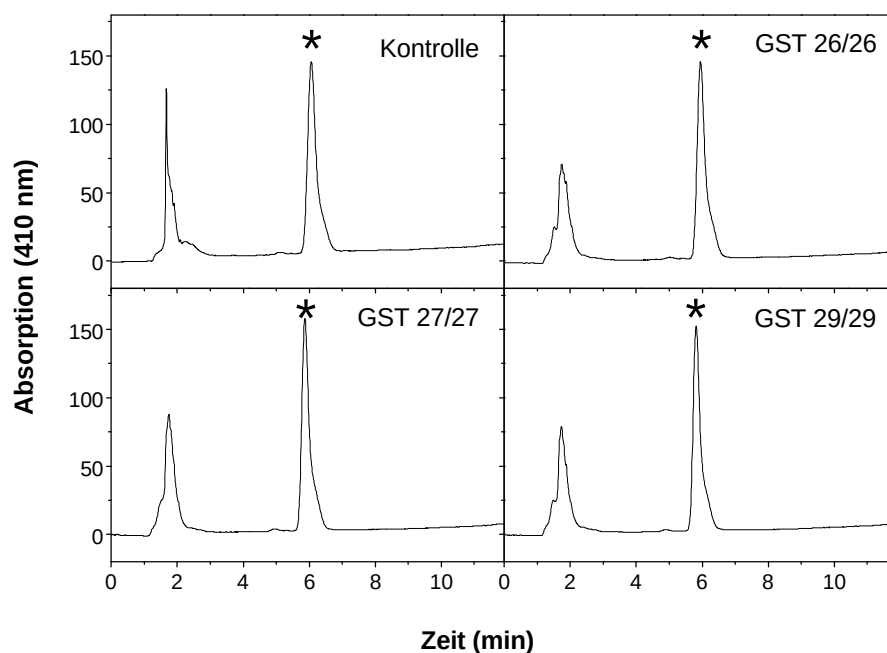


**Abbildung 33: Chromatogramm des Protoporphyrin IX und möglicher Glutathionkonjugate bzw. Abbau-
produkte nach Inkubation mit Glutathion S-Transferasen.**

Chromatographische Auftrennung des Protoporphyrin (PPIX, mit einem Stern gekennzeichnet) nach 24stündiger Inkubation mit GSH und den GST-Isoformen GST26/26, GST27/27 und GST29/29 (Methode nach Dayan et. al, 1999).

3.3.2.2 Bindung von Porphyrinen an Glutathion S-Transferasen

Eine Interaktion zwischen Proteinen und Molekülen muss nicht zwingend den chemischen Umsatz des Moleküls zur Folge haben, sondern kann auch eine mehr oder weniger feste Bindung des Moleküls an das Protein bewirken.

PPIX kann mittels seiner Fluoreszenz unter UV-Licht direkt detektiert werden, ohne dass eine Derivatisierung oder radioaktive Markierung notwendig ist. Diese Eigenschaft – welche auch andere Tetrapyrrole besitzen – erlaubt es, eine Bindung des PPIX an Proteine nach nicht-denaturierender Gelelektrophorese zu lokalisieren. Im selben Gel können daraufhin die Proteine durch Anfärbung lokalisiert werden. Hiermit kann eine Bindung der Tetrapyrrole an Proteine nachgewiesen werden, sofern sie stärker ist als die Auftrennung durch das elektrische Feld.

Nach kurzer Vorinkubation mit PPIX wurden die verschiedenen Reinformen der GSTs nativer Gelelektrophorese unterworfen. Wie aus Abbildung 34 (markiert durch einen Pfeil) ersichtlich, wanderte PPIX selbst im elektrischen Feld nur wenig. Bei Vorinkubation mit GSTs co-migrierte PPIX mit den Transferasen gemäß deren Größe und Eigenladung. Ergänzend wurden GSTs nach PPIX-Vorinkubation denaturiert im SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Eine kovalente Bindung von PPIX an GSTs würde hierin ebenfalls eine Fluoreszenzmarkierung des Proteins durch PPIX zur Folge haben. Unter denaturierenden Bedingungen konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Daten ohne Abbildung).

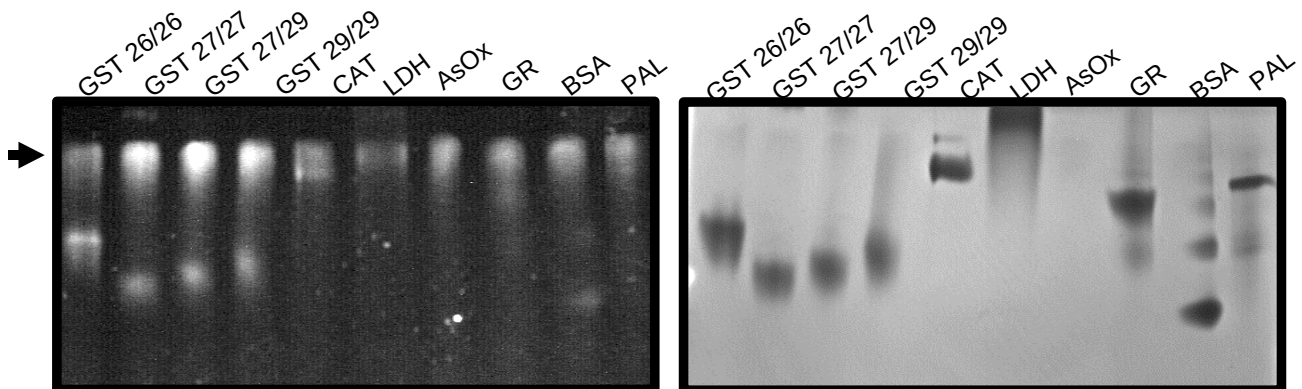


Abbildung 34: Native Gelelektrophorese verschiedener Proteine nach Protoporphyrin-Vorinkubation.

Reinenzyme der GST-Isoformen (GST26/26, GST27/27, GST27/29 und GST29/29), der Catalase (CAT), der Laktatdehydrogenase (LDH), der Ascorbattoxidsae (AsOx), der Glutathionreduktase (GR), des bovinen Serumalbumins (BSA) und der Phenylalaninlyase (PAL) wurde mit Protoporphyrin (PPIX) vorinkubiert und nichtdenaturierender Gelelektrophorese unterworfen. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Fluoreszenz des PPIX nach Anregung bei 256 nm (der Pfeil indiziert ungebundenes PPIX); die rechte Seite die Färbung der Proteine durch Coomassie Blau (AsOX wanderte nicht im Gel).

Um auszuschließen, dass die Bindung unspezifischer Natur ist, wurden weitere Reinproteine zum Vergleich aufgetragen (Abbildung 34). Als Positiv-Kontrolle diente hierbei bovines Serumalbumin (BSA), das in der Lage ist, PPIX spezifisch zu binden (Lamola et al., 1981). Allein BSA war – neben den GSTs – in der Lage, PPIX zu binden.

Weitere Tetrapyrrole wurden in analogem Vorgehen getestet, um festzustellen, ob dem PPIX sterisch ähnliche Moleküle ebenfalls in der Lage sind, an GSTs zu binden (Abbildung 35). Eingesetzt wurden Mesoporphyrin (MesoPP), Coproporphyrin (CoproPP), Uroporphyrin (UroPP) und Mg-Protoporphyrin (Mg-PP). Da die Fluoreszenzmaxima der verwendeten Porphyrine z. T. recht beträchtlich von der Anregungswellenlänge (256 nm) auf der Lichtbank abweichen, variierte die Fluoreszenzintensität trotz gleicher eingesetzter Mengen. Bei allen untersuchten Porphyrinen wurde eine Bindung an native GST Isoformen gefunden.

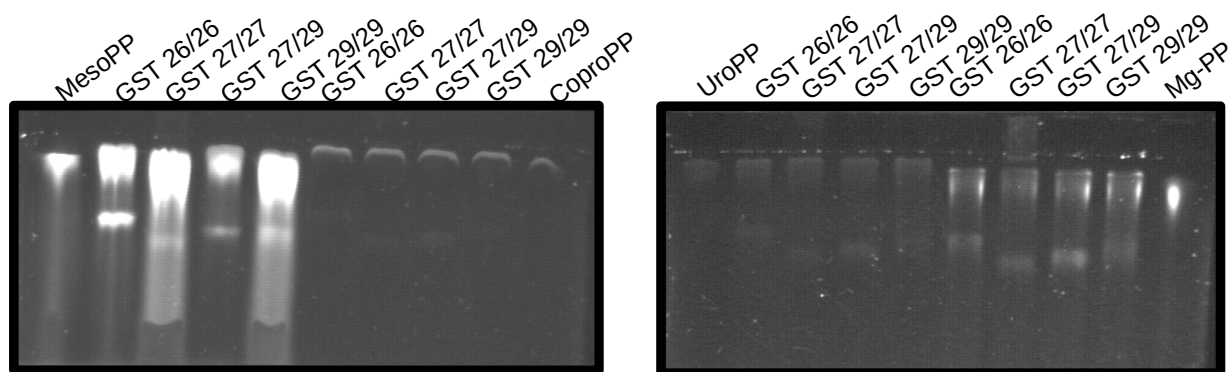


Abbildung 35: Native Gelelektrophorese der Glutathion S-Transferase-Isoformen nach Inkubation mit Mesoporphyrin, Coproporphyrin, Uroporphyrin oder Mg-Protoporphyrin.

Die GST-Isoformen (GST26/26, GST27/27, GST27/29 und GST29/29) wurden mit Mesoporphyrin (MesoPP; linkes Gel außen), Coproporphyrin (CoproPP; linkes Gel innen), Uroporphyrin (UroPP; rechtes Gel innen) und Mg-Protoporphyrin (MgPP; rechtes Gel außen) vorinkubiert und durch Gelelektrophorese unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Es wurde in allen Fällen die gleiche Menge an Porphyrin eingesetzt und zur Kontrolle jeweils eine Spur mit den Porphyrinen ohne Proteinvorinkubation beladen.

3.3.2.3 Hemmung der Glutathion S-Transferase - Aktivität durch Porphyrine

Je nach Bindungsort der Tetrapyrrole kann eine Veränderung der aktiven Zentren der GSTs auftreten, sei es durch Konformationsänderung oder durch kompetitive Blockade der Substrataschen. Anhand der GST-Enzymaktivität gegenüber den Testsubstraten CDNB und GSH wurde eine mögliche Modifikation der Enzyme durch die Bindung von verschiedenen substituierten Porphyrinderivaten geprüft.

Wie aus Abbildung 36 ersichtlich, wurde die Aktivität der GST29/29, gemessen als CDNB-Glutathionisierung, bei Zugabe von 50 μM PPIX vollständig, und mit weniger als 10 μM halbmaximal gehemmt. Mesoporphyrin, ein chemisch ähnliches Tetrapyrrol, hemmte hingegen die Aktivität der GST29/29 bei einer Konzentration von 50 μM nicht vollständig, die halbmaximale Hemmung lag im Bereich von 10 – 25 μM MesoPP. Diphenylether wie Oxyfluorfen besitzen eine räumliche Struktur, die der Hälfte eines Tetrapyrrolringes ähnelt (Nandihalli et al., 1992). Oxyfluorfen hemmte die GST29/29, wenngleich auch in einem höheren Konzentrationsbereich als die Tetrapyrrole, mit einer geschätzten halbmaximalen Hemmung bei mindestens 50 μM Oxyfluorfen.

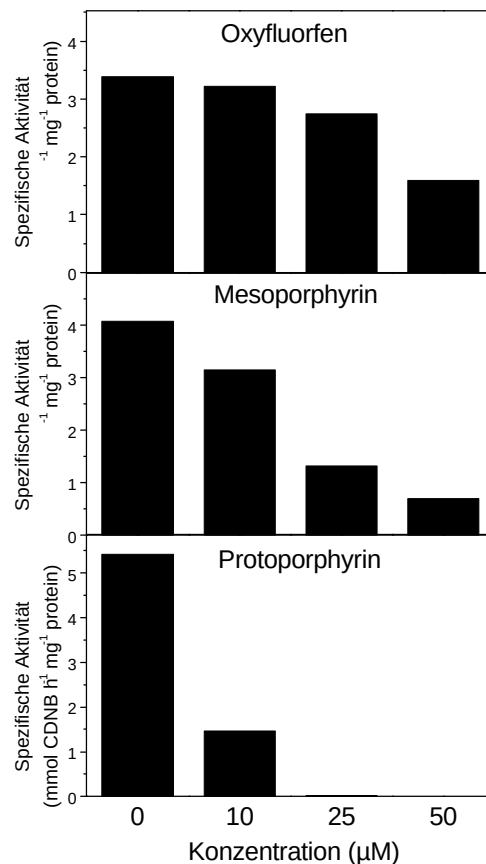


Abbildung 36: Hemmung der GST29/29 durch Tetrapyrrole und Diphenylether.

Die Aktivitätsverminderung der GST29/29 bezüglich der Konjugation von CDNB mit GSH wurde nach kurzer Vorinkubation mit Oxyfluorfen (oben), Mesoporphyrin (Mitte) oder Protoporphyrin (unten) in den Konzentrationen 0, 10, 25 und 50 μM bestimmt. Die Daten basieren jeweils auf Doppelbestimmungen und sind deswegen ohne Standardabweichung dargestellt.

Für PPIX wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der verschiedenen GST-Isoformen bestimmt. Der K_i für GST29/29 liegt im Bereich von 1 bis 5 μM PPIX. Für die GST26/26 wurde ein K_i zwischen 5 und 10 μM bestimmt, für die Isoform GST27/27 ein K_i zwischen 10 und 25 μM .

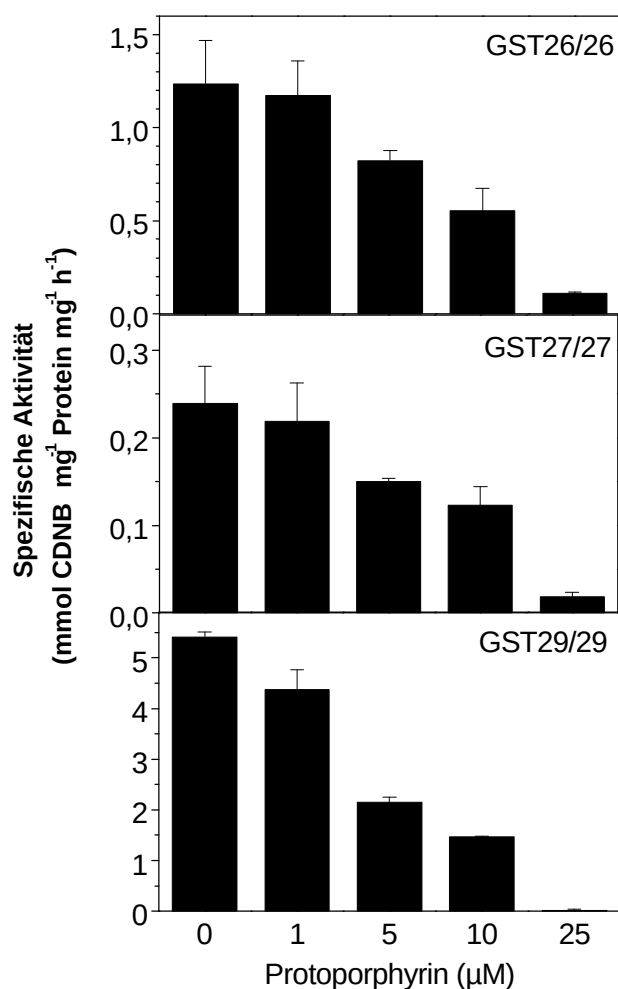


Abbildung 37: Hemmung der Aktivität verschiedener Glutathion S-Transferase-Isoformen durch Protoporphyrin.

Die konzentrationsabhängige Verminderung der GST26/26-, GST27/27- und GST29/29-Aktivität wurde nach kurzer Vorinkubation mit Protoporphyrin (0, 1, 5, 10 und 25 μM) anhand des Umsatzes von CDNB und GSH bestimmt.

Um zu klären, ob die Hemmung der GSTs einzig durch PPIX oder ob die Hemmung generell durch Porphyrin-ähnliche Strukturen bewirkt werden kann, wurden weitere Porphyrine getestet. Mit PPIX (25 μM) wurden die einzelnen GSTs um 91 bis 99 % gehemmt. Mesoporphyrin (25 μM) besaß höhere I_{50} Werte als PPIX. Hier betrug die Hemmung der Isoformen GST26/26 bzw. GST 27/27 81 % bzw. 75 %. Die Isoformen GST27/29 und GST29/29 wurden um 62 % bzw. 43 % gehemmt. Auch Mg-PPIX hemmte die GSTs schwächer als das metall-freie PPIX und führte bei einer Konzentration von 25 μM zu Aktivitätsverminderungen von 47 %, 67 %, 43 % bzw. 37 % für die Isoformen GST26/26, GST27/27, GST27/29 bzw. GST29/29.

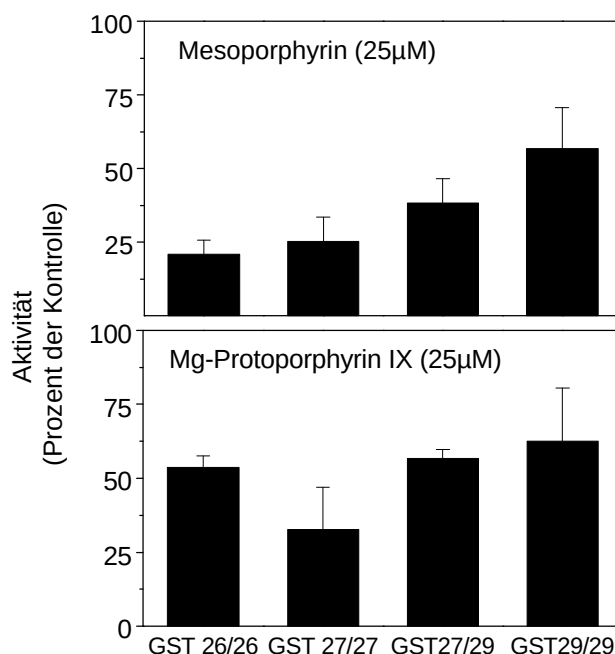


Abbildung 38: Prozentuale Hemmung der Glutathion S-Transferase-Isoformen durch Mesoporphyrin und Mg-Protoporphyrin.

Die durch Vorinkubation mit jeweils 25 μM Mesoporphyrin (oben) oder Mg-Protoporphyrin (unten) hervorgerufene Veränderung der Aktivität der Isoformen GST26/26, GST27/27, GST27/29 bzw. GST29/29 wurde durch den Umsatz des Substrates CDNB mit GSH bestimmt. Angegeben sind jeweils Aktivitätsveränderungen bezüglich der Kontrollaktivität der untersuchten GST-Isoform, die spezifischen Aktivitäten sind der Abbildung 37 zu entnehmen.

3.3.2.4 Enzymatische Bestimmung des Bindungsorts von Protoporphyrin an Glutathion S-Transferasen

Um den Ort der Bindung einzugrenzen, wurden Enzymtests mit PPIX als Inhibitor und CDNB und GSH als Substraten durchgeführt. Das Lineweaver-Burk-Diagramm (die doppeltreziproke Auftragung der eingesetzten Substratkonzentration gegen die Enzymaktivität bei verschiedenen Inhibitor-konzentrationen) erlaubt es, aufgrund des Schnittpunktes der Geraden, die sich aus der Erhöhung der Enzymaktivität durch gesteigerte Substratmenge bei gleicher Inhibitor-konzentration ergeben, eine Aussage über die Art der Hemmung zu treffen, sei sie kompetitiv, nichtkompetitiv oder unkompetitiv.

Die enzymatische Aktivität der Isoformen GST27/27, GST27/29 und GST29/29 gegenüber CDNB und GSH wurde mit und ohne PPIX-Vorinkubation bei verschiedenen CDNB-Konzentrationen und sättigender GSH-Konzentration gemessen (Abbildung 39). Durch PPIX ergab sich für alle Isoformen der GSTs eine nicht-kompetitive Hemmung bezüglich CDNB, d. h. die Bindung von PPIX und CDNB erfolgt an unterschiedlichen Epitopen des Proteins.

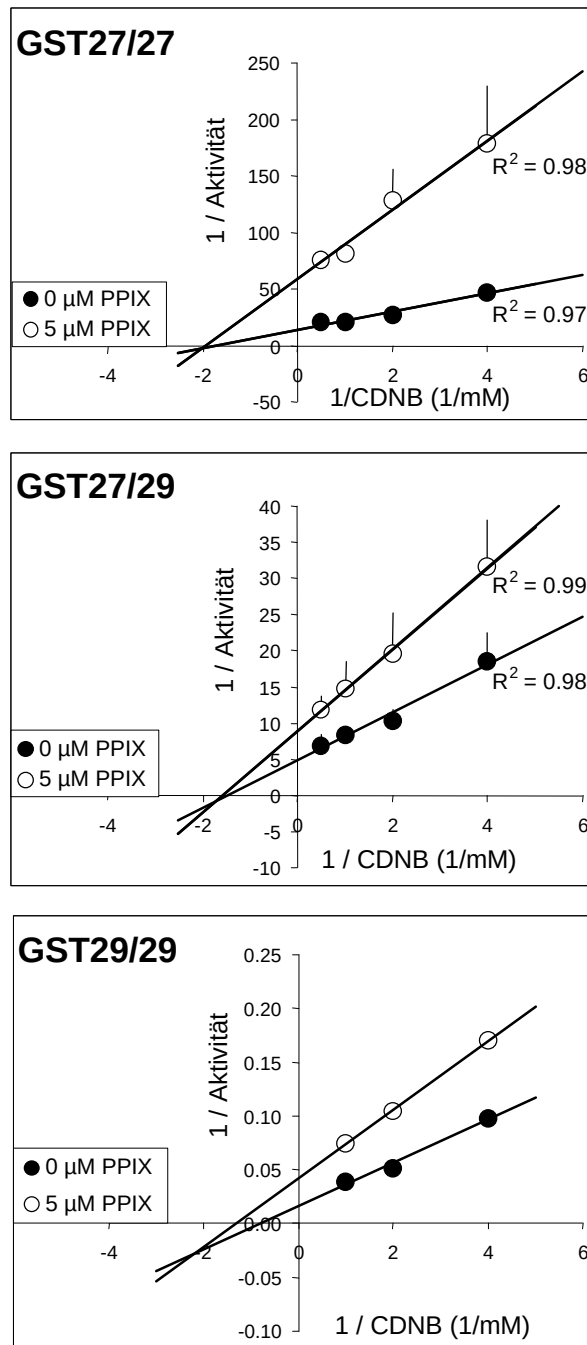


Abbildung 39: Lineweaver-Burk-Diagramm bei variabler CDNB-Konzentration mit Hemmung der Aktivität der Glutathion S-Transferasen durch Protoporphyrin.

Die Aktivitäten der GST27/27, GST27/29 und GST29/29 wurden bei verschiedenen CDNB-Konzentrationen und gleichbleibender GSH-Konzentration gemessen und im Diagramm doppelt-reziprok aufgetragen. Analog wurden Enzymaktivitätstests bei Vorinkubation mit 5 μM Protoporphyrin durchgeführt. Im Falle der GST29/29 wurden nur Doppelbestimmungen durchgeführt und deswegen der Regressionskoeffizient nicht angegeben.

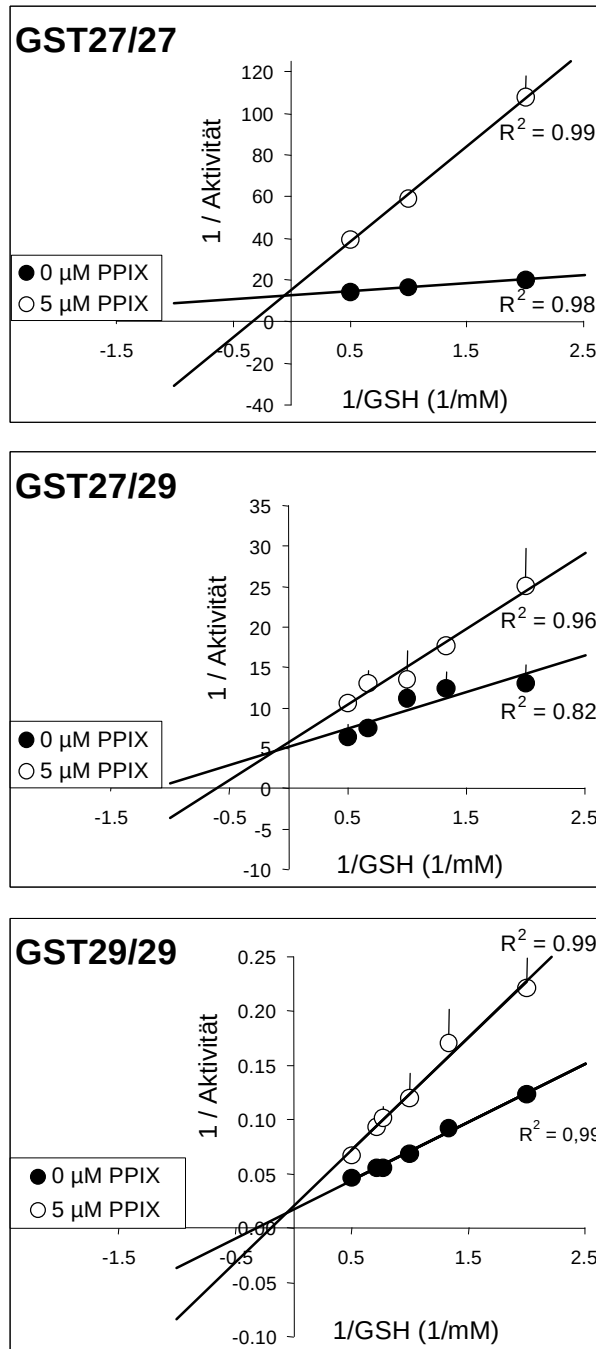


Abbildung 40: Lineweaver-Burk-Diagramm bei variabler GSH-Konzentration mit Hemmung der Aktivität der Glutathion S-Transferasen durch Protoporphyrin.

Die Aktivitäten der GST27/27, GST27/29 und GST29/29 wurden mit (5 μM) und ohne Protoporphyrin-Vorinkubation bestimmt. In beiden Fällen wurde zudem bei gleichbleibender CDNB-Konzentration die GSH-Konzentration variiert und die Daten im Diagramm doppelt-reziprok aufgetragen.

Bei Variation der eingesetzten GSH-Konzentration und sättigender CDNB-Konzentration (Abbildung 40) lässt sich aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen bei allen untersuchten Isoformen eine kompetitive Hemmung der GSTs durch PPIX bezüglich GSH ablesen. Demgemäß befindet sich die Bindestelle für PPIX an oder nahe an der GSH-Bindestelle.

3.3.2.5 Bindungsaffinität von Porphyrinen an Glutathion S-Transferasen

Um beurteilen zu können, ob unter physiologischen Konzentrationen eine Interaktion von Porphyrinen und GSTs möglich ist, wurde die Affinität beider Partner zueinander getestet. Im Vorfeld der Untersuchungen wurde klar, dass dies nicht über die Trennung des Ligand-Proteinkomplexes vom freien Liganden möglich war (z. B. durch Ammoniumsulfat-Fällung), da PPIX aufgrund seiner Hydrophobie bei Zentrifugation am Reaktionsgefäß adhäriert. Eine Dialyse der Proben war demgemäß ebenfalls nicht durchführbar. Als Methode der Wahl erwies sich die Titration des Liganden mit dem Protein unter Messung der Fluoreszenz. Da die molekulare Umgebung von Tetrapyrrolen deren Fluoreszenzemissions-, -exzitationsmaxima und Fluoreszenzintensität beeinflussen kann (Lamola et al., 1981), ist es möglich, protein-gebundene und frei in Lösung vorliegende Tetrapyrrole zu diskriminieren.

Diese Methode konnte allerdings nicht für die Bestimmung der Bindungsaffinität von PPIX gegenüber GSTs herangezogen werden. Zwar trat eine Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums von PPIX bei Zugabe von GST auf, dieser Effekt wurde aber durch Fluoreszenzverschiebung bei Zugabe des Proteinaufbewahrungspuffers überlagert. Durch Variation des Messpuffers in Zusammensetzung und pH-Wert oder durch Verwendung anderer Puffer konnte das Problem nicht umgangen werden.

Bei Coproporphyrin oder Mesoporphyrin trat die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums durch den Proteinaufbewahrungspuffer nicht auf. Nach Bestimmung der jeweiligen Exzitations- und Emissionsmaxima in PBS-Puffer wurde die Fluoreszenzveränderung bei Titration mit GST26/26 aufgezeichnet (Abbildung 41). In Parallelansätzen wurden Proteinaufbewahrungspuffer als Hintergrundkontrolle (nicht abgebildet) und BSA als Positivkontrolle pipettiert.

Das Fluoreszenzspektrum des Mesoporphyrin wurde bei Titration mit GST26/26 in der Maximalemission verschoben und in der Intensität vermindert. Ohne Protein lag das Fluoreszenzemissionsmaximum des Mesoporphyrin bei 623 nm; mit GST26/26 emittierte es maximal bei 618 nm (Abbildung 41). Die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von Mesoporphyrin hin zu kürzeren Wellenlängen trat in schwächerer Form auch bei Titration mit den anderen Isoformen auf (Daten ohne Abbildung).

Durch Zusatz der GST26/26 wurde auch das Fluoreszenzemissionsmaximum des Coproporphyrin (612 nm) in den längerwelligen Bereich (616 nm) verschoben und die Fluoreszenz-

intensität stark abgeschwächt (Abbildung 41). Dieser Effekt zeigte sich, wenngleich weniger ausgeprägt, auch bei Zugabe der anderen GST-Isoformen (Spektren ohne Abbildung), nicht aber bei Zugabe von BSA.

Im Falle von Mg-Protoporphyrin und Uroporphyrin trat durch GSTs eine Verminderung der Fluoreszenzintensität, aber keine Fluoreszenzverschiebung auf (ohne Abbildung).

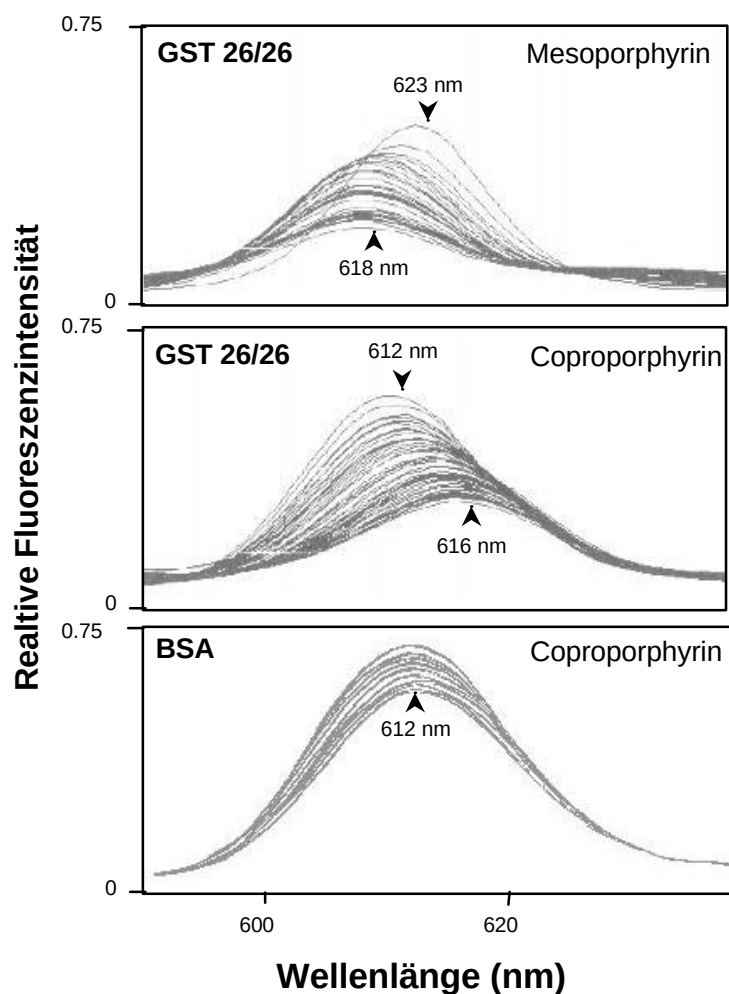


Abbildung 41: Fluoreszenzveränderung der Porphyrine bei Titration mit GST26/26.

Mesoporphyrin (oberes Spektrum) bzw. Coproporphyrin (mittleres und unteres Spektrum) (beide 10 nM) wurden mit steigenden Proteinmengen der GST26/26 (obere beide Spektren) bzw. bovinem Serumalbumin (BSA) titriert und die resultierenden Emmissionsveränderung bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm aufgezeichnet.

Die Verschiebung und Verminderung des Fluoreszenzmaximums aufgrund der Bindung von GSTs an Porphyrine resultierte bei Titration mit zunehmender Proteinmenge in einer Sättigung bei Erreichen des maximalen Bindungsgleichgewichtes. Bei halblogarithmischer Auftragung

der eingesetzten Proteinmenge gegen die Fluoreszenzintensität ergab sich eine sigmoidale Kurve (Abbildung 42), aus deren Wendepunkt sich die Dissoziationskonstante (K_d -Wert) ablesen lässt. Die molare Stöchiometrie zwischen Ligand (Porphyrin) und Protein (GST 26/26, 27/27, 29/29 oder BSA) wurde dergestalt gewählt, dass hochaffine Bindungsstellen bestimmt werden konnten. Das Vorhandensein von Bindungsstellen mit niedriger Affinität wurde durch die native Gelelektrophorese (Abbildung 35, S. 72) nichtquantitativ nachgewiesen.

Die verschiedenen Isoformen der GSTs zeigten - unabhängig von der Bindungsaffinität - in sehr unterschiedlichem Ausmaß eine Verminderung der Porphyrinfluoreszenz. Die Fluoreszenzabnahme des Mesoporphyrin und des Coproporphyrin durch die GST26/26 war weitaus größer als durch die anderen GST-Isoformen, wie aus den jeweiligen Endpunkten der Titration abzulesen ist. Unterschiede in der maximalen Fluoreszenzveränderung der unterschiedlichen Isoformen sind möglicherweise auf die Art der räumlichen Bindung zurückzuführen.

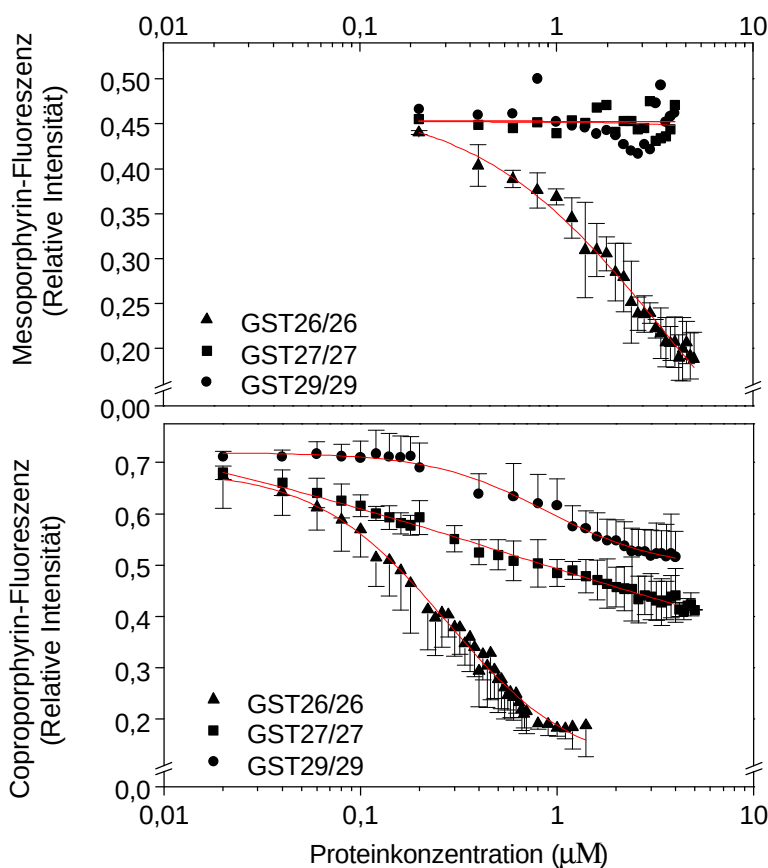


Abbildung 42: Bindungskonstanten der Glutathion S-Transferase-Isoformen gegenüber Mesoporphyrin und Coproporphyrin

Mesoporphyrin (oben) bzw. Coproporphyrin (unten) (beide 10 nM) wurden mit steigender Proteinmenge der GST26/26, GST27/27 oder GST29/29 titriert und die jeweiligen Fluoreszenzmaxima gemessen. Die Proteinmenge wurde halblogarithmisch gegen die Fluoreszenzemission aufgetragen und aus den Wendepunkten der resultierenden Kurven die Bindungsaffinität ermittelt.

Die ermittelten Dissoziationskonstanten unterschieden sich sowohl im Hinblick auf die jeweilige GST-Isoform als auch im Hinblick auf das Substitutionsmuster des verwendeten Porphyrins. Die K_d -Werte gegenüber Coproporphyrin lagen mit $0,27 \pm 0,02 \mu\text{M}$ für die GST26/26, $0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$ für die GST27/27, und $0,89 \pm 0,08 \mu\text{M}$ für die GST29/29 (Abbildung 42) bei deutlich niederen Konzentrationen als für Mesoporphyrin. Gegenüber der GST27/27 und GST29/29 zeigte Mesoporphyrin keine starke Bindungsaffinität, mit der GST26/26 ergab sich ein K_d -Wert von $1,93 \pm 0,18 \mu\text{M}$.

Diese Daten belegen eine starke Bindung der GSTs gegenüber Porphyrinen und zeigen eine gewisse Selektivität der GST Isoformen gegenüber den Liganden auf.

3.3.3 Schutzfunktion der Glutathion S-Transferasen gegenüber Tetrapyrrolen

Die in den vorhergehenden Abschnitten dokumentierte Fähigkeit der GSTs, verschiedene Porphyrine mit hoher Affinität zu binden, deutet auf eine nicht-enzymatische Beteiligung der GSTs am Tetrapyrrolstoffwechsel hin. Deswegen wurde untersucht, inwiefern GSTs durch Bindung physiologisch relevanter Porphyrine eine protektive Aufgabe im Zellgeschehen übernehmen können.

Ein zentrales Intermediat der Tetrapyrrolbiosynthese ist Protoporphyrinogen. Protoporphyrinogen unterliegt im wässrigen, sauerstoffhaltigen Medium einer starken Autoxidation zu Protoporphyrin. Diese Oxidation tritt *in vivo* auch enzymatisch auf und ist für die phytotoxischen Effekt der Protoporphyrinogen-Oxidase-Hemmstoffe ursächlich. Da GSTs in der Lage sind, Porphyrin-artige Strukturen zu binden, wurde deren Einfluss auf die Umsetzung des ungesättigten, nicht fluoreszierenden Protoporphyrinogens zum photodynamischen Protoporphyrin untersucht.

In sauerstoffgesättigtem Puffer bei pH 7,4 wird Pgen schnell zu PPIX autoxydiert (Abbildung 43). Die GST27/27 hatte keinen Einfluss auf die PPIX-Bildung. Die GST26/26 hingegen verminderte die Autoxidation des Pgen und somit die Bildung des fluoreszierenden PPIX stark.

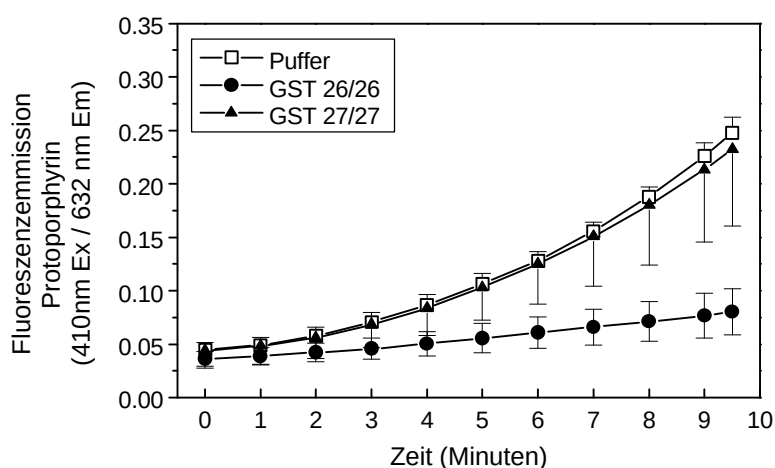


Abbildung 43: Verminderung der Autoxidation von Protoporphyrinogen durch die GST26/26.

Die Autoxidation des nichtfluoreszierenden Protoporphyrinogens (ca. 2 μM) zum fluoreszierenden Protoporphyrin wurde in sauerstoffgesättigtem Puffer durch Messung der Emission bei 632 nm (Anregungswellenlänge 410 nm) bestimmt. Den Ansätzen wurde alternativ GST26/26, GST27/27 (je 0,2 μM) oder das entsprechende Volumen Proteinaufbewahrungspuffer zugegeben.

Die GST-Isoformen sind in der Lage, Metall-komplexierte Tetrapyrrole wie z.B. Mg-PPIX zu binden (Abbildung 35, S. 72). Im Cytosol, wo die GSTs überwiegend vorliegen, ist eisenhaltiges PPIX das dominierende metallhaltige Porphyrin. Deswegen wurde die Interaktion der GSTs mit Fe(III)-Protoporphyrin (Hämin) untersucht. Das Absorptionsspektrum des Häm(in) weist wie alle Porphyrine ein Maximum im Wellenlängenbereich um 400 nm auf. Diese sogenannte Soret-Bande erfährt je nach der molekularen Umgebung und gegebenenfalls dem Reduktionszustand des Porphyrins eine charakteristische Veränderung.

Durch Zugabe von GST-Isoformen wurde das Absorptionsspektrum des Hämin im Bereich der Soret-Bande teilweise stark verändert. Während die GST26/26 keine bemerkenswerte Modulation des Absorptionsspektrums hervorrief, wurde das Häminspektrum bei Zugabe von GST29/29 und von GST27/27 verändert.

Die spektralen Eigenschaften des GST27/27-Hämin-Komplexes ähneln stark dem anderer Häm-haltiger Enzyme, wie z. B. Cytochrom-Oxidasen oder Peroxidasen. In tierischen Organismen wurden glutathionabhängige Peroxidasen beschrieben, die in der Lage sind, H_2O_2 umzusetzen. Sogenannte Mikroperoxidasen belegen zudem, dass eine peroxidative Aktivität von nicht-kovalent gebundenem Häm schon durch die Bindung weniger Aminosäuren vermittelt werden kann.

Deswegen wurde untersucht, ob Hämin-komplexierte GSTs in der Lage sind, mit GSH als Reduktand H_2O_2 abzubauen. Spektroskopische Enzymtests gaben keinerlei Hinweis auf eine

Glutathion-abhängige Peroxidase-Aktivität der GST-Häm-Komplexe (vergleiche hierzu die Absorption des H_2O_2 bei 240 nm in Abbildung 44, weitere Ergebnisse ohne Abbildung).

In Ergänzung zum Einfluss des Hämin auf die enzymatischen Eigenschaften der GSTs wurde *vice versa* der Einfluss der GSTs auf die biochemischen Eigenschaften des Hämin untersucht. Eisenhaltige Porphyrine sind stark redoxempfindlich. Im Biosyntheseweg des Häm wird FeII in PPIX eingebaut, allerdings ist Häm (FeII) im wässrigen Milieu instabil und wird sehr schnell zu Hämin (FeIII) oxidiert.

Unter reduzierenden Bedingungen führte H_2O_2 zu einem eklatanten Abbau des Hämin, wie aus Abbildung 44 ersichtlich ist. Unter den gewählten Bedingungen wurde das Hämin innerhalb von 15 min fast vollständig zerstört. Durch die GST27/27 wurde der Abbau des Hämin sehr stark unterdrückt. Die anderen Isoformen der GSTs waren nur in vermindertem Maße in der Lage, das Hämin vor Abbau zu schützen.

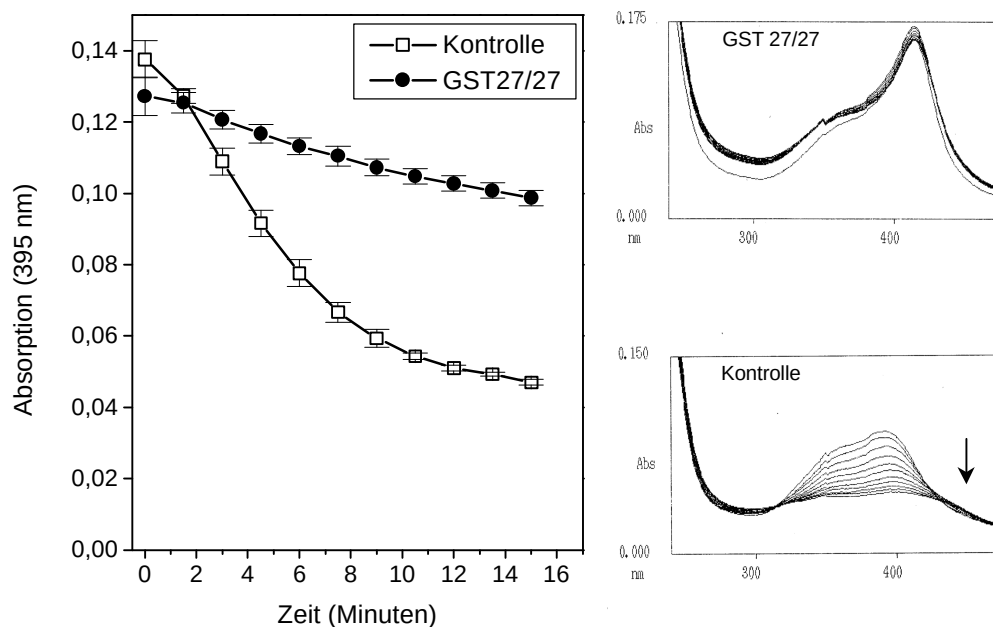


Abbildung 44: GST27/27-vermittelte Verringerung des H_2O_2 - katalysierten Abbaus von Hämin.

Die Degradation des Hämin ($0,2 \mu\text{M}$) durch Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 und 1 mM GSH wurde spektroskopisch bestimmt. Die rechte Seite der Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Minderung des Häminspektrums bei Zusatz von $1 \mu\text{M}$ Gst27/27 (oben) oder dem entsprechenden Volumen Proteinaufbewahrungspuffer (unten). Die resultierende Absorptionsänderung bei 395 nm wurde gegen die Zeit aufgetragen (linker Teil der Abbildung).

4 DISKUSSION

4.1 REGULATION DES ANTIOXIDATIVEN SYSTEMS BEI BEHANDLUNG MIT UNTERSCHIEDLICH WIRKENDEN STRESSOREN

4.1.1 Einfluss des Pflanzenalters und der Inkubationsart auf physiologische Parameter

Das antioxidative System höherer Pflanzen ist nicht einheitlich ausgeprägt, sondern kann je nach untersuchter Spezies, Organ, Alter, Anzucht und Tageszeit beträchtlich variieren. Rückschlüsse auf eine Modulation des antioxidativen Systems sind demzufolge aus möglichst standardisiert angezogenem Material bei Bestimmung mehrerer Parameter in vergleichenden Untersuchungen zu ziehen. Darüber hinaus ist der direkte Vergleich des publizierten Datenmaterials nicht immer möglich, zumal meist nur Messungen einzelner Komponenten des Systems veröffentlicht wurden.

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten wurden Pflanzen in gleichen Entwicklungsstadien analysiert, da onthogenetisch eine grundlegende Veränderung des antioxidativen Systems auftreten kann (vgl. Abbildung 22, S. 53). Eine Überlagerung der Stressantwort durch biotische oder abiotische Faktoren wurde vermieden, indem - bis auf wenige Ausnahmen - steril in der Klimakammer angezogene Pflanzen verwendet und die Proben zur jeweils gleichen Tageszeit genommen wurden.

Auch die Form des verwendeten Pflanzenmaterials hat Auswirkungen auf die oxidative Schädigung, insbesondere beim Einsatz von peroxidierend wirkenden Herbiziden. Die Sensitivität ganzer Pflanzen unterschied sich beträchtlich von derjenigen ausgestanzter Blattstücke. Bei Behandlung von ganzen Pflanzen trat mit 1 μM Oxyfluorfen eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes um ca. 20 % auf, Blattstücke zeigten auch bei 2 μM Oxyfluorfen keine signifikante Reduktion der Pigmente. Behandlung mit 5 μM Paraquat beeinträchtigte den Chlorophyllgehalt ganzer Pflanzen nach der dreitägigen Inkubation kaum, die Blattstücke hingegen zeigten nach einem Tag Behandlung mit 1 μM Paraquat eine Verminderung des Chlorophyllgehalts um nahezu 90 % (alle Daten ohne Abbildung). Dieser Effekt ist z. T. sicherlich durch Unterschiede in Translokation, Metabolismus und Wirkung der Herbizide bedingt, aber auch auf die andersartige Stoffwechselleistung von intakten Pflanzen im Vergleich zu der ausgestanzter Blattscheiben zurückzuführen.

Die Herbizidkonzentrationen zur Behandlung ganzer Pflanzen wurden so gewählt, dass bei den höchsten verwendeten Konzentrationen und Langzeitadaptation für drei Tage nur subletale Schädigungen, bei den niederen Konzentrationen phänotypisch keine Schadsymptome auftraten.

Der Vergleich der Auswirkungen von Paraquat und Oxyfluorfen auf das antioxidative System kann nur qualitativer Natur sein, erlaubt aber gleichwohl die Untersuchung der kompartiment-spezifischen Induktion von Schutzmechanismen nach primär plastidärer (Paraquat) oder cytosolischer (Oxyfluorfen) Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die Kompartimente der pflanzlichen Zelle unterscheiden sich beträchtlich in ihrem Gehalt an Antioxidantien (vgl. Abbildung 1, S. 3 zur Lokalisation). Wie aus Abbildung 45 ersichtlich, dominieren im Chloroplasten die enzymatischen Komponenten des antioxidativen Systems, deren katalytische Funktionalität durch die große Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten gewährleistet wird. Der Chloroplast ist auch unter physiologischen Bedingungen oxidativer Belastung ausgesetzt und deswegen durch ein effizientes antioxidatives System geschützt. Die Akkumulation von ROS im Cytosol könnte deutlich schwerwiegendere Folgen haben, da hier das enzymatische antioxidative System weniger stark ausgeprägt ist und die niedermolekularen Antioxidantien überwiegen. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung einer kompartimentspezifischen Induktion des antioxidativen Systems durch den Vergleich der Auswirkung von plastidär und cytosolisch initiiertem oxidativen Stress geprüft werden.

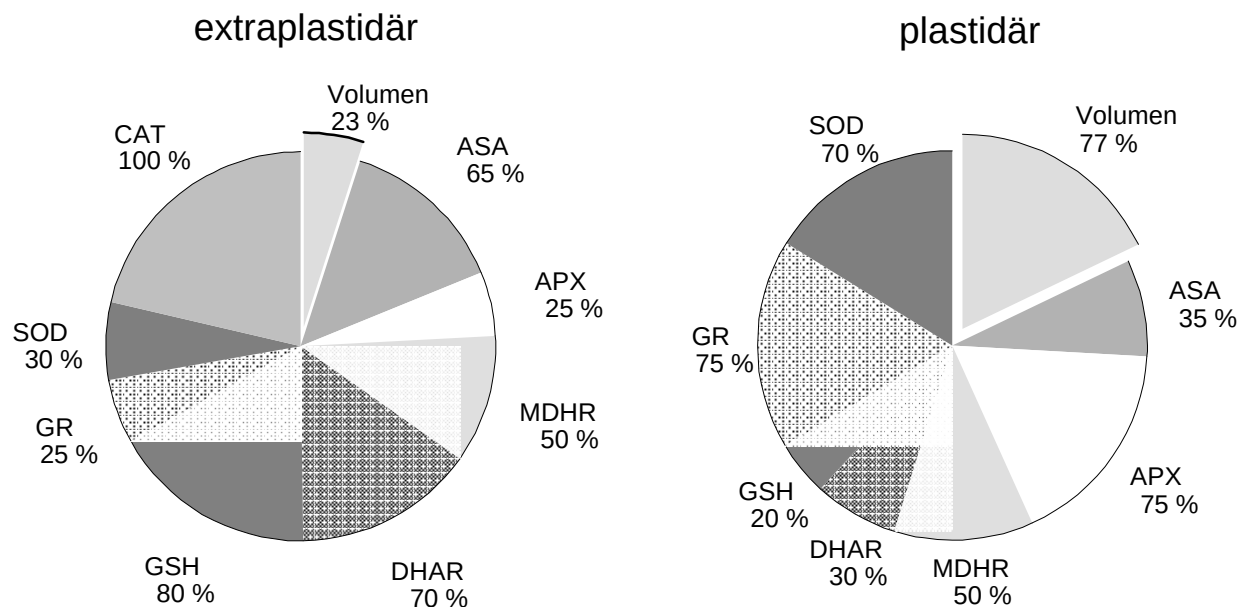


Abbildung 45: Plastidäre und extraplastidäre Verteilung der Antioxidantien.

Die Verteilung der wichtigsten Antioxidantien des Plastiden („plastidär“) im Verhältnis zum Rest der Zelle („extraplastidär“) ist in prozentualen Anteilen der Gesamtkonzentrationen angegeben. Bei Berechnung der Volumina wurde das Vakuolenvolumen nicht mit einbezogen. Die prozentualen Angaben sind Mittelwerte aus Daten von Polle, 2001; Foyer und Mullineaux, 1994; Scandalios, 1997; und den darin angeführten Referenzen.

4.1.2 Reaktion des antioxidativen Systems auf Paraquat-Behandlung

Der Einsatz des Bipyridium-Herbizids Paraquat erlaubt es, initial im Plastiden oxidativen Stress zu erzeugen. Aufgrund seines negativen Redoxpotentials kann Paraquat Elektronen von der reduzierenden Seite des PSI unter Bildung eines stabilen Radikals übernehmen, welches von molekularem Sauerstoff sehr effizient unter Bildung von Superoxidanionen autooxidiert wird.

Die schädigende Wirkung des Paraquat manifestierte sich in einer konzentrationsabhängigen Degradation des plastidären D1-Proteins (Abbildung 13, S. 44). Der Abbau des im PSII lokalisierten D1 durch in räumlicher Nähe zum PSI gebildete Superoxidanionen ist vermutlich auf deren Disproportionierung zu H_2O_2 zurückzuführen, da zwar das PSI primär durch kurzlebige Superoxidanionen geschädigt wird, aber eine Schädigung des PSII auch durch das stabilere H_2O_2 hervorgerufen werden kann (Tjus et al., 2001).

Schutz vor Superoxidanionen und anderen ROS bieten Carotinoide, die in den Plastidenmembranen die dominierenden niedermolekularen Antioxidantien darstellen. Zum Einen können Carotinoide bei Überlastung der photosynthetischen Kapazität entstehenden Singulett-sauerstoff und andere ROS abfangen. Zum Anderen verhindern sie im Xanthophyllzyklus durch nichtphotochemische Energiedissipation die Überreduktion der Elektronentransportkette und damit oxidativen Schaden. Trotz der starken Schädigung des D1-Proteins wurde durch Expressionsanalysen keine Steigerung des Transkriptionsniveaus zweier Xanthophyllbiosynthesegene (β -Carotinhydroxylase (bhy) und Violaxanthindeepoxidase (vde) festgestellt (Abbildung 16, S. 47). Durch Paraquat wird allerdings die Effizienz des Elektronentransportes gesteigert und als Folge der resultierenden Lumenansäuerung die Xanthophyll-Deepoxidation erleichtert (Váradi et al., 2000). Diese biochemische Erhöhung der Enzymaktivität könnte eine Induktion der vde-Genexpression erübrigen.

Im Zusammenspiel mit dem enzymatischen Abwehrsystem erfüllen die niedermolekularen wasserlöslichen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion in ihrer Funktion als Substrate und Radikalfänger eine wesentliche Aufgabe. Bei Behandlung mit Paraquat war eine Erhöhung der gesamtzellulären Ascorbat- und Glutathion-Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 5, S. 37). Der Reduktionszustand wurde in beiden Fällen nicht substantiell verändert.

Superoxidanionen werden enzymatisch durch Isoformen der Superoxiddismutase (SOD) abgebaut. Bei den eingesetzten Konzentrationen an Paraquat (maximal 1 μM) wurde die mRNA der plastidären Fe-Superoxiddismutase (chlFeSOD) allerdings nicht induziert (Abbildung 16, S. 47). Bei Applikation einer 50fach höheren Paraquatkonzentration fanden Tsang et al. (1991) einen Anstieg der chlFeSOD in Tabak (*Nicotiana glauca*). Da SODs insbesondere im Plastiden in grosser Konzentration vorliegen und eine hohe Umsatzgeschwindigkeit besitzen, ist die Menge bei moderater $\text{O}_2^{\cdot -}$ -Belastung und Langzeitadaptation offenbar ausreichend.

Bei stärkerer Belastung kann einer schnellen, aber transienten Induktion der plastidären SOD die Induktion der cytosolischen SOD folgen, wie Untersuchungen von Murai und Murai (1996) in *Solidago altissima* belegten. Eine Erhöhung der cytosolischen CuZn-Superoxid-dismutase (cytCuZnSOD) wurde auch von Tsang et al. (1991) bei hohen Konzentrationen an Paraquat beschrieben, trat aber in der vorliegenden Arbeit bei Behandlung mit weniger Paraquat nicht auf (Abbildung 16, S. 47). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß unter diesen Bedingungen eine transiente Induktion, wie sie beispielsweise Ye und Gressel (2000) innerhalb von 48 h nach Behandlung mit Paraquat fanden, durch die Probennahme nach 72 h nicht erfasst wurde.

Bei Paraquat-induziertem oxidativem Stress entsteht im Extremfall viermal mehr H_2O_2 als O_2^- (Elstner, 1990), da zusätzlich zur Bildung von Superoxidanionen über die eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion Hydroxylradikale und membrangängiges H_2O_2 gebildet werden können. Diese sekundär auftretenden ROS tragen signifikant zur Wirkung des Paraquats bei, wie die Verminderung der Pflanzenschädigung durch Metallchelatoren belegt (Chang und Kao, 1997).

Durch das membrangängige H_2O_2 kann oxidativer Stress aufgrund des Diffusionsgefälles auch auf das Cytosol übergreifen. Im hier verwendeten System mit mildem Paraquatstress unterlagen die meisten untersuchten cytosolischen Enzyme keiner starken Induktion durch Paraquat. So wurde die mRNA der cytosolischen Catalasen und Ascorbatperoxidase (H_2O_2 -Entgiftung) sowie die der Glutathionperoxidase (Lipidhydroperoxid-Entgiftung) nicht signifikant verändert (Abbildung 14, S. 45 und Abbildung 15, S. 46). In Übereinstimmung mit der unveränderten Transkriptionsmenge antioxidativer Schutzenzyme wurde auch deren Enzymaktivität nur wenig erhöht (Abbildung 8, S. 40 und Abbildung 9, S. 40).

Da Catalasen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften nur bei hohen Substratkonzentrationen arbeiten, steht zu vermuten, dass die im hier verwendeten System entstandene H_2O_2 -Menge relativ gering ist und nicht zu einer Induktion der CAT2, der Isoform, die bei oxidativem Stress vermehrt gebildet wird, führt. Des Weiteren lässt sich aus der fehlenden Induktion der CAT1 ableiten, dass keine vermehrte Photorespiration stattfindet. Willekens et al. (1994) fanden eine Induktion der glyoxisomalen CAT3 bei UVB-, SO_2 - und O_3 - Behandlung, was auf einen erhöhten Energiebedarf und verstärkte α -Oxidation von Fettsäuren zurückgeführt wurde. Bei Behandlung mit Paraquat in niederen Konzentrationen ist diese kompensatorische ATP-Gewinnung nicht zwingend notwendig, da durch Paraquat nur die Versorgung mit Reduktionsäquivalenten, nicht aber die Bildung von ATP unterbunden wird.

Die mRNA-Induktion des extraplastidären PR1a (Pathogenesis Related Protein 1a) zeigte allerdings, dass durch Paraquat in niederen Konzentrationen durchaus eine Veränderung der Transkription cytosolischer Proteine hervorgerufen wird (Abbildung 15, S. 46). Das PR1a-Gen kann als molekularer Indikator für biotischen und abiotischen Stress herangezogen

werden. Es kodiert für ein bislang biochemisch unklassifiziertes Protein der Stressabwehr und wird u. a. durch H_2O_2 induziert (Bi et al., 1995).

Wie in Abbildung 45 dargestellt, beruht ein Großteil der plastidären Radikalabwehr auf der Wirkung von antioxidativen Enzymen, die dort in proportional größerer Menge als die niedermolekularen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion vorkommen. Im Chloroplasten ist eine Regeneration dieser Antioxidantien insbesondere durch die Reaktionssequenzen des Ascorbat-Glutathion-Zyklus und des Wasser-Wasser-Zyklus möglich. Moderat phytotoxische Konzentrationen an Paraquat, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurden, führten trotz starker Degradation des D1-Proteins nicht zu einer Induktion antioxidativer Enzyme. Allerdings wurde die Gesamtkonzentration der niedermolekularen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion erhöht.

Dies lässt darauf schließen, dass bei mildem oxidativen Stress im Plastiden die Kapazität des antioxidativen Systems nicht durch die Aktivität der Enzyme, sondern durch die Verfügbarkeit der hydrophilen Antioxidantien Ascorbat und Glutathion limitiert wird.

4.1.3 Reaktion des antioxidativen Systems auf Oxyfluorfen-Behandlung

Im Gegensatz zu Paraquat bewirkt der Diphenylether Oxyfluorfen eine im weiteren Sinne extraplastidäre oxidative Schädigung durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff, aber auch von Superoxidanionen. Ursache hierfür ist die Hemmung der Protoporphyrinogenoxidase (PPOX), die an der Chlorophyll- und Häm-Biosynthese beteiligt ist. Diese Hemmung führt zu einer Anhäufung des photodynamischen PPIX in nicht-photosynthetisch aktiven Membranen wie z. B. der Chloroplastenhüllmembran, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Plasmalemma und in Folge zu primär cytosolischem oxidativem Stress.

Die peroxidierende Wirkung von Diphenylethern wie z. B. Oxyfluorfen kann durch eine gentechnische Erhöhung der plastidären PPOX-Aktivität vermindert werden (Lermontova und Grimm, 2000). Daher wurde überprüft, ob bei Oxyfluorfenbehandlung eine regulatorische Kompensation der PPOX auftritt. Die PPOX-mRNA erfuhr durch Oxyfluorfenbehandlung keine Veränderung, wurde aber im Licht stärker als im Dunkel transkribiert (Abbildung 20, S. 51).

Die durch Akkumulation des PPIX hervorgerufene Belastung durch Superoxidanionen führte nicht zu einer Induktion der chlFeSOD, während die cytCuZnSOD eine geringfügige Steigerung erfuhr (Abbildung 21, S. 52; und Daten ohne Abbildung). Demgegenüber konnte bei plastidärer Akkumulation des ebenfalls photodynamischen Uroporphyrin(ogen) (UroPP) eine Transkriptionssteigerung der chlFeSOD und der cytCuZnSOD nachgewiesen werden (Mock et al., 1998). Im Gegensatz zum hydrophilen UroPP wird das lipophile PPIX bevorzugt in Membranen eingelagert; die löslichen Isoformen der SODs sind demzufolge vermutlich nicht in

der Lage, Superoxidanionen direkt am Ort ihrer Entstehung abzufangen.

Ein Großteil der bei Porphyrinakkumulation lichtinduziert auftretenden Membranschäden beruht wahrscheinlich auf der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren. Die Lebensdauer von $O_2^{\cdot -}$ ist in hydrophober Umgebung deutlich größer als in wässrigem Milieu (Halliwell und Gutteridge, 1989), weswegen der Abbau dieser Lipidhydroperoxide einen wichtigen Schutz vor Folgeschäden darstellt. Durch Oxyfluorfenbehandlung wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Lipidhydroperoxid-abbauenden GPX hervorgerufen. Diese Induktion der GPX-mRNA trat nur bei phytotoxischer Lichtinkubation, nicht aber bei Dunkelinkubation auf (Abbildung 19, S. 50). Wie auch unter Paraquateinfluß beobachtet (Abbildung 15, S. 46), wurde der Gehalt der PR1a-mRNA, eines unspezifischen Enzymes der Stressabwehr, durch Behandlung mit Oxyfluorfen konzentrationsabhängig erhöht (Abbildung 20, S. 51).

Durch radikalische Folgereaktionen können weitere ROS, wie z.B. H_2O_2 , gebildet werden. Bei Langzeitbehandlung mit Oxyfluorfen wurde das Transkriptionsniveau der cytosolischen H_2O_2 -abbauenden Enzyme cytAPX und CAT2 stark erhöht (Abbildung 19, S. 50 und Abbildung 17, S. 48). Hierbei fand die mRNA-Akkumulation der cytAPX deutlich früher als die Veränderung der Catalase(n) statt (Abbildung 18, S. 49). Diese zeitlich versetzte Induktion spiegelt die enzymatischen Eigenschaften beider Enzyme wider, da die APX zwar eine höhere Substrataffinität gegenüber H_2O_2 , aber eine geringere katalytische Umsatzrate als die CAT besitzt. Somit kann die APX, im Gegensatz zur CAT, niedrigere H_2O_2 -Konzentrationen umsetzen. Eine effiziente Entgiftung hoher Konzentrationen, wie sie bei Überlastung des antioxidativen Systems als Langzeiteffekt auftreten, kann allerdings nur durch die CAT geleistet werden.

Die transkriptionale Induktion der cytAPX durch Oxyfluorfen (Abbildung 19, S. 50) korreliert im niederen Konzentrationsbereich mit der resultierenden Aktivität der APX (Abbildung 12, S. 43). Bei höheren Konzentrationen jedoch verminderte sich die Enzymaktivität trotz mRNA-Anstieg. Diese Diskrepanz kann auf einer irreversiblen Inaktivierung der APX bei Ascorbatmangel durch H_2O_2 (Asada, 1994) oder auf posttranskriptionaler Suppression der cytAPX-Expression (Mittler et al., 1998) beruhen und unterstreicht die Rolle der Catalasen bei der oxidativen Stressabwehr.

Die verschiedenen Catalase-Isoformen zeigten darüber hinaus ein spezifisches Induktionsprofil (Abbildung 17, S. 48). Die CAT3, deren physiologische Aufgabe in der Fettsäuremobilisierung liegt und die in Blättern nur schwach exprimiert wird, erfuhr unter Oxyfluorfeneinfluß keine Veränderung. CAT2, die an der Verteidigung gegen oxidativen Stress beteiligt ist (Willekens et al., 1994), wurde hingegen stark induziert. Eine dritte in Tabak klassifizierte Catalase, die CAT1 trägt zu ca. 80 % der Gesamt-Catalaseaktivität in ausdifferenzierten Blättern bei und entgiftet im Zuge der Photorespiration entstehendes H_2O_2 . Sie wurde durch Oxyfluorfen, gegenläufig zur CAT2, stark in ihrer Expression vermindert. In transgenen Pflanzen mit

plastidärer Akkumulation der ebenfalls photodynamischen Chlorophyllvorstufe UroPP hingegen wurde eine Erhöhung der CAT1-, CAT2- und CAT3-mRNA gefunden (Mock et al., 1998), was auf dem engen funktionalen und räumlichen Zusammenspiel von Peroxisomen und Chloroplasten im Zuge der Entsorgung von plastidär entstandenem H_2O_2 beruhen könnte.

Die gegenläufig veränderte Transkription der CAT1 und CAT2 bei gleichbleibendem mRNA-Gehalt der CAT3 führte nicht zu einer Veränderung der Gesamtcatalase-Enzymaktivität (Abbildung 7, S. 39) und damit nur zu einer internen Verschiebung der Isoformenverteilung.

Durch Oxyfluorfenbehandlung wurden nicht allein die Transkriptmengen, sondern auch die Aktivitäten antioxidativer Schutzenzyme beeinflusst (Abbildung 6, S. 38 und Abbildung 7, S. 39). Die Aktivität der Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus (APX, MDHAR, DHAR und GR) sowie der Gesamtgehalt an Ascorbat und Glutathion wurden durch Oxyfluorfen erhöht.

Eine differenzierte Induktion der Enzyme, wie sie hier nach Oxyfluorfenbehandlung auftrat, kann möglicherweise ausreichenden Schutz gegenüber cytosolischem Stress bieten, sofern Substrate nicht limitierend sind. Da das Cytosol einen Großteil der zellulären niedermolekularen Antioxidantien ASA und GSH beinhaltet, tritt eine Substratbegrenzung vermutlich erst bei eklatanter Belastung durch ROS auf.

Demgegenüber liegen im Cytosol, im Vergleich zum Plastiden, antioxidative Enzyme – mit Ausnahme der Catalasen – nur in relativ geringem Anteil vor (vgl. Abbildung 7, S. 39), weswegen eine Induktion des enzymatischen Systems effizienten Schutz gegen oxidativen Stress vermittelt.

4.2 UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSION DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME IN VERSCHIEDENEN TABAKKULTIVAREN - HINWEISE AUF DIE OZONSENSITIVITÄT DES BELW3

Das in dieser Studie verwendete Tabakkultivar BelW3 hat sich als äußerst sensibler Wirkungsindikator und Biomonitor für Ozon etabliert, der schon bei geringer Ozonbelastung kleinflächige Nekrosen bildet (Hock und Elstner, 1995; Formin et al., 1995). Allerdings ist die molekulare Basis für diese ausgeprägte Ozonsensitivität bislang noch ungeklärt.

Veränderungen in der stomatären Leitfähigkeit oder in der Ozonaufnahme, der Aktivität der RubisCo, im Ascorbat- oder Glutathiongehalt, in der Aktivität der APX oder SOD scheiden als Ursachen aus (Heggstad, 1991; Pasqualini et al., 1995; Ederli et al., 1997; Batini et al., 1995; Tanaka et al., 1990). BelW3 besitzt allerdings einen um die Hälfte erniedrigten Gehalt an β -Carotin gegenüber dem Kultivar Havana (Antonielli et al., 1997) und eine deutlich höhere Lipidperoxidation unter photoinhibitorischen Bedingungen (Ederli et al., 1997).

Tanaka et al. (1990) führen die Ozonsensitivität auf den verminderten Gehalt an GR zurück, da

BelW3 im Vergleich mit allen anderen Kultivaren nur die Hälfte an GR-Aktivität besitzt. Die Überexpression der GR in unabhängigen Studien erbrachte allerdings keine gesteigerte Ozontoleranz des Kultivars BelW3 bei cytosolischer oder plastidärer Erhöhung der GR-Aktivität (vgl. Abschnitt 1.2.)

Im Zuge der Charakterisierung der antioxidativen Abwehr wurde das Kultivar BelW3 in der vorliegenden Studie mit dem ozontoleranteren und relativ pigmentreichen Tabakkultivar Samsun verglichen. Die gleichbleibende Expression der antioxidativen Schutzenzyme lässt keine generell stärkere oxidative Belastung des Kultivars BelW3 gegenüber Samsun erkennen. So unterschieden sich unter verschiedenen Lichtbedingungen beide Kultivare weder in Bezug auf die Transkription und Aktivität der cytAPX, noch in der Transkriptmenge von cytCuZnSOD und chlFeSOD, der SOD-Isoformenverteilung und der Menge an D1-Protein (Abbildung 23, S. 54).

Das Transkriptionsmuster der Catalasen hingegen war in den Kultivaren grundverschieden (Abbildung 23, S. 54). Die mRNA der physiologisch aktivsten Isoform CAT1 lag in BelW3 gegenüber Samsun stark vermindert vor. Sie war in BelW3 dennoch regulierbar, wie die Induktion unter Lichtstress und nach Oxyfluorfenbehandlung zeigte (Abbildung 17, S. 48). Überschüssiges H₂O₂, wie es beispielsweise durch Starklicht entsteht, könnte in BelW3 durch kompensatorische Induktion der CAT2-Expression entgiftet werden, welche in Samsun nicht zu beobachten war.

Bei Ozonbehandlung betrifft die prominenteste Veränderung im Translationsmuster des antioxidativen Systems die Catalasen. In BelW3 führte bereits subnekrotische Ozonexposition innerhalb von wenigen Stunden zu einer verstärkten Transkription der APX und CAT (die Isoform der CAT wurde hier nicht benannt; Örvar et al., 1997). Da die CAT1 für 80 % der Catalaseaktivität in Tabak codiert, steht zu vermuten, dass in BelW3 aufgrund der Verminderung der CAT1-Transkription H₂O₂ unter oxidativem Stress weniger effizient abgebaut werden kann.

Die Nekrosenbildung im BelW3 nach Ozonbehandlung ist nach Schraudner et al. (1998) nicht auf die direkte Toxizität des Ozons zurückzuführen, sondern auf eine aktive H₂O₂-Akkumulation ('oxidative burst'). Analog zur hypersensitiven Reaktion der Pathogenabwehr kann durch H₂O₂ als Signalmediator induzierter Zelltod ausgelöst werden (Alvarez et al., 1998). Dies wurde auch an Tabak (*Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1) mit gentechnisch reduzierter Aktivität der CAT1 beobachtet, der eine gegenüber dem Wildtyp höhere Ozonsensitivität besitzt (Willekens et al., 1997). Die Nekrosenbildung in BelW3 könnte demnach als Folge vernetzter Signaltransduktionswege der Pathogenabwehr und der Abwehr von oxidativem Stress zu sehen sein. Die mit der reprimierten CAT1-Expression in BelW3 einhergehend verminderte Fähigkeit, Spitzenkonzentrationen an H₂O₂ zu entgiften, initiiert möglicherweise diese Signaltransduktion und bewirkt so die Bildung von Nekrosen.

4.3 VERÄNDERUNGEN IM ANTIOXIDATIVEN NETZWERK BEI ÜBEREXPRESSION DER GLUTATHIONREDUKTASE

Die Glutathionreduktase (GR) liegt von allen am Ascorbat-Glutathion-Zyklus beteiligten Enzymen in der geringsten Konzentration vor und stellt vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der plastidären Ascorbat-Regeneration dar (Foyer und Harbinson, 1994). Die gentechnische Erhöhung der GR-Aktivität zur Verbesserung der Resistenz gegen oxidativen Stress erschien insbesondere in BelW3 erfolgversprechend, da dieses Kultivar gegenüber anderen eine stark verminderte Aktivität der GR besitzt.

Die Überexpression der GR in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten verschiedener Pflanzenarten bewirkte nur eingeschränkten Schutz gegenüber Paraquat oder Ozon (z. B. Aono et al., 1995; Foyer et al., 1991; Strohm et al., 1999).

Um diesem Effekt der Resistenzveränderung auf den Grund zu gehen, wurde der Ausgangs-genotyp BelW3 mit der Glutathionreduktase-überexprimierenden Transformante BelW3gor verglichen und die Auswirkung der cytosolischen Überexpression der bakteriellen Glutathionreduktase (GOR) auf das antioxidative System untersucht.

In physiologischen Untersuchungen zeigte sich, dass BelW3gor im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Resistenz gegenüber Lichtstress besitzt, was sich in Chlorophylldegradation und erhöhter Lipidperoxidation manifestierte. In der Transformante BelW3gor wurde im Starklicht das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Tabelle 1, S. 33). Die Größe der Lichtsammelkomplexe scheint nicht der Grund für diese Verschiebung zu sein, da Verhältnis und Konzentration der Chlorophylle unter Schwachlicht in beiden Kultivaren vergleichbar waren. In der Transformante tritt offenbar eine stärkere Schädigung der Photosynthesezentren auf. BelW3gor besaß gegenüber dem Wildtyp eine stark verminderte Transkription der Violaxanthindeepoxidase (Abbildung 16, S. 47). Andere plastidäre Gene, wie die β -Carotinhydroxylase, die ebenfalls in der Carotinoidbiosynthese beteiligt ist, sowie die antioxidativ wirkende chlFeSOD wurden nicht in ihrer Transkription moduliert (Abbildung 23, S. 54). Es steht zu vermuten, dass die geringere Lichttoleranz von BelW3gor in der verminderten Transkription der Violaxanthindeepoxidase begründet liegt, wodurch die Effizienz des Xantophyllzyklus und damit die nichtphotochemische Energiedissipation beeinträchtigt ist.

Durch oxidativen Stress, ausgelöst durch H₂O₂-Behandlung, wurde in BelW3gor eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Schädigung hervorgerufen (Abbildung 3, S. 34). Die Transformante vermochte sowohl exogen zugegebenes als auch bei Paraquatbehandlung entstandenes endogenes H₂O₂ besser abzubauen als der Wildtyp (Abbildung 3, S. 34 und Abbildung 4, S. 36). Da sich die Transkriptmengen der Catalasen (Abbildung 14, S. 45), der Ascorbat-

peroxidase (Abbildung 15, S. 46) und das Muster der anionischen Peroxidasen bei Aktivitätsfärbung (Abbildung 10, S. 41) in den Kultivaren nicht unterscheiden, ist die bessere Entgiftung des H_2O_2 durch die Transformante nicht auf eine verstärkte Induktion von H_2O_2 -abbauenden Enzymen zurückzuführen. Der stärkere Abbau kann nur indirekt durch die überexprimierte GOR vermittelt werden, da die GR selbst kein H_2O_2 umsetzen kann. Die zugrundeliegende Reaktionssequenz umfasst vermutlich die Entgiftung des H_2O_2 durch den Ascorbat-Glutathion-Zyklus durch Ascorbat und Regeneration des entstandenen DHA unter GSH-Verbrauch. Diese Schritte können sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch ablaufen, allein die abschließende Reduktion des GSSG kann nur enzymatisch bei Katalyse durch die GR stattfinden.

Eine Verhinderung des Anstiegs von H_2O_2 durch den kompensatorischen Anstieg der GR-Aktivität konnte auch bei Inaktivierung der Catalasen in Roggen (*Secale cereale* L.) beobachtet werden (Streb und Feierabend, 1996). Die Bedeutung der cytosolischen H_2O_2 -Entgiftung über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus unterstreichen transgene BelW3-Pflanzen mit Überexpression der (cytosolischen) APX aus Erbse, die bei plastidärer Lokalisation des Fremdgens einen schwachen Schutz gegenüber Paraquat besaßen, bei cytosolisch lokalisierter Überexpression hingegen eine signifikant verbesserte Resistenz (Pitcher et al., 1994).

Somit könnte die erhöhte H_2O_2 -Entgiftungskapazität auch das unterschiedliche Ausmaß der D1-Degradation des Wildtyps BelW3 und der Transformante BelW3gor bei Paraquatbehandlung erklären (Abbildung 13, S. 44). Eine kompartmentübergreifende Schutzfunktion der GR kann zudem durch den Transport des Substrates GSH vermittelt werden, wenn die Fähigkeit des antioxidativen Systems zur Regeneration des GSH aus GSSG überschritten wird (Foyer et al., 2001). So wird bei hohen Paraquatdosen auch der cytosolische GSH-Pool oxidiert (Smith, 1985). Casano et al. (1999) berichten, dass die Enzymaktivität der plastidären GR unter photooxidativem Stress und bei Paraquatgabe sehr stark vermindert wird, was durch einen Anstieg der Aktivität der extraplastidären GR kompensiert werden kann.

Bezüglich des GSH-Gehalts und dessen Reduktionszustands fanden Foyer et al. (1991) – in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Studie (Abb. Abbildung 5, S. 37) – keine signifikante Veränderung in der GOR-Transformante gegenüber dem Wildtyp. Das Verhältnis von Ascorbat zu Dehydroascorbat hingegen war in den Untersuchungen von Foyer nach Paraquatbehandlung in GOR-Tabak erhöht. Die Autoren folgern daraus, dass die Regeneration des im Plastiden oxidierten ASA durch die cytosolisch überexprimierte GOR über Ascorbat-Translokation vermittelt werden kann. Dieser Effekt trat in den hier dargelegten Untersuchungen nicht zutage (Abbildung 5, S. 37), da bei den eingesetzten Paraquatkonzentrationen auch im Wildtyp keine Veränderung im Reduktionszustand des Ascorbats hervorgerufen wurde.

Die Überexpression der GR zog zudem eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Regulation der cytCuZnSOD-Transkription nach sich (Abbildung 23, S. 54). Während die cytCuZnSOD im Wildtyp unter Starklicht induziert wurde, trat in der transgenen Pflanze keine Veränderung durch die höhere Lichtintensität auf.

Ein Zusammenhang zwischen der Transkription von SOD und GR wurde durch Ergebnisse anderer Forscher bestätigt. Die mRNA-Transkription der cyt Cu/nSOD aus *Pinus* unterliegt einer sehr starken Reprimierung bei erhöhten GSH-Konzentrationen und erhöhtem Verhältnis von GSH zu GSSG (Wingsle und Karpinski, 1996). Aono et al. (1995) wiesen eine um 30 % verminderte SOD-Aktivität in *Nicotiana tabacum* cv SR1 mit erhöhter cytosolischer Aktivität der bakteriellen Glutathionreduktase im Vergleich zur nicht-transformierten Kontrolle nach. Bei cytosolischer Cotransformation der GR und der CuZnSOD in Tabak wurde im Vergleich mit den jeweiligen Einzeltransformationen eine ca. 10fach höhere Resistenz gegenüber Paraquat beobachtet (Aono et al., 1995).

Eine interne Vernetzung der Expression antioxidativer Enzyme wurde gleichfalls bei anderen Transformationsansätzen beschrieben. Sen Gupta et al. (1993b) fanden bei Transformanten mit Überexpression der cytosolischen SOD eine offenbar kompensatorisch erhöhte Aktivität der plastidären und cytosolischen APX; Tabakpflanzen mit plastidär überexprimierter Catalase aus *E. coli* zeigten eine konstitutive Erhöhung der endogenen SOD-Aktivität (Miygawa et al., 2000).

Unerwarteterweise erfuhr die in der Tabaktransformante BelW3gor "konstitutiv" überexprimierte GOR eine Transkriptionsinduktion (Abbildung 19, S. 50). Die Expression der GOR steht unter Kontrolle des 35S-Blumenkohlmosaikvirus-Promotors, der allerdings auch durch Komponenten der Signaltransduktion bei oxidativem Stress induziert werden kann. Die Zunahme der GOR-Transkriptniveaus der Transformante spiegelte sich in der Steigerung der Enzymaktivität wider. Im Vergleich zum Wildtyp wurde in BelW3gor die Gesamt-GR-Aktivität überproportional erhöht (Daten ohne Abbildung). Eine vergleichbare Steigerung der Aktivität transgen überexprimierter GOR wurde von Badenhorst et al. (1997) beschrieben und auf posttranslationale, möglicherweise redoxvermittelte Aktivierung zurückgeführt.

Die verminderte Expression der cytCuZnSOD und der vde durch die Überexpression der GR deutet auf eine pleiotrope Kontrolle des antioxidativen Systems hin. Sie kann durch erhöhtes Redoxverhältnis des GSH oder verminderte H₂O₂-Akkumulation hervorgerufen werden, da beide Parameter in der Transformante verändert sind und in Pflanzen regulatorische Funktion besitzen. Karpinski et al. (1997) postulieren eine redoxvermittelte Aktivierung von cytosolischen antioxidativen Enzymen durch photooxidativen Stress, wobei sie einen negativen regulatorischen Einfluss von GSH auf die über Plastochinon vermittelte Signaltransduktion vermuten.

Eine solche negative Rückkopplung kann erklären, weswegen die Transformante trotz

Überexpression der GR nicht resistenter, sondern sensitiver gegenüber spezifischem oxidativen Stress ist. Obgleich unter extremen Bedingungen das Redoxverhältnis des GSH-Pools aufrechterhalten werden kann, ist unter normalen physiologischen Bedingungen der cytosolische Schutz vor Superoxidanionen durch die schwach exprimierte cytCuZnSOD vermindert. Zudem kann eine stärkere oxidative Belastung des Chloroplasten im Licht bei geringerer Transkription der Violaxanthindeepoxidase durch die verminderte Bildung des photoprotektiven Zeaxanthin auftreten.

4.4 ROLLE DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN IN DER HERBIZIDENTGIFTUNG UND UNTER OXIDATIVEM STRESS

Die Mehrzahl der Untersuchungen zur Funktionen der GSTs in Pflanzen bezieht sich auf ihre Fähigkeit der Herbizidentgiftung. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren nachgewiesen, dass spezifische Isoformen der GSTs in der Lage sind, durch oxidativen Stress entstandene toxische Abbauprodukte zu entgiften. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte an *Zea mays* geklärt werden, welche Isoform(en) diese Aufgabe im Schutz gegen oxidativen Stress auch *in vivo* übernehmen. Auf Basis dieser physiologischen Charakterisierung sollte die kodierende cDNA der vielversprechendsten GST-Isoform zur Transformation des Tabakkultivars BelW3 ausgewählt werden.

4.4.1 Expressionsmuster der Glutathion S-Transferase-Isoformen

Zur Beurteilung der endogenen Regulation der GST-Isoformen wurden Maiskeimlinge unter verschiedenen Bedingungen angezogen und die Expression der GST26, GST27 und GST29 Untereinheit auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen. Alle drei untersuchten GST-Untereinheiten (GST26, GST27 und GST29) wurden in der Wurzel weitaus stärker exprimiert als im Blatt (vgl. z. B. Abbildung 29, S. 62). Diese verstärkte Expression spiegelte sich auch in einer sechsfach erhöhten Gesamtaktivität der GSTs in Wurzeln gegenüber grünen Blättern wider (Tabelle 2, S. 67). Bei dreitägiger Dunkelinkubation von im Licht angezogenen Maispflänzchen zeigte sich keine Veränderung der GSTs gegenüber der Lichtinkubation (vgl. z. B. Abbildung 32, S. 65). In Blättern von etioliert angezogenem Mais war jedoch die Aktivität der GSTs doppelt so hoch wie in grünen Blättern (Tabelle 2, S. 67). Im Zuge der Ergrünung begann die GST-Aktivität in den Blättern nach ca. 24 h zu sinken. Nichtgrüne Gewebe, also etiolierte Blätter und Wurzeln, zeigten eine konstitutiv höhere Expression und Aktivität der GSTs als grüne Blätter (vgl. Abbildung 29, S. 62 und Tabelle 2, S. 67). Da sich nach dreitägiger Dunkelinkubation weder in den Blättern noch in den Wurzeln grüner Maispflanzen eine Veränderung im Proteingehalt der GSTs zeigte, ist die erhöhte Expression in nichtgrünem Gewebe keine kurzfristige Lichtadaptation, sondern stellt vermutlich einen Schutz in Geweben mit nicht ausdifferenzierten Plastiden dar.

Laut Dixon et al. (1998) sinken die Mengen der GSTs mit zunehmenden Alter der Pflanzen und sind in der Wurzel stärker vorhanden.

Aus der Literatur sind Salicylsäure, Glutathion und NA als potentielle Induktoren von GSTs bekannt (Marrs, 1996). Die drei in dieser Studie untersuchten Isoformen zeigten bei Applikation über die Wurzel zumindest in grünen Blättern keine Veränderung durch Salicylsäure, reduziertes und oxidiertes Glutathion (Abbildung 28, S. 61), woraus allerdings nur geschlossen werden kann, dass bei den verwendeten Konzentrationen keine systemische Induktion erfolgt. Demgegenüber wurde durch NA bei Wurzelapplikation eine starke Induktion der GST27 und GST29 hervorgerufen. Die GST26 wurde durch NA nicht induziert. NA stärkt das pflanzliche Entgiftungssystem und wird deswegen in der Landwirtschaft als sogenannter "Safener" zum Schutz vor Herbiziden bzw. deren phytotoxischer Wirkung eingesetzt.

Diese Schutzwirkung durch NA-vermittelte Induktion von GSTs kann, zumindest im Falle des Oxyfluorfen, nicht allein durch die Entgiftung des Herbizides selbst vermittelt werden, sondern auf der Verminderung herbizidaler Folgeschäden beruhen, wie aus Tabelle 4 (S. 69) gefolgert werden kann. Die phytotoxische Wirkung des Oxyfluorfen liegt in der PPIX-Akkumulation, was nur nach Lichtanregung zu starker Zellschädigung führt. Bei endogener Erhöhung des PPIX-Gehaltes durch dessen Vorstufe Aminolaevulinat oder exogener Erhöhung durch Inkubation mit PPIX waren NA-behandelte Blätter weniger geschädigt als unbehandelte Blätter.

4.4.2 Expression der Glutathion S-Transferasen nach Herbizidbehandlung und unter oxidativem Stress

Zur Beurteilung der bifunktionalen Rolle der GSTs im Abbau von Herbiziden und in der Entgiftung toxischer Folgeprodukte von oxidativem Stress wurden Herbizide mit unterschiedlichem Wirkmechanismus eingesetzt.

Das Herbizid Metazachlor wird durch GSTs entgiftet, wobei in Mais GST Isoformen mit 27 kDa Untereinheit höchste Aktivität besitzen (Sommer und Böger, 1999). Die herbizidale Wirkung des Chloracetamids Metazachlor beruht auf der Hemmung der Verlängerung sehr langkettiger Fettsäuren. Im Gegensatz zu Paraquat und Oxyfluorfen wirkt es demzufolge nicht peroxidierend. Die Behandlung mit Metazachlor bewirkte in phytotoxischer Konzentration (100 µM) bei keiner der untersuchten GST-Untereinheiten (GST26, GST27 und GST29) eine Veränderung der exprimierten mRNA- und Proteinmenge (Abbildung 29, S. 62). Auch Irzyk und Fuerst (1997) fanden durch 10 µM Metolachlor keine Induktion der GST27-Untereinheit, obgleich die GST-Gesamtaktivität durch Metazachlor leicht induziert wurde. Möglicherweise war die Aktivitätserhöhung auf andere Isoformen zurückzuführen oder die verwendeten Herbizidkonzentrationen waren zu gering, um eine Induktion auszulösen. Es steht zu ver-

muten, dass bei der verwendeten Konzentration die endogen vorhandene Menge an GSTs ausreichend ist, um das Chloracetamid zu entsorgen oder dass andere Entgiftungsmechanismen überwiegen.

Um zu testen, ob eine Veränderung im GST-Muster durch peroxidierende Herbizide auftritt, wurden Paraquat, Oxyfluorfen und Chlorophthalim verwendet. Von einer Umsetzung des Paraquats durch GSTs ist bislang nicht berichtet worden. Oxyfluorfen hingegen wird vermutlich durch GSTs glutathionisiert. Deswegen wurde zusätzlich Chlorophthalim eingesetzt, dessen Wirkmechanismus gleich dem des Oxyfluorfens ist, das aber nicht von GSTs konjugiert werden kann. Um die Reaktion der GSTs auf die Herbizide *per se* getrennt von der lichtabhängigen phytotoxischen Wirkung beurteilen zu können, wurde die Behandlung jeweils im Dunkeln und im Licht durchgeführt.

Die Isoformen GST26 und GST29 zeigten weder im Licht noch im Dunkeln eine veränderte Expression durch Paraquat, Oxyfluorfen oder Chlorophthalim (Abbildung 30, S. 64, Abbildung 32, S. 65, und Daten ohne Abbildung). Dies steht im Einklang mit ihren biochemischen Eigenschaften, da sie weder die Herbizide selbst, noch Produkte des oxidativen Stresses umsetzen können.

Die GST27 hingegen, die in der Lage ist, durch ROS entstandene Abbauprodukte zu entgiften, wurde durch alle drei verwendeten peroxidierenden Herbizide konzentrationsabhängig auf mRNA- und auf Proteinebene induziert. Diese Expressionssteigerung trat, wie die peroxidierende Wirkung selbst, nur im Licht, nicht aber im Dunkeln auf. In unbehandelten und in unbelichteten Blättern lag die Proteinmenge der GST27 unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Ausnahme bildete die höchste Konzentration an Oxyfluorfen, wo auch im Dunkeln eine marginale Expression auftrat. Toxische Effekte des PPIX wurden im tierischen System zwar auch im Dunkeln beschrieben (Williams et al., 1992), mutmaßlich aber ohne Bildung eines Porphyrinradikals. Die beobachtete Dunkelinduktion kann demnach nicht durch die peroxidierende Wirkung erklärt werden, sondern wird entweder durch Oxyfluorfen selbst oder durch die Akkumulation von PPIX hervorgerufen (vgl. hierzu auch Abschnitt 4.6, S. 99).

Diese Ergebnisse erlauben die Folgerung, dass die GST27 in der Abwehrreaktion gegenüber oxidativer Belastung eine wichtige Rolle spielt.

Durch den Ascorbat-Glutathion-Zyklus können nur die primär auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, entgiftet werden. Folgeprodukte, die durch Weiterreaktion mit organischen Molekülen wie z. B. mehrfach ungesättigten Fettsäuren auftreten, müssen über andere Systeme entsorgt werden. Unter peroxidierenden Bedingungen wurde die GST27, die organische Hydroperoxide abbauen kann (Sommer und Böger, 1999, langsam, aber drastisch erhöht. Dies könnte durch H_2O_2 vermittelt werden, wie von ähnlichen GST-Isoformen berichtet (Levine et al., 1994, Chen et al., 1996).

Somit ergänzen spezifische GSTs (in *Zea mays* die GST27) in idealer Weise das klassische antioxidative System.

4.5 AUSWIRKUNGEN AUF DAS ANTIOXIDATIVE SYSTEM BEI ÜBEREXPRESSION DER GST27 IN BELW3

Aufgrund der physiologischen Untersuchungen zum antioxidativen Potential wurde die GST27 aus Mais zur Überexpression in *Nicotiana tabacum* BelW3 ausgewählt. Die Primärtransformanten wurden über die cotransformierte Kanamycinresistenz selektioniert und nach Samenbildung mutmaßlich hemizygote und homozygote Pflanzen der F1-Generation geselbstet. Neben dem indirekten Nachweis der Insertion durch die Kanamycinresistenz war der direkte Nachweis des Transgens bislang technisch nicht möglich, da der Antikörper gegen die GST27 in Tabak unspezifisch kreuzreagiert und eine erste Reinigung wenig Verbesserung brachte (Daten ohne Abbildung). Zudem war die F2-Generation während der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar. Deswegen wurden Versuche an der Primärtransformante bzw. den Samen der F1-Generation durchgeführt.

Die Behandlung von Keimlingen mit Oxyfluorfen in moderater Konzentration erbrachte einen Hinweis auf eine gesteigerte Resistenz der BelWgst27-Transformante gegenüber dem Wildtyp BelW3. Abhängig von der Oxyfluorfenkonzentration und dem Alter der Pflanzen zeigte sich an jungen Pflanzen ein tendenziell verminderter Chlorophyllverlust (Abbildung 24, S. 56 und Abbildung 25, S. 57). Es ist denkbar, dass unter anderen Konzentrationen und Wachstumsbedingungen diese Resistenz deutlicher zu Tage tritt.

Die Behandlung von Keimlingen mit PPIX führte bei Inkubation im Dunkeln zu keinem nennenswerten Unterschied des Chlorophyllgehaltes von BelW3 und BelW3gst27. Bei Belichtung wurde der Chlorophyllgehalt im Wildtyp durch PPIX stark vermindert; in der Transformante hingegen blieb er nahezu unverändert. Durch die Überexpression der GST27 wird demnach ein Schutz vor der peroxidierenden Wirkung durch PPIX vermittelt.

Roxas et al. (1997) fanden eine bessere Keimung bei niederen Temperaturen und unter Salzstress bei Tabak mit einer transgenen GST/GPX aus Tabak. Erste Untersuchungen der F1-Generation von BelW3 mit Überexpression der GST27 aus Mais zeigten gegenüber dem Wildtyp ebenfalls eine bessere Kälte- und Salztoleranz der Sämlinge (Daten ohne Abbildung).

Um beurteilen zu können, ob die Überexpression der GST27 zu einer verbesserten oxidativen Abwehr beiträgt, wurden Blattstücke von Stecklingen des Wildtyps und der Primärtransformante mit Paraquat und H₂O₂ behandelt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die BelW3gst27-

Transformante bei Paraquatgabe geringere Schädigung (Abbildung 26, S. 58). Dieser Effekt ist vermutlich nicht direkt auf eine bessere Entgiftung von ROS zurückzuführen, da exogen gegebenes H₂O₂ im Wildtyp und im Transgen gleichermaßen schnell abgebaut werden konnten, sondern auf eine Verminderung der durch oxidativen Stress hervorgerufenen Membranschäden.

Die Überexpression der GST27 aus *Zea mays* ist demnach in der Lage, im Tabakkultivar BelW3 sowohl Schutz gegenüber oxidativem Stress durch PPIX als auch gegenüber Paraquat zu vermitteln.

4.6 MÖGLICHE BETEILIGUNG DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN AM TETRAPYRROLSTOFFWECHSEL

Die protektive Wirkung der GSTs gegenüber PPIX-induziertem oxidativen Stress wurde in unserer Arbeitsgruppe auch an Sojazellkulturen (Knörzer et al., 1999) und an etiolierten Maisblättern (Böger und Miller, 1994) belegt. Allerdings trat in beiden Systemen zudem eine Verminderung der herbizidinduzierten PPIX-Akkumulation bei erhöhter GSTs-Aktivität auf, die nicht mit deren antioxidativer Wirkung allein erklärt werden kann. Die Reduktion der PPIX-Menge basierte hierbei offenbar nicht auf einer verminderten Biosynthese, da die Hemmung der PPOX unverändert blieb. PPIX kann in Pflanzen durch eine nicht genauer charakterisierte glutathionabhängige Peroxidase abgebaut werden (Dayan et al., 1999). Da die GST27-Isoform Glutathionperoxidase-ähnliche Eigenschaften besitzt, war es naheliegend, die Fähigkeit der GSTs zum enzymatischen Umsatz des PPIX zu testen. Wie Edwards et al. (2000) zu Bedenken geben, besteht die Möglichkeit, daß GSH-Konjugate insbesondere in der Vakuole instabil sind und deswegen *in vivo* keine Glutathionisierung nachzuweisen ist. Diese Möglichkeit konnte durch die Verwendung eines *in vitro*-Systems mit gereinigten rekombinanten GST Isoformen aus Mais ausgeschlossen werden.

Keine der Isoformen der untersuchten GSTs war *in vitro* in der Lage, PPIX zu glutathionisieren oder zu degradieren, wie anhand verschiedener Testsysteme überprüft wurde (Abbildung 33, S. 70; Daten z. T. ohne Abbildung).

Alle GST-Isoformen sind jedoch in der Lage, PPIX zu binden (Abbildung 34, S. 71). Diese Bindung war nicht kovalent, da nach Auflösung der Tertiärstruktur keine Bindung auftrat. Im Vergleich mit anderen Reinproteinen zeigte sich, dass die Bindung spezifisch ist, da keinerlei Interaktion mit PPIX beobachtet werden konnte. Nur mit Rinderserumalbumin (BSA), welches in der Lage ist, Tetrapyrrole zu binden und transportieren, wurde eine PPIX-Bindung nachgewiesen.

Die Bindung von PPIX und anderen Tetrapyrrolen an die GSTs führte zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität (Abbildung 36 bis Abbildung 38, S. 73, 74 und 75).

Die Hemmung der GSTs wurde durch Modifikationen im Substitutionsmuster des Tetra-

pyrrolgrundgerüsts beeinflusst. Mesoporphyrin besitzt beispielsweise Ethyl-Gruppen an Position 3 und 8 des Porphyringerüsts (statt Vinyl -Gruppen wie PPIX), die Hemmung war zwei- bis fünfmal geringer (Abbildung 37, S. 74). Singh und Shaw (1988) fanden eine Hemmung der GST-Aktivität in Rohextrakten von Saathafer sowohl durch metallhaltige Tetrapyrrole wie Chlorophyllin und Hämin als auch in geringerem Maße durch lineare Tetrapyrrole wie Bilirubin und Biliverdin. Auch Oxyfluorfen, das in der Form in etwa einem halben Tetrapyrrol entspricht (Nandihalli et al., 1992), hemmte in hoher Konzentration die GST aus Mais (Abbildung 36, S. 73).

PPIX wird allerdings nicht an der Bindungsstelle für potenzielle Substrate (der sogenannten H-Tasche) der GSTs gebunden, wie anhand von Lineweaver-Burk-Diagrammen bestimmt wurde (Abbildung 39, S. 76). Dixon et al. (1999) fanden durch das Tetrapyrrol Chlorophyllin ebenfalls eine nichtkompetitive Bindung bezüglich der variablen H-Bindungsstelle bei Untersuchungen an Reinenzymen der GST aus Saatweizen. Somit wird biochemisch erklärbar, warum keine Konjugation des PPIX an GSH durch GSTs in der HPLC-Analyse der Substrate nachweisbar ist. Tetrapyrrole binden nicht an die hierfür maßgebende Bindungstasche und können deswegen nicht glutathionisiert werden.

Die Interpretation der Hemmdaten zeigte allerdings eine kompetitive Bindung der Tetrapyrrole an die G-Bindungsstelle (Abbildung 40, S. 77). Die G-Bindungstasche, die der Bindung des GSH dient, vermag nur sterisch sehr nahe verwandte Analoga des GSH zu binden. Aufgrund von Kristallisationsdaten und Verdrängungsstudien nehmen Wilce und Parker (1994) an, dass Tetrapyrrole in der Kluft zwischen den beiden Untereinheiten der GSTs binden. Die vorgeschlagene Bindungsstelle liegt in unmittelbarer Nähe zur GSH-Bindungstasche. Somit ist es naheliegend, die Inhibierung der GSTs durch PPIX gegenüber GSH nicht als kompetitiv, sondern als pseudokompetitiv zu bezeichnen.

Eine physiologische Relevanz der Hemmung von GSTs durch Tetrapyrrole ist allerdings unwahrscheinlich, da die gemessenen I_{50} -Werte im mikromolaren Konzentrationsbereich bei natürlich auftretenden Konzentrationen an freien Porphyrinen nur eine irrelevante Hemmung der GSTs bewirken könnten, zumal GSTs bis zu 1 % der löslichen Proteine einer Pflanze ausmachen können.

Gerade diese hohe Konzentration an GSTs deutet im Verein mit der Erkenntnis, dass die Mehrzahl der bislang bekannten endogenen Substrate nicht umgesetzt, sondern nur gebunden wird, auf eine Rolle der GSTs als Bindeproteine hin (Walbot et al., 2000). Die Dissoziationskonstanten der untersuchten Porphyrine belegen eine starke Affinität der GSTs im nano- bis mikromolaren Bereich (Abbildung 42, S. 80). Die Porphyrinstruktur bestimmt die Bindungsaffinität hierbei maßgeblich. Vergleichbares wurde von der Interaktion humaner GSTs mit Porphyrinen berichtet (Tipping et al., 1978; Smith et al., 1985).

Zwischen den pflanzlichen GSTs und Porphyrinen kann eine physiologisch relevante Bindung angenommen werden, da freie Porphyrine in der Zelle in nanomolaren Konzentrationen vor-

liegen und die GSTs in mindestens mikromolaren Konzentrationen vertreten sind. Zudem sind in Geweben mit erhöhtem Pool an freien Porphyrinen, wie etiolierten Blättern und Wurzeln, GSTs in hoher Konzentration und Aktivität vorhanden (vgl. Abschnitt 4.4.1).

4.7 SCHUTZFUNKTION DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN IM TETRAPYRROLMETABOLISMUS – EINE NEUE PHYSIOLOGISCHE ROLLE?

GSTs könnten in Analogie zum tierischen Tetrapyrrolmetabolismus (Smith, 1987) auch in Pflanzen am intrazellulären Transport von Porphyrinen beteiligt sein. Die Synthese von Protoporphyrinogen, des grundlegenden Tetrapyrrolgerüsts, findet ausschließlich im Chloroplasten statt (Beale 1999). Von dort müssen die anderen Organellen mit Vorstufen für Häm und Phytochrom versorgt werden. Über den hierfür notwendigen Transport von Tetrapyrrolen, in erster Linie Protoporphyrinogen, liegen nur wenige Erkenntnisse vor.

Die vollständig reduzierten Porphyrine, die Porphyrinogene, werden allerdings in wässriger Lösung sehr schnell autooxidiert. Zudem wurde in Pflanzen die Existenz einer membran-gebundenen unspezifischen Oxidase nachgewiesen, die bei hohen Porphyrinogen (Pgen)-Konzentrationen zu Bildung von PPIX führt. Somit ist für die Weiterleitung des Pgen vom Chloroplasten zum Mitochondrium ein Transport- und Schutzmechanismus vonnöten. Die GST26/26 ist, wie die hier vorgelegten Untersuchungen belegen, in der Lage, diese Aufgabe zu übernehmen. Sie bindet zum Einen Porphyrine mit hoher Affinität (Abbildung 42, S. 80). Zum Anderen ist sie in der Lage, die Autoxidation des Pgen zu PPXI zu verhindern (Abbildung 43, S. 82). Die Bedeutung eines koordinierten Protoporphyrin(ogen)-Transportes wird durch eine Mutante mit fehlendem ABC-Transporter unterstrichen, die durch starke Akkumulation von PPIX geschädigt ist (Møller et al., 2001).

Der Pool an freiem und lose gebundenem Häm im Chloroplasten liegt im mikromolaren Konzentrationsbereich (Thomas und Weinstein, 1990). Einen nicht unerheblichen Anteil der hämhaltigen Enzyme machen die Catalasen aus, die zudem eine recht geringe Halbwertszeit von 3 - 4 h besitzen (Feierabend et al., 1996). Auch das Häm oder eine seiner Vorstufen muss von den Biosyntheseorten im Plastiden oder Mitochondrium in das Cytoplasma transportiert werden, wo es als Cofaktor mannigfaltiger Enzyme benötigt wird (z. B. Catalasen, Peroxidasen, P450 Mono-Oxygenasen). Im tierischen System wurde eine GST als Transferprotein des Häm vom Syntheseort im Mitochondrium zum Cytosol, dem Ort des Einbaus in Apoproteine charakterisiert (Senjo et al., 1985).

Die eisenhaltige Tetrapyrrole sind sehr redoxsensitiv. So unterliegt das Fe II-haltige Häm in wässrigem, sauerstoffhaltigem Medium einer starken Oxidation zum Hämin (Fe III). Das Hämin wird sehr schnell durch H₂O₂ zerstört. Demnach muss auch hier ein Schutzmechanismus die ansonsten auftretende Degradation unterbinden.

Die GST-Isoformen binden in unterschiedlichem Maße an Hämin, wie aus der Verschiebung der Soret-Bande des Hämin ersichtlich ist (Abbildung 44, S. 83). Der H_2O_2 -Abbau des Hämin wird durch die GST26/26 kaum, durch die GST29/29 zum Teil vermindert (Daten ohne Abbildung). Die GST27/27 hingegen kann den Abbau fast vollständig verhindern. Eine physiologische Entsprechung dieses biochemischen Befundes findet sich im Induktionsmuster der GST27/27. Sie wird unter oxidativem Stress induziert, also unter Bedingungen, welche erhöhte Konzentrationen an H_2O_2 und gleichzeitig einen erhöhten Bedarf an hämhaltigen Enzymen wie z. B. Catalasen und Peroxidasen hervorrufen.

In vielen Untersuchungen zu antioxidativem Stress und zur Pathogenabwehr wurde eine sehr frühe und starke Induktion von GSTs nachgewiesen. Bislang konnte allerdings für keine der pflanzlichen GSTs ein signifikanter Umsatz von H_2O_2 nachgewiesen werden. Ihre katalytische Fähigkeit liegt in der Entgiftung von organischen Hydroperoxiden und toxischen Alkenalen, beides Produkte, die aus einer zellulären Attacke von ROS resultieren. Die überaus frühe Induktion der GSTs nach oxidativem Stress - noch vor den dominierenden H_2O_2 -abbauenden Enzymen APX und CAT - lässt sich schwerlich mithilfe ihres antioxidativen Potentials erklären. Allerdings gewinnt die schnelle Induktion der GSTs an Bedeutung, wenn ihre Binde- und Schutzeigenschaften gegenüber Porphyrinen in Betracht gezogen werden. APX und CAT sind, neben den anderen Schutzenzymen, hämhaltige Proteine.

Spezifische GST-Isoformen erfahren eine sehr schnelle Induktion unter oxidativem Stress (Conclin und Last, 1995). Andere antioxidative Enzyme werden später induziert. Es erscheint deswegen unwahrscheinlich, dass die Rolle der GSTs allein in der Entgiftung von Lipidhydroperoxiden liegt, da deren Ursache, die Einwirkung von ROS auf Membranen, nicht durch die vorgeschaltete Induktion antioxidativer Enzyme verhindert wird. Viele der antioxidativen Enzyme, so die Catalasen, Ascorbatperoxidasen und Peroxidasen, benötigen Häm als Cofaktor. Für die funktionale Expression dieser antioxidativen Enzyme ist demnach der Einbau des aus Protoporphyrin gebildeten Häm zwingend notwendig. Unter oxidativem Stress (vermittelt durch H_2O_2) sind Fe-Porphyrine in wässriger, sauerstoffhaltiger Lösung instabil. Der Schutz des Häm(in) kann durch Isoformen der GSTs gewährleistet werden. Somit könnte die schnelle Induktion der GST unter Stress primär dem (Fe-)Porphyrinschutz dienen. Der Schutz der Membranen vor fortschreitender Lipidperoxidation unterstützt die Abwehrfunktion zusätzlich.

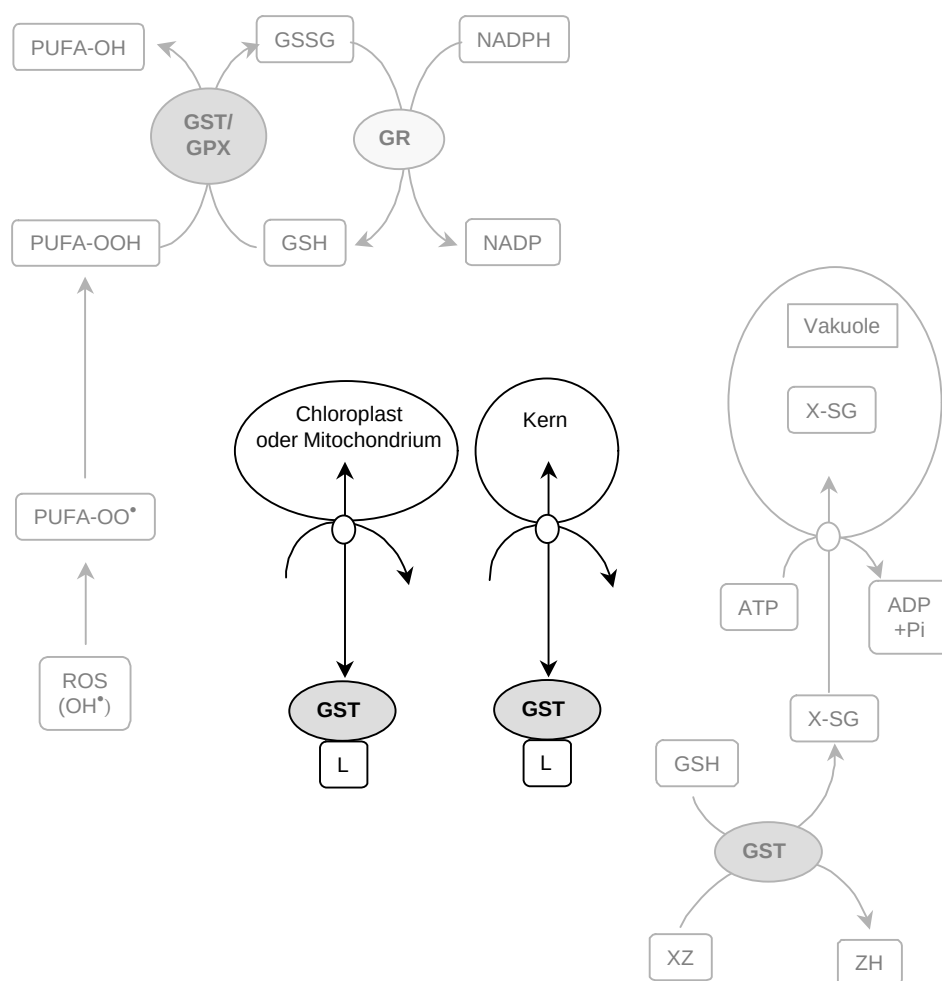


Abbildung 46: Erweiterte Funktion der Glutathion S-Transferasen im Zellstoffwechsel.

Glutathion S-Transferasen sind in der Lage, Xenobiotika durch Glutathionisierung und / oder Vakuolentransport zu entgiften (rechtes Piktogramm, hellgrau). Sie unterstützen darüber hinaus die antioxidative Abwehr mittels ihrer Fähigkeit, organische Hydroperoxide zu reduzieren (linkes Piktogramm, hellgrau). Eine mögliche neue Funktion umfasst den Schutz und Transport von Tetrapyrrolen (Mitte, schwarz), wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten lassen.

Mehrfach ungesättigte Fettsäure-Hydroxyalkenale (**PUFA-OH**); mehrfach ungesättigte Fettsäure-Hydroperoxide (**PUFA-OOH**); mehrfach ungesättigte Fettsäureperoxyl-Radikale (**PUFA-OO•**); Reaktive Sauerstoffspezies (**ROS**); Hydroxyl-Radikal (**OH•**); Glutathiontransferase (**GST**); Glutathionperoxidase (**GPX**); reduziertes Glutathion (**GSH**); oxidiertes Glutathion (**GSSG**); Glutathionreduktase (**GR**); xenobiotischer oder toxischer Metabolit (**XZ**, z.B. Hydroxyalkenale) mit nucleophiler Abgangsgruppe (**Z**) und durch Glutathiontransferase mit GSH kondensierter Gruppe (**X**; mit **SG** als Rest des GSH im Konjugat); Ligand, z. B. Tetrapyrrole (**L**).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung des antioxidativen Systems höherer Pflanzen gab Aufschluß über eine Modulation unter der Einwirkung unterschiedlich wirkender peroxidierender Agentien sowie über eine Modulation bei gezielter Erhöhung einer Komponente der Stressabwehr.

- 1.) Bei plastidärem und cytosolischem oxidativen Stress wurde eine unterschiedliche, kompartimentspezifische Regulation beobachtet:

Durch cytosolischen Stress bei Paraquatbehandlung wurden die Enzyme des antioxidativen Systems auf transkriptioneller Ebene nur wenig verändert, obgleich eine starke plastidäre, aber auch cytosolische Belastung auftrat.

Bei Behandlung mit Oxyfluorfen, das zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im cytosolischen Kompartiment führt, war hingegen eine starke Induktion der meisten cytosolischen antioxidativen Schutzenzyme zu beobachten. Die untersuchten plastidären Enzyme blieben unverändert.

Im Cytosol wird demzufolge der Schutz vor auftretenden Sauerstoffradikalen primär über die differenzierte Induktion antioxidativer Schutzenzyme vermittelt. Der Chloroplast ist aufgrund der hohen Konzentration an antioxidativen Enzymen bei einem großen Regenerationspotential der niedermolekularen Antioxidantien bestmöglich gegen Radikale geschützt. Ein Schutzwirkung gegenüber oxidativem Stress kann aber durch Stärkung der cytosolischen Abwehr erzeugt werden, wie anhand der Transformante mit cytosolischer Überexpression der Glutathionreduktase gezeigt werden konnte.

- 2.) Der Vergleich verschiedener Tabakkultivare zeigte eine stark verminderte Transkription der photorespiratorischen Catalase in BelW3. Da dieser Isoform der Großteil der Catalaseaktivität in Blättern zuzuordnen ist, liegt hierin vermutlich ein Grund für die bislang molekularbiologisch noch ungeklärte Ozonsensitivität dieses Kultivars.

Die cytosolische Überexpression der bakteriellen Glutathionreduktase in BelW3gor führt zwar zu einer höheren Resistenz gegenüber Paraquat und H₂O₂, zieht aber auch eine erhöhte Lichtsensitivität nach sich.

Neben der gesteigerten Aktivität der Glutathionreduktase trat in der Transformante eine transkriptionelle Verminderung der plastidären Violaxanthindeepoxidase und der cytosolische CuZn-Superoxiddismutase im Vergleich zum Wildtyp auf.

Diese pleiotropen Effekte erklären zum Einen, warum die Überexpression eines Schutzzyms nicht notwendigerweise eine Verbesserung der Stressresistenz nach sich zieht. Zum Anderen zeigt sich hierdurch die enge Vernetzung und die komplexe Regulation des antioxidativen Systems.

- 3.) Es konnte gezeigt werden, daß die Glutathion S-Transferasen eine wichtige Ergänzung des klassischen antioxidativen Systems darstellen.

Die GST27-Untereinheit wurde als einzige der untersuchten Isoformenuntereinheiten durch die Herbizide Oxyfluorfen und Paraquat induziert. Diese Induktion auf mRNA- und Proteinebene wurde nicht durch die Herbizide *per se*, sondern durch deren peroxidierende Wirkung ausgelöst.

Die transgene Tabakpflanze mit Überexpression der GST27 (BelW3gst27) zeigte eine verbesserte Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Im Vergleich zum Wildtyp wurde sie durch Behandlung mit Paraquat, H₂O₂ und Protoporphyrin weniger geschädigt.

- 4.) Das Expressionsmuster der verschiedenen GST-Isoformen und die Interaktion der GSTs mit Porphyrinen *in vitro* gaben Aufschluß über eine potentielle Funktion im pflanzlichen Tetrapyrrolstoffwechsel.

GSTs sind nicht in der Lage, Protoporphyrin zu glutathionisieren oder abzubauen. Sie können aber Porphyrine mit sehr großer Affinität binden. Die Bindung des Protoporphyrin ist reversibel und gegenüber der Bindungsstelle für Glutathion kompetitiv. Bezüglich der Bindungsstelle für zu glutathionisierende Substrate ist sie nichtkompetitiv.

Insbesondere die GST26/26 ist in der Lage, Protoporphyrinogen vor der Autoxidation zum toxischen Protoporphyrin zu schützen. Sie wird in Wurzeln und etiolierten Blättern verstärkt exprimiert.

Die GST27/27 ist in der Lage, den Abbau des Hämin durch H₂O₂ zu vermindern. Da sowohl Degradation als auch Bedarf an Häm(in) unter oxidativem Stress steigen, ist die beobachtete Induktion unter peroxidierenden Bedingungen möglicherweise auch auf diese Schutzfunktion zurückzuführen.

Diese bislang unbekannten biochemischen Eigenschaften ordnen pflanzlichen GSTs eine neue physiologische Rolle zu. GSTs könnten durch ihre Fähigkeit, Tetrapyrrole hochaffin zu binden und vor oxidativen Schäden zu schützen, eine wichtige Aufgabe im Tetrapyrrolstoffwechsel übernehmen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aebi H. E. (1983). Catalase. In: Methods of enzymatic analyses, Vol. 3 (H. U. Bergmeyer, ed.), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273-282
- Alfenito M. R., Souer E., Goodman C. D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10: 1135-1149
- Allen R. D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1054
- 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
- Antonielli M., Pasqualini S., Ederli L., Batini P., Moscatello S., Loreto F. (1997). Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. *Environ. Exp. Bot.* 38: 271-277
- Aono M., Kubo A., Saij H., Tanaka K., Kondo N. (1993). Enhanced tolerance to photo-oxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol.* 34: 129-135
- Aono M., Kubo A., Saji H., Natori 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., Saij H., Sakamoto A., Kondo N., Tanaka, K. (1995). Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol.* 36: 1687-1691
- Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (Foyer C. H., Mullineaux P. M., eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 77-104
- Babbs C. F., Pham J. A., Coolbaugh R. C. (1989). Lethal hydroxyl radical production in paraquat treated plants. *Plant Physiol.* 90: 1267-1273
- Badenhorst P. W., Amory A. M., Hockett B. I. (1998). Light regulation of native and *Escherichia coli* glutathione reductase in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* 152: 502-509
- Baker C. J., Orlandi E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321

- Bartling D., Radzio R., Steiner U., Weiler E. W. (1993). A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 216: 579-586
- Batini B., Ederli L., Pasqualini S., Antonielli A., Valenti V. (1995). Effects of the ethylendiurea and ozone in detoxificant ascorbic-ascorbate peroxidase system in tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 717-723
- Beale, S. I. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60: 43-73
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287
- Bi Y.-M., Kenton P., Mur L., Darby R., Draper J. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8: 235-245
- Boehler-Kohler B. A., Schopf M., Böger P. (1981). The effect of paraquat on membrane lipids. In: *Photosynthesis IV. Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment* (Akoyunoglou G., ed.). Balaban International Science Services, Philadelphia
- Böger P. (1964). Das Strukturprotein aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. *Flora* 154: 174-211
- Böger P., Miller R. (1994). Protoporphyrin accumulation induced by peroxidizing herbicides is counteracted by safeners. *Z. Naturforsch.* 49c: 775-780
- Böger P., Kunert K.-J. (1978). Phytotoxic action of paraquat on the photosynthetic apparatus. *Z. Naturforsch.* 33c: 668-694
- Bowler C., Chua N.-H. (1994). Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* 6: 1529-1541
- 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
- Broadbent P., Creissen, G. P., Kular B., Wellburn A. R., Mullineaux P. M. (1995). Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J.* 8: 247-255
- Casano L. M., Martin M., Zapata J. M., Sabater B. (1999). Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against oxidative stress. *Plant Sci.* 149: 13-22
- Chamnongpol 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.* 9: 491-503

- Chance B., Maehly A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: Methods in Enzymology, Vol. 2 (S. P. Colowick, N. O. Kaplan, eds.), Academic Press, New York, pp. 764-775
- Chang C. J., Kao C. H. (1997). Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. *Physiol. Plant.* 101: 471-476
- Chen W., Chao G., Singh K. B. (1996). The promotor of a H₂O₂-inducible *Arabidopsis* glutathione S-transferase contains closely linked obf- and obp1-binding sites. *Plant J* 10: 955-966
- Cole D. J., Cummins I., Hatton P. J., Dixon D., Edwards R. (1997). Glutathione transferases in crops and major weeds. In: Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. (Hatzios K. K., ed.), Kluwer Akad. Publ. Dordrecht, pp. 139-154
- Conklin P. L., Last R. L. (1995). Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol.* 109: 203-208
- Creissen G., Broadbent P., Stevens R., Wellburn A. R., Mullineaux P. (1996) Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 465-469
- Davies K. J. A. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic live. In: Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives (Rice-Evans C., Halliwell B., Lunt G. G.; eds.), Biochem. Soc. Symp. 61, Portland Press, London, pp. 1-31
- Dayan F. E., Rimando A. M., Duke S. O., Jacobs N. J. (1999). Thiol-dependent degradation of protoporphyrin IX by plant peroxidases. *FEBS Lett.* 444: 227-230
- Dean J. V., Devarenne T. P. (1997). Peroxidase-mediated conjugation of glutathione to unsaturated phenylpropanoids: evidence against glutathione S-transferase involvement. *Physiol. Plant.* 99: 271-278
- Dean J. V., Devarenne T. P., Lee I-S, Orlofsky L. E. (1995). Properties of a maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoids. *Plant Physiol.* 102: 985-994
- Dixon D., Cole D. J., Edwards R. (1997). Characterisation of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). *Pestic. Sci.* 50: 72-82
- Dixon D., Cole D. J., Edwards R. (1999). Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. *Plant Mol. Biol.* 40: 997-1008
- Dixon D. P., Cummins I., Cole D. J., Edwards R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 258-266

- Donahue J. L., Okpodu C. M., Cramer C. L., Grabau E. A., Alschner R. G. (1997). Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiol.* 113: 249-257
- Droog F. N. J., Hooykaas P. J. J., Libbenga K. R., van der Zaal B. J. (1993). Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows *in vitro* GST activity. *Plant Mol. Biol.* 21: 965-972
- Droog F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Reg.* 16: 95-107
- Drotar A., Phelbs P., Fall R. (1985). Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* 42: 35-40
- Durner J., Knörzer O. C., Böger P. (1993). Ketol-acid reductoisomerase from barley (*Hordeum vulgare*): purification, properties and specific inhibition. *Plant Physiol.* 103: 903-910
- Durner J., Shah J., Klessig D. F. (1997). Salicylic acid and the induction of defense genes. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274
- Ederli L., Pasqualini S., Batini P., Antonielli M. (1997). Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *J. Plant Physiol.* 151: 422-428
- Edwards R. (1996). Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant* 98: 594-604
- Edwards R., Dixon D. P., Walbot V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193-198
- Elstner E. F. (1990). *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- Feierabend J., Streb P., Schmidt M., Dehne S., Shang W. (1996). Expression of catalase and its relation to light stress and stress tolerance. In: *Physical Stresses in Plants. Genes and their Products for Tolerance* (Grillo S., Leone A., eds.), Springer Berlin, Heidelberg, pp. 223-234
- Formin A., Knödl T., Arndt U. (1995). Bioindikatornetz Niederlausitz: Aktives Biomonitoring mit *Nicotiana tabacum* BelW3 und *Populus euramericana* var. Gelrica zum Nachweis der regionalen Ozonimission. In: *1. Hohenheimer Workshop zur Bio-indikation am Kraftwerk Altbach-Deizisau 1995: Bioindikation – Neue Entwicklungen, Nomenklatur, synökologische Aspekte* (Arndt U., Formin A., Lorenz S. eds.), Verlag Günther Heimbach, Ostfildern, pp. 221-229

- Foyer C. H., Harbinson, J. (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (Foyer C. H., Mullineaux P. M., eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1-42
- Foyer C. H., Lelandais M., Galap C. und Kunert K. J. (1991). Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* 97: 863-872
- Foyer C. H., Noctor G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146: 359-388
- Foyer C. H., Theodoulou F. L., Delrot S. (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 486-492
- Gaillard C., Dufaud A., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N., Martinoia E. (1994). A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett.* 352: 219-221
- Gressel J., Galun E. (1994). Genetic controls of photooxidative stress tolerance. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (Foyer C. H., Mullineaux P. M., eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 237-274
- Griffith O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207-212
- Grove G., Zarlengo R. P., Timmerman K. P., Li N., Tam M., Tu C.-P. D. (1988). Characterization and heterospecific expression of cDNA clones of genes in the maize GSH S-transferase multigene family. *Nucl. Acids Res.* 16: 425-438
- Hahn K., Herget C., Strittmatter C. (1994). PR-gene *prp1-1* from potato: Regulation of its expression and functional analysis of the gene product. In: Abstr. 4th. Int. Congr. Plant Mol. Biol., No. 1764., Kluwer Publ., Dordrecht
- Halliwell B., Foyer C. H. (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139: 9-17
- Halliwell B., Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 137-176
- Hamlyn J. N. (1989). *Plants under Stress: Biochemistry, Physiology and Ecology and their Application to Plant Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Heggestad H. (1991) Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ. Pollut.* 74: 264-291
- Hock B., Elstner, E. F. (1995). *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

- Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. (1996). Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.* 98: 685-692
- Hossain M. A., Asada K. (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25: 85-92
- Hossain M. A., Nakano Y., Asada K. (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25: 385-395
- Inzé D., van Montagu M. (1995). Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 153-158
- Irzyk G. P., Fürst E. P. (1997). Characterization and induction of maize glutathione S-transferases involved in herbicide detoxification. In: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants.* (Hatzios K. K., ed.), Kluwer Akad. Publ. Dordrecht, pp. 155-170
- Jacobs J. M., Jacobs N. J. (1993). Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids. *Plant Physiol.* 101: 1181-1187
- Jepson I., Holt D. C., Roussel V., Wright S. Y., Greenland A. J. (1997). Transgenic plant analysis as a tool for the study of maize glutathione S-transferases. In: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants.* (Hatzios K. K., ed.), Kluwer Akad. Publ. Dordrecht, pp. 313-323
- Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Mullineaux P. C. (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in arabidopsis during light stress. *Plant Cell* 9: 627-640
- Kirtikara K., Talbot D. (1996). Alteration in protein accumulation, gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato (*Lycopersicum esculentum*) under paraquat and ozone stress. *J. Plant Physiol.* 148: 752-760
- Knörzer O. C. und Böger P. (1999). Antagonizing Peroxidizing herbicides. In: *Peroxidizing Herbicides* (Böger P., Wakabayashi K., eds), Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 303-327
- Knörzer O. C., 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
- Knörzer O. C., Lederer B., Durner J., Böger P. (1999). Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiol. Plant.* 107: 294-302

- Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E. (1996). Old enzymes for a new job – Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.* 111: 349-353
- Lämmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamola A. A., Asher V., Muller-Eberhardt U., Poh-Fitzpatrick M. (1981). Fluorimetric study of the binding of protoporphyrin to haemopexin and albumin. *Biochem. J.* 196: 693-698
- Lamoureux G. L., Rusness D. G. (1993). Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (de Kok L. J., Stulen I., Rennenberg H., Brunold C., Rauser W., eds.), SPB Academic Publishing BV, Hague, Netherlands, pp. 221-237
- Larcher W. (1987) Stress bei Pflanzen. *Naturwiss.* 74: 158-167
- Larcher W. (1994) Ökophysiologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp.255-353
- Law M. Y., Charles S. A., Halliwell B. (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem. J.* 210: 899-903
- Lermontova I., Grimm B. (2000). Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol.* 122: 75-83
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Longa M. A., del Río L. A., Palma J. M. (1994). Superoxide dismutases of chestnut leaves, *Castanea sativa*: characterization and study of their involvement in natural leaf senescence. *Physiol. Plant.* 92: 227-232
- Lopez F., Vansuyt G., Casse-Delbart F., Fourcroy P. (1996). Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Physiol. Plant.* 97: 13-20
- Madamanchi N. R., Anderson J. V., Alscher R. G., Cramer C. L., Hess J. L. (1992). Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiol.* 100: 138-145
- Marrs K. A. (1996). Function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158
- Marrs K. A., Alfenito M. R., Lloyd A. M., Walbot V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375: 397-400

- Matringe M., Camadro J.-M., Labbe P. und Scalla R. (1989). Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260: 231-235
- Matringe M., Scalla R. (1988). Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons: porphyrin accumulation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32: 164-172
- Mauch F., Dudler R. (1993). Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102: 1193-1201
- McGonigle B., Keeler S. J., Lau S.-M. C., Koeppe M., O'Keefe D. P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant. Physiol.* 124: 1105-1120
- McKersie B. D., Chen Y., de Beus M., Bowley S. R., Bowler C., Inzé D., D'Halluin K., Botterman J. (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155-1163
- Mehdy M. C., Sharma Y. K., Satjasivan K., Bays N. W. (1996). The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98: 365-348
- Mittler R., Feng X., Cohen M. (1998). Post-Transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10: 461-473
- Mittler R., Zilinskas B. A. (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 212: 540-546
- Miyagawa Y., Tamoi M., Shigeoka S. (2000). Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 41: 311-320
- Mock H.-P., Keetman U., Kruse E., Rank B., Grimm B. (1998). Defense responses to tetrapyrrole-induced oxidative stress in transgenic plants with reduced uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase activity. *Plant Physiol.* 116: 107-116
- Møller S. G., Kunkel T., Chua N.-H. (2001). A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Develop.* 15: 90-103
- Moore R. E., Davies M. S., O'Connell K. M., Harding E. I., Wiegand R. C., Tiemeier D. C. (1986). Cloning and expression of a cDNA encoding a maize glutathione S-transferase in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* 14: 7227-7235
- Mueller L. A., Goodman C. D., Silady R. A., Walbot V. (2000). AN9, a *Petunia* glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123: 1561-1570

- Murai R., Murai K. (1996). Different transcriptional regulation of cytosolic and plastidic Cu/Zn-superoxide dismutase genes in *Solidago altissima* (Asteracea). *Plant Sci.* 120: 71-79
- Nakano Y., Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880
- Nandihalli U. B., Duke M. V., Duke S. O. (1992). Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43: 193-211
- Navari-Izzo F., Quadracci M. F., Sgherri C. M. L. (1996). Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 447-450
- Neuefeind T., Huber H., Dasenbrock H., Prade L., Bieseler B. (1997). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoglutathione: Evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.* 274: 446-453
- Nicolaus B., Sato Y., Wakabayashi K., Böger P. (1997). Activation of proherbicides by glutathione S-transferase. In: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants* (Hatzios K. K., ed.), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 183-196
- Nicolaus B., Sandmann G., Böger P. (1993). Molecular aspects of herbicide action on protoporphyrinogen oxidase. *Z. Naturforsch.* 48c: 326-333
- Nicolaus B., Sato Y., Wakabayashi K., Böger P. (1996). Isomerisation of peroxidizing thiadiazolidine herbicides is catalyzed by glutathione S-transferase. *Z. Naturforsch.* 51c: 342-354
- Niki E., Tsuchiya J., Tanimura R. und Kamiya Y. (1982). Regeneration of vitamin E from chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem. Lett.* 789-792
- Noctor G., Arisi A.-C. M., Jouanin L., Foyer C. H. (1999). Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.* 50: 1157-1167
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Foyer C. H. (2000). Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signaling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 1465-1475
- O'Kane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. (1996). Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* calli. *Planta* 198: 371-377
- Okamura M. (1980). An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin. Chim. Acta* 103: 259-268
- Övar B. L., McPherson J., Ellis E. E. (1997). Preactivating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant J.* 11: 203-212

- Pasqualini S., Batini P., Ederli S., Antonielli M. (1995). Changes induced by ozone in protein pattern of two tobacco cultivars. In: Photosynthesis: From Light to Biosphere, (Mathis, P ed.), Kluwer Acad. Publ., Netherlands 4: 413-416
- Pell E. J., Schlagnhauser C. D., Arteca R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* 100: 264-273
- Pitcher L. H., Repetti P., Zilinskas B. A. (1994). Overproduction of ascorbate peroxidase protects transgenic tobacco against oxidative stress (abstract No. 623). *Plant Physiol.* 105: 116
- Pitcher L. H., Brennan E., Hurley A., Dunsmuir P., Tepperman J. M., Zilinskas B. A. (1991). Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc superoxiddismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 97: 452-455
- Polle A. (1996). Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis? *Bot. Acta* 109: 84-89
- Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in the chloroplasts by metabolic modeling. Computer stimulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462
- Rao M. V., Paliyath C., Ormrod D. P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136
- Retzlaff K. und Böger P. (1996). An endoplasmic reticulum plant enzyme has protoporphyrinogen IX oxidase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54: 105-114
- Roxas V. P., Smith R. K., Allen E. R., Allen R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 16: 988-991
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sandermann Jr. H. (1996). Ozone and plant health. *Annu. Rev. Plant Pathol.* 34: 347-366
- Sandmann G., Böger P. (1988). Accumulation of protoporphyrin IX in the presence of peroxidizing herbicides. *Z. Naturforsch.* 43c: 699-704
- Saran M., Michel C., Bors W. (1998). Radical functions in vivo: A critical review of current concepts and hypotheses. *Z. Naturforsch.* 53c: 210-227
- Scandalios J. G. (1994). Regulation and properties of plant catalases. In: *Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (Foyer C. H., Mullineaux P. M., eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 275-314

- Scandalios J. C. (1997). Molecular biology of the antioxidant defense genes encoding catalases and superoxid dismutases in maize. In: Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants (Hatzios K. K., ed.). Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 97-108
- Schraudner M., Langebartels C., Sandermann Jr. H. (1996). Plant defense systems and ozone. Biochem. Soc. Trans. 24: 456-461
- Schraudner M., Moeder W., Wiese C., van Camp W., Inzé D., Langebartels C., Sandermann Jr H. (1998). Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco BelW3. Plant J. 16: 235-245
- Schwacke und Hager (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cultured cells that is dependent on Ca^{2+} and protein kinase activity. Planta 187: 139-141
- Sen Gupta A., Heinen J. L., Holaday A. S., Burke J., Allen R. D. (1993a). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1629-1633
- Sen Gupta A., Webb R. P., Holaday A. S., Allen, R. D. (1993b). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. Plant Physiol. 103: 1067-1073
- Senjo M., Ishibashi T., Imai Y. (1985). Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome B6 from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases. J. Biol. Chem. 260: 9191-9196
- Shaaltiel Y., Chua N.-H., Gepstein S., Gressel J. (1988a). Dominant pleiotropy controls enzymes co-segregating with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. Theor. Appl. Genet. 75: 850-856
- Shaaltiel Y., Glazer A., Bocion P. F., Gressel J. (1988b). Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide, and ozone. Pestic. Biochem. Physiol. 31:13-23
- Sharma Y.K., Léon J., Raskin I., Davis K.R. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5099-5104
- Singh B. R., Shaw R. W. (1988). Selective inhibition of oat glutathione-S-transferase activity by tetrapyrroles. FEBS Lett. 324: 379-382
- Smirnoff N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 355: 1455-1464

- Smith A. (1987). Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins. Role of porphyrin-protein interaction. *Ann. New York Acad. Sci.* 514: 309-322
- Smith A., Nuiry I., Awasthi Y. C. (1985). Interactions with glutathione S-transferases of porphyrines used in photodynamic therapy and naturally occurring porphyrins. *Biochem. J.* 229: 823-831
- Smith I. K. (1985). Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79: 1044-1047
- Sommer A., Böger P. (1999). Characterisation of recombinant corn glutathione S-transferase isoforms I, II, III and IV. *Pestic. Biochem. Physiol.* 63: 127-138
- Streb P., Feierabend J. (1996). Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye-leaves. *Botan. Acta* 109: 125-132
- Strohm M., Eiblmeier M., Langebartels C., Polle A., Sandermann Jr H., Rennenberg H. (1999). Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: Visible injury and leaf gas exchange. *J. Exp. Bot.* 50: 365-374
- Takahashi Y., Kusaba M., Nagata T. (1991). Characterization of the auxin-regulated par gene from tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J.* 1:327-332
- Takeba G., Kozaki A. (1998). Photorespiration is an essential mechanism for the protection of C₃ plants from photooxidation. In: *Stress Responses of Photosynthetic Organisms* (Satoh K., Murata N., eds), Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp. 15-36
- Tanaka K., Machida T., Sugimoto T. (1990). Ozone tolerance and glutathione reductase in tobacco cultivars. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1061-1062
- Tenhaken R., Levine A., Brisson L. F., Dixon R. A., Lamb C. (1995). Function of the oxidative burst in the hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4158-4163
- Thomas L., Weinstein J. D. (1990). Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts. *Plant Physiol.* 94: 1414-1423
- Tipping E., Ketterer B., Koskelo P. (1978). The binding of porphyrins by ligandin. *Biochem. J.* 169: 509-516
- Tjus S. E., Scheller H. V., Andersson B., Møller B. L. (2001). Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiol.* 125: 2007-2015

- Torsethaugen G., Pitcher L. H., Zilinskas B. A., Pell E. J. (1997). Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiol.* 114: 529-537
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Tsang E. W. T., Bowler C., Hérouart D., Camp W. V., Villesroel R., Gentello C., Montagu M. V., Inzé D. (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792
- Ulmasov T., Ohmiya A., Hagen G., Guilfoyle T. (1995). The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol.* 108: 919-927
- van Camp W., Capiou K., van Montagu M., Inzé D. und Slooten L. (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112: 1703-1714
- Váradí G., Darkó É., Lehocski E. (2000). Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.). *Cronq. Plant Physiol.* 123: 1459-1469
- Walbot V., Mueller L. A., Silady R. A., Goodman C. D. (2000). Do glutathione S-transferases act as enzymes or carrier proteins for their natural substrates? In: *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants* (Brunold C., Rennenberg H., De Kok L. J., Stulen I., Davidian J. C., eds.), Paul Haupt, Bern, Switzerland, pp. 155-165
- Wardman P. und Candeias L.P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.* 145: 523-531
- Watahiki M. K., Mori H., Yamamoto K. T. (1995). Inhibitory effects of auxins and related substances on the activity of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase isozyme expressed in *Escherichia coli*. *Physiol. Plant.* 94 :566-574
- Wellburn A. R., Wellburn F. A. M. (1996). Gaseous pollutants and plant defense mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 461-464
- Wilce M. C. J., Parker M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205: 1-18
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Inzé D., van Camp W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3-plants. *Embo J.* 16: 4806-4816

-
- Willekens H., Inzé D., van Montagu M., van Camp W. (1995). Catalases in plants. Mol. Breed. 1: 207-228
- Willekens H., van Camp W., van Montagu M., Inzé D., Langenbartels C. und Sandermann Jr. H. (1994). Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. Plant Physiol. 106: 1007-1014
- Williams M., de Zee J. V., van Steveninck J. (1992). Toxic dark effects of protoporphyrin on the cytochrom P-450 system in rat liver microsomes. Biochem. J. 228: 155-159
- Wingsle G., Karpinski S. (1996). Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. Planta 198: 151-157
- Winkler B. S., Orselli S. M., Rex T. S. (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. Free Rad. Biol. Med. 17: 333-349
- Ye B., Gressel J. (2000). Transient, oxidant-induced antioxidant transcript and enzyme levels correlate with greater oxidant-resistance in paraquat-resistant *Conyza bonariensis*. Planta 211: 50-61
- Zhou J., Goldsbrough P. B. (1993). An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene. Plant Mol. Biol. 22: 517-523

Danksagung

Finanziell wurde die Arbeit von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Universität Konstanz ermöglicht.

Herrn Prof. Böger möchte ich meinen herzlichen Dank ausdrücken, nicht allein für den bestens ausgestatteten Laborplatz, sondern auch für Unterstützung und Anregungen.

Herrn Prof. Ullrich sei gedankt für die freundliche Bereitschaft, ein Gutachten zur vorliegenden Arbeit zu verfassen.

cDNA-Proben bzw. Antisera wurden dankenswerterweise von Dr. K.-J. Kunert (AECI Biotechnology, Modderfontein, SA), Prof. I. Jepson (ZENECA Seeds, Bracknell, UK), Prof. D. Klessig (Rutgers University, Piscataway, USA), Prof. D. Inzé (Universität Gent, B), Dr. A. Sommer und Dr. S. Römer (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

Herr Dr. Oliver Knörzer half zu Beginn der Arbeit, einen Einstieg in Thematik und Methoden zu finden. Frau Dr. Susanne Römer war durch ihr Wissen und ihre Hilfsbereitschaft verlässlicher Beistand und aufrichtiger Ratgeber. Frau Kinga Gerber und Frau Verena Reiser arbeiteten nicht nur bei Experimenten mit, sondern teilten auch die "Freude am Forschen". Herrn Dr. Bernd Matthes, Herrn Dr. Friedrich Kauder und Herrn Dr. Friedhelm Kring sei für ihre kollegiale Unterstützung gedankt.

Den ehemaligen, zeitweiligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich an dieser Stelle für das angenehme Arbeitsklima und konstruktive fachliche sowie fachübergreifende Gespräche danken.

.....meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Bruder. Und der Katze.