

**Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen auf
den Sekundärstoffwechsel und Pathogenabwehrmechanismen
von *Nicotiana tabacum***

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Andrea Maslak
geb. am 04.06.1974 in Erfurt

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Priv. Doz. Dr. Hans-Peter Mock
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Prof. Dr. Mark Stitt

Halle (Saale), 20.09.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004194

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004194>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

| | | |
|------|---|----|
| 1.1. | Einfluss erhöhter atmosphärischer CO ₂ -Konzentration auf den Stoffwechsel der Pflanze | 1 |
| 1.2. | Die globale Bedeutung sekundärer Inhaltsstoffe in der Pflanze | 4 |
| 1.3. | Sekundäre Inhaltsstoffe mit Bedeutung für die Pathogenabwehr in Tabak | 5 |
| 1.4. | Bedeutung von Glucosyltransferasen im pflanzlichen Sekundärmetabolismus | 8 |
| 1.5. | Zielsetzung | 10 |

2. Material und Methoden

| | | |
|--------|---|----|
| 2.1. | Pflanzenmaterial | 11 |
| 2.2. | Anzuchtbedingungen | 11 |
| 2.2.1. | <i>Zellsuspensionskultur</i> | 11 |
| 2.2.2. | <i>Gewebekultur zur Anzucht transgener Pflanzen</i> | 12 |
| 2.2.3. | <i>Anzucht im Gewächshaus</i> | 12 |
| 2.2.4. | <i>Anzucht in der Klimakammer für Hoch-CO₂-Experimente</i> | 13 |
| 2.2.5. | <i>Medium für die Anzucht mit definierter Mineralstoffversorgung</i> | 13 |
| 2.3. | Bestimmung von C- und N-Gehalten | 14 |
| 2.4. | Bestimmung Sekundärer Inhaltsstoffe | 14 |
| 2.4.1. | <i>Bestimmung von Alkaloiden</i> | 14 |
| 2.4.2. | <i>Bestimmung von Methanol-löslichen Phenylpropanen</i> | 15 |
| 2.4.3. | <i>Bestimmung von Zellwand-gebundenen Phenylpropanen</i> | 15 |
| 2.4.4. | <i>Bestimmung von Salizylsäure</i> | 15 |
| 2.5. | Identifizierung der Chlorogensäure (CGA)-Isomere | 16 |
| 2.6. | Bestimmung des Ligningehaltes | 17 |
| 2.7. | Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) Aktivität | 18 |
| 2.8. | Inokulationsexperimente mit dem Kartoffelvirus Y (PVY) | 19 |
| 2.8.1. | <i>Inokulation von Tabakpflanzen mit PVY</i> | 19 |
| 2.8.2. | <i>Bestimmung des Titer an PVY-Protein durch ELISA</i> | 19 |
| 2.9. | Infiltration von Blattscheiben | 20 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.10. | Präparative Extraktion und Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) durch säulenchromatographische Trennverfahren | 21 |
| 2.10.1. | <i>Extraktion und Ammoniumsulfatfällung</i> | 21 |
| 2.10.2. | <i>Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose</i> | 22 |
| 2.10.3. | <i>Kationenaustauschchromatographie über CM-Sepharose</i> | 22 |
| 2.10.4. | <i>Chromatographie über Hydroxyapatit</i> | 22 |
| 2.10.5. | <i>Gelfiltrationschromatographie über Superdex-75</i> | 23 |
| 2.10.6. | <i>Affinitätschromatographie über Reactive-Yellow 3</i> | 23 |
| 2.11. | Präparative Isolierung von Scopolin aus Tabakwurzeln | 23 |
| 2.12. | Enzymatische Bestimmung der SGT-Aktivität | 25 |
| 2.13. | Proteinkonzentrationsbestimmung | 26 |
| 2.14. | Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) | 26 |
| 2.15. | Molekulargewichtsabschätzung der SGT | 27 |
| 2.16. | Expression rekombinanter SGT in <i>E. coli</i> | 28 |
| 2.17. | Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA Agarose | 28 |
| 2.18. | Gewinnung von Antiseren aus Kaninchen | 29 |
| 2.19. | Nachweis von Proteinen durch Western Blot-Hybridisierung | 29 |
| 2.20. | Molekularbiologische Standardmethoden | 31 |
| 2.21. | Oligonukleotide | 31 |
| 2.22. | Vektoren | 32 |
| 2.23. | Bakterienstämme | 32 |
| 2.24. | Isolierung eines cDNA-Klons über PCR-Amplifizierung | 32 |
| 2.25. | Transformation von Tabak mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 33 |
| 2.26. | Nachweis von RNA durch Northern Blot-Hybridisierung | 35 |
| 2.27. | Peptidmassen-Fingerprint mittels MALDI/TOF-MS | 37 |
| 2.27.1 | <i>Tryptischer Verdau von Proteinen</i> | 37 |
| 2.27.2. | <i>Aufnahme von MS Spektren am MALDI-TOF-MS</i> | 38 |
| 3. | Ergebnisse | |
| 3.1. | Untersuchungen der Pathogenabwehr beim Tabak unter variiertes CO ₂ - und N-Versorgung | 39 |
| 3.1.1. | <i>Fragestellung</i> | 39 |
| 3.1.2. | <i>Experimenteller Ansatz</i> | 39 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.1.3. | <i>Veränderte C/N-Gehalte in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]</i> | 40 |
| 3.1.4. | <i>Veränderte Metabolitprofile in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]</i> | 42 |
| 3.1.5. | <i>Untersuchung der Pathogenabwehr in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]</i> | 52 |
| 3.2. | Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) | 56 |
| 3.2.1. | <i>Fragestellung</i> | 56 |
| 3.2.2. | <i>Reinigung von Scopolin zur Quantifizierung von HPLC-Analysen</i> | 56 |
| 3.2.3. | <i>Versuche zur Stimulation der SGT-Aktivität</i> | 58 |
| 3.2.4. | <i>Präparative Reinigung der SGT durch säulenchromatographische Trennverfahren</i> | 59 |
| 3.3. | Klonierung einer Salizylsäure induzierbaren Glucosyltransferase | 64 |
| 3.3.1. | <i>Isolierung eines cDNA-Klons über PCR-Amplifizierung</i> | 64 |
| 3.3.2. | <i>Expression rekombinanter SGT in E. coli</i> | 64 |
| 3.3.3. | <i>Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA Agarose</i> | 65 |
| 3.4. | Vergleich der Peptidmassen der gereinigten SGT-Aktivität mit der rekombinanten Glucosyltransferase über MALDI/TOF-MS-Analysen | 67 |
| 3.4.1. | <i>MALDI/TOF-MS-Analysen mit der rekombinanten Glucosyltransferase</i> | 67 |
| 3.4.2. | <i>MALDI/TOF-MS-Analysen mit der gereinigten Glucosyltransferase</i> | 68 |
| 3.4.3. | <i>Vergleich der untersuchten Glucosyltransferase mit anderen bekannten Glucosyltransferasen aus Tabak</i> | 70 |
| 3.5. | Transformation von Tabak zur Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten | 71 |
| 3.5.1. | <i>Selektion geeigneter transgener Linien</i> | 72 |
| 3.5.2. | <i>Charakterisierung der ausgewählten Sense-Linien</i> | 74 |
| 3.5.3. | <i>Untersuchungen zur Wirkung der veränderten SGT-Aktivität auf die Akkumulation von Scopolin und anderen phenolischen Inhaltsstoffen</i> | 76 |
| 3.5.4. | <i>Funktionelle Untersuchungen transgener Linien um den Beitrag von Coumarinen zur Pathogenabwehr zu prüfen</i> | 80 |
| 4. | Diskussion | |
| 4.1. | Veränderte Metabolitprofile in Tabakpflanzen unter variiertes CO ₂ - und N-Versorgung | 82 |
| 4.2. | Veränderte Pathogenabwehr in Tabakpflanzen unter variiertes | |

| | |
|---|-----|
| CO ₂ - und N-Versorgung | 87 |
| 4.3. Reinigung und Klonierung einer UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT)-Aktivität | 93 |
| 4.4. Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten und Untersuchungen zum Beitrag von Coumarinen zur Pathogenabwehr beim Tabak | 98 |
| 5. Zusammenfassung | 101 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis | 103 |
| 7. Literatur | 105 |

1. Einleitung

1.1. Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration auf den Stoffwechsel der Pflanze

Durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe nimmt die CO₂-Konzentration in unserer Atmosphäre seit Beginn des 18. Jahrhunderts ständig zu. Verstärkt wird der Anstieg noch durch die andauernde Abholzung von Wäldern, wodurch die Re-fixierung des CO₂ durch die Photosynthese der Pflanzen beschränkt wird. Vor diesem Hintergrund untersuchen Wissenschaftler weltweit die Reaktion von Pflanzen auf eine Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration.

Nach bislang verfügbaren Daten führt die Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze (Penuelas und Estiarte, 1998; Poorter et al., 1997). Die möglichen Auswirkungen dieser Verschiebung im C/N-Verhältnis auf den pflanzlichen Metabolismus fassten Bryant et al. (1983) in einem „*carbon/nutrient balance*“ (CNB) -Modell zusammen. Nach der CNB-Hypothese korreliert die Konzentration kohlenstoffhaltiger Metabolite positiv mit erhöhten C/N-Verhältnissen, wogegen die Konzentration stickstoffhaltiger Verbindungen negativ mit erhöhten C/N-Verhältnissen verbunden ist. Erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen führen danach zu einer dramatischen Änderung der chemischen Zusammensetzung von Pflanzen, wobei das Ausmaß der Veränderungen wesentlich von der Verfügbarkeit an Stickstoff und Kohlenstoff abhängt (Zusammenfassung in Stitt und Krapp, 1999).

Gut untersucht ist der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die mit dem Primärstoffwechsel verbundenen Parameter. Gezeigt werden konnte eine beschleunigte Entwicklung der Pflanzen und die Steigerung des Ertrages unter Hoch-CO₂ für Vertreter verschiedener Pflanzenarten (Jitla et al., 1997; Ludewig et al., 1998; Geiger et al., 1999; Maroco et al., 1999). Dabei ist die relative Wachstumsrate in jungen Pflanzen unter Hoch-CO₂ stark erhöht, gleicht sich aber im Verlauf der Entwicklung zwischen ambierter und erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration wieder an (Geiger et al., 1998). Ertragssteigerungen wurden auf den Anstieg des C/N-Verhältnisses unter Hoch-CO₂ zurückgeführt (Ludewig, 1998). Eine Steigerung der Photosyntheserate unter erhöhtem [CO₂] gegenüber Vergleichsbedingungen, bei sättigender Lichtintensität

wurde mehrfach beschrieben (Pearson und Brooks, 1995; Van Oosten und Besford, 1995; Miller et al., 1997). In allen Versuchen wurde die Abnahme der Photosyntheserate mit zunehmendem Pflanzenalter und auch im vertikalen Altersgradienten (d.h. von jungen zu alten Blättern einer Pflanze) beschrieben, wobei die Abnahme unter Hoch-CO₂ schneller erfolgt als unter ambienten CO₂-Bedingungen. Die altersabhängige Herunterregulierung der Transkriptmengen von Photosynthese- bzw. Calvin-Zyklus-Genen bestätigten Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen, bei denen die Seneszenz verzögert ist. In diesen Pflanzen werden durch Expression einer Isopentenyltransferase bei eintretender Seneszenz Cytokinine gebildet, welche die Seneszenz wieder aufheben. Ältere, nicht seneszente Blätter dieser Pflanzen zeigen keine stärkere Repression von Photosynthese- bzw. Calvin-Zyklus-Genen bei Hoch-CO₂ gegenüber ambienten Bedingungen als junge Blätter (Ludewig, 1998). Die frühere Inhibierung der Photosynthese wird daher auf eine beschleunigte Seneszenz unter erhöhtem [CO₂] zurückgeführt. Andere Autoren dagegen gehen von einer Zucker-vermittelten Repression der Photosynthesegene aus (Jang und Sheen, 1997; Moore et al., 1999). In Korrelation zu erhöhten Photosyntheseraten unter Hoch-CO₂ wurde die unterschiedlich starke Akkumulation von löslichen Zuckern in den Blättern beobachtet (Moore et al., 1997; Geiger et al. 1998). Einen direkten negativen Zusammenhang zwischen Zuckergehalt und Transkriptmengen von Photosynthese- bzw. Calvin-Zyklus-Genen zeigten Van Oosten und Besford (1995). Im Gegensatz dazu wurde eine Abhängigkeit der Transkriptmengen von Photosynthese- bzw. Calvin-Zyklus-Genen von der intrazellulären Zuckermenge in anderen Arbeiten nicht festgestellt (Ludewig, 1998; Nie et al., 1995). Bei Wachstum von Pflanzen unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration wurde auch die Akkumulation von Blattstärke vielfach beschrieben (Van Oosten und Besford, 1996; Moore et al., 1997; Cheng et al., 1998). Die Akkumulation von Stärke ist wahrscheinlich nötig, um eine Endproduktlimitierung der Photosynthese zu umgehen und so die Photosyntheserate auch unter erhöhter CO₂-Konzentration aufrecht zu erhalten (Ludewig, 1998).

Bislang verfügbare experimentelle Daten zeigten die Tendenz zu höheren Gehalten an CBSSC (*carbon-based secondary or structural compounds*) mit zunehmender CO₂-Konzentration, allerdings ist ein einheitliches Bild nicht erkennbar. Neben der Akkumulation struktureller und nicht-struktureller Kohlenhydrate unter Hoch-CO₂ wurde in vielen Pflanzenarten auch die Akkumulation löslicher phenolischer

Verbindungen und verminderte Gehalte an Proteinen und Mineralien beobachtet (Poorter et al., 1997). Die Zunahme war für lösliche phenolische Verbindungen gegeben, nicht jedoch für Lignin, Struktur-Polysaccharide und Terpene, in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies (Poorter et al., 1997; Penuelas und Estiarte, 1998). Eine Zunahme an löslichen Phenolen und Tanninen wurde auch unter Mangel an Stickstoff und anderen Nährstoffen beobachtet (Penuelas und Estiarte, 1998). Im Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. One-Sucker) wurden signifikant erhöhte Gehalte an Chlorogensäure und Scopolin in stickstofflimitierten Pflanzen beobachtet (Armstrong et al., 1970). Die Limitierung der Stickstoffversorgung unter erhöhter CO₂-Konzentration führte zu einer Verminderung des Gehaltes an stickstoffhaltigen Glucosinolaten in *Brassica juncea*, nicht jedoch in *Raphanus sativa* und *Brassica rapa* (Karowe et al., 1997). Beschrieben ist auch die erhöhte Allokation von Stickstoff in die Bildung von Prunasin in *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell unter Hoch-CO₂ bei verminderten N-Gehalten im Blatt (Gleadow et al., 1998). In Feldversuchen zeigten Rufty et al. (1989) in Tabakblättern die Verminderung im Gehalt an Alkaloiden (Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin), gegenüber erhöhten Gehalten an nichtstrukturellen Kohlenhydraten, Polyphenolen (CGA, Rutin) und Diterpenen unter Hoch-CO₂. Ein Wachstum unter erhöhter CO₂-Konzentration könnte also im Tabak neben der generellen Erhöhung des Gehaltes an Sekundärmetaboliten auch zu einer Verschiebung der Anteile an stickstoffhaltigen Alkaloiden zugunsten von CBSC (*carbon based secondary compounds*) führen. Da viele der aus Tabak bekannten sekundären Inhaltsstoffe von Bedeutung für die Pathogenabwehr sind (s. 1.3.) lassen sich Konsequenzen für die Wechselwirkung von Tabakpflanzen mit ihrer Umwelt erwarten, insbesondere in der Interaktion mit Pathogenen (Abb. 1). Die beobachtete Tendenz zu gesteigerten Mengen an CBSC in nährstofflimitierten Pflanzen und die generelle Verminderung im N-Gehalt unter Hoch-CO₂ führten zu der Vermutung, dass die beschriebenen Veränderungen im Metabolitprofil eher indirekte Effekte der unter erhöhtem [CO₂] reduzierten Gehalte an organischem N sind als direkte CO₂-Effekte. Im experimentellen Ansatz dieser Arbeit sollte daher die N-Versorgung genau kontrolliert werden. Außerdem sollte das N-Angebot so gewählt werden, dass N für das Wachstum der Pflanzen nicht limitiert ist.

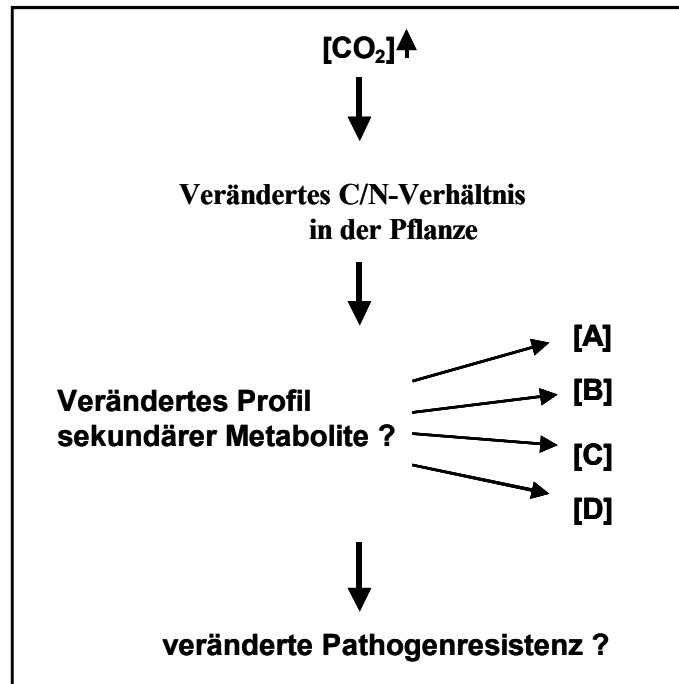


Abb. 1: Schematische Darstellung der möglichen Veränderungen in Pflanzen unter Hoch-CO₂ im Hinblick auf die Interaktion mit Pathogenen

1.2. Die globale Bedeutung sekundärer Inhaltsstoffe in der Pflanze

Um den Selektionsdruck zu überwinden, der durch abiotische und biotische Stressfaktoren ausgeübt wird, haben Pflanzen effektive Resistenzmechanismen entwickelt. Große Bedeutung für die Interaktion von Pflanzen mit ihrer Umwelt haben dabei die sogenannten Sekundären Pflanzenstoffe (Harborne, 1997). Sekundärmetabolite wirken in Pflanzen als Lockstoffe (Anthocyane, Flavonoide), als Schutz vor UV-Strahlung (Anthocyane, Flavonoide, Coumarine), als strukturelle Verbindungen (Lignin, Tannin), regulieren Phytohormone (Flavonoide, einfache Phenole), sind allelopathisch wirksam u.v.m. (Herms und Mattson, 1992). Die vielfältigen Funktionen, die sekundäre Inhaltsstoffe in Pflanzen erfüllen haben dazu geführt, dass Sekundärmetabolite nicht länger als „Abfallprodukte“ pflanzlicher Zellen betrachtet werden sondern als Klasse von Verbindungen, die nachhaltig das Überleben der Pflanze in ihrer Umwelt sichern. Besondere Bedeutung haben pflanzliche Sekundärstoffe in der Pathogenabwehr. Sie dienen als Fraßhemmer, Gifte, haben antimikrobielle Wirkung oder dienen als Signalmoleküle (Dixon und Paiva, 1995). Dabei können wirksame Metabolite nach Pathogenbefall *de novo* synthetisiert werden

(Phytoalexine; Kuc und Rush, 1985) oder als präformierte Abwehrstoffe in der Pflanze akkumulieren (Dixon und Paiva, 1995; Osbourn, 1996). Diese wirksamen Metabolite gehören chemisch unterschiedlichen Stoffklassen an (Terpenoide, Alkaloide, Phenylpropane), und wir finden sie in allen taxonomischen Gruppen des Pflanzenreichs (Croteau et al., 2000).

Von den phenolischen Verbindungen sind Hydroxyzimtsäuren und Hydroxycoumarine von besonderer Bedeutung. Coumarine wirken als Lockstoffe und Fraßschutz und tragen nachweislich zu Resistenzmechanismen in Pflanzen bei (Harborne, 1995). Bekannt ist auch ihre Beteiligung an regulatorischen Prozessen des Pflanzenwachstums durch die Inhibierung von Samenkeimung und Wurzelwachstum. Durch die Eigenschaft UV-Licht in hohem Maße zu absorbieren schützen Coumarine besonders junge Pflanzenteile vor zu starker Sonneneinstrahlung (Weinmann, 1997). Coumarine und Hydroxycoumarine sind weit verbreitet im Pflanzenreich, hohe Gehalte finden sich in den Pflanzenfamilien Rutaceae, Apiaceae, Moraceae und Solanaceae (Murray et al., 1982). Zu den im Tabak hauptsächlich gefundenen Polyphenolen gehören neben Chlorogensäure, Rutin, Qercetin und Kaempferol auch die Hydroxycoumarine Scopolin und Scopoletin (Leffingwell, 1999).

1.3. Sekundäre Inhaltsstoffe mit Bedeutung für die Pathogenabwehr in Tabak

Aus Tabak sind verschiedene Klassen an sekundäre Inhaltsstoffen mit Bedeutung für die Pathogenabwehr bekannt, weshalb er sich gut als Versuchsobjekt eignet. Die stressinduzierte Akkumulation von Sesquiterpenen wurde für eine Reihe von Vertretern der Solanaceae gezeigt (Stoessl et al., 1976). In *Nicotiana* akkumuliert das als Phytoalexin antimikrobiell wirksame Capsidiol nach Infektion mit TNV (*tobacco necrosis virus*; Bailey et al., 1975) und nach Infiltration mit *Pseudomonas lachrymans* (Guedes et al., 1982). Neben Sesquiterpenen sind auch Diterpene mit Funktion in der Pathogenabwehr beschrieben. Sekrete der Trichomzellen von Tabakblättern enthalten Cembranoid-Diterpene, denen eine Schutzfunktion gegen Insektenfraß zugeschrieben wird (Wagner, 1991). Zu den bekannten sekundären Metaboliten im Tabak gehören auch Vertreter der stickstoffhaltigen Alkaloide. Alle untersuchten *Nicotiana*-Arten enthalten die Alkaloide Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin (Saitoh et al.

1985). Die Erhöhung des Alkaloid-Gehaltes wurde nach Verwundung von Tabakblättern beobachtet (Baldwin, 1989), wobei die Erhöhung im Nikotingehalt mit erhöhten Gehalten an Jasmonsäure korreliert (Baldwin et al., 1997). Eine weitere wichtige Stoffgruppe sind die Phenylpropane. Vielfach wurde die stressinduzierte Akkumulation von Phenylpropanen beobachtet (Legrand, 1983; Hahlbrock und Scheel, 1989; Nicholson und Hammerschmidt, 1992; Dixon und Paiva, 1995). So ist die Hypersensitivitätsreaktion der Tabakvarietäten Xanthi n.c. und SamsunNN nach Inokulation mit TMV (*tobacco mosaic virus*) begleitet von der Akkumulation einer Vielzahl an phenolischen Verbindungen, darunter Flavonolglycoside wie Rutin, Glucoseester von Zimtsäuren, Chinasäureester und dem Coumarin Scopolin (Fritig und Hirth, 1971; Tanguy und Martin, 1972). Für das Tabakhybrid *N. glutinosa* x *N. debneyi* konnte die konstitutive Expression von Pathogenabwehrmechanismen gezeigt werden (Ahl Goy et al., 1992). Der Gehalt an den Coumarinen Scopoletin und Scopolin trägt dabei mutmaßlich zu einer erhöhten Pathogenresistenz des Hybrids bei (Ahl Goy et al., 1993). Auch in transgenen Tabakpflanzen mit verminderter Aktivität an Uroporphyrinogen Decarboxylase oder Coproporphyrinogen Oxidase, die erhöhte Resistenz gegenüber TMV zeigten, konnte die Akkumulation von Scopolin beobachtet werden (Mock et al., 1999). Mit *Phytophthora megaspora* infizierte Tabakpflanzen akkumulieren Scopoletin in einer Zone die versetzt zur Infektionsstelle liegt (Dorey et al., 1997). Die antimikrobielle Wirkung von Scopoletin und anderen Coumarinen wurde durch *in vitro* Versuche gezeigt (Fischer et al., 1976; Valle et al., 1993; Garcia et al., 1995). Konsistent dazu führte das Besprühen von Tabakpflanzen mit Scopoletin zu verminderter Läsionenbildung nach TMV-Infektion (Mikulska-Macheta, 1976; Ahl Goy et al., 1993). Scopoletin trägt auch zur Resistenz von *Hevea* gegen *Microcyclus ulei* (Garcia et al., 1995) und *Phytophthora palmivora* (Churngchow und Rattarasarn, 2001) bei. In den beschriebenen Interaktionen ist die Wirkung des Scopoletins insbesondere von seiner hohen Toxizität, der lokalen Konzentration und der Bildungsgeschwindigkeit nach Pathogenbefall abhängig. Da Scopolin kaum antimikrobielle Wirkung zeigt, kann es als präformierter Abwehrstoff aufgefasst werden, aus dem nach Einwirken einer spezifischen β -Glucosidase mutmaßlich das wirksame Aglycon freigesetzt wird. In Abb. 2 ist der mögliche Biosyntheseweg der Coumarine Scopoletin und Scopolin im Tabak dargestellt. Katalysiert wird die Glucosylierung von Scopoletin durch die UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase.

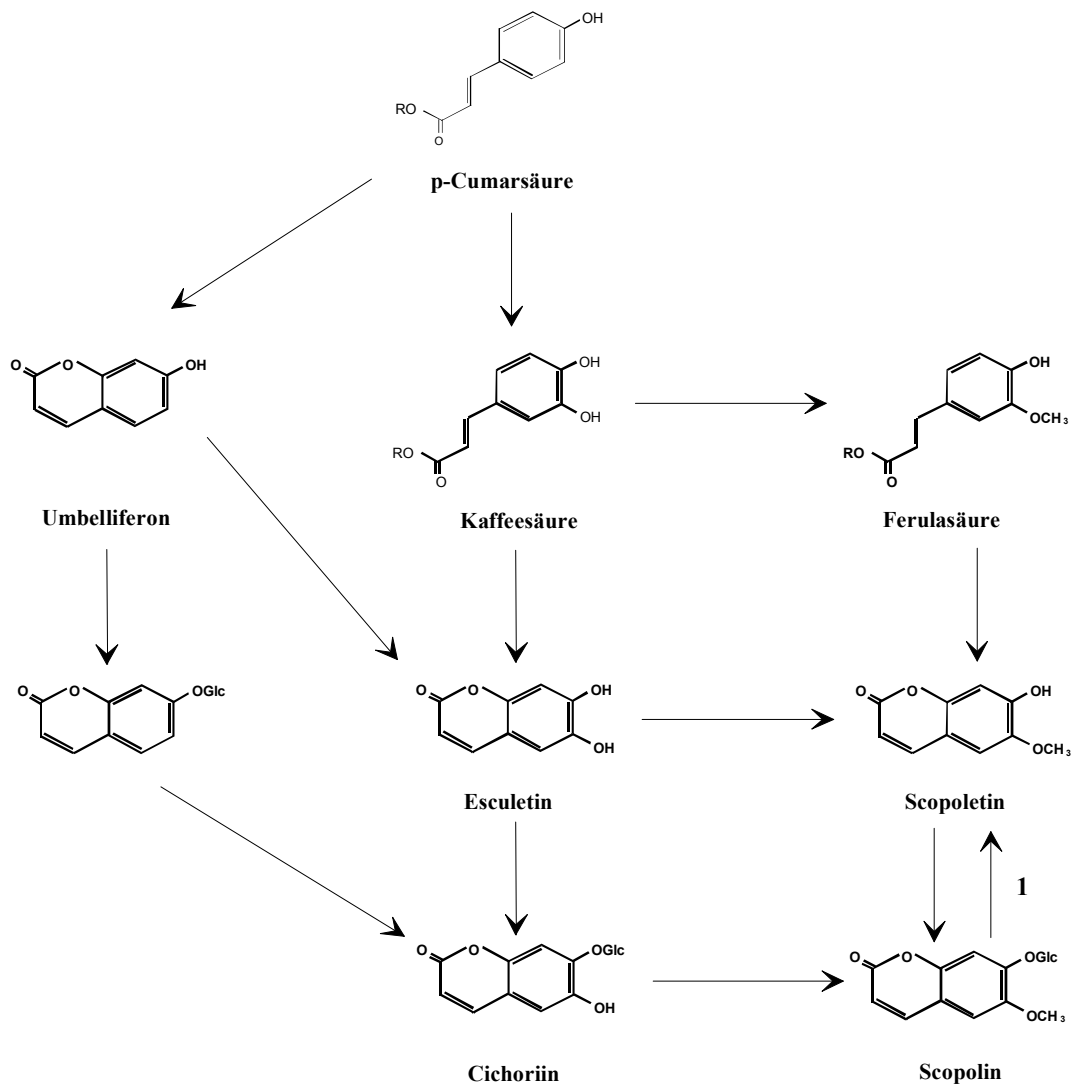


Abb. 2: mögliche Biosynthesewege der Coumarine des Tabaks (nach Fritig et al. 1970), 1-UDP-Glucose:Scopoletin Glucosyltransferase

Die phenolische Hauptkomponente im Tabak ist die Chlorogensäure (Snook et al., 1986, Leffingwell, 1999), deren Bedeutung in der pflanzlichen Pathogenabwehr gut bekannt ist (Harborne, 1995). Maher et al. (1994) hatten gezeigt, dass in transgenen Tabakpflanzen mit verminderten Gehalten an Chlorogensäure die Krankheitsresistenz deutlich reduziert ist. Dabei beruht die Wirkung der Chlorogensäure sehr wahrscheinlich auf ihrer Bedeutung als Vorstufe für die Synthese von Lignin, Suberin und weiteren Wund-induzierten polyphenolischen Barrieren (Hahlbrock und Scheel, 1989; Bernhards und Lewis, 1992). Außerdem wurde die antimikrobielle Wirkung der CGA beschrieben (Scholz et al., 1993).

1.4. Bedeutung von Glucosyltransferasen im pflanzlichen Sekundärmetabolismus

Als letzter Schritt in der Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe sind oft Glucosylierungsreaktionen beschrieben (Heller und Forkmann, 1994). Katalysiert wird die Umwandlung von Sekundärstoffen in ihre Glycokonjugate durch Glucosyltransferasen, welche Nukleotid-diphosphat aktivierte Zuckereinheiten auf niedermolekulare Substrate übertragen. Dabei können Vertreter aller Stoffklassen an Sekundärmetaboliten als Zucker-Akzeptor dienen (Terpenoide, Alkaloide, Phenylpropanoide). Die Bedeutung von Glucosylierungsreaktionen ist vielfältig. Zum einen erhöht die Glucosylierung von Metaboliten ihre Löslichkeit in Wasser (Hrazdina, 1988) und ermöglicht damit ihre Kompartimentierung und Akkumulation in der Vakuole (Werner und Matile, 1985; Taguchi et al., 2000a). Nach Dekompartimentierung (Verletzung) und Einwirken von β -Glucosidasen können somit wirksame Metabolite gegen Pathogene oder Herbivoren spezifisch freigesetzt werden.

Flüchtige Verbindungen werden durch Glucosylierung stabilisiert und auf diese Weise vor spontanem Verfall geschützt (Crouzet und Chassagne, 1999). Bekannt ist auch die Regulation der Wirkung einiger pflanzlicher Hormone (IAA, Cytokinin) durch Glucosylierung (Szerszen et al., 1994; Dixon et al., 1989). Des Weiteren stellt die Glucosylierung von xenobiotischen Verbindungen (synthetische Chemikalien in der pflanzlichen Umgebung, Herbizide) neben der Entgiftung über Glutathion einen wirksamen Schutz der Pflanze dar (Kreuz et al., 1996; Coleman et al., 1997).

Glucosyltransferasen sind mit wenigen Ausnahmen lösliche Enzyme mit einem Molekulargewicht zwischen 45kDa und 60kDa, welche in der Zelle nur in geringen Mengen inmitten eines breiten Spektrums weiterer Enzyme vorkommen (Vogt und Jones, 2000). Nur in wenigen Fällen war eine homogene Aufreinigung von Glucosyltransferasen mit herkömmlichen chromatographischen Techniken und damit die Charakterisierung dieser Enzyme möglich (Hrazdina, 1988; Keil und Schreier, 1989; Szerszen et al., 1994; Warnecke und Heinz, 1994; Shibata et al. 1995; Lee und Raskin, 1999). Moderne molekulare Methoden ermöglichten die Charakterisierung einer Reihe weiterer Glucosyltransferasen, nach dem Klonieren und der Expression in heterologen Systemen. Das erste für eine Glucosyltransferase (UDP-Glucose: Flavonol Glucosyltransferase, UFGT) codierende Gen wurde aus Mais isoliert (Ralston et al., 1988). In der Folge wurden zahlreiche, für Enzyme zur Glucosylierung von Flavonolen

codierende Gene, aus verschiedenen Pflanzenarten kloniert (Übersichtsartikel Holton und Cornish, 1995). Später gelang dann auch die Isolierung von Genen, die für Glucosyltransferasen codieren, welche die Übertragung der Glucose auf die Hydroxyl- oder Carboxylgruppe anderer Metabolite katalysieren (Szerszen et al., 1994; Johns et al. 1999; Vogt et al., 1999). Mittels eines *differential display*-Ansatzes konnten aus Tabak zwei nah verwandte Gene IS5a und IS10a isoliert werden (Horvath und Chua, 1996). Die durch diese Gene codierten Proteine zeigen hohe Sequenzhomologie zu bereits bekannten UDP-Glucose: Flavonoid Glucosyltransferasen und zeigen *in vitro* neben geringer Glucosyltransferase-Aktivität mit Salizylsäure hohe Glucosyltransferase-Aktivität mit Hydroxycoumarinen (Scopoletin, Esculetin) und Hydroxyzimtsäuren (Fraissinet-Tachet et al., 1998). Die Induktion durch Salizylsäure, während der Hypersensitivitätsreaktion nach Befall mit TMV (*tobacco mosaic virus*), einem pilzlichen Elicitor (Horvath und Chua, 1996) und nach Verwundung (Roberts et al., 1999) konnte für zu IS5a und IS10a homologe Gene aus Tabak gezeigt werden. Aus verschiedenen Arten der Solanaceae wurden weitere „induzierbare“ Glucosyltransferasen (GT) isoliert: Salizylsäure induzierbare Glucosyltransferase (SAGTase; Lee und Raskin, 1999) und Jasmonsäure induzierbare GT (JIGT; Imanishi et al., 1998) aus Tabak sowie Wund-induzierte Glucosyltransferasen aus Kartoffel (StSGT; Moehs et al., 1997) und aus Tomate (Twi1; Truesdale et al., 1996). Dabei zeigt die aus Tomaten isolierte Wund-induzierte GT (Twi1) hohe Sequenzhomologie zu IS5a und IS10a (O'Donnell et al., 1998). Für alle oben genannten induzierbaren GT konnte eine sehr schnelle Expression nach Verwundung, Pathogenbefall oder Zugabe eines Elicitors beobachtet werden, was auf eine potentielle Bedeutung dieser Gene in der Pathogenabwehr und Stresstoleranz hindeutet. Für die Pathogenabwehr im Tabak sind die durch IS5a und IS10a codierten Glucosyltransferasen mutmaßlich von Bedeutung, da bekannt ist, dass induzierbare zu IS5a und IS10a homologe Gene in die Glucosylierung der Coumarine Scopoletin und Esculetin involviert sind (Chong et al., 1999).

1.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen auf den Gehalt an Sekundärmetaboliten im Tabak und mögliche Änderungen in der Pathogenabwehr untersucht werden.

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration führt in der Regel zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze, wonach erwartet werden kann, dass sich der Gehalt stickstofffreier Komponenten in der Pflanze erhöht. In Anzuchten von Tabakpflanzen sollte daher geprüft werden, ob die Kultivierung unter erhöhtem [CO₂] und bei optimaler und suboptimaler Stickstoffversorgung zu gesteigerten Gehalten an Sekundärmetaboliten führt, und ob neben einer generellen Erhöhung eine Verschiebung der Anteile an Alkaloiden zugunsten von kohlenstoffhaltigen sekundären Inhaltsstoffen zu beobachten ist. Inokulationsexperimente mit dem Kartoffelvirus Y (PVY) sollten zeigen, ob veränderte Metabolitgehalte unter Hoch-CO₂ gegebenenfalls mit einer veränderten Suszeptibilität gegenüber dem Pathogen korrelieren. Besonderes Augenmerk galt dabei den Coumarinen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Coumarine Scopolin und Scopoletin für die Pathogenabwehr in *Nicotiana tabacum* eingehend zu untersuchen. Die UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) als Schlüsselenzym der Scopolinbiosynthese im Tabak nahm dabei die zentrale Rolle der Arbeiten ein. Mit Hilfe konventioneller chromatographischer Trenntechniken sollte eine SGT-Aktivität aus einer Tabak-Zellsuspensionskultur (*N. tabacum* cv. Havana) aufgereinigt und sequenziert werden. Parallel dazu sollte in einem molekularbiologischen Ansatz eine aus Tabak bekannte Salizylsäure induzierbare Glucosyltransferase (IS5a, U32644) kloniert und im heterologen System exprimiert werden. Durch Änderung der Glucosyltransferase-Aktivität sollte außerdem die Kapazität zur Bildung von Scopolin und evl. weiterer glucosidischer Phenylpropane im Tabak variiert werden. In funktionellen Analysen transgener Linien (Inokulation mit PVY) sollte anschließend der Beitrag von Coumarinen zur Pathogenabwehr geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Die Samen zur Anzucht von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) wurden von Bioplant, „Vereinigte Saatzuchten eG“, Ebstorf bezogen. Die verwendete Zellsuspensionskultur mit der Bezeichnung S2LS3 (Zellsuspensionskultur einer Wurzelkalluskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Havana; Kunze et al., 1998) wurde von Frau Dr. I. Kunze (Arbeitsgruppe Hefegenetik, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben) zur Verfügung gestellt.

2.2. Anzuchtbedingungen

2.2.1. Zellsuspensionskultur

Die sterile Kultur der Zellsuspension erfolgte unter ständigem Schütteln (100rpm) auf einem „Platform Shaker“ (Innova 2300, New Brunswick Scientific) bei 24°C in der Dunkelheit. Zur Erhaltung der Zellsuspensionskultur wurden die Zellen im wöchentlichen Rhythmus in frisches Nährmedium umgesetzt. Die Zusammensetzung des Mediums war folgende (geändert nach Murashige und Skoog, 1962):

| | |
|--------|------------------------------------|
| 4,3g/l | MS-Medium, ohne Vitamine (Ducheva) |
| 30g/l | Saccharose |
| 5ml/l | 0,004% Thiamin-HCL |
| 5ml/l | 1% Myoinositol |

Es wurde voll entsalztes Wasser verwendet und der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 6,0 eingestellt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden dem Nährmedium sterilfiltriertes Kinetin (EK: 0,03%) und NAA (EK: 0,2%) zugesetzt.

2.2.2. Gewebekultur zur Anzucht transgener Pflanzen

Für die Sterilkultur der Tabakpflanzen in Glas-Kulturgefäßen wurde folgendes Medium verwendet:

| | |
|--------|---------------------|
| 4,3g/l | MS-Medium (Ducheva) |
| 20g/l | Saccharose |
| 1% | Gibco-Agar |

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 5,6-5,8 eingestellt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden dem Nährmedium sterilfiltriertes Betabactyl (EK: 1µg/ml) und NAA (EK: 0,1µg/µl) zugesetzt. Vor dem Auslegen auf MS-Medium wurden die Tabaksamen oberflächensterilisiert (drei Minuten in 70% Ethanol, anschließend für zehn Minuten in 1% Natriumhyperchlorid, 0,02% TritonX100). Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen getrocknet und auf MS-Medium in Petrischalen ausgelegt. Zwei Wochen später erfolgte der Transfer der Tabakpflanzen in sterile Glas-Kulturgefäße. Die weitere Vermehrung der Pflanzen erfolgte dann über Sprosskulturen, d.h. die Spitzen des alten Sprosses wurden in neue Kulturgefäße überführt, um dann wieder Wurzeln und Blätter zu bilden. Die Anzucht erfolgte in Gewebekulturkammern bei 24°C und einem 16h Licht- / 8h Dunkelrhythmus bei einer Lichtintensität von ca. 50µE-PAR. Für den Transfer von Pflanzen aus der Gewebekultur in das Gewächshaus wurden die Pflanzen in mit Humus versetzte sehr feinkörnige Erde getopft und für drei Tage in abgedeckten Pflanzschalen kultiviert.

2.2.3. Anzucht im Gewächshaus

Die Anzucht von Tabakpflanzen im Gewächshaus erfolgte in einem Erde/Substrat-Gemisch. Dazu wurden zwei Teile dampfsterilisierte Erde mit einem Teil „Substrat2“ der Firma Klasmann gemischt. Die Pflanzen wurden täglich gewässert und die Topfgröße (2,2l, 2,5l oder 7,5l) war abhängig vom Entwicklungsalter der Pflanzen. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte unter ambienten CO₂-Konzentrationen (350ppm) und einer Lichtintensität von ca. 200µE- PAR bei einem 16h Licht- / 8h Dunkelrhythmus. Die Temperatur betrug im Licht 23°C und bei Dunkelheit 15°C und die Luftfeuchte lag bei 60%.

2.2.4. Anzucht in der Klimakammer für Hoch-CO₂-Experimente

In den Klimakammern wuchsen die Pflanzen bei 350ppm oder 1000ppm CO₂, einer Lichtintensität von 450μE- PAR und bei einem 14h Licht- / 10h Dunkelrhythmus. Die Temperatur betrug im Licht 24°C und bei Dunkelheit 20°C und die Luftfeuchtigkeit war auf 60% eingestellt. Kultiviert wurden die Pflanzen im unter 2.2.3. erwähnten Erde/Substrat-Gemisch oder alternativ in Quarzsand bei definierter Mineralstoffversorgung (s. 2.2.5.). Für die Anzucht unter definierter Mineralstoffversorgung wurden die Tabaksamen zunächst im Gewächshaus auf Erde/Substrat-Gemisch ausgelegt. Nach 2 Wochen wurden die Pflanzen in Schalen auf Erde/Substrat-Gemisch pikiert und in die Klimakammern transferiert. Weitere 2 Wochen später erfolgte dann der Transfer in den Quarzsand und die definierte Versorgung mit Mineralstoffen.

2.2.5. Medium für die Anzucht mit definierter Mineralstoffversorgung

Für die Düngung der auf Quarzsand angezogenen Pflanzen wurde das von Murashige und Skoog (1962) vorgeschlagene Medium zur Kultivierung von Tabakpflanzen in Gewebekultur verwendet. Dieses Medium enthält keine organischen Verbindungen und der pH-Wert wird mit KOH auf 7,0 eingestellt. Um das Wachstum von Algen zu verhindern wurde die jeweilige Stickstoffkonzentration erst direkt vor dem Gebrauch der Lösung eingestellt. Jede Pflanze wurde täglich mit 100-200ml Nährlösung abhängig vom Entwicklungsalter versorgt.

| Substanz | Konzentration | Substanz | Konzentration |
|--------------------------------------|---------------|---|---------------|
| KH ₂ PO ₄ | 3mM | ZnSO ₄ | 2μM |
| MgSO ₄ | 1mM | CuSO ₄ | 0,5μM |
| CaCl ₂ x2H ₂ O | 1mM | MoNa ₂ O ₄ x2H ₂ O | 0,5μM |
| H ₃ BO ₃ | 25μM | Fe-EDTA | 20μM |
| MnSO ₄ | 2μM | H ₂ SO ₄ | 1mM |

2.3. Bestimmung von C- und N-Gehalten

Die Bestimmung von C- und N-Gehalten in Tabakpflanzen erfolgte mit Hilfe eines Elementaranalysators (Vario EL III) in der Arbeitsgruppe Genwirkung des IPK-Gatersleben. Das verwendete Pflanzenmaterial wurde direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann unter flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert. Etwa 100mg pro Probe wurden in Reaktionsgefäße (Eppendorf, 1,5ml) eingewogen, bei 80°C für mindestens 24h getrocknet und erneut gewogen. Aus den so erhaltenen Trockenmassen wurde das Verhältnis Trockenmasse/Frischmasse ermittelt. Die getrockneten Proben wurden nun erneut pulverisiert. Anschließend wurden jeweils 2-4mg der getrockneten Probe mit 6-12mg Wolframoxid auf Aluminiumpapier eingewogen, zu festen Päckchen gefaltet und im Elementaranalysator vermessen. Als Standard wurde ein vom Hersteller angebotener Heustandard mit definierten C-, N-, und S-Gehalten verwendet. Aus den so gewonnenen Daten wurde dann das C/N-Verhältnis ermittelt.

2.4. Bestimmung Sekundärer Inhaltsstoffe

2.4.1. Bestimmung von Alkaloiden

Zur Bestimmung der Alkaloide wurde gefrorenes, pulverisiertes Pflanzenmaterial (ca. 100mg) in drei Schritten mit 40% MeOH / 0,1% 1N HCl extrahiert (1 x 500µl, 1 x 300µl, 1 x 200µl). Der nach Zentrifugation (5 min., 20000g) gewonnene Überstand wurde dann direkt für die Alkaloidbestimmung mittels HPLC (Waters LCM 1) verwendet. Die Trennung der Alkaloide erfolgte auf einer Prodigy-Säule (ODS (3), 5µ, 150x4,6mm, Phenomenex) mit folgendem Gradientensystem: von 0% B in 25 min. auf 60% B bei RT.

A: 50ml 0,4M K₂HPO₄, 800ml H₂O, 150ml MeOH (pH 8,5 mit Phosphorsäure)

B: 50ml H₂O, 950ml Acetonitril

Die aufgetrennten Alkaloide wurden bei 254nm detektiert. Quantifizierungen wurden über den Vergleich mit käuflichen Standards vorgenommen. Für alle HPLC-Analysen wurde hochreines Wasser für die HPLC (Merck) verwendet.

2.4.2. Bestimmung von Methanol-löslichen Phenylpropanen

Etwa 100mg pulverisiertes, gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in zwei Schritten (2 x 500µl) mit 100% Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min., 20000g) wurden 160µl des Überstandes mit 40µl Laufmittel A verdünnt und per HPLC aufgetrennt. Die Trennung erfolgte über eine Umkehrphasen-Säule (LiChrospher 100, RP18, 250x4,6mm, 5µ, Merck) mit folgendem Gradientensystem: von 0% B in 25 min. auf 60% B bei 25°C.

A: 980ml H₂O, 20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure

B: 80ml H₂O, 900ml MeOH, 20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure

Die Detektion der aufgetrennten Phenylpropane erfolgte mittels Fluoreszenz (Excitation: 300nm, Emission: 400nm, Verstärkung: 100) und mittels UV bei 210nm-450nm (Waters, PDA Detector 996). Quantifizierungen wurden über den Vergleich mit käuflichen Standards vorgenommen. Scopolin wurde über den aufgereinigten Standard quantifiziert (s. 2.11.). Für alle HPLC-Analysen wurde hochreines Wasser für die HPLC (Merck) verwendet.

2.4.3. Bestimmung von Zellwand-gebundenen Phenylpropanen

Zur Bestimmung Zellwand-gebundener Phenole wurde das durch methanolische Extraktion (2.4.2.) gewonnene Sediment ü. N. mit 1ml 1N NaOH bei 40°C inkubiert. Nach Ansäuern des Extraktes mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 wurde der Ansatz 2 mal mit je 0,5ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die jeweils nach Zentrifugation erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt, in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt und in ca. 150µl 80% Methanol resuspendiert. Dieser Ansatz wurde dann im oben beschriebenen Phenole-System per HPLC aufgetrennt und analysiert.

2.4.4. Bestimmung von Salizylsäure

Etwa 100mg pulverisiertes, gefrorenes Pflanzenmaterial wurde mit vier mal 550µl 100% Methanol extrahiert. Die jeweils nach Zentrifugation (5 min., 20000g) gewonnenen Überstände wurden vereinigt und erneut zentrifugiert. Zur Bestimmung

der freien Salizylsäure wurden 1,5ml des Extraktes mit 6ml Laufmittel A (LM A) verdünnt und über Festphasenextraktionssäulen (C₁₈, OASIS, 30mg, Waters) gereinigt. Dazu wurden je 6ml des Gemisches auf die mit 1ml Methanol und 1ml Laufmittel A konditionierten Säulen aufgegeben. Nach einem Waschschrift mit 1ml 5% Methanol in Laufmittel A wurde die Salizylsäure mit 1ml 100% Methanol eluiert.

Zur Bestimmung der glucosidisch gebundenen Salizylsäure wurden 0,5ml des Extraktes mit 0,8ml Laufmittel A verdünnt und in der Vakuumzentrifuge auf 0,8ml eingengt. Nach Zugabe von 400µl konzentrierter HCl wurde das Gemisch für 1h bei 85°C inkubiert. Das Hydrolysat wurde dann auf Eis mit 1,1ml 4N NaOH versetzt und 2ml dieses Gemisches wurden wie oben beschrieben über Festphasenextraktion gereinigt.

Zur HPLC-Analyse wurde das jeweilige Eluat 1:1 mit Laufmittel A verdünnt und je 100µl über eine Umkehrphasen-Säule (Symmetry-shield, RP18, 100Å, 250x4,6mm, 5µ, Waters) getrennt. Verwendet wurde folgendes Gradientensystem: von 10% B in 40 min. auf 60% B bei 30°C.

LM A: 980ml H₂O, 20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure

LM B: 80ml H₂O, 800ml MeOH, 100ml Acetonitril, 20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure

Die aufgetrennte Salizylsäure wurde mittels Fluoreszenz (Excitation: 300nm, Emission: 400nm, Verstärkung: 1000) detektiert. Quantifizierungen wurden über den Vergleich mit käuflich erworbener Salizylsäure vorgenommen, welche parallel zu den Proben mit aufgearbeitet wurde.

2.5. Identifizierung der Chlorogensäure (CGA)-Isomere

Chlorogensäure (5-O-caffeoyl-D-quinic acid) ist kommerziell erhältlich und konnte durch Cochromatographie und Vergleich der PDA-Spektren eindeutig einem Peak in den aufgetrennten Extrakten Methanol-löslicher Phenole (s. 2.4.2.) zugeordnet werden. Die Identifizierung von Neochlorogensäure (3-O-caffeoyl-D-quinic acid) und Cryptochlorogensäure (4-O-caffeoyl-D-quinic acid) erfolgte durch Isomerisierung der Chlorogensäure. Dazu wurden 10mg Chlorogensäure in 50ml H₂O gelöst und unter schnellem Rühren bei RT mit 50ml einer wässrigen Na₂CO₃ Lösung (2g/l) versetzt. Aliquots dieser Isomerisierungslösung wurden direkt nach dem Mischen (0 min.

Inkubationszeit), nach 5 min. und nach 30 min. mittels HPLC analysiert. Abgestoppt wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe von 1 Vol 100% MeOH. Die Auftrennung der drei Isomere erfolgte über eine Umkehrphasen-Säule (Symmetry shield, RP18, 250x4,6mm, 5 μ , Waters) in dem unter 2.4.2. beschriebenen Gradientensystem. In wässriger Natriumcarbonatlösung wird zuerst das 4'- und dann das 3'-Isomer gebildet (Kiehne, 1997). Die erste Messung (0 min.) lieferte ein intensives Signal für die Chlorogensäure und ein schwaches Signal für die Cryptochlorogensäure. Nach 5 min. wurde ein zusätzliches Signal für die Neochlorogensäure detektiert. Daraus ergab sich auf der Symmetry-Säule ein Elutionsverhalten von 3-, 4-, 5-O-caffeoyl-D-quinic acid, was der in der Literatur am häufigsten beschriebenen Elutionsfolge entspricht (Kiehne, 1997). Da die Trennung phenolischer Extrakte auf einer LiChrospher-Säule erfolgte (s. 2.4.2.) mussten die Isomere der Chlorogensäure diesem System zugeordnet werden. Dazu wurden die auf der Symmetry-Säule getrennten Isomere einzeln aufgefangen und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in 80% MeOH resuspendiert und auf einer LiChrospher-Säule getrennt. Auch für die LiChrospher-Säule ergab sich die Elutionsfolge 3-, 4-, 5-O-caffeoyl-D-quinic acid, wobei in diesem System das 4'- und 5'-Isomer im Gemisch nicht voneinander getrennt werden können. Durch Cochromatographie und Vergleich der PDA-Spektren mit den aufgetrennten Extrakten methanollöslicher Phenole (s. 2.4.2.) konnten auch die Isomere der Chlorogensäure zugeordnet werden.

2.6. Bestimmung des Ligningehaltes

Der Ligningehalt wurde nach der Thioglycolsäure Methode (Campbell und Ellis, 1992; Lapierre et al., 1986) bestimmt. Dazu wurden 100mg Pflanzenmaterial mit 1ml Extraktionspuffer (200mM Tris-Acetat pH 7,5; 5mM Mercaptoethanol; 0,5% Chaps) versetzt. Die löslichen Proteine wurden dann durch wiederholtes Mixen extrahiert. Das unlösliche Material wurde anschließend durch Zentrifugation (10 min., 20000g) sedimentiert und einer Methanolextraktion unterzogen. Dazu wurde das Pellet in 500 μ l reinem MeOH gelöst und in Sicherheitsreaktionsgefäßen 2h bei 80°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet 2 mal mit H₂O gewaschen, mit 375 μ l H₂O, 125 μ l konzentrierter Salzsäure und 50 μ l Thioglycolsäure versetzt und für 3h bei 80°C

inkubiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde 2 mal mit H₂O gewaschen und in 1ml 1N NaOH resuspendiert. Dieser Ansatz wurde ü. N. bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der gewonnene Überstand mit 100µl konzentrierter Salzsäure versetzt, vermischt und für 4h bei 4°C gefällt. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde in 1ml NaOH resuspendiert und bei 280nm in einer geeigneten Verdünnung gegen 1N NaOH gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe käuflich erworbenen Lignins (Aldrich), welches parallel zu den Proben mit aufgearbeitet wurde. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug und in Sicherheitsreaktionsgefäßen durchgeführt.

2.7. Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) Aktivität

Zur Bestimmung der PAL-Aktivität wurde gefrorenes pulverisiertes Pflanzenmaterial 1:1 (mg:µl) mit Extraktionspuffer (100mM Na-Borate pH 8,8; Proteaseinhibitoren (Complete EDTA free, Pharmacia); 5mM Mercaptoethanol) und einer Spatelspitze unlöslichem PVP versetzt. Nach Homogenisierung des Ansatzes durch wiederholtes Schütteln erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 30 min. auf Eis. Anschließend wurden der Extrakt 2 mal 30s im Ultraschallbad inkubiert, wodurch die Ausbeute an löslichem Protein erhöht werden konnte. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand wurde über Gelfiltration (NAP5, Pharmacia) gegen Extraktionspuffer entsalzt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 2.13.) wurde der Enzymassay in Mikrotiterplatten wie folgt angesetzt:

| | |
|-------|---------------------------------|
| 20µl | 100mM L-Phenylalanin (EK: 10mM) |
| 100µl | Proteinextrakt |
| 80µl | Extraktionspuffer |

Der Ansatz wurde bei 37°C im Mikrotiterplattenlesegerät (Spektra Max Plus, Molecular Devices) inkubiert. Der Nachweis der Produktbildung erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 290nm, gemessen wurde alle 3 min. über einen Zeitraum von 2h. Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichgerade mit käuflich erworbener t-Zimtsäure.

2.8. Inokulationsexperimente mit dem Kartoffelvirus Y (PVY)

2.8.1. Inokulation von Tabakpflanzen mit PVY

Die Infektionslösung zur Inokulation von Tabakpflanzen mit PVY wurde immer frisch durch Homogenisierung von je 2 Blattscheiben (9mmØ) von deutlich infizierten Pflanzen mit 2ml 50mM KP_i -Puffer (pH 7,0) im Mörser hergestellt. Die Tabakpflanzen wurden immer im Alter von 6-7 Wochen infiziert. Zur mechanischen Infektion wurde das zweitälteste Blatt einer Tabakpflanze mit etwas Carborundum (Schleifmittel) bestäubt. Die Infektionslösung wurde dann mit einem Pistil auf dem bestäubten Blatt verrieben. Nach ca. 5 min. wurden das Carborundum und die restliche Infektionslösung mit ausreichend Wasser von der Blattoberfläche abgespült. Kontrollpflanzen wurden mit 50mM KP_i -Puffer (pH 7,0) schein-infiziert.

2.8.2. Bestimmung des Titers an PVY-Protein durch ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)-Test zur Bestimmung des Titers an PVY-Protein wurde unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt:

| Extraktionspuffer | Coating-Puffer | 10 x PBS | Substrat-Puffer |
|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1 x PBS | 1,95g/l Na_2CO_3 | 80g/l NaCl | 800ml H_2O |
| 0,5ml/l Tween20 | 2,93g/l $NaHCO_3$ | 2,4g/l KH_2PO_4 | 203mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ |
| 2% PVP (löslich) | 0,2g/l NaN_3 | 14,4g/l Na_2HPO_4 | 97ml Diethanolamin |
| 0,2% BSA | pH 9,6 | 2g/l KCl | mit HCl auf pH 9,6 |
| | | pH 7,4 min NaOH | ad 1l mit H_2O |
| | | autoklavieren | 0,2g NaN_3 |

Zunächst wurde der erste Antikörper (Anti PVY IgG, Bioreba) an die Oberfläche der Mikrotiterplatte (PS Mikroplatte, 96 well, Flachboden, Greiner) gebunden. Dazu wurde der Antikörper 1:1000 in Coating-Puffer verdünnt und je 100µl/Öffnung auf die Platte

aufgetragen. Nach Inkubation bei 4°C ü. N. wurden die Platten gewaschen (1 x PBS, 0,5ml/l Tween20, 2 x kurz, 3 x lang) und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Von den Tabakpflanzen wurden 7 und 14 Tage nach Inokulation je zwei Blattscheiben (9mmØ) aus dem Interkostalfeld des infizierten Blattes und des vierten Blattes darüber geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Je zwei Blattscheiben wurden mit 2ml Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert und unlösliches Blattmaterial durch Zentrifugation (5 min., 13000rpm) sedimentiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) der Extrakte angefertigt und je 100µl/ Öffnung aufgetragen. Die Platten wurden dann bei 4°C ü. N. inkubiert und anschließend gewaschen (s. o.). Nach Auftragen des 1:1000 in Extraktionspuffer verdünnten PVY-Konjugates (100µl/Öffnung, Anti PVY IgG conjugated, Bioreba) wurden die Platten bei 30°C für 4h inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurde das Substrat (4-Nitrophenylphosphat, Roth, 1mg/ml in Substrat-Puffer) aufgetragen (100µl/Öffnung). Nach Eintreten einer Gelbfärbung, spätestens aber nach 15 min., wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl 3M NaOH/Öffnung gestoppt und die Absorption bei 405nm gemessen. Alle Platten wurden nach der gleichen Zeit abgestoppt und vermessen. Als Kontrolle wurde immer eine „positiv Kontrolle“ (sichtbar infizierte Wildtyp-Pflanze) mit aufgearbeitet und vermessen. Alle Inkubationen erfolgten in „feuchter Kammer“ (Deckel mit angefeuchtetem Filterpapier).

2.9. Infiltration von Blattscheiben

Von 6 Wochen alten Tabakpflanzen wurden mit einem Korkbohrer Blattscheiben (Ø 8mm) aus dem Interkostalfeld ausgestochen und mit einer Scopoletinlösung (10µM, 75µM oder 150µM in 50mM KP_i pH 5,7) oder zur Kontrolle mit 50mM KP_i pH 5,7 inkubiert. Dazu wurden die Blattscheiben in den Deckel einer Petrischale (10cmx10cm) gelegt und mit der Inkubationslösung bedeckt. Nach Auflegen der Petrischale wurden die Blattscheiben 10 min. in einer Vakuumzentrifuge infiltriert. Die Blattscheiben wurden anschließend in frische Inkubationslösung transferiert und bis zur Ernte in Gewebekulturkammern (s. 2.2.2.) weiterkultiviert. Direkt nach der Ernte wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.10. Präparative Extraktion und Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) durch säulenchromatographische Trennverfahren

2.10.1. Extraktion und Ammoniumsulfatfällung

Die höchsten Ausbeuten an Protein und aktivem Enzym wurden mit lyophilisiertem Zellkulturmaterial erhalten. Ca. 40g lyophilisiertes Zellkulturmaterial (entspricht ca. 630g Frischmasse) wurde mit 1200ml Extraktionspuffer (0,1M HEPES pH 8,0, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT) im vorgekühlten Mörser homogenisiert und anschließend 1h auf Eis extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min., 11000g) wurden die nichtlöslichen Bestandteile mit 700ml Extraktionspuffer nachextrahiert und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden dann einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Nach einstündiger Fällung des Extraktes bei 30% Sättigung mit (NH₄)₂SO₄ erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 11000g. Der so erhaltene Überstand wurde nun nochmals eine Stunde bei 70% Sättigung mit (NH₄)₂SO₄ gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 70ml HEPES-Puffer (20mM HEPES pH 8,0, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT, 2% Glycerin) resuspendiert und im gleichen Puffer per Gelfiltration (Sephadex G25, Pharmacia) entsalzt. Der Proteinextrakt wurde mit einer Flussrate von 1ml/min auf die Sephadex G25-Säule (SV=200ml) gegeben, gesammelt wurden Fraktionen von 10ml.

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Bestimmungen von Proteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten erfolgten immer direkt nach der Probenahme. Alle beschriebenen säulenchromatographischen Trennverfahren wurden an einem FPLC[®]-System (Pharmacia) durchgeführt. Das System bestand aus einer Pumpeneinheit (Pump P-500), mit Kontrolleinheit (Controller LCC-501 Plus). Die Probenaufgabe erfolgte mittels eines Rheodyne-Injektionssystems und die Detektion und Aufzeichnung der Elutionsprofile erfolgte photometrisch bei 280nm durch einen UV-Detektor (UV-MII) mit angeschlossenen Schreiber (Rec 102). Das Auffangen der Säuleneluate erfolgte mit einem Fraktionssammler (Frac-200). Alle verwendeten Pufferlösungen wurden vor Gebrauch filtriert (0,45µm) und mit Helium entgast.

2.10.2. Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose

Der über SephadexG25 gereinigte Proteinextrakt wurde 10 Minuten zentrifugiert (11000g) und mit einer Flussrate von 4ml/min auf eine DEAE-Sepharose-Säule (DEAE-Sepharose Fast Flow, Pharmacia, SV=120ml) gegeben. Alle nicht gebundenen Proteine wurden mit 200ml Hepes-Puffer (20mM Hepes pH 7,8, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT, 2% Glycerin) von der Säule gewaschen. Die SGT-Aktivität wurde anschließend mit einem linearen Gradienten von 0-200mM NaCl in Hepes-Puffer eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten SGT-Aktivität wurden vereinigt und über Ultrafiltration (Centricon80, Amicon) auf ca. 30ml eingeengt.

2.10.3. Kationenaustauschchromatographie über CM-Sepharose

Zur Chromatographie über einen Kationenaustauscher wurde der konzentrierte Proteinextrakt zunächst mittels Gelfiltration (Nap10, Pharmacia) umgepuffert (20mM Hepes pH 6,5, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT, 2% Glycerin). Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 2ml/min auf die CM-Sepharose-Säule (CM-Sepharose Fast Flow, Pharmacia, SV=22ml) aufgetragen, Fraktionen von 10ml wurden gesammelt. Unter den gewählten Bedingungen wurde die SGT nicht an das Säulenmaterial gebunden. Wieder wurden die Fraktionen mit der höchsten SGT-Aktivität vereinigt. Der so entstandene Pool wurde über Ultrafiltration auf ein geringes Volumen eingeengt, mittels Gelfiltration gegen KP_i-Puffer (10mM, pH 6,8, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT) umgepuffert und erneut konzentriert auf ca. 15ml.

2.10.4. Chromatographie über Hydroxyapatit

Zur weiteren Reinigung wurde die Proteinlösung an einer Hydroxyapatit-Säule (Macro-Prep[®] Ceramic Hydroxyapatite Type I, 20µm, SV=10ml) aufgetrennt. Das Auftragen der Proteinlösung und das Auswaschen nicht gebundener Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0,5ml/min in 10mM KP_i-Puffer pH 6,8. Die Elution der SGT erfolgte über einen linearen Gradienten von 10-250mM KP_i-Puffer pH 6,8 bei einer Flussrate von

1ml/min, gesammelt wurden 2ml Fraktionen. Die Fraktionen mit der höchsten SGT-Aktivität wurden vereinigt und über Ultrafiltration auf 550µl eingengt.

2.10.5. Gelfiltrationschromatographie über Superdex-75

Im Anschluss an die Chromatographie über Hydroxyapatit wurde eine Gelfiltration über eine Superdex75-Säule (SuperdexTM75, Pharmacia, SV=120ml) durchgeführt. Die Proteinfraktion wurde mit einer Flussrate von 0,2ml/min mit Hepes-Puffer (20mM Hepes pH 8,0, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM DTT, 2% Glycerin) auf die Säule aufgetragen. Gesammelt wurden 2ml Fraktionen. Die Fraktionen mit der höchsten SGT-Aktivität wurden vereinigt und über Ultrafiltration auf 2,5ml eingengt.

2.10.6. Affinitätschromatographie über Reactive Yellow 3

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie über Reactive Yellow 3 (Reactive Yellow 3, Sigma, SV=8ml) durchgeführt. Die nach Gelfiltration erhaltene Fraktion wurde mit einer Flussrate von 0,1ml/min in Hepes-Puffer (s. 2.10.5.) aufgetragen und ungebundene Proteine von der Säule gewaschen, gesammelt wurden Fraktionen von 1ml. Anschließend erfolgte die Elution der SGT mit 5mM UDP in Hepes-Puffer (s. oben) mit einer Flussrate von 0,5ml/min, gesammelt wurden Fraktionen von 2ml. Vereinigt wurden dann die Fraktionen mit der höchsten SGT-Aktivität. Der so erhaltene Pool wurde mittels Ultrafiltration auf 800µl konzentriert.

2.11. Präparative Isolierung von Scopolin aus Tabakwurzeln

Festphasenextraktion (SPE)

5g gemörseretes Wurzelmaterial von 8 Wochen alten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) wurde mit 15ml 50% igem MeOH ca. 30 Minuten extrahiert und über einen Nylonfilter (100µm) und eine Cellulosemembran (45µm) filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser auf 10% MeOH verdünnt und über Festphasenextraktions-Säulen

(Chromabond C18, 5g, Macherey-Nagel) weiter gereinigt. Dazu wurde das Filtrat auf die mit je 1Vol 100% MeOH und H₂O equilibrierten Säulen aufgegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säulen mit je 10% MeOH wurde das Scopolin mit je 20ml 100% MeOH eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge auf 1ml eingeeengt.

Präparative High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Mit Hilfe eines präparativen HPLC-Systems (WatersTM 600 Controller) wurde die gewonnene Scopolinfraktion weiter gereinigt. Die nach der SPE erhaltene Scopolinfraktion wurde in 50% MeOH manuell über ein Rheodyne-Ventil auf eine in H₂O konditionierte präparative RP18-Säule (LiChrospher100, RP18, 5µm, 250x8mm) gegeben. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0-100% MeOH in 30 Minuten. Die Detektion und Aufzeichnung der Elutionsprofile erfolgte photometrisch bei 254nm durch einen UV-Detektor (Waters 440 Absorbance Detector) mit angeschlossenem Schreiber (1326 Econo Recorder, Bio Rad). Die Fraktionierung erfolgte per Hand in Abhängigkeit von der Absorption. Die Scopolin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und erneut über das präparative System gereinigt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis eine ausreichende Reinheit erzielt war. Die Reinheitskontrolle erfolgte über analytische HPLC (s. 2.4.2.). Außerdem wurde die Scopolinkonzentration der gereinigten Fraktion über den Verdau mit β-Glucosidase bestimmt. Die reine Scopolinfraktion wurde über Vakuumzentrifugation schonend bis zur Trockne eingeeengt, gewogen und dann in 20% MeOH resuspendiert und portioniert eingefroren.

Verdau mit β-Glucosidase

100ng des gereinigten Scopolins wurden in 100µl MES-Puffer (50mM, pH 5,0) resuspendiert. 50µl dieses Ansatzes wurden mit 10µl β-Glucosidase (0,1U/µl) 1h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die restlichen 50µl dienten als Kontrolle. Nach 1h wurde die Reaktion in beiden Reaktionsgefäßen mit 1Vol 100% MeOH abgestoppt. Beide Ansätze wurden dann über das analytische HPLC-System (s. 2.4.2.) getrennt. Die Menge des gebildeten Produktes Scopoletin wurde mit Hilfe des käuflichen Scopoletinstandards berechnet und mit der Einwaage an mutmaßlich reinem Scopolin verglichen.

2.12. Enzymatische Bestimmung der SGT-Aktivität

Analytische Proteinextraktion

Zur Anfertigung von Proteinextrakten aus verschiedenen Pflanzengewebe wurde das Pflanzenmaterial unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Homogenisierung des Pflanzenmaterials erfolgte unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser und die weiteren Arbeitsschritte wurden bei $0-4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Zur Extraktion der Proteine wurden 100mg Pflanzenmaterial mit 500 μl Extraktionspuffer (EP) der folgenden Zusammensetzung versetzt: 0,1M Tris-HCl pH 8,0; 1mM MgCl_2 ; 1mM EDTA; 10mM Dithiothreitol (DTT); Proteaseinhibitoren (Complete EDTA free, Pharmacia). Dithiothreitol und der Proteaseinhibitoren-Mix wurden dem Puffer unmittelbar vor Beginn der Aufarbeitung zugesetzt. Nach dem Mischen des Pflanzenmaterials mit dem Extraktionspuffer wurde der Extrakt für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um Zell- und Gewebetrümmer vom löslichen Überstand zu trennen schloss sich eine Zentrifugation (13000rpm, 5min) an. Der lösliche Überstand wurde dann über Gelfiltrationssäulen (NAP5, Pharmacia) gegen Extraktionspuffer entsalzt.

Enzymassay zur Bestimmung der SGT-Aktivität

Die spezifische Aktivität der SGT wurde jeweils über die Produktmenge quantifiziert, die in einem Enzymassay unter definierten Bedingungen entstanden war. Der Enzymassay wurde wie folgt angesetzt:

10 μl Scopoletin (10mM in EP)

10 μl UDP-Glucose (5mM in EP)

80 μl entsalzter Proteinextrakt

Das Reaktionsgemisch wurde direkt nach Zugabe der Proteine für 20 min. bei 30°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 μl 100% MeOH zum Reaktionsgemisch. Als Kontrolle wurde jeweils ein Nullwert (Abstoppen der Reaktion direkt nach Ansatz des Assays) oder alternativ eine Hitzekontrolle (Denaturierung des Proteins für 5 min. bei 95°C) mit angesetzt.

Quantifizierung des Reaktionsproduktes mittels HPLC

Der Nachweis der Produktbildung erfolgte per Auftrennung über HPLC (Waters 2690 Alliance) und Fluoreszenzdetektion (FP-1520 Fluorescence Detector, Jasco). Nach Zentrifugation des abgestoppten Reaktionsgemisches wurden jeweils 20µl des Reaktionsgemisches an einer Umkehrphasen-Säule (LiChrospher 100, RP18, 75x4mm, 5µm, Merck) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in 7 min. isokratisch bei 70% Laufmittel A (20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure + 980ml H₂O) und 30% Laufmittel B (20ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure + 900ml MeOH + 80ml H₂O). Die Detektion der Produktbildung erfolgte nach Anregung mit 300nm bei 400nm und einer Verstärkung von 100, quantifiziert wurde mit Hilfe des gereinigten Scopolinstandards (s. 2.11.).

2.13. Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Messungen von Proteinkonzentrationen in Extrakten oder gereinigten Enzymfraktionen wurden nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit Hilfe des Bio Rad Proteinassays durchgeführt. Dazu wurde entsprechend den Angaben des Herstellers eine Verdünnung des Proteinassay-Konzentrates (1:5 in H₂O) hergestellt. Zu 200µl Bradford Reagenz wurden 1µl bis maximal 5µl der Proteinlösung pipettiert und gut gemischt. Nach 10 min. Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595nm in Mikrotiterplatten gegen einen identisch behandelten Blindwert ohne Protein am Spektralphotometer (Spektramax Plus, Molecular Devices) gemessen. Zur Quantifizierung der Extinktionswerte wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt.

2.14. Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE)

Vertikale SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen aus Pflanzenextrakten oder Enzymfraktionen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen nach der von Laemmli (1970) entwickelten Methode. Dazu wurden die Proteinextrakte mit 2Vol Probenpuffer (56mM Na₂CO₃, 56mM DTT, 2% SDS, 13% Saccharose, 2mM EDTA) versetzt und für 10 min. bei 95°C inkubiert (Ansatz maximal 20µl). Nach anschließender Zentrifugation

wurden die denaturierten Proteine in die Geltaschen pipettiert. Zur Trennung der Proteinproben wurde das Vertikal-Minigel-System (Mini 2D cell) von Bio Rad verwendet (Trenngelgröße 9 x 6 cm, Gelstärke 1mm).

| | Trenngel (12%) | Trenngel (10%) | Sammelgel |
|---|----------------|----------------|-----------|
| Acrylamid / Bisacrylamid (30% / 0,8%, w/v) | 4,0ml | 3,3ml | 1,3ml |
| 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 2,5ml | 2,5ml | |
| 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 | | | 2,5ml |
| 10% SDS | 0,1ml | 0,1ml | 0,1ml |
| TEMED | 50µl | 50µl | 50µl |
| 10% Ammoniumpersulfat | 5µl | 5µl | 10µl |
| H ₂ O | 3,35ml | 4,05ml | 6,1ml |

Die Trennung erfolgte bei 140V in ca. 1,5h. Verwendet wurden sowohl 10%ige als auch 12%ige SDS-Gele. Der zur Elektrophorese verwendete Puffer bestand aus 25mM Tris-HCl pH 8,3, 200mM Glycin und 0,1% SDS.

Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine im Gel durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele 0,5h in Färbelösung (0,1% Coomassie Blue R-250 (w/v), 40% MeOH (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) inkubiert. Die Gele wurden anschließend entfärbt (40% MeOH (v/v), 10% Essigsäure (v/v)), bis die Proteinbanden auf dem klaren Hintergrund des Polyacrylamidgeles deutlich sichtbar waren.

2.15. Molekulargewichtsabschätzung der SGT

Die Abschätzung des Molekulargewichtes des nativen Proteins erfolgte mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie über die Superdex75-Säule. Aus den Elutionsvolumina von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Aldolase, BSA, Eialbumin, Chymotrypsinogen A, Cytochrom C, DNP-L-Alanin) konnte das Molekulargewicht der

SGT berechnet werden. Weiterhin wurde das Molekulargewicht des denaturierten Proteins aus der Wanderungsstrecke der SGT im Polyacrylamidgel in Relation zur Wanderungsstrecke von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht bestimmt.

2.16. Expression rekombinanter SGT in *E. coli*

Der isolierte cDNA Klon (s. 2.24.) wurde zur Gewinnung rekombinanten Proteins mit Hilfe des QIAexpress Type IV Kits (Qiagen) in *E. coli* (Stamm: XLIBLue) transformiert.

2.17. Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA Agarose

Lysis

Zunächst wurde eine ausreichend große Bakterienkultur in LB-Medium angelegt (bei 30°C, 120rpm):

je 1 Liter LB-Medium
10g Bacto-Trypton (Difco)
5g Bacto-Hefe-Extrakt (Difco)
10g NaCl
pH 7,5 mit NaOH.

Bei einer OD_{600nm} von 0,6 wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1mM Imidazol (EK) induziert. Nach weiteren 5-7 Stunden Inkubation (120rpm, 30°C) wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min. bei 5000g) pelletiert und bei -80°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurde das Pellet in 3ml Lysispuffer/g Zellen resuspendiert (Lysispuffer: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA, Proteaseinhibitoren (Complete EDTA free, Pharmacia), 100mM NaCl). Nach Zugabe von 800µg Lysozym/g Zellen wurde der Ansatz 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3x30s Ultraschall aufgeschlossen. Es folgte die Zugabe von 4mg Desoxycholinsäure/g Zellen. Nach vorsichtigem Mischen wurde das Lysat viskos. Nun wurden 100µg DNase/g Zellen zugegeben und mit dem Lysat auf Eis so lange vermischt, bis die Lösung nicht mehr viskos war. Um Zelltrümmer abzutrennen folgte die Zentrifugation des Lysats für 1h bei 16000rpm und 4°C. Der so

gewonnene Überstand wurde anschließend über PD-10-Säulen (Pharmacia) umgepuffert (Puffer A: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8).

Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose

Zur weiteren Reinigung des rekombinanten Proteins wurde Ni-NTA Agarose (Qiagen) eingesetzt. Nach Konditionierung des Trennmediums mit Puffer A (s. oben) wurde das Lysat mit der Ni-NTA Agarose für 3h bei 4°C im Batch-Verfahren inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen abgenommen. Die Ni-NTA Agarose wurde nun mit 1Vol Puffer B (Puffer A + 10mM Imidazol) und 1Vol Puffer C (Puffer A + 20mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte dann mit Puffer D (Puffer A + 250mM Imidazol). Im Anschluss wurde die Proteinfraction über Ultrafiltration eingeeengt und gegen H₂O + 10% Glycerin dialysiert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden im SDS-Gel getrennt und analysiert. Im Eluat waren neben dem gereinigten Protein einige Banden für Proteine mit kleinerem Molekulargewicht im SDS-Gel zu beobachten, weshalb die Fraktion noch einmal einer Gelfiltration über Superdex75 (s. 2.10.5.) unterzogen wurde.

2.18. Gewinnung von Antiseren aus Kaninchen

Die, wie unter Punkt 2.17. beschrieben, gereinigte rekombinante Glucosyltransferase wurde direkt für die Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die Immunisierung, wie auch die Herstellung der Antiseren erfolgte als Dienstleistung des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) durch Frau Dr. Mannteufel (Arbeitsgruppe Serologie). Die so erhaltenen Antikörper wurden im Western-Blot überprüft.

2.19. Nachweis von Proteinen durch Western Blot-Hybridisierung

Proteintransfer auf Nylonmembranen

Im Anschluss an die Elektrophorese (2.14.) wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 10 min. in Transferpuffer (25mM Tris, 20% MeOH (v/v)) equilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einem Semi-dry-Blotter (LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG),

bei $0,8\text{mM}/\text{cm}^2$ Gel für 1,5h. Dazu wurden Filterpapiere (Whatman 3mm) und die Nylonmembran (ImmobilonTM-P, PVDF, $0,45\mu\text{m}$, Millipore) in Gelgröße zugeschnitten und im jeweiligen Transferpuffer equilibriert (s. Blot-Aufbau). Der Blot wurde dann wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

| | | |
|----------|------------------------|--|
| Anode: | 6 Lagen Whatman-Papier | 0,3M Tris, 20% MeOH (v/v) |
| | 3 Lagen Whatman-Papier | 25mM Tris, 20% MeOH (v/v) |
| | PVDF-Membran | 25mM Tris, 20% MeOH (v/v) |
| | SDS-Polyacrylamidgel | 25mM Tris, 20% MeOH (v/v) |
| Kathode: | 9 Lagen Whatman-Papier | 60mM 6-Aminohexansäure, 20% MeOH (v/v), 0,1% SDS (w/v) |

Dann wurde die obere Graphitplatte (Kathode) aufgesetzt und beschwert. Der Transfer wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau (0,2% in 3% TCA) überprüft.

Hybridisierung

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran ü. N. bei 4°C in Blockierungslösung (10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,5% I-Block) inkubiert um die noch freien Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen. Der zur Immunodetektion verwendete erste Antikörper (2.18.) wurde im gleichen Puffer mit 0,2% I-Block und 1% Tween 20 1:500 verdünnt und für 3h bei RT gebunden. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min. in TBST-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) und 1 x 10min in TBST-Puffer (mit 1% Tween 20, 0,2% I-Block) gewaschen um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu spülen. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP) erfolgte 1:5000 in 10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0,15% Tween 20, 0,5% I-Block. Zusammen mit der Membran erfolgte die Inkubation für 45 min. auf einem Schüttler. Die Membran wurde dann 2 x 5 min. in TBST-Puffer, 1 x 10 min. in TBST-Puffer (mit 0,15% Tween 20, 0,2% I-Block) und 1 x 5 min. in DEA (0,1M Diethanolamin, 1mM MgCl_2 , pH 10) gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden nun mit Hilfe des Chemilumineszenzsubstrates CDP-Star® (Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase führt zu Licht-Emission bei 465nm) sichtbar gemacht. Dazu wurden 100 μl Saphire blue und 10 μl CDP-Star (25mM) mit 1ml DEA gemischt und luftblasenfrei auf der Membran verteilt. Nach 5 min. Inkubation wurde das Substrat von der Membranoberfläche abgenommen und der Filter in einen Hybridisierungsbeutel

überführt welcher allseitig verschlossen wurde. Es folgte die 5-15 minütige Exposition eines Röntgenfilms (X-OMAT, Kodak).

2.20. Molekularbiologische Standardmethoden

Alle verwendeten Standardmethoden (Restriktionsspaltungen, gelelektrophoretische Auftrennungen, Ligationen, usw.) wurden soweit nicht anders angegeben wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben durchgeführt.

2.21. Oligonukleotide

Unter Verwendung der aus der Literatur bekannten Sequenz einer Salizylsäure induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, Datenbanknummer U32643) wurden Oligonukleotid-Primer mit dem Ziel abgeleitet ein Fragment codierend für dieses Enzym zu amplifizieren.

Die zur Isolierung eines cDNA-Klons aus Zellsuspensionskulturen benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und bestehen aus folgenden Nukleotidsequenzen:

5'-Oligonucleotid: 5'-ATG GGT CAG CTC CAT ATT-3'

3'-Oligonucleotid: 5'-ATG ACC AGT GGA ACT ATA-3'

Von der Firma Interaktiva (Ulm) wurden die für die Klonierung der Glucosyltransferase benötigten Oligonukleotide synthetisiert, bestehend aus folgenden Nukleotidsequenzen:

5'-Oligonucleotid: 5'-GAC GTG GAT CCA TGG GTC AGC TCC ATA TT-3'

3'-Oligonucleotid: 5'-GTC GAG TCG ACA TGA CCA GTG GAA CTA TA-3'

Die zur Nukleotidsequenz der IS5a komplementären Nukleotide sind unterstrichen. Die Oligonukleotide wurden mit der Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme BamHI bzw. SalI ausgestattet, um weitere Klonierungsschritte zu vereinfachen.

2.22. Vektoren

| | |
|--------------|--|
| pBinAR | Kan ^r (Höfgen und Willmitzer, 1990) |
| pQE30 | Amp ^r (Qiagen) |
| TA (PCR 2.1) | Amp ^r (Invitrogen) |

2.23. Bakterienstämme

| | |
|----------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> XLIBLue | endA1, hsdR17 (r _{k-} , m _{k+}), supE44, λ-thi-1, recA1, gyrA96, rel A1, lac, (F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tv10, (tet ^r)) (Bullock et al., 1987) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Stamm: (p)GV2260 (Deblaere et al., 1984) |

2.24. Isolierung eines cDNA-Klons über PCR-Amplifizierung

Reverse Transkription von mRNA

Ausgehend von isolierter Gesamt-RNA (s. 2.26.) aus Zellsuspensionskulturen wurde mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (SuperscriptTM Preamplification System, Gibco BRL) einzelsträngige cDNA mit folgendem Ansatz synthetisiert:

| | |
|------|---|
| 1 μl | Oligo-(dt) ₁₅ -primer (500μg/ml) |
| 11μl | Gesamt-RNA in H ₂ O (1,65μg) |

Gesamtansatz max. 12μl, Denaturierung bei 70°C für 10 min., anschließend mindestens 1 min. auf Eis, dazu:

| | |
|-----|---|
| 2μl | PCR-Puffer (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl) |
| 2μl | 0,1M DTT |
| 2μl | 25mM MgCl ₂ |
| 1μl | dNTP-Mix (je 10mM) |

Nach einer Inkubation dieses Ansatzes bei 42°C für 5 min. erfolgte die Zugabe von:

| | |
|-----|---|
| 1μl | Reverse Transkriptase (200U, Superscript II RT) |
|-----|---|

Dieser Ansatz wurde dann für 50 min. bei 42°C inkubiert und anschließend bei 70°C für 15 min. abgestoppt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde das Reaktionsgemisch abzentrifugiert und mit 1μl RNase H versetzt um überschüssige RNA zu beseitigen. Es

folgte die Inkubation für 20 min. bei 37°C. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA wurde als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

PCR-Amplifizierung

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) erfolgte die Amplifizierung der isolierten cDNA Fragmente (s. o.). Die PCR wurde unter Verwendung des Superscript™ Preamplification Systems (Gibco BRL) in einem automatischen Temperatur-„cycler“ (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 3 min., Hybridisierung bei 65°C für 2min und die Elongation bei 72°C für 3 min.. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

2.25. Transformation von Tabak mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Transformation von Agrobacterium tumefaciens über einen binären Vektor

Um den isolierten cDNA Klon (s. 2.24.) stabil in Tabak zu transformieren wurde dieser zunächst in die Agrobakterien ((p)6V 2260) transformiert. Die Transformation der Agrobakterien erfolgte mittels Elektroporation über einen binären Vektor (pBinAR, Abb. 3).

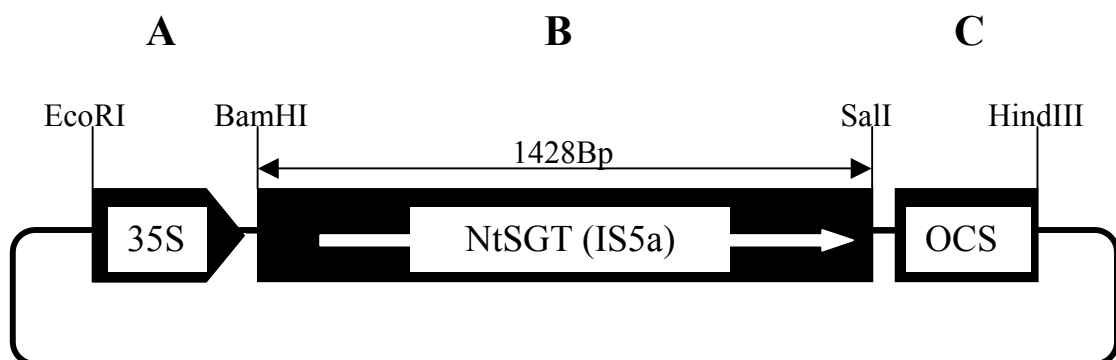


Abb. 3: Zeichnung des Genkonstruktes zur Vermittlung der Überexpression („sense“) der RNA der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) aus *Nicotiana tabacum*. Das über PCR amplifizierte cDNA Fragment der SGT (s. 2.24.) wurde unter Verwendung der SalI und BamHI Schnittstellen der zur Amplifikation verwendeten Primer in die multiple Klonierungssequenz des binären Vektors pBinAR kloniert. **A:** 450 Bp Fragment des 35S-Promotors des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus), **B:** cDNA Fragment der SGT, **C:** Terminator des Octopin-Synthase Gens

Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Agrobakterien auf CPY-Medium ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurde aus den Agrobakterien über den QIAprep Spin MiniprepKit (Qiagen) DNA isoliert und in kompetente *E. coli* Zellen (XLIBLue) transformiert. Aus den so erhaltenen Zellen wurde über den QIAprep Spin MiniprepKit erneut DNA isoliert und nach restriktivem Verdau (BamHI, Sall) sequenziert.

CPY-Medium, pH 7,2: 0,1% Yeast-Extract
 0,5% Tryptone
 0,5% Saccharose
 2% Gibco-Agar

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 2mM MgSO₄x7H₂O. Direkt vor Verwendung wurden Kanamycin (50µg/ml), Rifampicin (100µg/ml) und Carbenicillin (100µg/ml) zugegeben.

Transformation von Tabak mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens

50ml CPY-Medium (flüssig) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Zur Infektion wurde die 2-Tage-Kultur 1:50 mit MS-Medium (nach Murashige und Skoog, 1962, 3% Saccharose, pH 5,6-5,8, ohne Antibiotika) verdünnt. Die zur Transformation eingesetzten Wildtyp-Pflanzen stammten aus Gewebekultur-Anzuchten (s. 2.2.2.). Mit einer Rasierklinge wurden ca. 1cm² große Blattstücken geschnitten und 2 Tage auf Petrischalen mit Transformationsmedium (MS-Medium nach Murashige und Skoog, 3% Saccharose, 0,8% Gibco-Agar, 1µg/ml Benzyladenin, 0,1µg/ml NAA, pH 5,6-5,8) in der Dunkelheit bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücken durch die Infektionslösung gezogen und auf die gleiche Stelle der Petrischale zurückgelegt. Es folgte eine weitere Inkubation für 2 Tage in der Dunkelheit und bei RT. Die infizierten Blattstücke wurden nun auf Kallus- und Spross-Induktionsmedium (entspricht Transformationsmedium mit Ticarcillin (0,03% (w/v)) und Kanamycin (50µg/ml)) überführt und bis zur Bildung von ausreichend Kalli in der Dunkelheit bei RT inkubiert. Nach Transfer in die Gewebekulturkammern verblieben die Kalli bis zum Einsetzen der Organogenese auf diesem Medium. Nach Bildung von Sprossen erfolgte der Transfer der Pflanzen auf MS-Medium (nach Murashige und Skoog, 2% Saccharose, 1% Gibco-Agar, pH 5,6-5,8, mit Ticarcillin

(0,01% (w/v)) und Kanamycin (50µg/ml)) in sterile Glas-Kulturgefäße. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte wurden die Pflanzen in Pikiererde getopft.

2.26. Nachweis von RNA durch Northern Blot-Hybridisierung

RNA-Isolierung aus pflanzlichen Geweben (Logermann et al., 1987)

Das Pflanzenmaterial wurde direkt nach der Probenahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Etwa 300mg Pflanzenmaterial wurden im Mörser unter Stickstoff pulverisiert und mit 1ml Z6-Puffer (8M Guanidiniumhydrochlorid pH 7,0, 20mM EDTA, 20mM MES, 0,7% β-Mercaptoethanol (v/v)) versetzt. Die Probe wurde dann bis zur vollständigen Homogenität gemörsert, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1/20 Ausgangsvolumen 1M Essigsäure und 0,7 Volumen des Ausgangsvolumens Ethanol versetzt, gut gemischt und bei RT gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 13000rpm. Das Pellet wurde mit 500µl 3M Natriumacetat pH 5,2 versetzt, gut geschüttelt und nach erneuter Zentrifugation einmal mit 75% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment kurz getrocknet und bei 65°C unter Schütteln in 20-50µl DEPC-H₂O gelöst.

Alle Lösungen für RNA-Präparationen wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt um RNasen zu inaktivieren: 10ml 10% DEPC (w/v) in Ethanol mit Wasser auf 1l auffüllen, mehrfach schütteln und ü. N. stehen lassen. Der Ansatz wurde zweifach autoklaviert.

Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Pro Agarosegel (14cmx12cm) wurden 3g Agar in 150ml H₂O (EK: 1,5% (w/v)) in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 60°C abgekühlt. Direkt nach Zugabe von 20ml 10 x MEN (0,2M MOPS, 50mM Natriumacetat, 10mM EDTA) und 32,5ml Formaldehyd (EK: 6% (v/v)) wurde das Agarosegel luftblasenfrei gegossen. Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in folgendem Ansatz denaturiert:

Je 30µg RNA in DEPC-H₂O werden mit 6µl 1 x MEN-Puffer, 6µl Formaldehyd und 24µl Formamid versetzt und 10 min. bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 6µl Blaumarker (10mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylenxyanol, 50%

Glycerol) und 0,6µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte auf horizontalen Gelen in 1 x MEN-Puffer bei 130V ca. 1,5h. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

RNA-Transfer auf Nylonmembranen

Die im Agarosegel aufgetrennte RNA wurde über Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran (GeneScreenTM, DuPont) transferiert. Dazu wurde das Gel kopfüber auf eine Brücke aus saugfähigem Papier (Whatman, 4-5mm) gelegt. Darauf wurde die Nylonmembran gelegt. Es folgte eine weitere Lage aus Whatman-Papier und weitere Lagen aus saugfähigem Papier (Kleenex). Der Aufbau wurde mit ca. 300g beschwert. Als Transferpuffer diente 20 x SSC (3M NaCl, 300mM Natriumcitrat). Der Transfer war nach ca. 16 Stunden beendet. Mit UV-Licht wurde die RNA auf der Membran anschließend immobilisiert.

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von cDNA Fragmenten für RNA-Gel-Blot Analysen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Dazu wurde der High PrimeTM Kit (Boehringer Mannheim) verwendet, welcher auf der „*random prime*“ Methode zur DNA Markierung basiert. Zunächst wurden ca. 30ng DNA in H₂O für 10 min. bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 4µl High PrimeTM -Lösung (4U Klenow-Polymerase, je 0,125mM dATP, dTTP und dGTP in Reaktionspuffer mit 50% Glycerin) und 4µl [α^{32} P] dCTP (40µCi) zugegeben. Der Ansatz (20µl Gesamtvolumen) wurde dann 30 min. bei 37°C inkubiert. Alle nicht eingebauten dCTP-Nukleotide wurden anschließend durch Gelfiltration über eine G50-Säule von den markierten DNA-Fragmenten getrennt. Vor der Hybridisierung wurden die markierten Fragmente 5 min. bei 95°C denaturiert.

Hybridisierung

Zunächst wurde die Membran mindestens 2h in Church-Puffer (500mM NaP_i pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS, 0,5% BSA) bei 65°C in einer Fotoschale vorinkubiert. Die durch Gelfiltration über eine G50-Säule erhaltene Fraktion von markierten DNA-Fragmenten wurde nun hinzugegeben und ü. N. (16-24h) mit der Membran bei 65°C inkubiert.

Anschließend folgten mehrere Waschstritte (2 x mit 6 x SSC, 1 x mit 4 x SSC, 1 x mit 2 x SSC). Dabei richtete sich die Länge und Intensität des Waschens nach der Stärke der gebundenen Aktivität. Die Filter wurden dann in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) 4h-72h bei -70°C exponiert.

2.27. Peptidmassen-Fingerprint mittels MALDI/TOF-MS

2.27.1. Tryptischer Verdau von Proteinen

Tryptischer Verdau von rekombinant gewonnener Glucosyltransferase (GT) in Lösung
(modifiziert nach Matsudaira, 1989)

Die gereinigte rekombinante GT (s. 2.17.) in wässriger Lösung wurde zunächst mit GuHCl (EK: 6M), Tris-HCl pH 8,0 (EK: 0,5M) und EDTA (EK: 10mM) denaturiert. Nach Reduktion der Disulfidbindungen mit DTT (10-facher molarer Überschuss, 1h bei 37°C) wurden die Cysteinreste mit Iodacetamid carbamidomethyliert (1h bei 37°C in der Dunkelheit). Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol (10-facher molarer Überschuss über Iodacetamid) wurde der Ansatz über Dialyse gegen H_2O entsalzt, wobei die Glucosyltransferase vollständig ausfiel. Das Präzipitat wurde in 8M Harnstoff / 0,4M Ammoniumbicarbonat gelöst und anschließend mit 3Vol H_2O verdünnt. Diese Lösung wurde mit Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) versetzt (SGT:Trypsin = 25:1) und ü. N. unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über RP-Chromatographie (SepPac Plus C18, Waters) konzentriert und entsalzt. Die Elution der tryptischen Peptide erfolgte mit 1% Essigsäure/75%Acetonitril. Das Eluat wurde direkt zur Analyse am MALDI-MS verwendet.

Tryptischer Verdau von rekombinant gewonnener und gereinigter GT im SDS-Gel
(Lamer und Jungblut, 2001)

Dazu wurden die gereinigte rekombinante GT (s. 2.17.) und die gereinigte Fraktion der SGT-Präparation (s. 2.10.) im SDS-Gel getrennt. Aus den betreffenden Coomassie G-250 gefärbten Banden wurden Gelstücke von ca. 1mm^3 Größe ausgeschnitten und mit 0,1M Tris-HCl pH 8,5/50% Acetonitril (500 μl /Gelstück) 20 min. gewaschen. Es folgte ein Waschrisschritt mit 50mM Ammoniumbicarbonat/5% Acetonitril (500 μl /Gelstück).

Nach Trocknung im Vakuumkonzentrator (Eppendorf, 15 min.) wurde jedes Gelstück mit 10µl Trypsinlösung (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega; 200ng/ml) versetzt und ü. N. bei 37°C inkubiert. Der nach anschließender Zentrifugation gewonnene Überstand wurde direkt zur Analyse am MALDI-MS verwendet.

2.27.2. Aufnahme von MS Spektren am MALDI-TOF-MS

Die Molekularmassen der Peptide wurden im positiven Modus mit einem MALDI/TOF-MS (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometer, Reflex III, Bruker Saxonia Analytik GmbH, Leipzig) bestimmt. Die Präparation der Proben erfolgte nach der dry-droplet Methode (Jiménez et al. 1998) in α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure. Alle Spektren wurden im Reflektormodus aufgenommen und intern unter Verwendung von Peptiden des Selbstverdaus von Trypsin bzw. zugesetzter Standardpeptide kalibriert. Monoisotopische Peaks wurden manuell selektiert. Die Proteine wurden durch Vergleich der experimentell gefundenen Peptidmassen mit den theoretischen Massenlisten aus der NCBI-nr-Datenbank unter Verwendung des Programms Mascot identifiziert. Zusätzlich wurden die Spektren aus dem in-Gel-Verdau der SGT-Präparation mit den Spektren vom Verdau der rekombinant gewonnenen Glucosyltransferase verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen der Pathogenabwehr beim Tabak unter variiertem CO₂- und N-Versorgung

3.1.1. Fragestellung

Erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen führen mutmaßlich zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze, wonach sich der Gehalt stickstofffreier Komponenten in der Pflanze erhöht (Poorter et al., 1997; Penuelas et al., 1997). Konsistent dazu wurde die Zunahme an löslichen phenolischen Verbindungen auch unter Mangel an Stickstoff und anderen Nährstoffen beobachtet (Penuelas und Estiarte, 1998). Veränderungen im metabolischen Profil zugunsten von CBSC (*carbon based secondary compounds*) lassen Konsequenzen für die Wechselwirkung der Pflanze mit ihrer Umwelt erwarten, insbesondere in der Interaktion mit Pathogenen. In dieser Arbeit sollte daher geprüft werden, ob die Kultivierung von Tabakpflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration und bei optimaler und suboptimaler Stickstoffversorgung zu gesteigerten Gehalten an Sekundärmetaboliten führt, und ob neben einer generellen Erhöhung eine Verschiebung der Anteile an Alkaloiden zugunsten von CBSC-Komponenten zu beobachten ist. Ob veränderte Metabolitprofile gegebenenfalls mit einer veränderten Suszeptibilität gegenüber dem Kartoffelvirus Y (PVY) korrelieren sollten Inokulationsexperimente mit dem Pathogen zeigen.

3.1.2. Experimenteller Ansatz

Tabakpflanzen der Varietät Samsun NN wurden unter normalen und erhöhten CO₂-Konzentrationen in klimatisierten Kammern angezogen und variabel mit Stickstoff versorgt (2mM, 5mM und 8mM NH₄NO₃). In ersten Versuchen wurden die Profile an sekundären Inhaltsstoffen, insbesondere Phenolen, über die gesamte Ontogenie der Pflanze verfolgt. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den drei angebotenen N-Konzentrationen während der gesamten Ontogenie. Die phenolische Hauptkomponente Chlorogensäure war bei Anzucht unter erhöhter CO₂-Konzentration in Blättern für alle untersuchten Entwicklungsstadien deutlich gesteigert gegenüber ambienten

Bedingungen (Abb. 4). Ebenso zeigte eine Reihe weiterer Komponenten erhöhte Gehalte, darunter Scopolin. Die Unterschiede waren bei 2mM weniger deutlich, und das Wachstum der Pflanzen war bei dieser N-Versorgung stark retardiert. Entsprechend dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Versuche die beiden höheren Konzentrationen an Ammoniumnitrat (5mM und 8mM NH_4NO_3) und ein Entwicklungsstadium (sechs Wochen) ausgewählt. Vollständige Datensätze wurden für drei unabhängige Experimente ermittelt und vergleichend ausgewertet.

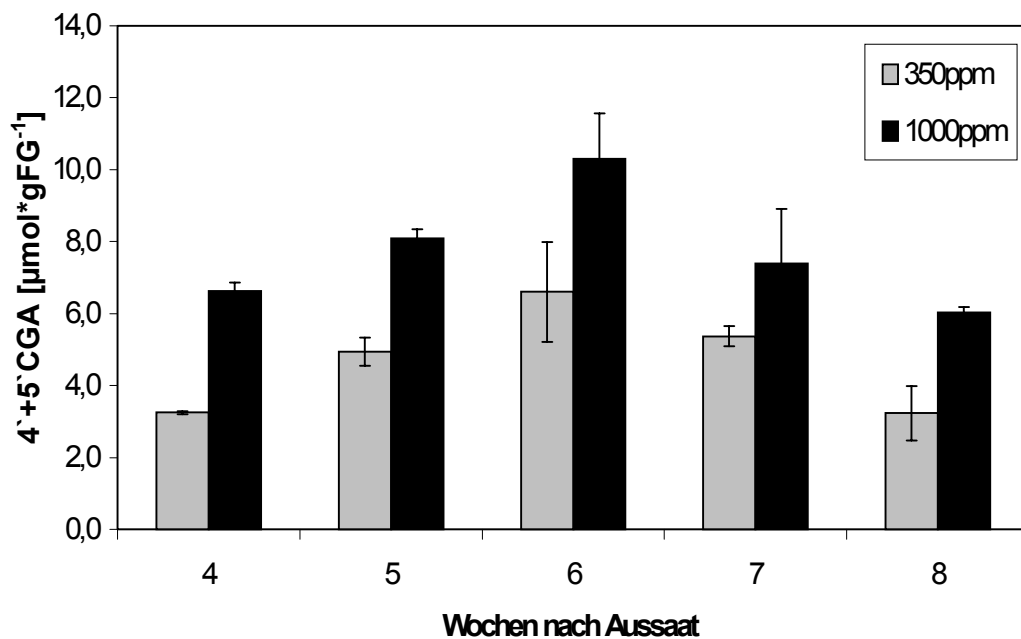


Abb. 4: Gehalt an 4'+5'-Chlorogensäure (CGA) von Tabakpflanzen im Verlauf der Vegetationsperiode unter ambienten und erhöhten CO_2 -Konzentrationen, junges Blatt; 5mM NH_4NO_3 , Mittelwert der Analysen von n=6 Pflanzen \pm Standardfehler

3.1.3. Veränderte C/N-Gehalte in Tabakpflanzen unter erhöhtem $[\text{CO}_2]$

Die Kultivierung von Tabakpflanzen unter erhöhter atmosphärischer CO_2 -Konzentration führte in allen drei Experimenten zu einer Zunahme des C/N-Verhältnisses. Diese Zunahme ist dramatisch in den Blättern, wogegen in den Wurzeln nur ein schwach erhöhtes C/N-Verhältnis ermittelt wurde. Beispielhaft sind die Ergebnisse eines Versuchs in Abb. 5 und Tab. 1 dargestellt. Die gesteigerten C/N-Verhältnisse beruhen vorwiegend auf erhöhten C-Gehalten unter Hoch- CO_2 . Neben

dem Anstieg im Gehalt an C ist unter Hoch-CO₂ der Gehalt an N tendenziell vermindert. Dabei ist der N-Gehalt in Blättern und Wurzeln abhängig von der angebotenen Stickstoffkonzentration. Bei höherem N-Angebot (8mM NH₄NO₃) wurden gesteigerte Gehalte an N in jungen Blättern und Wurzeln gegenüber den unter 5mM NH₄NO₃ gewachsenen Pflanzen gemessen (Tab. 1). Dieser Befund war in den Pflanzen unter Hoch-CO₂ wie auch unter ambienten Bedingungen zu beobachten.

Das Verhältnis C/N ist immer kleiner in den Pflanzen, die unter 8mM NH₄NO₃ angezogen wurden (Abb. 5). Grund hierfür sind in jungen Blättern und Wurzeln höhere Gehalte an Stickstoff und in alten Blättern niedrigere Gehalte an Kohlenstoff in den Pflanzen unter 8mM NH₄NO₃ (Tab. 1).

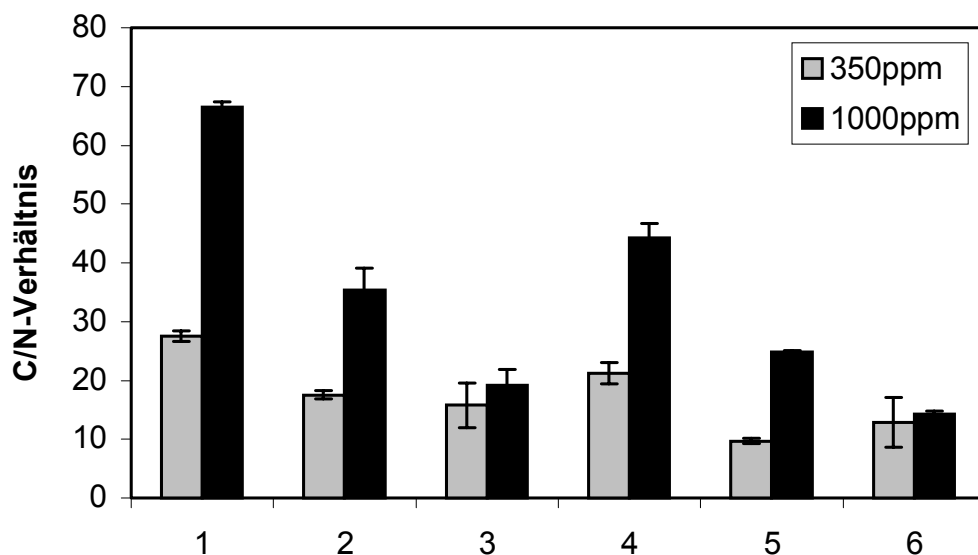


Abb. 5: C/N-Verhältnis von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen, 1-5mM NH₄NO₃, altes Blatt; 2-5mM NH₄NO₃, junges Blatt; 3-5mM NH₄NO₃, Wurzel; 4-8mM NH₄NO₃, altes Blatt; 5-8mM NH₄NO₃, junges Blatt; 6-8mM NH₄NO₃, Wurzel, Mittelwert der Analysen von n=7 Pflanzen ± Standardfehler

Die Messungen belegen, dass die gewählten Variationen der C- und N-Versorgung ausreichen, um die C/N-Flüsse zu modulieren und damit die Allokation der Ressourcen in den Primär- oder Sekundärstoffwechsel zu verschieben. Es sollte im Folgenden geprüft werden, ob neben möglichen Veränderungen im Gehalt an sekundären Verbindungen auch quantitative Unterschiede im Profil von stickstoffhaltigen und stickstofffreien Sekundärmetaboliten auftreten würden unter Hoch-CO₂.

| | | N-Gehalt [mg*gFG ⁻¹] | | C-Gehalt [mg*gFG ⁻¹] | |
|---|--------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|--------------|
| | | 350ppm | 1000ppm | 350ppm | 1000ppm |
| 5mM NH₄NO₃ | altes Blatt | 2,06 ±0,29 | 1,82 ±0,03 | 56,69 ±0,89 | 121,40 ±0,86 |
| | junges Blatt | 4,17 ±0,71 | 3,10 ±0,23 | 73,03 ±0,68 | 109,81 ±3,77 |
| | Wurzel | 2,12 ±0,47 | 1,68 ±0,20 | 33,53 ±3,80 | 32,22 ±2,63 |
| 8mM NH₄NO₃ | altes Blatt | 1,77 ±0,26 | 1,77 ±0,18 | 37,37 ±1,80 | 78,38 ±2,49 |
| | junges Blatt | 6,48 ±0,48 | 4,23 ±0,16 | 62,75 ±0,46 | 105,13 ±0,16 |
| | Wurzel | 2,77 ±0,30 | 3,07 ±0,23 | 35,64 ±4,23 | 43,64 ±0,60 |

Tab. 1: N-Gehalt und C-Gehalt von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN, Mittelwerte der Analysen von n=7 Pflanzen ± Standardfehler) unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen

3.1.4. Veränderte Sekundärmetabolitprofile in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]

Modifizierte Gehalte an Alkaloiden unter erhöhtem [CO₂]

Unter erhöhtem [CO₂] wurden gegenüber ambienten Bedingungen in den nicht infizierten (Abb. 6), wie auch in den mit PVY infizierten Pflanzen niedrigere Gehalte an Nikotin gemessen, sowohl in den Blättern, als auch in den Wurzeln. Dieses Ergebnis war reproduzierbar und stimmt mit der Hypothese überein, dass erhöhte CO₂-Konzentrationen zu einer Verschiebung des Metabolitprofils zu Ungunsten der stickstoffhaltigen Verbindungen in Pflanzen führen (Penuelas und Estiarte, 1998).

Diese Änderung im Metabolitprofil ist abhängig von der jeweiligen Verfügbarkeit an Stickstoff und Kohlenstoff, wie die höheren Gehalte an Nikotin unter 8mM NH₄NO₃ gegenüber 5mM NH₄NO₃ zeigen (Abb. 6). Die Infektion der Pflanzen mit PVY hat auf den Nikotingehalt keinen Einfluss unter 5mM NH₄NO₃, wogegen unter 8mM NH₄NO₃ tendenziell niedrigere Nikotingehalte ermittelt wurden (nicht gezeigt).

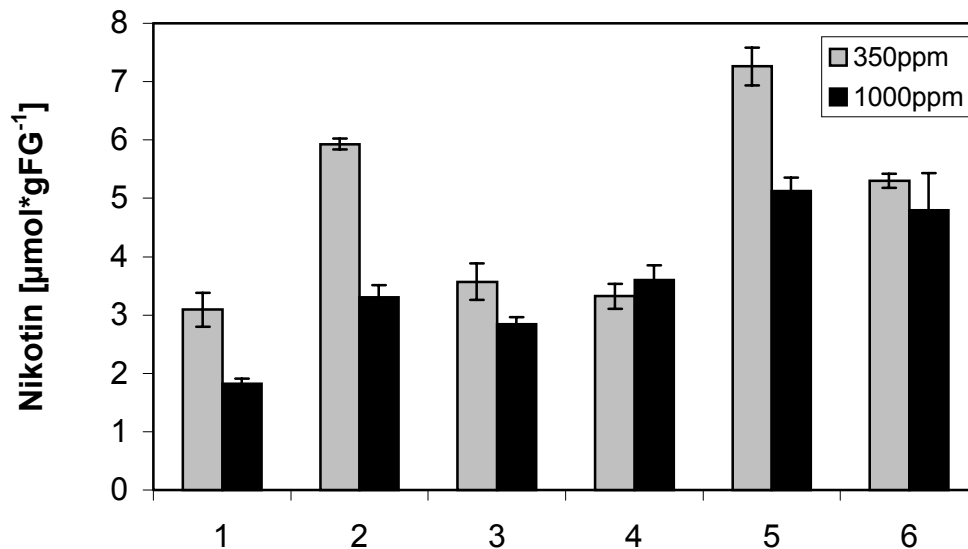


Abb. 6: Nikotingehalte in *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN, Mittelwerte der Analysen von $n=6$ Pflanzen \pm Standardfehler, unter ambienten und erhöhten CO_2 -Konzentrationen, ohne PVY-Infektion, **1**-5mM NH_4NO_3 , altes Blatt; **2**-5mM NH_4NO_3 , junges Blatt; **3**-5mM NH_4NO_3 , Wurzel; **4**-8mM NH_4NO_3 , altes Blatt; **5**-8mM NH_4NO_3 , junges Blatt; **6**-8mM NH_4NO_3 , Wurzel

Modifizierte Gehalte an Methanol-löslichen phenolischen Verbindungen unter erhöhtem $[\text{CO}_2]$

Nach Kultivierung unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen war eine Veränderung im Metabolitprofil für Methanol-lösliche Phenole zu beobachten. Veränderte Metabolitgehalte wurden für Blätter, wie auch in den Wurzeln gemessen. In den Wurzeln konnten hauptsächlich die Isomere der Chlorogensäure (CGA) sowie die Coumarine Scopolin und Scopoletin nachgewiesen werden, wogegen in den Blättern eine große Zahl weiterer Verbindungen detektiert werden konnte (Abb. 7).

Im Metabolitprofil für Methanol-lösliche Phenole konnten nach Kultivierung unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen im Blatt sowohl Verbindungen mit geänderten als auch unveränderten Gehalten beobachtet werden (Abb. 7, Tab. 2). Ein Einfluss der Stickstoffkonzentration auf den Gehalt an phenolischen Verbindungen konnte insbesondere für eine Reihe bislang nicht identifizierter Verbindungen beobachtet werden. Einige der im Blatt detektierbaren Metabolite waren nur unter 5mM NH_4NO_3 zu beobachten, nicht aber in Pflanzen, welche unter 8mM NH_4NO_3 kultiviert wurden (Tab. 2). Einige dieser Verbindungen waren unter Kultivierung mit 8mM NH_4NO_3 nur

nach Infektion mit dem Kartoffelvirus Y detektierbar (nicht gezeigt), was auf eine Stimulation der Phenylpropan-Biosynthese nach PVY-Inokulation hindeutet.

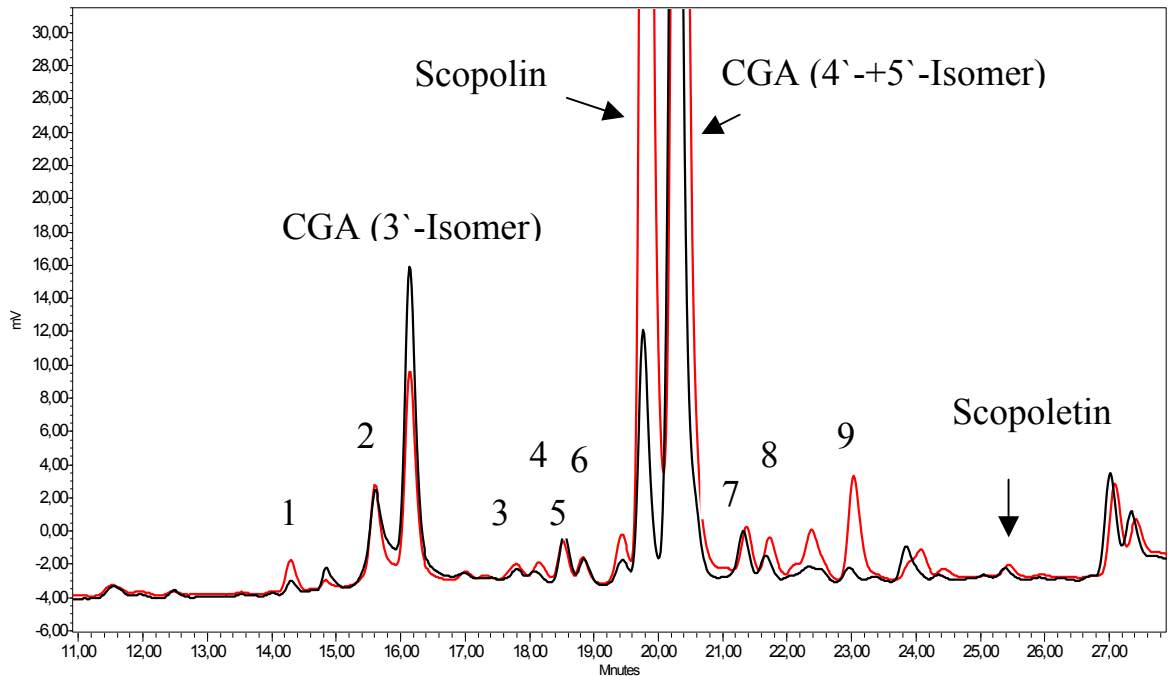


Abb. 7: Fluoreszenz Chromatogramm (Ex: 300nm, Em: 400nm), *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN, Methanol-lösliche Phenole, junges Blatt, rot-1000ppm [CO₂], schwarz-350ppm [CO₂], 1-9 noch unbekannte phenolische Verbindungen

Zu den Verbindungen, deren Gehalt am deutlichsten erhöht war unter Hoch-CO₂ gehören das Coumarin Scopolin (Abb. 8) und die 4' - + 5' -Isomere der Chlorogensäure (Abb. 9). Dabei korrelierten erhöhte Scopolingehalte in nicht infizierten Pflanzen unter 1000ppm [CO₂] mit höheren spezifischen Aktivitäten der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (Tab. 3), welche die Glucosylierung von Scopoletin zu Scopolin katalysiert. Chlorogensäure (CGA) stellt mengenmäßig die Hauptkomponente der löslichen phenolischen Verbindungen in den Blättern der Tabakvarietät SamsunNN dar. Die Identifizierung der CGA-Isomere (3'-CGA, 4'-CGA und 5'-CGA) erfolgte wie unter 2.5. beschrieben.

Die Gehalte an Scopolin und an 4' - + 5' - CGA unter erhöhtem und ambientem [CO₂] waren unter den gewählten Bedingungen unabhängig von der jeweiligen Stickstoffkonzentration (5mM und 8mM NH₄NO₃).

**Veränderungen im Profil löslicher phenolischer Verbindungen
unter erhöhtem [CO₂] (1000ppm)**

| Verbindung | RT | 5mM NH ₄ NO ₃ | 8mM NH ₄ NO ₃ |
|---------------------|------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 14,3 | erhöht | n.d. |
| 2 | 15,6 | unverändert | unverändert |
| CGA (3'-Isomer) | 16,2 | vermindert | vermindert |
| 3 | 17,8 | vermindert | vermindert |
| 4 | 18,2 | unverändert | unverändert |
| 5 | 18,5 | vermindert | vermindert |
| 6 | 18,9 | unverändert | n.d. |
| Scopolin | 19,8 | erhöht | erhöht |
| CGA (4'-+5'-Isomer) | 20,4 | erhöht | erhöht |
| 7 | 21,4 | unverändert | unverändert |
| 8 | 21,7 | erhöht | erhöht |
| 9 | 23,0 | erhöht | n.d. |
| Scopoletin | 25,4 | erhöht | erhöht |

Tab. 2: Veränderungen im Gehalt Methanol-löslicher phenolischer Verbindungen in jungen Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) unter erhöhtem [CO₂] (1000ppm), Fluoreszenzdaten, Die Bezeichnung der Verbindungen erfolgte in Übereinstimmung mit Abb. 7. RT (Retentionszeit), n.d. (nicht detektierbar)

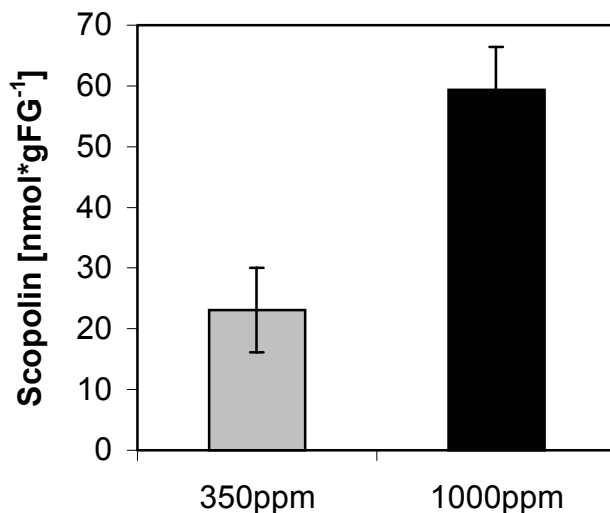


Abb. 8: Scopolingehalt in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) unter ambienten bzw. erhöhten CO₂-Konzentrationen, ohne PVY-Infektion, junges Blatt; 5mM NH₄NO₃; Mittelwerte der Analysen von n=6 Pflanzen ± Standardfehler

Tab. 3: spezifische Aktivität der UDP-Glucose:Scopoletin-Glucosyltransferase (SGT) in *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN, Blatt, unter ambient und Hoch-CO₂, Mittelwert der Analysen \pm Standardfehler von n=7 Pflanzen

| spez. SGT-Aktivität [pkat*mg ⁻¹] | |
|--|----------------------------|
| 350ppm [CO ₂] | 1000ppm [CO ₂] |
| 2,16 \pm 0,60 | 3,49 \pm 0,43 |

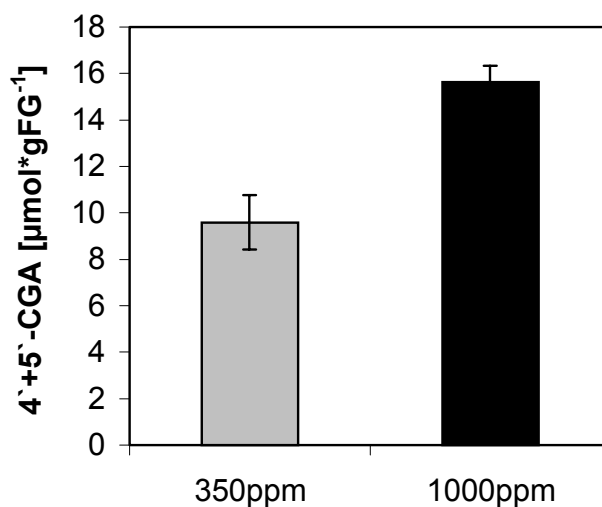


Abb. 9: Gehalt an Chlorogensäure (CGA, 4'-5'-Isomer) in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen, ohne PVY-Infektion, junges Blatt; 5mM NH₄NO₃; Mittelwert der Analysen von n=6 Pflanzen \pm Standardfehler

Modifizierte Gehalte an Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen unter erhöhtem [CO₂]

Neben den Methanol-löslichen Phenolen wurde auch der Gehalt Zellwand-gebundener Phenole untersucht. Für die meisten Verbindungen konnten erhöhte Gehalte unter Hoch-CO₂ gemessen werden (Abb. 10). Nur eine Verbindung war vermindert unter erhöhtem [CO₂], und zwei der Hauptkomponenten waren unverändert im Gehalt (Tab. 4). Beispielfhaft ist in Abb. 11 der Gehalt einer Zellwand-gebundenen Komponente (Verbindung 2 s. Abb. 10) unter ambient und Hoch-CO₂ gezeigt. Nach Infektion mit PVY war für einige der Zellwand-gebundenen phenolischen Komponenten unter ambienten Bedingungen ein starker Anstieg im Gehalt zu beobachten, eine weitere Erhöhung im Gehalt unter erhöhten CO₂-Konzentrationen blieb aber aus.

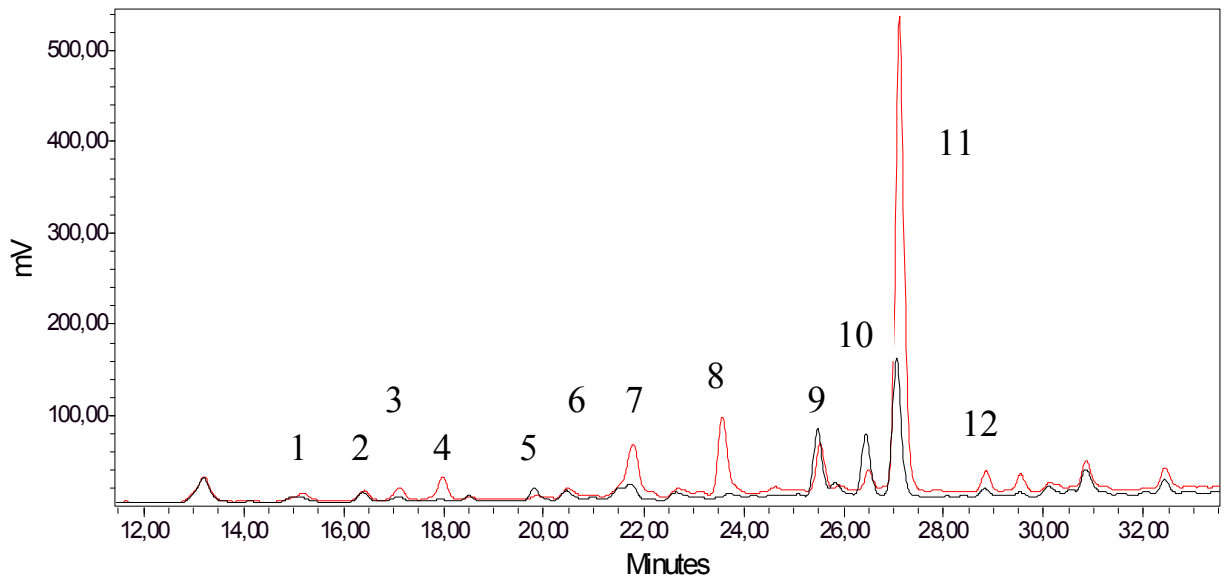


Abb. 10: Fluoreszenz Chromatogramm (Ex: 300nm, Em: 400nm), Zellwand-gebundene Phenole, altes Blatt (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), rot-1000ppm, schwarz-350ppm [CO₂], 1-9 noch unbekannte gebundene phenolische Verbindungen

Veränderungen im Profil Zellwand-gebundener Phenole unter Hoch-[CO₂] (1000ppm)

| Verbindung | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| RT | 15,0 | 16,4 | 15,1 | 17,9 | 19,8 | 20,5 | 21,8 | 23,6 | 25,5 | 26,5 | 27,2 | 28,2 |
| Änderung im Gehalt | + | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | - | + | + |

Tab. 4: Änderungen im Gehalt Zellwand-gebundener phenolischer Verbindungen unter erhöhten [CO₂]-Konzentrationen, Fluoreszenzdaten, 5mM NH₄NO₃, altes Blatt (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), + erhöhte Gehalte unter 1000ppm [CO₂], - verminderte Gehalte unter 1000ppm [CO₂], 0 unverändert im Gehalt

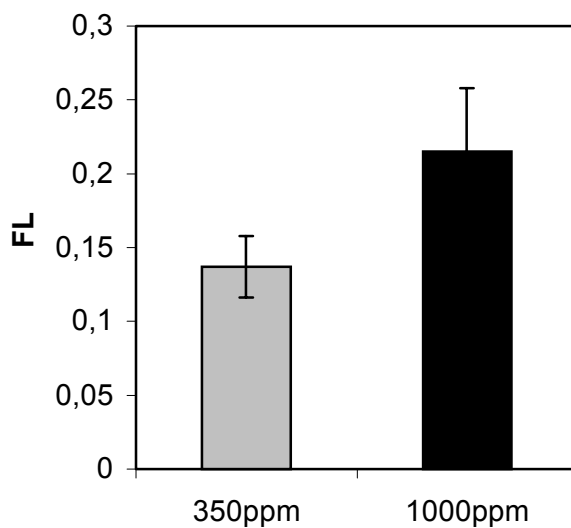


Abb. 11: Gehalt einer Zellwandgebundenen phenolischen Verbindung (Verbindung 2, s. Abb. 10) im Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen, altes Blatt, Mittelwert der Analysen von n=6 Pflanzen \pm Standardfehler; 5mM NH₄NO₃

Induktion der PAL-Aktivität in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]

Unsere Experimente zeigten Verschiebungen im Metabolitprofil unter erhöhter CO₂-Konzentration insbesondere zugunsten kohlenstoffhaltiger Methanol-löslicher und Zellwand-gebundener phenolischer Verbindungen und zu Ungunsten stickstoffhaltiger Alkaloide. Der erste Schritt in der Biosynthese des Phenylpropanoidgerüsts ist die Deaminierung von L-Phenylalanin zur trans-Zimtsäure, welche durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert wird (Hahlbrock und Scheel, 1989). Um zu verstehen, an welchen Stellen im Metabolismus und mit welcher Priorität Flussänderungen vorgenommen werden, wurde die Aktivität der PAL enzymatisch in den unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen kultivierten Pflanzen bestimmt und mit den Metabolitprofilen in Beziehung gesetzt. Ein signifikanter Anstieg der PAL-Aktivität war in den unter erhöhtem [CO₂] kultivierten Pflanzen zu beobachten. Der Anstieg war am höchsten in älteren Blättern (lokal) gegenüber Wurzeln (Abb. 12). In den nicht infizierten Pflanzen (Abb. 12, oben) war die PAL-Aktivität stärker erhöht unter 5mM NH₄NO₃ gegenüber 8mM NH₄NO₃. Nach PVY-Befall war unter ambienten CO₂-Bedingungen eine deutliche Steigerung der PAL-Aktivität messbar gegenüber den nicht infizierten Pflanzen unter 5mM NH₄NO₃ wie auch unter 8mM NH₄NO₃ (Abb. 12). Außerdem konnten für die mit PVY infizierten Pflanzen signifikant gesteigerte PAL-Aktivitäten nach Kultivierung unter Hoch-CO₂ im Blatt gemessen werden (Abb. 12, unten).

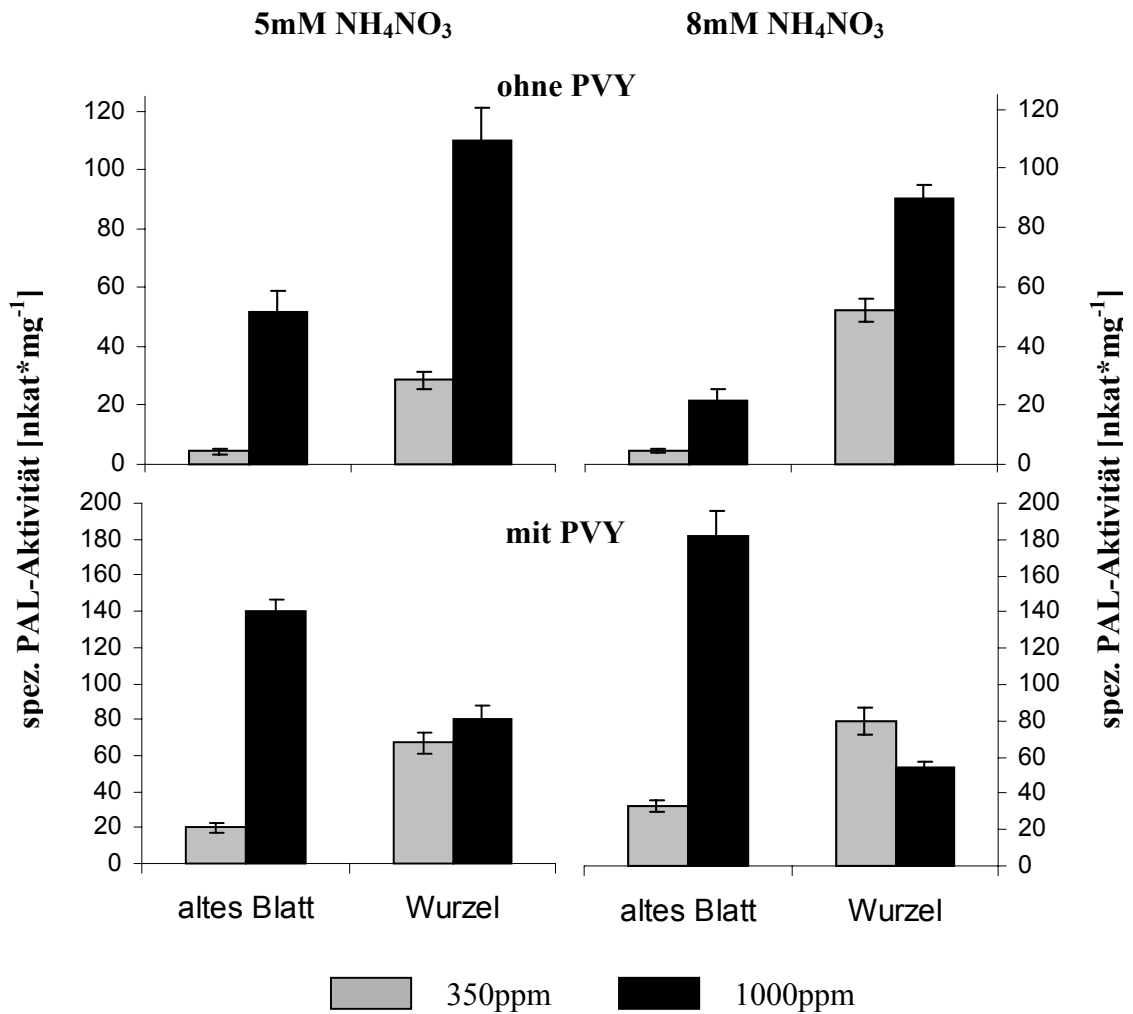


Abb. 12: spezifische PAL-Aktivität im Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen; obere Abbildung ohne PVY-Infektion, untere Abbildung mit PVY-Infektion, altes (lokales) Blatt und Wurzeln, Mittelwerte der Analysen von n=7 Pflanzen ± Standardfehler; linke Abbildungen-5mM NH₄NO₃, rechte Abbildungen 8mM NH₄NO₃

Modifizierte Gehalte an Lignin unter erhöhtem [CO₂]

Die Verschiebung des Metabolitprofils und die starke Steigerung der PAL-Aktivität in den unter erhöhtem [CO₂] kultivierten Pflanzen ließ die Vermutung zu, dass neben den löslichen und Zellwand-gebundenen Phenolen auch der Gehalt an Lignin erhöht ist. Die Bestimmung des Ligningehaltes erfolgte wie unter 2.6. beschrieben, nach der Thioglycolsäure-Methode (Brauns, 1952). In den unter 1000ppm [CO₂] kultivierten Pflanzen konnten leicht, aber nicht signifikant erhöhte Ligningehalte in den Wurzeln gemessen werden, wogegen die Blätter keine Änderungen im Ligningehalt zeigten (Abb. 13). Die Tendenz zu gesteigerten Ligningehalten der Wurzeln war jeweils stärker unter 5mM NH₄NO₃ gegenüber 8mM NH₄NO₃.

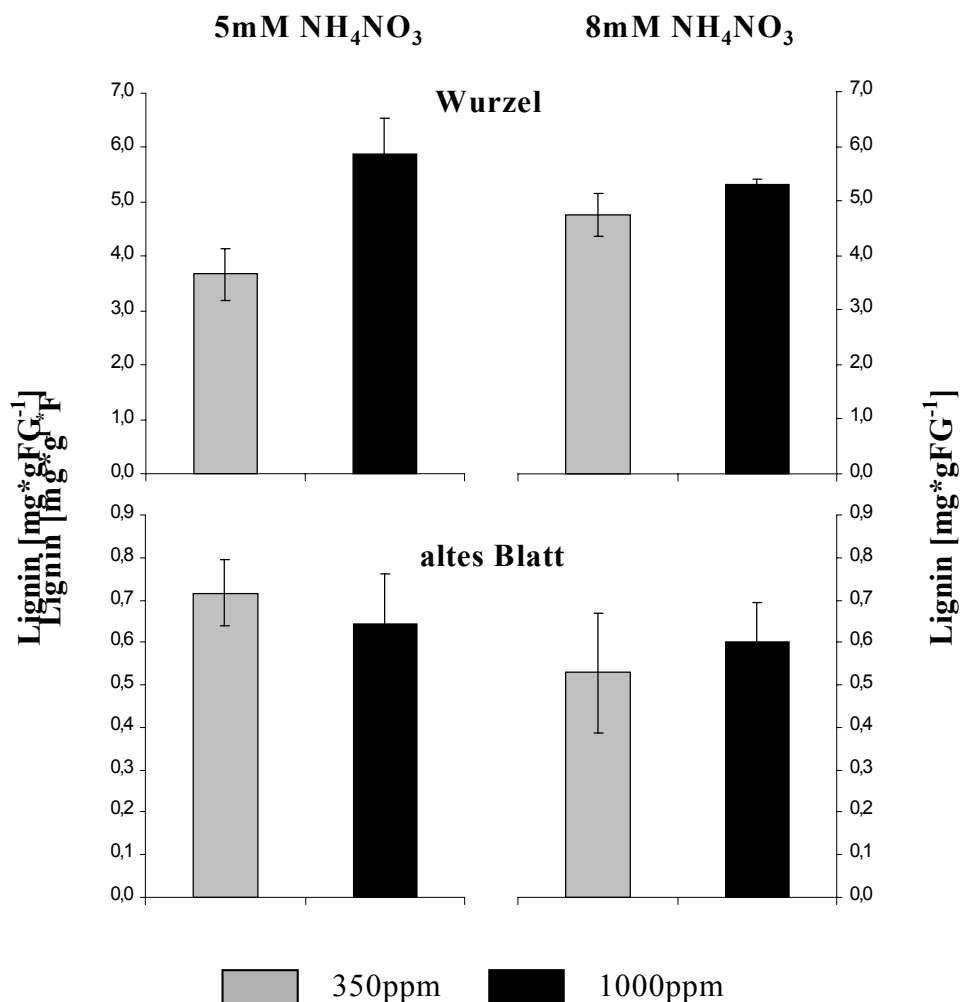


Abb. 13: Ligningehalt im Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen; ohne PVY-Infektion, Wurzel und altes Blatt, Mittelwerte der Analysen von n=6 Pflanzen ± Standardfehler; 5mM NH₄NO₃ und 8mM NH₄NO₃

Induktion der Salizylsäure-Biosynthese in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]

Die Biosynthese der Salizylsäure erfolgt vermutlich aus *t*-Zimtsäure über Seitenkettenverkürzung zu Benzoessäure gefolgt von einem Hydroxylierungsschritt (Yalpani et al., 1993; Wildermuth et al., 2001). Zur Bereitstellung von *t*-Zimtsäure ist die Aktivität der PAL essentiell, daher sollte geprüft werden, ob in den unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen mit stark erhöhter PAL-Aktivität die Gehalte an konstitutiv gebildeter Salizylsäure erhöht sind. Da die gebildete Salizylsäure in der Zelle sehr schnell zu β -O-D-Glucosylsalizylsäure konvertiert wird wurde der Gehalt an freier, wie auch an glucosidisch gebundener Salizylsäure bestimmt (s. 2.4.4.). Für die unter erhöhtem [CO₂] kultivierten Pflanzen konnten in allen drei unabhängigen Experimenten erhöhte Gehalte an Salizylsäure gemessen werden. Der Gehalt an freier Salizylsäure lag dicht an der Nachweisgrenze in den untersuchten Tabakblättern, weshalb die Erhöhung im Gehalt an freier Salizylsäure nicht signifikant ist (Tab. 5). Signifikant gesteigerte Gehalte unter Hoch-CO₂ wurden für die gebundene Salizylsäure ermittelt (Tab. 5).

Gehalt an Salizylsäure (SA) [nmol*gFG⁻¹]

| | 350ppm [CO ₂] | 1000ppm [CO ₂] |
|--------------|---------------------------|----------------------------|
| Freie SA | 0,074 ±0,039 | 0,114 ±0,048 |
| Gebundene SA | 7,976 ±0,823 | 12,856 ±0,176 |

Tab. 5: Gehalt an freier und glucosidisch gebundener Salizylsäure in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), junges Blatt, unter ambienten (350ppm) und erhöhten [CO₂]-Konzentrationen (1000ppm), Die Werte entsprechen den Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit je n=5 Pflanzen \pm Standardfehler.

3.1.5. Untersuchung der Pathogenabwehr in Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂]

Die Infektion mit dem Kartoffelvirus Y (PVY) sollte zeigen, ob die veränderten Metabolitprofile unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (insbesondere die erhöhten Gehalte an den Coumarinen Scopolin und Scopoletin) zu einer veränderten Pathogenresistenz der Pflanzen führen. Das Ausmaß der PVY-Infektion wurde über ELISA-Tests detektiert.

In drei unabhängigen Experimenten wurde nach Infiltration mit PVY in den lokalen (infizierten) Blättern, wie auch in den systemischen Blättern unter Hoch-CO₂ weniger PVY-Protein gemessen. Dies gilt für die unter 5mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen ebenso wie für die unter 8mM NH₄NO₃ gewachsenen Pflanzen (Abb. 14). Hohe Standardabweichungen wurden für die Gehalte an PVY-Protein in den lokalen Blättern unter 5mM NH₄NO₃ ermittelt, wogegen die Ergebnisse unter 8mM NH₄NO₃ und für die systemische Infektion signifikant sind. Im systemischen Blatt wurden jeweils geringere Gehalte an PVY-Protein gegenüber dem lokalen Blatt (der Infektionsstelle) detektiert (Abb. 14).

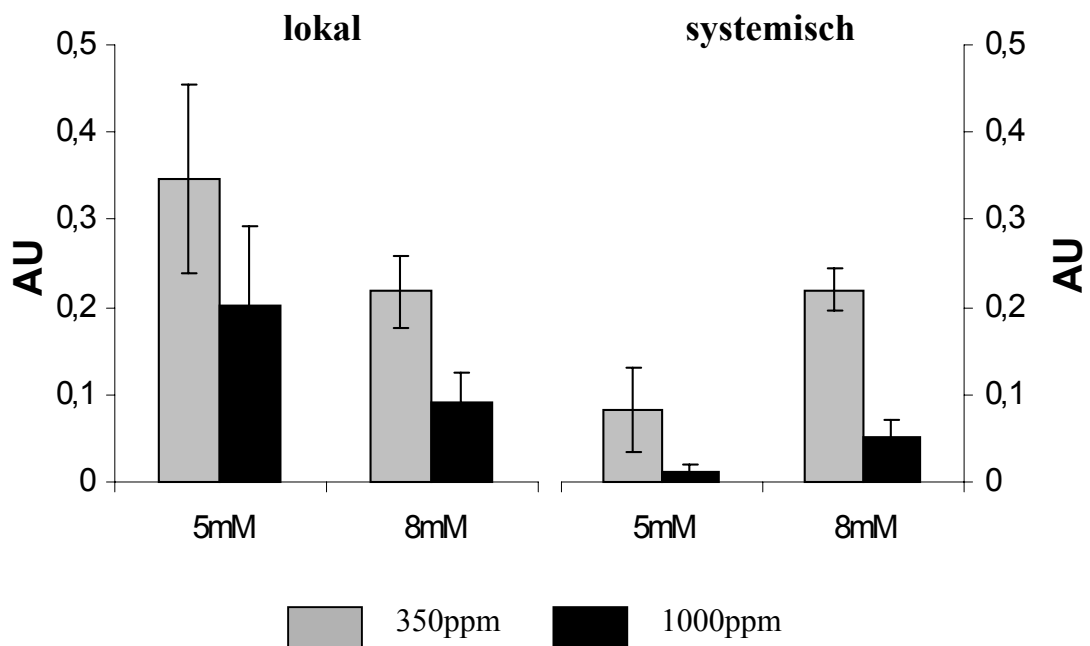


Abb. 14: Gehalt an PVY-Protein in Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) 14 Tage nach Infiltration mit PVY, lokales Blatt (infiziert) und systemisches Blatt (4. Blatt über der Infektionsstelle), unter ambienter (350ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (1000ppm), kultiviert unter 5mM NH₄NO₃ und 8mM NH₄NO₃. Die Säulen entsprechen den Werten aus drei unabhängigen Experimenten mit je n=7 Pflanzen ± Standardfehler.

Begleitet war die Infektion der Tabakpflanzen jeweils von einer starken Erhöhung der Gehalte an Methanol-löslichen, wie auch an Zellwand-gebundenen phenolischen Verbindungen (s. 3.1.2.). Insbesondere wurde die Akkumulation von Scopolin (Abb. 15) und Scopoletin (Abb. 16) unter ambienten Bedingungen nach Befall mit PVY beobachtet. Die Erhöhung im Gehalt an Scopoletin korrelierte mit verminderten spezifischen Aktivitäten der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase in infizierten Pflanzen(nicht gezeigt). Höhere Gehalte an Scopolin nach PVY-Befall konnten in Blättern (Abb. 15) und Wurzeln nachgewiesen werden, wobei der Anstieg im Scopolingehalt am höchsten in den Blättern war, unabhängig von der angebotenen Stickstoffkonzentration (nicht gezeigt). Scopoletin wurde in den nicht infizierten Pflanzen unter ambienten Bedingungen oft nur in Spuren nachgewiesen, akkumulierte jedoch nach Befall mit PVY unabhängig von der Stickstoffkonzentration in Blättern (Abb. 16) und Wurzeln.

Unter erhöhten CO₂-Bedingungen war in den mit PVY infizierten Pflanzen meist kein weiterer Anstieg der Phenolgehalte zu beobachten, was mit einer geringeren Ausbreitung des Virus korreliert.

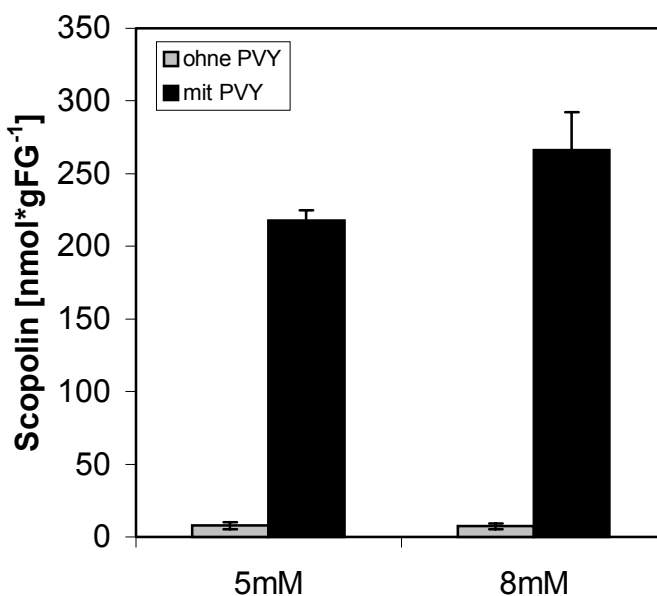


Abb. 15: Akkumulation von Scopolin in Tabakpflanzen unter ambienten CO₂-Konzentrationen nach PVY-Infektion, lokales Blatt; 5mM und 8mM NH₄NO₃. Die Säulen entsprechen den Werten aus drei unabhängigen Experimenten mit je n=7 Pflanzen ± Standardfehler.

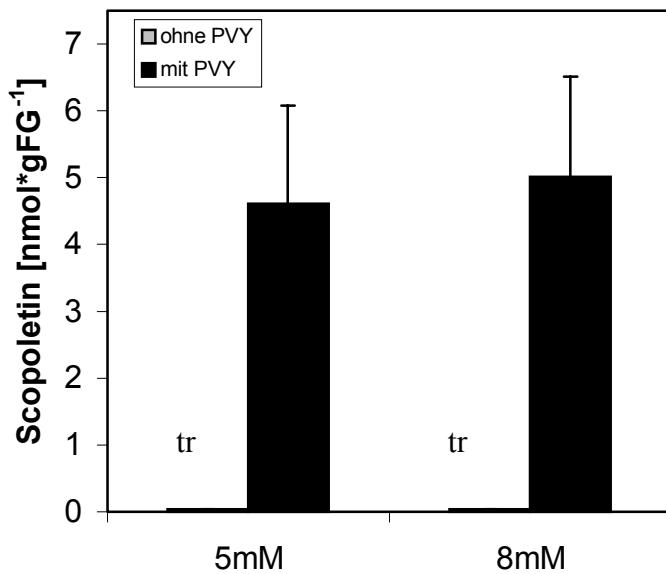


Abb. 16: Akkumulation von Scopoletin in Tabakpflanzen unter ambientem [CO₂] nach PVY-Infektion, lokales Blatt; 5mM und 8mM NH₄NO₃, Scopoletin war in den Kontrollpflanzen nur in Spuren (tr) nachweisbar. Die Säulen entsprechen den Werten aus drei unabhängigen Experimenten mit je n=7 Pflanzen ± Standardfehler.

Die Infektion war außerdem begleitet von der Bildung von Blattläsionen. Etwa 7 Tage nach Infektion der Pflanzen waren erste Symptome des Befalls an den jüngeren Blättern zu beobachten, Aufwölbung der Interkostalfelder und der Blattadern, violette Verfärbungen an den Blattansätzen, Ausbleichen kleinerer Blattbereiche (Abb. 17, C). Zusätzlich bildeten die unter erhöhtem [CO₂] kultivierten Pflanzen nach PVY-Befall Läsionen aus, die großflächiger und stärker gefärbt waren als unter ambienten CO₂-Bedingungen (Abb. 17, D).

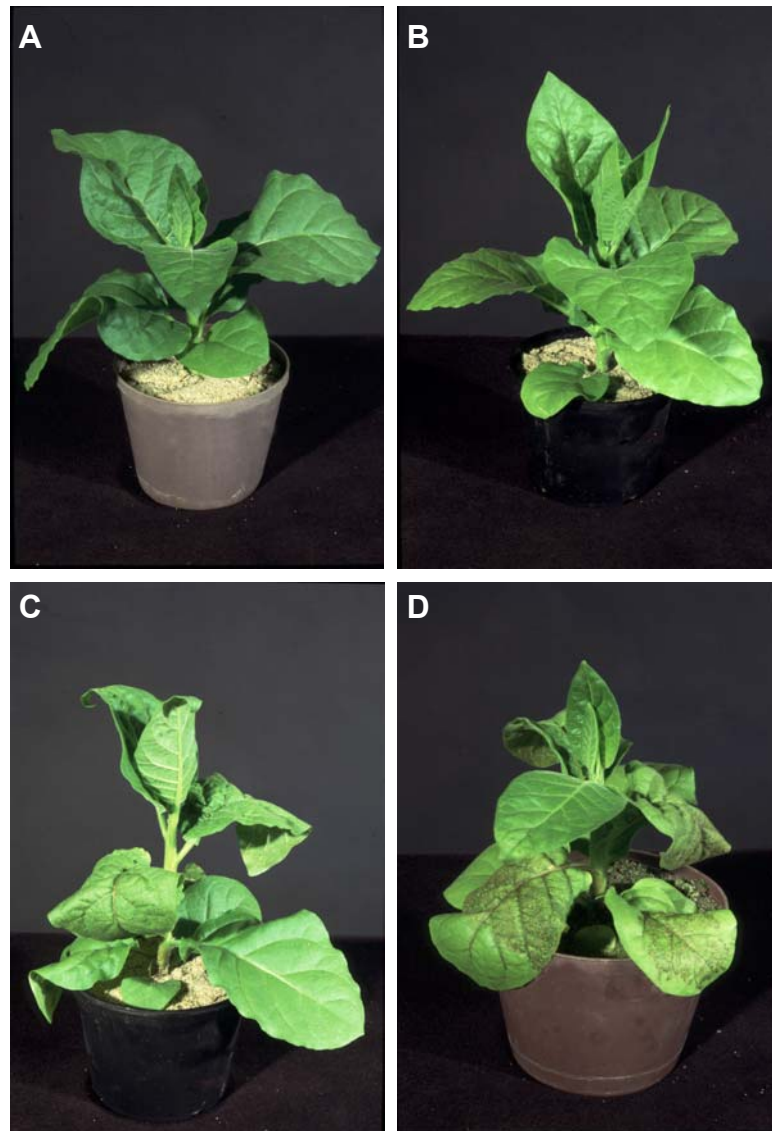


Abb. 17: Ausbildung von Blattläsionen in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN nach Befall mit PVY, kultiviert unter 5mM NH_4NO_3 , 14 Tage nach PVY-Infektion, **A-** 350ppm CO_2 , ohne PVY; **B-** 1000ppm CO_2 , ohne PVY; **C-** 350ppm CO_2 , mit PVY; **D-** 1000ppm CO_2 , mit PVY;

3.2. Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT)

3.2.1. Fragestellung

Die Anzucht von Tabakpflanzen unter Hoch-CO₂-Bedingungen führte zu einer verminderte Ausbreitung an PVY (*potato virus Y*), die insbesondere von der Akkumulation der Coumarine Scopolin und Scopoletin begleitet war. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb die Bedeutung dieser Coumarine für die Pathogenabwehr im Tabak eingehend untersucht. Im Mittelpunkt der Arbeiten stand dabei die UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) als Schlüsselenzym der Scopolinbiosynthese im Tabak.

3.2.2. Reinigung von Scopolin zur Quantifizierung von HPLC-Analysen

Die Aktivität der SGT wurde über einen einfachen enzymatischen Test bestimmt (s. 2.12.), bei dem aus UDPGlucose und Scopoletin durch Glucosylierung Scopolin und UDP entstehen. Der Nachweis der Produktbildung erfolgte per Auftrennung über HPLC und Fluoreszenzdetektion (Abb. 18).

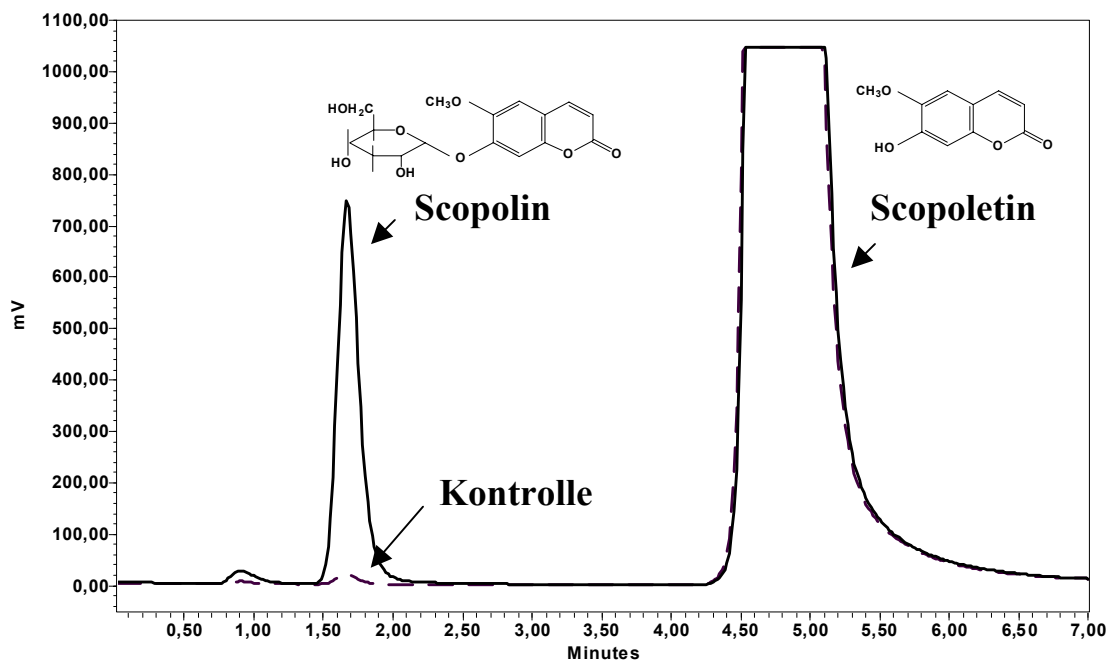


Abb. 18: HPLC-Chromatogramm zum Nachweis der Produktbildung, Detektion mittels Fluoreszenz (Anregung: 300nm, Emission: 400nm)

Durch die Auswahl eines geeigneten Trennmediums und die Verbesserung der Laufmittelzusammensetzung gelang es die Auftrennung ohne Selektivitätsverlust auf sieben Minuten zu verkürzen. Für die Quantifizierung der Glucosyltransferase-Aktivität war eine Kalibration der HPLC für Scopolin unbedingt nötig. Da Scopolin nicht käuflich erworben werden kann, musste es präparativ in ausreichender Menge gereinigt werden. Hohe Gehalte an Scopolin wurden in Tabakwurzeln (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) gemessen (Abb. 35), welche deshalb für die Scopolinreinigung verwendet wurden. Die Reinigung erfolgte nach methanolischer Extraktion des Wurzelmaterials über Festphasenextraktion und präparative HPLC (s. 2.11.). Mit den gewählten chromatographischen Trennverfahren konnte eine Fraktion an Scopolin gewonnen werden, deren Reinheit mittels HPLC überprüft wurde. Weder in der Fluoreszenz, noch im UV (Photo Diode Array) konnten Verunreinigungen beobachtet werden (Abb. 19). Die Scopolinkonzentration der gereinigten Fraktion wurde über den Verdau mit β -Glucosidase bestimmt. Die Ausbeute einer solchen Reinigung betrug ca. 1mg Scopolin.

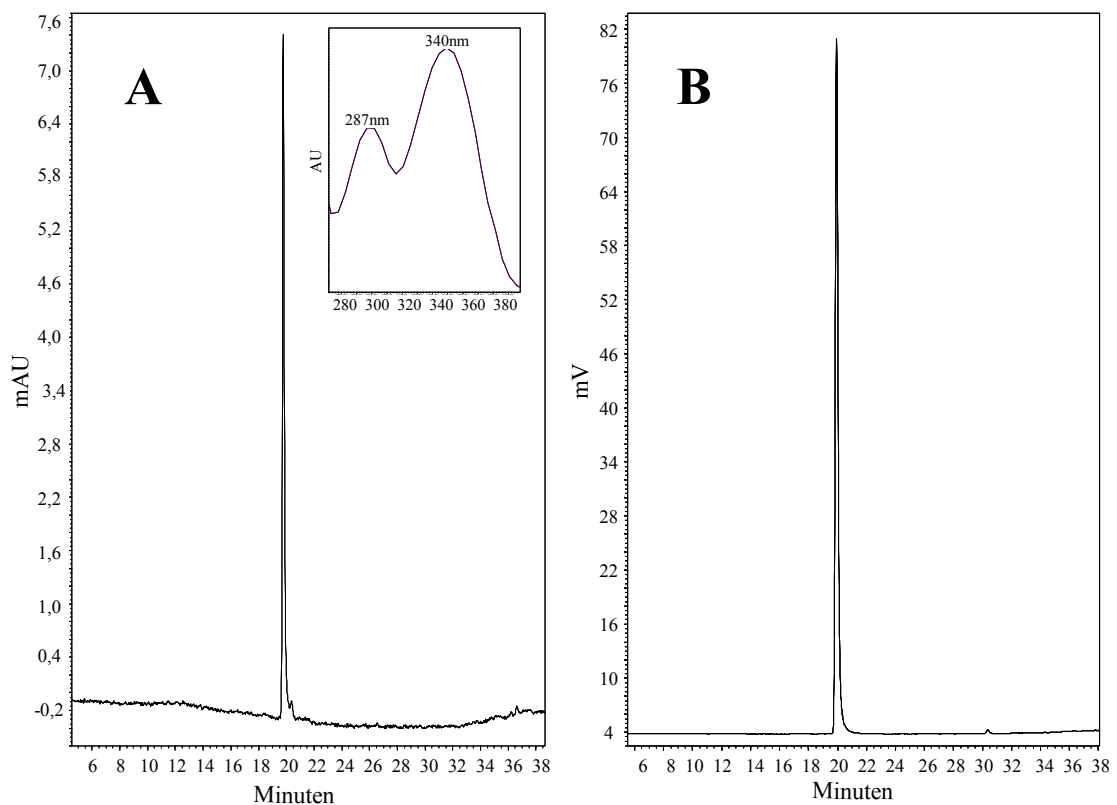


Abb. 19: HPLC-Chromatogramme der reinen Scopolinfraktion, **A:** UV-Chromatogramm, 300nm, UV-Spektrum (PDA von 260-390nm, 1/s, bei maximaler Auflösung 1,2) **B:** Fluoreszenzchromatogramm (Anregung: 300nm, Emission: 400nm)

3.2.3. Versuche zur Stimulation der SGT-Aktivität

In Abb. 20 sind die Aktivitäten der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase in Tabak-Wurzeln, Tabak-Blättern und Tabak-Zellsuspensionskulturen vergleichend dargestellt. Am höchsten ist die Aktivität der Glucosyltransferase in Wurzeln und in den Zellkulturen. In Blättern dagegen ist die Aktivität der Glucosyltransferase nur gering.

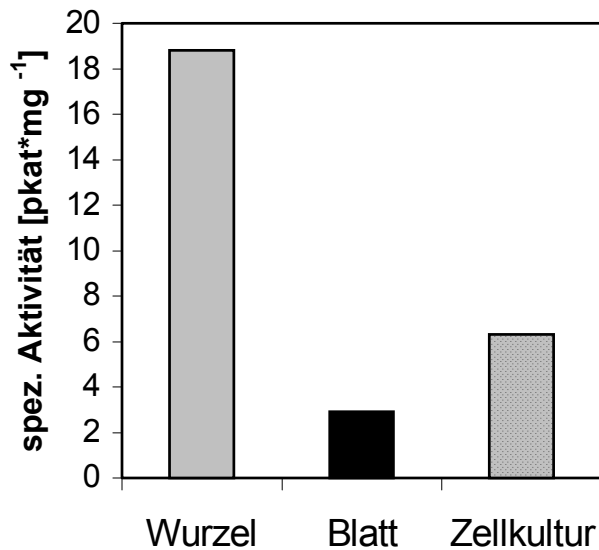


Abb. 20: Aktivität der SGT (UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase) in Tabak-Wurzeln, Tabak-Blättern (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) und Tabak-Zellsuspensionskulturen (S2LS3, *Nicotiana tabacum* cv. Havana)

Trotz der höheren Aktivität der SGT in den Wurzeln, wurde wegen der besseren Handhabbarkeit (Anzucht, Ernte) die Zellsuspensionskultur mit der Bezeichnung S2LS3 (Zellsuspensionskultur einer Wurzelkalluskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Havana) als Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung verwendet. Die Kultivierung des Ausgangsmaterials erfolgte innerhalb einer Woche und ermöglichte somit die Anzucht größerer Zellmengen für die Enzymreinigung. Die Wirkung verschiedener Effektoren auf das Zellsystem wurde untersucht, um die Ausbeute an aktivem Enzym noch zu erhöhen. Eine Steigerung der Glucosyltransferase-Aktivität der Zellkultur wurde nach Infiltration mit Methyljasmonat beobachtet (nicht gezeigt). Die maximale UDPGlucose: Scopoletin Glucosyltransferase-Aktivität war nach 32h Inkubationszeit erreicht. Andere getestete Effektoren wie Cellulase, Salizylsäure und Chitosan führten nicht zu einer Steigerung der Glucosyltransferase-Aktivität. Da die SGT-Aktivität durch Zugabe von Methyljasmonat nur um das 1,5fache gesteigert war wurde zur Reinigung des Enzyms auf die Verwendung der induzierten Zellkultur verzichtet und stattdessen die Ausgangsmenge des Zellkulturmaterials erhöht.

3.2.4. Präparative Reinigung der SGT durch säulenchromatographische Trennverfahren

Für die Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase wurden verschiedene chromatographische Trenntechniken etabliert und optimiert. Zuvor musste jedoch die Optimierung der Extraktionsmethode im Hinblick auf größere Extraktionsvolumina erfolgen. Die höchste Ausbeute an Proteinkonzentration und Enzymaktivität wurde mit lyophilisiertem Zellkulturmaterial und einem Verhältnis Puffer [ml]/FG [g] von 3:1 erhalten. Um einer raschen Inaktivierung des Enzyms vorzubeugen, war es nötig, allen verwendeten Puffern Glycerin (2%) und DTT (10mM) zuzusetzen. Die beste Extraktion wurde mit Hepes-Puffer (s. 2.10.1.) erzielt. An die Extraktion angeschlossen war eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (30% und 70%), der die Entsalzung des Extraktes folgte. Statt der anfänglich verwendeten Dialyse über Nacht wurde der Extrakt per Gelfiltration (Sephadex G25, Pharmacia) entsalzt, da so störende niedermolekulare Verbindungen schonender und schneller abgetrennt werden konnten. Wie Tab. 6 zeigt konnte mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung nur ein sehr geringer Reinigungsfaktor erzielt werden. Die Ammoniumsulfatfällung wurde aber als Reinigungsschritt beibehalten, da der Rohextrakt auf diesem Wege schnell und schonend konzentriert werden konnte. Im folgenden Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung über einen Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose) aufgetrennt. Abb. 21 zeigt das Reinigungsprofil einer DEAE-Säule.

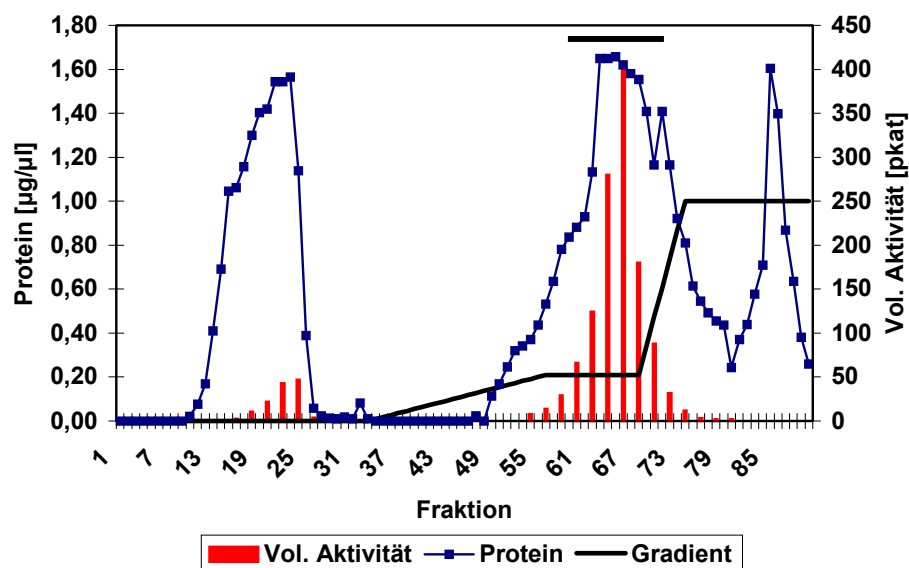


Abb. 21: Reinigungsprofil einer DEAE-Sepharose-Säule (20mM Hepes pH 8,0); Die mit dem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt und weiter gereinigt.

Mit diesem Schritt konnten bis zu 80% des Gesamtproteins (Tab. 6) abgetrennt werden. Die Bedingungen für die anschließende Kationenaustausch-Chromatographie (CM-Sepharose, 20mM Hepes pH 7,0) wurden so gewählt, dass die SGT im Durchfluss eluierte und von den gebundenen Proteinen abgetrennt wurde (Abb. 22). Als effizienter Schritt für die Aufreinigung der SGT erwies sich auch Chromatographie über Hydroxyapatit (Abb. 23).

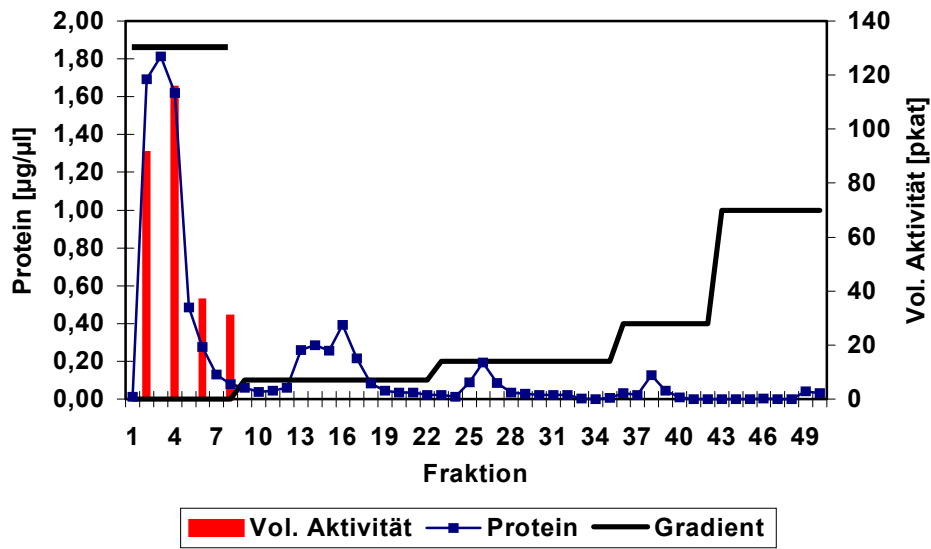


Abb. 22: Reinigungsprofil einer CM-Sepharose-Säule (20mM Hepes pH 7,0); Die mit dem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt und weiter gereinigt.

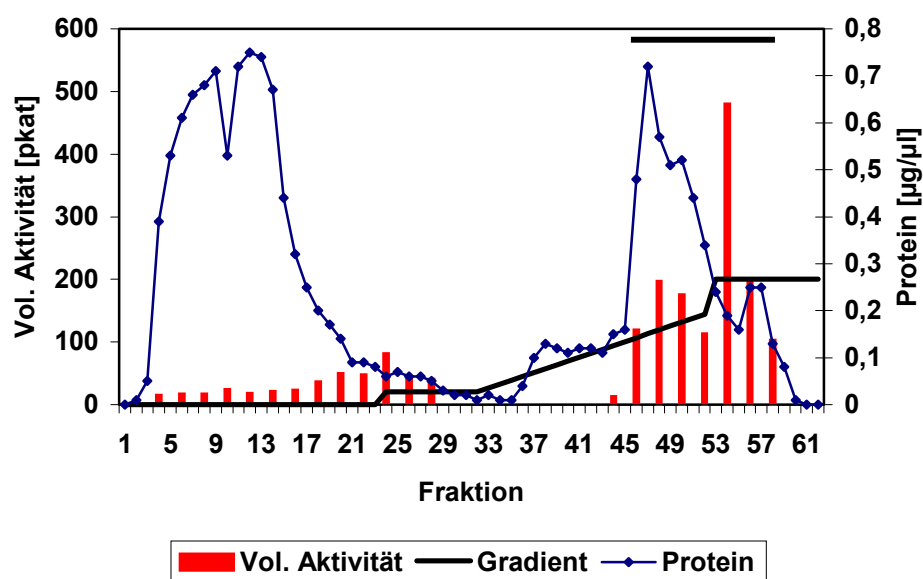


Abb. 23: Reinigungsprofil einer Hydroxyapatit-Säule (KP_i pH 6,8); Die mit dem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt und weiter gereinigt.

Zur abschließenden Reinigung wurden die Gelfiltrationschromatographie (Superdex75) und die Affinitätschromatographie (Reactive Yellow 3) verwendet. Mit Hilfe der Gelfiltration konnten vor allem Proteine mit höherem Molekulargewicht gut abgetrennt werden (Abb. 24, Abb. 26). Eine erste Abschätzung des Molekulargewichtes erfolgte nach dem Elutionsvolumen der nativen SGT von der geeichten Superdex75-Säule. Dabei wurde ein Molekulargewicht von 53 kDa für das Enzym ermittelt.

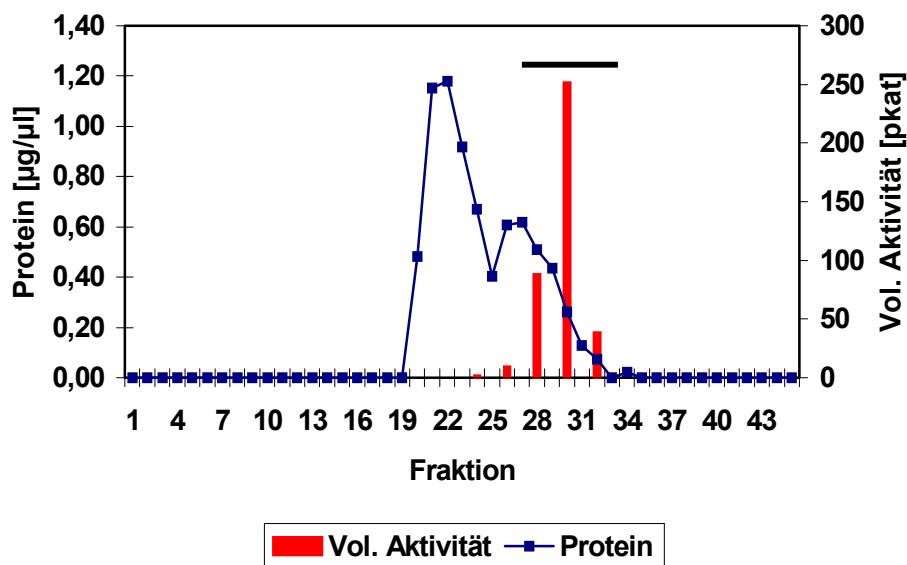


Abb. 24: Reinigungsprofil einer Superdex75-Säule (20mM Hepes pH 8,0); Die mit dem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt und weiter gereinigt.

Letzter Reinigungsschritt war die Affinitätschromatographie über Reactive Yellow 3. Mit diesem Material konnten häufig gute Ergebnisse bei der Reinigung von Glucosyltransferasen erzielt werden (Vogt et al., 1999). Unter den gewählten Bedingungen wurden die meisten Proteine nicht an die Säule gebunden, wogegen die SGT an das Säulenmaterial band (Abb. 25). Die spezifische Elution der SGT erfolgte mit 5mM UDPG (Substrat).

Die Reinheit des Enzyms wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Abb. 26 zeigt die Proteingele zur Dokumentation einer Reinigungssequenz. Die effektivsten Reinigungsschritte waren die Gelfiltration über eine Superdex75-Säule (Abb. 26, I) und die Affinitätschromatographie über eine Reactive Yellow 3-Säule (Abb. 26, K).

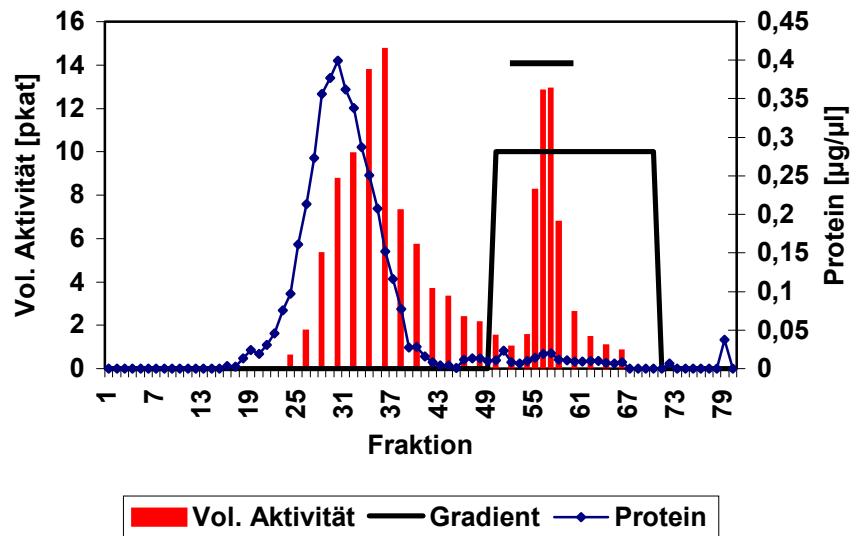


Abb. 25: Reinigungsprofil einer Reactive Yellow 3-Säule (20mM Hepes pH 8,0); Die mit dem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt.

Mittels SDS-PAGE wurde für die denaturierte SGT (markiert mit einem Pfeil) ein Molekulargewicht von 49kDa ermittelt, was dem per Gelfiltration kalkulierten Molekulargewicht von 53kDa sehr nahe kommt. Wie Abb. 26, Spalte K zeigt konnte trotz Kombination vieler Einzelschritte keine vollständige Aufreinigung des Enzyms erzielt werden. Die Reinigung von Glucosyltransferasen wird meist durch einen raschen Aktivitätsverlust erschwert (Vogt and Jones 2000). Auch die SGT-Aktivität erwies sich als sehr labil, weshalb bei den meisten Reinigungen nur ein Reinigungsfaktor von weniger als 100fach erzielt wurde (Tab. 6).

Das Molekulargewicht einer aus Tabak (Zellkultur von *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) identifizierten Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a) beträgt 53614 Da (Datenbanknummer U32644, Horvath und Chua, 1996). Das in *E. coli* exprimierte rekombinante Enzym zeigte signifikante Glucosyltransferase-Aktivität für Salizylsäure und sehr hohe Aktivitäten mit Hydroxycoumarinen (Scopoletin, Esculetin) und Hydroxyzimtsäuren als Substrate (Fraissinet-Tachet et al., 1998). Aus diesem Grund wurden parallel zur Reinigung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase molekularbiologische Arbeiten zur Überexpression der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase in *E. coli* begonnen (s. 3.3).

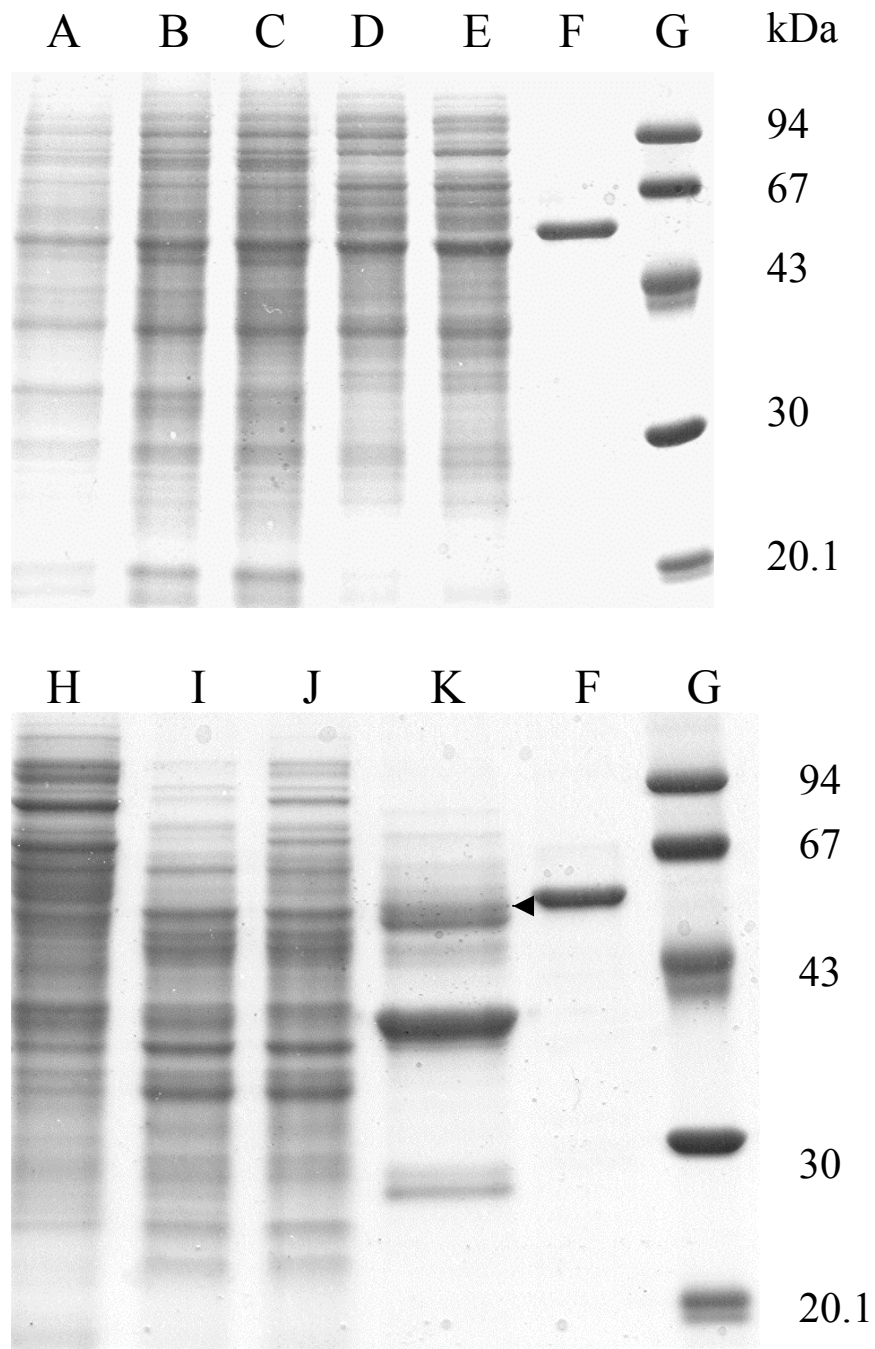


Abb. 26: SDS-PAGE einer Reinigung, **A-** Rohextrakt, **B-** Ammoniumsulfatfällung, **C-** Sephadex-G25, **D-** DEAE-Sepharose, **E-** CM-Sepharose, **F-** rekombinantes Protein (Glucosyltransferase aus Tabak, codiert durch IS5a), **G-** Protein Marker, **H-** Hydroxyapatit, **I-** Superdex75, **J-** Reactive Yellow 3 (ungebundene Proteine), **K-** Reactive Yellow 3 (eluierte Fraktion)

| Reinigungs-schritt | Volumen [ml] | Total Protein [mg] | Volumenaktivität [pkat] | spez. Aktivität [pkat/mg] | Ausbeute [%] | Reinigungs-faktor |
|--------------------|--------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|-------------------|
| Rohextrakt | 1500 | 1100 | 7106 | 6,5 | 100,0 | 1 |
| ASF | 223 | 452 | 3502 | 7,8 | 49,3 | 1,2 |
| DEAE | 66 | 146 | 1685 | 11,6 | 23,7 | 1,8 |
| CM | 12 | 37 | 416 | 11,1 | 5,9 | 1,7 |
| CHT | 1,5 | 8 | 183 | 21,8 | 2,6 | 3,4 |
| S 75 | 0,5 | 0,9 | 107 | 124,3 | 1,5 | 19,2 |
| RY-3 | 5,2 | 0,1 | 32 | 446,6 | 0,5 | 69,1 |

Tab 6: Reinigungstabelle einer SGT-Präparation, ASF- Ammoniumsulfatfällung, DEAE- DEAE-Säule, CM- CM-Sepharose-Säule, CHT- Ceramic Hydroxyapatite-Säule, S75- Superdex 75-Säule, RY-3- Reactive Yellow 3-Säule

3.3. Klonierung einer Salizylsäure induzierbaren Glucosyltransferase

3.3.1. Isolierung eines cDNA-Klons über PCR-Amplifizierung

Aufgrund der Ähnlichkeit der aus Tabak isolierten Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, U32643, Horvath and Chua 1996) mit der zu reinigenden Glucosyltransferase erschien es sinnvoll parallel zu den proteinchemischen Arbeiten mit der Klonierung dieses Enzyms zu beginnen.

Wie unter Punkt 2.24. beschrieben wurde ein Fragment codierend für diese Glucosyltransferase amplifiziert. Als PCR Ausgangsmaterial wurde die aus der Zellsuspensionskultur S2LS3 hergestellte cDNA (s. 2.24.) verwendet. Eine Bande von 1428 Bp wurde nach wiederholter Amplifikation isoliert und in den TA-cloning Vektor eingebaut.

3.3.2. Expression rekombinanter SGT in *E. coli*

Der isolierte cDNA-Klon wurde nun für die Gewinnung rekombinanten Proteins aus *E. coli* eingesetzt (s. 2.16.). Im bakteriellen System konnte nach IPTG Induktion hohe UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase Aktivität gemessen werden.

3.3.3. Reinigung des rekombinanten Proteins zur Herstellung eines Antiserums

Für weitere enzymologische Untersuchungen und zur Herstellung eines Antiserums musste das rekombinante Protein in ausreichender Menge gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte über Ni-NTA Agarose (s. 2.17.). Alle Schritte der Reinigung wurden über SDS-PAGE geprüft (Abb. 27). Da die mit Imidazol von der Ni-NTA Agarose eluierte Enzymfraktion im SDS-Gel noch Verunreinigungen zeigte (Abb. 27 D) wurde ein weiterer Reinigungsschritt über Superdex75 (Gelfiltration) durchgeführt.

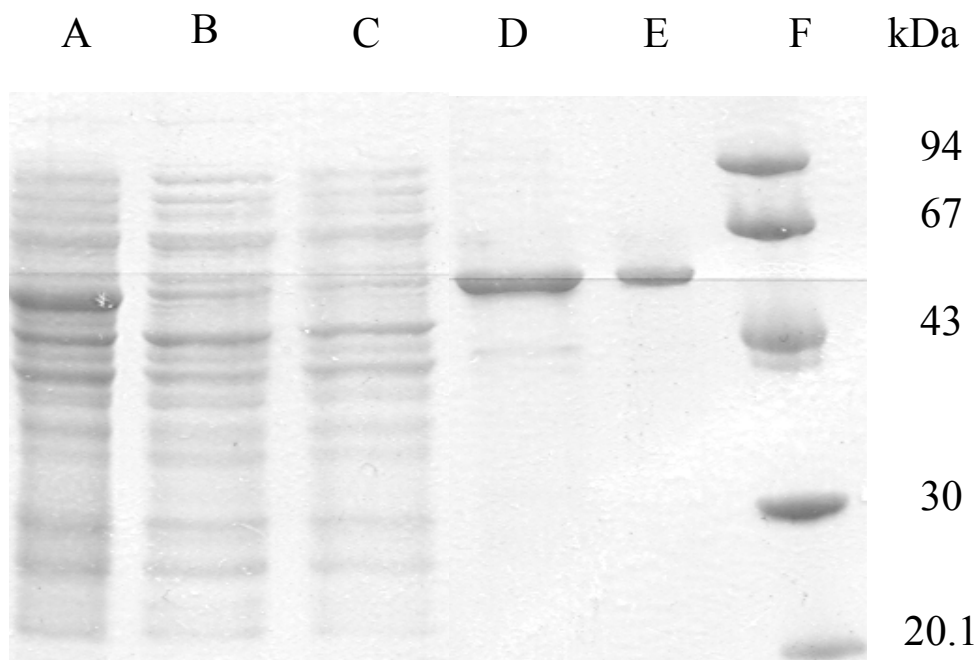


Abb. 27: SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte: **A-** Lysat, **B-** ungebundene Fraktion nach 2h Inkubation mit Ni-NTA Agarose, **C-** Waschfraktion, **D-** Eluat mit 250mM Imidazol, **E-** konzentrierte Fraktion nach Gelfiltration über Superdex75, **F-** Proteinmarker

Da das rekombinante Protein durch diese Schritte eine große Reinheit aufwies wurde es ohne weitere Reinigungsschritte für die Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die so erhaltenen Antiseren wurden im Western-Blot geprüft. Für die Antiseren beider Kaninchen wurden Signale in der erwarteten Größe (53kDa) gemessen. Aufgrund einiger unspezifischer Signale beim Antikörper des Kaninchens Nr. 1 wurde nur das Serum 2 für weitere Arbeiten genutzt.

Abb. 28 zeigt den Western Blot einer Konzentrationsreihe der rekombinanten Glucosyltransferase. Die Intensität des Signals nimmt mit steigender SGT-Konzentration zu, und erreicht schon ab 5ng die Sättigung.

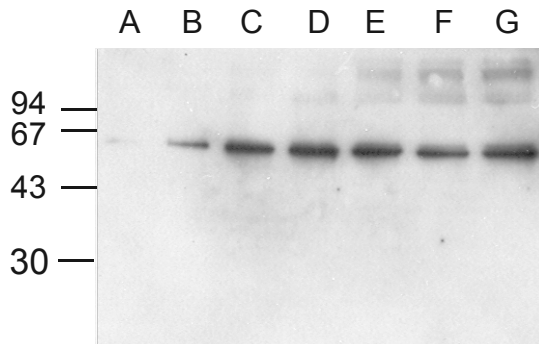


Abb. 28: Western Blot des rekombinanten Proteins, A-1ng, B-2ng, C-5ng, D-7,5ng, E-10ng, F-15ng, G-20ng

Mit dem so gewonnenen polyklonalen Antikörper wurden auch die verschiedenen Fraktionen der SGT-Reinigung getestet (Abb. 29). In allen Fraktionen reagierte der Antikörper spezifisch mit nur einer Proteinbande, die der Molekularmasse der gereinigten SGT entspricht. Dies deutet auf eine starke Ähnlichkeit der rekombinanten Glucosyltransferase mit der gereinigten SGT hin. Der Vergleich der Peptidmassen beider Proteine mittels MALDI/TOF-MS sollte dies bestätigen (s. 3.4.)



Abb. 29: Western-Blot einer Reinigung, Detektion mit dem Antikörper der rekombinanten SGT, **A** – Rohextrakt, **B** – Sephadex G25, **C** – DEAE-Sepharose Säule, **D** – CM-Sepharose Säule, **E** – Hydroxyapatit Säule, **F** – Superdex75-Säule, **G** – Reactive Yellow 3 Säule, **H** – rekombinante Glucosyltransferase

3.4. Vergleich der Peptidmassen der gereinigten SGT-Aktivität mit der rekombinanten Glucosyltransferase über MALDI/TOF-MS-Analysen

Die Peptidmassen der gereinigten SGT und der rekombinanten Glucosyltransferase sollten nach tryptischem Verdau mit Hilfe eines MALDI/TOF-MS ermittelt und anschließend vergleichend ausgewertet werden.

3.4.1. MALDI/TOF-MS-Analysen mit der rekombinanten Glucosyltransferase

Zunächst wurde das rekombinante Protein in Lösung untersucht. Die nach tryptischem Verdau erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe des MALDI/TOF-MS vermessen und zur Datenbanksuche (NCBIInr-Datenbank, Programm: Mascot) verwendet. Anhand der gemessenen Peptidmassen konnte das rekombinante Protein korrekt zugeordnet werden (Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase IS5a, Datenbanknummer gi/7433906), mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$. Abb. 30 zeigt die Sequenzabdeckung der gefundenen Peptidsequenzen der analysierten rekombinanten Glucosyltransferase mit der Sequenz der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a).

| | |
|-----|---|
| 1 | MGQLHIFFFP VMAHGHMIPT LDMAK LFASR GVK ATIITTP LINEVF SKAI |
| 51 | QR NKHLGIEI EIRLIKFP AV ENGLPEE CER LDQIPSDEKL PNFFKAVAMM |
| 101 | QEPLEQLIEE CRPDCLISDM FLPWTTDTAA KNIPR IVFH GTSFFALCVE |
| 151 | NSVRLNKPFK NVSSDSE TFV VPDLPHEI KL TR TQVSP FER SGEETAM TRM |
| 201 | IKTVRESDSK SYGVV NSFY ELETDY VEHY TKVLG RRAWA IGPLSMCNRD |
| 251 | IEDKAERGK SSIDKHECLK WLDSKKPSSV VYICFGSVAN FTASQLHELA |
| 301 | MGVEASGQEF IWVVR TELDN EDWLPE GFE RTKEK GLIIR GWAPQVLILD |
| 351 | HESVGAFVTH CGWNSTLEGV SGGVPMVTWP VFAEQFFNEK LVTEVLK TGA |
| 401 | GVGSIQ WKR SASEGVKREAI AKAIK VMVS EADGFR NRA KAYKEM ARKA |
| 451 | IEEGSSYTG LTTLLEDIST YSSTGH |

Abb. 30: Sequenzabdeckung (*Sequence coverage*) der gefundenen Peptidsequenzen der rekombinanten Glucosyltransferase mit der Sequenz der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a). Die Aminosäuren der zur Identifizierung herangezogenen Peptide der MS-Analyse sind rot unterlegt. Nominale Masse der IS5a (M_r): 53580. Der Vergleich der Peptidsequenzen erfolgte mit Hilfe der NCBIInr-Datenbank unter Verwendung des Programmes Mascot.

Da die zu vermessende aus Zellkulturen aufgereinigte SGT als Proteinbande auf einem SDS-Gel vorlag, sollte zunächst geprüft werden, ob die rekombinante Glucosyltransferase auch nach gelelektrophoretischer Trennung und anschließendem tryptischen Verdau über die MALDI/TOF-Analyse identifiziert werden kann. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Proteins auf einem SDS-Gel getrennt, Gelstücke von 1mm^3 ausgeschnitten, und im Gel tryptisch verdaut (2.27.1.). Auch aus den gefundenen Peakmassen dieser Aufarbeitung konnte die Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, Datenbanknummer gi/7433906) korrekt zugeordnet werden. Von den Massenpeaks, die zur Datenbanksuche verwendet wurden stimmen die meisten mit denen der ersten Aufarbeitung des in Puffer gelösten Proteins überein.

3.4.2. MALDI/TOF-MS-Analysen mit der gereinigten Glucosyltransferase

Auch zur massenspektrometrischen Analyse des gereinigten Proteins aus dem SDS-Gel wurden Gelstücke ausgeschnitten und anschließend tryptisch verdaut. Da auf dem SDS-Gel zwei Banden in der gesuchten Größe sehr dicht beieinander lagen (Abb. 26, K), wurden Proben aus beiden Banden entnommen und untersucht. In Western-Blot Analysen zeigte allerdings nur die obere Bande immunologische Verwandtschaft mit dem rekombinanten Protein (s. 3.3.3.).

Für die untere Bande zeigte keiner der nach tryptischem Verdau im Chromatogramm aufgetretenen Peaks Übereinstimmungen zu den verwendeten Peaks der Analyse der rekombinanten Glucosyltransferase. Die Analyse der für die untere Bande gefundenen Peptidmassen in der Datenbank ergab außerdem keine Übereinstimmungen zu Peptidsequenzen bereits bekannter Glucosyltransferasen.

Die mit Hilfe des MS ermittelten Peakmassen der oberen Bande dagegen zeigten in der Datenbankanalyse die größten Übereinstimmungen zu der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, Datenbanknummer gi/7433906). Die MALDI/TOF-Spektren der Peptidfragmente der rekombinanten (A) und der gereinigten (B) Glucosyltransferase sind in Abb. 31 vergleichend dargestellt. Die zur Datenbanksuche verwendeten Peptidmassen sind mit einem Stern markiert.

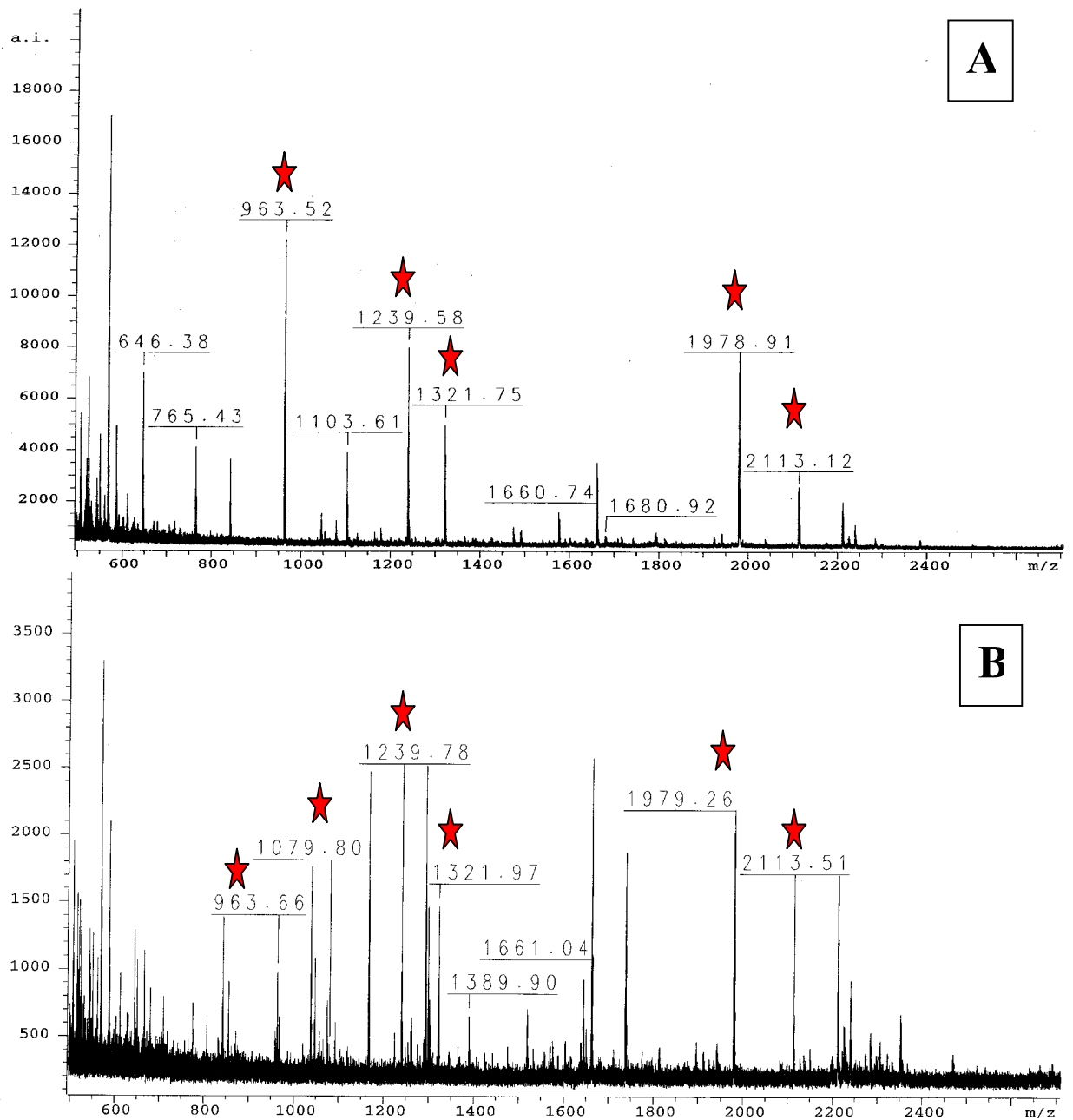


Abb. 31: MALDI/TOF-Spektren der Peptidfragmente der rekombinanten (A) und der gereinigten (B) Glucosyltransferase, beide nach Verdau mit Trypsin im SDS-Gel (s. 2.27.1.)

3.4.3. Vergleich der untersuchten Glucosyltransferase mit anderen bekannten Glucosyltransferasen aus Tabak

Die *Sequence coverage* der gefundenen Peptidsequenzen der rekombinanten Glucosyltransferase mit der Sequenz der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a) zeigte keine vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenz (Abb. 30). Darum war es erforderlich, Ähnlichkeiten der untersuchten gereinigten und rekombinanten Glucosyltransferasen zu anderen bekannten Glucosyltransferasen aus Tabak auszuschließen. Die durch IS5a (U32643) codierte Glucosyltransferase zeigt hohe Sequenzhomologie zu dem nah verwandten Gen IS10a (U32644). Abb. 32 zeigt den Sequenzvergleich von IS5a und IS10a.

| | | | | | | |
|--------------|------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| IS5a | 1 | MGQLH I FFFP | VMAHGHIPT | LDMAKL F ASR | GVKATIITTP | LNE F VFSK A I |
| IS10a | 1 | MGQLH F FFFP | VMAHGHIPT | LDMAKL V ASR | GVKATIITTP | LNE S VFSK S I |
| IS5a | 51 | QRNKHLGIEI | EIRLIKFP | ENGLPEECER | LD Q IPSD E KL | PNFFKAVAMM |
| IS10a | 51 | QRNKHLGIEI | EIRLIKFP | ENGLPEECER | LD L IPSD D KL | PNFFKAVAMM |
| IS5a | 101 | QEPLEQLIEE | CRP D CL I SDM | FLPWTTDTAA | KFN I PRIVFH | GTSFFALCVE |
| IS10a | 101 | QEPLEQLIEE | CRP N CL V SDM | FLPWTTDTAA | KFN M PRIVFH | GTSFFALCVE |
| IS5a | 151 | NS V RLNKPFK | NVSSDSETFV | VP D LPH E IKL | TRT Q VSP F ER | SGEET A MTRM |
| IS10a | 151 | NS I RLNKPFK | NVSSDSETFV | VP N LPH E IKL | TRT Q LSP F EQ | SGEET T MTRM |
| IS5a | 201 | IKTVRES D SK | SYGV V FNS F Y | ELE T DYVEHY | TKVLGRR A WA | IGPLSMCNRD |
| IS10a | 201 | IK VRES D SK | SYGV I FNS F N | ELE H DYVEHY | TKVLGRR A WA | IGPLSMCNRD |
| IS5a | 251 | IEDKAERG K K | SSIDKHECLK | WLDSKKPSSV | VY I CFGSVAN | FTASQLHELA |
| IS10a | 251 | IEDKAERG Q Q | SSIDKHECLK | WLDSKKPSSV | VY V CFGSVAN | FTASQLHELA |
| IS5a | 301 | MG V EASGQEF | IWVVRTELDN | EDWLPEG F EE | RTKEKGLIIR | GWAPQVLILD |
| IS10a | 301 | MG I EASGQEF | IWVVRTELDN | EDWLPEG L EE | RTKEKGLIIR | GWAPQVLILD |
| IS5a | 351 | HESVGAFVTH | CGWNSTLEGV | SGGVPMV T WP | VFAEQFFNEK | LVTEVLKTGA |
| IS10a | 351 | HESVGAFVTH | CGWNSTLEGV | SGGVPMV T WP | VFAEQFFNEK | LVTEVLKTGA |
| IS5a | 401 | GVGSIQW K RS | ASEGVKREAI | AKAIK R VMVS | EEAD D GFRNRA | KAYKEMARKA |
| IS10a | 401 | GVGSIQW K RS | ASEGVKREAI | AKAIK R VMVS | EEA E GFRNRA | KAYKEMARKA |
| IS5a | 451 | IEEGSSYTG | LTLL E DIST | YSSTGH | | |
| IS10a | 451 | IEEGSSYTG | LTLL E DIST | YSSTGH | | |

Abb. 32: Sequenzvergleich der nah verwandten Gene IS5a und IS10a; Sequenzunterschiede sind rot markiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe der NCBI-nr-Datenbank unter Verwendung des Programmes Standard protein-protein BLAST.

Beide Gene unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren, was jedoch weitreichende Konsequenzen für das Spektrum an Peptidmassen hat, welches nach tryptischem Verdau entsteht. Der Austausch von Phenylalanin (IS5a) gegen Valin (IS10a) in der Sequenzposition 27 beispielsweise führt zu unterschiedlichen Massen der zugehörigen Peptide. Die zugehörige Peptidmasse für IS5a ist 592,39, wogegen für IS10a ein Peptid mit der Masse 544,33 entstehen würde. In den massenspektrometrischen Untersuchungen der rekombinanten, wie auch der gereinigten Glucosyltransferase wurde die Masse 592,39 immer gefunden und auch zur Datenbankanalyse verwendet. Ein Massenpeak mit der Masse 544,33 dagegen wurde niemals gemessen, weshalb IS10a als möglicher Kandidat für das aufgereinigte Protein ausgeschlossen werden kann.

Neben IS10a sind weitere Enzyme mit Glucosyltransferase-Aktivität aus Tabak isoliert und sequenziert wurden, die Sequenzhomologie zu IS5a zeigen. Der Vergleich der gemessenen Peptidmassen unserer MS-Analysen und der zu erwartenden Peptidmassen einer UDPGlucose:Salizylsäure Glucosyltransferase (SA-Gtase, Datenbanknummer: AF190634, Lee und Raskin, 1999) zeigte nur in einer einzigen Peptidmasse Übereinstimmung. Mit den theoretisch abgeleiteten Peptidmassen einer Jasmonat-induzierten potentiellen Glucosyltransferase (JIGT, Datenbanknummer: AB000623, Imanishi et al., 1998) konnten keine Übereinstimmungen mit denen der MALDI/TOF-Analyse gefunden werden.

3.5. Transformation von Tabak zur Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten

In Anzuchten von Tabakpflanzen unter erhöhtem [CO₂] wurden höhere Gehalte an Phenylpropanen, insbesondere die Akkumulation von Scopolin gezeigt (s. 3.1.2.). Verbunden mit höheren Gehalten an den Coumarinen Scopolin und Scopoletin war eine verbesserte Resistenz der Pflanzen gegenüber einer Infektion mit PVY (s. 3.1.3.). Um den Beitrag dieser Coumarine zur Pathogenabwehr zu prüfen sollte die Aktivität der SGT in Tabak gezielt modifiziert werden. Dazu sollten transgene Tabakpflanzen mit Hilfe von Sense-Konstrukten erzeugt werden. Parallel zur Reinigung und Sequenzierung der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase wurde deshalb eine

Salizylsäure-induzierbare Glucosyltransferase (Horvath and Chua, 1996) aus der Zellsuspensionskultur S2LS3 kloniert und mittels PCR amplifiziert (s. 2.24.). Das so erhaltene cDNA Fragment (1428 Bp) wurde unter Verwendung der Sall und BamHI Schnittstellen der zur Amplifikation verwendeten Primer in die multiple Klonierungssequenz des binären Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) zwischen den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) und das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., 1984) kloniert. Das resultierenden Sense-Konstrukt (Abb. 3) wurde anschließend über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Tabak transformiert (s. 2.25.).

3.5.1. Selektion geeigneter transgener Linien

Charakterisierung der Primärtransformanten (F0-Generation)

Aus der mit den Sense-Konstrukten durchgeführten Transformation wurden 61 Kanamycin resistente Pflanzen regeneriert. Nach Überführung in das Gewächshaus wurden die Transformanten per Enzymassay auf die spezifische Aktivität der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT) hin geprüft. Dazu wurden zunächst von 6-8 Wochen alten Pflanzen (Primärtransformanten, F0-Generation) Blattproben entnommen und analysiert. Die transgenen Sense-Linien zeigten dem Wildtyp (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) gegenüber meist deutlich erhöhte spezifische Enzymaktivitäten. Für die erste und zweite Probenahme konnten ähnliche spezifische Aktivitäten ermittelt werden. Von den 15 ausgewählten Sense-Pflanzen wurde Saatgut zur Weiterführung der Linien gewonnen.

Selektion der transgenen F1- und F2-Generation

Die Ergebnisse der F0-Generation konnten durch Untersuchungen der F1-Generation bestätigt werden. Die so selektierten Sense-Linien mit erhöhten spezifischen SGT-Aktivitäten zeigt Abb. 33. Um die Schwankungsbreite der SGT-Aktivität in den Wildtypen zu erfassen wurden jeweils 5 Wildtyppflanzen untersucht. Von den ausgewählten Linien der F1-Generation wurde wiederum Saatgut zur Weiterführung der Linien gewonnen. Die anschließende Durchmusterung der F2-Generation führte zur Auswahl von 3 Sense-Linien (Abb. 34). Die eingehende Untersuchung der in Abb. 34

gezeigten ausgewählten transgenen Linien sollte zeigen, ob eine veränderte Aktivität der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase mit modifizierten Gehalten an Scopolin korreliert.

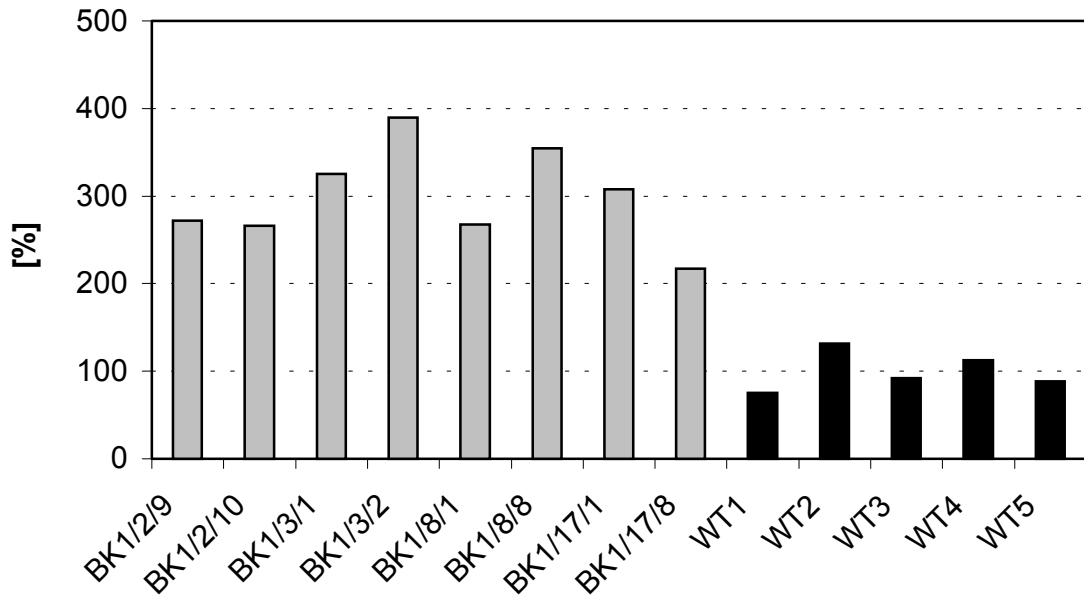


Abb. 33: spezifische SGT-Aktivität in Blättern (5. Blatt von oben) ausgewählter Sense-Pflanzen der F1-Generation (BK1, erste und zweite Analyse) gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

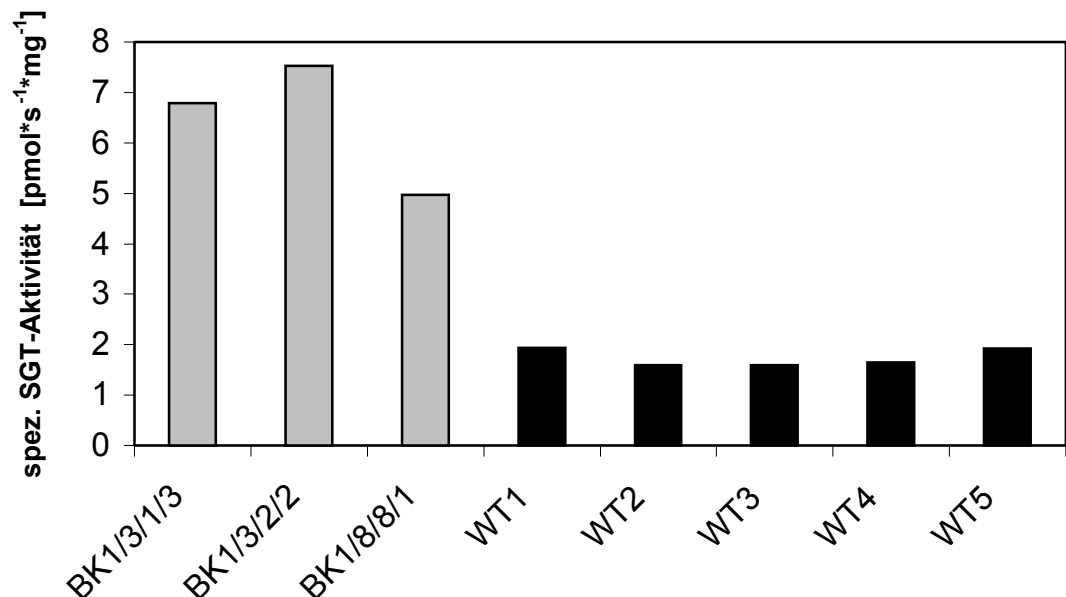


Abb. 34: spezifische SGT-Aktivität in Blättern (5. Blatt von oben) ausgewählter Sense-Pflanzen der F2-Generation (BK1, erste und zweite Analyse) gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

Die Analyse von Coumarinen im Tabak zeigte, dass der Gehalt an Scopolin am höchsten in den Wurzeln ist (Abb. 35). In weitere Untersuchungen wurden deshalb auch Wurzelproben mit einbezogen, um den Einfluss der Transformation auf den Gehalt an Scopolin und anderen phenolischen Inhaltsstoffen genauer zu prüfen (s. 3.5.3.). Physiologische Untersuchungen sollten anschließend zeigen, ob die durch die Transformation möglicherweise veränderten Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen zu einer veränderten Pathogenresistenz der Pflanze führen (s. 3.5.4.).

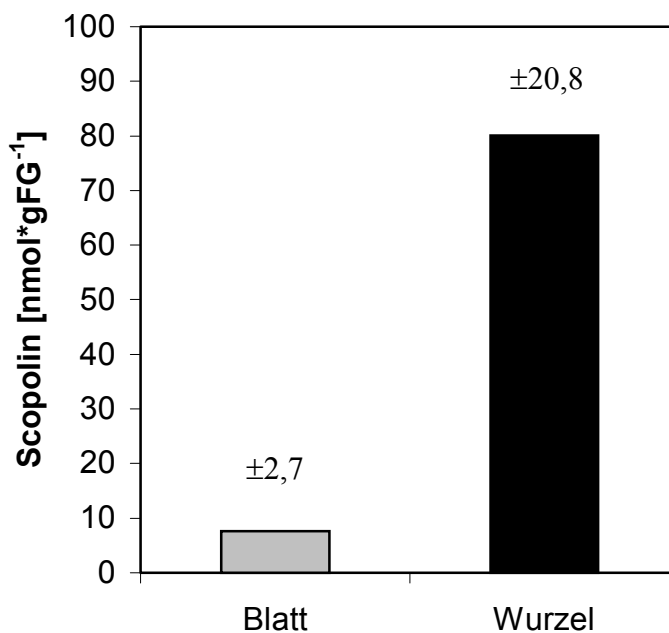


Abb. 35: Vergleich der Scopolingehalte in Tabak-Wurzeln und Tabak-Blättern, (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)
Die Balken entsprechen den Werten aus drei unabhängigen Experimenten mit je n=6 Pflanzen ± Standardfehler.

3.5.2. Charakterisierung der ausgewählten Sense-Linien

Northern-Blot Analysen der ausgewählten transgenen Linien

Zur Charakterisierung der transgenen Linien wurden Blätter und Wurzeln 6 Wochen alter Tabakpflanzen verwendet. Für die Northern-Blot Analysen wurde Gesamt-RNA aus Blättern und Wurzeln isoliert und mit einer radioaktiv markierten Sonde des cDNA-Fragments hybridisiert (s. 2.26.). Die Transkriptmengen an SGT-mRNA waren in den ausgewählten Sense-Linien stark erhöht gegenüber dem Wildtyp (Abb. 36). Die Erhöhung war sowohl für die Blätter als auch für die Wurzeln zu beobachten (Abb. 36), wobei die Menge an gebildeter SGT-mRNA in Blättern und Wurzeln aufgrund des verwendeten starken Promotors (35S-Promotor des CaMV, s. 2.25.) gleich war.

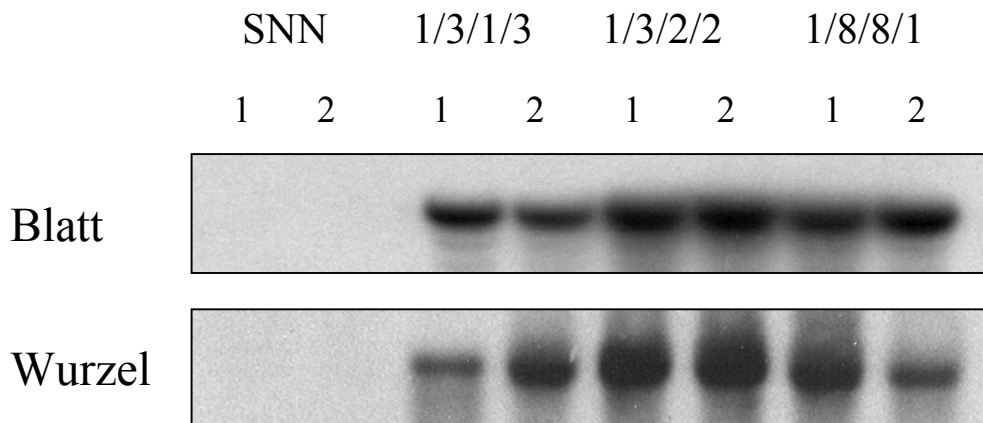


Abb. 36: Autoradiogramm der Northern-Blot Analyse von Blättern (5. Blatt von oben) und Wurzeln ausgewählter Sense-Pflanzen (1/3/1/3, 1/3/2/2, 1/8/8/1) gegenüber dem Wildtyp (SNN, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), F3-Generation, untersucht wurden je zwei Einzelpflanzen, 14h Exposition des Röntgenfilms, Signale für die Wildtyp mRNA konnten nach 72h Exposition beobachtet werden

Western-Blot Analysen der ausgewählten transgenen Linien

Um zu prüfen, ob die erhöhte Expression von SGT-mRNA mit erhöhten Gehalten an SGT-Protein korreliert, wurde aus Blättern und Wurzeln Gesamt-Protein isoliert und mit dem gewonnenen polyklonalen Antikörper für das Enzym (s. 3.3.3.) hybridisiert. Im Western-Blot konnten in den ausgewählten Sense-Linien erhöhte Gehalte an SGT-Protein gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden. Die Erhöhung im Proteingehalt war sowohl für die Blätter als auch für die Wurzeln gegeben (Abb. 37), Unterschiede im Gehalt an SGT-Protein zwischen Blättern und Wurzeln wurden nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der Western- und Northern-Blot Analysen bestätigten die stabile Transformation der SGT-Sense-Konstrukte in Tabak. Für weitere Analysen standen somit Tabakpflanzen mit erhöhter Expression der SGT-mRNA zur Verfügung. Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen konnten im Gewächshaus während der gesamten vegetativen Wachstumsphase keine phänotypischen Veränderungen der transformierten Pflanzen beobachtet werden.

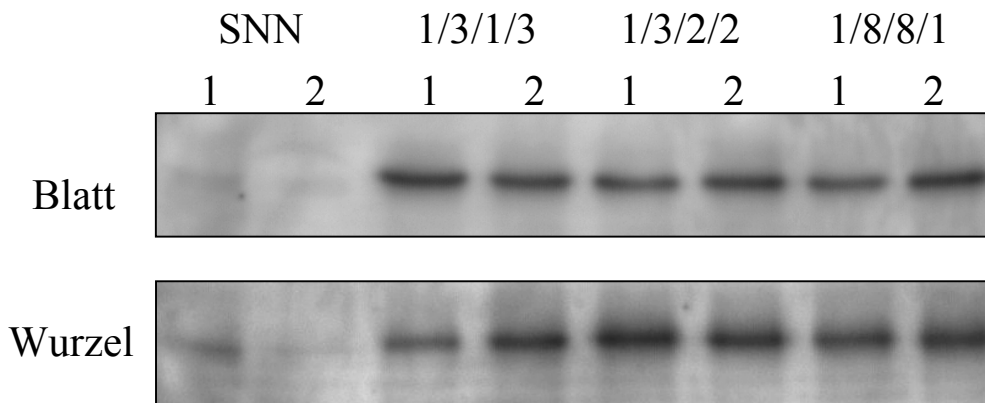


Abb. 37: Autoradiogramm der Western-Blot Analyse von Blättern (5. Blatt von oben) und Wurzeln ausgewählter Sense-Pflanzen (1/3/1/3, 1/3/2/2, 1/8/8/1) gegenüber dem Wildtyp (SNN, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN), F3-Generation untersucht wurden je zwei Einzelpflanzen

3.5.3. Untersuchungen zur Wirkung der veränderten SGT-Aktivität auf die Akkumulation von Scopolin und anderen phenolischen Inhaltsstoffen

Zur weiteren Charakterisierung der ausgewählten transgenen Pflanzen sollten die Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen (insbesondere Scopolin) analysiert werden. Die UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase katalysiert die Glucosylierung von Scopoletin zu Scopolin, weshalb in Pflanzen mit erhöhter SGT-Aktivität erhöhte Scopolingehalte erwartet werden. Für die drei ausgewählten Sense-Linien wurden in den Blättern (Abb. 38) wie auch in den Wurzeln (Abb. 39) gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Aktivitäten der SGT gemessen.

Zur Bestimmung der Gehalte an löslichen Phenylpropanen wurden die methanolischen Extrakte per HPLC aufgetrennt und analysiert (s. 2.4.2.). Obwohl alle Sense-Linien erhöhte Aktivitäten der UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase zeigten wurde in den Blättern der Sense-Pflanzen keine erhöhten Scopolingehalte gegenüber den Wildtyp-Kontrollen gemessen (Abb. 40). In den Wurzeln dagegen konnten für alle Sense-Linien leicht erhöhte Gehalte an Scopolin gemessen werden (Abb. 41). Der Gehalt an Scopoletin war unverändert in den Blättern und den Wurzeln der Sense-Linien gegenüber dem Wildtyp. Ebenfalls unverändert war der Gesamtanteil an glucosidischen bzw. nicht-glucosidischen Phenylpropanen (nicht gezeigt, keine Veränderung im Gesamtmuster an Phenylpropanen).

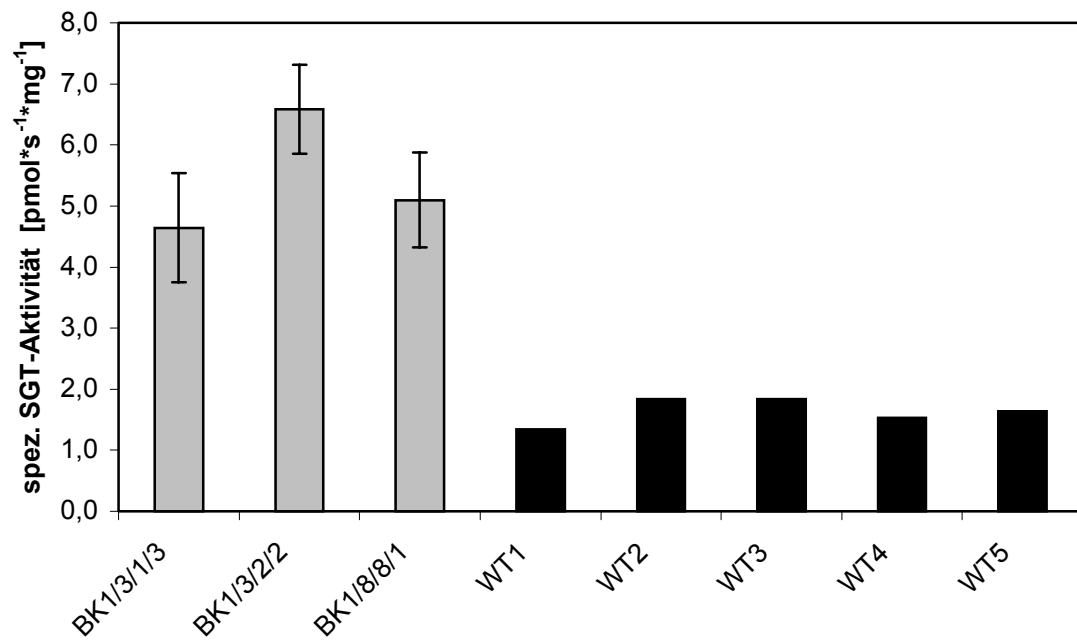


Abb. 38: spezifische SGT-Aktivität in Blättern (5. Blatt von oben) ausgewählter Sense-Pflanzen (BK, n=6) der F3-Generation gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

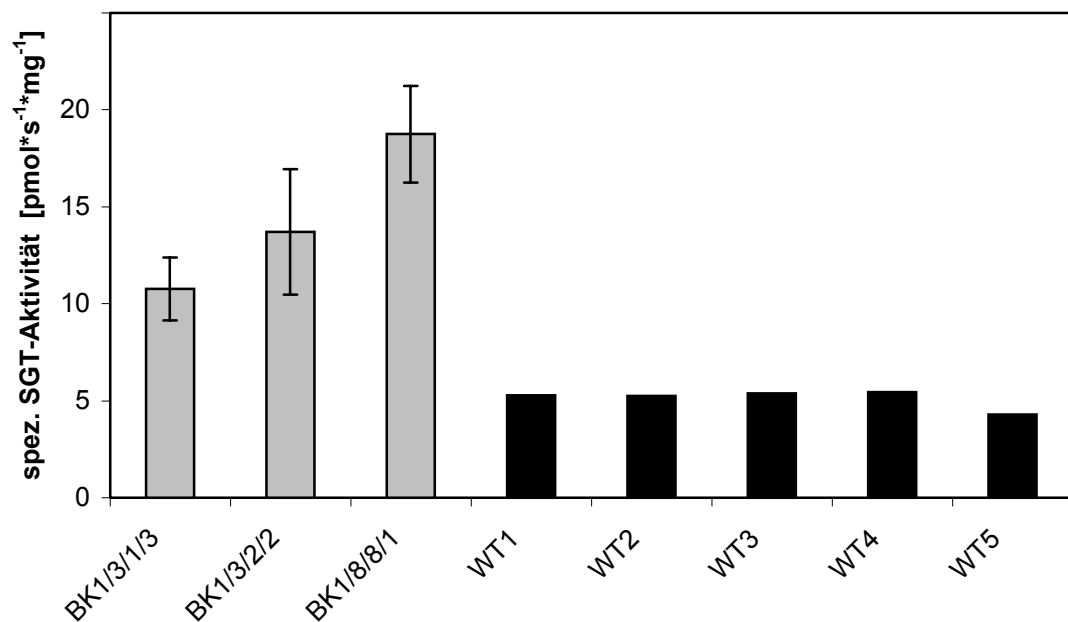


Abb. 39: spezifische SGT-Aktivität in Wurzeln ausgewählter Sense-Pflanzen (BK, n=6) der F3-Generation gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

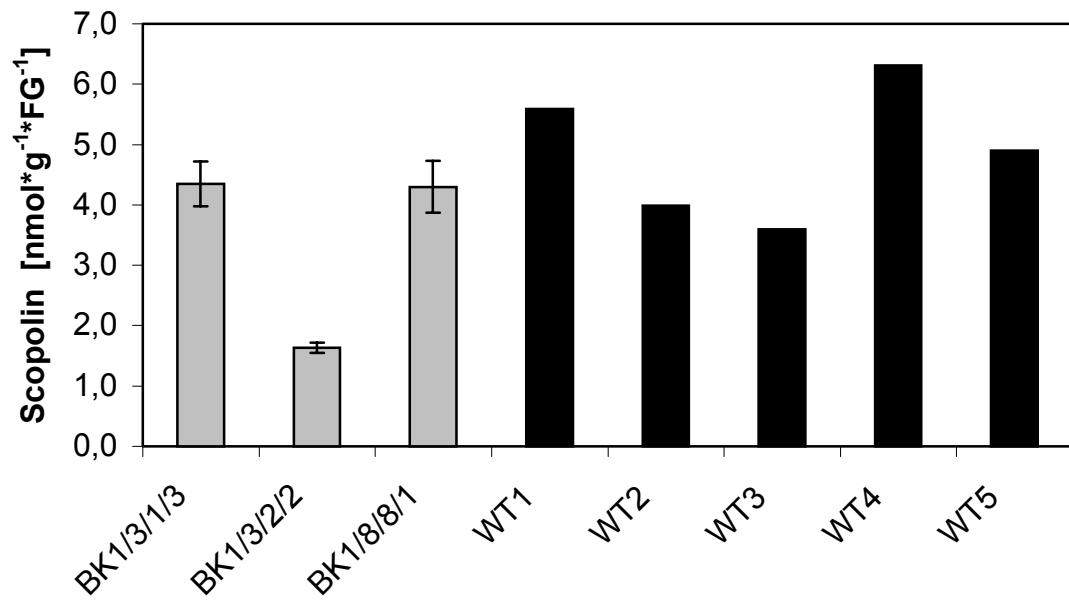


Abb. 40: Scopulingehalt in Blättern (5. Blatt von oben) ausgewählter Sense-Pflanzen (BK, n=6) der F3-Generation gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

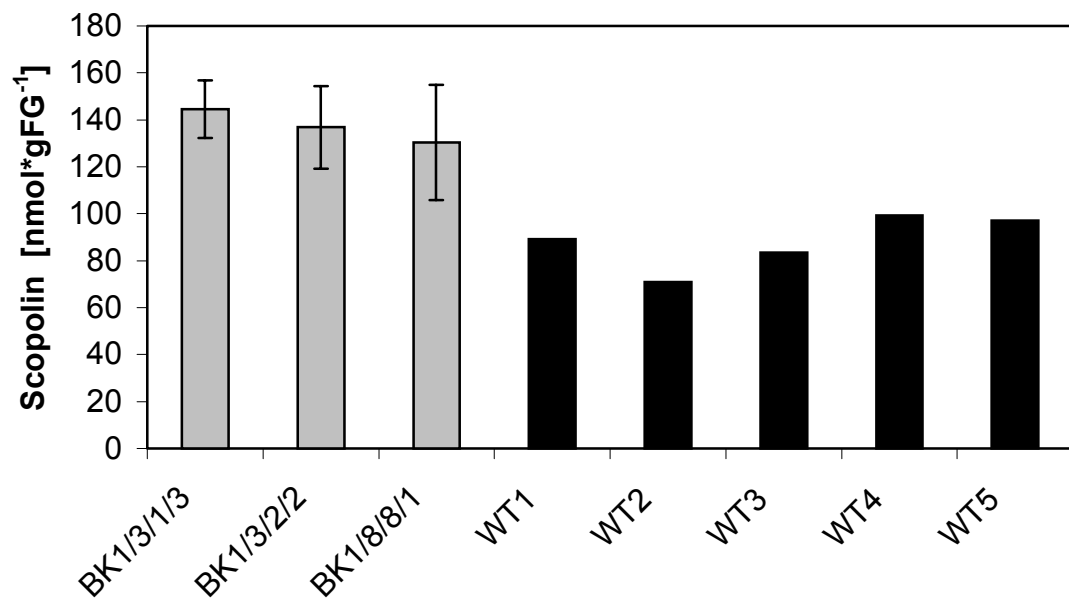


Abb. 41: Scopulingehalt in Wurzeln ausgewählter Sense-Pflanzen (BK, n=6) der F3-Generation gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN)

Infiltration von Blattscheiben mit Scopoletin

Die Untersuchung der SGT-Sense-Linien hatte gezeigt, dass in den Blättern der transgenen Pflanzen nicht mehr Scopolin akkumuliert als im Wildtyp, obwohl die SGT-Aktivität in den Sense-Pflanzen deutlich erhöht war gegenüber dem Wildtyp. Um zu prüfen, ob die Bildung von Scopolin in den Blättern der transgenen Sense-Linien durch die Menge an Substrat limitiert wird, wurden Blattscheiben dieser Linien mit Scopoletin infiltriert (s. 2.9.). Bereits eine Stunde nach Infiltration konnten für zwei der Sense-Linien höhere Gehalte an Scopolin gegenüber dem Wildtyp gemessen werden, und nach 3h Inkubation war die Scopolinbildung stärker in allen verwendeten Sense-Linien (Abb. 42). Dabei war die Bildung von Scopolin direkt abhängig von der zugegebenen Scopoletinkonzentration, wie die integrierte Abbildung zeigt (Abb. 42).

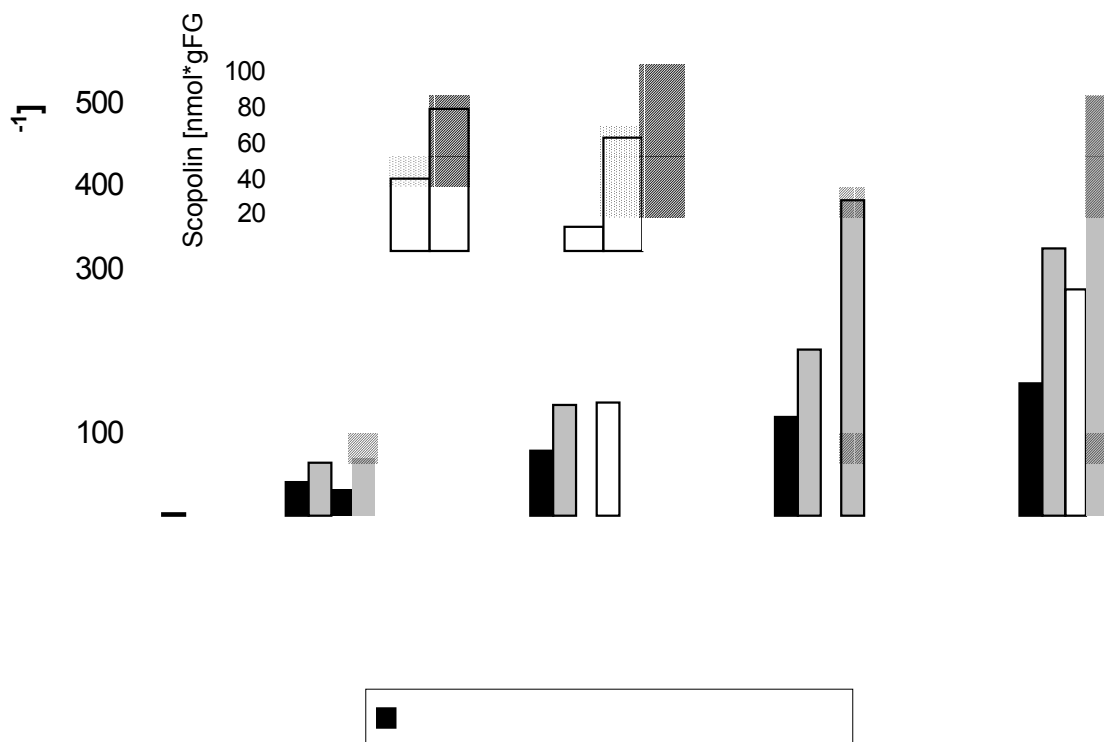


Abb. 42: Scopolingehalt in Blattscheiben von SGT-Sense-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) nach Infiltration mit 75µM Scopoletin, die Balken entsprechen den Werten eines Pools von je vier Blattscheiben entnommen von vier Einzelpflanzen; die integrierte Grafik zeigt den Scopolingehalt in Blattscheiben für den Wildtyp und eine ausgewählte Sense-Linie (1/3/1/3) nach 1h Infiltration mit Scopoletin in Abhängigkeit von der Scopoletinkonzentration

3.5.4. Funktionelle Untersuchungen transgener Linien um den Beitrag von Coumarinen zur Pathogenabwehr zu prüfen

In Anzuchten von Tabakpflanzen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen war der Gehalt der phenolischen Hauptkomponenten (Chlorogensäure und Scopolin) gesteigert. Inokulationsexperimente mit dem potato virus Y (PVY) zeigten eine höhere Resistenz der unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen, die mit erhöhten Gehalten an phenolischen Verbindungen, darunter Scopolin, korrelierte. Die Kultivierung der transgenen Pflanzen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen sollte zeigen, ob die veränderte Aktivität der SGT unter Hoch-CO₂ zu einer modifizierten Bildung von Scopolin oder anderen Phenylpropanen führt und ob diese Veränderungen gegebenenfalls zur Resistenz gegen PVY beitragen.

Kultivierung der transgenen Tabakpflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration

In den unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen konnten jeweils erhöhte Gehalte an Phenylpropanen, insbesondere an Scopolin (Abb. 43) und Chlorogensäure (nicht gezeigt) gemessen werden. Dabei zeigten die transgenen Linien keine dem Wildtyp gegenüber stärker erhöhten Gehalte an phenolischen Verbindungen unter erhöhtem [CO₂] (Abb. 43).

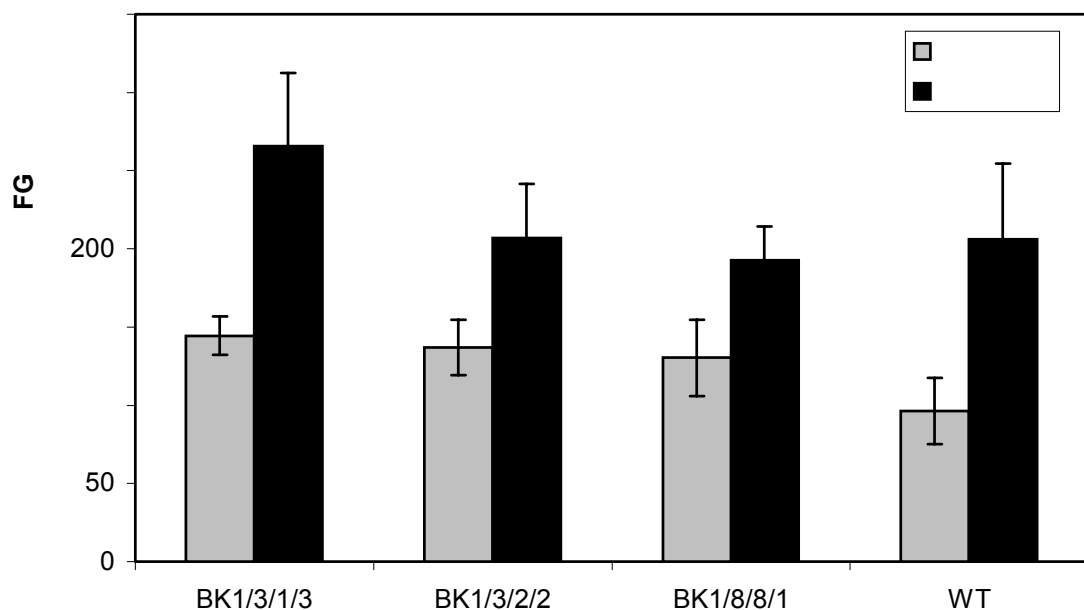


Abb. 43: Scopolingehalt in Wurzeln ausgewählter Sense-Pflanzen (BK) gegenüber dem Wildtyp (WT) unter ambienten (350ppm) und erhöhten (1000ppm) CO₂-Konzentrationen, Mittelwerte der Analysen von n=7 Pflanzen ± Standardfehler

Auch der Gesamtanteil an glucosidischen bzw. nicht-glucosidischen Phenylpropanen war unverändert in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp unter Hoch-CO₂. Erhöhte Gehalte an Scopolin wurden in den Sense-Linien gegenüber dem Wildtyp unter ambienten CO₂-Konzentrationen nur in den Wurzeln gemessen (s. dazu auch 3.5.3.).

Infiltrationsexperimente mit dem Kartoffelvirus Y (PVY)

Infiltrationsexperimente mit den transgenen Sense-Linien sollten zeigen, ob die vermehrte Bildung von Scopolin zur Resistenz gegen PVY (Kartoffelvirus Y) beiträgt. Dazu wurden Tabakpflanzen der drei Sense-Linien und des Wildtyps im Gewächshaus kultiviert und im Alter von 6 Wochen mechanisch mit PVY inokuliert. Zur Kontrolle wurden die Pflanzen mit KP₁-Puffer infiziert (s. 2.8.1.). 10 und 14 Tage nach Inokulation wurden die Pflanzen geerntet und der Gehalt an Virusprotein mittels monoklonaler Antikörper gegen PVY im ELISA-Test (s. 2.8.2.) bestimmt. Die Versuche zeigten verminderte Gehalte an PVY-Protein in den Blättern und damit eine erhöhte Resistenz gegen den Befall mit PVY für zwei der drei ausgewählten Sense-Linien (Abb. 44). Dieser Befund weist auf eine Korrelation zwischen der Kapazität zur Scopolinbildung und der Resistenz gegen PVY hin.

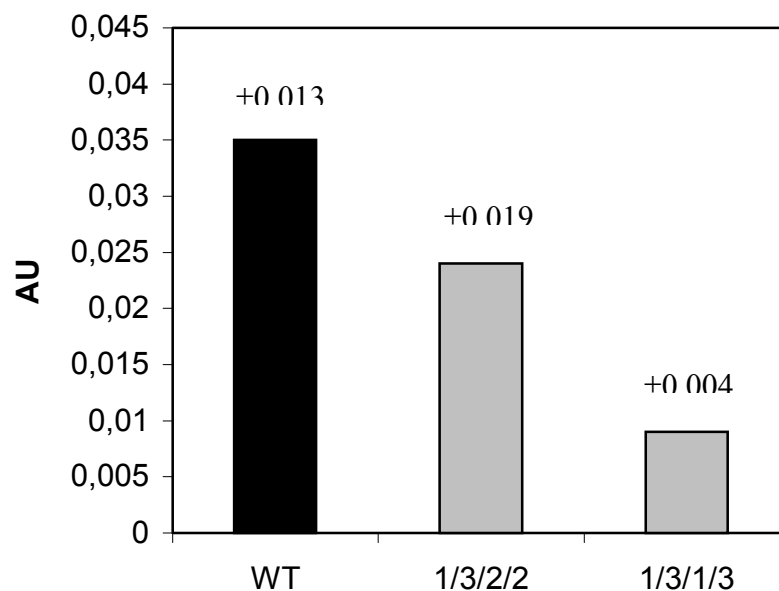


Abb. 43: Gehalt an PVY-Protein (in AU = Absorption Units) in infizierten Blättern ausgewählter Sense-Pflanzen (F3-Generation, (n=7)) gegenüber dem Wildtyp (WT, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, n=7) unter ambienten (350ppm) CO₂-Konzentrationen, 10 Tage nach PVY-Infektion

4. Diskussion

4.1. Veränderte Sekundärmetabolitprofile in Tabakpflanzen unter variiertes CO₂- und N-Versorgung

Das Wachstum unter erhöhtem [CO₂] führt zu gesteigerten C/N-Verhältnissen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von Tabakpflanzen unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration zu gesteigerten C/N-Verhältnissen in den Pflanzen führt. Die Erhöhung im C/N-Verhältnis war dramatisch in den Blättern, wogegen in den Wurzeln nur schwach erhöhte C/N-Verhältnisse ermittelt wurden. Von verschiedenen Autoren wurde die verstärkte Bildung kohlenstoffhaltiger nicht-struktureller Verbindungen, insbesondere die Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke im Blatt als Folge erhöhter Photosyntheseraten unter erhöhtem [CO₂] für Tabak beschrieben (Moore et al., 1997; Geiger et al., 1998; Ludewig et al., 1998; Stitt und Krapp, 1999). Dabei war der Anstieg im Gehalt an nichtstrukturellen Kohlenhydraten abhängig von der Pflanzenart und insbesondere von den gewählten N-Bedingungen (Stitt und Krapp, 1999).

Neben gesteigerten Gehalten an Kohlenstoff unter erhöhtem [CO₂] wurden in dieser Arbeit verminderte Gehalte an Stickstoff bei ausreichender Stickstoffversorgung (5mM NH₄NO₃) in Blatt und Wurzel gemessen. Die Verminderung im N-Gehalt bei Hoch-CO₂ war unter 8mM NH₄NO₃ nicht immer gegeben was darauf hindeutet, dass die gewählte N-Versorgung ausreichend war um einer N-Limitierung unter Hoch-CO₂ entgegenzuwirken. In Übereinstimmung mit der Literatur (Geiger et al., 1999) wurde in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der N-Gehalte von der für die Pflanze verfügbaren N-Konzentration und dem Blattalter beobachtet. Unter 8mM NH₄NO₃ wurden höhere Gehalte an Stickstoff unter ambienter und erhöhter CO₂-Konzentration in jungen Blättern und Wurzeln gegenüber den unter 5mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen gemessen (s. 3.1.1.). Das C/N-Verhältnis ist deshalb immer kleiner in den unter 8mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen gegenüber 5mM NH₄NO₃.

Für Tabak konnte die Akkumulation von Stärke, Saccharose und weiteren löslichen Zuckern unter Hoch-CO₂ in N-gesättigten Pflanzen gezeigt werden, in N-limitierten Pflanzen ist der Anstieg im Stärkegehalt unter Hoch-CO₂ zusätzlich erhöht, nicht jedoch für die löslichen Zucker (Geiger et al., 1999). Beschrieben wurden niedrigere Gehalte

an Stickstoff im Blatt unter Hoch-CO₂-Bedingungen in verschiedenen Pflanzenarten (Poorter et al., 1997; Gleadow et al., 1998), wobei die Veränderungen im N-Gehalt von der Verfügbarkeit an Stickstoff für die Pflanze abhängig waren. In der Literatur wird die Verminderung im N-Gehalt unter Hoch-CO₂ zum einen als „Verdünnungseffekt“ aufgrund stark erhöhter Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke diskutiert (Luo et al., 1994). Andere Autoren führen die verminderten Gehalte an Stickstoff unter erhöhtem atmosphärischem [CO₂] auf eine erhöhte Effizienz der Photosynthese zurück, da unter Hoch-CO₂ eine bestimmte Photosyntheserate auch bei geringeren Mengen an Rubisco, Calvin-Zyklus-Enzymen und Komponenten der Lichtreaktion erreicht wird bei verminderter Photorespiration und so weniger N für die Proteinsynthese benötigt wird (Stitt und Krapp, 1999).

Die beschriebenen verminderten Gehalte an Stickstoff und erhöhten Gehalte an Kohlenstoff in Pflanzen unter erhöhtem [CO₂] ließen die Vermutung zu, dass mit Erhöhung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze der Anteil an CBSC (*carbon based secondary compounds*) am Gesamtgehalt an kohlenstoffhaltigen Verbindungen steigt unter erhöhtem [CO₂]. Basis dieser Vermutung ist die von Bryant et al. 1983 formulierte „*carbon/nutrient balance*“-Hypothese, nach der der Gehalt an kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Metaboliten direkt von der Balance zwischen C- und N-Gehalt in der Pflanze abhängt.

Das Wachstum unter erhöhtem [CO₂] führt zu modifizierten Sekundärmetabolitprofilen

Für die unter Hoch-CO₂ gewachsenen Pflanzen konnten in dieser Arbeit verminderte Gehalte an Nikotin in Blättern und Wurzeln gegenüber ambienten CO₂-Konzentrationen gemessen werden. Der Gehalt an Nikotin war stärker vermindert unter erhöhtem [CO₂] in den unter 5mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen gegenüber 8mM NH₄NO₃. Ein relativ konstantes Verhältnis von Nikotin zum N-Gehalt in Tabakblättern wurde von Baldwin und Ohnmeiss (1994) beschrieben.

Außerdem konnten im Tabak Methanol-lösliche und Zellwand-gebundene phenolische Verbindungen mit erhöhten, verminderten, sowie unveränderten Gehalten nach Kultivierung unter erhöhten CO₂-Konzentrationen beobachtet werden (s. 3.1.2.). Zu den Methanol-löslichen Verbindungen, deren Gehalt am deutlichsten erhöht war gehören das Coumarin Scopolin und die 4'-und 5'-Isomere der Chlorogensäure (CGA), wobei die CGA mengenmäßig die Hauptkomponente der löslichen phenolischen

Verbindungen in der Tabakvarietät SamsunNN darstellt (Leffingwell, 1999). Ein Einfluss der Stickstoffkonzentration auf den Gehalt an löslichen phenolischen Metaboliten konnte insbesondere für eine Reihe bislang nicht identifizierter Verbindungen beobachtet werden. Einige der im Blatt detektierbaren Metabolite waren nur unter 5mM NH_4NO_3 zu beobachten, nicht aber in Pflanzen, welche unter 8mM NH_4NO_3 kultiviert wurden.

Eine weitere Klasse an kohlenstoffhaltigen sekundären Inhaltsstoffen sind die Sesquiterpenoide. Weder in den unter Hoch- CO_2 kultivierten Tabakpflanzen, noch nach PVY-Infektion konnte eine Akkumulation an Capsidiol oder anderen Sesquiterpenen gemessen werden (M. Heim, persönliche Mitteilung). Hinweise auf einen signifikanten Effekt erhöhter atmosphärischer CO_2 -Konzentrationen auf den Gehalt an Sesquiterpenen liegen in der Literatur nicht vor und auch die Induktion von Enzymen der Terpenoidbiosynthese unter Hoch- CO_2 konnte bisher nicht gezeigt werden (siehe Übersichtsartikel; Penuelas und Estiarte, 1998).

Die beobachtete Verschiebung der Metabolitprofile in Tabakpflanzen zugunsten von kohlenstoffhaltigen Phenylpropanen unter Hoch- CO_2 -Bedingungen korreliert mit der von Bryant et al. 1983 formulierten „*carbon/nutrient balance*“-Hypothese nach der höhere C/N-Verhältnisse positiv mit dem Gehalt an C-haltigen Metaboliten verbunden sind. Die „*growth/differentiation balance*“-Hypothese erweitert diese Aussage um den Faktor Wachstum, d.h. nur wenn die Verfügbarkeit der Ressourcen für das Wachstum der Pflanze limitiert ist oder den Bedarf übersteigt investiert eine Pflanze in die Produktion sekundärer Metabolite (Herms und Mattson, 1992). Danach führt das Wachstum von Pflanzen unter erhöhter CO_2 -Konzentration und bei nicht-limitierender N-Versorgung zu einer Verschiebung des Metabolitprofils zu Ungunsten stickstoffhaltiger Verbindungen (Landsberg und Stafford Smith, 1992). Im Gegensatz dazu beschrieben andere Autoren die erhöhte, verminderte oder unveränderte Bildung von N-haltigen Glucosinolaten unter Hoch- CO_2 in Abhängigkeit von der untersuchten Pflanzenart, unabhängig vom C/N-Verhältnis im Blatt (Karowe et al., 1997). Die erhöhte Allokation von N in die Bildung von Prunasin in *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell unter Hoch- CO_2 , bei verminderten N-Gehalten im Blatt wurde ebenso gezeigt (Gleadow et al., 1998). Konsistent mit den oben beschriebenen Hypothesen zeigten die von Karowe et al. (1997) und Gleadow et al. (1998) untersuchten Pflanzenarten unter Hoch- CO_2 gegenüber ambienten Bedingungen nur gering erhöhte Wachstumsraten bei

stark erhöhten C/N-Verhältnissen. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden in den von Ruffy et al. (1989) durchgeführten Feld-Versuchen verminderte Gehalte an Alkaloiden unter Hoch-CO₂-Bedingungen gegenüber ambienten CO₂-Konzentrationen in Tabak gemessen, wobei der N-Gehalt im Blatt in diesem System keine Beachtung fand.

Die Tendenz zu höheren Gehalten an phenolischen Inhaltsstoffen mit zunehmender CO₂-Konzentration wurde für verschiedene Pflanzenarten beschrieben (Poorter et al., 1997; Penuelas et al., 1997; Estiarte et al., 1999). Dabei ist jedoch nicht klar erkennbar ob die Veränderungen im Sekundärmetabolitgehalt direkte Effekte der erhöhten CO₂-Bedingungen sind oder einfach auf der möglichen Limitierung für N unter Hoch-CO₂ beruhen.

In Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, welche die C/N-Balance beeinflussen wird die Regulation der Sekundärmetabolitbiosynthese mit Hilfe von zwei Modellsystemen erklärt (Herms und Mattson, 1992; Lambers, 1993; Karban und Baldwin, 1997). Die „*carbon supply*“-Hypothese geht davon aus, dass die Biosynthese sekundärer Inhaltsstoffe durch überschüssige Sucrose bei verminderter Proteinsynthese induziert wird. In Nährstoff-limitierten Pflanzen wird so mutmaßlich ein „*energy overflow*“ verhindert. In transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. SamsunNN) welche Hefe-Invertase konstitutiv im Apoplasten (cwInv) oder der Vakuole (vacInv) exprimieren, konnten Herbers et al. (1996) die Zucker-vermittelte Induktion des Phenylpropanoidmetabolismus nachweisen. Insbesondere wurde die Induktion der Biosynthese von Kaffeesäurekonjugaten und Scopolin durch lösliche Zucker in den oben genannten transgenen Tabakpflanzen (cwInv) kürzlich gezeigt (Baumert et al., 2000). Die beobachtete starke Akkumulation löslicher Zucker in *N. tabacum* cv. SamsunNN unter Hoch-CO₂ (Moore et al., 1997; Geiger et al., 1998) bestärkt die Hypothese, dass die Akkumulation der Phenylpropane unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration auf höheren Gehalten an Saccharose beruht.

In Pflanzen führen gesteigerte Wachstumsraten unter erhöhtem [CO₂] aufgrund erhöhter Photosyntheseraten oft sehr schnell zur N-Limitierung (Zusammengefasst in Stitt und Krapp, 1999). Bei niedrigem N-Angebot ist die Rate der Proteinsynthese begrenzt und nur ein Teil der gebildeten Aminosäuren wird zur Biosynthese von Proteinen verwendet. Nach der „*amino acid diversion*“-Hypothese begünstigt der so entstandene Überschuss an Tyrosin und Phenylalanin die Phenylpropanoidbiosynthese, und stellt

damit ebenfalls eine Art „*overflow*“-Metabolismus dar (Lambers, 1983). Die Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese unter Mangel an Stickstoff und anderen Nährstoffen ist aus der Literatur bekannt (Margna et al., 1989; Sanchez et al., 2000). Im Tabak (*Nicotiana tabacum* cv One-Sucker) wurden signifikant erhöhte Gehalte an Chlorogensäure und Scopolin in Stickstoff-limitierten Pflanzen beobachtet (Armstrong et al., 1970). Ein signifikanter Einfluss der verwendeten N-Konzentrationen (5mM NH_4NO_3 und 8mM NH_4NO_3) auf den Gehalt der Hauptkomponenten CGA und Scopolin konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden, dabei war der Gehalt an Gesamt-Stickstoff in den unter 5mM NH_4NO_3 kultivierten Pflanzen jeweils niedriger gegenüber den unter 8mM NH_4NO_3 angezogenen Pflanzen (s. oben). Dies deutet darauf hin, dass die Tabakpflanzen unter der gewählten N-Versorgung nicht N-limitiert sind, und die beobachteten Effekte für die phenolischen Hautkomponenten (CGA und Scopolin) tatsächlich auf den erhöhten atmosphärischen CO_2 -Konzentrationen beruhen. Indirekte Effekte der gesteigerten CO_2 -Konzentration auf den pflanzlichen Metabolismus können aber auch in unserem experimentellen Ansatz nicht völlig ausgeschlossen werden, insbesondere wenn der Einfluss der erhöhten CO_2 -Konzentration auf das Wachstum stärker ist als auf die N-Aufnahme und Stickstoff damit für das Wachstum limitiert ist.

Von besonderer Bedeutung für das Wachstum und die Stabilität von Pflanzen ist das phenolische Polymer Lignin. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikant erhöhten Gehalte an Lignin in den Pflanzen unter Hoch- CO_2 gemessen werden. Die Ligninbiosynthese ist mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden (Lewis und Yamamoto, 1990), weshalb Pflanzen kurzfristig wahrscheinlich eher in kostengünstigere Biosynthesen investieren. Auch in anderen Arbeiten wurde keine Zunahme im Gehalt für Lignin und Struktur-Polysaccharide in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies unter Hoch- CO_2 beobachtet (Penuelas und Estiarte, 1998). In dieser Arbeit zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten Gehalten an Lignin unter erhöhtem $[\text{CO}_2]$ bei geringerer Stickstoffzufuhr (5mM NH_4NO_3), wobei der Anstieg im Ligningehalt höher war in den Wurzeln gegenüber Blättern. Dieser Befund steht im Einklang zu der Erhöhung im Gehalt einiger bislang nicht identifizierter phenolischer Verbindungen unter 5mM NH_4NO_3 gegenüber 8mM NH_4NO_3 und spricht für eine erhöhte Allokation von Kohlenstoff in die Biosynthese von Phenylpropanoiden unter vermindertem N-

Angebot (Sanchez et al., 2000). Dies bestätigten auch die Messungen der Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, s. unten).

Bei Wachstum unter erhöhtem [CO₂] wird die PAL induziert

Als Eingangsenzym in den Phenylpropanstoffwechsel katalysiert die PAL die Deaminierung von L-Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure und verbindet somit den Primär- und den Sekundärmetabolismus in der Pflanze (Hahlbrock und Scheel, 1989). Ein signifikanter Anstieg der PAL-Aktivität war in den unter erhöhtem [CO₂] kultivierten Pflanzen zu beobachten (s. 3.1.2.). Der Anstieg war am höchsten in alten Blättern (lokal) gegenüber jungen Blättern und Wurzeln, und war deutlich höher unter 5mM NH₄NO₃ gegenüber 8mM NH₄NO₃. Die N-induzierte Inhibition der PAL-Aktivität ist aus der Literatur bekannt (Margna et al., 1989) und steht im Einklang mit den oben beschriebenen Modellen zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Weiterhin bekannt ist die Induktion der Expression von PAL-Transkripten durch abiotischen Stress (UV-Licht), Verwundung, Herbivorie und Pathogenbefall (Hahlbrock und Scheel, 1989). Als eine mögliche metabolische Ursache der gesteigerten PAL-Aktivität unter erhöhtem [CO₂] kann wahrscheinlich die Akkumulation löslicher Zucker bei Wachstum unter Hoch-CO₂ diskutiert werden (Abb. 45), da in transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. SamsunNN) mit konstitutiv exprimierter Hefe-Invertase (s. oben), die Akkumulation von PAL-mRNA beschrieben wurde (Herbers et al., 1996).

4.2. Veränderte Pathogenabwehr in Tabakpflanzen unter variiertem CO₂- und N-Versorgung

Das Wachstum unter erhöhtem [CO₂] führt zur verminderten Ausbreitung des Kartoffelvirus Y (PVY) in Tabakblättern

Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung von Pflanzen bei Wachstum unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration sind insbesondere für die Interaktion mit Pathogenen von Bedeutung. So können gesteigerte Gehalte an löslichen Zuckern und verminderte Gehalte an Proteinen und Mineralien unter Hoch-CO₂ zu erhöhten Fraßraten von Herbivoren führen (Landsberg und Smith, 1992; Lambers, 1993). Auf der anderen Seite kann die gesteigerte Akkumulation C-haltiger Sekundärmetabolite die

Fitness der Pflanze im Bezug auf den Befall mit pilzlichen und bakteriellen Pathogenen erhöhen (Poorter et al., 1997; Penuelas und Estiarte, 1998). Das Wachstum von Tabakpflanzen unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration und ausreichendem Stickstoffangebot führte zu einer deutlichen Verschiebung im Metabolismus zugunsten der Phenylpropanoidbiosynthese (s. 4.1.). Besondere Bedeutung haben Phenylpropane in der Pathogenabwehr und Stresstoleranz von Pflanzen (Legrand, 1983; Nickolson und Hammerschmidt, 1992; Dixon und Paiva, 1995), weshalb Änderungen im Gehalt an Phenylpropanen Modifizierungen in der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen erwarten lassen (Maher et al., 1994; Penuelas und Estiarte, 1998). Um diese Hypothese zu prüfen wurden in der vorliegenden Arbeit Tabakpflanzen unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen kultiviert und mit dem Kartoffelvirus Y (PVY) infiziert. In den Blättern infizierter Pflanzen konnte unter Hoch-CO₂ weniger PVY-Protein gegenüber den Kontrollen gemessen werden (s. 3.1.3.). Dabei war der Gehalt an PVY-Protein in den lokalen (infizierten) Blättern nur leicht vermindert aber die systemische Ausbreitung des Virus war deutlich eingeschränkt (signifikant verminderte Gehalte an PVY-Protein in den systemischen Blättern). Dies gilt für die unter 5mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen ebenso wie für die unter 8mM NH₄NO₃ gewachsenen Pflanzen. Vermutlich steht die verminderte Ausbreitung des Virus (PVY) in Tabakpflanzen unter Hoch-CO₂ im Zusammenhang mit der konstitutiv stark erhöhten Aktivität der PAL (Abb. 45). Einen Beitrag leisten dabei die in der Folge gesteigerten Gehalte an Zellwand-gebundenen und Methanol-löslichen Phenylpropanen. Insbesondere von Bedeutung sind wahrscheinlich die erhöhten Gehalte an CGA und Scopolin unter erhöhtem atmosphärischem [CO₂] (s. 4.1.), wobei aus Scopolin in der Interaktion mit dem Pathogen durch Einwirken einer spezifischen, bisher nicht beschriebenen β -Glucosidase mutmaßlich das antimikrobiell wirksame Scopoletin freigesetzt wird. Als Vorstufe für die Synthese Pathogen- oder Wund-induzierter Barrieren (Halbrock und Scheel, 1989) und durch ihre antimikrobielle Wirkung (Scholz et al., 1993) ist die CGA vermutlich von Bedeutung für die Abwehr des Pathogens. Die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase wird in der Literatur als eine wichtige Voraussetzung der lokalen und systemischen pflanzlichen Pathogenabwehr diskutiert (Ryals et al., 1996; Dorey et al., 1997), wobei die besondere Bedeutung in der Bereitstellung von Vorstufen zur Biosynthese des Signalmoleküls Salizylsäure (SA) liegt. So ist in Arabidopsispflanzen, in denen die PAL durch einen Inhibitor blockiert ist, die Induktion

der systemischen Abwehrmechanismen (SAR) vollständig unterbunden (Mauch-Mani und Slusarenko, 1996). In den unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen konnten in der vorliegenden Arbeit signifikant höhere Gehalte an freier und glucosidisch gebundener Salizylsäure gegenüber ambienten Bedingungen beobachtet werden (s. 3.1.2.). Für die Ausbildung der SAR (*systemic acquired resistance*) ist die Bildung von SA essentiell (Gaffney et al., 1993; Ryals et al., 1996), wobei bis heute unklar ist, ob die Salizylsäure das tatsächlich transportierte Signalmolekül ist welches die Ausbildung der SAR vermittelt (Ryals et al., 1996; Durner et al., 1997; Hammerschmidt und Becker, 1999). In Tabakblättern führte die Infektion mit Pathogenen zu einem Anstieg der endogenen Gehalte an Salizylsäure (Enyedi et al., 1992) und zur Induktion von PR-Proteinen (Malamy et al., 1990, Yalpani et al., 1993). Die exogene Applikation von Salizylsäure bewirkte die Akkumulation von PR-Proteinen und die Ausbildung der SAR in Gurken und Tabak (Métraux et al., 1990; Ward et al., 1991), insbesondere wurde im Tabak die Resistenz gegen den Befall mit TMV induziert (Ward et al., 1991). In der inkompatiblen Interaktion der Tabakvarietät Xanthi NN mit TMV akkumulierte Salizylsäure in den Blättern 20mal stärker gegenüber den Blättern der gegen TMV-Befall suszeptiblen Varietät Xanthi nn (Malamy et al., 1990). Neben der generellen Bedeutung für die Pathogenabwehr wurde kürzlich die Gewebe-spezifische Wirkung der Salizylsäure gegen den Befall mit TMV beschrieben (Murphy und Carr, 2002). Dabei war in mit Salizylsäure (1mM) gewässerten Tabakpflanzen die Replikation von TMV in Mesophyllzellen inhibiert, in epidermalen Zellen dagegen nicht. Andererseits war die Ausbreitung von TMV in epidermalen Zellen unterdrückt, in Mesophyllzellen dagegen nicht. Diese Befunde machten deutlich, dass die Salizylsäure auch in der lokalen Pathogenabwehr eine wichtige Rolle spielt. Erhöhte Gehalte an freier und konjugierter Salizylsäure in den unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen gingen in den hier gezeigten Versuchen nicht mit der konstitutiven Expression systemischer Abwehrmechanismen einher. Die Induktion von PR-Proteinen als molekulare Marker der SAR (*systemic acquired resistance*) konnte im Tabak unter erhöhtem [CO₂] nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Es bleibt zu prüfen, ob die konstitutiv erhöhten Salizylsäuregehalte im Tabak unter Hoch-CO₂ nach Infektion mit PVY zu einer beschleunigten Aktivierung systemischer Abwehrmechanismen führen, welche die Ausbreitung des Pathogens einschränken (Abb. 45). Zu beachten ist dabei, dass die Ausbreitung von PVY in den unter Hoch-CO₂ kultivierten Pflanzen auch lokal

eingeschränkt war. Hilfreich könnten dabei NahG-Linien sein, welche durch die ektopische Expression einer bakteriellen Salizylat-Hydroxylase verminderte Gehalte an Salizylsäure aufweisen, wodurch die Ausbildung der SAR beeinträchtigt ist (Gaffney et al., 1993). Einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkung erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Pathogenabwehr im Tabak könnten auch zukünftige Versuche mit transgenen Pflanzen mit verminderter Expression von PAL-Transkripten leisten.

Nach Befall mit PVY akkumulieren phenolische Verbindungen in den Tabakpflanzen unter ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen abhängig von der N-Verfügbarkeit

Begleitet war die Infektion der Pflanzen jeweils durch eine Erhöhung der Gehalte an löslichen phenolischen Verbindungen unter ambienten CO₂-Bedingungen (s. 3.1.3.). Einige dieser Verbindungen waren bei Kultivierung unter 8mM NH₄NO₃ nur nach Infektion mit dem Kartoffelvirus Y detektierbar (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass nach PVY-Inokulation eine Stimulation der Phenylpropan-Biosynthese stattfindet. Dies steht in Einklang zu Inokulationsexperimenten mit TMV (Fritig und Hirth, 1971; Tanguy und Martin, 1972). Insbesondere wurde in den hier vorgestellten Versuchen die Akkumulation von Scopolin und Scopoletin nach PVY-Befall unter ambienten CO₂-Bedingungen beobachtet. Bekannt ist die Akkumulation von Scopoletin nach Pathogenbefall in verschiedenen Pflanzenarten. (Olson und Roseland, 1991; Ahl Goy et al., 1993; El Modafar et al., 1995; Dorey et al., 1997; Valle et al., 1997; Breton et al., 1997; Churngchow und Rattarasarn, 2001). Die Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese nach Befall mit PVY konnte auch unter Hoch-CO₂ gezeigt werden, wobei insbesondere die weitere Akkumulation der Coumarine Scopolin und Scopoletin nach PVY-Infektion unter erhöhten CO₂-Konzentrationen weniger stimuliert wurde als in den Kontrollpflanzen. Dieser Befund korreliert mit der verminderten Ausbreitung des Virus unter erhöhtem [CO₂] (s. oben). Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass die Akkumulation von Scopoletin bzw. Scopolin vor allem in Zellen erfolgt, die um die Infektionsstelle herum liegen (Dorey et al., 1997). Nach Infektion mit PVY war unter ambienten CO₂-Bedingungen auch für einige der Zellwandgebundenen phenolischen Komponenten ein starker Anstieg im Gehalt zu beobachten (s. 3.1.2.), der bei Pflanzen unter Hoch-CO₂ deutlicher ausfiel. Möglicherweise üben diese Verbindungen eine Funktion in der Pathogenabwehr aus (Abb. 45). Gezeigt werden konnte die Akkumulation von mit der Zellwand veresterten Syringaldehyden

und Kaffeesäuren in der Hypersensitivitätsreaktion von *Lactuca sativa* nach Befall mit *Bremia lactucae* (Bennet et al., 1996).

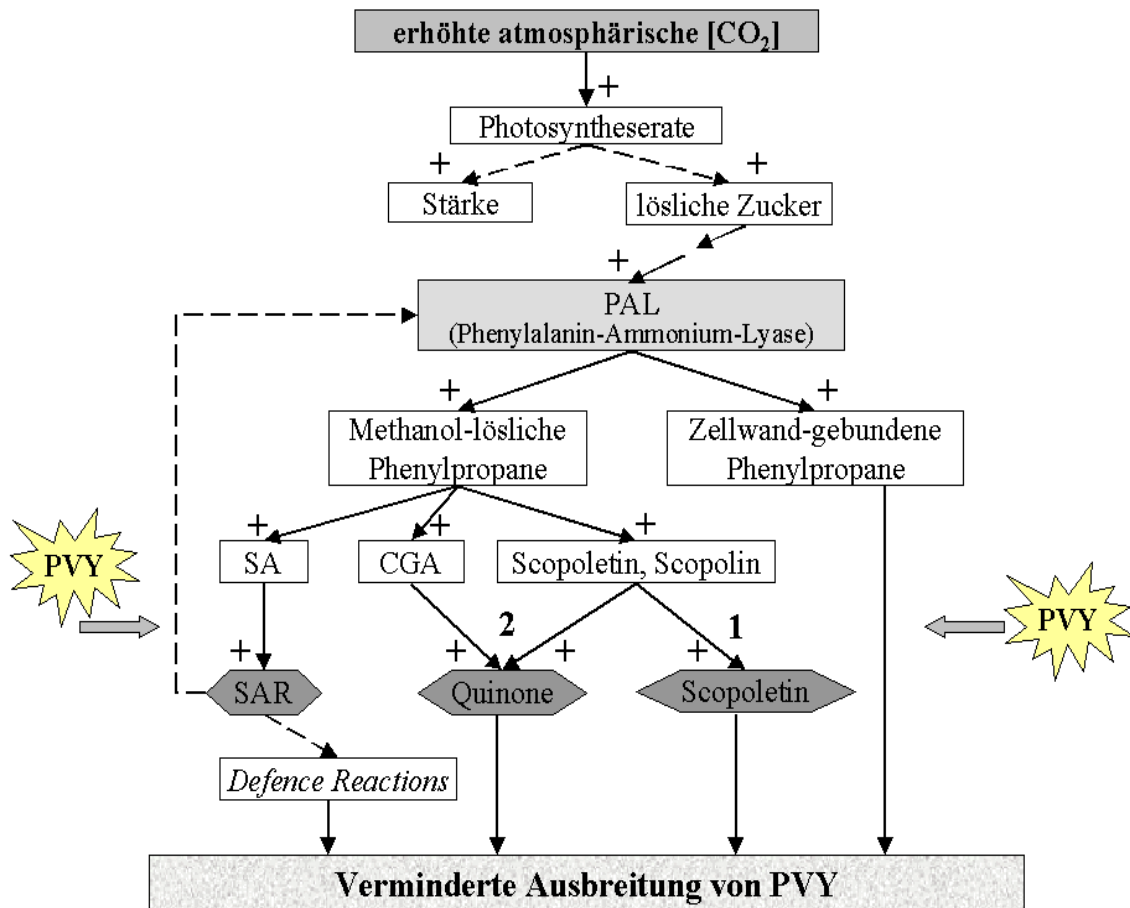


Abb. 45: Modell zur Wirkung erhöhter atmosphärischer CO_2 -Konzentrationen auf die Abwehr viraler Pathogene (PVY, *potato virus Y*) im Tabak

Das Wachstum von Tabakpflanzen unter erhöhtem $[\text{CO}_2]$ führt zur Akkumulation von Stärke und löslichen Zuckern infolge gesteigerter Photosyntheseraten. Durch die hohen Gehalte an löslichen Zuckern wird vermutlich die Bildung der PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) induziert, wodurch die Biosynthese der Phenylpropane (Methanol-lösliche, wie auch Zellwand-gebundene Phenole) gesteigert wird. Auf den Befall mit einem Pathogen kann die Pflanze nun durch die erhöhten Gehalte an präformierten Abwehrstoffen schneller reagieren. Dabei tragen die mit der Zellwand veresterten Phenylpropane ebenso zur Abwehr bei wie die gesteigerten Gehalte an Chlorogensäure (CGA), Scopolin und Scopoletin. Durch Einwirken einer bislang nicht nachgewiesenen β -Glucosidase (1) wird nach Pathogenbefall mutmaßlich das antimikrobiell wirksame Scopoletin freigesetzt. Außerdem wird die Wirkung von Scopoletin und CGA wahrscheinlich durch die Bildung toxischer Quinone infolge induzierter Polyphenoloxidase (PPO)-Aktivitäten (2) nach Pathogenbefall verstärkt. Die Wirkung konstitutiv erhöhter Gehalte an Salizylsäure (SA) unter Hoch- CO_2 beruht wahrscheinlich auf der beschleunigten Induktion systemischer Abwehrreaktionen (SAR) nach Befall mit PVY.

Nach Infektion mit PVY ist die Aktivität der PAL erhöht

Die allgemeine Stimulation des Phenylpropanstoffwechsels (s. oben) nach Infektion mit PVY konnte in der vorliegenden Arbeit durch Messungen der PAL-Aktivität bestätigt werden (s. 3.1.2.). Erhöhte PAL-Aktivitäten wurden in den mit PVY infizierten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen gemessen, dabei war die Erhöhung stärker in den unter 5mM NH₄NO₃ kultivierten Pflanzen gegenüber 8mM NH₄NO₃. Wie die Kontrollpflanzen zeigten auch die infizierten Pflanzen höhere PAL-Aktivitäten bei Wachstum unter erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen gegenüber ambienten Bedingungen. Die Bedeutung der PAL als Schlüsselenzym der Biosynthese von Phenylpropanen mit Bedeutung für die Pathogenabwehr wurde bereits diskutiert (s. 4.1.). So zeigen Tabakpflanzen mit verminderter PAL-Aktivität eine gesteigerte Anfälligkeit gegen den Befall mit Pilzen (Maher et al., 1994). Zurückgeführt wird dies zum Einen auf die verminderten Gehalte an Chlorogensäure und zum Anderen auf die reduzierte Bildung von Salizylsäure und die dadurch verminderte Kapazität zur schnellen Induktion systemischer Abwehrmechanismen in den betroffenen Pflanzen (Pallas et al., 1996). Für den Befall mit Herbivoren zeigten Felton et al. (1999) einen umgekehrten Effekt. In transgene Tabakpflanzen mit verminderter PAL-Aktivität war die Ausbildung der SAR gesteigert nach Befall mit *Heliothis virescens* Larven, wogegen die Ausbildung der SAR vermindert war nach TMV-Infektion. In transgenen Tabakpflanzen mit gesteigerter PAL-Aktivität war die Ausbildung der SAR nach Herbivorie vermindert, jedoch nach TMV-Befall erhöht. Diese Versuche machten deutlich, dass zwischen mikrobiell-induzierten und Herbivorie-induzierten systemischen Resistenzmechanismen ein „cross-talk“ besteht, welcher zwischen Salizylsäure-vermittelter und Jasmonsäure-vermittelter SAR kanalisiert. Danach könnte in Pflanzen unter erhöhtem [CO₂], bei erhöhter PAL-Aktivität die Resistenz gegen den Befall mit Herbivoren vermindert sein. Beispiele dafür sind aus der Literatur jedoch nicht bekannt.

Modifizierte Reaktion der Tabakpflanzen auf den Befall mit PVY unter erhöhtem [CO₂]

Nach Inokulation mit PVY konnte in der vorliegenden Arbeit die Bildung nekrotischer Läsionen beobachtet werden. Ähnliche Symptome wurden für Tabak nach Befall mit TMV beschrieben (Tanguy und Martin, 1972). Die Untersuchung nicht-nekrotischer und nekrotischer Blattbereiche zeigte, dass große Mengen an Scopolin im Tabak nahe der Infektionsstelle bzw. im Bereich der Läsionen akkumulieren. Dies gilt sowohl für

den Befall mit TMV (Tanguy und Martin, 1972) als auch für die Infektion mit PVY (Baumert et al., 2001). Neben der Bildung von Läsionen zeigten die infizierten Pflanzen unter erhöhtem atmosphärischem [CO₂] zusätzlich eine starke Bräunung der Lamina und der Blattansätze gegenüber ambienten Bedingungen. Wahrscheinlich sind diese Veränderungen auf die konstitutiv sehr stark erhöhten Gehalte an CGA und Scopolin unter Hoch-CO₂ zurückzuführen (s. 4.1.). Die antioxidative Wirkung der CGA (Rice-Evans et al., 1997) und die hohe Aktivität von Peroxidasen mit Scopoletin, dem Aglycon des Scopolin (Ahl Goy et al., 1993; Breton et al., 1997), sind bekannt. Tanguy und Martin (1972) zeigten die Induktion der *o*-Polyphenoloxidase-Aktivität (PPO) nach TMV-Befall in Tabak. In Kontrollpflanzen erfolgt die Bildung der gegen Pathogene wirksamen Phenylpropane sehr schnell, vor allem aber lokal in der Nähe der Infektionsstelle. Die Oxidation der Phenylpropane verstärkt in diesem Fall die lokale Wirkung der Metabolite, durch die Bildung toxischer Quinone und deren polymerisierter Produkte und führt zu einer mehr oder weniger starken Braunfärbung. Unter Hoch-CO₂-Bedingungen dagegen wurden die Phenylpropane (insbesondere CGA und Scopolin) in allen Pflanzenteilen vermehrt gebildet (s. 4.1.), wodurch nach Pathogenbefall eine verstärkte Braunfärbung auch in den systemischen Pflanzenteilen sichtbar wurde.

4.3. Reinigung und Klonierung einer UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT)-Aktivität

Vorkommen der SGT-Aktivität im Tabak

In Anzuchten unter erhöhten CO₂-Konzentrationen zeigten Tabakpflanzen eine höhere Resistenz gegen den Befall mit PVY, die mit dem erhöhten Gehalt phenolischer Verbindungen, darunter Scopolin korreliert (s. oben). Die antimikrobielle Wirkung von Scopolin konnte *in vitro* bisher nicht nachgewiesen werden, ist aber vielfach beschrieben für sein Aglycon Scopoletin (Fischer et al., 1976; Mikulska-Macheta, 1976; Valle et al., 1993; Ahl Goy et al., 1993; Garcia et al., 1995; Breton et al., 1997; Churngchow und Rattarasarn, 2001). Katalysiert wird die Glucosylierung von Scopoletin durch die UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase (SGT). In der hier verwendeten Tabakvarietät (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) war die SGT-Aktivität

in allen Pflanzenteilen messbar. Dabei fanden sich hohe SGT-Aktivitäten in den Wurzeln und in einer Zellsuspensionskultur (Zellsuspensionskultur einer Wurzelkalluskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Havana). Eine Steigerung der SGT-Aktivität in der Zellkultur wurde nur nach Infiltration mit Methyljasmonat beobachtet, andere getestete Effektoren wie Cellulase, Chitosan oder Salizylsäure hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Taguchi et al. (2001), wonach die Infiltration von Tabak Zellkulturen (*Nicotiana tabacum* L. Bight Yellow, T13) mit Salizylsäure zur Akkumulation von Scopolin führt. Eine Erklärung für diese abweichenden Befunde könnte die Verwendung unterschiedlicher Zellkultursysteme sein. Die Induktion der Scopolinbildung im Tabak nach Infiltration mit Methyljasmonat wurde mehrfach berichtet (Sharan et al., 1998; Taguchi et al., 2001). Taguchi et al. zeigten, dass durch Methyljasmonat die Aktivität der PAL induziert wird, wodurch neben der allgemeinen Induktion des Phenylpropanstoffwechsels auch die Bildung der Coumarine Scopoletin und Scopolin gesteigert wird. Die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung der SGT-Aktivität in der Zellkultur nach Infiltration mit Methyljasmonat ist daher wahrscheinlich in Verbindung mit erhöhten Substratkonzentrationen (Scopoletin) zu sehen.

Reinigung einer SGT-Aktivität

Aus der Zellsuspensionskultur einer Wurzelkalluskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Havana konnte in der vorliegenden Arbeit durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie über DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, Hydroxyapatit, Superdex75 und Reactive Yellow 3 eine Proteinbande ausreichend für die Sequenzierung der SGT-Aktivität gewonnen werden (s. 3.2.3.). Der entscheidende Schritt für die Aufreinigung des Enzyms war die Chromatographie über Reactive Yellow 3 und die spezifische Elution der SGT-Aktivität mit UDP-Glucose. Mit diesem Material konnte auch bei der Reinigung anderer Glucosyltransferasen gute Erfolge erzielt werden (Vogt et al., 1999). Erschwert wurde die Aufarbeitung durch einen raschen Verlust der Enzymaktivität. Schwierigkeiten bei der Aufreinigung von Glucosyltransferasen sind für verschiedene Pflanzenarten beschrieben (Zusammenfassung in Vogt und Jones, 2000) und nur in wenigen Fällen war eine homogene Aufreinigung dieser Enzyme mit chromatographischen Trenntechniken möglich (Hrazdina, 1988; Szerszen et al., 1994; Keil und Schreier, 1989; Warnecke und Heinz, 1994; Shibata et al. 1995; Lee und

Raskin, 1999). Für die denaturierte SGT wurde mittels SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 49kDa abgeschätzt, was dem für das native Protein per Gelfiltration kalkulierten Molekulargewicht von 53kDa sehr nahe kommt. Das Molekulargewicht bereits bekannter Glucosyltransferasen liegt zwischen 45kDa und 60kDa (Vogt und Jones, 2000).

Klonierung einer Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase und Expression in E. coli

Das Molekulargewicht einer aus Tabak identifizierten Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a), die neben Glucosyltransferase-Aktivität für Salizylsäure auch hohe Aktivität mit Hydroxycoumarinen (Scopoletin, Esculetin) zeigt (Fraissinet-Tachet et al., 1998), beträgt 53614 Da. Aufgrund der möglichen Ähnlichkeit der aus Tabak isolierten Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase mit der zu reinigenden Glucosyltransferase wurde parallel zu den proteinchemischen Arbeiten diese Salizylsäure-induzierbare Glucosyltransferase kloniert (s. 3.3.1.). Der isolierte cDNA-Klon wurde anschließend für die Gewinnung rekombinanten Proteins aus *E. coli* eingesetzt. Das rekombinant gewonnenen Protein wurde über Ni-NTA Agarose und Gelfiltration gereinigt und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. In allen Fraktionen der präparativen SGT-Reinigung reagierte der so gewonnene polyklonale Antikörper spezifisch mit nur einer Proteinbande. Auch dies deutete auf eine starke Ähnlichkeit der rekombinanten Glucosyltransferase mit der gereinigten SGT hin. Der Vergleich der Peptidmassen beider Proteine mittels MALDI/TOF-MS bestätigte deren Identität (s. unten).

Sequenzierung der gereinigten SGT und Vergleich der Peptidmassen mit denen der rekombinanten Glucosyltransferase mittels MALDI/TOF-MS

Für die nach tryptischem Verdau mittels MALDI/TOF-MS ermittelten Peptidmassen der aus Zellkulturen gereinigten SGT-Aktivität wurden in der Datenbanksuche die größten Übereinstimmungen mit der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, Datenbanknummer: U32644; Horvath und Chua, 1996) aus Tabak gefunden. Auch die gefundenen Peakmassen der MS-Analyse des rekombinanten Proteins konnten der Salizylsäure-induzierbaren Glucosyltransferase (IS5a, U32644) zugeordnet werden. Der Vergleich der Peptidmassen-Fingerprints der gereinigten und der rekombinanten

SGT bestätigte die Identität beider Proteine. Zu den theoretisch abgeleiteten Peptidmassen anderer bekannter Glucosyltransferasen aus Tabak konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden (s. 3.4.3.).

Bedeutung der SGT-Aktivität in Tabakpflanzen

Aus verschiedenen Pflanzenarten sind Glucosyltransferasen (GT) isoliert worden, deren Aktivität durch sogenannte Signalmoleküle induziert werden kann (siehe Übersicht, Tab. 7). Die Expression der in Tab. 7 genannten induzierbaren GT nach Verwundung, Pathogenbefall oder Zugabe eines Elicitors erfolgt sehr schnell, was auf eine potentielle Bedeutung dieser Gene in der Signaltransduktion bzw. der Pathogenabwehr hindeutet. Die Glucosylierung von Metaboliten ist ein wirksamer Schutzmechanismus der Pflanze, da sonst toxische Sekundärmetaboliten auf diese Weise entgiftet und als präformierte Abwehrstoffe gespeichert werden können. Bekanntestes Beispiel ist die Akkumulation cyanogener Glycoside in verschiedenen Pflanzenspezies (Übersichtsartikel: Hughes, 1999). Die Speicherung der Glycoside erfolgt in der Vakuole, wodurch ihre hydrolytische Spaltung durch Glycosidasen erst nach Zerstörung der Zellkompartimente möglich wird. Bei der Hydrolyse des Glycosids werden der Zucker und als Zwischenstufe ein Cyanhydrid freigesetzt, welches dann spontan zu einem Aldehyd oder Keton und HCN zerfällt. Dieser als Cyanogenese bekannte Abwehrmechanismus ist insbesondere bei der Interaktion von Pflanzen mit Herbivoren von Bedeutung (Harborne, 1995).

In Tabakpflanzen ist die SGT für die Entgiftung des gebildeten Scopoletins durch Glucosylierung und die daraus resultierende Speicherung des 7-O-Glucosids in der Vakuole von großer Bedeutung (Taguchi et al., 2001b, Chong et al., 1999). Als Teil der Abwehrmechanismen bei Verwundung (Dekompartimentierung) durch Herbivore oder andere Pathogene kann die Pflanze auf diese Weise durch Einwirken einer spezifischen noch nicht beschriebenen β -Glucosidase vermutlich schnell und lokal große Mengen an Scopoletin freisetzen (Mock et al., 1999).

durch Signalmoleküle und Pathogenbefall induzierbare Glucosyltransferasen

| Gen | Induziert durch: | Pflanzenart | Substrate | Referenz |
|-----------------------|---|---|---|-----------------------------------|
| GTase | SA | <i>Avena sativa</i> cv. Dal | SA | Yalpani et al., 1992 |
| IEGT (IS5a, IS10a) | SA, ASA, BA, 2,4-D, MJ, H ₂ O ₂ | <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi | Hydroxycoumarine, Hydroxyzimtsäuren | Horvath und Chua, 1996 |
| SGT | Verwundung | <i>Solanum tuberosum</i> | Steroidalkaloide | Moehs et al., 1997 |
| Twil | Verwundung, Avr9, SA, ASA, JA, H ₂ O ₂ , BA | <i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> | | O'Donnell et al., 1998 |
| JIGT | MJ | Zellkultur BY2 <i>N.</i> <i>tabacum</i> | | Imanishi et al., 1998 |
| TOGT | SA, β-Megaspermin | <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SamsunNN | SA, Hydroxycoumarine, Hydroxyzimtsäuren | Fraissinet-Tachet et al., 1998 |
| UFGT | Verwundung, SA | Wurzelkultur <i>Scutellaria baicalensis</i> | Flavonoide, Kaempferol | Hirotsami et al., 1999 |
| GTase | Verwundung, TMV-Infektion, SA | <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SamsunNN | | Roberts et al., 1999 |
| SA GTase | SA, TMV-Infektion | <i>N. tabacum</i> L. cv. Xanthi-nc NN | SA, BA, 4-HBA, t-Zimtsäure | Lee und Raskin, 1999 |
| CGTase | 2,4-D, Auxin | Zellkultur <i>N. tabacum</i> cv. Bright Yellow T-13 | Hydroxycoumarine, Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide | Taguchi et al., 2000b |
| NtGT1a, NtGT1b | SA, Auxin | Zellkultur <i>N. tabacum</i> cv. Bright Yellow T-13 | Coumarine, Flavonoide | Taguchi et al., 2001a |

Tab. 7: Induktion von Glucosyltransferasen (GT) durch Signalmoleküle, Verwundung oder Pathogenbefall in verschiedenen Pflanzenarten

4.4. Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten und Untersuchungen zum Beitrag von Coumarinen zur Pathogenabwehr beim Tabak

Korrelative Evidenz für die Bedeutung der Coumarine Scopoletin und Scopolin in der pflanzlichen Pathogenabwehr gibt es seit langem. In mit *Phytophthora infestans* infizierten Kartoffelknollen beobachteten Hughes und Swain (1960) die Akkumulation von Scopolin in einem fluoreszierenden Ring um die Infektionsstelle und im Tabak wurde die Akkumulation von Scopolin nach TMV-Infektion (Fritig und Hirth, 1971; Tanguy und Martin, 1972) und nach Befall mit PVY (Baumert et al., 2001) nahe der Infektionsstelle beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die inkompatible Interaktion mit Pathogenen in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi n c. (Tanguy und Martin, 1972), in *Platanus occidentalis* (El Modafar et al., 1995; Clérivet und Alami, 1999), in *Ulmus pumila* (Valle et al., 1997) und in *Hevea brasiliensis* (Churngchow und Rattarasarn, 2001) begleitet war von der schnelleren Bildung von Scopoletin im Vergleich zu suszeptiblen Varietäten. Im Gegensatz dazu wurden 5fach höhere Gehalte an Scopoletin in der gegen den Befall mit *Corynespora cassiicola* suszeptiblen Varietät von *Hevea brasiliensis* gegenüber einer resistenten Varietät beobachtet. Dabei zeigte der verwendete Pilz eine sehr hohe Kapazität zur Entgiftung von Scopoletin (Breton et al., 1997). Diese Beispiele zeigen, dass die Effizienz der Phytoalexine im Tabak von ihrer Toxizität, der Schnelligkeit, Intensität und Lokalisation ihrer Akkumulation im Wirtsgewebe und der Fähigkeit des Pathogens die gebildeten Phytoalexine zu entgiften abhängt.

Transformation von Tabak zur Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten

Um den Beitrag der Coumarine Scopolin und Scopoletin zur Pathogenabwehr im Tabak zu prüfen wurde in dieser Arbeit die Salizylsäure-induzierbare Glucosyltransferase IS5a (Horvath und Chua, 1996) aus der Zellsuspensionskultur (Zellsuspensionskultur einer Wurzelkalluskultur von *N. tabacum* cv. Havana) kloniert und über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer stabil in Sense-Orientierung in Tabak transformiert. Aus der Vielzahl an Transformanten konnten drei transgene Tabaklinien selektiert werden. Die Transkriptmengen an SGT-mRNA waren in allen ausgewählten Sense-Linien deutlich

erhöht gegenüber dem Wildtyp und korrelierten mit erhöhten Gehalten an SGT-Protein in den transgenen Linien. Analysen von Wildtyppflanzen hatten gezeigt, dass höhere Gehalte an SGT-Protein in den Wurzeln gegenüber den Blättern zu finden sind (nicht gezeigt). Dieser Befund steht im Zusammenhang zu höheren Gehalten an Scopolin und höheren SGT-Aktivitäten in den Wurzeln von Wildtyppflanzen. Die transgenen Linien zeigten die starke Expression der SGT in allen Geweben durch die Verwendung des starken konstitutiven 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., 1980).

Transformation von Tabak zur Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Antisense-Konstrukten

Die aus der Zellsuspensionskultur klonierte Salizylsäure-induzierbare Glucosyltransferase (IS5a, Horvath und Chua, 1996) wurde über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer auch in Antisense-Orientierung in Tabak transformiert (nicht gezeigt). Zunächst konnten Pflanzen mit verminderter SGT-Aktivität regeneriert werden. Auffällig war, dass in jeder Anzucht ein großer Teil der Pflanzen starke Wachstumsstörungen zeigte, weitergeführt wurden aber jeweils die transgenen Linien ohne Wachstumsstörungen. Die Wachstums- und Keimungshemmende Wirkung von Scopoletin für eine Reihe von Mikroorganismen und Pilzen ist bekannt (Jurd et al., 1971; Tal und Robeson, 1986; Ahl Goy et al., 1993; El Modafar et al., 1993; Valle et al., 1997). In jeder untersuchten Generation war der Einfluss der Transformation schwächer, bis in der dritten Generation keine verminderten SGT-Aktivitäten mehr messbar waren und die Pflanzen verworfen werden mussten. In zukünftigen Experimenten soll daher versucht werden die Transgen-abhängige Co-Suppression der SGT in Tabakpflanzen mit Hilfe eines *RNAinterference* (RNAi)-Ansatzes zu vermitteln.

Veränderte Gehalte an Scopolin in den transgenen Tabak-Linien

Die Analyse der ausgewählten Sense-Linien ergab deutlich gesteigerte SGT-Aktivitäten in den Blättern, wie auch in den Wurzeln der Pflanzen im Gegensatz zum Wildtyp. Erhöhte Gehalte an Scopolin wurden dagegen nur in den Wurzeln der transgenen Sense-Linien gemessen. Zurückzuführen ist dies auf die Limitierung der Scopolinbildung durch Mangel an Substrat in den Blättern. Fütterungsexperimente hatten gezeigt, dass

die Bildung von Scopolin in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht ist, wenn man Blattscheiben mit Scopoletin infiltriert (s. 3.5.3.).

Die Induktion der PAL verbunden mit der Akkumulation an Scopolin und Scopoletin wurde in der vorliegenden Arbeit nach Inokulation mit PVY und nach Kultivierung unter erhöhten CO₂-Konzentrationen gezeigt (s. 4.1. und 4.2.). Es sollte deshalb geprüft werden, ob der Gehalt an Scopolin in den Sense-Pflanzen unter Hoch-CO₂ zusätzlich gesteigert ist gegenüber dem Wildtyp. Dies war weder in den Blätter noch in den Wurzeln der Fall. Da die im Tabak überexprimierte Glucosyltransferase neben Scopoletin auch andere Hydroxycoumarine als Substrate akzeptiert (Fraissinet-Tachet et al., 1998) wurden die Metabolitprofile der methanollöslichen Phenylpropane des Wildtyps mit denen der transgenen Linien verglichen. Außer den oben erwähnten erhöhten Scopolingehalten in den Wurzeln der transgenen Pflanzen konnten keine Veränderungen im Gehalt an glucosidierten Phenylpropanen beobachtet werden. Dieser Befund ist erklärbar, da die in der untersuchten Tabakvarietät (*Nicotiana tabacum* cv. SamsunNN) hauptsächlich synthetisierten Phenylpropane CGA, Scopoletin und Scopolin sind.

Veränderte Pathogenabwehr in den transgenen Tabak-Linien

Um zu prüfen, ob die gesteigerte Kapazität zur Bildung von Scopolin in den transgenen Sense-Linien zur Resistenz gegen PVY beiträgt wurden Infiltrationsexperimente mit PVY durchgeführt. Phänotypische Unterschiede im Infektionsverlauf zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp wurden nicht beobachtet, aber für zwei der drei untersuchten transgenen Linien konnte eine verminderte Ausbreitung des Virus nachgewiesen werden. Konstitutiv erhöhte Gehalte an Scopolin und Scopoletin tragen auch zur Krankheitsresistenz des Tabakhybrids *N. glutinosa* x *N. debneyi* bei (Ahl Goy et al., 1993). Weiterhin konnte in Tabakpflanzen mit deregulierter Tetrapyrrolbiosynthese, die gesteigerte Resistenz gegenüber dem Befall mit TMV zeigten, die Induktion von Abwehrmechanismen einschließlich der Akkumulation von Scopolin beobachtet werden (Mock et al., 1999). Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Aktivität der SGT und damit die gesteigerte Kapazität zur Scopolinbildung neben den bekannten Abwehrmechanismen einen wichtigen Teil der induzierten Abwehrreaktionen im Tabak darstellt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Profile an sekundären Inhaltsstoffen und mögliche Veränderungen in der Pathogenabwehr im Tabak untersucht.

Das Wachstum von Tabakpflanzen unter Hoch-[CO₂] führt durch die Akkumulation kohlenstoffhaltiger nicht-struktureller Verbindungen als Folge erhöhter Photosyntheseraten zu gesteigerten C/N-Verhältnissen. Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an N-haltigen Alkaloiden vermindert ist unter Hoch-[CO₂] in Abhängigkeit von der angebotenen N-Konzentration wogegen der Gehalt an C-haltigen Phenylpropanen (lösliche und Zellwand-gebundene Phenole) meist erhöht war. Insbesondere wurden unter erhöhtem [CO₂] höhere Konzentrationen für die Hauptkomponente Chlorogensäure und die Coumarine Scopolin und Scopoletin ermittelt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivität der PAL, als Eingangsenzym in den Phenylpropanstoffwechsel stark erhöht ist in den unter Hoch-[CO₂] kultivierten Pflanzen wodurch auch der Gehalt an endogener Salizylsäure gesteigert war. In Inokulationsexperimenten mit PVY konnte die verminderte Ausbreitung des Virus in den unter Hoch-[CO₂] kultivierten Tabakpflanzen gezeigt werden. Es wurde ein Modell erarbeitet (Abb. 45), wonach die verminderte systemische Ausbreitung an PVY-Protein im Zusammenhang steht mit konstitutiv erhöhten Gehalten an präformierten Abwehrstoffen (Methanol-lösliche und Zellwand-gebunden Phenylpropane) und an Salizylsäure unter Hoch-CO₂. Bei Pathogenbefall ist die Pflanze auf diese Weise in der Lage systemische Abwehrmechanismen schneller zu induzieren.

Um die Funktion der Coumarine Scopolin und Scopoletin in der Pathogenabwehr zu prüfen wurde eine UDPGlucose:Scopoletin Glucosyltransferase-Aktivität (SGT) aus einer Tabakzellkultur aufgereinigt. Parallel zur Reinigung der SGT wurde eine bereits beschriebene Salizylsäure-induzierbare Glucosyltransferase (IS5a) aus der Tabakzellkultur kloniert und im heterologen System exprimiert. Die Identität beider Proteine wurde durch den Vergleich der Peptidmassen mittels MALDI/TOF-MS gezeigt. Zur Modulation der SGT-Aktivität mit Hilfe von Sense-Konstrukten wurde der erhaltene cDNA-Klon stabil in Tabak transformiert. Inokulationsexperimente mit den transgenen Sense-Linien zeigten, dass die Aktivität der SGT und damit die Kapazität

zur Bildung von Scopolin oder anderen glucosidierten Phenylpropanen zur Resistenz gegen PVY beiträgt.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ASA | Acetylsalizylsäure (<i>acetyl salicylic acid</i>) |
| BA | Benzoessäure (<i>benzoic acid</i>) |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>) |
| C | Kohlenstoff |
| ca. | cirka |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CGA | Chlorogensäure |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiotreitol |
| DW | Trockengewicht (<i>dry weight</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EK | Endkonzentration |
| Em | Emission (Detektionswellenlänge) |
| EP | Extraktionspuffer |
| Ex | Excitation (Anregungswellenlänge) |
| FG | Frischgewicht (<i>fresh weight</i>) |
| g | Gramm |
| GuHCl | Guanidin-HCl |
| h | Stunde |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2 ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| m | milli oder Meter |
| M | Molarität |
| MeOH | Methanol |
| MES | Morpholinoethanosulfonsäure |
| min. | Minute |

| | |
|----------------|--|
| MJ | Methyljasmonat |
| mRNA | „messenger“ RNA |
| N | Normalität |
| N | Stickstoff |
| NAA | Naphtalessigsäure |
| OD | optische Dichte |
| PAR | photosynthetisch aktive Strahlung (<i>photosynthetic active radiation</i>) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PDA | Photo Dioden Array |
| P _i | anorganisches Phosphat |
| PPO | Polyphenoloxidase |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| μ | Mikro |
| rpm | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| ROS | reactive oxygen species (reaktive Sauerstoff Spezies) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SA | Salizylsäure (<i>salicylic acid</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SGT | UDP-Glucose:Scopoletin Glucosyltransferase |
| s.o. | siehe oben |
| SV | Säulenvolumen |
| Tab. | Tabelle |
| U | Unit: Einheit für Enzymaktivität, 1U = 1 μmol Substratumsatz min ⁻¹ |
| UDP-Glucose | Uridine-5'-diphosphoglucose |
| ü.N. | über Nacht |
| xg | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| v/v | Volumenprozent vom Volumen |
| w/v | Gewichtsprozent vom Volumen |

7. Literatur

- Ahl Goy P, Felix G, Metrau JP, Meins F.** 1992. Resistance to diseases in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high levels of chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**: 11-21
- Ahl Goy P, Signer H, Reist R, Aichholz R, Blum W, Schmidt E, Kessmann H.** 1993. Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. *Planta* **191**: 200-206.
- Armstrong GM, Rohrbaugh LM, Rice EL, Wender SH.** 1970. The effect of nitrogen deficiency on the concentration of caffeoylquinic acids and scopoletin in tobacco. *Phytochem.* **9**: 945-948
- Bailay JA, Burden RS, Vincent GG.** 1975. Capsidiol: an antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochem.* **14**: 597.
- Baldwin IT.** 1989. Mechanism of damage-induced alkaloid production in wild tobacco. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1661-1680
- Baldwin IT, Ohnmeiss TE.** 1994. Coordination of photosynthetic and alkaloidal responses to damage in uninducible and inducible *Nicotiana sylvestris*. *Ecology* **75**: 1003-1014
- Baldwin IT, Zhan ZP, Diab N, Ohnmeiss T, McCloud ES, Lynds GY, Schmelz EA.** 1997. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **201**: 397-404
- Baumert A, Mock H-P, Schmidt J, Herbers K, Sonnewald U, Strack D.** 2001. Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochem.* **56**: 535-541
- Bennett M, Gallagher M, Fegg J, Bestwick C, Paul T, Beale M, Mansfield J.** 1996. The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. *Plant J.* **9(6)**: 851-865
- Bernards MA, Lewis NG.** 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochem.* **31**:3409-3412

- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM.** 1987. XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with β -galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**: 376-378
- Bradford MM.** 1976. Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-252
- Brauns FE.** 1952. *The chemistry of Lignin*. Academic Press Inc., Publisher-New York
- Breton F, Sanier Ch, D'Àusac J.** 1997. Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *J. Plant Physiol.* **151**: 595-602
- Bryant JP, Chapin III FS, Reichardt P, Clausen T.** 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos.* **40**: 357-368
- Campbell MM, Ellis BE.** 1992. Fungal elicitor mediated responses in pine cell cultures: Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* **196**: 409-417
- Cheng SH, Moore BD, Seemann JR.** 1998. Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **116**: 715-723
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P.** 1999. An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalisation of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett.* **458**: 204-208
- Churngchow N, Rattarasarn M.** 2001. Biosynthesis of Scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *J. Plant Physiol.* **158**: 875-882
- Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE.** 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Sci.* **2(4)**: 144-151
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG.** 2000. Natural products (Secondary Metabolites) in Buchanan et al. (eds.) 2000, *Biochemistry&Molecular Biology of Plants* ASPP Chapter 24: 1250-1341
- Crouzet J, Chassagne D.** 1999. Glycosidically bound volatiles in plants. In: *Naturally Occurring Glycosides* (Ikan R, ed.) John Wiley&Sons 225-374

- Debleare R, Bytebier B, De Greve H, Debroeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J.** 1984. Efficient octopine Ti-plasmid-derived vectors of Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* 13: 4777-4788
- Dixon SC, Martin RC, Mok MC, Shaw G, Mok DWS.** 1989. Zeatin glucosylation enzymes in *Phaseolus*. Isolation of O-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to O-Xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol.* **90**: 1316-1321
- Dixon RA, Paiva NL.** 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S.** 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 646-655
- Durner J, Shahn J, Klessig DF.** 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends plant Sci.* **2(7)**: 266-274
- El Modafar C, Clerivet A, Fleuriet A, Macheix JJ.** 1993. Inoculation of *Platanus acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* F. sp. Platani induces Scopoletin and umbelliferone accumulation. *Phytochem.* **34(5)**: 1271-1276
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silveman P, Raskin I.** 1992. Localisation, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2480-2484
- Estiarte M, Penuelas J, Kimball BA, Hendrix DL, Jr Pinter PJ, Wall GW, LaMorte RL, Hunsaker DJ.** 1999. Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol. Plantarum* **105**: 423-433
- Fischer C, Van Doorne H, Lim MI, Svendsen AB.** 1976. Bacteriostatic activity of some coumarin derivatives. *Phytochem.* **15**: 1078-1079.
- Fraissinet-Tachet L, Baltz R, Chong Julie, Kauffmann S, Fritig B, Saindrenan P.** 1998. Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* **437**: 319-323.
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L.** 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* **21**: 285-294

- Fritig B, Hirth L, Ourisson G.** 1970. Biosynthesis of the coumarins: Scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochem.* **9**: 1963-1975.
- Fritig B, Hirth L.** 1971. Biosynthesis of phenylpropanoids and coumarins in TMV-infected tobacco leaves and tobacco cultures. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung* **6**: 21-29.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J.** 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**:754-756
- Garcia D, Sanier C, Macheix JJ, D'Auzac J.** 1995. Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.). V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**: 213-223.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M.** 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* **21**: 253-268
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M.** 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ.* **22**:1177-1199
- Gleadow RM, Foley WJ, Woodrow IE.** 1998. Enhanced CO₂ alters the relationship between photosynthesis and defense in cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. *Plant Cell and Environ.* **21**: 12-22
- Guedes MEM, Kuc J, Hammerschmidt R, Bostock R.** 1982. Accumulation of six sesquiterpenoid phytoalexins in tobacco leaves infiltrated with *Pseudomonas lachrymans*. *Phytochem.* **21**: 2987-2988
- Hahlbrock K, Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 347-369
- Hammerschmidt R, Nicholson RL.** 1999. The role of salicylic acid in disease resistance. In: *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture*. A. A. Agrawal, S. Tudzun, E. Bent (ed.). 2. Aufl. APS Press. PartI: 73-94

- Harborne JB.** 1995. *Ökologische Biochemie: Eine Einführung*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl.
- Heller W, Forkmann G.** 1994. Biosynthesis of flavonoids. In *The Flavonoids, Advances in research since 1986*, Harborne, J.B. (ed.), Chapman & Hall, 499-535.
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U.** 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803
- Herms DA, Mattson WJ.** 1992. The dilemma of plants: To grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* The University of Chicago Vol. **67**: No. 3
- Höfgen R, Willmitzer L.** 1990. Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato. *Plant Sci.* **66**: 221-230
- Holton TA, Cornish EC.** 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083
- Horvath DM, Chua NH.** 1996. Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterisation of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* **31** (5): 1061-1072.
- Hrazdina G.** 1988. Purification and properties of o UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from *Hippeastrum* petals. *Biochim. Biophys. Acta* **955**: 301-309
- Hughes CJ, Swain T.** 1960. Scopolin production in potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **50**: 398-400
- Hughes MA.** 1999. Biosynthesis and degradation of Cyanogenic Glycosides. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. SD Barton, K Nakanishi (eds.). Elsevier. Vol. **1** Chapter **1.31**: 881-894
- Imanishi S, Hashizume K, Kojima H, Ishihara A, Nakamura K.** 1998. An mRNA of tobacco cell, which is rapidly inducible by methyl jasmonate in the presence of cycloheximide, codes for a putative Glucosyltransferase. *Plant Cell Physiol.* **39**: 202-211
- Jang JC, Sheen J.** 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* **2**(6): 208-214

- Jiménez CR, Huang L, Qiu J and Burlingame AL.** 1998. Sample Preparation for MALDI Mass Analysis of Peptides and Proteins. in: *Current Protocols in Protein Science*, 16.3.1-16.3.6, John Wiley & Sons, Inc. 1998
- Jitla DS, Rogers GS, Seneweera SP, Basra AS, Oldfield RJ, Conroy JP.** 1997. Accelerated early growth of rice at elevated CO₂. Is it related to developmental changes in the shoot apex? *Plant Physiol.* **115(1)**: 15-22
- Johns PR, Møller BL, Høj PB.** 1999. The UDP-glucose: *p*-hydroxy-mandelonitril glucosyltransferase that catalyses the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *sorghum bicolor*. *J. Biol. Chem.* **274**: 36637-36642
- Jurd L, Corse J, King AD, Bayne H, Mihara K.** 1971. Antimicrobial properties of 6,7-Dihydroxy-, 7,8-Dihydroxy-, 6-Hydroxy and 8-Hydroxycoumarins. *Phytochem.* **10**: 2971-2974
- Karban R, Baldwin IT.** 1997. Induced responses to herbivory. The University of Chicago Press. Chicago, London. Chapter **2.3.8.**: 35-39
- Karowe DN, Seimens DH, Mitchell-Olds T.** 1997. Species-specific response of glucosinolate content to elevated atmospheric CO₂. *J. Chem. Ecol.* **23**: 2569-2582
- Keil U, Schreier P.** 1989. Purification and partial characterisation of UDP-glucose:phenol- β -D-glucosyltransferase from papaya fruit. *Phytochem.* **28**: 2281-2284
- Kiehne A.** 1997. Untersuchungen über Polyphenole in Tee und Kaffee mittels HPLC und Thermospray HPLC-MS. *Dissertation*. Braunschweig
- Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E.** 1996. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.* **111**: 349-353
- Kuc J, Rush JS.** 1985. Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**: 455-472
- Kunze I, Kunze G, Bröker M, Manteuffel R, Meins F, Müntz K.** 1998. Evidence for secretion of vacuolar alpha-mannosidase, class I chitinase, and class I β -1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells. *Planta* **205**: 92-99
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lambers H.** 1993. Rising CO₂, secondary plant metabolism, plant-herbivore interactions and litter decomposition. *Vegetatio* **104/105**: 263-271

- Lamer S, Jungblut PR.** 2001. Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry peptide mass fingerprinting for proteome analysis: identification efficiency after on-blot or in-gel digestion with and without desalting procedures. *Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. Mar. 10* **752(2)**: 311-22
- Landsberg J, Stafford-Smith M.** 1992. A functional scheme for predicting the outbreak potential of herbivorous insects under global atmospheric change. *Austral. J. Bot.* **40**: 565-577
- Lapierre C, Monties B, Rolando M.** 1986. Thioacidolysis of poplar Lignins: identification of monomeric syringyl products and characterisation of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforschung* **40**: 113-118
- Lee HI and Raskin I.** 1999. Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDPGlucose: salicylic acid Glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* **274**: 35483-35491
- Leffingwell, JC.** 1999. Leaf Chemistry: Basic Chemical Constituents of tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types. In *Tobacco: Production, Chemistry and Technology*. Davis and Nielsen (eds.). Blackwell Science. Chapter 8: 265-303
- Legrand M.** 1983. Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease. In: *Biochemical Plant Pathology*. Callow JA (ed.) Wiley, Chichester, U.K. 367-384
- Lewis NG, Yamamoto E.** 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 455-496
- Logermann J, Schell J, Willmitzer L.** 1990. Improved method for the preparation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20
- Ludewig F.** 1998. Pflanzenwachstum unter erhöhter atmosphärischer Kohlendioxid-Konzentration: Untersuchungen zur Genregulation und Kohlenhydratakkumulation. *Dissertation*. Göttingen: Cuvillier
- Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heinecke D, Geige M, Stitt M, Müller-Röber BT, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB.** 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated CO₂. *FEBS Lett.* **429**: 147-151.
- Luo Y, Field CB, Mooney.** 1994. Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated [CO₂]_a: interactions among carbon, nitrogen and growth. *Plant Cell Environ.* **17**: 1195-1204

- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ.** 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7802-7806
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I.** 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004
- Margna U, Margna E, Vainjärv T.** 1989. Influence of nitrogen nutrition on the utilisation of L-Phenylalanine for building Flavonoids in Buckwheat Seedling Tissues. *J. Plant Physiol.* **134**: 697-702
- Maroco JP, Edwards GE, Ku MSB.** 1999. Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta* **210**: 115-125
- Maslak A, Mock H-P.** 1999. Influence of elevated CO₂-concentrations on the contents of secondary Metabolites in tobacco – Implications for pathogen defence?. *2000 Years of Natural Products Research-Past Present and Future*, Amsterdam 26.7.-30.7.1999.
- Matsudaira, P. T.** 1989. A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing. *Academic Press, Inc.*, San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto p. 39-42
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ.** 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**: 203-212
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardj B.** 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Miller A, Tsai CH, Hemphill D, Endres M, Rodermel S, Spalding M.** 1997. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. A new perspective on acclimation. *Plant Physiol.* **115**: 1195-1200
- Mikulska-Macheta A.** 1976. Influence of scopoletin on the infectivity of tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln.* **182**: 17-24
- Mock H-P, Heller W, Molina A, Neubohn B, Sandermann Jr H, Grimm B.** 1999. Expression of uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase antisense RNA in tobacco induces pathogen defense responses conferring increased resistance to TMV. *J. Biol. Chem.* **274 (7)**: 4231-4238

- Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR.** 1997. Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* **11** (2): 227-236
- Moore BD, Palmquist DE, Seemann JR.** 1997. Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco plants. *Plant Physiol.* **115**: 241-248
- Moore BD, Cheng SH, Seemann JR.** 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* **22**: 567-582
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Murphy AM, Carr JP.** 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on *tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* **128**: 552-563
- Murray RDH, Mendez J, Brown SA.** 1982. *The Natural Coumarins. Occurrence. Chemistry and Biochemistry.* Wiley. New York
- Nicholson RL, Hammerschmidt R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **30**: 369-389.
- Nie G, Hendrix DL, Webber AN, Kimball BA, Long SP.** 1995. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ concentration on the field. *Plant Physiol.* **108**: 975-983
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR, Bowles DJ.** 1998. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *The Plant Journal* **14** (1): 137-142.
- Olson MM, Roseland CR.** 1991. Induction of the coumarins Scopoletin and ayapin in Sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding of sunflower beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomol. Society of America* **91**: 1166-1172
- Osbourn AE.** 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb CJ, Dixon RA.** 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia lyase expression do not develop systemic

- acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J.* **10**: 281-293
- Pearson M, Brooks GL.** 1995. The influence of elevated CO₂ on growth and age-related changes in leaf gas exchange. *J. Exp. Bot.* **46**: 1651-1659
- Penuelas J, Estiarte M.** 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function?. *Tree* **13**: 20-24
- Penuelas J, Estiarte M, Llusia J.** 1997. Carbon based secondary compounds at elevated CO₂. *Photosynthetica* **33(2)**: 313-316
- Poorter H, Berkel V, Baxter R, den Hertog J, Dijkstra P, Gifford RM, Giffin KL, Rounet C, Roy J, Wong SC.** 1997. The effect of elevated carbon dioxide on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant Cell Environ.* **20**: 472-482
- Ralston EJ, English JJ, Dooner HK.** 1988. Sequence of three *bronze* alleles of maize and correlation with the genetic fine structure. *Genetics* **119**: 185-197
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2(4)**: 152-159
- Roberts MR, Warner SAJ, Darby R, Lim EK, Draper J, Bowles DJ.** 1999. Differential regulation of a glucosyltransferase gene homologue during defence responses in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **50 (332)**: 407-410.
- Rufty TW, Jr Jackson DM, Severson RF, Lam JJ, Snook ME.** 1989. Alterations in growth and chemical constituents of tobacco in response to CO₂ enrichment. *J. Agricult. Food Chem.* **37**: 552-555
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willitz MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD.** 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Saitoh F, Noma M, Kawashima N.** 1985. The alkaloid content of sixty *Nicotiana* species. *Phytochem.* **24**: 477-480.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez E, Soto JM, Garcia PC, Lopez-Lefebvre LR, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L.** 2000. Phenolic and oxidative metabolism as bioindicators of nitrogen deficiency in french bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). *Plant Biol.* **2**: 272-277

- Scholz E, Heinrich M, Hunkler D.** 1993. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphitifolia*. *Planta Med.* **60**: 360-364
- Shibata H, Sawa Y, Ota T, Sonoke S, Kim KK, Yoshioka M.** 1995. Steviol and steviol-glucoside Glucosyltransferase activities in *stevia rebaudiana* Bertoni-purification and partial characterisation. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 390-396
- Snook ME, Mason PF, Sisson VA.** 1986. Polyphenols in the *Nicotiana* species. *Tob. Sci.* **30**: 43-49
- Stitt M, Krapp A.** 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* **22**: 583-621
- Stoessl A, Stothers JB, Ward EWB.** 1976. Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. *Phytochem.* **15**: 855-872
- Strack D, Mock H-P.** 1993. Hydroxycinnamic acids and lignins. In *Methods of Plant Biochemistry, vol. 9: Enzymes of secondary metabolism* (P. J. Lea, ed.), Academic Press, London.
- Szerszen JB, Szczyglowski K, Bandurski RS.** 1994. *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**: 1699-1701
- Taguchi G, Fujikawa S, Yazawa T, Kodaira R, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M.** 2000a. Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci.* **151**: 153-161
- Taguchi G, Imura H, Maeda Y, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M.** 2000b. Purification and characterisation of UDP-glucose:hydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells. *Plant Sci.* **157**: 105-112
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M.** 2001a. Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4086-4094
- Taguchi G, Yoshizawa K, Kodaira R, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M.** 2001b. Plant hormone regulation on Scopoletin uptake from culture medium into tobacco cells. *Plant Sci.* **160**: 905-911

- Tal B, Robeson DJ.** 1986. The induction by fungal inoculation, of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochem.* 25: 77-79
- Tanguy J, Martin C.** 1972. Phenolic Compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochem.* 11: 19-28.
- Truesdale MR, Doherty HM, Loake GJ, McPherson MJ, Roberts MR, Bowles DJ.** 1996. Molecular cloning of a novel wound-induced gene from tomato: *twi1*. *Plant Physiol.* 112: 446
- Van Etten HD, Matthews DE, Matthews PS.** 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 143-164
- Van Oosten JJ, Besford RT.** 1995. Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant Cell Environ.* 18: 1253-1266
- Van Oosten JJ, Besford RT.** 1996. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion. *Photosynth. Res.* 48: 353-365
- Valle T, López JL, Hernández JM, Corchete P.** 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Science* 125: 97-101.
- Vogt T, Grimm R, Strack D.** 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-*O*-Glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid- specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from Solanaceae. *Plant J.* 19: 509-519.
- Vogt T, Jones P** 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterisation of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5 (9): 380-386.
- Vogt T, Zimmermann E, Grimm R, Meyer M, Strack D.** 1997. Are the characteristics of betanidin glycosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheantus bellidiformis* indicative of their phylogenetic relationship with flavonoid glycosyltransferases. *Planta* 203: 349-361.
- Wagner GJ.** 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* 96: 675-679

- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA.** 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 10085-1094
- Warnecke DC, Heinz E.** 1994. Purification of a membrane-bound UDP-glucose: sterol Glucosyltransferase based on its solubility in diethyl ether. *Plant Physiol.* **105**: 1067-1073
- Weinmann I.** 1997. History of the Development and Applications of Coumarin and Coumarin-related Compounds. In *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. O'Kennedy and Thornes (eds.), 1997. John Wiley & Sons. 1: 1-37
- Werner C, Matile P.** 1985. Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* **118**: 237-249
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM.** 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Yalpani N, León J, Lawton MA, Raskin I.** 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**: 315-321
- Yalpani N, Schulz M, Davies MP, Balke NE.** 1992. Partial purification and properties of an inducible uridine 5`diphosphate-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from oat roots. *Plant Physiol.* **100**: 457-463

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die direkt und indirekt zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Peter Mock für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Auseinandersetzung mit allen während der Doktorarbeit aufgetretenen Problemen, sowie für die Bereitstellung von Reisemitteln für die Teilnahme an verschiedenen Kongressen.

Allen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitsgruppe „Angewandte Biochemie“ des IPK-Gatersleben danke ich für ihre herzliche Unterstützung und sehr gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Barbara Kettig, die durch ihre technische Unterstützung und freundschaftliche Hilfestellung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Herrn Dr. Bernhard Schlesier danke ich insbesondere für seine Unterstützung bei den MALDI/TOF-Analysen, aber auch für seine Gesprächsbereitschaft und die hilfreichen Bemerkungen zu meiner Arbeit. Für Ihre technische Hilfestellung bedanke ich mich herzlichst auch bei Miriam Eisbrenner und Annegret Wolf. Bei Steffen Amme bedanke ich mich insbesondere für die gute Zusammenarbeit bei den CO₂-Experimenten und die vielen guten Kuchen von Oma.

Frau Anita Winger und Frau Melanie Ruff danke ich für Ihre Anleitung und Hilfestellung bei den durchgeführten phytopathologischen und einigen molekularbiologischen Arbeiten.

Für die schnelle und fachkundige Hilfe bei der Bewältigung von HPLC-Problemen zu jeder Tages- und Nachtzeit danke ich Herrn Arno Simon.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Gärtnerei, den Fotografinnen, Technikern, den Mitarbeiterinnen der Bibliothek und insbesondere der Grafikabteilung.

Meiner Familie, insbesondere meinem Freund Michael, der unter dem täglichen Stress leiden musste, gilt mein besonderer und herzlicher Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maslak
Vorname: Andrea
Geburtsdatum: 04.06.1074
Geburtsort: Erfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981-1990 POS Ernst-Busch, Magdeburg
1990-1991 Leistungsklasse der POS Ernst-Busch, Magdeburg
1991-1993 Johannes-Kepler Gymnasium, Magdeburg

Hochschulbildung

1993-1998 Studium der Biologie an der Friedrich Schiller Universität Jena
(FSU) Abschluss: Diplom-Biologin
seit 1998 Anfertigung der Dissertation am Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben
angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
11.1998-03.1999 wissenschaftliche Hilfskraft am IPK Gatersleben
im Rahmen der Dissertation
04.1999-09.2001 Stipendiatin der Graduiertenförderung der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 10.2001 wissenschaftliche Hilfskraft am IPK Gatersleben
im Rahmen der Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Halberstadt, den 13.3.2002

Andrea Maslak