

Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie  
Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie  
Arbeitsgruppe Dr. Peter Dörmann

---

# **Phytol aus dem Chlorophyllabbau ist limitierend für die Tocopherol (Vitamin E)-Synthese**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Marion Kanwischer

Golm, im August 2007

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 Germany License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> or send a letter to Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

Elektronisch veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1595/>  
urn:nbn:de:kobv:517-opus-15957  
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15957>]

Viele Menschen wissen, dass sie unglücklich sind.  
Aber noch mehr Menschen wissen nicht, dass sie glücklich sind.

Albert Schweitzer  
14.01.1875-04.09.1965

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Isoprenoide gehören zu den Lipiden .....	1
1.2 Phytol ist das meist verbreitete Isoprenoidlipid .....	2
1.3 Die <i>de novo</i> -Synthese von Phytylpyrophosphat .....	4
1.4 Phytol ist Bestandteil des Photosynthesepigmentes Chlorophyll .....	6
1.5 Phytylpyrophosphat ist Substrat für die Tocopherol (Vitamin E)-Synthese.....	7
1.5.1 Struktur, Vorkommen und Bedeutung von Tocopherol .....	7
1.5.2 Die Biosynthese von Tocopherol.....	10
1.6 Phytol ist Bestandteil der Fettsäurephytylester.....	11
1.7. Phyllochinon enthält eine Phytylseitenkette.....	13
1.8 Der Abbau von Chlorophyll.....	13
1.8.1 Identifizierung und Klonierung der <i>Chlorophyllase</i> .....	15
1.8.2 Lokalisation der Chlorophyllasen.....	17
1.8.3 Identifizierung von <i>staygreen</i> -Mutanten.....	17
1.9 Der Verbleib von Phytol .....	18
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Arbeitsmaterialien .....	23
3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.2 Kits, Enzyme .....	24
3.1.3 Medien .....	24
3.1.4 Verwendete Oligonukleotide.....	25
3.1.5 Bakterienstämme und Klone.....	25
3.1.6 Pflanzen .....	25
3.2 Methoden .....	27
3.2.1 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
3.2.2 Bestimmung des Tocopherolgehaltes.....	28
3.2.3 Bestimmung von Phyllochinon .....	29
3.2.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes .....	30
3.2.5 Trennung von Chlorophyll und Chlorophyllid .....	31
3.2.6 Bestimmung der Fettsäurephytylester aus Blättern und Samen .....	31
3.2.7 Bestimmung von freiem Phytol in Blättern .....	36
3.2.8 Analyse der photosynthetischen Pigmentzusammensetzung .....	38
3.2.9 Behandlung von Pflanzen mit Methyljasmonat.....	38
3.2.10 Fütterung von Pflanzen mit Phytol.....	39
3.2.11 Durchführung eines Stickstoffmangelstress-Experimentes mit Pflanzen....	39
3.2.12 Behandlung von Pflanzen mit Fosmidomycin.....	39
3.2.13 Elektronenmikroskopie .....	39
3.2.14 Molekularbiologische Methoden .....	40
3.2.15 Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	43
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
4.1 Analyse von Chlorophyll, Tocopherol, Phyllochinon und Fettsäure- phytylestern in Blättern und Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
4.2 Analyse von Mutanten mit verminderter Chlorophyllase-aktivität .....	49
4.2.1 Isolierung der Mutanten <i>chl1-1</i> , <i>chl1-2</i> , <i>chl2</i> , <i>chl1-1chl2</i> .....	49
4.2.2 Kreuzung der <i>chl1-1</i> - und <i>chl2</i> -Mutanten zur Erzeugung der Doppelmutante <i>chl1-1chl2</i> .....	54

4.2.3 Expressionsanalyse von <i>CHL1</i> und <i>CHL2</i> in den Mutanten .....	56
4.2.4 Der Chlorophyllidanteil in den Chlorophyllasemutanten ist stark reduziert.....	58
4.2.5 Die Chlorophyllasemutanten akkumulieren etwas weniger Fettsäurephytylester und Tocopherol.....	60
4.2.6 Der Tocopherolgehalt der Samen der Chlorophyllasemutanten ist unverändert zum Wildtyp .....	62
4.2.7 Der Phytolgehalt in den Chlorophyllasemutanten.....	63
4.2.8 Die Plastoglobuli in den Chlorophyllasemutanten sind verkleinert .....	64
4.3 Überexpression von <i>Chlorophyllase1</i> .....	66
4.4 Analyse weiterer Mutanten mit vermindertem Chlorophyllabbau .....	70
4.4.1 Induktion der Seneszenz nach Dunkelbehandlung von <i>pao1</i> und <i>SGR-RNA<sub>i</sub></i> .....	70
4.4.2 Analyse von <i>pao1</i> und <i>SGR-RNA<sub>i</sub></i> nach dunkelinduzierter Seneszenz.....	72
4.5 Inhibierung der plastidären <i>de novo</i> -Isoprenoidsynthese durch den Inhibitor Fosmidomycin.....	74
4.6 Analyse einer Geranylgeranylreduktase-Mutante ( <i>ggr</i> ) .....	75
4.6.1 Identifizierung einer homozygoten T-DNA-Insertionsmutante der <i>Geranylgeranyl-reduktase</i> ( <i>ggr</i> ).....	76
4.6.2 Die <i>ggr</i> -Mutante enthält Geranylgeranyl-Chlorophyll .....	78
4.6.3 In <i>ggr</i> sind kein Phyllochinon und keine Fettsäurephytylester detektierbar, jedoch in geringen Mengen Tocopherol .....	80
4.6.4 Sowohl Geranylgeranylpyrophosphat als auch Phytolpyrophosphat können Substrate der Chlorophyllsynthetase sein .....	84
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>87</b>
5.1 Charakterisierung der Chlorophyllasemutanten .....	87
5.1.1 Der Beitrag der Chlorophyllasen <i>CHL1</i> und <i>CHL2</i> zum <i>in vivo</i> Chlorophyllabbau in der Seneszenz ist gering.....	88
5.1.2 Überexpression von <i>CHL1</i> führte zu keinem erhöhten Chlorophyllabbau ...	91
5.1.3 Zusammenfassung .....	91
5.2 Charakterisierung der <i>staygreen</i> -Mutanten .....	92
5.3 Phytol wird in Blättern und Samen in Form von Fettsäurephytylestern und Tocopherol gespeichert.....	93
5.3.1 Die Fettsäurephytylesterzusammensetzung in Blättern und Samen ist verschieden.....	95
5.3.2 Die Bedeutung des alternativen Phytolsyntheseweges für den Tocopherolgehalt in Blättern und Samen .....	96
5.3.3 In Blättern wird Phytol primär in Form von Fettsäurephytylestern, jedoch in Samen als Tocopherol gespeichert.....	97
5.4 Charakterisierung der <i>ggr</i> -Mutante .....	97
5.4.1 Die an der Fettsäurephytylester-, Tocopherol- und Phyllochinonsynthese beteiligten Enzyme zeigen hohe Substratspezifitäten für die Phytolgruppe .....	99
5.4.2 Es existiert wahrscheinlich eine weitere Geranylgeranylreduktase-Aktivität .....	100
5.4.3 Verschiedene Prenylpyrophosphate können Substrat der Chlorophyllsynthetase sein.....	101
5.5 Ein Modell für den Phytolstoffwechsel in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	103
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>108</b>
<b>7. Ausblick</b> .....	<b>110</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>121</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>123</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Isoprenide gehören zu den Lipiden

Eine pflanzliche Zelle besteht zu etwa 5,9 % ihres Trockengewichtes aus Lipiden (Buchanan *et al.*, 2000). Diese bilden eine Gruppe chemisch sehr verschiedener Moleküle, die sich nur in unpolaren Lösungsmitteln lösen. Sie können in Speicherlipide, Strukturlipide und Lipide mit besonderen biologischen Funktionen unterteilt werden. Zu den Speicherlipiden gehören die Triacylglycerine, welche aufgrund der niedrigen Oxidationsstufe des Kohlenstoffs als Energiespeicherform dienen. Biologische Membranen sind aus Strukturlipiden aufgebaut, zu denen die Phospholipide, Sphingolipide und Galactolipide, aber auch einige Sterole, wie z.B. Cholesterin, gehören. Lipide mit besonderen biologischen Funktionen zeichnen sich im Gegensatz zu den Speicherlipiden und Strukturlipiden durch spezifische Wirkungen im Stoffwechsel aus. Sie wirken unter anderem als Cofaktoren von Enzymen, an der Signalübertragung und an Elektronentransferprozessen. Beispiele solcher Lipide sind die Chlorophylle, die Steroidhormone, wie z.B. Cortison und Testosteron und die fettlöslichen Vitamine A (Retinol), D (Cholecalciferol), K (Phyllochinon) und E (Tocopherol) (Lehninger *et al.*, 1998).

Einige Lipide besitzen eine Isoprenoidseitenkette. Isoprenoidlipide kommen sowohl im Primär-, als auch im Sekundärstoffwechsel vor. Im Primärstoffwechsel sind sie z. B. Bestandteil der Membranen, Photosynthesepigmente, und Pflanzenhormone. So gehen aus dem C<sub>30</sub>-Isoprenoid Farnesylpyrophosphat die Membranlipide Cholesterin und Sitosterin hervor, während die Schutzpigmente  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Violaxanthin aus dem Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (C<sub>20</sub>) synthetisiert werden. Farnesyl- bzw. Geranylgeranylpyrophosphat sind ferner Ausgangssubstanzen zur Synthese der Brassinosteroide und der Gibberelline, für die Pflanzenentwicklung wichtige Hormone. Die an Elektronentransportprozessen beteiligten Substanzen Ubichinon, Plastochinon, Cytochrom a und Phyllochinon, aber auch Chlorophyll und Tocopherol (Vitamin E) besitzen Isoprenoidseitenketten zur Membranverankerung. Als Bestandteil des sekundären Metabolismus gehen aus Isoprenoiden oft Duftstoffe zur Anlockung von Bestäubern oder zur Abwehr von Fraßfeinden hervor. Saponine sind glycosylierte Steroide und wirken in der Pflanze als Fraßgift. Ein bekannter

Vertreter der Saponine ist das Digitoxigenin aus dem Fingerhut (*Digitalis purpurea*). Kautschuk ist ein Polyterpen mit wichtiger industrieller Bedeutung, wie z.B. zur Herstellung von Gummi (Heldt, 1999).

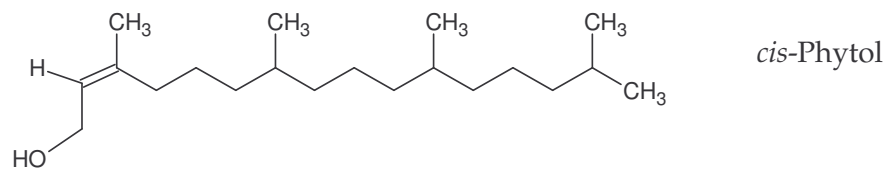
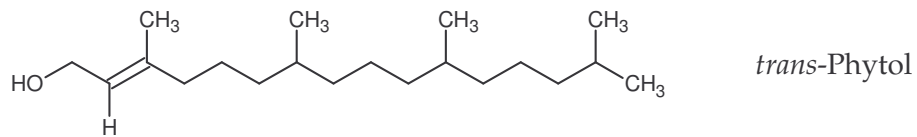
## 1.2 Phytol ist das meist verbreitete Isoprenoidlipid

Als Bestandteil von Chlorophyll ist Phytol das am häufigsten vorkommende azyklische Isoprenoid in der Biosphäre (Volkman und Maxwell, 1986). Aufgrund des Chlorophylls besitzen Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien die Befähigung zur Photosynthese und bilden damit die Lebensgrundlage vieler Organismen auf der Erde. Über eine Billion Tonnen Chlorophyll werden schätzungsweise jährlich degradiert (Hendry *et al.*, 1987). Das auffälligste Merkmal des Chlorophyllabbaus ist der herbstliche Wandel der grünen Blattfarbe zu gelb bzw. rot aufgrund der zeitgleichen Zurückhaltung von Carotenoiden und Anthocyaninen. Chlorophylldegradation findet auch im Zuge des Chlorophyllumsatzes, aber auch aufgrund von Zelltod durch den Einfluss äußerer Faktoren, wie Pathogenbefall oder Hitze-, und Kältestress statt. Durch Chlorophyllhydrolyse werden große Mengen an Phytol freigesetzt, über dessen Verbleib jedoch wenig bekannt ist.

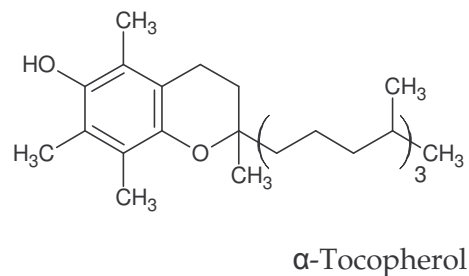
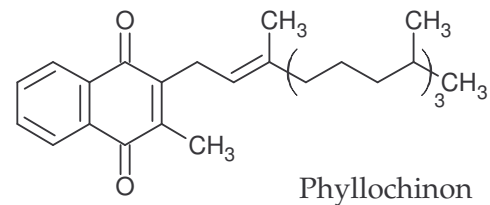
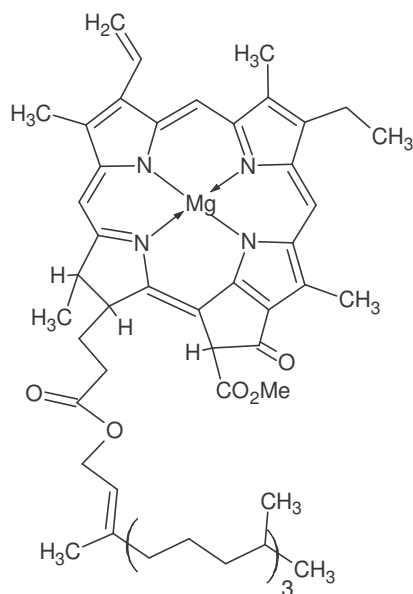
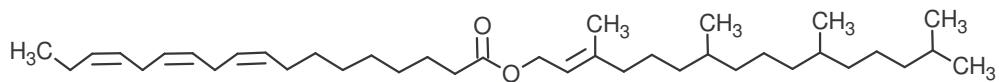
Phytol entsteht durch Hydrolyse im ersten Schritt des Chlorophyllabbaus. Es ist ein Diterpen-Alkohol und kommt als *cis*- und *trans*-Isomer vor (Abb. 1 A). Das natürlich vorkommende Phytol ist die *trans*-Form. Es wurde erstmals 1906 von Willstätter (Willstätter und Mieg, 1906) durch Hydrolyse des Chlorophylls isoliert. Weiterhin ist Phytol Bestandteil von Tocopherol (Vitamin E) und von Phyllochinon (Vitamin K) und liegt verestert mit Fettsäuren als Fettsäurephytylester vor (Abb. 1 B). Chlorophyll, Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phyllochinon sind im Chloroplasten lokalisiert. Chlorophyll befindet sich in der Thylakoidmembran und Phyllochinon ist ein Elektronenakzeptor des Photosystem I. Tocopherol und die Fettsäurephytylester befinden sich zum größten Teil in den Plastoglobuli und zu kleineren Anteilen in der Thylakoidmembran und in den Chloroplastenmembranen (Vidi *et al.*, 2006; Gaude *et al.*, 2007). Chlorophyll, Tocopherol und Phyllochinon bestehen jeweils aus einer polaren Kopfgruppe, dem Tetrapyrrolringsystem, dem Chromanolring bzw. dem Naphthochinonring, und der hydrophoben Isoprenoidseitenkette. Während die polaren Kopfgruppen dem wässrigen Milieu zugewandt sind, ist die Seitenkette auf

Grund ihrer lipophilen Eigenschaften mit Membranen assoziiert (Heldt, 1999). Daher besitzt Phytol hauptsächlich strukturelle Funktionen und spielt eine wichtige Rolle bei der Assoziation von Chlorophyll, Tocopherol und Phyllochinon mit Membranen. Damit kommt Phytol eine große Bedeutung für den Aufbau und die Struktur plastidärer Membranen zu.

A



B



**Abb. 1 Chemische Strukturen von Phytol und Phytylderivaten**

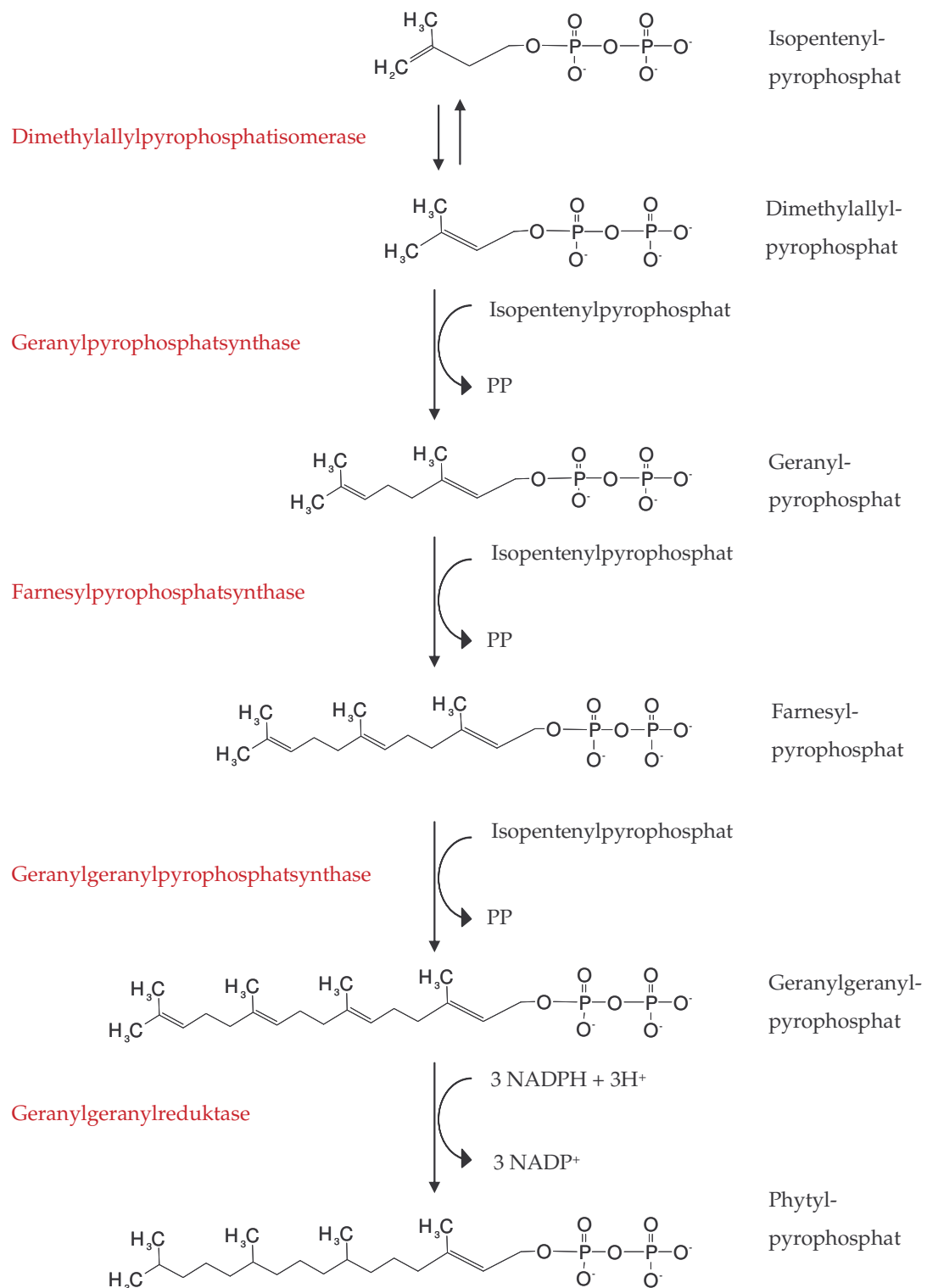
Gezeigt sind das *cis*- und das *trans*-Isomer des Phytols (A) und die Phytylderivate Chlorophyll, Fettsäurephytylester, Phyllochinon und  $\alpha$ -Tocopherol (B).



### 1.3 Die *de novo*-Synthese von Phytylpyrophosphat

Die Vorstufen aller Isoprenoide sind Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat. Letzteres entsteht aus einer Isomerisierungsreaktion des Isopentenylpyrophosphats. In höheren Pflanzen gibt es zwei Synthesewege für die Bildung von Isopentenylpyrophosphat, den cytosolischen Acetat-Mevalonat-Weg und den plastidären 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Weg. Während aus dem cytosolischen Isoprenoidsyntheseweg hauptsächlich die Isoprenoide zur Synthese der Sterole und von Ubichinon hervorgehen (Disch *et al.*, 1998), werden die Vorstufen von Phytol über den plastidären Isoprenoidsyntheseweg synthetisiert (Arigoni *et al.*, 1997). Dabei wird Pyruvat decarboxyliert und auf ein Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen. Das Produkt ist 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat. Über eine Folge von weiteren Reaktionen entsteht Isopentenylpyrophosphat bzw. Dimethylallylpyrophosphat. Die Prenyltransferase Geranylpyrophosphatsynthase katalysiert aus den Vorstufen Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat eine Kopf-Schwanz-Addition und es entsteht zunächst das C<sub>10</sub>-Isoprenoid Geranylpyrophosphat. Farnesylpyrophosphatsynthase katalysiert die Synthese des C<sub>15</sub>-Isoprenoids Farnesylpyrophosphat durch Bildung von Geranylpyrophosphat als Zwischenprodukt. Analog erfolgt die Synthese des C<sub>20</sub>-Isoprenoids Geranylgeranylpyrophosphat durch die Geranylgeranylpyrophosphatsynthase (Abb. 2). Unter Verbrauch von 3 Reduktionsäquivalenten NADPH+H<sup>+</sup> wird Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytylpyrophosphat durch die Aktivität der Geranylgeranylreduktase reduziert (Heldt, 1999).

Studien mit Anwendung der Inhibitoren Lovastatin und Fosmidomycin, welche spezifisch den cytosolischen bzw. den plastidären Isoprenoidsyntheseweg hemmen, zeigten, dass die Inhibierung des cytosolischen Weges durch die plastidäre Isoprenoidsynthese kompensiert werden kann, jedoch nicht umgekehrt (Laule *et al.*, 2003). Aufnahmeexperimente mit isolierten Chloroplasten und Hüllmembranvesikeln demonstrierten, dass Isopentenyldiphosphat und Geranylpyrophosphat über die Hüllmembran in das Cytosol transportiert werden können. Der Transport scheint an einen für einige Prenylpyrophosphate spezifischen Prenylpyrophosphattransporter gebunden zu sein, und wird durch einen Protonengradienten und Calciumionen stimuliert (Bick und Lange, 2003).



**Abb. 2 Biosynthese von Phytylpyrophosphat**

Gezeigt ist die Biosynthese von Phytylpyrophosphat ausgehend von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat, welche aus dem plastidären 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Weg resultieren. Die an der Synthese beteiligten Enzyme sind rot dargestellt.

## 1.4 Phytol ist Bestandteil des Photosynthesepigmentes

### Chlorophyll

Chlorophylle sind die wichtigsten lichtabsorbierenden Pigmente in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Sie besitzen eine polycyclische planare Struktur und stellen ein heterocyclisches System aus fünf Ringen dar (Abb. 1 B). Vier dieser Ringe sind Pyrrolringe, deren Stickstoffatome  $Mg^{2+}$  als Zentralatom konjugieren. Am Pyrrolring IV befindet sich eine Phytylseitenkette, die mit der Carboxylgruppe verestert ist. Chlorophyll ist ein stark konjugiertes System und absorbiert daher im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums. In Pflanzen gibt es zwei Arten von Chlorophyll, das Chlorophyll a und das Chlorophyll b. Im Chlorophyll b befindet sich am Pyrrolring II anstelle der Methylgruppe eine Aldehydgruppe. Daher sind die Absorptionsspektren der beiden Chlorophylle etwas verschieden und ergänzen sich. Für gewöhnlich enthalten Pflanzen etwa drei Mal soviel Chlorophyll a wie Chlorophyll b. Zusammen mit einem Proteinkomplex und fest gebundenen Chinonen sind Chlorophylle Bestandteile der Photosynthesezentren und der Lichtsammelkomplexe. Lichtenergie wird in den Lichtsammelkomplexen absorbiert und durch Resonanzenergieübertragung an die Reaktionszentren der Photosysteme weitergeleitet. Dort erfolgt die Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie. Während der größte Teil des Chlorophylls a in den Photosynthesezentren vorliegt, befindet sich Chlorophyll b hauptsächlich in den Lichtsammelkomplexen (Lehninger *et al.*, 1998).

Nach Heldt *et al.*, (1999) katalysiert Chlorophyllsynthetase den letzten Schritt innerhalb der Chlorophyllsynthese mit den Substraten Phytylpyrophosphat und Chlorophyllid. Bereits Forschungsergebnisse aus den 80er Jahren haben jedoch die Frage aufgeworfen, ob nicht Geranylgeranylpyrophosphat das Substrat der Chlorophyllsynthetase ist (Tanaka *et al.*, 1999; Soll *et al.*, 1983; Soll und Schultz, 1981; Shibata *et al.*, 2004 a; Shibata *et al.*, 2004 b; Rüdiger *et al.*, 1980; Keller *et al.*, 1998). In diesem Fall entsteht Geranylgeranyl-Chlorophyll als Zwischenprodukt und Geranylgeranylreduktase katalysiert die Reduktion zu Chlorophyll. Keller *et al.* (1998) demonstrierten, dass Geranylgeranylreduktase sowohl Geranylgeranylpyrophosphat als auch Geranylgeranyl-Chlorophyll reduzieren kann. Daher wurde vorgeschlagen, dass Geranylgeranylreduktase die Synthese von Phytylpyrophosphat aus Geranylgeranylpyrophosphat und von Chlorophyll aus Geranylgeranyl-Chlorophyll

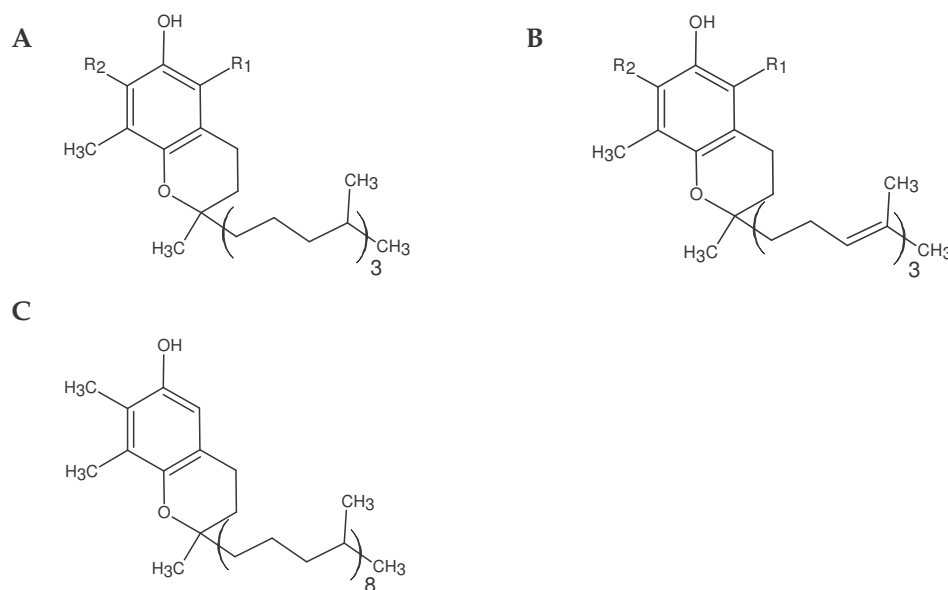
katalysiert und somit sowohl in der Hüllmembran als auch in der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Bereits Soll und Mitarbeiter schlugen vor, dass innerhalb der Hüllmembran die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat und innerhalb der Thylakoidmembran die Reduktion von Geranylgeranyl-Chlorophyll stattfindet (Soll *et al.*, 1983).

## **1.5 Phytylpyrophosphat ist Substrat für die Tocopherol (Vitamin E)-Synthese**

### **1.5.1 Struktur, Vorkommen und Bedeutung von Tocopherol**

Die Tocopherole gehören zusammen mit den Tocotrienolen und Plastochromanol zur Vitamin E-Gruppe. Alle bestehen aus einer polaren Kopfgruppe, dem Chromanolring, und einer hydrophoben Seitenkette, die diesen Lipiden amphipathische Eigenschaften verleihen. Sie unterscheiden sich in der Art der hydrophoben Seitenkette und tragen verschiedene Kopfgruppen. Die Tocopherole besitzen am Chromanolring eine gesättigte und die Tocotrienole eine ungesättigte C<sub>16</sub>-Isoprenoidseitenkette. Die Tocopherole und die Tocotrienole kommen in jeweils vier Formen vor, und zwar in der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - bzw.  $\delta$ -Form. Unterschieden werden diese durch die Anzahl und Stellung von Methylgruppen am Chromanolring (Abb. 3). Sie besitzen in ihren Seitenketten Chiralitätszentren, jedoch kommen in der Natur nur die Stereoisomere in der *R*-Konfiguration vor (Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996).

Im Jahre 1922 benannten Evans und Bishop Tocopherol erstmals als Vitamin und brachten es als wichtigen Faktor mit der Fortpflanzung von Tieren in Verbindung (Evans und Bishop, 1922). Erst 40 Jahre später wurden antioxidative Eigenschaften des Tocopherols erkannt (Tappel, 1962). Die heute weitgehend akzeptierte Hypothese besagt, dass es mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranen vor oxidativem Abbau schützt (Fryer, 1992). Die genaue Wirkungsweise des Tocopherols ist jedoch noch unbekannt.



Tocopherol/ Tocotrienol	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
$R_1$	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	H	H
$R_2$	$\text{CH}_3$	H	$\text{CH}_3$	H

### Abb. 3 Struktur der Tocochromanole

Dargestellt sind die Strukturformeln der (A) Tocopherole, (B) Tocotrienole und (C) des Plastochromanols.

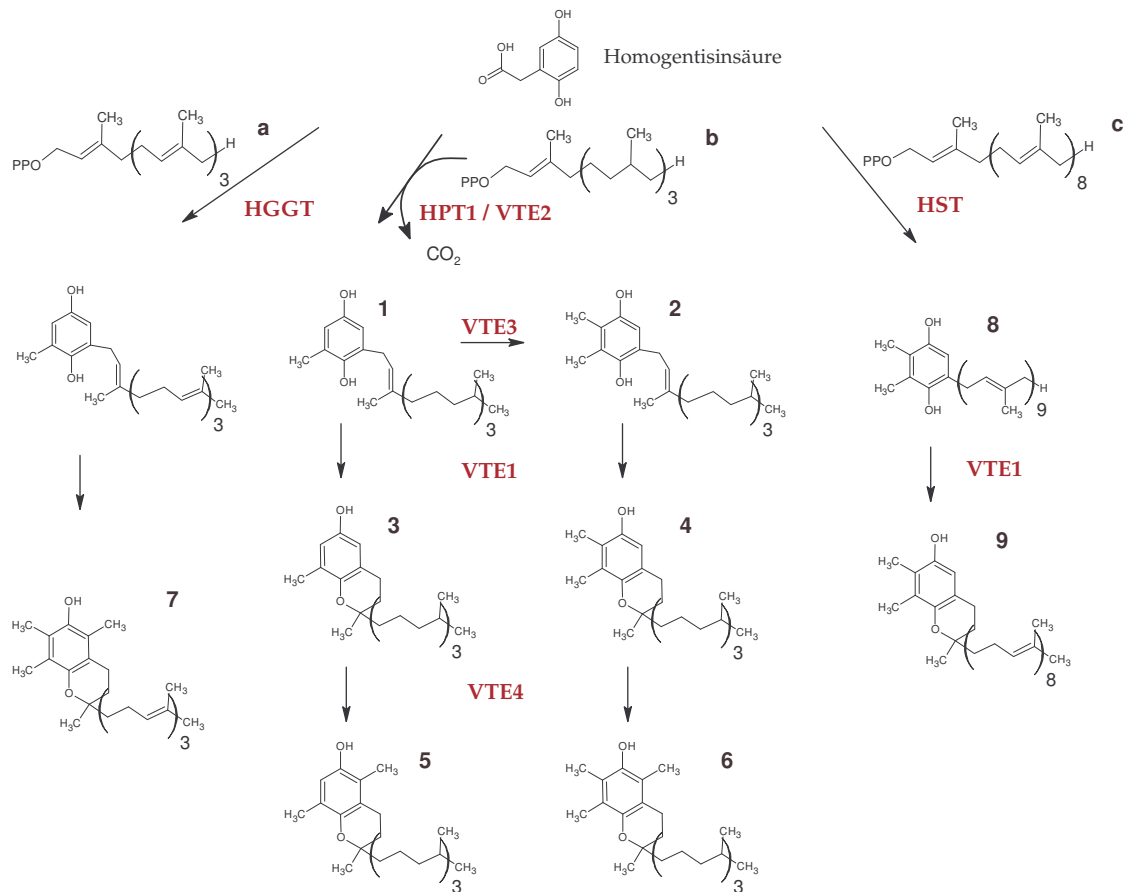
Da meist ausreichende Mengen an Vitamin E mit der Nahrung z.B. in Form von pflanzlichen Ölen aufgenommen werden, treten Mangelerscheinungen beim Menschen selten auf (Brigelius-Flohé und Traber, 1999). Ungenügende Versorgung ist eher auf Defekte im Transport- und Verteilungsmechanismus zu den entsprechenden Geweben zurückzuführen. Studien, in denen die Aufnahme verschiedener stereoisomerer Tocopherole in Ratten analysiert wurde, zeigten eine bevorzugte Resorption von  $R,R,R$ - $\alpha$ -Tocopherol (Azzi und Stocker, 2000). Tatsächlich existiert in der Leber ein  $\alpha$ -Tocopherol-Transferprotein ( $\alpha$ -TTP), welches spezifisch die Verteilung von  $R,R,R$ - $\alpha$ -Tocopherol in extra-hepatisches Gewebe unterstützt (Brigelius-Flohé und Traber, 1999). Genetische Defekte im Gen des  $\alpha$ -TTP haben eine unzureichende Verteilung von  $\alpha$ -Tocopherol zur Folge, was zu einem stark reduzierten Tocopherolgehalt führt. Symptome einer Vitamin-E-Defizienz sind z. B. Störungen der Gehirnfunktion,

Reproduktionsstörungen, embryonaler Abort und Missbildungen der Muskulatur, Leber und Knochenmark (Brigelius-Flohé und Traber, 1999). Vitamin E-Mangel führte in Ratten zu Unfruchtbarkeit und embryonalem Tod (Evans und Bishop, 1922). Während Pflanzen und andere photosynthetisch aktive Organismen meist in der Lage sind, Tocopherol zu synthetisieren (Munné-Bosch und Alegre, 2002; Fryer, 1992) ist die Aufnahme dieses Vitamins für Säuger essentiell. Der Gehalt an Tocopherol ist abhängig von der Spezies, den Wachstumsbedingungen und dem Entwicklungsstadium der Pflanze und erhöht sich mit zunehmendem Alter (Tramontano *et al.*, 1992; Rise *et al.*, 1989; Molina-Torres und Martinez, 1991; Grusak und DellaPenna, 1999). Oft stellt die  $\alpha$ -Form den Hauptanteil am Gesamttocopherol in Blättern dar (Munné-Bosch und Alegre, 2002; Hofius und Sonnewald, 2003). Samen besitzen meist mehr Tocopherol als Blätter und der Anteil an  $\alpha$ -Tocopherol ist oft sehr gering. In Samen von *Arabidopsis* dominiert  $\gamma$ -Tocopherol (Shintani und DellaPenna, 1998). Die Formen  $\beta$ - und  $\delta$ -Tocopherol treten stress- und seneszenzbedingt auf und sind in *Arabidopsis* unter Standardwachstumsbedingungen nur in geringen Mengen detektierbar (Bergmüller, 2003). Tocotrienole sind oft nur in den Samen von Monokotyledonen nachweisbar, jedoch nicht in Blättern (Munné-Bosch und Alegre, 2002; Grusak und DellaPenna, 1999). Die Überexpression einer samenspezifischen Homogentisatgeranylgeranyltransferase aus Gerste in Tabak und *Arabidopsis* führte zur Akkumulation von Tocotrienolen in den transgenen Pflanzen (Cahoon *et al.*, 2003). Rippert und Mitarbeiter konnten in *Arabidopsis* Tocotrienole nach Co-Expression der Prephenatdehydrogenase aus Hefe und der *Arabidopsis-p*-Hydroxyphenylpyruvat-dioxygenase nachweisen (Rippert *et al.*, 2004). Innerhalb des Shikimatweges katalysiert Prephenatdehydrogenase die Umsetzung von Prephenat zu Hydroxyphenylpyruvat. Dieses wird dann durch die *p*-Hydroxyphenylpyruvat-dioxygenase zu Homogentisat umgesetzt.

Plastochromanol bezeichnet die bisher kaum untersuchte neunte Vitamin E-Form. Plastochromanol ist am Chromanolring kovalent mit einer ungesättigten Octaprenylseitenkette gebunden. Es geht aus dem Elektronenüberträger des Photosystems II Plastochinon hervor. Katalysiert wird die Reaktion durch die Tocopherolzyklase VTE1, einem Enzym des Tocopherolsyntheseweges (Abb. 4). In Blättern ist der Anteil von Plastochromanol mit etwa 13 mol % am Gesamttocochromanolgehalt in *A. thaliana* gering. Ebenso wie die Tocopherole steigt Plastochromanol unter Stress und während der Seneszenz an (Zbierzak *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Die Biosynthese von Tocopherol

Zur Synthese von Tocopherol werden Zwischenprodukte aus zwei Stoffwechselwegen benötigt (Abb. 4). Phytylpyrophosphat ist ein Zwischenprodukt des plastidären Isoprenoidsyntheseweges (Arigoni *et al.*, 1997). Aus dem Shikimatsyntheseweg stammt die Homogentisinsäure, welche mit Phytylpyrophosphat zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon reagiert. Die Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Homogentisatphytyltransferase HPT1/VTE2 (Savidge *et al.*, 2002). Es kann nun 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon zu 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon methyliert werden, oder es findet ein Zyklisierungsschritt statt, wobei  $\delta$ -Tocopherol entsteht. Die Reaktion wird durch die 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon-Methyltransferase (VTE3) katalysiert mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppdonor (Van Eenennaam *et al.*, 2003; Soll und Schultz, 1980; Cheng *et al.*, 2003). Durch Bildung eines zweiten Ringes wird 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon zu  $\gamma$ -Tocopherol umgesetzt. Sowohl die Synthese von  $\delta$ -Tocopherol, als auch von  $\gamma$ -Tocopherol erfolgt durch das Enzym Tocopherolzyklase VTE1 (Porfirova *et al.*, 2002). Beide Tocopherolformen werden nochmals methyliert, so dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocopherol entstehen. Dieser letzte Schritt wird durch die  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase VTE4 katalysiert (Shintani und DellaPenna, 1998; Bergmüller *et al.*, 2003), mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppdonor (Soll *et al.*, 1980). Homogentisinsäure ist ebenso Ausgangsprodukt zur Synthese von Tocotrienol, Plastochromanol und Plastochinol. In diesen Fällen kondensiert Homogentisinsäure mit Geranylgeranylpyrophosphat bzw. Solanesylpyrophosphat, welche ebenfalls aus dem plastidären Isoprenoidsyntheseweg stammen (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Arigoni *et al.*, 1997).



**Abb. 4 Tocopherolbiosynthese**

Homogentisinsäure ist Ausgangssubstanz zur Synthese der vier Tocopherolformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (6, 5, 4 und 3), der Tocotrienole (7), Plastochinol (8) und Plastochromanol (9). Die entsprechenden Prenylpyrophosphate sind Geranylgeranylpyrophosphat (a), Phytylpyrophosphat (b) bzw. Solanesylpyrophosphat (c). Die Synthese der Tocotrienole ist nur angedeutet. Weitere Intermediate bzw. Enzyme sind (1) 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon, (2) 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon, (HGGT) Homogentisatgeranylgeranyltransferase, (HST) Homogentisatsolanesyltransferase.

## 1.6 Phytol ist Bestandteil der Fettsäurephytylester

Fettsäurephytylester sind Fettsäureester mit dem Diterpen-Alkohol Phytol (Abb. 1 B). Diese Lipidklasse wurde bisher kaum charakterisiert. Sie wurden erstmals in Gerste von Liljenberg analysiert (Liljenberg, 1977). Es konnten insbesondere gesättigte bzw. einfach ungesättigte mit Phytol veresterte Fettsäuren nachgewiesen werden, hauptsächlich jedoch Palmitinsäure (16:0)-phytylester. Des Weiteren wurden sie in



Bakterien (Rontani *et al.*, 1999), Moosen (Buchanan *et al.*, 1995), Dinoflagellaten (Cranwell *et al.*, 1990) und einigen höheren Pflanzen (Pereira *et al.*, 2002; Peisker *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1984) gefunden. Patterson und Mitarbeiter beschrieben eine Mutante von *A. thaliana*, welche, im Gegensatz zum Wildtyp, unter Abkühlung Phytylester mit mittelkettigen, gesättigten Fettsäuren und Hexadecatriensäure (16:3)-phytylester akkumulieren (Patterson *et al.*, 1993). Die Anreicherung dieser Ester wird mit massivem Chlorophyllabbau in dieser Mutante in Zusammenhang gebracht. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass unter Standardwachstumsbedingungen Fettsäurephytylester kaum nachweisbar sind, aber vor allem unter Stressbedingungen und in der Seneszenz akkumulieren (Ischebeck *et al.*, 2006; Gaude *et al.*, 2007). In Blattgewebe von *A. thaliana* wurden Phytylester gesättigter, mittel- bis langkettiger Fettsäuren, wie der Caprinsäure (10:0), Laurinsäure (12:0), Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Hexadecatriensäure (16:3<sup>Δ7,10,13</sup>), Ölsäure (18:1<sup>Δ9</sup>) und α-Linolensäure (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) identifiziert. In *Arabidopsis* akkumulieren unter Stressbedingungen hauptsächlich Hexadecatriensäurephytylester. Da Hexadecatriensäure zum großen Teil in dem Galactolipid Monogalactosyldiacylglycerol vorkommt und dieses Lipid unter Stickstoffmangelbedingungen im Vergleich zu Standardwachstumsbedingungen reduziert ist, wurde gefolgert, dass die Hexadecatriensäure aus dem stress- bzw. seneszenzbedingten Galactolipidabbau stammt. Dagegen sind die gesättigten Fettsäuren wahrscheinlich Intermediate der plastidären Fettsäuresynthese und werden mit Phytol verestert (Gaude *et al.* 2007). Durch Fraktionierung der Chloroplastenmembranen konnten Fettsäurephytylester hauptsächlich in den Plastoglobuli und zum geringeren Anteil in der Thylakoidmembran und den Chloroplastenhüllmembranen nachgewiesen werden (Gaude *et al.*, 2007). Durch Fütterungsexperimente von Keimlingen von *A. thaliana* mit Phytol wurde gezeigt, dass es neben Tocopherol und Chlorophyll hauptsächlich in Form von Fettsäurephytylestern eingebaut wird (Ischebeck *et al.*, 2006). Ischebeck und Mitarbeiter zeigten ferner, dass die Synthese der Fettsäurephytylester durch Zugabe von Phytol und Acyl-CoA *in vitro* stimuliert werden kann. Eine entsprechende Acyltransferaseaktivität zur Synthese, wie auch die Funktion der Fettsäurephytylester, sind bisher noch unbekannt. Es wird vermutet, dass freies Phytol und Fettsäuren aus dem Lipidabbau in Form von Fettsäurephytylestern in den Plastoglobuli gespeichert werden. Gaude *et al.*, (2007) zeigte anhand von elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blattgewebe nach Stickstoffmangelstress, dass gerade die Größe der Plastoglobuli unter diesen Bedingungen stark zunimmt.

## 1.7. Phyllochinon enthält eine Phytylseitenkette

Phyllochinon (Vitamin K<sub>1</sub>) gehört zur Gruppe der Vitamin-K-Lipide. Es besitzt eine 2-Methyl-1,4-naphthochinon-Kopfgruppe und trägt eine Phytylseitenkette (Abb. 1 B). Weitere Vitamine dieser Gruppe sind das von unter andere *E. coli* produzierte Menachinon (Vitamin K<sub>2</sub>) und das synthetische Menadion (Vitamin K<sub>3</sub>). Diese K-Vitamine besitzen ebenfalls eine 2-Methyl-1,4-naphthochinon-Kopfgruppe. Während die Isoprenoidgruppe von Vitamin K<sub>2</sub> verschieden lang und ungesättigt sein kann, ist Vitamin K<sub>3</sub> nicht prenyliert (Lehninger *et al.*, 1998). Vitamin K<sub>3</sub> wird als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt, da es nach Aufnahme im Menschen prenyliert werden kann.

Vitamin K<sub>1</sub> ist für Menschen essentiell. Es dient als Cofaktor bei der  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutamatresten verschiedener Proteine. Zu diesen Proteinen gehören wichtige Proteinfaktoren in der Blutgerinnung. Eine Unterversorgung mit Vitamin K<sub>1</sub> durch z.B. einseitige Ernährung kann daher zu Störungen in der Blutgerinnung führen.

Phyllochinon kommt in allen grünen Pflanzengeweben und in Blaualgen vor und ist integraler Bestandteil des Photosystems I. Es dient dort als Elektronenüberträger innerhalb der photosynthetischen Redoxkette und nimmt Elektronen vom Chlorophyll-Dimer A<sub>0</sub> auf und überträgt es auf Ferredoxin (Biggins und Mathis, 1988). Lohmann (2005) zeigte, dass in *Arabidopsis* unter Hitzestress keine Veränderung der Phyllochinonmenge eintritt. Unter Hochlichtstress nimmt der Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> zunächst um etwa 50 % zu, fällt dann jedoch auf das Ausgangsniveau zurück. Dies wird auf eine kurzfristige vermehrte Bildung einzelner Photosystemkomponenten unter Stressbedingungen zurückgeführt.

## 1.8 Der Abbau von Chlorophyll

Chlorophyllabbau kann während verschiedener Lebensphasen der Pflanzen erfolgen, so z.B. unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Nährstoffmangel (Gaude *et al.*, 07), Starklicht und Pathogenbefall und letztendlich in der Seneszenz. Aber auch unter Standardwachstumsbedingungen findet zu jeder Zeit Chlorophyll-*turnover* statt (Takamiya *et al.*, 2000). Da es durch Überreduktion der Photosynthesezentren zur

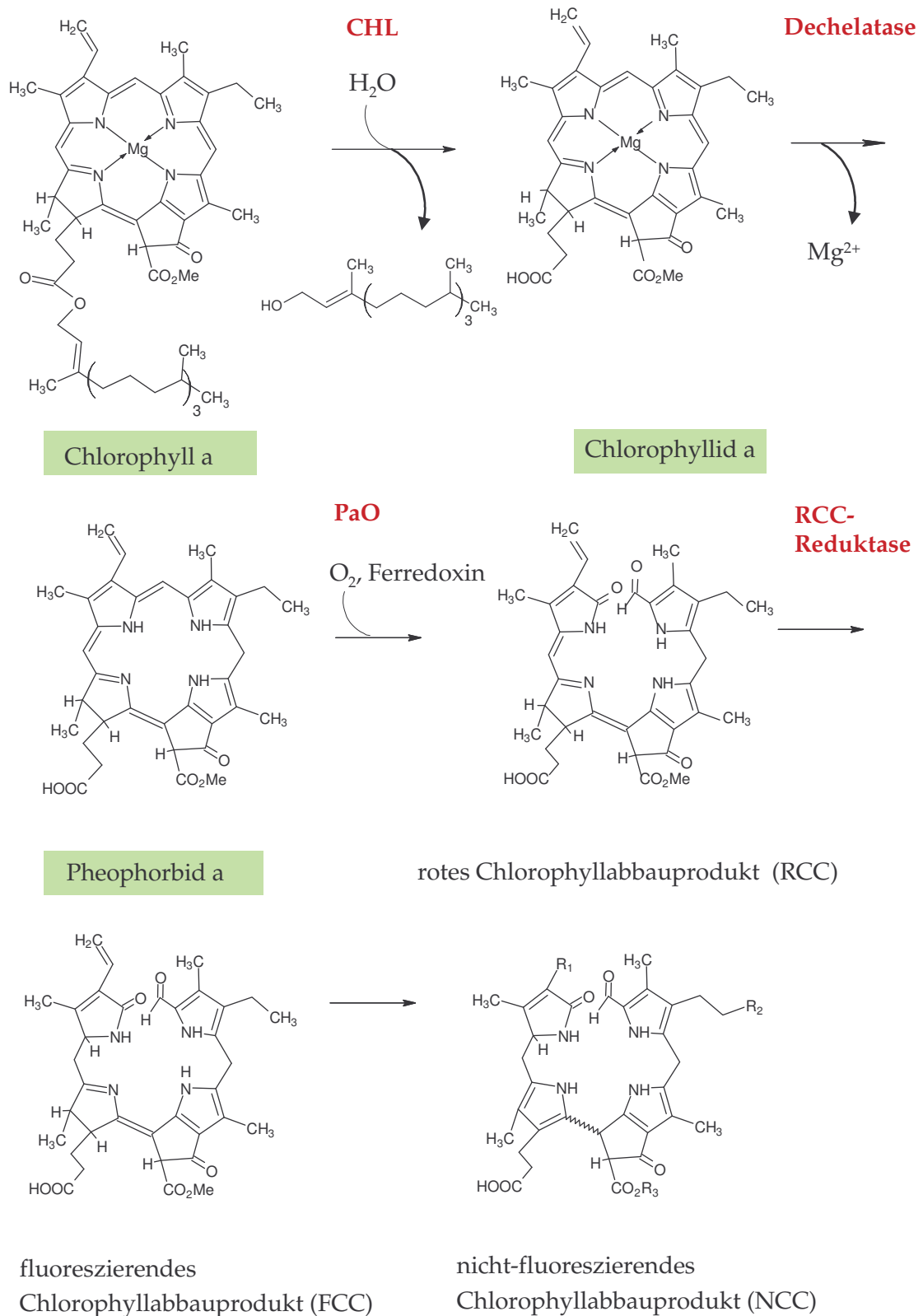
Bildung zellschädigender reaktiver Sauerstoffspezies kommen kann, wird der Chlorophyllabbau unter Stress bzw. in der Seneszenz als für die Pflanze essentiell betrachtet (Matile *et al.*, 1999; Hörtensteiner, 2004). Im Zuge dessen wird das stark konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem abgebaut, wodurch die Absorptionseigenschaften des Chlorophylls verloren gehen. Es wird zu nicht fluoreszierenden Verbindungen abgebaut (Pružinska *et al.*, 2005; Kräutler *et al.*, 1991), und diese Abbauprodukte werden in der Vakuole gespeichert (Matile *et al.*, 1988; Hinder *et al.*, 1996).

Der erste Schritt ist die Hydrolyse des Chlorophylls durch die Aktivität der Chlorophyllase (CHL; Abb. 5). Es entstehen Chlorophyllid und Phytol. Da ab diesem Schritt bisher ausschließlich Abbauprodukte des Chlorophylls a detektiert werden konnten (Pružinska *et al.*, 2003; Ginsburg *et al.*, 1994), wird angenommen, dass entweder Chlorophyll b oder Chlorophyllid b durch die Aktivität der Chlorophyll-b-Reduktase (Tanaka *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1996) zu Chlorophyll a bzw. Chlorophyllid a reduziert wird. Die Entfernung des Zentralatoms  $Mg^{2+}$  wird durch eine Magnesiumdechelatase katalysiert. Das Produkt ist Pheophorbid a. Pheophorbid-a-Oxygenase (PAO1; At3g44880, Pružinska *et al.*, 2003) katalysiert die oxygenolytische Öffnung des Tetrapyrrolringsystems zwischen den Pyrrolringen I und II. Pheophorbid-a-Oxygenase ist eine Monooxygenase, da nur ein Sauerstoffatom des für die Katalyse notwendigen Sauerstoffs übertragen wird (Hörtensteiner *et al.*, 1998). Außerdem weist es eine Substratspezifität für Pheophorbid a auf, während Pheophorbid b die Katalyse inhibiert (Pružinska *et al.*, 2003). Pheophorbid-a-Oxygenase aus *Arabidopsis* (AtPaO) konnte an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert werden (Matile und Schellenberg, 1996). Die *Arabidopsis*-Mutante *pao1* akkumuliert hohe Mengen an Pheophorbid a und zeigt nach Dunkelbehandlung einen *staygreen*-Phänotyp (Pružinska *et al.*, 2005). Das Produkt der PaO-katalysierten Reaktion ist das Rote Chlorophyllabbauprodukt (RCC), welches jedoch sofort durch die Aktivität einer spezies- und stereospezifischen RCC-Reduktase (Rodoni *et al.*, 1997) zu einem fluoreszierenden Chlorophyllkatabolit (FCC) reduziert wird. Daher akkumuliert RCC *in vivo* nicht. RCC-Reduktase ist im Stroma lokalisiert (Rodoni *et al.*, 1997). Die PaO/RCC-Reduktase-katalysierte Öffnung des Tetrapyrrolringsystems ist abhängig von Ferredoxin (Ginsburg *et al.*, 1994) und führt zum Verlust der lichtabsorbierenden Eigenschaften von Chlorophyll. Die Umwandlung des FCC in nicht-fluoreszierende Chlorophyllkataboliten (NCC) erfolgt speziesabhängig, wobei die FCCs hydroxyliert bzw. mit einer Glucosyl- oder Malonylgruppe konjugiert werden können (Mühlecker

und Kräutler, 1996). Es konnten z.B. aus *A. thaliana* fünf, aus *Brassia napus* vier und aus *Zea mays* zwei verschiedene NCCs identifiziert werden (Hörtensteiner, 2006). Mit Hilfe eines ATPase-gekoppelten Transportsystems werden die NCCs in die Vakuole transportiert (Hinder *et al.*, 1996). Dort findet aufgrund des sauren Mediums eine nichtenzymatische Tautomerisierung der NCCs statt (Oberhuber *et al.*, 2003).

### 1.8.1 Identifizierung und Klonierung der *Chlorophyllase*

Im Jahre 1999 konnte *Chlorophyllase* (Chlorophyll-Chlorophyllido-hydrolase, EC 3.1.1.14) aus *A. thaliana*, *Chenopodium album* (Tsuchiya *et al.*, 1999) und *Citrus sinensis* (Jacob-Wilk *et al.*, 1999) identifiziert und kloniert werden. Für die *Chlorophyllase* konnten in *A. thaliana* bisher zwei Gene identifiziert werden, nämlich *Chlorophyllase1* (*AtCHL1*, At1g19670) und *Chlorophyllase2* (*AtCHL2*, At5g43860). Tsuchiya und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass die Expression der *AtCHL1*-mRNA in Blättern durch Behandlung mit dem seneszenz- und stressregulierendem Phytohormon Methyljasmonat induziert wird, während *AtCHL2* schwach, aber konstitutiv exprimiert ist. Durch Isolation der Mutante *coi1*, welche unsensibel gegenüber Methyljasmonat und dem Phytotoxin Coronatin ist, wurde bereits im Jahre 1988 *AtCOR11* (coronatine-induced, =*AtCHL1*) (Benedetti *et al.*, 1998) beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt war die Funktion dieses Gens jedoch noch unbekannt. Mittels Northern-Blot-Analyse zeigten Benedetti *et al.*, (1998), dass *AtCHL1*-mRNA in Keimlingen, Blättern, Blüten und Samen, jedoch nicht in Wurzeln exprimiert wird. Später wurde durch Southern-Blot-Analyse von *reverse*-transkriptierter RNA gezeigt, dass in Blüten, Knospen und Blättern auch *AtCHL2*-mRNA vorhanden ist (Benedetti und Arruda, 2002). Die Expression von *AtCHL2* war in Blüten und Knospen stärker als in Blättern.



**Abb. 5 Schematische Darstellung des Chlorophyllabbauweges**

Der Abbau des Chlorophylls, beginnend mit Chlorophyll a, ist bis zur speziesbedingten Bildung der nicht-fluoreszierenden Chlorophyllabbauprodukte dargestellt. Die bisher bekannten Enzyme sind rot markiert.

### 1.8.2 Lokalisation der Chlorophyllasen

Chlorophyllase wurde aus diversen Spezies, wie der Alge *Chlorella*, der Zitrusfrucht, aus *Chenopodium* und *Pheodactylum* isoliert (Tsuchiya *et al.*, 1997; Trebitsh *et al.*, 1993; Shioi und Sasa, 1986). Es wurde vorgeschlagen, dass Chlorophyllase aus *Arabidopsis*, ebenso wie Chlorophyllase aus Gerste und Zitrusfrucht an der inneren Hüllmembran lokalisiert ist (Matile *et al.*, 1997; Brandis *et al.*, 1996). Doch nach Analyse der Aminosäuresequenz konnten keine Sequenzbereiche identifiziert werden, welche auf eine Membranssoziation hinweisen. Während AtCHL2 am N-Terminus eine Transitpeptidsequenz für den Import in den Chloroplasten besitzt und daher wahrscheinlich im Chloroplasten lokalisiert ist, konnte keine Chloroplast-Transitsequenz für AtCHL1 identifiziert werden (Tsuchiya *et al.*, 1999). Aufgrund der Aminosäuresequenz scheint AtCHL1 ein lösliches Protein zu sein. Diese Annahme wird gestützt durch Aktivitätsstudien mit rekombinantem Protein. Um Chlorophyllasaktivität zu detektieren, war die Zugabe eines Detergenzes nicht nötig (Tsuchiya *et al.*, 1997; Benedetti und Arruda 2002). Es scheint sicher, dass keine der beiden Chlorophyllasen aus *Arabidopsis* mit der Thylakoidmembran assoziiert ist, da ansonsten vorzeitig der Abbau des Chlorophylls durch Chlorophyllase eingeleitet werden würde (Matile *et al.*, 1999). Es wird ein Transportmechanismus diskutiert, bei welchem Chlorophyll aus der Thylakoidmembran in Vesikeln zur Chlorophyllase transportiert wird. Eine extraplastidäre Lokalisation von insbesondere AtCHL1 wird nicht ausgeschlossen (Tsuchiya *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass Chlorophyllase aus *Chenopodium album* (CaCHL1) posttranslational am N-Terminus glycosyliert wird, was darauf schließen lässt, dass Chlorophyllase über das endoplasmatische Retikulum transportiert wird (Tsuchiya *et al.*, 1997). Guiamét und Mitarbeiter fanden heraus, dass aus Gerontoplasten der Sojabohne große chlorophyllbeladene Plastoglobuli durch die Hüllmembran in das Cytosol transportiert werden (Guiamét *et al.*, 1999). Auf diese Weise könnte das Substrat Chlorophyll zum Enzym Chlorophyllase gelangen.

### 1.8.3 Identifizierung von *staygreen*-Mutanten

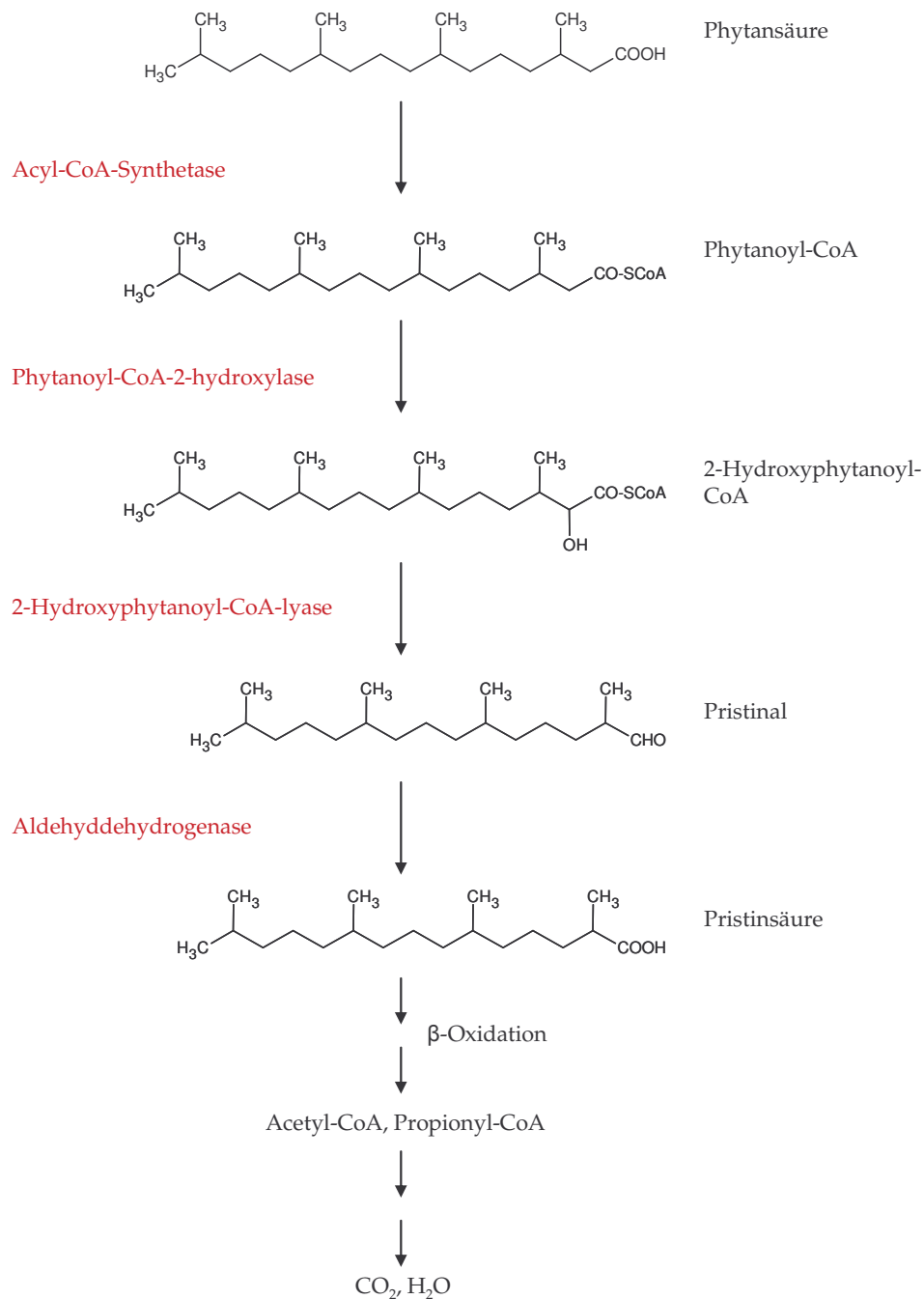
Der *staygreen*-Phänotyp beschreibt eine Retention des Chlorophylls in seneszenten Blättern. Es konnten bisher diverse Mutanten identifiziert werden, welche einen ausgeprägten *staygreen*-Phänotyp aufweisen. Biochemische Untersuchungen der Mutanten ließen jedoch auf unterschiedliche Mutationen schließen. So isolierte bereits

Mendel im Jahre 1866 eine solche Mutante aus Erbse (*Pisum sativum*) (Mendel, 1866), und Thomas und Mitarbeiter konnten eine verminderte Aktivität der Pheophorbid-a-Oxygenase feststellen (Thomas *et al.*, 1996). Der gleiche Locus ist in der *staygreen*-Mutante von *Festuca pratensis* betroffen (Vicentini *et al.*, 1995). Dieser Locus (*SGR*, At4g22920) konnte auf Chromosom fünf von *Arabidopsis* lokalisiert werden (Armstead *et al.*, 2007), die Funktion ist jedoch noch unbekannt. Es wird ein regulatorisches Gen der Pheophorbid-a-Oxygenase vermutet. Weitere *staygreen*-Mutanten konnten von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Akhtar *et al.*, 1999), der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) (Fang *et al.*, 1998) und aus Reis (*Oryza sativa*) (Kusaba *et al.*, 2007) isoliert werden. Die Chlorophyllretention in der Reismutante wird auf verminderten Chlorophyll-b-Abbau und auf Stabilisierung des Lichtsammelkomplexes II zurückgeführt. In der Tat konnte für einige *staygreen*-Mutanten gezeigt werden, dass in diesen Linien der Abbau des Lichtsammelkomplexes II in der Seneszenz inhibiert ist (Park *et al.*, 2007; Kusaba *et al.*, 2007; Bachmann *et al.*, 1994; Akhtar *et al.*, 1999).

## 1.9 Der Verbleib von Phytol

Unter Stressbedingungen und in der Seneszenz kommt es zu massivem Chlorophyllabbau (Hörtensteiner, 2006; Gaude *et al.*, 2007), und dabei werden große Mengen an Phytol freigesetzt. Während der Abbau des Tetrapyrrolringsystems intensiv erforscht wurde (Hörtensteiner, 2006), ist wenig bekannt über den Verbleib von Phytol. Anhand von Analysen von seneszentem Blattmaterial von Petersilie (*Petroselinum sativum*) und Hafer (*Avena sativa*) konnten Photooxidationsprodukte von freiem als auch Chlorophyll-gebundenem Phytol nachgewiesen werden (Rontani *et al.*, 1996). Über den oxidativen Abbau in Pflanzen ist allerdings wenig bekannt. Aus dem Säugetiersystem weiß man, dass Phytol zunächst zum Aldehyd Phytanal und anschließend zu Phytensäure oxidiert wird. Durch Reduktion der Doppelbindung entsteht Phytansäure (van den Brink *et al.*, 2005). Phytansäure wird dann in den Peroxisomen durch  $\alpha$ -Oxidation zu Pristin säure umgesetzt. Dieses wird anschließend in den Peroxisomen und in den Mitochondrien im Zuge der  $\beta$ -Oxidation, zu Acyl-CoA-Einheiten und letztendlich zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut (Wanders *et al.*, 2003). Die  $\alpha$ -Oxidation von Phytansäure über Phytanoyl-CoA zu Pristin säure ist in Abb. 6 dargestellt. Aufgrund eines genetischen Defektes besitzen Patienten mit dem meist tödlich verlaufenden Zellwegersyndrom keine Peroxisomen, was zum Verlust

peroxisomaler Funktionen führt. Daher weisen diese Patienten unter anderem keine Phytansäure- $\alpha$ -Oxidation auf (Poulus *et al.*, 1984). In der Leber von Patienten der Refsum-Krankheit akkumulieren hohe Mengen an Phytansäure aufgrund der Defizienz der Phytanoyl-CoA-hydroxylase (van den Brink *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 1997). Dies führt unter anderem zu neurologischen Funktionsstörungen, Polyneuritis und vermindertem Sehvermögen ([www.medterms.com](http://www.medterms.com)).



**Abb. 6 Oxidativer Abbau von Phytansäure in Säugetieren**

Dargestellt ist die  $\alpha$ -Oxidation von Phytansäure zu Pristininsäure. Diese wird dann im Zuge der  $\beta$ -Oxidation zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut. Enzyme sind rot markiert.



Ishizaki und Mitarbeiter identifizierten aus *Arabidopsis* eine T-DNA-Insertionsmutante der *Ubichinonreduktase* (ETFQO) (Ishizaki *et al.*, 2005). In Säugetieren ist ETFQO ein mitochondrial lokalisiertes Protein, welches durch das Elektronentransfer-Flavoprotein (ETF) reduziert wird. ETF ist Elektronenakzeptor verschiedener mitochondrial lokalisierter Dehydrogenasen. Das System ETF/ETFQO ist Teil des mitochondrialen Elektronentransportsystems und überträgt hauptsächlich Elektronen, welche aus der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und der Oxidation von Aminosäuren stammen. Im Gegensatz zum Wildtyp akkumulierten in der Mutante *etfqo* nach dunkelinduzierter Seneszenz unter anderem hohe Mengen an Phytanoyl-CoA. Es wurde gefolgert, dass dies, wie auch in Säugetieren, ein Intermediat des oxidativen Phytolabbaus ist. Des Weiteren wurde angenommen, dass der Phytolabbau in Pflanzen ähnlich wie im Säugetiersystem verläuft und, dass das System ETF/ETFQO am oxidativen Abbau von Phytol beteiligt ist (Ishizaki *et al.*, 2006; Ishizaki *et al.*, 2005).

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass freies Phytol in Pflanzen phosphoryliert werden kann und somit für weitere Stoffwechselprozesse zur Verfügung steht. Valentin *et al.* (2006) identifizierten die Mutante *vte5* von *Arabidopsis thaliana*, die nur etwa 20 % des Tocopherolgehaltes des Wildtyps in den Samen aufweist. Der Gehalt an freiem Phytol war in *vte5* um das Dreifache im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Kartierung und Sequenzanalysen des Gens ließen auf eine Phytolkinase (VTE5) schließen. Aufgrund dessen wurde spekuliert, ob freies Phytol, resultierend aus dem Chlorophyllabbau, durch VTE5 phosphoryliert wird und so Eingang in die Tocopherolsynthese findet. Dafür muss Phytolphosphat durch die Aktivität einer weiteren Kinase zu Phytolpyrophosphat phosphoryliert werden, bevor es durch die Aktivität der Homogentisatphytyltransferase (HPT1/VTE2) mit Homogentisat zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon reagiert. Ischebeck *et al.* (2006) zeigten durch Fütterungsexperimente von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Phytol, dass durch die Aktivität von zwei unabhängigen Kinasen Phytol über Phytolphosphat zu Phytolpyrophosphat phosphoryliert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Recyclingmechanismus denkbar, bei dem Phytol in Zwischenprodukte des zentralen Pflanzenmetabolismus, wie z. B. Tocopherol, integriert wird. Rise und Mitarbeiter analysierten den Tocopherol- und Chlorophyllgehalt in verschiedenen seneszierenden Pflanzenspezies und schlugen bereits 1989 vor, dass während der Chlorophyllhydrolyse freigesetztes Phytol in die Tocopherolsynthese Eingang findet (Rise *et al.*, 1989).

## 2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Phytolmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen. Es wurde bisher davon ausgegangen, dass Phytolpyrophosphat zur Synthese der Phytolseitenkette von Tocopherol, Phyllochinon und Chlorophyll ausschließlich über den plastidären Isoprenoidsyntheseweg synthetisiert wird. Aktuelle Forschungsergebnisse geben jedoch Hinweise darauf, dass es einen alternativen Stoffwechselweg gibt, bei welchem freies Phytol in die Biosynthese verschiedener Phytolderivate eingeschleust wird (Valentin *et al.*, 2006; Ischebeck *et al.*, 2006). Da Tocopherolsynthese und Chlorophyllabbau oft zeitgleich einhergehen, wurde bereits 1989 vermutet, dass im Zuge der Chlorophyllhydrolyse freigesetztes Phytol für die Biosynthese von Tocopherol wiederverwertet wird (Rise *et al.*, 1989). Fettsäurephytylester repräsentieren eine weitere Gruppe von Phytolderivaten und gehören auch zu den seneszenzinduzierten Metaboliten (Gaude *et al.*, 2007). Durch Bestimmung von Tocopherol, Phyllochinon, Chlorophyll und Fettsäurephytylester in seneszenten Blättern und in Samen soll zunächst analysiert werden, welche dieser Metabolite über einen alternativen Stoffwechselweg synthetisiert werden können. Weiterhin soll der Nachweis erbracht werden, dass tatsächlich das durch Chlorophyllhydrolyse freigesetzte Phytol in die Synthese anderer Phytolderivate Eingang findet.

Dafür sollen T-DNA-Insertionsmutanten des chlorophyllhydrolysierenden Enzym Chlorophyllase identifiziert werden und diese hinsichtlich *in vivo* und *in vitro* Chlorophyllabbau und Gehalt an Tocopherol und Fettsäurephytylester untersucht werden. Ferner sollen *staygreen*-Mutanten mit vermindertem Chlorophyllabbau nach Dunkelinkubation ebenfalls auf den Gehalt an Chlorophyll und den Phytolderivaten Tocopherol und Fettsäurephytylester analysiert werden.

Um weiteren Einblick in die Bedeutung von Phytol für die Pflanze zu gewinnen, soll eine T-DNA-Insertionsmutante der *Geranylgeranylreduktase* (GGR) untersucht werden. GGR katalysiert die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytolpyrophosphat. Durch Bestimmung von Tocopherol, Phyllochinon und Fettsäurephytylester soll zunächst analysiert werden, ob eine phytolfreie Pflanze identifiziert werden kann und welche Konsequenz diese Mutation auf das Wachstum

hat. Es soll weiterhin geklärt werden, ob die entsprechenden Geranylgeranylderivate nachweisbar sind. Es soll das Geranylgeranylderivat von Chlorophyll nachgewiesen werden, da es ein Zwischenprodukt der Chlorophyllsynthese darstellen könnte. Weiterhin kann auf Substratspezifitäten der am Phytolstoffwechsel beteiligten Enzyme geschlossen werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Arbeitsmaterialien

#### 3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien

Zentrifuge Sorvall® RC-5B Plus	Kendro, Asheville, USA
Tischzentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Variofuge 3.0 R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Centrikon T-1080	Kontron Instruments
Thermocycler T-Gradient	Biomedizinische Analytik GmbH,
Spektrophotometer Genesys™ 10uv	Thermo Electron Corporation, Cambridge,
Probenkonzentrator	Techne Duxford, Cambridge, UK
HPLC-Säulen	Knauer, Berlin
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lichrosper 100-5 Diol, 250 x 3 mm mit Vorsäule</li> <li>• Nucleosil-120-C18, 250 x 3 mm mit Vorsäule</li> <li>• Eurospher-100-C18, 250 x 4,6 mm mit Vorsäule</li> </ul>	
HPLC HP1100 mit Fluoreszenzdetektor (FLD) und Dioden Array Detektor (DAD)	Agilent Technologies, Böblingen
Gaschromatograph HP 6890 mit inertem massenselektivem Detektor 5973 (GC-MS)	Agilent Technologies, Böblingen
GC-Säulen:	
HP-5MS, 0,25 cm x 30 m x 0,25 µm	Agilent Technologies, Böblingen
SP-2380, 30 m x 0,53 mm x 0,2 µm	Supelco, Taufkirchen
Reichert Ultracut S microtome	Labequip LTD., Ontario, Canada
LR White Resin	Agar Scientific Limited, Stansted, UK
CM100 Transmissionselektronenmikroskop	Philips, Zürich
GC/HPLC-Röhrchen + Verschlusskappen	Chromacol LTD, Welwyn Gardencity, USA

### 3.1.2 Kits, Enzyme

Nucleospin®Plant, Mini	Macherey-Nagel, Düren
Wizard®SV Gel and PCR clean-up System	Promega GmbH, Mannheim
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim

Die gebräuchlichsten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Taufkirchen) erworben.

### 3.1.3 Medien

Murashige and Skoog (MS)-Medium wurde zur Keimung von Samen von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Es besteht aus den Komponenten 1 % (w/v) Saccharose, 0,24 % (w/v) Murashige and Skoog-Medium, 0,055 % (w/v) MES sowie 0,7 % (w/v) Select Agar. Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt.

Stickstoffmangelmedium zur Anzucht von *Arabidopsis thaliana* setzt sich zusammen aus 0,8 % (w/v) Agarose, 1 % (w/v) Saccharose, 2,5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 µM Fe-EDTA, 35 µM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 7 µM MnCl<sub>2</sub>, 0,25 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 5 µM NaCl, 5 nM CoCl<sub>2</sub>

YT-Medium diente der Anzucht von *Escherichia coli*. Es setzt sich zusammen aus 0,8 % (w/v) Select Pepton, 14,05 % (w/v) Hefeextrakt sowie 0,5 % (w/v) NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Die Anzucht erfolgte bei 37°C über Nacht.

YEB-Medium diente der Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*. Es besteht aus 0,5 % (w/v) Rindfleischextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton sowie 0,5 % (w/v) Saccharose. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Die Anzucht erfolgte bei 28°C über Nacht.

Zur Anzucht von *E. coli* bzw. *A.* auf festem Nährmedium erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) Bacto-Agar vor dem Autoklavieren.

### 3.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien).

SALK LBb1 (left border)	PD 300 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
FLAG LB (left border)	PD 413 5'-CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC-3'
<i>ggr</i>	PD 781 5'-GAGAGTGACGAAGATGAAGAT-3' PD 782 5'-CACATACCCTGCAGCATCAC-3'
<i>chl1-1, chl1-2</i>	PD 336 5'-CCAGCTCGAAAGATTCCGGTT-3' PD 335 5'-TTTTGTTTACGCAGCCCATGC-3'
<i>chl2</i>	PD 415 5'-ATTTGATTTTGTGTTTATGTGCTCTT-3' PD 414 5'-GCTGAGAATAGAAGGAGTTGTAGA-3'

### 3.1.5 Bakterienstämme und Klone

- *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen, Karlsruhe)
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pmp 90 (Koncz und Schell, 1986) zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Rifampicin<sup>R</sup>, Gentamycin<sup>R</sup>
- EST-Klon U25648 (*Escherichia coli* TOP-10, *Arabidopsis* Biological Resource Center, Columbus, USA)

### 3.1.6 Pflanzen

Es wurde ausschließlich mit der Spezies *Arabidopsis thaliana* gearbeitet.

- Wildtyp, Ökotyp Columbia 0 (Col0)
- Wildtyp, Ökotyp Columbia 2 (Col2)
- Wildtyp, Ökotyp Wassilewskija (Ws)

Diverse Stockcenter bieten Pflanzenpopulationen an, die durch *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation eines Vektors mutagenisiert wurden. Die T-DNA, flankiert durch die Sequenzbereiche „left border“ (LB) und „right border“ (RB), wird in das Genom übertragen. Durch Insertion der T-DNA in das Genom können betroffene Abschnitte nicht mehr einwandfrei transkribiert werden, was meist zum Verlust der Aktivität des entsprechenden Proteins führt. Auf den öffentlich zugänglichen Internetseiten dieser Anbieter kann nach T-DNA-Insertionslinien für verschiedene Gene gesucht und die entsprechenden Mutanten können käuflich erworben werden (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Folgende T-DNA-Insertionsmutanten wurden verwendet:

- *chl1-1* (*Chlorophyllase1-1*, At1g19670, SALK\_124978, Ökotyp Columbia 0, SALK, NASC, Loughborough, UK)
- *chl1-2* (*Chlorophyllase1-2*, FLAG\_065B09, Ökotyp Wassilewskija, FLAG, INRA, Versailles, Frankreich)
- *chl2* (*Chlorophyllase2*, At5g43860, FLAG\_076H05, Ökotyp Wassilewskija, FLAG, INRA, Versailles, Frankreich)
- *ggr* (*Geranylgeranylreduktase*, At4g38460, SALK\_046606, Ökotyp Columbia 0, SALK, NASC, Loughborough, UK)

Die folgenden Mutanten bzw. RNA<sub>i</sub>-Linien wurden von Stefan Hörtensteiner (Zürich, Schweiz) für die Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- *pao1* (*pheophorbide a oxygenase1*; At3g44880, Ökotyp Columbia 0, Pružinska *et al.*, 2003 )
- *SGR-RNA,#2,16* (At4g22920, Ökotyp Columbia 0, Armstead *et al.*, 2007)

weitere Mutanten:

- *hpt1* (*homogentisate phytyl transferase*, Ökotyp Columbia 0),  
Aufgrund der EMS-Mutagenese liegt ein Basenaustausch in *hpt1* vor, der zu einem Aminosäuretausch führt. Dies hat eine stark verminderte Aktivität der Homogentisatphytyltransferase (HPT1/VTE2) im Vergleich zum Wildtyp zur Folge.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

#### Oberflächensterilisation der Samen

Zur Anzucht der Pflanzen wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Zu den Samen wurde 1 ml einer Sterilisationslösung, bestehend aus 6 % (v/v) Natriumhypochlorit und 0,1 % (v/v) Triton X-100, zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Samen drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen und in steriler 0,1 % (w/v) Agarose oder sterilem Wasser aufgenommen. Die Samen wurden auf Petrischalen mit MS-Medium ausplattiert. Zur Anzucht transgener Pflanzen enthielt das Medium zusätzlich das Antibiotikum Hygromycin B in einer Konzentration von 25 µg/ml.

#### Keimung und Wachstum der Pflanzen

Nach Lagerung der Platten für eine Nacht bei 4°C erfolgte die Keimung der Samen in Gewebekulturkammern (16 h Licht, 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 22°C, 70 % Luftfeuchtigkeit). Nach etwa 10 bis 14 Tagen wurden die Keimlinge in Einzeltöpfe pickiert. Die verwendete Erde war ein Gemisch aus gleichen Volumenanteilen GS90 Erde und Vermiculit. Die mit Erde gefüllten Töpfe wurden mit Leitungswasser angestaut, welches zusätzlich 0,15 % (v/v) Previcur N sowie 0,186 % (w/v) Borat enthielt. Previcur N ist ein Fungizid und soll Pilzbefall der Pflanzen verhindern. Bor ist ein Spurenelement und wurde zugegeben, um eine Unterversorgung zu vermeiden. Das weitere Wachstum der Pflanzen erfolgte in Klimakammern unter folgenden Bedingungen:

	Licht	Dunkelheit
Dauer	16 h	8 h
Temperatur	20 °C	18 °C
Relative Luftfeuchtigkeit	60 %	60 %
Lichtintensität [µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	120	0



### 3.2.2 Bestimmung des Tocopherolgehaltes

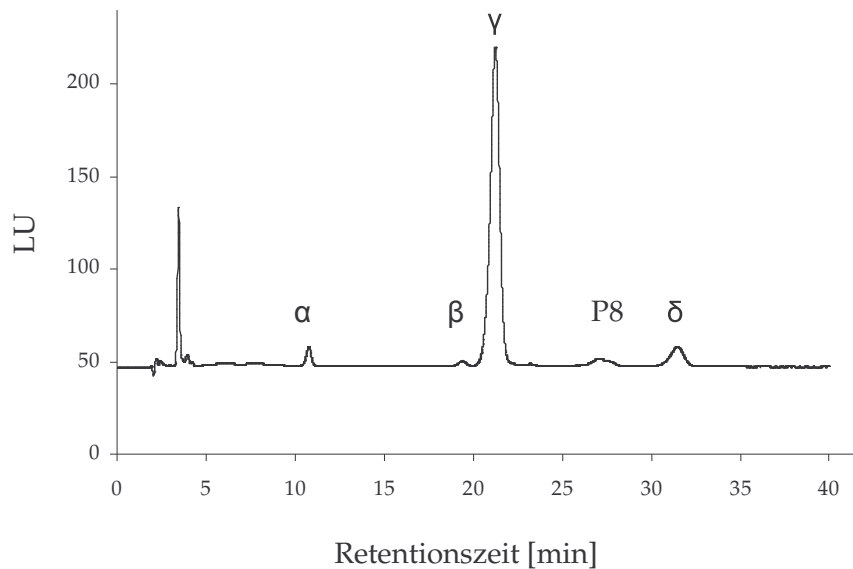
#### Tocopherol Extraktion

Das geerntete Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend im Porzellanmörser gut zerkleinert. Die Extraktion von Tocopherol erfolgte durch Zugabe von 1 ml Diethylether sowie 300 µl einer Lösung bestehend aus 1 M KCl/ 0,2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Zur Quantifizierung von Tocopherol wurden im ersten Extraktionsschritt 500 ng Tocol als interner Standard zugegeben. Die Suspension wurde gut gemischt und anschließend bei 4 °C, 14000 g für 3 bis 5 Minuten zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in ein Reagenzglas überführt, während die untere Phase weitere zwei Male mit 0,5 ml Diethylether extrahiert wurde. Die Überstände wurden vereinigt. Durch Zugabe von 1-2 Spatelspitzen Kieselgel, kurzer Inkubation und anschließender Zentrifugation wurde noch eventuell vorhandenes Wasser und hydrophile Substanzen entfernt. Der Diethylether wurde unter Luftstrom bis zur Trockene eingengt und die Proben anschließend in 100 µl Hexan aufgenommen. Etwa 90 µl dieser Lösung wurden in ein HPLC-Röhrchen überführt und gut verschlossen.

#### Quantifizierung von Tocopherol mittels Fluoreszenz-HPLC

(Balz *et al.*, 1992)

Mit Hilfe eines Autoinjektors wurden 20 µl des Extraktes in die Säule (LiChrospher 500-Diol, 250 x 3 mm) injiziert. Tocopherole wurden mit 4 % (v/v) Tertiärbutylmethylether in Hexan bei einer Flussrate von 0,75 ml/min isokratisch innerhalb von 40 Minuten eluiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei  $\lambda = 290$  nm, und die Emission bei  $\lambda = 330$  nm. Der Säulenofen war auf 30°C temperiert. Durch Injektion von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol sowie Tocol bekannter Konzentrationen wurden die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzsignale der Tocopherole mit dem des Tocols verglichen. Über die ermittelten Responsefaktoren der jeweiligen Tocopherolform und Tocol konnten die Mengen an  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - bzw.  $\delta$ -Tocopherol im Extrakt über das Fluoreszenzsignal von Tocol ermittelt werden. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software Chemstation (Agilent Technologies, Böblingen). In Abb. 7 ist ein Beispielchromatogramm eines Trennungslaufes der Tocochromanole aus Maisöl dargestellt.



**Abb. 7 Chromatographische Separierung der Tocochromanole aus Maisöl**

Gezeigt ist ein Separationslauf der vier Tocopherolformen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol sowie Plastochromanol (P8) aus Maisöl. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor (Excitation  $\lambda = 290$  nm, Emission  $\lambda = 330$  nm).

### 3.2.3 Bestimmung von Phyllochinon

#### Extraktion

Das geerntete Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, zerkleinert und Phyllochinon in 0,8 ml einer Lösung bestehend aus Isopropanol/Hexan (3:1) extrahiert. Zur Quantifizierung von Phyllochinon wurden 500 ng des internen Standards Menachinon (Vitamin K<sub>2</sub>) zugegeben. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zu dem Pellet 0,6 ml Hexan gegeben. Nach Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt. Nach Zugabe von 0,6 ml eines Methanol/Wasser (9:1)-Gemisches und Zentrifugation erfolgte die Trennung der wässrigen und organischen Phase. Die obere organische Phase wurde abgenommen und bis zur Trockene unter Luftstrom eingengt. Phyllochinon wurde in 100  $\mu$ l Dichlormethan/Methanol (1:9) gelöst und in HPLC-Röhrchen überführt und gut verschlossen.

### Quantifizierung von Phyllochinon

(Jakob und Elmadfa, 1996)

Mittels Autoinjektor wurden 20 µl Extrakt in die Umkehrphasensäule (Eurospher-100-C18, 250 x 4,6 mm) injiziert und Phyllochinon bei 40°C, isokratisch mit dem Laufmittel, bestehend aus 100 ml Dichlormethan, 900 ml Methanol und 5 ml einer methanolischen Lösung (1,37 g Zinkchlorid, 0,41 g Natriumacetat, 0,3 g Essigsäure) eluiert. Die Flussrate war 0,4 ml/min. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Excitation  $\lambda=243$  nm, Emission  $\lambda=430$  nm). Da nur reduziertes Phyllochinon fluoresziert, erfolgte eine Nachsäulen-Reduktion an einer Zinksäule (30 mm). Das über die erste Säule separierte Phyllochinon wurde an der zweiten nachgeschalteten Zinkgefüllten Säule reduziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Chemstation (Agilent Technologies, Böblingen).

### **3.2.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes**

(Porra *et al.*, 1989)

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren, gut zerkleinert und in 80 % (v/v) Aceton extrahiert. Das Blattmaterial wurde durch Zentrifugation entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Absorptionen bei  $\lambda = 750$  nm,  $\lambda = 646,8$  nm und  $\lambda = 663,8$  nm des Extraktes wurden photometrisch mit 80 % (v/v) Aceton als Referenz bestimmt. Bei Bedarf wurden die Proben mit 80% (v/v) Aceton verdünnt. Die Konzentration des Gesamtchlorophylls (Chl a+b) wurde anschließend wie folgt ermittelt:

$$\text{Chl a+b [nmol ml}^{-1}\text{]} = 19,54 E_{646,6 \text{ nm}} + 8,29 E_{663,6 \text{ nm}}$$

### 3.2.5 Trennung von Chlorophyll und Chlorophyllid

(verändert nach Tsuchiya *et al.*, 1997)

Bei der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wird die Intensität der Lösung im grünen Wellenlängenbereich photometrisch bestimmt. Dabei werden hauptsächlich Chlorophyll und Chlorophyllid analysiert. Zur spezifischen Anreicherung von Chlorophyllid wurde eine definierte Menge des Chlorophyllextraktes zu einer Lösung aus Aceton/Hexan/1 M Tris-HCl pH 9 (1/3/0,2) gegeben und gut gemischt. Nach Zentrifugation stellte sich eine Phasentrennung ein. Die untere Acetonphase enthält Chlorophyllid, während sich in der oberen Hexanphase Chlorophyll anreichert. Die Konzentration von Chlorophyllid in der unteren Acetonphase wurde durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 750$  nm,  $\lambda = 646,8$  nm und  $\lambda = 663,8$  nm bestimmt und entsprechend der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes (siehe oben) berechnet.

### 3.2.6 Bestimmung der Fettsäurephytyl ester aus Blättern und Samen

#### Extraktion

Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, zerkleinert und die Lipide in 1 ml Methanol/Chloroform/Ameisensäure (1:1:0,1) sowie 300  $\mu$ l 1 M KCl/ 0,2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> extrahiert. Der synthetische Phytyl ester der Pentadecansäure (15:0) dient als interner Standard. Davon wurden 12,1 nmol im jeweils ersten Extraktionsschritt zugegeben. Nach Zentrifugation wurde die untere Lipidphase abgenommen und die obere Phase noch zwei Mal mit jeweils 0,5 ml Methanol/Chloroform (1:2) extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und im Probenkonzentrator unter Luftstrom bis zur Trockene eingengt. Die Lipide wurden in 50  $\mu$ l Hexan gelöst, der Extrakt in GC-Röhrchen überführt und gut verschlossen.

Für die Extraktion aus Samen wurden diese in einem Glasmörser gut zerkleinert und die Ester anschließend ebenfalls in 1 ml Methanol/Chloroform/Ameisensäure (1:1:0,1) sowie 300  $\mu$ l 1 M KCl/ 0,2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> extrahiert. Es wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

### Quantifizierung der Fettsäurephytylester

Die Fettsäurephytylester wurden gaschromatographisch (HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) separiert und mittels massenselektivem Quadrupol detektiert. Es wurden 2 µl des Extraktes auf die Säule gegeben und anschließend im Gasstrom über der Säule separiert. Es wurden folgende Parameter bzw. folgendes Temperaturprogramm angewendet:

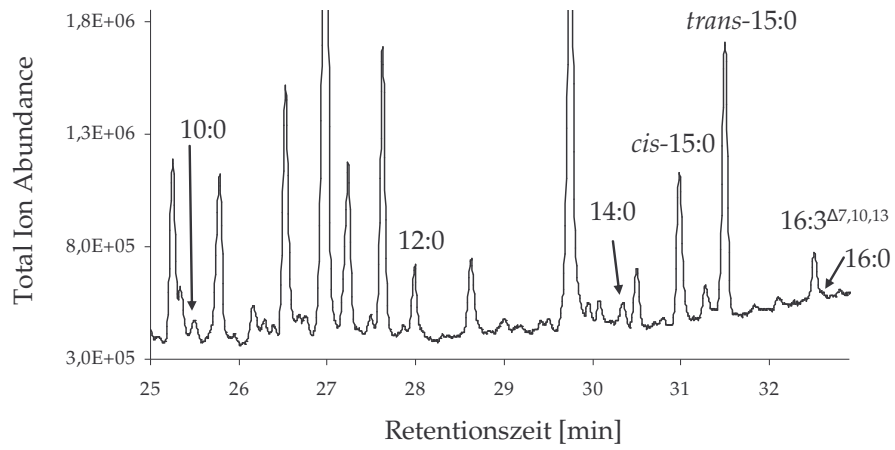
Parameter der Gaschromatographie:

Gesamthelium-Fluss: 54,2 ml/min, septum purge flow: 50 ml/min, Säulenflussrate: 2 ml/min, Injektionskammer 260°C

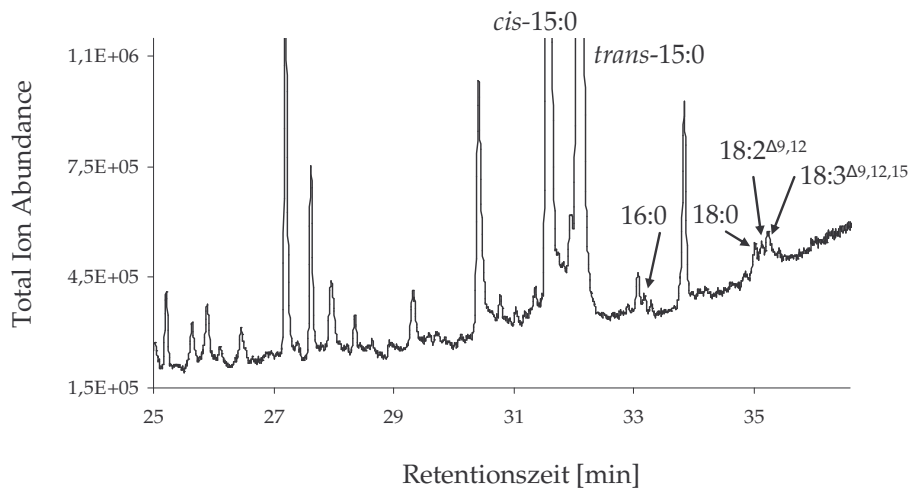
Temperaturprogramm:	170°C – 320°C	5°C/min
	320°C – 170°C	20°C/min

Die Auswertung der Chromatogramme und die Analyse der Spektren erfolgte mit Hilfe der Software MSD ChemStation (Agilent Technologies, Böblingen). Die Identifizierung der verschiedenen Fettsäurephytylester erfolgte durch Vergleich mit Retentionszeiten und Massenspektren von synthetisierten Standards. Ischebeck *et al.* (2005) synthetisierte bereits die Phytylester der Fettsäuren 16:0, 18:1 und 18:3 und ermittelte deren Retentionszeiten und Massenspektren. Zusätzlich wurden die Phytylester von 18:0 und 18:2 synthetisiert. Die Massenspektren der synthetisierten Ester dienten als Vergleich zur Identifizierung weiterer Phytylester. Über Vergleich der integrierten Peakflächen der einzelnen Fettsäurephytylester mit der des Pentadecansäurephytylesters wurde die Menge der jeweiligen Ester quantifiziert. In Abb. 8 sind Chromatogramme von Wildtypipidextrakten aus Blättern und Samen gezeigt.

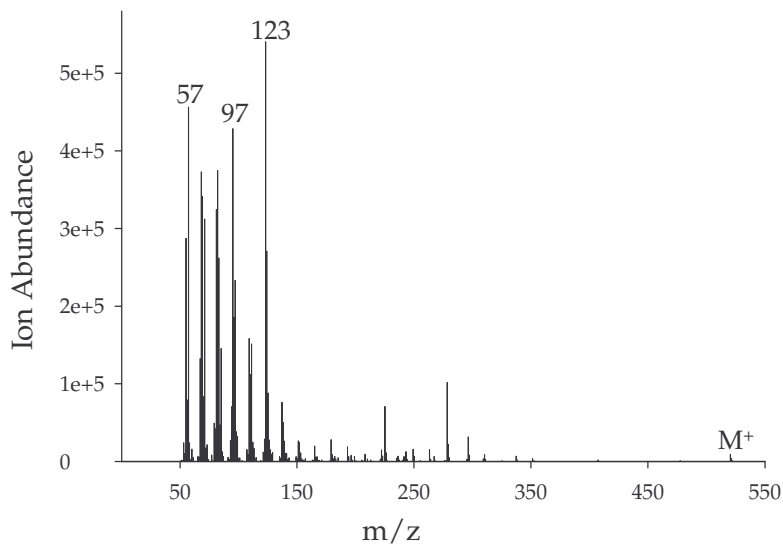
A

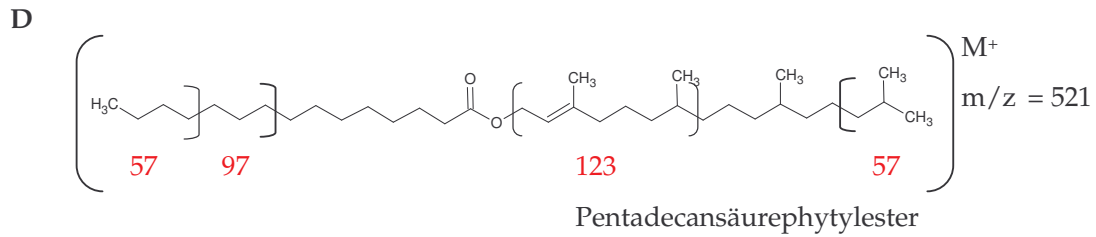


B



C





**Abb. 8 Gaschromatographische Trennung und massenselektive Detektierung der Fettsäurephytylester**

- A Dargestellt ist die Trennung der Fettsäurephytylester aus Blattgewebe eines kältgestressten Wildtyps. Es sind die Fettsäuren bezeichnet, welche mit Phytol verestert vorliegen. Der interne Standard Pentadecansäure (15:0)-phytylester liegt als *cis/trans*-Gemisch vor, daher erscheinen zwei Peaks im Chromatogramm.
- B Es wurden die Fettsäurephytylester aus Samen des Ökotyps Columbia 0 aufgetrennt.
- C Beispielhaft für weitere Fettsäurephytylester ist das Massenspektrum des Pentadecansäurephytylesters gezeigt.
- D Gezeigt ist ein mögliches Fragmentierungsmuster des Esters nach Ionisierung im Massendetektor.

Synthese der Fettsäurephytylester

(Gellermann *et al.*, 1975)

Die Phytylester 15:0, 18:0 und 18:2 wurden chemisch synthetisiert. Pentadecansäure (15:0)-phytylester diente als interner Standard zur Quantifizierung der Fettsäurephytylester. Zur Identifizierung weiterer Ester dienten die Massenspektren der synthetisierten Phytylester aus 18:0 und 18:2. Zur Synthese der entsprechenden Acylchloride wurden 0,2 mmol der Fettsäure, 1 ml Toluol und 0,28 mmol Oxalsäuredichlorid gemischt und bei 60-65°C für etwa zwei Stunden im Wasserbad inkubiert. Die Lösung wurde bis zur Trockene eingengt und die Veresterung erfolgte dann durch Zugabe von 1 ml Diethylether, 0,2 mmol Phytol (*cis/trans*-Gemisch) sowie 0,25 ml trockenes Pyridin und anschließender Inkubation bei 80°C für zwei bis drei Stunden. Die Lösung wurde nach Zugabe von 2 ml Hexan und 1 ml Wasser ausgeschüttelt und die organische Phase abgenommen. Die Fettsäurephytylester wurden zur Aufreinigung auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Chloroform/Methanol (2:1) eluiert. Das Eluat wurde eingengt, in Hexan

aufgenommen und per Dünnschichtchromatographie an Kieselgel zusätzlich gereinigt. Die aufgetrennten Fettsäurephytylester wurden mittels Chloroform/Methanol (2:1) und 0,9 % (w/v) NaCl aus dem Kieselgel extrahiert. Die organische Phase wurde separiert und das Lösungsmittel bis zur Trockene eingengt. Die Fettsäurephytylester wurden in Hexan aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

#### Quantifizierung der synthetisierten Fettsäurephytylester

(Browse *et al.*, 1986b)

Zur Verwendung als interner Standard musste der Pentadecansäure (15:0)-phytylester quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Lösung einer Umesterungsreaktion unterzogen. Zur Quantifizierung diente Palmitinsäure (16:0) als interner Standard. Der Ester wurde durch Zugabe von 1 ml 1 M HCl in Methanol und Inkubation bei 80°C für 20 min gespalten und die Fettsäuren zu Fettsäuremethylester umgeestert. Die Fettsäuremethylester wurden durch Ausschütteln in Hexan und 0,9 % (w/v) NaCl in der Hexanphase angereichert. Die organische Phase wurde abgenommen und im Luftstrom eingengt. Die Ester wurden in 100 µl Hexan aufgenommen, in GC-Röhrchen überführt, mittels Gaschromatographie (SP-2380, 30 m x 0,53 mm x 0,2 µm) separiert und im Flammenionisationsdetektor detektiert.

Parameter der Gaschromatographie:

Gesamthelium-Fluss: 119 ml/min, septum purge flow: 92,5 ml/min, Säulenflussrate: 22,9 ml/min, Injektionskammer: 220°C, Wasserstoff: 30 ml/min, Druckluft: 400 ml/min

Temperaturprogramm:	100°C – 160°C	25°C/min
	160°C – 220°C	10°C/min
	220°C – 100°C	25°C/min

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ChemStation (Agilent Technologies, Böblingen).



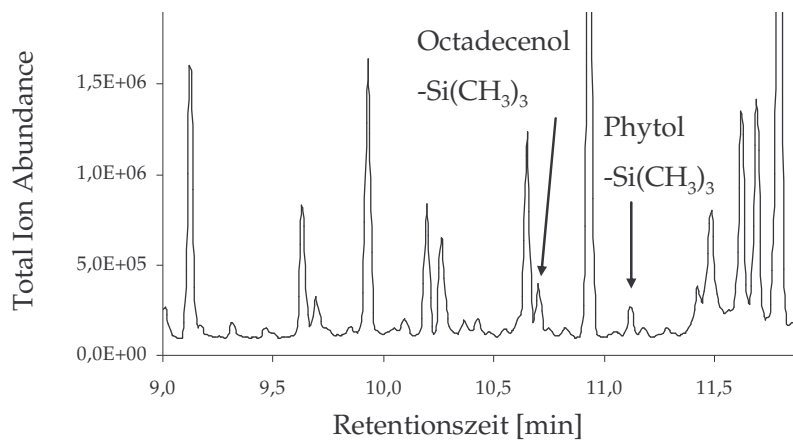
### 3.2.7 Bestimmung von freiem Phytol in Blättern

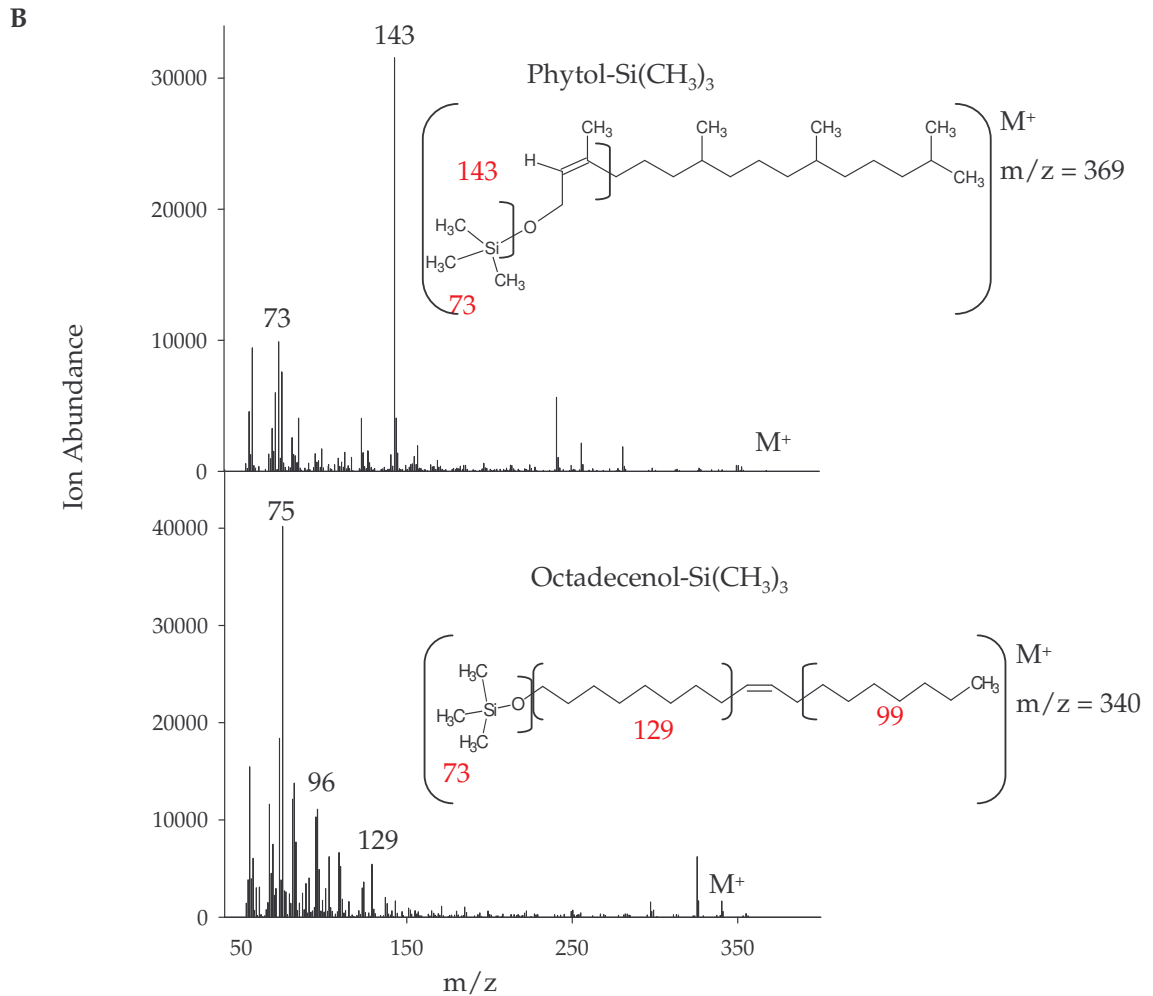
#### Extraktion

Es wurde wie unter 3.2.6 beschrieben, ein Lipidextrakt hergestellt. Als interner Standard diente Octadecenol (*cis*-9-Octadecen-1-ol), von dem 400 ng im ersten Extraktionsschritt zugegeben wurden. Nach Eintrocknung des Lösungsmittels wurden etwa 200 µl des Silylierungsreagenzes MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bis zur Trockene eingengt, in etwa 100 µl Hexan aufgenommen und in GC-Röhrchen überführt.

#### Quantifizierung von freiem Phytol

Phytol wurde in Form seines Trimethylsilans nachgewiesen. Die Quantifizierung von Phytol erfolgte durch Vergleich der Peakflächeintegrale von *cis*-9-Octadecen-1-ol mit dem des Phytols.

**A**



**Abb. 9** Gaschromatographische Analyse von Phytol mittels massenselektivem Detektor

Phytol wurde in Form seines Trimethylsilans nachgewiesen. Octadecenol diente als interner Standard zur Quantifizierung des Phytols.

- A Dargestellt ist ein Chromatogramm eines Wildtypextraktes. Die Trimethylsilane von Phytol und Octadecenol sind markiert.
- B Gezeigt sind die Massenspektren der beiden Komponenten sowie deren mögliches Fragmentierungsmuster.

### 3.2.8 Analyse der photosynthetischen Pigmentzusammensetzung

#### Extraktion der Pigmente

Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, zerkleinert und anschließend in 400 µl 80 % (v/v) Aceton aufgenommen. Die Proben wurden gut gemischt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet ein weiteres Mal mit 400 µl 100 % (v/v) Aceton extrahiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und der gesamte Extrakt in HPLC-Röhrchen überführt. Die Extraktion erfolgte bei 4°C bei abgedunkeltem Licht.

#### Quantifizierung der Pigmente mittels HPLC

(Thayer und Björkmann, 1990)

Mittels Autosampler wurden 20 µl auf eine Umkehrphasensäule (Nucleosil-120-C18, 250 x 3 mm) gegeben. Elutionsmittel waren die Lösungen A (Acetonitril/Methanol/0,1 M Tris-HCl, pH 8 (72:8:3)) und Lösung B (Methanol/Ethylacetat (68:32)). Die Elution erfolgte bei 30°C und einer Flussrate von 0,4 ml/min über einen Lösungsmittelgradienten wie unten beschrieben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Chemstation (Agilent Technologies, Böblingen). Die einzelnen Pigmente wurden mittels einer Eichgeraden quantifiziert, welche für jedes Pigment zuvor erstellt wurde.

Elutionsgradient:

100 % Lösung A --> 100 % Lösung B	0 – 25 min
100 % Lösung B --> 100 % Lösung A	30 – 35 min
Postrun	7 min

### 3.2.9 Behandlung von Pflanzen mit Methyljasmonat

Pflanzen wurden auf MS-Medium angezogen und nach etwa zwei Wochen in einer Lösung bestehend aus 1 mM Methyljasmonat in 20 mM MES und 10 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,5) für 7 Stunden inkubiert.

### 3.2.10 Fütterung von Pflanzen mit Phytol

Pflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen und nach etwa sieben Wochen für drei Tage in einer Lösung bestehend aus 20 mM MES + 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,5) sowie 0,2 % (v/v) Tween 80 und 20 mg Phytol (*cis/trans*-Gemisch) unter leichtem Schütteln inkubiert.

### 3.2.11 Durchführung eines Stickstoffmangelstress-Experimentes mit Pflanzen

Pflanzen wurden auf MS-Medium angezogen und nach drei Wochen auf Stickstoffmangelmedium transferiert. Die Ernte erfolgte meist nach zehn Tagen.

### 3.2.12 Behandlung von Pflanzen mit Fosmidomycin

Pflanzen wurden auf MS-Medium angezogen und nach drei Wochen auf frisches MS-Medium bzw. Stickstoffmangelmedium und jeweils 0,1 mM Fosmidomycin transferiert und nach zehn Tagen geerntet.

### 3.2.13 Elektronenmikroskopie

#### Fixieren und Einbetten des Blattmaterials

Zur sofortigen Fixierung wurden geerntete Blätter luftblasenfrei in einer 2,5 % (v/v) Glutaraldehydlösung in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) über Nacht inkubiert. Die Proben wurden mindestens drei Mal mit dem gleichen Puffer gewaschen und anschließend in einer 1 % (v/v) Osmiumtetroxidlösung in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) eingelegt, um die Membranen anzufärben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mindestens drei Mal mit Reinstwasser gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte durch schrittweise Erhöhung der Ethanolkonzentration in der Lösung wie folgt: 30 % (v/v) Ethanol für 20 min, 50 % (v/v) Ethanol für 20 min, 70 % (v/v) Ethanol für 20 min, 90 % (v/v) Ethanol für drei mal 10 min Inkubation. Das Blattmaterial wurde in dem Acrylpolymer LR White Resin eingebettet. Dafür wurde es zunächst für 90 min in einer Lösung bestehend aus 90 % (v/v) Ethanol/LR White (2:1) bei leichtem Schütteln inkubiert, anschließend weitere 90 min in einer Lösung bestehend aus 90 % (v/v) Ethanol/LR

White (1:2) und über Nacht in reinem LR White. Die Polymerisierung erfolgte für 24 h bei 50°C in Gelatinekapseln.

#### Anfertigung von Ultradünnschnitten

Zur Überprüfung der Fixierung und Einbettung der Proben wurden zunächst mit Hilfe eines Mikrotoms mit einem Glasmesser Halbdünnschnitte von etwa 0,4 µm Dicke angefertigt und mit dem Thiazinfarbstoff Toluidinblau angefärbt. Die Struktur der Zellen wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft. Anschließend wurden mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte von etwa 60 nm bis 70 nm Dicke präpariert. Die Ultradünnschnitte wurden auf einem Kupfergitter fixiert und anschließend kontrastiert.

#### Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Zunächst wurde Reynoldslösung wie folgt hergestellt.: Es wurden 0,33 g Bleinitrat und 1,76 g Natriumcitrat eingewogen und in 30 ml abgekochtem Wasser gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden 8 ml 1 N NaOH zugegeben. Abschließend wurde die Lösung auf ein Volumen von 50 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Ultradünnschnittpräparate wurden für 5 min in Reynoldslösung inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer in Wasser gesättigten Uranylösung für 40 min. Die Präparate wurden wieder mit Wasser gespült und nochmals für 20 min in Reynoldslösung inkubiert. Abschließend wurden die Präparate mit 0,04 N NaOH und Wasser gespült.

#### Transmissionselektronenmikroskopie

Die Analyse und Aufnahme der Ultradünnschnittpräparate erfolgte am CM 100 Transmissionselektronenmikroskop (Philips, Zürich) bei 60 kV.

#### **3.2.14 Molekularbiologische Methoden**

Es wurden Standardmethoden (Restriktionsanalysen, Ligationen, Transformation von *E. coli* und *A. tumefaciens*, elektrophoretische Auftrennung von DNA, Plasmidpräparation) nach (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Bei Anwendung von Kits wurde nach den Angaben der jeweiligen Hersteller verfahren.

Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genloci

Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 50 µl und bestanden aus 1 × PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 pmol forward Primer, 25 pmol reverse Primer, 1 µl genomischer DNA und 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (1,5 U). Das PCR-Programm war wie folgt:

Start:	95°C	5 min	Denaturierung der DNA
30 Zyklen:	95°C	1 min	
	60 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72°C	1 min	Polymerisation
Abschluss:	72°C	4 min	
Ende:	4°C	unendlich	

Northern-Blot-Analyse***Extraktion von RNA***

(Logemann *et al.*, 1987)

Zur Isolation von RNA aus Blattgewebe wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in 5 ml Z6-Puffer (8 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7 eingestellt mit NaOH, 0,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol) homogenisiert. Die Proben wurden im gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1/20 Volumen 1 M Essigsäure angesäuert und die RNA mit 0,7 Volumen Ethanol gefällt. Die sedimentierte RNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol, 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und weitere zwei Male mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die RNA durch Zentrifugation pelletiert. Das trockene RNA-Pellet wurde in Wasser aufgenommen.

Alternativ wurde eine Methode zur Isolation von RNA aus stark polysaccharidhaltigem Material angewendet. Dafür wurde bis zu 5 g Material gemörsert und in 5 ml REB-Puffer (1 M β-Mercaptoethanol, 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 1 % (w/v) SDS) homogenisiert und anschließend Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugegeben. Die Lösung wurde auf eine

2 M Lithiumchloridkonzentration eingestellt und die RNA über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat in 400 µl Wasser resuspendiert. Die RNA wurde ein weiteres Mal durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und zwei Volumen Ethanol bei -20°C für eine Stunde gefällt. Die sedimentierte RNA wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in Wasser aufgenommen.

Mit Ausnahme des Z6- und REB-Puffers und des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches waren alle verwendeten Lösungen zuvor mit 0,1 % (w/v) DEPC für 12 h bei 37°C behandelt und anschließend bei 120°C autoklaviert.

Die RNA- und Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt und das RNA-Protein-Verhältnis berechnet.

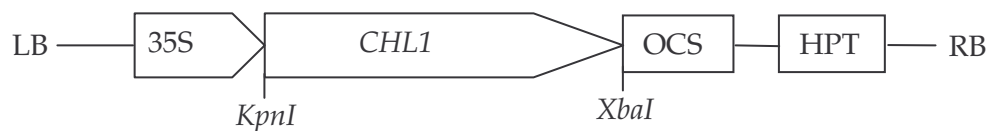
### ***RNA-Gelelektrophorese, Transfer auf die Membran und Hybridisierung***

20 µg Total-RNA in 20 µl wurden in 4 µl 10 x MEN (200 mM MOPS-NaOH, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH7), 6 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, 20 µl Formamid, 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), 0,5 µl Bromphenolblau (1 mg/ml, DEPC behandelt) gelöst, bei 56°C für 10 min denaturiert und elektrophoretisch in einem 1,5 % (w/v) Agarosegel in 1 x MEN getrennt.

Über Nacht erfolgte der Transfer der RNA auf die Nylonmembran in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat) als Transferpuffer. Die RNA wurde anschließend auf der Membran fixiert (UV Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Die Membran wurde in 2 x SSC gewaschen und für 4 h im Hybridisierungspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4, 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) BSA, 150 µl frisch denaturierte Heringsperm-DNA (10 mg/ml)) inkubiert. Es wurden 70 ng der Sonde mit Hilfe des Rediprime DNA-Labelingsystems (New England Biolabs, Beverly, USA) sowie 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig) radioaktiv markiert. Nach Denaturierung bei 95°C für 5 min erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 60°C. Anschließend wurde die Membran mehrfach in 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und in Expositionskassetten mit Verstärkerfolie mit einem Film (Kodak, X-Omat AR Films, Kodak Rochester, USA) bei -80°C exponiert.

Klonierung des Konstruktes pBinAR-Hyg-CHL1

Aus dem EST-Klon U25648 (Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus, USA) wurde die cDNA der *Chlorophyllase1* (*CHL1*) mittels Restriktion mit *XbaI* und *NotI* ausgeschnitten und mit diesen Schnittstellen in den Vektor pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe) zwischenkloniert. Dieses Konstrukt wurde mit *XbaI* und *KpnI* geschnitten und die cDNA von *CHL1* in den Zielvektor pBinAR-Hyg (Höfgen und Willmitzer, 1990) über diese Schnittstellen kloniert.



**Abb. 10** Schematische Darstellung des Konstruktes pBinAR-Hyg-CHL1

*CHL1*-cDNA wurde über *KpnI* und *XbaI* mit dem binären Vektor pBinAR-Hyg ligiert. Die cDNA steht unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors (35S), und als Terminator dient das 3'-Ende des Octopinsynthesegens (OCS) aus *A. tumefaciens*. Hygromycin-B-Resistenz zur Selektion transgener Pflanzen wird durch Hygromycinphosphotransferase (HPT) verliehen.

### 3.2.15 Transformation von *A. thaliana*

(Clough und Bent, 1998)

Die *in planta* Transformation von *A. thaliana* wurde vermittelt über *A. tumefaciens*. Die über Nacht angezogene Kultur wurde 30 min bei 5000 g zentrifugiert und die Zellen in gleichem Volumen Infiltrationsmedium, bestehend aus 0,5 % (w/v) Saccharose, 0,22 % MS-Salze, 0,05 % (w/v) MES, pH 5,7, 10 µg/l Benzylaminopurin (BAP), resuspendiert. Es wurden 200 ml Bakteriensuspension, 100 ml Infiltrationsmedium und 500 µl Silwett L-77 gemischt. Knospende Pflanzen wurden kurz in die Agrobakteriumlösung getaucht und anschließend für einen Tag mit einer Haube bedeckt. Die Heranreifung der Samen erfolgte im Gewächshaus. Durch Ausbringen der Samen auf Hygromycin-B-haltigem Medium wurden transgene Pflanzen isoliert.



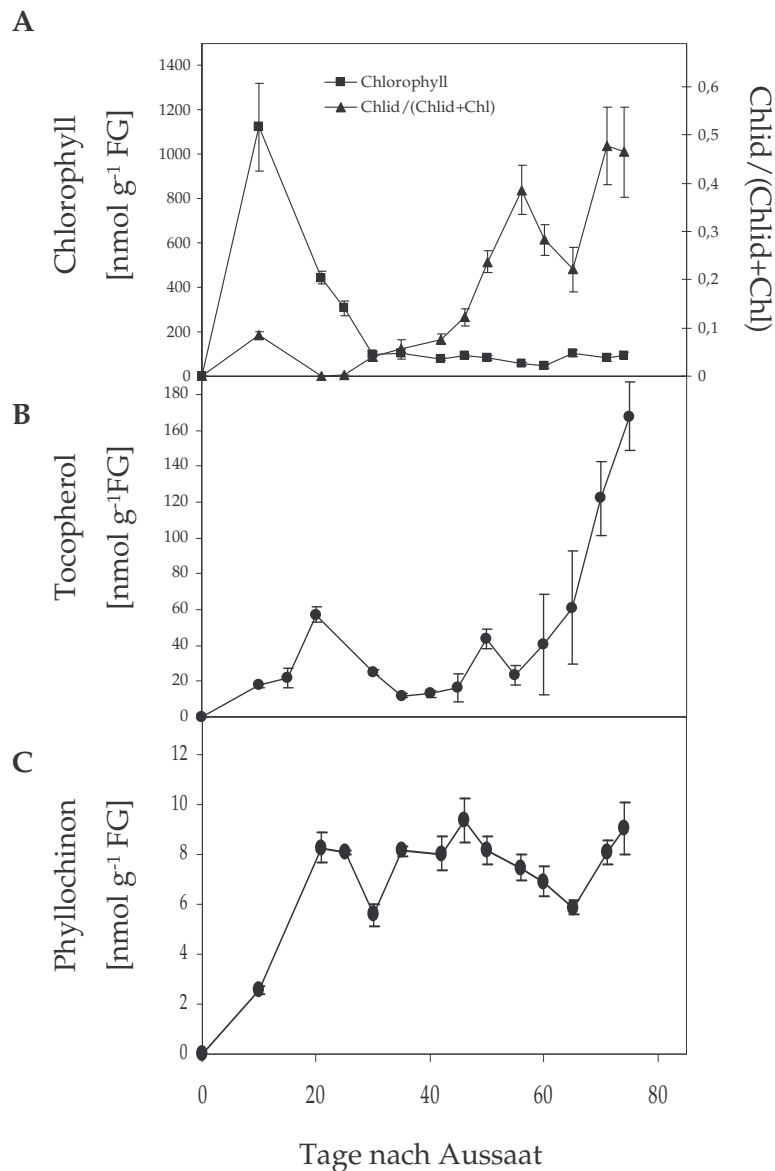
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Analyse von Chlorophyll, Tocopherol, Phyllochinon und Fettsäurephytylestern in Blättern und Samen von *Arabidopsis thaliana*

Unter Stressbedingungen wie Starklicht und Stickstoffmangel, aber auch in der Seneszenz wird Chlorophyll abgebaut. Es wurde mehrfach gezeigt, dass gerade unter diesen Bedingungen die Gehalte an Tocopherol und Fettsäurephytyl ester in *A. thaliana* stark ansteigen (Gaude *et al.*, 2007). Daher wurden bereits von Rise *et al.* (1998) vermutet, dass Phytol, resultierend aus dem Chlorophyllabbau, Eingang in andere Stoffwechselprozesse, wie die Tocopherolsynthese, findet. Demzufolge kann angenommen werden, dass hydrolysiertes Phytol ebenso für die Phyllochinon- und Fettsäurephytyl estersynthese verwertet wird. Es sollte zunächst ein Überblick über die entwicklungs- und stressabhängigen Gehalte an Tocopherol, Chlorophyll, Fettsäurephytyl ester und Phyllochinon in Blättern und in reifenden Samen von *A. thaliana* gegeben werden. Es soll analysiert werden, ob es zum einen zeitlich möglich ist, dass das durch den Chlorophyllabbau entstandene Phytol in anderen Synthesewegen als Substrat dienen kann und zum anderen, um welche Synthesewege es sich dabei handelt.

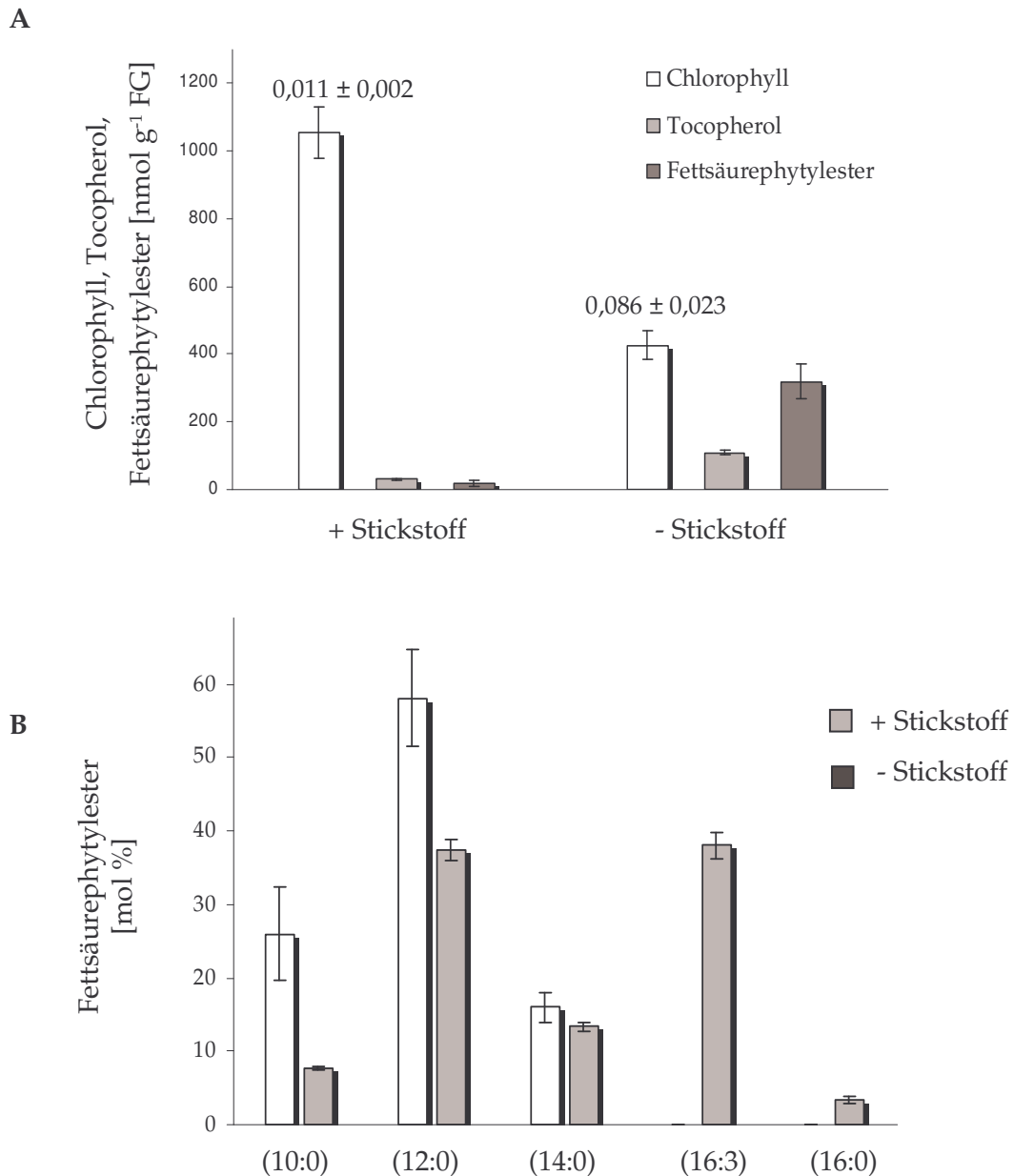
Es wurden Blätter von sich entwickelnden Pflanzen des Ökotyps Columbia 0 auf ihre Gehalte an Chlorophyll, Chlorophyllid, Tocopherol, Phyllochinon und Fettsäurephytyl ester untersucht. In Abb. 11 ist zu sehen, dass der Gehalt an Tocopherol mit dem Alter der Pflanzen zunimmt, gleichzeitig sinkt die Menge an Chlorophyll. Der Chlorophyllidanteil ( $\text{Chlorophyllid}/(\text{Chlorophyllid}+\text{Chlorophyll})$ ), als Maß für das unmittelbare Abbauprodukt des Chlorophylls, steigt dagegen stark an. Im Gegensatz zu Tocopherol und Chlorophyll ändert sich der Gehalt an Phyllochinon in seneszenten Pflanzen kaum. Selbst unter Hochlichtstress konnte keine Änderung im Phyllochinongehalt, vergleichbar zur Änderung von Tocopherol, festgestellt werden (Lohmann, 2004). Gaude *et al.* (2007) wiesen nach, dass Fettsäurephytyl ester in der Seneszenz stark ansteigen. Wie in Abb. 12 dargestellt, reichern Pflanzen, welche durch

Stickstoffmangel gestresst wurden, ebenso Tocopherol und Fettsäurephytylester stark an, während der Gehalt an Chlorophyll sinkt. Der Chlorophyllidanteil steigt an.



**Abb. 11 Chlorophyll, Chlorophyllid, Tocopherol und Phyllochinon in sich entwickelnden Pflanzen**

Pflanzen wurden unter Standardwachstumsbedingungen angezogen, Blattmaterial in regelmäßigen Zeitabständen geerntet und auf Chlorophyll und Chlorophyllid (A), Tocopherol (B) und Phyllochinon untersucht (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei bis fünf unabhängigen Messungen.

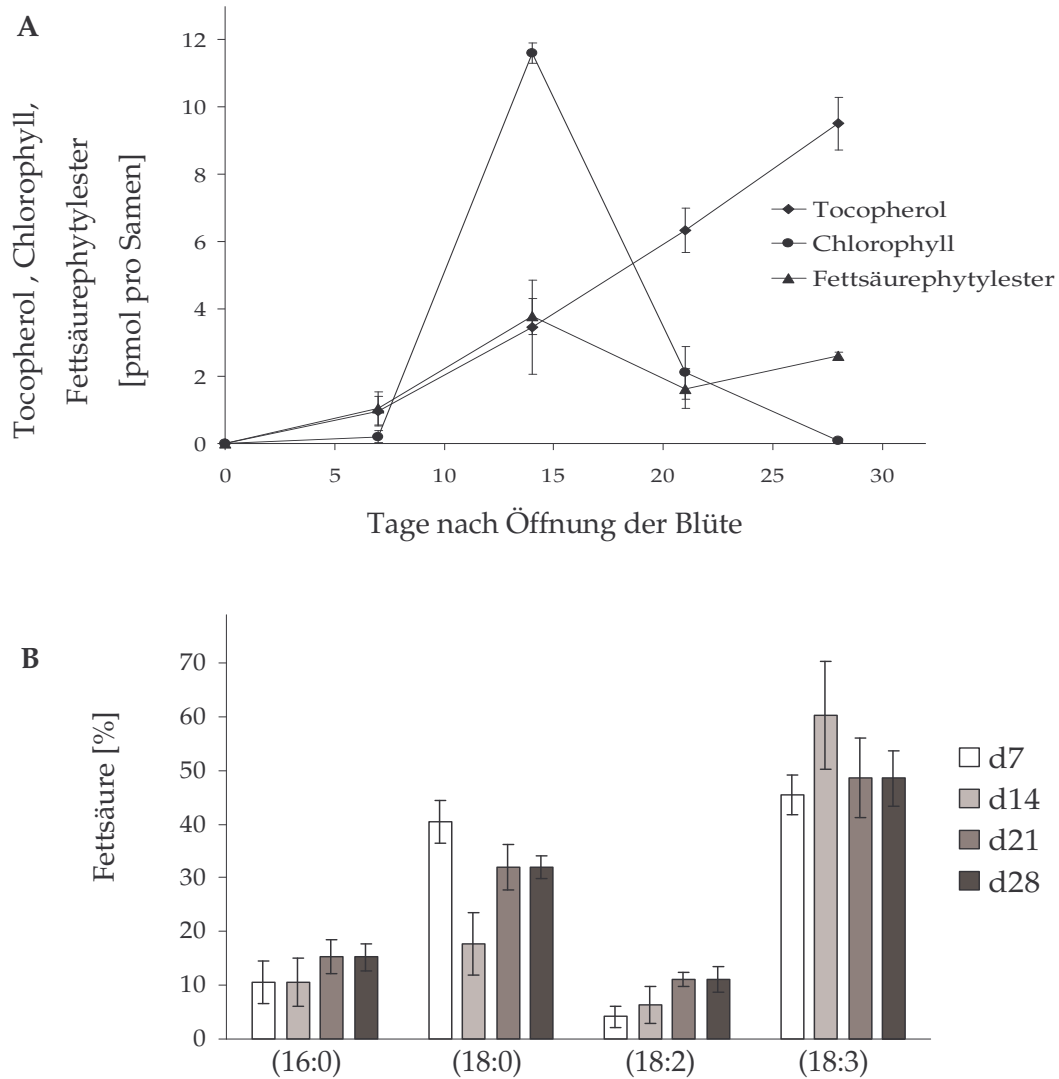


**Abb. 12 Chlorophyll, Tocopherol und Fettsäurephytylester in Blättern nach Stickstoffmangelstress**

Es wurden Pflanzen auf MS-Medium angezogen und nach drei Wochen auf Stickstoffmangelmedium bzw. frisches MS-Medium transferiert. Nach zehn Tagen wurden die Pflanzen geerntet und auf ihren Gehalt an Chlorophyll, Tocopherol und Fettsäurephytylester (A) analysiert. In (B) ist die Fettsäurezusammensetzung der Fettsäurephytylester dargestellt. Die Zahlen über den Balken in (A) stellen die Chlorophyllidanteile (Chlorophyllid/(Chlorophyll + Chlorophyllid)) dar. Angegeben sind die Mittelwerte ± SE von fünf unabhängigen Messungen.

Auch in sich entwickelnden Samen von *Arabidopsis* wird Chlorophyll abgebaut. Daher wurden reifende Samen auf ihre Gehalte an Chlorophyll, Tocopherol und Fettsäurephytylester untersucht (Abb. 13 A). Der Gehalt an Phyllochinon ist in reifenden Samen sehr gering (Lohmann, 2005), daher wurden die Samen nicht auf Phyllochinon analysiert. Mehrere Blüten wurden am Tag der Öffnung markiert und die Samen den Schoten nach definierter Zeit entnommen. In sich entwickelnden Samen ist zunächst (Tag 7) nur wenig Chlorophyll nachweisbar. Auch die Gehalte an Tocopherol und Fettsäurephytylester sind sehr niedrig. Am Tag 14 wurde der höchste Chlorophyllgehalt gemessen, dann nimmt dieser wieder ab. Dagegen nimmt der Tocopherolgehalt stetig zu. Der Tocopherolgehalt in reifen Samen beträgt etwa 9 pmol je Samen. Auch der Gehalt an Fettsäurephytylester steigt zunächst etwas an, stagniert dann aber ab Tag 14. Die Zusammensetzung der Fettsäurephytylester in Samen unterscheidet sich von der in Blättern. Während in Blättern hauptsächlich 10:0, 12:0, 14:0, 16:3 und 16:0 mit Phytol verestert sind (Abb. 12 B), kommen in Samen die Phytylester von 16:0, 18:0, 18:2 und 18:3 vor (Abb. 13 B).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sowohl in seneszierenden und gestressten Blättern als auch in sich entwickelnden Samen der Chlorophyllgehalt stetig abnimmt. Gleichzeitig steigen Chlorophyllid, Tocopherol und Fettsäurephytylester an. Dagegen war keine Änderung des Phyllochinonanteils in der Seneszenz feststellbar. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch den Abbau von Chlorophyll freigesetztes Phytol Eingang in die Synthese von Tocopherol und Fettsäurephytylester finden kann.



**Abb. 13 Tocopherol, Chlorophyll und Fettsäurephytylester in sich entwickelnden Samen**

Pflanzen wurden unter Standardwachstumsbedingungen angezogen. Blüten wurden am Tag der Öffnung markiert und Samen nach 7, 14, 21 bzw. 28 Tagen geerntet. Diese wurden auf Chlorophyll, Tocopherol und Fettsäurephytylester analysiert (A). Die Fettsäurezusammensetzung der Fettsäurephytylester ist in (B) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei bis fünf unabhängigen Messungen.

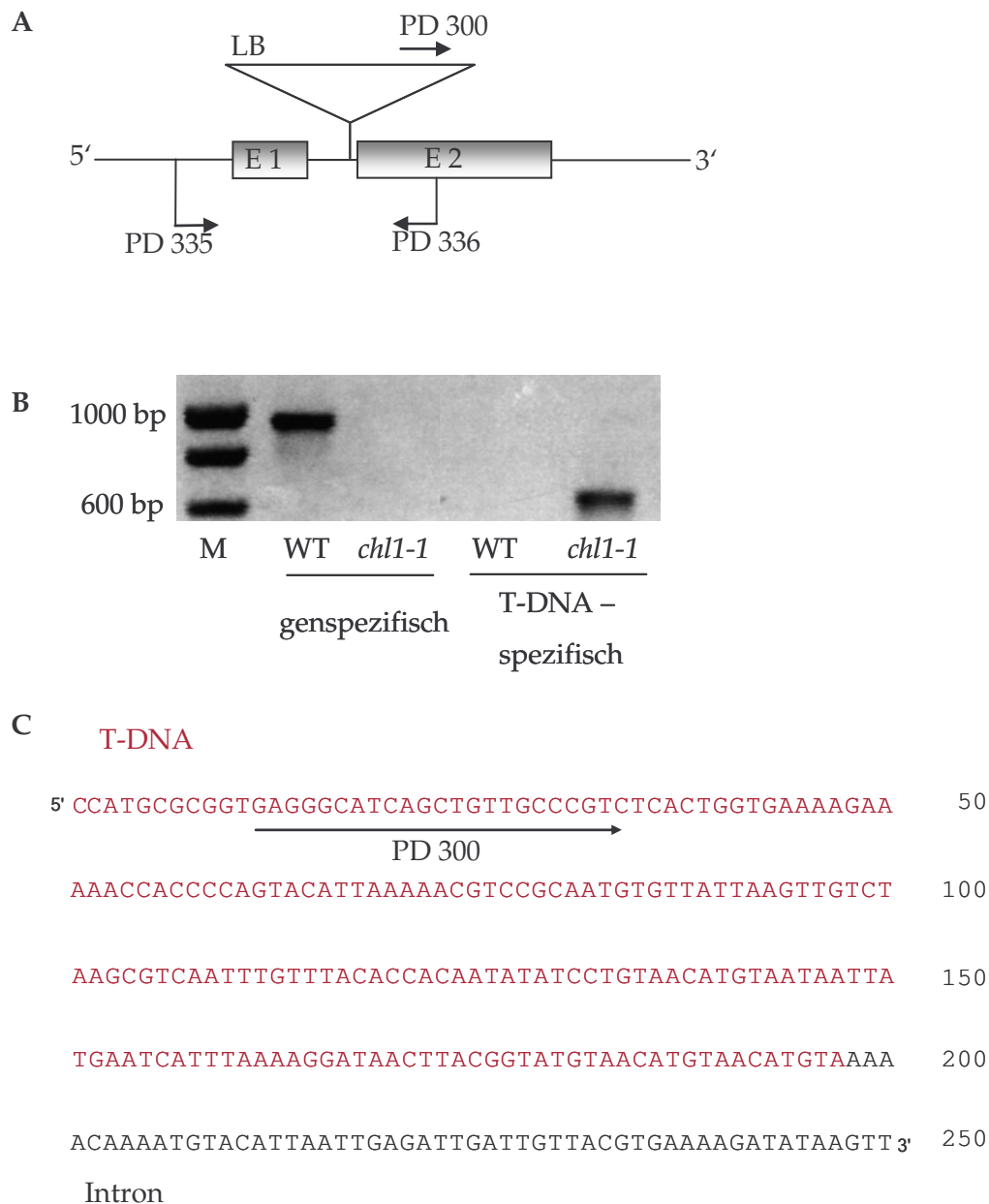
## 4.2 Analyse von Mutanten mit verminderter Chlorophyllaseaktivität

Chlorophyllase katalysiert die Hydrolyse des Chlorophylls unter Abspaltung von freiem Phytol. Für Chlorophyllase konnten in *A. thaliana* zwei Gene identifiziert werden, *Chlorophyllase1* (At1g19670) und *Chlorophyllase2* (At5g43860) (Tsuchiya *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob Phytol Substrat in anderen Stoffwechselprozessen ist, sollten zunächst Mutanten identifiziert werden, die eine verminderte Chlorophyllaseaktivität aufweisen. Dafür wurde auf T-DNA-Insertionsmutanten zurückgegriffen. Für *Chlorophyllase1* konnten zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien gefunden werden (*chl1-1*: SALK\_124978, *chl1-2*: FLAG\_065B09), für *Chlorophyllase2* wurde eine T-DNA-Insertionslinie identifiziert (*chl2*: FLAG\_076H05). Die Linien waren stets die 3. Generation (T3) der ursprünglich transformierten Pflanze und heterozygot für die T-DNA-Insertion. Mittels PCR mit einem T-DNA-spezifischen Primer und einem genspezifischen Primer konnte die T-DNA-Insertion im entsprechenden Genlocus identifiziert werden.

### 4.2.1 Isolierung der Mutanten *chl1-1*, *chl1-2*, *chl2*, *chl1-1chl2*

Mittels PCR konnte für jede T-DNA-Insertionsmutante eine Linie identifiziert werden, welche für die T-DNA-Insertion homozygot ist. Pro analysierte Pflanze wurden dafür je zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. In einer ersten Reaktion wurden genspezifische Primer verwendet. Ein Produkt entstand dann, wenn der betreffende Genabschnitt nicht durch die T-DNA unterbrochen wird, also im Falle des Wildtypgens. Eine zweite PCR-Reaktion wurde mit einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer durchgeführt. Es entsteht nur dann ein Reaktionsprodukt, wenn die T-DNA im Gen vorhanden ist. Durch Auswertung der beiden PCR-Reaktionen konnte darauf geschlossen werden, ob die betreffende Pflanze eine T-DNA-Insertion trägt, und ob sie für die Insertion heterozygot oder homozygot ist. Durch Sequenzierung der PCR-Fragmente der Mutanten, resultierend aus der PCR mit einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer, konnten die T-DNA-Insertionen in den Genloci bestätigt und genau lokalisiert werden. Die Insertion in der Linie *chl1-1* wurde im Intron nach Base 77 lokalisiert (Abb. 14 ). In *chl1-2* wurde die T-DNA im Intron, 3 bp

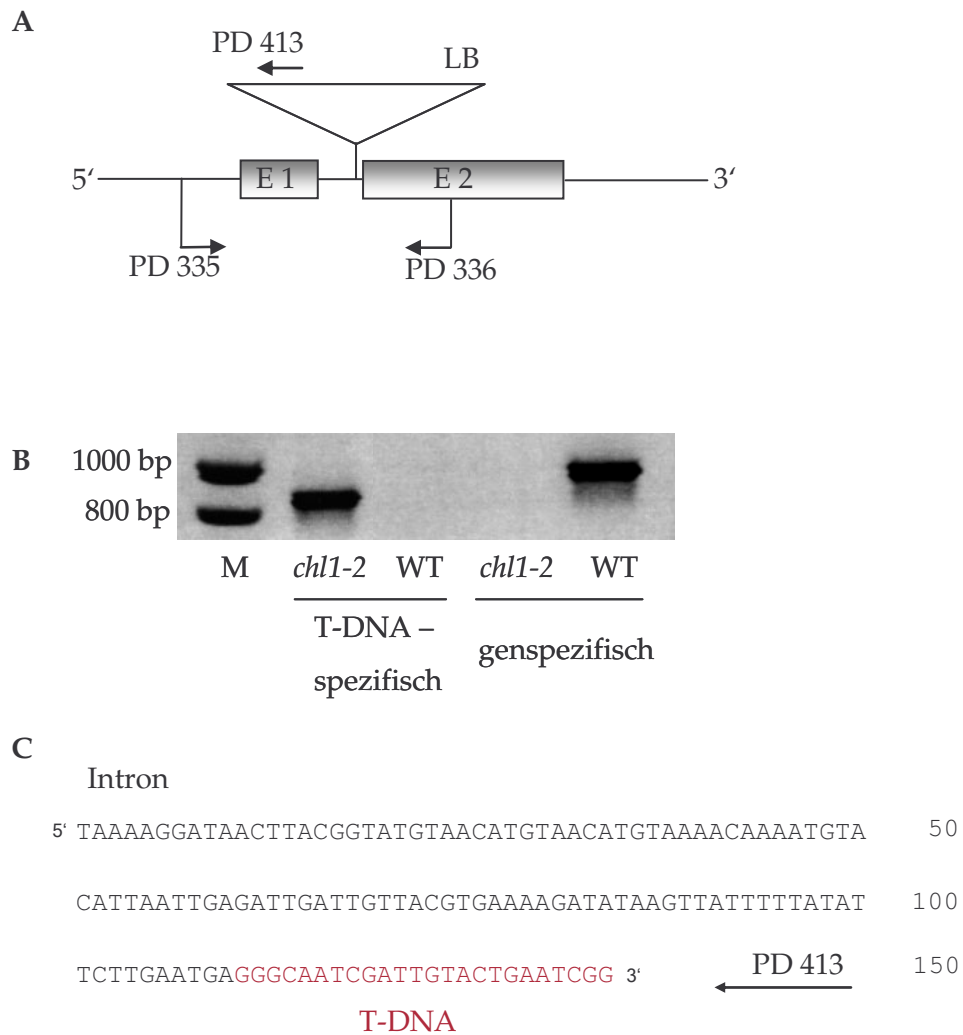
vor Beginn des zweiten Exons, identifiziert (Abb. 15) und die T-DNA in *chl2* wurde 27 bp nach dem Startcodon im ersten Exon lokalisiert (Abb. 16). Es konnte für alle drei Mutanten für die T-DNA-Insertion homozygote Pflanzen identifiziert werden. Für weitergehende Analysen muss beachtet werden, dass die von SALK Institute und INRA mutagenisierten Ökotypen verschieden sind. So ist der zu *chl1-1* entsprechende Ökotyp Columbia 0, während Wassilewskija der Ökotyp zu *chl1-2* und *chl2* ist.



**Abb. 14** Analyse der Insertionsstruktur in der T-DNA-Insertionsmutante *chl1-1* (SALK\_124978)

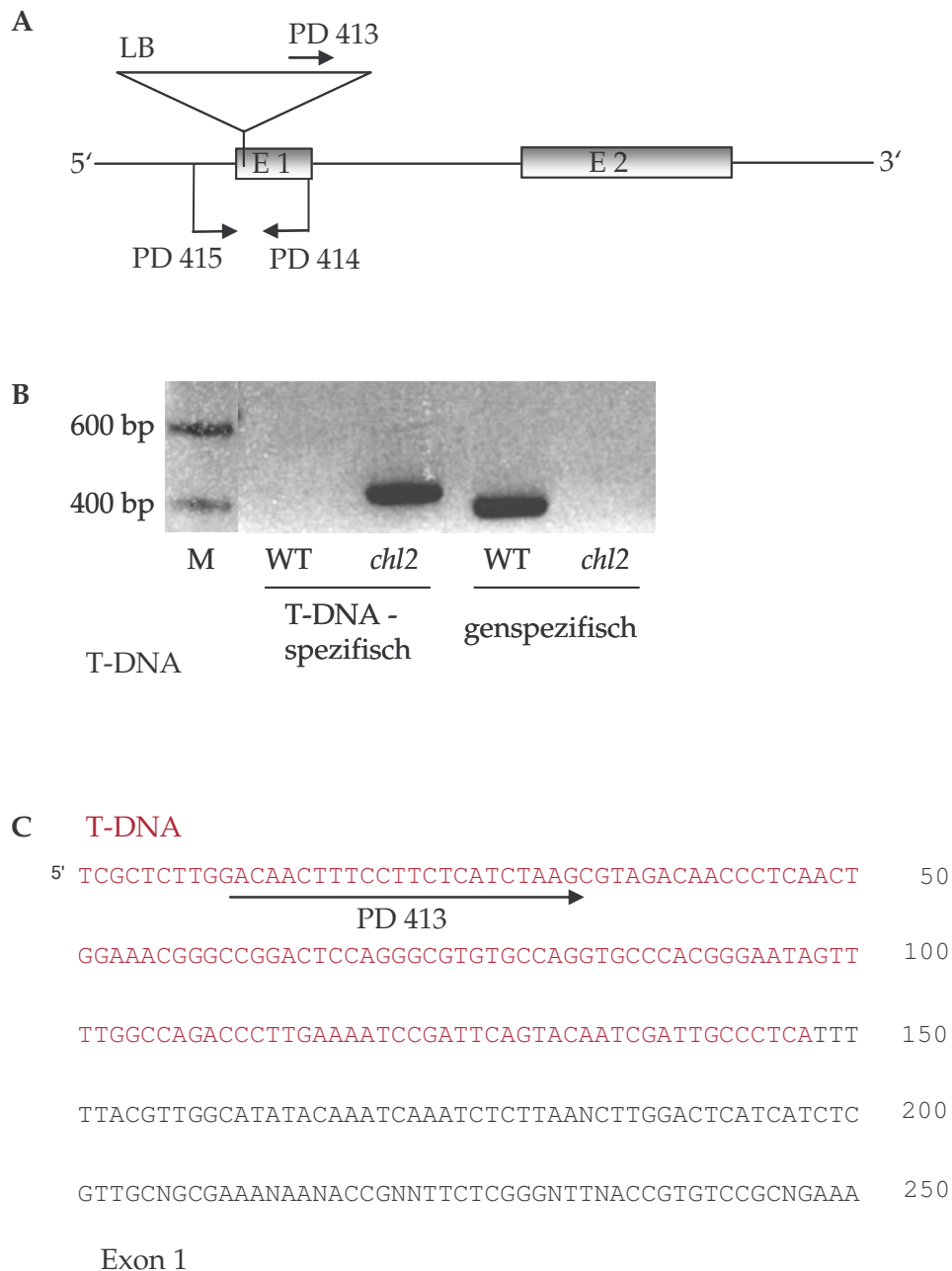
- A Schematische Darstellung der Insertionsstruktur der T-DNA. Die Exons sind mit E 1 und E 2 bezeichnet. Die Insertion ist im Intron lokalisiert.
- B Identifizierung der T-DNA in der Insertionsmutante *chl1-1*: Durch eine PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern PD 335 und PD 336 konnte im Wildtyp (WT), jedoch nicht in *chl1-1*, ein Fragment mit einer Größe von etwa 1000 bp amplifiziert werden. In einer zweiten T-DNA-spezifischen PCR-Reaktion wurde kein Fragment im Wildtyp, jedoch ein etwa 600 bp großes Fragment in *chl1-1* amplifiziert.
- C Das PCR-Fragment der T-DNA-spezifischen Reaktion von *chl1-1* wurde mit dem Primer PD 300 ansequenziert. Grau markierte Sequenzbereiche zeigen das erste Exon, rot markierte Bereiche Teile der T-DNA.





**Abb. 15 Analyse der Insertionsstruktur der T-DNA-Insertionsmutante *chl1-2* (FLAG\_065B09)**

- A Schematische Darstellung der Insertionsstruktur in *chl1-2*. E 1 und E 2 bezeichnen die Exons, die Insertion ist im Intron lokalisiert.
- B In einer PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern PD 335 und PD 336 konnte ein etwa 1000 bp großes Fragment im Wildtyp (WT), jedoch nicht in *chl1-2* amplifiziert werden. Die PCR-Reaktion mit den T-DNA-spezifischen Primern PD 413 und PD 335 lieferte ein Fragment der Größe 900 bp in *chl1-2*, jedoch nicht im Wildtyp.
- C Das PCR-Fragment der T-DNA-spezifischen Reaktion wurde mit PD 413 als Sequenzierungsprimer ansequenziert. Durch Abgleich dieser mit der genomischen Sequenz konnte die T-DNA in *CHL1* lokalisiert werden. Rot markiert ist die T-DNA-Sequenz.



**Abb. 16 Analyse der Insertionsstruktur der T-DNA-Insertionsmutante *chl2* (FLAG\_076H05)**

- A Schematische Darstellung der Insertionsstruktur der T-DNA in der Mutante *chl2*. Die T-DNA ist im ersten Exon (E 1) lokalisiert.
- B Eine PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern PD 415 und PD 414 lieferte ein Fragment von etwa 400 bp im Wildtyp (WT) und kein Fragment in *chl2*. Eine T-DNA-spezifische PCR-Reaktion mit den Primern PD 413 und PD 414 lieferte in *chl2* ein etwa 400 bp Fragment, aber kein Fragment im Wildtyp.
- C Sequenzierung des Fragmentes von *chl2* aus der T-DNA-spezifischen PCR-Reaktion bestätigte die T-DNA. Sequenzbereiche der T-DNA sind rot markiert.

#### 4.2.2 Kreuzung der *chl1-1*- und *chl2*-Mutanten zur Erzeugung der Doppelmutante *chl1-1chl2*

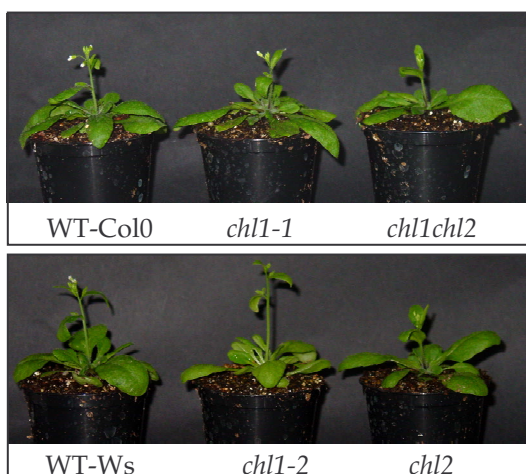
Mit dem Ziel, die Chlorophyllaseaktivität vollständig auszuschalten, wurden die Mutanten *chl1-1* und *chl2* gekreuzt. Da *CHL1* auf dem Chromosom 1 lokalisiert ist und *CHL2* sich auf dem Chromosom 2 befindet, wurden die T-DNA-Insertionen in der Nachkommenschaft nach den Regeln der Mendelschen Gesetze (Mendel, 1866) für einen dihybriden Erbgang vererbt. Es gilt die 3. Mendelsche Regel: Allele verteilen sich im Prinzip unabhängig voneinander und unabhängig von den Allelen anderer Gene auf die Nachkommen. Alle Nachkommen der Parentalgeneration sind nach dem Uniformitätsgesetz (2. Mendelsche Regel) uniform heterozygot. Eine heterozygote Pflanze der F1- Generation wurde geselbstet und gemäß der Spaltungsregel segregiert jede T-DNA-Insertion in der F2-Generation. Für den hier vorliegenden dihybriden Erbgang treten die resultierenden Phänotypen im Verhältnis 9:3:3:1 auf (Hennig, 2002). Das heißt, 9 von 16 Pflanzen zeigen einen Wildtyp-Phänotyp, da keine der T-DNA-Insertionen homozygot vorliegt. Es sind weiterhin jeweils 3 von 16 Pflanzen homozygot für die Mutation *chl1-1* bzw. *chl2*. Für beide T-DNA-Insertionen ist 1/16 der Generation homozygot. Analog zur Identifizierung der Einzelmutanten wurden mittels PCR die Pflanzen der F2-Generation auf ihren Genotyp analysiert. Von 45 analysierten Pflanzen konnten zwei doppelt homozygote Pflanzen identifiziert werden. Im Kreuzungsschema in Abb. 17 ist das Segregationsverhalten der T-DNA-Insertionen der beiden Mutanten *chl1-1* und *chl2* in der Kreuzung dargestellt.

Die Mutanten *chl1-1*, *chl1-2*, *chl2* und *chl1-1chl2* sind im Wachstum den Ökotypen Columbia 0 und Wassilewskija sehr ähnlich (Abb. 18). Es sind auch keine Unterschiede im Seneszenzverhalten zu beiden Wildtypen erkennbar.

<b>P</b>	♀	$\frac{chl1-1 \ CHL2}{chl1-1 \ CHL2}$	X	♂	$\frac{CHL1 \ chl2}{CHL1 \ chl2}$			
<b>F1</b>	♀	$\frac{chl1-1 \ CHL2}{CHL1 \ chl2}$	X	♂	$\frac{chl1-1 \ CHL2}{CHL1 \ chl2}$			
<b>F2</b>		$chl1-1 \ CHL2$		$chl1-1 \ chl2$		$CHL1 \ CHL2$		$CHL1 \ chl2$
$chl1-1 \ CHL2$		$\frac{chl1-1 \ CHL2}{chl1-1 \ CHL2}$		$\frac{chl1-1 \ chl2}{chl1-1 \ CHL2}$		$\frac{CHL1 \ CHL2}{chl1-1 \ CHL2}$		$\frac{CHL1 \ chl2}{chl1-1 \ CHL2}$
$chl1-1 \ chl2$		$\frac{chl1-1 \ CHL2}{chl1-1 \ chl2}$		$\frac{chl1-1 \ chl2}{chl1-1 \ chl2}$		$\frac{CHL1 \ CHL2}{chl1-1 \ chl2}$		$\frac{CHL1 \ chl2}{chl1-1 \ chl2}$
$CHL1 \ CHL2$		$\frac{chl1-1 \ CHL2}{CHL1 \ CHL2}$		$\frac{chl1-1 \ chl2}{CHL1 \ CHL2}$		$\frac{CHL1 \ CHL2}{CHL1 \ CHL2}$		$\frac{CHL1 \ chl2}{CHL1 \ CHL2}$
$CHL1 \ chl2$		$\frac{chl1-1 \ CHL2}{CHL1 \ chl2}$		$\frac{chl1-1 \ chl2}{CHL1 \ chl2}$		$\frac{CHL1 \ CHL2}{CHL1 \ chl2}$		$\frac{CHL1 \ chl2}{CHL1 \ chl2}$

**Abb. 17** Segregationsverhalten der T-DNA-Insertionen in der Kreuzung *chl1-1* x *chl2*

Ausgehend von der Parentalgeneration bis zur 2. Filialgeneration ist die Segregation der T-DNA-Insertionen der Mutanten *chl1-1* und *chl2* in der Kreuzung *chl1-1* x *chl2* dargestellt.



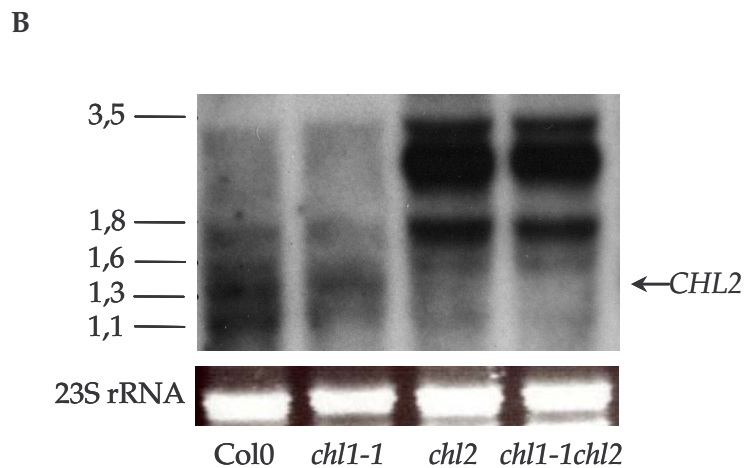
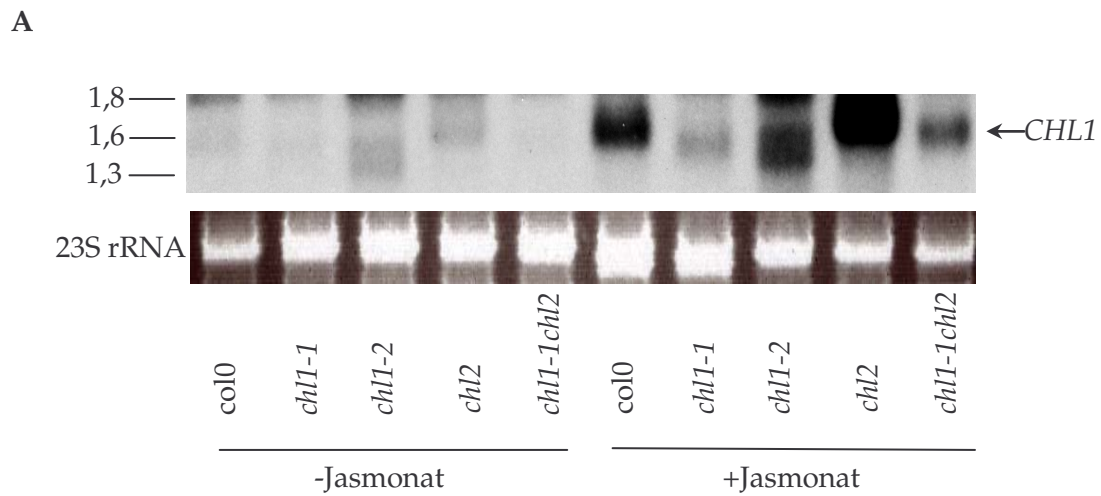
**Abb. 18** Der Wachstumsphänotyp der T-DNA-Insertionsmutanten *chl1-1*, *chl1-2*, *chl2* und *chl1-1chl2*

#### 4.2.3 Expressionsanalyse von *CHL1* und *CHL2* in den Mutanten

Expressionsanalysen von *CHL1* und *CHL2* sollten Aufschluss darüber geben, ob noch entsprechende Transkripte in den Mutanten detektierbar sind. Tsuchiya *et al.* (1999) demonstrierte, dass die Expression von *CHL1* unter Standardwachstumsbedingungen sehr gering ist, aber durch das Hormon Jasmonat induziert wird. Um beurteilen zu können, ob die Linien *chl1-1*, *chl1-2* und *chl1-1chl2* noch *CHL1*-Transkripte aufweisen, wurden für die Expressionsanalyse mit und ohne Jasmonat behandelte junge Pflanzen verwendet. Es wurde RNA präpariert, diese elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Northern-Blot-Analyse die Expression von *CHL1* analysiert. Zur Bestimmung der zu erwartenden mRNA-Größen wurden mittels Datenbankrecherche verschiedene cDNA-Klone von *CHL1* und *CHL2* (ESTs, expressed sequence tags; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) identifiziert und diese mit der genomischen Sequenz von *CHL1* bzw. *CHL2* verglichen. Für *CHL1*-mRNA wird ein Hybridisierungssignal von etwa 1400 bp und für *CHL2*-mRNA ein Signal von etwa 1300 bp erwartet. Im Northern-Blot von *CHL1*, zu sehen in Abb. 19 A, ist ein nur schwaches Hybridisierungssignal im Wildtyp in der erwarteten Größe ohne Jasmonatbehandlung zu erkennen. Der jasmonatbehandelte Wildtyp dagegen weist ein stärkeres Signal auf. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Tsuchiya *et al.*, 1999). In den Linien *chl1-1*, *chl1-2* und *chl1-1chl2* ist kein *CHL1*-Transkript der Größe entsprechend dem Wildtyp zu erkennen. Dafür ist in allen drei Linien ein kleineres Transkript erkennbar. Diese Transkripte können auf *CHL1*-mRNA-Bruchstücke zurückgeführt werden.

Tsuchiya *et al.*, (1999) und Benedetti und Arruda (2002) zeigten, dass *CHL2* konstitutiv, jedoch in Blättern sehr schwach exprimiert ist. Es sollte auch die Expression von *CHL2* in der T-DNA-Insertionsmutante *chl2* und der Doppelmutante *chl1-1chl2* überprüft werden. In Abb. 19 B ist ein Northern-Blot von Blättern von Wildtyp, *chl1-1*, *chl2* und *chl1-1chl2* gezeigt. Im Wildtyp und *chl1-1* ist jeweils ein sehr schwaches Signal in der erwarteten Größe von etwa 1300 bp erkennbar. Ein Hybridisierungssignal dieser Größe ist in *chl2* und *chl1-1chl2* nicht festzustellen. Im Northern-Blot ist in diesen Linien ein Signal für *CHL2* etwa 2000 bp größer als erwartet zu erkennen. Da sich auch innerhalb der T-DNA Promotoren befinden, ist es möglich, dass in den Linien *chl2* und *chl1-1chl2* ein mRNA-Fragment transkribiert wurde, welches aus Teilen von T-DNA-mRNA und *CHL2*-mRNA besteht.

In den untersuchten Linien konnten also für *CHL1* und *CHL2* nur aberrante Transkripte identifiziert werden, jedoch keine in der erwarteten Größe des Wildtyp.



**Abb. 19 Northern-Blot-Analyse von *CHL1* und *CHL2* in den Chlorophyllasemutanten**

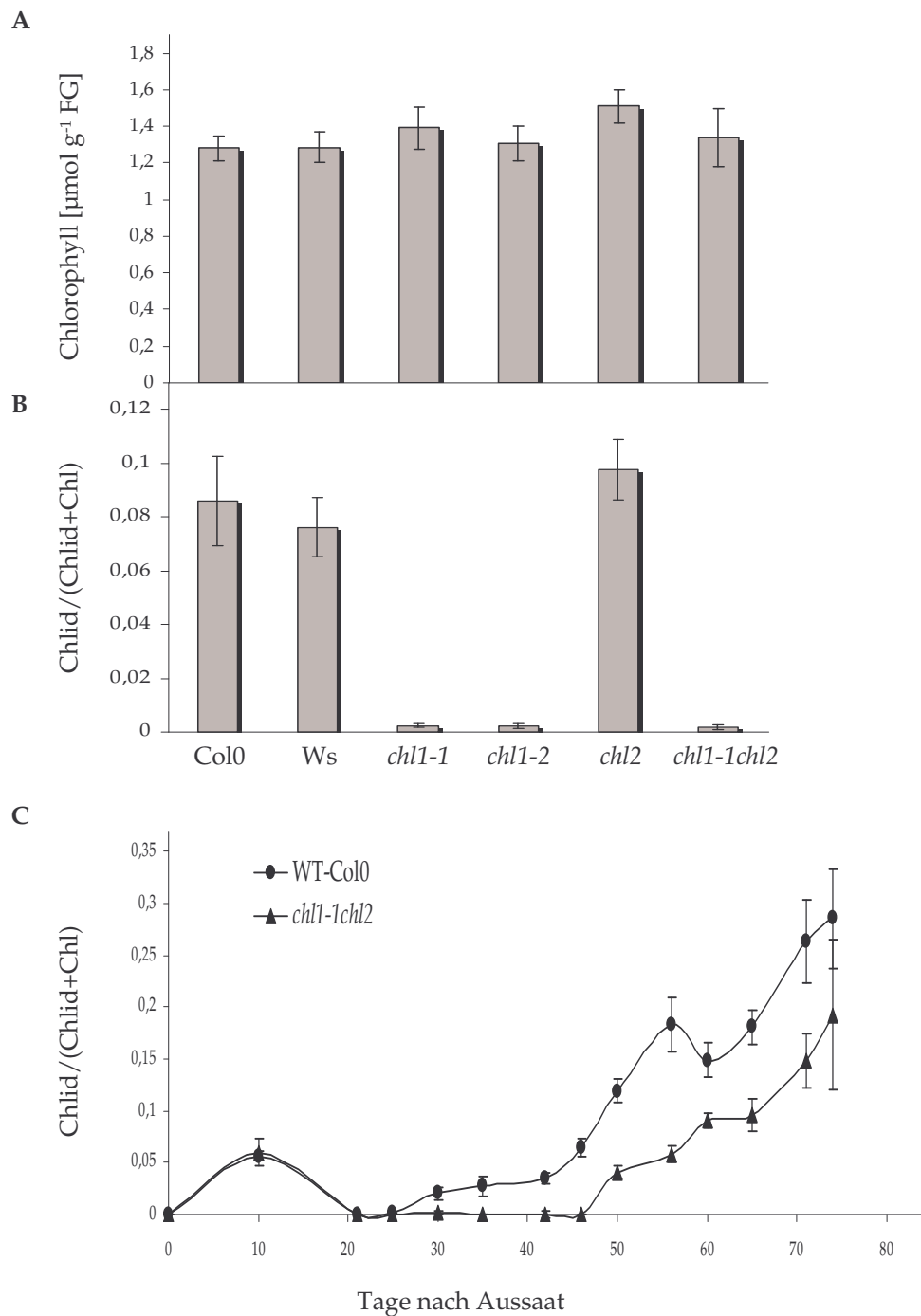
Dargestellt sind die Hybridisierungssignale und die 23S rRNA als Ladungskontrolle. Die mRNA-Größen sind in kbp angegeben.

- A Hybridisierung mit *CHL1*: Als Sonde wurde eine *CHL1*-cDNA (U25648, ABRC, Columbus, USA) verwendet. Ein Teil der Pflanzen wurden vor der Northern-Blot-Analyse mit Methyljasmonat behandelt.
- B Hybridisierung mit *CHL2*: Als Sonde wurde ein DNA-Stück mittels PCR und den Primern PD 415 und PD 414 amplifiziert.

#### 4.2.4 Der Chlorophyllidanteil in den Chlorophyllasemutanten ist stark reduziert

Das Produkt der Chlorophyllase-katalysierten Reaktion ist Chlorophyllid. Ob und in welchem Maße der Chlorophyllabbau bzw. die Hydrolyse des Phytols vom Tetrapyrrolring in den Mutanten *chl1-1*, *chl1-2*, *chl2* und in der Doppelmutante *chl1-1chl2* gehemmt ist, sollte durch Quantifizierung von Chlorophyll und Chlorophyllid analysiert werden. Die Bestimmung erfolgte nach einer Methode von Tsuchiya *et al.* (1997). Das Verhältnis aus der Menge von Chlorophyllid zu der Summe aus Chlorophyll und Chlorophyllid ( $\text{Chlorophyllid}/(\text{Chlorophyll} + \text{Chlorophyllid})$ ) gibt den Chlorophyllidanteil an. Der Abb. 20 A, B ist zu entnehmen, dass der Chlorophyllgehalt in allen untersuchten Linien ähnlich ist, jedoch ein um ca. 97% reduzierter Chlorophyllidanteil in *chl1-1*, *chl1-2* und *chl1-1chl2* gegenüber den Wildtypen nachgewiesen werden konnte. Der Chlorophyllidanteil in der *chl2*-Mutante entspricht etwa dem des Ökotyps Wassilewskija. Benedetti and Arruda (2002) und Tsuchiya *et al.* (1999) zeigten, dass *CHL2* in Blättern nur sehr schwach exprimiert wird. Auch die Bestimmung des Chlorophyllidgehaltes in der Mutante *chl2* lässt darauf schließen, dass in Blättern der Beitrag von *CHL2* zur Gesamt-Chlorophyllaseaktivität sehr gering ist.

Wie bereits in Abb. 11 gezeigt, steigt der Chlorophyllidanteil im Wildtyp in der Seneszenz stark an. Es sollte nun analysiert werden, wie der Verlauf des Chlorophyllidgehaltes in den Chlorophyllasemutanten in der Seneszenz ist. Für diesen Versuch wurde die Doppelmutante *chl1-1chl2* gewählt. Wie in Abb. 20 C zu sehen, ist kaum Chlorophyllid in noch nicht seneszenten *chl1-1chl2*-Pflanzen detektierbar, steigt dann jedoch ab Tag 50 kontinuierlich an. Zwar ist der Chlorophyllidanteil in der *chl1-1chl2*-Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp immer stark verringert, jedoch ist die Entwicklung des Chlorophyllidgehaltes in der Seneszenz ähnlich dem Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass unter Seneszenzbedingungen die Aktivität weiterer Hydrolasen zum Tragen kommt.



**Abb. 20 Bestimmung von Chlorophyll und Chlorophyllid in den Chlorophyllasemutanten**

Pflanzen wurden unter Standardwachstumsbedingungen angezogen und Blattmaterial nach sechs Wochen geerntet.

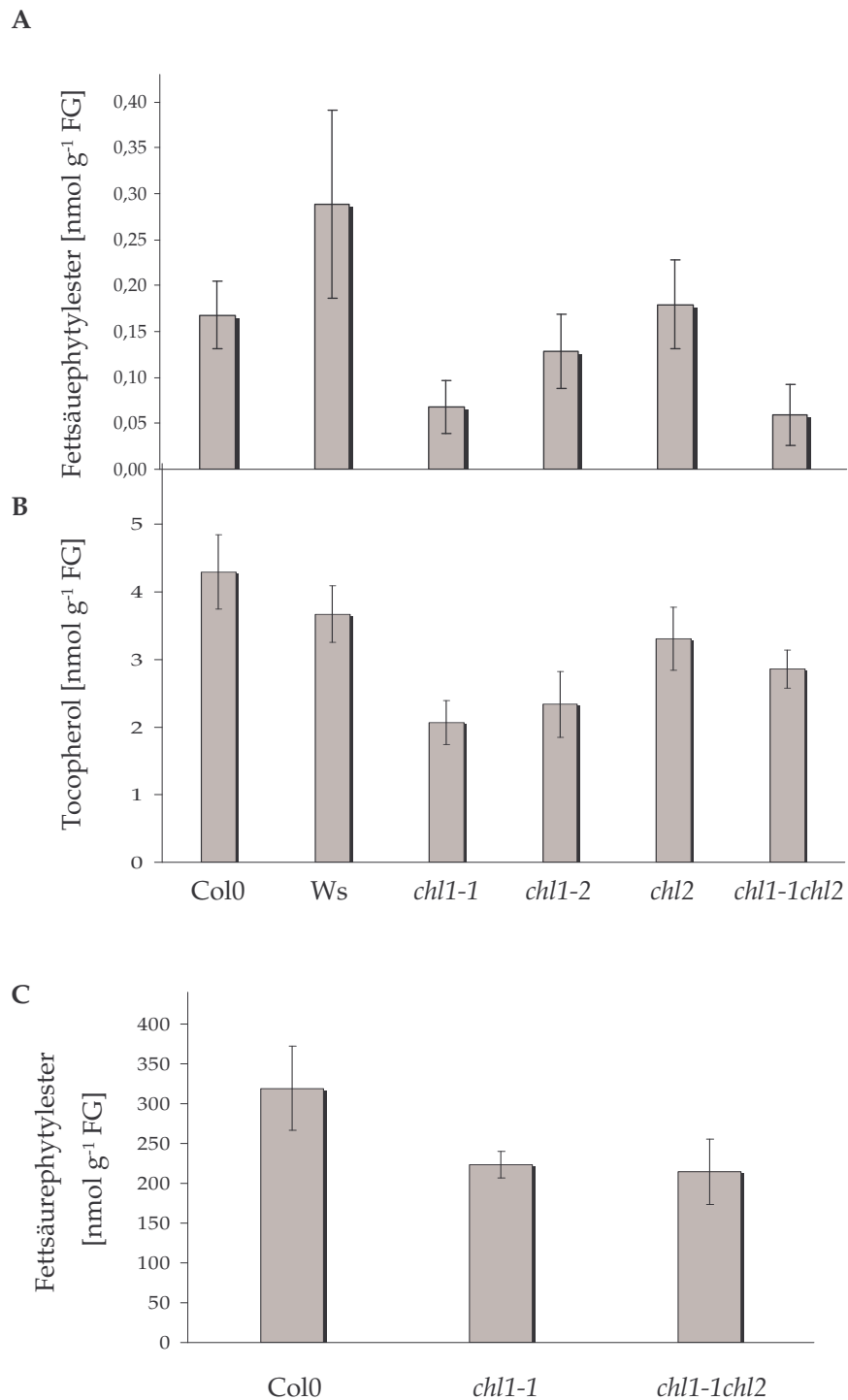
- A Chlorophyll wurde mit 80 % (v/v) Aceton extrahiert und spektrophotometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von vier bis fünf Messungen.
- B Dargestellt sind die Mittelwerte der Chlorophyllidanteile  $\pm$  SE von vier bis fünf Messungen.
- C Der Chlorophyllidanteil wurde in heranwachsenden Pflanzen von WT-Col0 und *chl1-1chl2* gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei bis fünf Messungen.



#### 4.2.5 Die Chlorophyllasemutanten akkumulieren etwas weniger Fettsäurephytyl-ester und Tocopherol

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die identifizierten Chlorophyllasemutanten einen stark reduzierten Chlorophyllidgehalt aufweisen. Infolgedessen wird vermutet, dass auch die Freisetzung an freiem Phytol stark reduziert ist. Da analysiert werden soll, ob durch Chlorophyllhydrolyse freigesetztes Phytol als Substrat in der Tocopherol- und Fettsäurephytylestersynthese dient, wurden Tocopherol und Fettsäurephytylester in diesen Mutanten quantifiziert. Tocopherol wurde mittels Fluoreszenz-Flüssigchromatographie (HPLC) nach Balz *et al.* (1992) bestimmt. Die Ermittlung der Fettsäurephytylester erfolgte mittels Massenspektrometrie-gekoppelter Gaschromatographie (GC-MS). In Abb. 21 A und B ist zu erkennen, dass der Gehalt an Fettsäurephytylester und Tocopherol selbst in den Ökotypen Columbia 0 und Wassilewskija unter nicht-seneszenten Bedingungen sehr gering ist. Wie bereits gezeigt, gehören Tocopherol und Fettsäurephytylester zu den stress- und seneszenzinduzierten Metaboliten. Es konnte geringfügig weniger Tocopherol und Fettsäurephytylester in *chl1-1*, *chl1-2* gegenüber den entsprechenden Wildtypen detektiert werden. Die Reduktion des Fettsäurephytylestergehaltes betrug etwa 60 % bzw. 50 % gegenüber dem Wildtyp Columbia 0 bzw. Wassilewskija. Der Tocopherolgehalt dieser Pflanzen war um etwa 50 % bzw. 30 % geringer gegenüber den Wildtypen. Während die Doppelmutante *chl1-1chl2* vergleichbare Mengen Fettsäurephytylester zu *chl1-1* anreicherte, konnte in dieser Linie etwas mehr Tocopherol als in *chl1-1* nachgewiesen werden, jedoch weniger als in beiden Wildtypen. Die Mutante *chl2* reicherte ähnlich hohe Mengen Fettsäurephytylester und Tocopherol wie der Ökotyp Wassilewskija an. Auch nach Stickstoffmangelbedingungen waren etwa 33 % weniger Fettsäurephytylester in *chl1-1* und *chl1-1chl2* im Vergleich zum Ökotyp Columbia 0 detektierbar (Abb. 21 C).

Zwar konnten geringere Mengen Tocopherol und Fettsäurephytylester in den Mutanten mit vermindertem Chlorophyllidanteil nachgewiesen werden. Der Chlorophyllidanteil war jedoch um 97 % reduziert, während der Gehalt an Tocopherol und Fettsäurephytylester maximal um 50 % bzw. 60 % reduziert war.

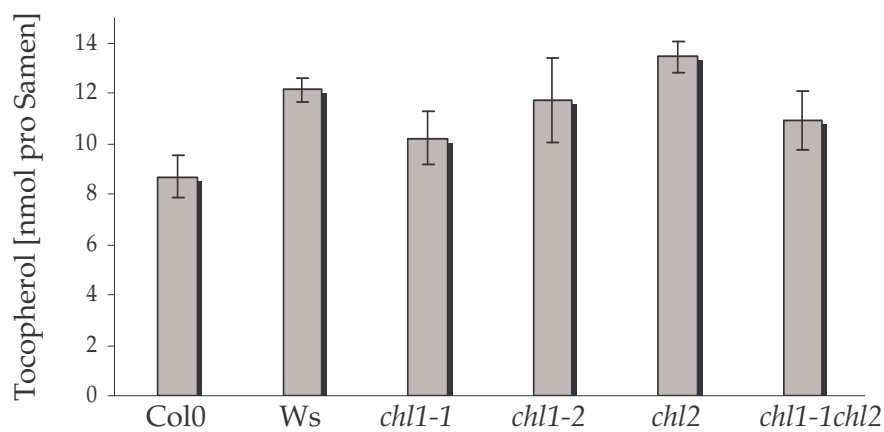


**Abb. 21 Bestimmung der Fettsäurephytylester und Tocopherol in den Blättern der Chlorophyllasemutanten**

Pflanzen wurden unter Standardwachstumsbedingungen angezogen und Blattmaterial von etwa sechs Wochen alten Pflanzen geerntet. Fettsäurephytylester (A) wurden per GC-MS und Tocopherol (B) mittels Fluoreszenz-HPLC analysiert. In (C) ist der Fettsäurephytylestergehalt nach Stickstoffmangelstress dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei bis fünf Messungen.

#### 4.2.6 Der Tocopherolgehalt der Samen der Chlorophyllasemutanten ist unverändert zum Wildtyp

Expressionsanalysen von Tsuchiya *et al.* (1999) zufolge ist *CHL2* in Blättern sehr gering exprimiert. Benedetti und Arruda (2002) zeigten zusätzlich, dass *CHL2* auch in Blüten und Blütenknospen exprimiert wird. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass dieses Gen in sich entwickelnden Samen eine Rolle spielt, was zu Veränderungen im Tocopherolgehalt der Samen insbesondere von *chl2* führen kann. Die Bestimmung von Tocopherol in den Samen der Chlorophyllasemutanten ergab allerdings keinen Unterschied zu den Wildtypen (Abb. 22).

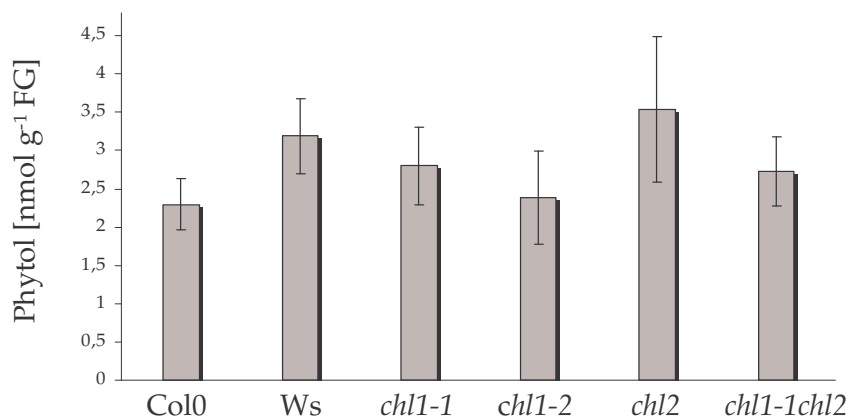


**Abb. 22 Tocopherolgehalte reifer Samen der Chlorophyllasemutanten**

Diethyletherextrakte reifer Samen wurden auf ihren Tocopherolgehalt analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei Messungen.

#### 4.2.7 Der Phytolgehalt in den Chlorophyllasemutanten

Freies Phytol entsteht bei der Hydrolyse von Chlorophyll im ersten Schritt des Chlorophyllabbaus (Willstätter und Mieg, 1906). Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten der Speicherung in Form von Fettsäurephytylestern, der Wiedereinschleusung in den Tocopherolsyntheseweg und des oxidativen Abbaus, verbleibt auch ein Teil als freies Phytol in der Zelle. Valentin und Mitarbeiter wiesen nach, dass in der Mutante *vte5* aufgrund einer Mutation in einer Phytolkinase mehr freies Phytol in den Samen von *vte5* akkumuliert als in Wildtypsamensamen (Valentin *et al.*, 2006). Der Einfluss der verminderten Chlorophyllaseaktivität auf den Gehalt an freiem Phytol sollte nun auch in den Chlorophyllasemutanten analysiert werden. Die Bestimmung erfolgte ebenfalls mittels GC-MS. Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt. Die Chlorophyllasemutanten reichern den Wildtypen ähnliche Mengen an freiem Phytol an.

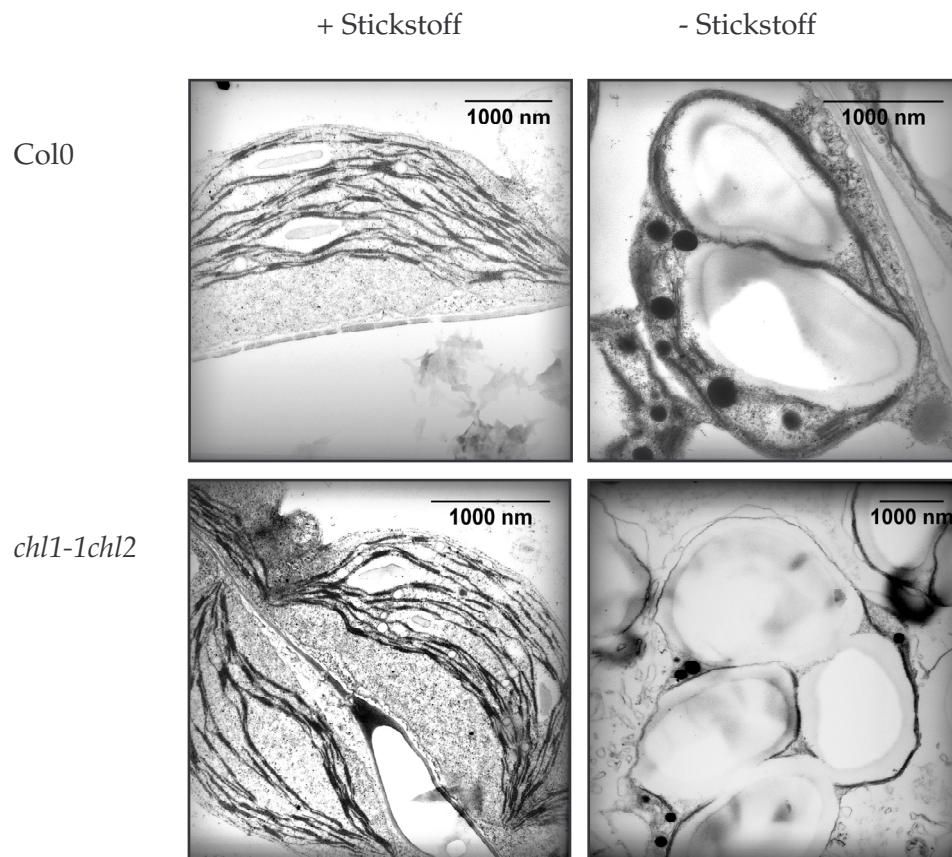


**Abb. 23 Bestimmung von freiem Phytol in den Blättern der Chlorophyllasemutanten**

Pflanzen wurden unter Standardwachstumsbedingungen angezogen und Blattmaterial nach etwa sechs Wochen geerntet. Phytol wurde in Form des Trimethylsilans per GC-MS quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von vier bis fünf Messungen.

#### 4.2.8 Die Plastoglobuli in den Chlorophyllasemutanten sind verkleinert

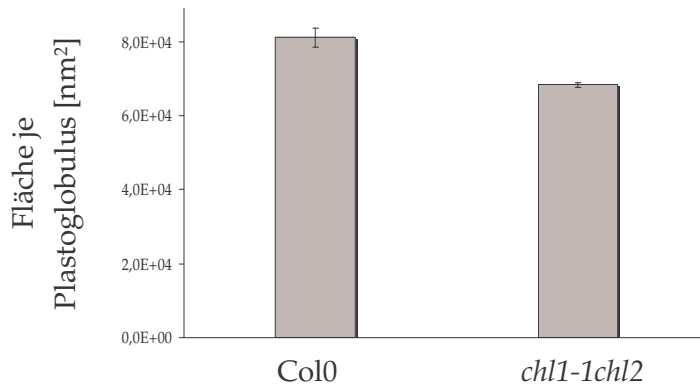
Tocopherol und Fettsäurephytylester steigen unter Seneszenz- bzw. Stressbedingungen stark an. Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde gezeigt, dass gerade unter diesen Bedingungen die Größe der Plastoglobuli in den Plastiden stark zunimmt (Gaude *et al.*, 2007). Mittels Analyse von fraktionierten Chloroplastenmembranen konnten Tocopherol und Fettsäurephytylester hauptsächlich in den Plastoglobuli identifiziert werden (Gaude *et al.*, 2007; Vidi *et al.*, 2006). Da unter Stickstoffmangelstress weniger Fettsäurephytylester in den Chlorophyllasemutanten detektierbar waren, wurden Ultradünnschnittpräparate von einzelnen Blättern von stickstoffmangelgestressten Pflanzen angefertigt und mittels Transmissions-elektronenmikroskopie analysiert. In ausgewählten Aufnahmen des Wildtyps (Abb. 24) und der Linie *chl1-1chl2* sind einzelne Chloroplasten nach Stickstoffmangelstress und nach voller Nährstoffzugabe gezeigt. Unter Normalbedingungen sind kleine Stärkekörner in Wildtypchloroplasten zu erkennen und kaum bzw. sehr kleine Plastoglobuli. Mehrere größere Plastoglobuli und Stärkekörner sind im Wildtyp nach Stickstoffmangelstress zu sehen. Diese führen zur Deformierung der Thylakoidmembran, wodurch sie schlechter sichtbar ist. Chloroplasten der Doppelmutante *chl1-1chl2* sind nach Anzucht unter Normalbedingungen denen des Wildtyps ähnlich. Nach Stickstoffmangelstress sind ebenfalls mehrere große Stärkekörner und Plastoglobuli sichtbar. Es sind jedoch nur noch vereinzelt Teile der Thylakoidmembran zu sehen und damit wirken die Chloroplasten der *chl1-1chl2*-Doppelmutante deformierter als die des Wildtyps.



**Abb. 24** Untersuchung der Chloroplastenultrastruktur der Chlorophyllasemutanten mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Pflanzen des Wildtyps und der Linie *chl1-1chl2* wurden auf MS-Medium angezogen und nach drei Wochen auf Stickstoffmangelmedium bzw. frisches Nährmedium transferiert. Nach sieben Tagen wurden die Pflanzen geerntet, fixiert und in einem Acrylpolymer eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte (60–70 nm) präpariert und diese mit einer Uranylacetat- und Bleizitratlösung kontrastiert.

Um zu untersuchen, ob die verminderte Akkumulation von Fettsäurephytylestern nach Stickstoffmangelstress (Abb. 21) einen Einfluss auf die Größe der Plastoglobuli hat, wurde mit Hilfe der Software ImageJ 1.37v ([www.imagej.com](http://www.imagej.com)) die Fläche einzelner Plastoglobuli bestimmt. In Abb. 25 ist zu erkennen, dass die Flächen einzelner Plastoglobuli von *chl1-1chl2* unter Stickstoffmangel gegenüber dem Wildtyp Columbia 0 um etwa 16 % reduziert sind.



**Abb. 25 Flächen einzelner Plastoglobuli in den Blättern der *chl1-1chl2* nach Stickstoffmangelstress**

Pflanzen wurde etwa drei Wochen auf MS-Medium angezogen und anschließend auf frisches Nährmedium bzw. Stickstoffmangelmedium transferiert. Es wurden Ultradünnschnittpräparate angefertigt und transmissionselektronenmikroskopisch analysiert. Dargestellt sind die Flächen einzelner Plastoglobuli von jeweils mindestens 200 analysierten Plastoglobuli.

### 4.3 Überexpression von *Chlorophyllase1*

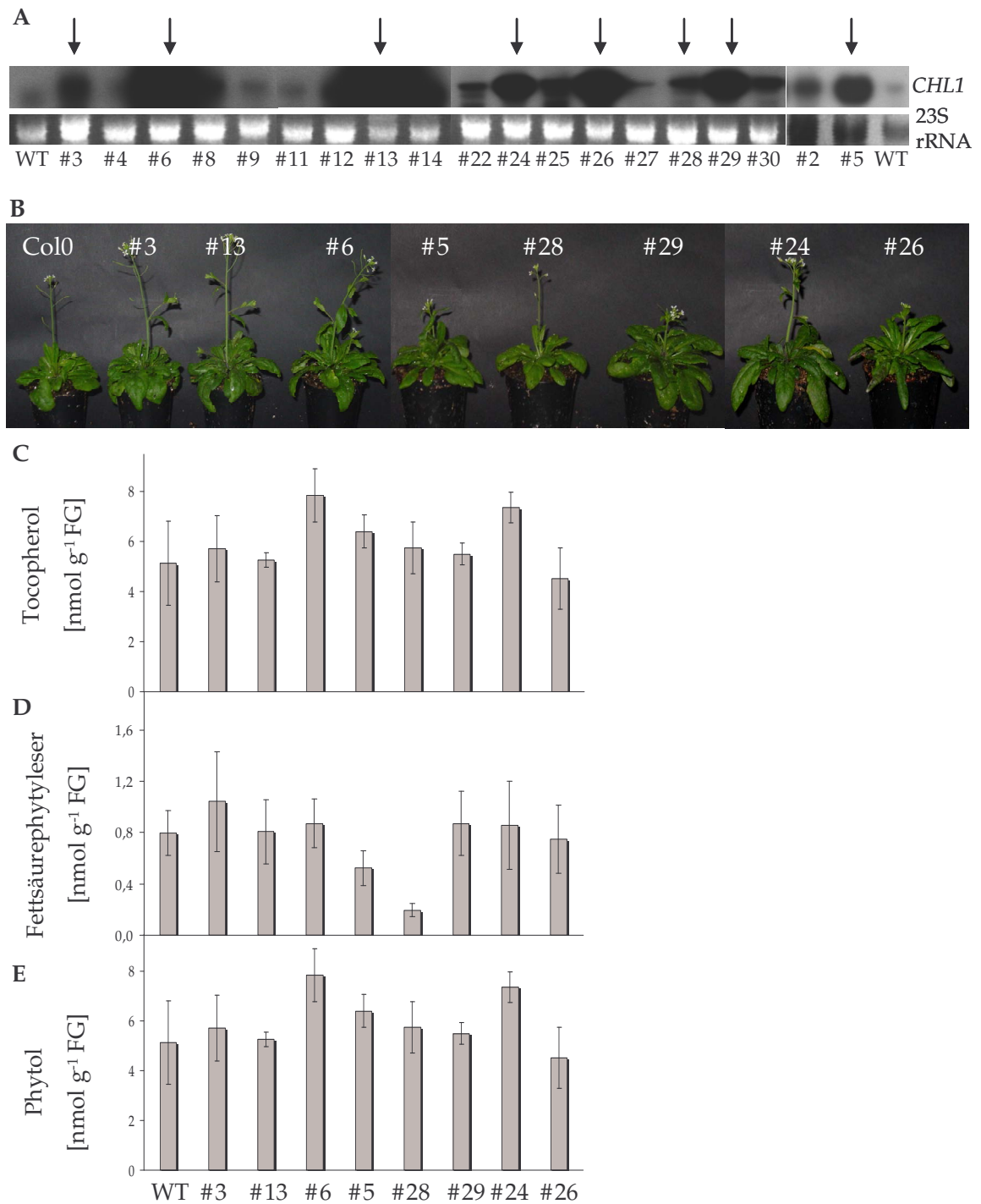
In *A. thaliana* konnten bisher die beiden Gene *CHL1* und *CHL2* für die Chlorophyllase identifiziert werden (Tsuchiya *et al.*, 1999). Die Analyse der Chlorophyllidanteile in den Chlorophyllasemutanten zeigte, dass der Chlorophyllidanteil in den *chl1-1*-Linien um etwa 97 % reduziert, während der Chlorophyllidanteil von *chl2* ähnlich hoch dem Wildtyp war. Daher wurde gefolgert, dass *CHL1* den höchsten Beitrag zur Chlorophyllaseaktivität in Blättern von *Arabidopsis* hat. Das Ziel der Überexpression von *CHL1* im Ökotyp Columbia 0 war, den Chlorophyllabbau und damit die Fettsäurephytylester- und Tocopherolsynthese zu induzieren. Des Weiteren wurde die tocopheroldefiziente EMS-Mutante *hpt1* mit *CHL1* transformiert. HPT1 katalysiert die Kondensation von Phytylpyrophosphat und Homogentisat innerhalb der Tocopherolsynthese. Die Induzierung der Chlorophyllhydrolyse in *hpt1* durch Überexpression von *CHL1* hat möglicherweise die Akkumulation von freiem Phytol bzw. eine Veränderung des Fettsäurephytylestergehaltes zur Folge, da Phytylpyrophosphat durch die eingeschränkte Aktivität von HPT1 nicht in die Tocopherolsynthese Eingang finden kann.

Mittels Northern-Blot-Analyse wurden solche Pflanzen ausgewählt, die ein starkes Expressionssignal für *CHL1* zeigten (Abb. 26 A, Abb. 27 A). Diese unabhängigen Linien wurden erneut angezogen und auf ihren Gehalt an Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phytol untersucht. Mit Ausnahme der transgenen Linie *CHL1-hpt1*#11 ähneln alle transgenen Pflanzen den entsprechenden Kontrollpflanzen *hpt1* bzw. dem Wildtyp Columbia 0 (Abb. 26 B, Abb. 27 B). Diese Linie ist im Wachstum gegenüber *hpt1* etwas reduziert. Da dieser Phänotyp jedoch nur in dieser Linie festgestellt werden konnte, kann der Phänotyp nicht auf die Überexpression von *Chlorophyllase1* zurückgeführt werden, sondern muss andere Ursachen haben.

Einige transgene Linien der Überexpression im Wildtyp Columbia 0 reicherten mehr Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phytol im Vergleich zum Wildtyp an (Abb. 26 C, D, E). Die Unterschiede waren jedoch minimal und nicht reproduzierbar. Daher können diese Ergebnisse nicht auf die *CHL1*-Überexpression zurückgeführt werden. Die Überexpression von *CHL1* im Wildtyp Columbia führte daher zu keiner deutlichen Erhöhung von Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phytol.

In Abb. 27 C ist zu erkennen, dass der Tocopherolgehalt von *hpt1* mit etwa 0,6 nmol g<sup>-1</sup> FG sehr gering ist. Die untersuchten Linien reicherten 0,8 nmol g<sup>-1</sup> FG bis 1,2 nmol g<sup>-1</sup> FG Tocopherol an. Dies entspricht einer Erhöhung von 33 % bis 100 %. Die Ergebnisse der Fettsäurephytylestermessung weisen in drei der untersuchten Linien (#8, #19, #11) einen hohen Standardfehler auf, daher kann nur von einer tendenziellen Erhöhung gegenüber *hpt1* ausgegangen werden. Die Linie #14 hatte etwa den gleichen Fettsäurephytylestergehalt wie *hpt1* (Abb. 27 D). Aufgrund der zum Teil hohen Standardfehler der Phytolmesswerte kann ebenfalls auf keinen Unterschied im Phytolgehalt zwischen *hpt1* und den transgenen Linien geschlossen werden (Abb. 27 E). Die Überexpression von *CHL1* im *hpt1*-Hintergrund führte also zu einer leichten Erhöhung des Tocopherolgehaltes, jedoch zu keiner Veränderung im Fettsäurephytylester- und Phytolgehalt.

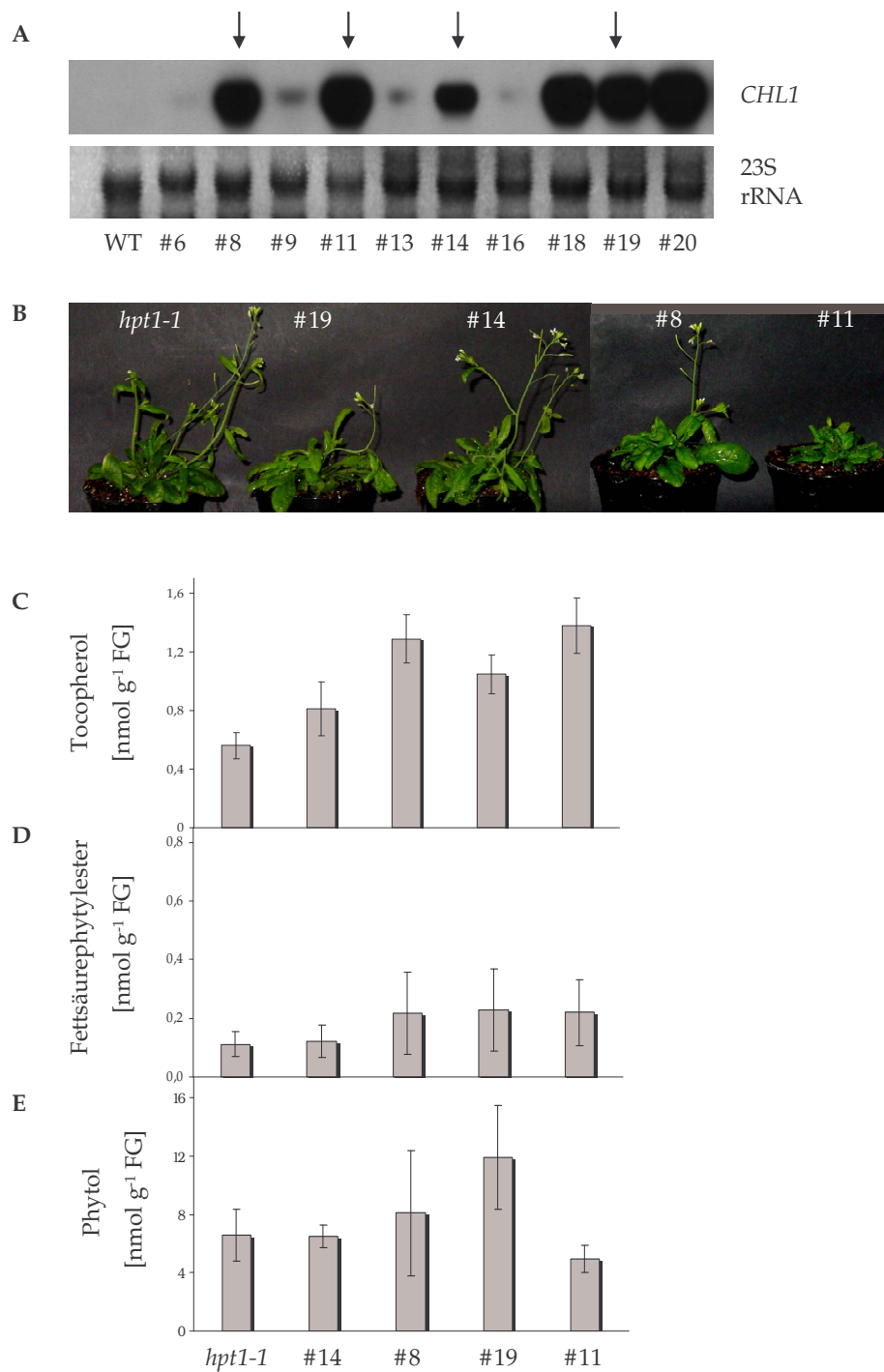




**Abb. 26** Überexpression von *Chlorophyllase1* im Ökotyp *Columbia 0*

Pflanzen wurden auf Hygromycin-B-haltigem MS-Medium angezogen. Transgene Pflanzen wurden auf Erde pikiert und Blätter nach etwa sechs Wochen geerntet.

- A Mittels Northern-Blot-Analyse wurden transgene Linien ausgewählt, welche ein starkes Expressionssignal für *CHL1* zeigten.
- B Der Wachstumsphänotyp der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp *Columbia 0*
- C Gezeigt sind die Mittelwerte der Tocopherolbestimmung von fünf Messungen  $\pm$  SE.
- D Gezeigt sind die Mittelwerte der Fettsäurephytyl ester von fünf Messungen  $\pm$  SE gezeigt.
- E Dargestellt sind die Mittelwerte der Phytolbestimmung von fünf Messungen  $\pm$  SE.



**Abb. 27 Überexpression von *Chlorophyllase1* in *hpt1-1***

Pflanzen wurden auf Hygromycin-B-haltigem MS-Medium angezogen. Transgene Pflanzen wurden auf Erde pikiert und Blätter nach etwa sechs Wochen geerntet.

- A Mittels Northern-Blot-Analyse wurden transgene Linien mit starkem Expressionssignal für *CHL1* ausgewählt.
- B Der Wachstumsphänotyp der Linien im Vergleich zur *hpt1-1*.
- C Dargestellt sind die Mittelwerte der Tocopherolbestimmung von fünf Messungen  $\pm$  SE.
- D Gezeigt sind die Mittelwerte der Fettsäurephytyl esterbestimmung  $\pm$  SE.
- E Dargestellt sind die Mittelwerte der Phytolbestimmung von fünf Messungen  $\pm$  SE.

## 4.4 Analyse weiterer Mutanten mit vermindertem Chlorophyllabbau

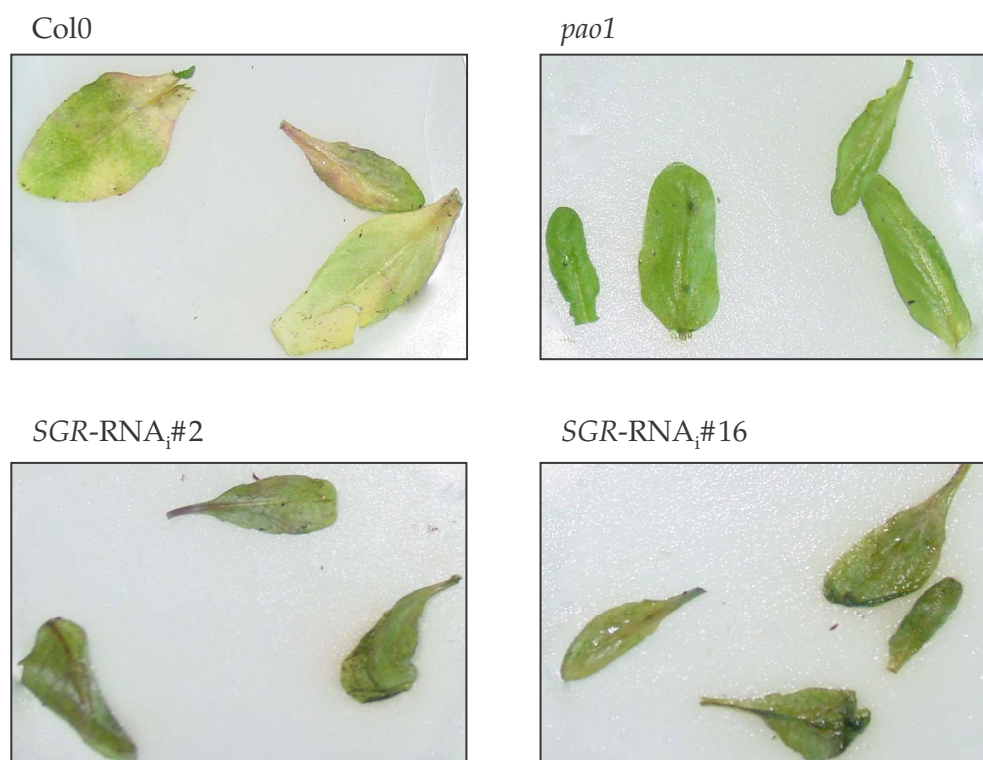
Die bisher analysierten Mutanten *chl1-1*, *chl1-2*, *chl2* und *chl1-1chl2* weisen verminderte Chlorophyllidanteile auf, was auf eine verminderte Chlorophyllaseaktivität hinweist. Dennoch seneszieren diese Linien ähnlich den Wildtypen, d.h. eine Verzögerung des *in vivo* Chlorophyllabbaus ist bei den Chlorophyllasemutanten nicht festzustellen.

In *staygreen*-Mutanten ist durch eine Mutation der seneszenzbedingte Chlorophyllabbau gestört, was zu einer Retention des Chlorophylls in der Seneszenz führt. Es konnten *staygreen*-Mutanten verschiedener Spezies identifiziert werden. Bereits Mendel beschrieb eine Mutante aus Erbse, deren Cotyledone die Grünfärbung nicht verlieren (Mendel, 1866) und Vicentini *et al.* (1995) isolierten die *staygreen*-Grasmutante Bf993 (*Festuca pratensis*). Bei beiden Mutanten handelt es sich um eine Mutation in dem Locus *SGR*. Analyse der Chlorophyllabbauprodukte von Bf993, sowie *in vitro*-Enzymaktivitätstest ließen den Schluss zu, dass es sich bei *SGR* um ein regulatorisches Gen der Pheophorbid-a-Oxygenase handelt. Eine weitere Mutante mit fehlendem Chlorophyllabbau in der Seneszenz, ist die T-DNA-Insertionsmutante *pao1* (Pružinska *et al.*, 2003). Nach dunkelinduzierter Seneszenz konnten in *pao1* große Mengen an Pheophorbid a, Chlorophyllid und letztendlich auch Chlorophyll detektiert werden. Da aufgrund des inhibierten Chlorophyllabbaus in diesen Mutanten wahrscheinlich auch weniger Phytol freigesetzt wird, sind diese Linien gut geeignet, den Phytolmetabolismus zu untersuchen. Für die Arbeit wurden *pao1* und zwei unabhängige RNA<sub>i</sub>-Linien von *SGR* (*SGR*-RNA<sub>i</sub>#2, #16) zur Verfügung gestellt (Hörtensteiner, Zürich, Schweiz).

### 4.4.1 Induktion der Seneszenz nach Dunkelbehandlung von *pao1* und *SGR*-RNA<sub>i</sub>

Dunkelbehandlung von Pflanzen ruft typische Seneszenzereignisse hervor, wie z.B. gelbliche Blätter durch Chlorophyllabbau, verstärkte Expression von seneszenzassoziierten Transkriptionsfaktoren und Genen verschiedener Abbauprozesse wie der Proteindegradation und  $\beta$ -Oxidation von Lipiden. Auf der anderen Seite konnte eine verminderte Expression von Genen gezeigt werden, die in

anabolischen Prozessen wie Aminosäurebiosynthese, Glycolyse und den Reaktionen der Photosynthese und Kohlenstofffixierung involviert sind (Lin und Wu, 2004). Um die Seneszenz in Blättern von Wildtyp Columbia 0, *pao1* und den beiden *SGR-RNA<sub>i</sub>*-Linien #2 und #16 zu induzieren, wurden diese in der Dunkelheit inkubiert. In Abb. 28 sind Blätter dieser Linien nach fünf Tagen Dunkelbehandlung gezeigt. Während im Wildtyp deutlich der seneszenzbedingte Chlorophyllabbau zu erkennen ist, weisen die Blätter von *pao1* noch eine kräftige grüne Blattfarbe auf. Die Blätter der *SGR-RNA<sub>i</sub>*-Linien zeigen einen intermediären Phänotyp, d.h. Chlorophyllabbau ist zu erkennen, aber weniger stark als im Wildtyp.

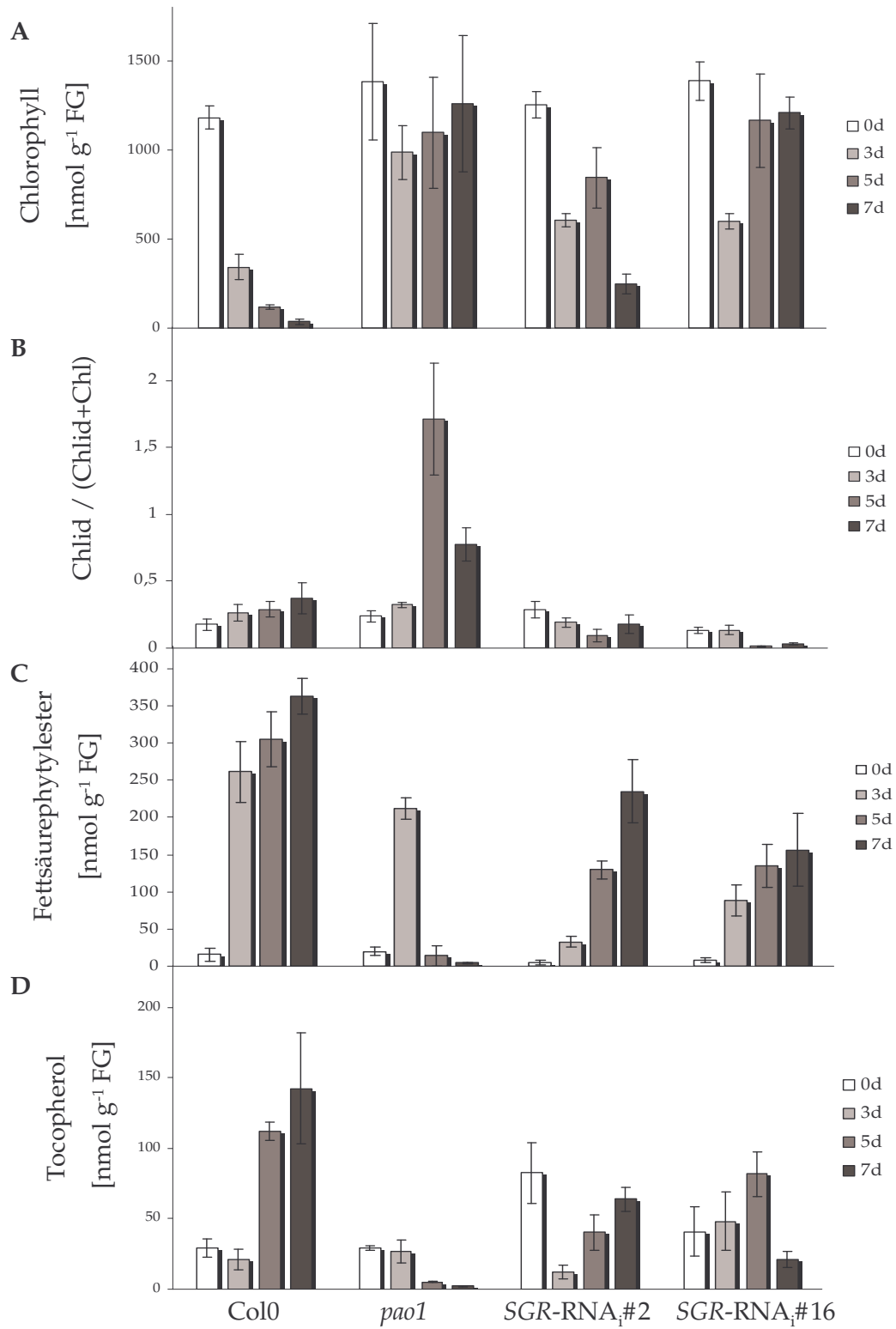


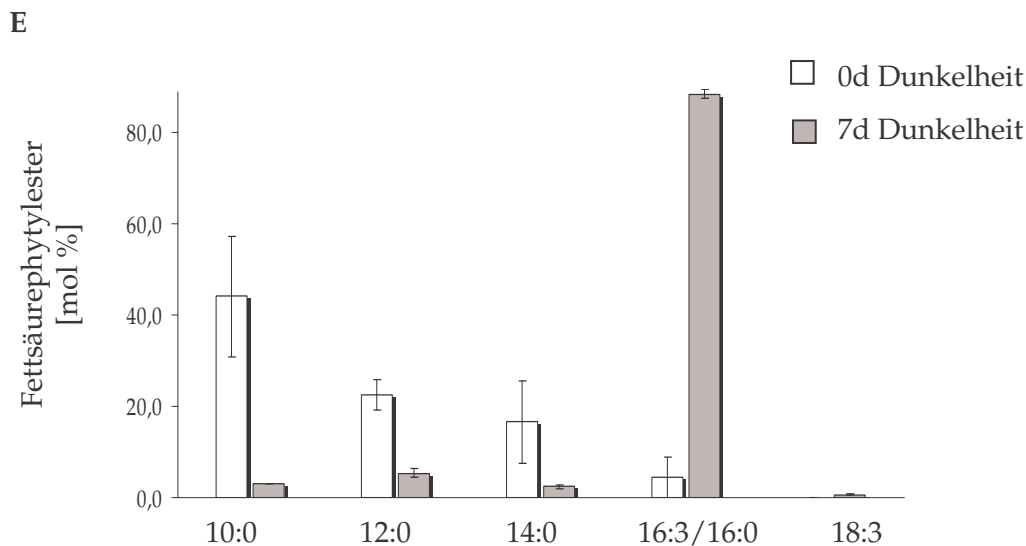
**Abb. 28 Induktion der Seneszenz durch Dunkelbehandlung in *pao1* und *SGR-RNA<sub>i</sub>*-Linien**  
Pflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen. Mit Öffnung der ersten Blüten wurden Blätter geerntet und in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier in der Dunkelheit für fünf Tage inkubiert.

#### 4.4.2 Analyse von *pao1* und *SGR-RNA<sub>i</sub>* nach dunkelinduzierter Seneszenz

Die nach Dunkelbehandlung seneszenten Blattproben von *pao1* und *SGR-RNA<sub>i</sub>* wurden nach drei, fünf bzw. sieben Tagen auf den Gehalt an Tocopherol, Fettsäurephytylester, Chlorophyll und Chlorophyllid untersucht. Als Kontrolle dienten Blätter vom Tag 0. In Abb. 29 A und B sind der Chlorophyll- und Chlorophyllidanteil dargestellt. Während im Wildtyp nach Dunkelbehandlung kaum noch Chlorophyll detektierbar war, ist der Chlorophyllgehalt von *pao1* an den untersuchten Tagen etwa gleich. In der *SGR-RNA<sub>i</sub>#2*-Linie nimmt der Chlorophyllgehalt ab, jedoch weniger im Vergleich zum Wildtyp. In *SGR-RNA<sub>i</sub>#16* konnte an den Tagen 5 und 7 ähnlich hohe Mengen Chlorophyll wie in *pao1* bestimmt werden. Chlorophyllid steigt im Wildtyp kaum an, dagegen akkumuliert es in *pao1* in großen Mengen. Ein Anstieg an Chlorophyllid war auch in den *SGR-RNA<sub>i</sub>*-Linien nicht zu verzeichnen. Bereits nach drei Tagen Dunkelbehandlung steigen Fettsäurephytylester im Wildtyp über das Zehnfache im Vergleich zu Tag 0 an. Auch in *pao1* ist an diesem Tag ein starker Anstieg zu verzeichnen, jedoch nicht mehr am Tag fünf und sieben der Dunkelbehandlung. Fettsäurephytylester akkumulieren auch in beiden *SGR-RNA<sub>i</sub>*-Linien, jedoch erfolgt der Anstieg im Vergleich zum Wildtyp langsamer und am siebten Tag entspricht der Fettsäurephytylestergehalt dem des Wildtyps vom dritten Tag der Seneszenzinduktion. Ab Tag fünf ist auch ein Anstieg an Tocopherol im Wildtyp zu verzeichnen und es akkumuliert etwa drei Mal soviel Tocopherol im Vergleich zur Kontrolle (Tag 0). In *pao1* dagegen ist kein Anstieg des Tocopherolgehaltes erkennbar, die Linien *SGR-RNA<sub>i</sub>#2* und *SGR-RNA<sub>i</sub>#16* zeigen einen moderaten Anstieg an Tocopherol.

Während im Wildtyp durch Dunkelbehandlung schnell und stark Chlorophyll abgebaut wird, ist der Chlorophyllabbau in *pao1* stark vermindert. Die *RNA<sub>i</sub>*-Linien zeigen im Chlorophyllabbau einen intermediären Phänotyp zu Wildtyp und *pao1*. Der Gehalt an Tocopherol und Fettsäurephytylester in *pao1*, *SGR-RNA<sub>i</sub>#2* und *SGR-RNA<sub>i</sub>#16* zeigt deutlich einen Zusammenhang zum Chlorophyllabbau bzw. Chlorophyllidanteil in diesen Linien.





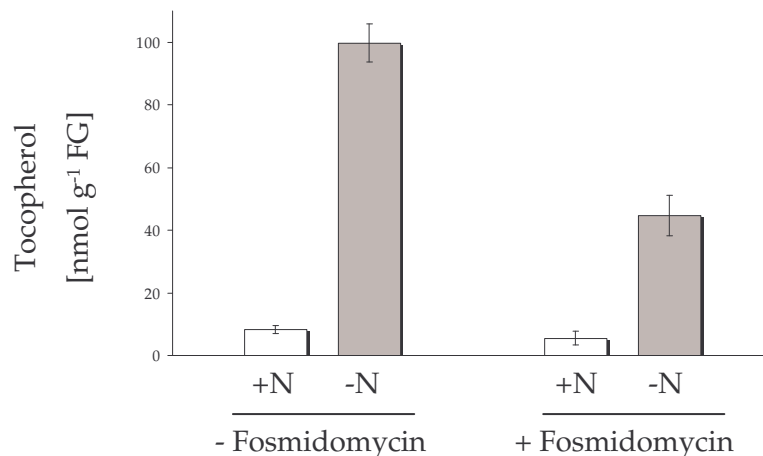
**Abb. 29** Analyse seneszenzinduzierter Blätter von *pao1* und *SGR-RNA<sub>i</sub>*

Seneszenzinduzierte Blätter wurden auf Chlorophyll (A), Chlorophyllid (B), Fettsäurephytyl ester (C) und Tocopherol (D) untersucht. In (E) ist die Fettsäurephytyl esterzusammensetzung des Wildtyps vor (0d) bzw. nach 7d Dunkelbehandlung gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei Messungen.

## 4.5 Inhibierung der plastidären *de novo*-Isoprenoidsynthese durch den Inhibitor Fosmidomycin

Für die Synthese von Tocopherol kann Phytylpyrophosphat über den plastidären *de novo*-Isoprenoidsyntheseweg bereitgestellt werden. Ein alternativer Weg zur Bereitstellung von Phytylpyrophosphat ist die Phosphorylierung von Phytol (Valentin *et al.*, 2006), welches während des Chlorophyllabbaus entsteht. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die plastidäre *de novo*-Isoprenoidsynthese auf die Menge des unter Stressbedingungen synthetisierten Tocopherols hat, sollte dieser Syntheseweg mittels eines spezifisch wirkenden Inhibitors gehemmt werden. Fosmidomycin inhibiert die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphatreductoisomerase innerhalb der plastidären Synthese von Isopentenylidiphosphat. Laule *et al.* (2003) zeigten, dass unter Anwendung dieses Inhibitors die Chlorophyllsynthese inhibiert wird, was zur starken Ausbleichung behandelter Pflanzen führte.

Nach Anzucht auf MS-Medium wurden die Pflanzen auf fosmidomycinhaltiges Stickstoffmangelmedium transferiert und nach zehn Tagen auf den Tocopherolgehalt untersucht. In Abb. 30 ist zu erkennen, dass der Tocopherolgehalt in stickstoffmangelgestressten, nicht fosmidomycinbehandelten Pflanzen etwa 100 nmol g<sup>-1</sup> FG beträgt, während fosmidomycinbehandelte Pflanzen nur noch ca. 40 nmol g<sup>-1</sup> FG Tocopherol aufweisen. Die Behandlung mit dem Inhibitor Fosmidomycin führte also zu einer Reduktion des Tocopherolgehaltes von etwa 60 %.



**Abb. 30 Tocopherolgehalt im Wildtyp Columbia 0 nach Hemmung der *de novo*-Isoprenoidsynthese durch den Inhibitor Fosmidomycin**

Pflanzen des Wildtyps Columbia 0 wurden auf MS-Medium angezogen und nach drei Wochen auf Stickstoffmangelmedium mit und ohne Fosmidomycin transferiert. Nach zehn Tagen wurden die Pflanzen geerntet. Gezeigt ist der Gehalt an Tocopherol  $\pm$  SE von drei bis fünf Messungen.

#### 4.6 Analyse einer Geranylgeranylreduktase-Mutante (*ggr*)

Phytol ist Bestandteil verschiedener Intermediate des zentralen Metabolismus und wird als Phytolpyrophosphat innerhalb des plastidären Isoprenoidsyntheseweges synthetisiert. Es entsteht durch Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat unter Verbrauch von drei Reduktionsäquivalenten (NADPH + H<sup>+</sup>). Diese Reaktion wird katalysiert durch Geranylgeranylreduktase (GGR). Die Reduktion der Expression von GGR durch *antisense*-RNA in Tabak führte zur Abnahme des Chlorophyll- und Tocopherolgehaltes (Tanaka *et al.*, 1999). Über 50 % des Chlorophyllgehaltes dieser



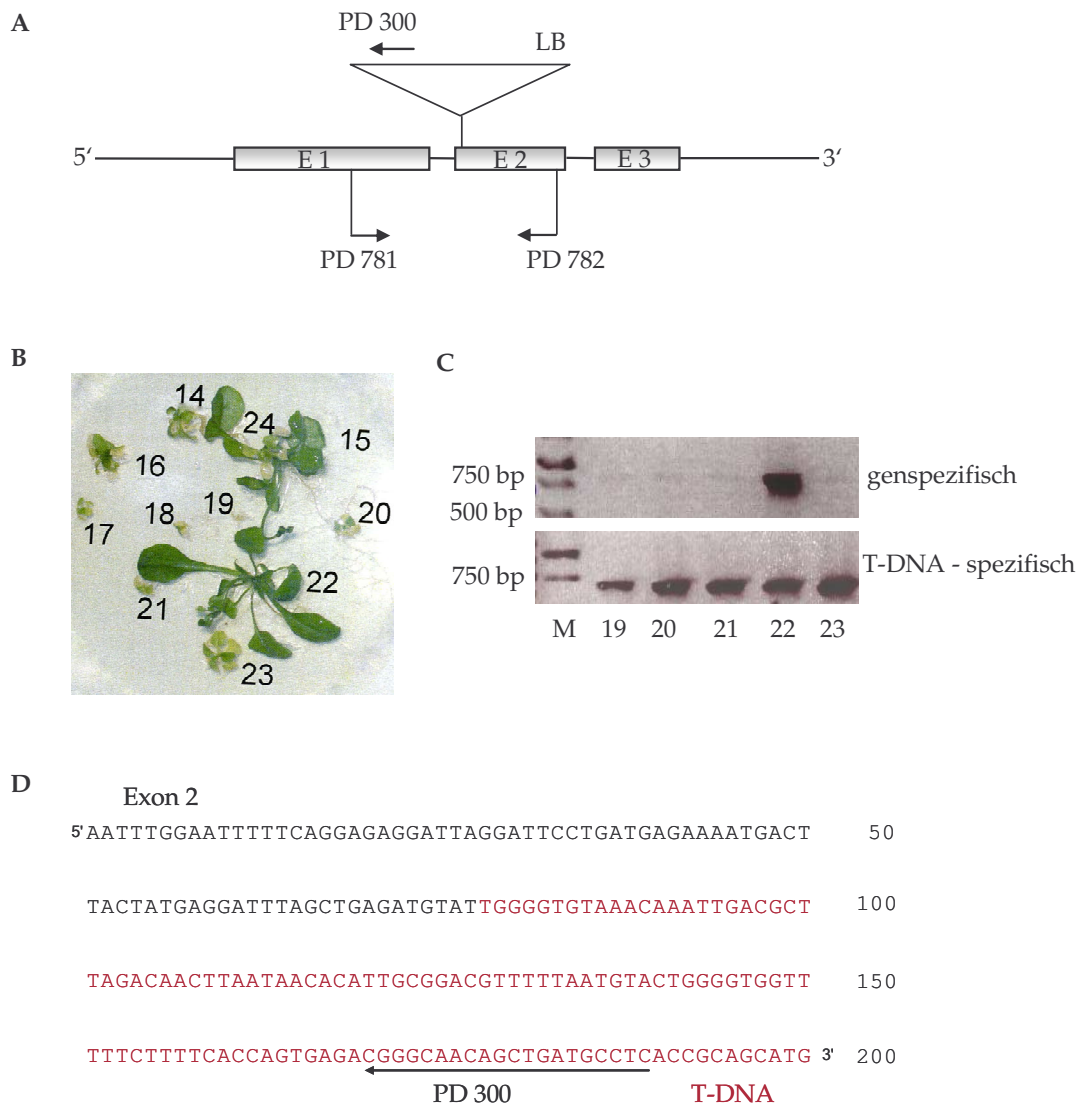
transgenen Tabakpflanzen lag als Geranylgeranyl-Chlorophyll vor. Die GGR-defizienten Reismutanten M134 und M249 akkumulieren neben Geranylgeranyl-Chlorophyll auch Dihydro- und Tetrahydrogeranylgeranyl-Chlorophyll (Shibata *et al.*, 2004 b). Weiterhin konnte in den Reismutanten Menachinon mit unvollständig reduzierten Seitenketten identifiziert werden.

Um weitere Einblicke in den Phytolmetabolismus von *Arabidopsis* zu erhalten, sollte eine Geranylgeranylreduktase-Mutante (*ggr*) identifiziert werden. Um zu analysieren, welche Konsequenz die Defizienz der Geranylgeranylreduktase auf den Phytolgehalt hat, wurden die Phytylderivate Tocopherol, Chlorophyll, Phyllochinon und Fettsäurephytylester in *ggr* untersucht. Es sollte ferner analysiert werden, ob die Reduktion des Phytolgehaltes in *ggr* zur Substitution der Phytylseitenkette durch eine Geranylgeranylseitenkette führt. In diesem Fall wären Tocotrienol, Geranylgeranyl-Chlorophyll, Geranylgeranyl-Phyllochinon (Menachinon-4 = Vitamin K<sub>2</sub>) und Fettsäuregeranylgeranylester detektierbar. Dies kann Einblicke in die Substratspezifikationen der Enzyme, die am Phytolstoffwechsel beteiligt sind geben.

#### **4.6.1 Identifizierung einer homozygoten T-DNA-Insertionsmutante der Geranylgeranyl-reduktase (*ggr*)**

Aus einer segregierenden Population (SALK\_046606) sollte eine homozygote T-DNA-Insertionsmutante für das Gen *Geranylgeranylreduktase* (*GGR*; At1g74470) identifiziert werden. Dafür wurden Pflanzen zunächst unter Standardwachstumsbedingungen auf Erde angezogen. Mittels PCR konnten jedoch nur heterozygote bzw. Wildtyppflanzen identifiziert werden. Aufgrund dessen wurden Pflanzen auf Nährmedium angezogen und nach etwa 14 Tagen die kleinsten Pflanzen auf frisches Nährmedium isoliert. Die PCR-Analyse ergab, dass diese kleinen Pflanzen für die T-DNA-Insertion in *GGR* homozygot waren (Abb. 31 B, C). Die T-DNA wurde 59 bp nach Beginn des zweiten Exons lokalisiert (Abb. 31 D). Die homozygoten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp ein sehr langsames Wachstum auf, sind sehr klein, bilden nur wenige grüne Blätter und sind nur auf zuckerhaltigem Nährmedium überlebensfähig. Sie bilden daher keine Samen. Die für diese Mutation heterozygoten Pflanzen sind wildtypähnlich. Die Anzucht homozygoter *ggr*-Mutanten erfolgte aufgrund dessen immer über die Aussaat der Samen heterozygoter Elternpflanzen und anschließender

Isolierung und Transfer der kleinsten Keimlinge auf frisches Nährmedium. Für weitergehende Analysen wurde jede Pflanze mittels PCR überprüft, ob sie homozygot ist.



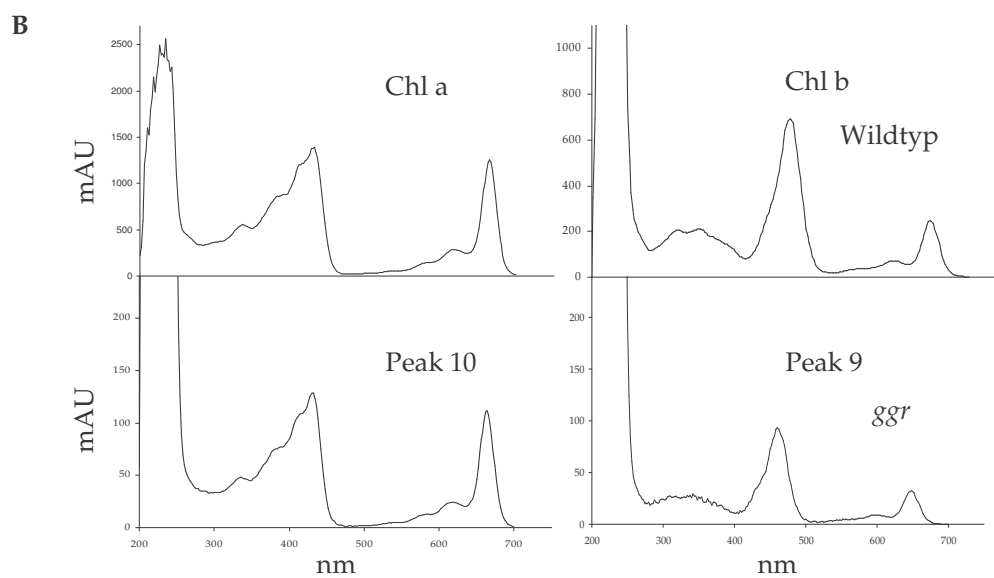
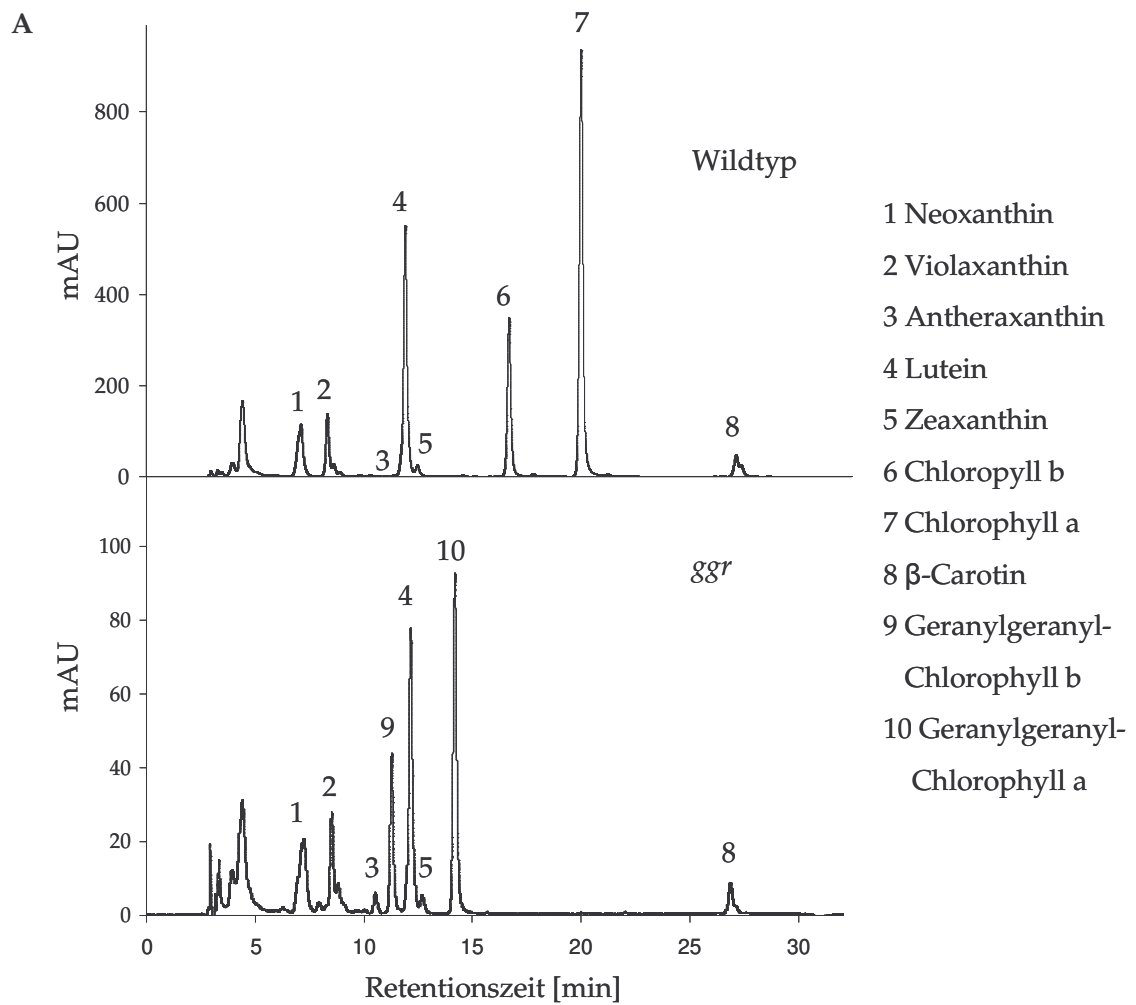
**Abb. 31** Isolierung der T-DNA-Insertionsmutante *ggr*

- A Schematische Darstellung der T-DNA-Insertionsstruktur in *ggr*. Die T-DNA wurde in Exon 2 (E 2) lokalisiert.
- B Die kleinsten Pflanzen der Nachkommenschaft einer heterozygoten Linie wurden isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein der T-DNA bzw. des Wildtypgens analysiert.
- C Beispielhaft sind die Ergebnisse der PCR-Analyse von fünf isolierten Pflanzen aus (B) dargestellt. Mit Ausnahme der Pflanze 22 waren die untersuchten T-DNA-Mutanten homozygot.
- D Das PCR-Produkt der T-DNA-spezifischen Reaktion von *ggr* wurde mit dem Primer PD 300 ansequenziert. Bereiche der T-DNA sind rot markiert dargestellt.

#### 4.6.2 Die *ggr*-Mutante enthält Geranylgeranyl-Chlorophyll

Der größte Anteil des zellulären Phytols liegt gebunden im Chlorophyll vor. Da die homozygote *ggr*-Mutante einige grüne Blätter aufweist, sollte zunächst untersucht werden, ob *ggr* noch Chlorophyll enthält und ob die Phytolseitenkette durch eine Geranylgeranylseitenkette ersetzt wurde. Es wurden Pigmente extrahiert und diese mittels HPLC analysiert. In Abb. 32 A sind typische Chromatogramme von Pigmenten des Wildtyps und von *ggr* dargestellt. Nach Auftrennung eines Wildtypextraktes sind neben Neoxanthin, den Xanthophyllpigmenten Antheraxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin, auch Lutein,  $\beta$ -Carotin, und Chlorophyll b und a erkennbar. Die chromatographische Analyse der *ggr*-Pigmente zeigt ebenso Neoxanthin, die Xanthophyllpigmente, Lutein und  $\beta$ -Carotin, jedoch alle in etwas geringerer Konzentration als im Wildtyp (Abb. 32 C). Chlorophyll b und Chlorophyll a konnten nicht detektiert werden, dafür erscheinen zwei neue Peaks. Es wurden die Absorptionsspektren von 200 nm bis 700 nm von Chlorophyll b und Chlorophyll a mit denen der unbekanntenen Peaks verglichen. Im Spektrum von Chlorophyll a sind die typischen Absorptionsmaxima bei etwa  $\lambda = 425$  nm und  $\lambda = 665$  nm zu erkennen. Das Spektrum von Chlorophyll b weist die typischen Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 450$  nm und  $\lambda = 650$  nm auf. Die Spektren der unbekanntenen Peaks in *ggr* sind identisch mit denen von Chlorophyll b bzw. Chlorophyll a des Wildtyps (Abb. 32 B). Dies lässt darauf schließen, dass diese beiden Substanzen einen Polyporphyrinring enthalten und chlorophyllähnlich sind. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um Geranylgeranyl-Chlorophyll a bzw. Geranylgeranyl-Chlorophyll b. Der Gehalt an Geranylgeranyl-Chlorophyll von *ggr* beträgt etwa ein Fünftel des Chlorophyllgehaltes des Wildtyps. Im Wildtyp beträgt das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b für gewöhnlich etwa drei. In *ggr* konnte zwar mehr Geranylgeranyl-Chlorophyll a als Geranylgeranyl-Chlorophyll b nachgewiesen werden, das Verhältnis von Geranylgeranyl-Chlorophyll a zu Geranylgeranyl-Chlorophyll b beträgt jedoch nur 1,9.

Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten mit Tabak und Reis von Tanaka *et al.*, (1999) bzw. Shibata *et al.*, (2004), in denen durch verminderte Expression der GGR Chlorophyll mit einer Geranylgeranylseitenkette detektiert wurde. Allerdings konnte in *ggr* aus *Arabidopsis* kein Dihydro- bzw. Tetrahydrogeranylgeranyl-Chlorophyll wie in den Reismutanten nachgewiesen werden.



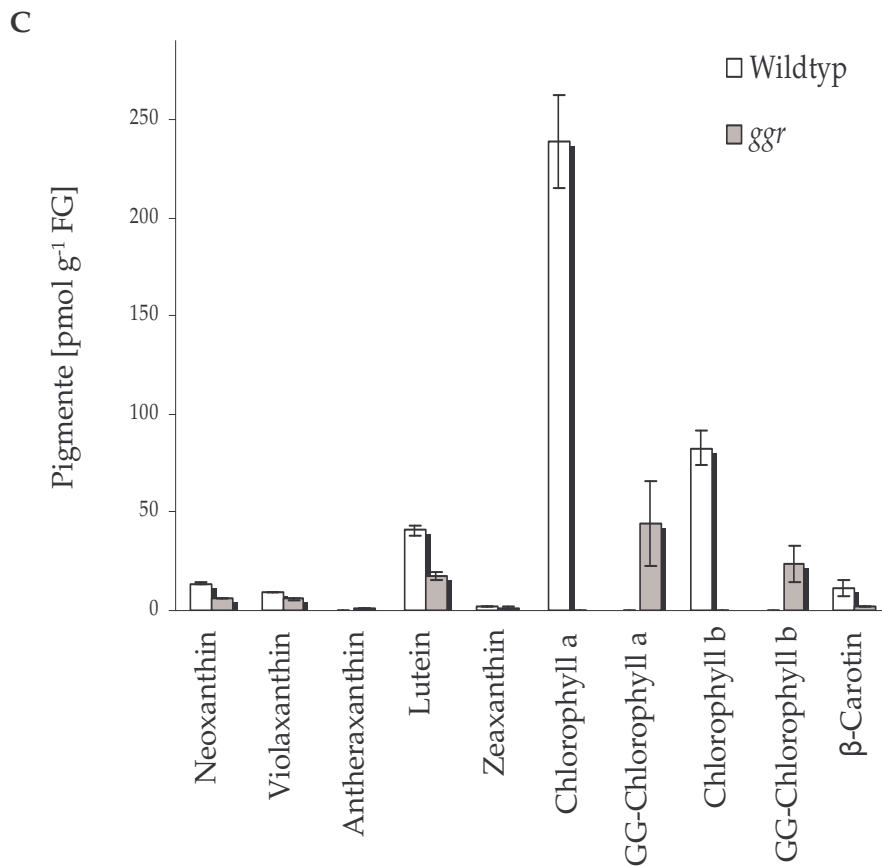


Abb. 32 Pigmentanalyse der Mutante *ggr*

- A Pigmente von Wildtyp und *ggr* wurden mittels HPLC getrennt und die Absorption bei 254 nm detektiert. Dargestellt sind die Elutionsprofile von Wildtyp und *ggr*.
- B Dargestellt sind die Absorptionsspektren von 200 nm bis 700 nm von Chlorophyll a und Chlorophyll b des Wildtyp und die der Peaks 9 und 10 der *ggr*.
- C Gezeigt sind die Mittelwerte der Pigmentgehalte  $\pm$  SE von drei Messungen.

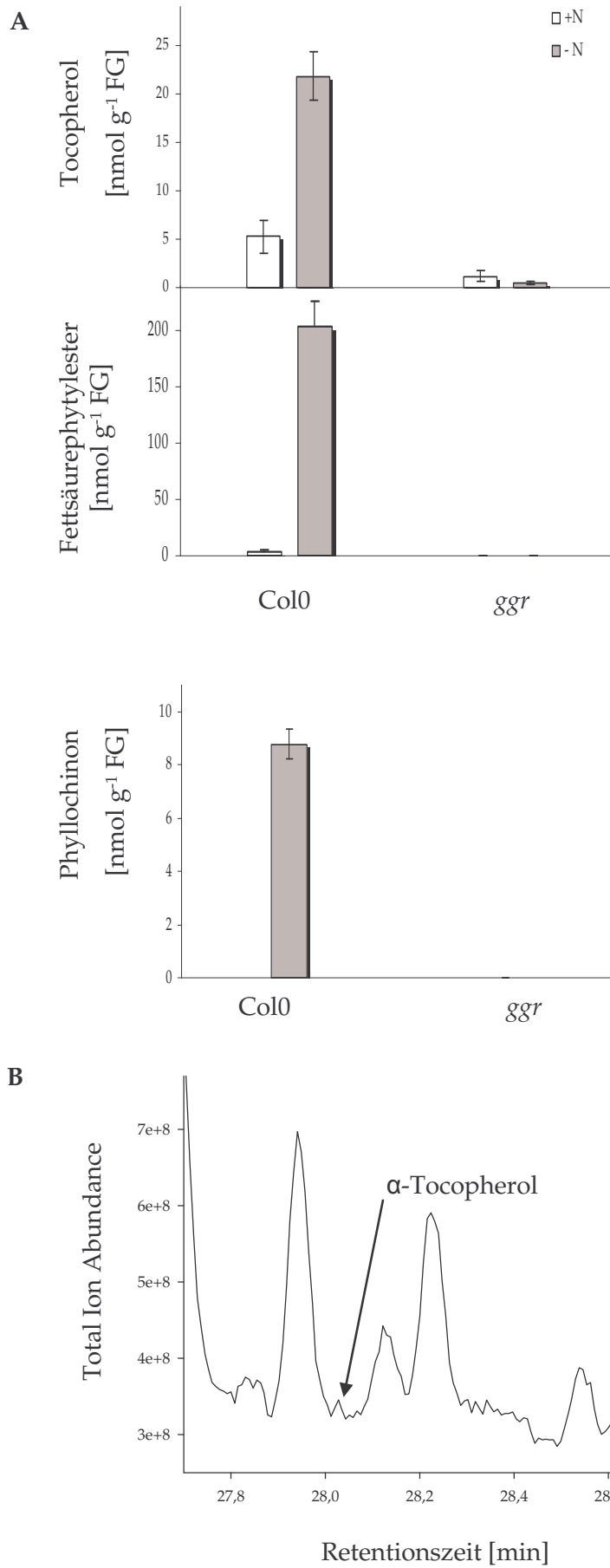
#### 4.6.3 In *ggr* sind kein Phyllochinon und keine Fettsäurephytylester detektierbar, jedoch in geringen Mengen Tocopherol

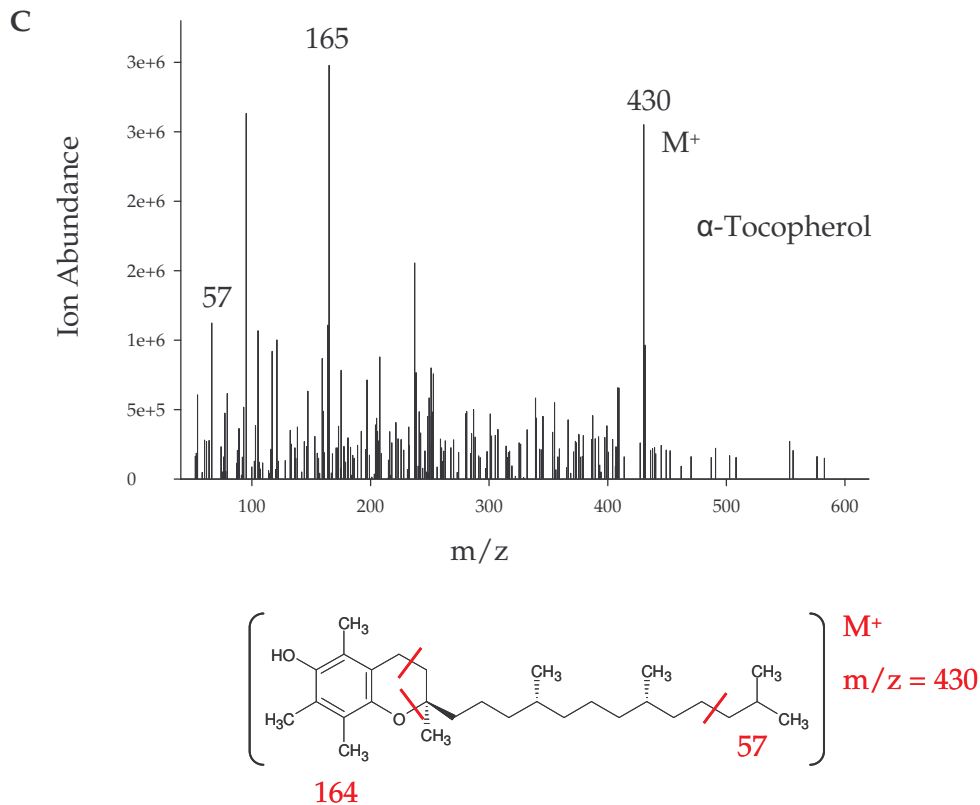
Es sollte analysiert werden, ob *ggr* andere phytolhaltige Metabolite aufweist. Daher sollten Tocopherol, Phyllochinon und Fettsäurephytylester bestimmt werden. Um die Tocopherol- und Fettsäurephytylestersynthese zu induzieren, wurden etwa drei Wochen alte Wildtyppflanzen und *ggr*-Mutanten für etwa 10 Tage auf Stickstoffmangelmedium transferiert. Wie erwartet sind im Wildtyp nur geringe

Mengen an Tocopherol und Fettsäurephytylester nach Kontrollbedingungen detektierbar, und sie steigen nach Stickstoffmangelstress stark an (Abb. 33 A). In *ggr* sind weder unter voller Nährstoffzugabe noch nach Stickstoffmangelstress Fettsäurephytylester detektierbar. Allerdings waren unter beiden Bedingungen geringe Mengen Tocopherol nachweisbar. Interessanterweise war in *ggr* kein Anstieg des Tocopherols nach Stickstoffmangelstress erkennbar. Unter Standardbedingungen entsprach der Tocopherolgehalt von *ggr* etwa 22,5 % des Wildtypocopherols. Nach Stickstoffmangelstress erhöhte sich der Tocopherolgehalt im Wildtyp jedoch nicht in *ggr*, so dass der Tocopherolgehalt der Mutante nur noch 2,1 % des Wildtypocopherols entsprach. Als Kontrolle wurde das Vorhandensein von Tocopherol neben dem Nachweis per Fluoreszenz-HPLC mittels GC-MS untersucht. In Abb. 33 B ist ein Peak im Chromatogramm eines *ggr*-Extraktes zu sehen, welcher der Retentionszeit von  $\alpha$ -Tocopherol entspricht. Das Massenspektrum zeigt ein für  $\alpha$ -Tocopherol typisches Fragmentierungsmuster (Abb. 33 C). Da die für die Analyse verwendeten Pflanzen zuvor auf Homozygotie untersucht wurden, kann eine Kontamination mit einer heterozygoten bzw. Wildtyppflanze ausgeschlossen werden.

Phyllochinon wurde nur nach Standardwachstumsbedingungen analysiert, da Lohmann (2004) zeigte, dass Stress keinen Einfluss auf den Phyllochinongehalt hat. In *ggr* waren kein Phyllochinon und keine teilreduzierten Phyllochinonderivate detektierbar (Abb. 33 A).

Während die Phytyleitenkette des Chlorophylls durch eine Geranylgeranylseitenkette substituiert wurde, konnte Gleiches für Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phyllochinon nicht beobachtet werden. Es konnten auch nach Stickstoffmangelstress weder Tocotrienol noch Fettsäuregeranylgeranylester nachgewiesen werden.





**Abb. 33 Analyse von Tocopherol, Fettsäurephytylester und Phyllochinon in *ggr***

- A Pflanzen wurden auf MS-Medium angezogen, nach drei Wochen auf frisches Nährmedium bzw. Stickstoffmangelmedium transferiert und auf Tocopherol und Fettsäurephytylester untersucht. Die Bestimmung von Phyllochinon erfolgte nur nach Anzucht auf MS-Medium. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei Messungen.
- B Extrakte der *ggr*-Mutante wurden mittels GC-MS analysiert. Es konnte ein Peak identifiziert werden, welcher der Retentionszeit von  $\alpha$ -Tocopherol entspricht.
- C Das Massenspektrum des Peaks aus (B) entspricht dem von  $\alpha$ -Tocopherol. Dargestellt ist ein mögliches Fragmentierungsmuster von  $\alpha$ -Tocopherol.

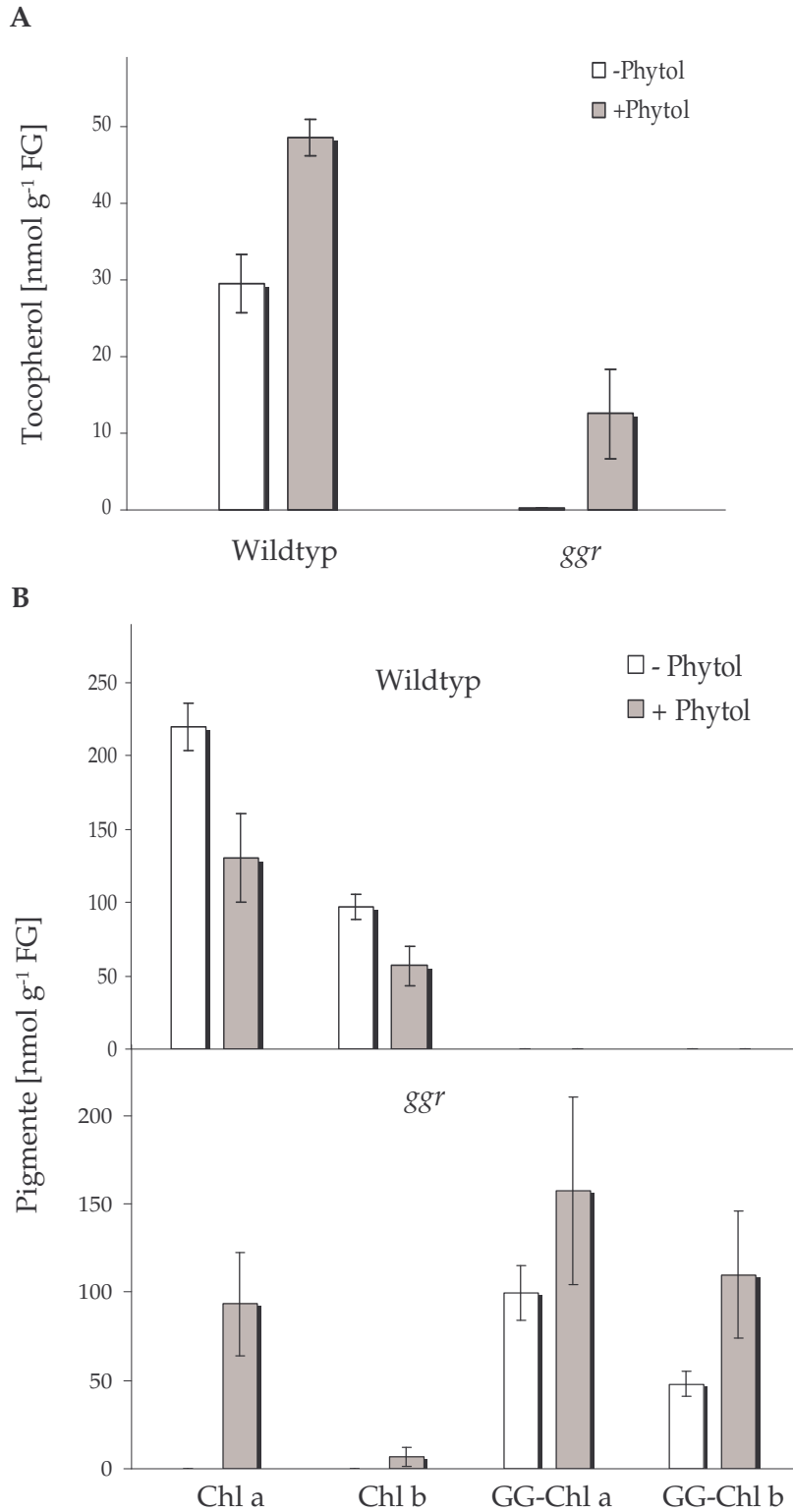


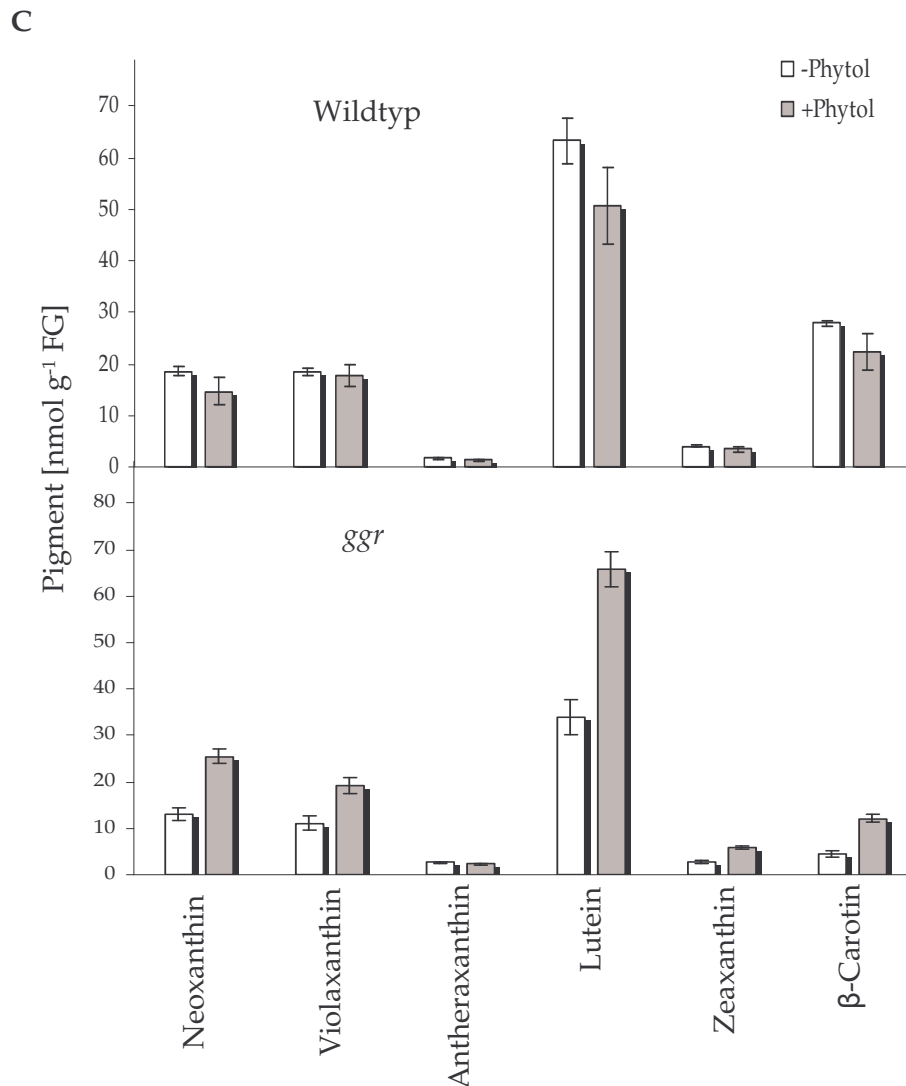
#### 4.6.4 Sowohl Geranylgeranylpyrophosphat als auch Phytylpyrophosphat können Substrate der Chlorophyllsynthetase sein

Geranylgeranylpyrophosphat resultiert aus der plastidären Isoprenoidsynthese und wird durch die Katalyse der Geranylgeranylreduktase zu Phytylpyrophosphat reduziert. Letzteres wird anschließend mit dem Tetrapyrrolring des Chlorophyllids verestert. Diese Reaktion wird durch die Chlorophyllsynthetase katalysiert und das Produkt ist Chlorophyll (Heldt, 1999). Es wird diskutiert, ob auch Geranylgeranylpyrophosphat als Substrat der Chlorophyllsynthetase in Frage kommt und zunächst Geranylgeranyl-Chlorophyll synthetisiert wird. Anschließend wird dann durch Geranylgeranylreduktase Geranylgeranyl-Chlorophyll zu Chlorophyll reduziert. Enzymtests von in *E. coli* heterolog exprimierter *Arabidopsis*-Geranylgeranylreduktase mit radioaktiv markiertem Geranylgeranyl-Chlorophyll bzw. radioaktiv markiertem Geranylgeranylpyrophosphat zeigten, dass Geranylgeranylreduktase sowohl Geranylgeranyl-Chlorophyll als auch Geranylgeranylpyrophosphat als Substrat nutzen kann (Keller *et al.*, 1998).

Ein Fütterungsexperiment von *ggr* mit Phytol sollte Aufschluss geben, ob Phytol *in vivo* Substrat der *Arabidopsis*-Chlorophyllsynthetase sein kann. Darauf kann geschlossen werden, wenn Chlorophyll in *ggr* nach der Fütterung von Phytol detektierbar ist. Etwa sieben Wochen alte Wildtyppflanzen und *ggr*-Mutanten wurden für drei Tage in einer Lösung eines *cis/trans*-Phytol-Gemisches inkubiert und anschließend auf Chlorophyll und Tocopherol untersucht. Ischebeck *et al.*, (2006) zeigte, dass gefüttertes Phytol im Wildtyp Eingang in die Chlorophyll- und Tocopherolsynthese findet. In Abb. 34 A ist zu erkennen, dass der Tocopherolgehalt in den phytolgefütterten Wildtyp- und *ggr*-Pflanzen ansteigt, was auf die Aufnahme des Phytols in den Stoffwechsel hinweist. Interessanterweise nimmt der Chlorophyllgehalt nach Phytolfütterung im Wildtyp ab (Abb. 34 B). Geranylgeranyl-Chlorophyll ist, wie erwartet, zu keinem Zeitpunkt im Wildtyp detektierbar. Während ohne Zugabe von Phytol ausschließlich Geranylgeranyl-Chlorophyll in *ggr* nachweisbar ist, konnten in den gefütterten Pflanzen sowohl Chlorophyll als auch Geranylgeranyl-Chlorophyll bestimmt werden. Durch die Fütterung von Phytol sind ähnliche Mengen Chlorophyll synthetisiert worden, wie Geranylgeranyl-Chlorophyll in den nicht-gefütterten Pflanzen nachgewiesen wurde. In *ggr* stiegen nach Phytolfütterung die Pigmente Neoxanthin,

Violaxanthin, Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin auf wildtypähnliche Mengen an (Abb. 34 C). Die Tatsache, dass Chlorophyll nach Phytolfütterung nachgewiesen werden konnte, lässt den Schluss zu, dass neben Geranylgeranylpyrophosphat auch Phytylpyrophosphat Substrat der Chlorophyllsynthetase sein kann.





**Abb. 34** Pigment- und Tocopherolanalyse nach Fütterung von Phytol im Wildtyp und *ggr*

- A Es wurde der Tocopherolgehalt bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE von drei Messungen.
- B Dargestellt sind die Mittelwerte des Gehaltes an Chlorophyll (Chl a und Chl b) bzw. Geranylgeranyl-Chlorophyll (GG-Chl a und GG-Chl b)  $\pm$  SE von drei Messungen.
- C Gezeigt sind die Mittelwerte weiterer Pigmente  $\pm$  SE von drei Messungen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Chlorophyllasemutanten

Ziel der Arbeit ist es, zu zeigen, dass Phytol aus dem Chlorophyllabbau in die Synthese von Tocopherol und Fettsäurephytylester eingeschleust wird. Phytol entsteht im Zuge der Chlorophyllhydrolyse, dem ersten Schritt der Chlorophylldegradation. Diese Reaktion wird katalysiert durch Chlorophyllase (CHL). Es wurden bisher zwei Gene für Chlorophyllase identifiziert, *CHL1* und *CHL2*. Daher wurden T-DNA-Insertionsmutanten von *CHL1* und *CHL2* identifiziert und auch die Doppelmutante *chl1-1chl2* erzeugt. Die Mutanten wurden zunächst auf ihren Gehalt an Chlorophyll und Chlorophyllid untersucht, um beurteilen zu können, ob diese Linien eine Defizienz in der Chlorophyllaseaktivität aufweisen. Anschließend erfolgte die Analyse von Tocopherol und Fettsäurephytylester. In den *chl1*-Linien konnten stark verminderte Chlorophyllidanteile nachgewiesen werden, die Gehalte an Tocopherol und Fettsäurephytylester waren allerdings nur geringfügig gegenüber den entsprechenden Wildtypen reduziert.

Die untersuchten Mutanten wurden ausgewählt, da die T-DNA-Insertionen zwischen Start- und Stopcodon lokalisiert sind. Damit ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass durch die Insertion die Transkription der Gene unterbrochen wird, was die vollständige Defizienz der entsprechenden Chlorophyllaseaktivitäten zur Folge hat. In *chl1-1* und *chl1-2* befindet sich die T-DNA im Intron. Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, dass die T-DNA im Zuge des *Splicing*-Prozesses entfernt wird, was zu einer mRNA entsprechend der Größe der Wildtyp-mRNA führt. Mittels Northern-Blot-Analyse konnte in diesen Linien jedoch mit *CHL1* als Sonde kein Hybridisierungssignal entsprechend der Größe der Wildtyp-mRNA detektiert werden. Ferner ist es möglich, dass nur das erste Exon transkribiert wird, aufgrund dessen die entsprechende mRNA kleiner als die Wildtyp-mRNA wäre. In der Tat konnten im Northern-Blot von *chl1-1*, *chl1-2* und *chl1-1chl2* kleinere Hybridisierungssignale als im Wildtyp detektiert werden. Bei diesen Signalen kann es sich demnach um die mRNA des ersten Exons handeln. Da das vollständige Gen jedoch aus zwei Exons besteht, ist es unwahrscheinlich, dass die Transkription und Translation nur eines Exons zu einem katalytisch aktiven Protein führt.

In *chl2* wurde die T-DNA am Anfang des ersten Exons lokalisiert. Daher werden vermutlich beide Exons nicht transkribiert. Nach Northern-Blot-Analyse mit der Sonde *CHL2* konnte in den Linien *chl2* und *chl1-1chl2* kein Hybridisierungssignal in der Größe der Wildtyp-mRNA detektiert werden. Im Northern-Blot war dagegen ein starkes Hybridisierungssignal etwa 2 kbp größer als die Wildtyp-mRNA detektierbar. Da sich auch innerhalb der T-DNA Promotoren befinden, können diese Signale mRNA-Fragmente sein, die sich aus T-DNA-mRNA und *CHL2*-mRNA zusammensetzen. Sequenzanalyse der genomischen DNA ergab jedoch, dass sich kein Startcodon innerhalb der T-DNA-mRNA befindet, welches sich im Leserahmen mit der *CHL2*-mRNA befindet (Schenk *et al.*, 2007). Daher ist für diesen Fall die Transkription und Translation zu einem katalytisch aktiven Protein sehr unwahrscheinlich.

Aufgrund dessen wird gefolgert, dass aufgrund der T-DNA-Insertionen in den Chlorophyllasemutanten die mRNA nicht funktionell transkribiert und translatiert werden kann, was die Defizienz der entsprechenden Chlorophyllaseaktivitäten zur Folge hat.

### **5.1.1 Der Beitrag der Chlorophyllasen CHL1 und CHL2 zum *in vivo* Chlorophyllabbau in der Seneszenz ist gering**

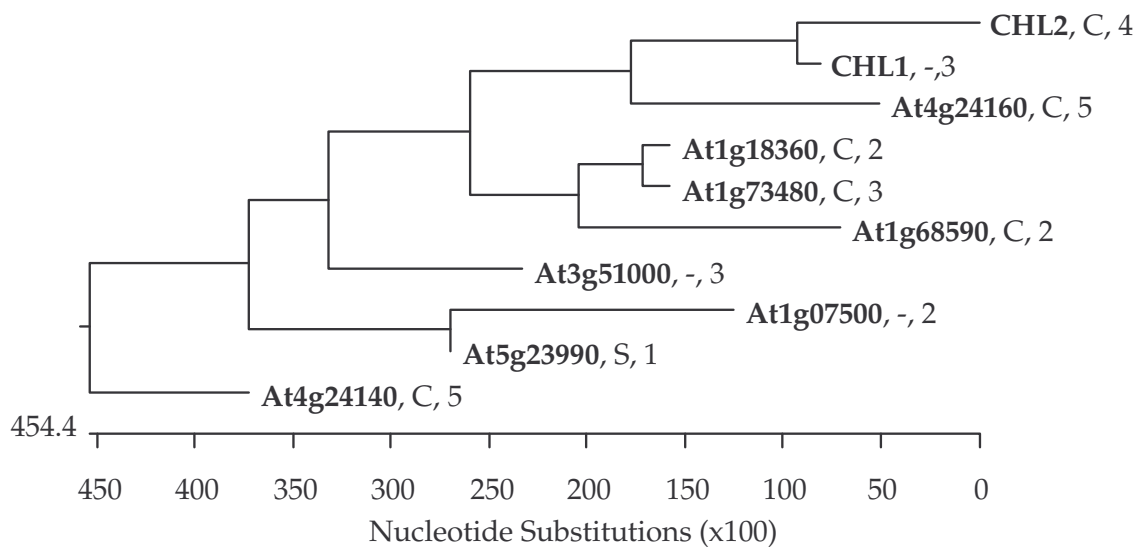
Der Chlorophyllidgehalt in *chl2* entsprach etwa dem des Wildtyps. Tsuchya *et al.*, (1999) und Arruda und Benedetti (2002) zeigten, dass die Expression von *CHL2* in Wildtypblättern sehr gering ist, was die Schlussfolgerung zulässt, dass *CHL2* in Blättern kaum zur Chlorophyllhydrolyse beiträgt. Andererseits konnten Liao *et al.*, (2007) in Pflanzen mit durch Interferenz-RNA (RNA<sub>i</sub>) inhibierter Expression von *CHL2* eine deutliche Reduktion des Chlorophyllidgehaltes im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Da gezeigt wurde, dass die Expression der *CHL1* in diesen transgenen Linien nicht reduziert ist, steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den ermittelten Chlorophyllidanteilen für die *chl2*-T-DNA-Insertionsmutanten. Benedetti und Arruda (2002) zeigten weiterhin, dass neben der geringen Expression in Blättern dieses Gen auch in Blüten und Blütenknospen exprimiert wird und folgerten, dass *CHL2* in der Samenentwicklung eine Rolle spielt. Daher wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit der Tocopherolgehalt reifer Samen der Chlorophyllasemutanten analysiert. Ein Unterschied im Tocopherolgehalt zum Wildtyp war jedoch für keine

Chlorophyllasemutante feststellbar. Ferner waren keine Unterschiede im Reifungsprozess der Samen zu den Wildtypen erkennbar. Daher scheinen *CHL1* und *CHL2* keinen Einfluss auf die Chlorophylldegradation in den Samen zu haben, so dass andere samenspezifische Chlorophyllhydrolasen existieren müssen.

In den Blättern der Linien *chl1-1*, *chl1-2* und *chl1-1chl2* konnte im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen ein reduzierter Chlorophyllidanteil ermittelt werden. Daher wurde gefolgert, dass die Aktivität von CHL1 in diesen Linien reduziert ist. Die Analyse des Chlorophyllidgehaltes in heranwachsenden *chl1-1chl2*-Pflanzen ergab, dass in bis zu sieben Wochen alten Pflanzen kaum Chlorophyllid detektierbar ist, in der Seneszenz jedoch ansteigt. Ferner waren die Phytylderivate Tocopherol und Fettsäurephytylester nicht im gleichen Maße reduziert wie die Chlorophyllidanteile in den Linien. Dies bedeutet, dass wahrscheinlich neben *CHL1* weitere Chlorophyllhydrolasen den Chlorophyllabbau induzieren. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Chlorophyllasemutanten in der Seneszenz keine Verzögerung im *in vivo* Chlorophyllabbau aufweisen. Schenk und Mitarbeiter zeigten, dass es keinen Unterschied im Seneszenzverhalten der T-DNA-Insertionsmutanten nach Dunkelinkubation zu den entsprechenden Wildtypen gibt (Schenk *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde von Schenk *et al.*, (2007) gezeigt, dass in den Chlorophyllasemutanten während der Seneszenz die gleichen Chlorophylldegradationsprodukte akkumulieren. Es wurde gefolgert, dass es keinen Unterschied im Seneszenzverhalten zwischen Chlorophyllasemutanten und Wildtyp gibt.

Demgegenüber stehen die im Vergleich zum Wildtyp erniedrigten *in vitro* gemessenen Chlorophyllidanteile in den *chl1*-Linien. Möglicherweise spiegeln die Chlorophyllidwerte nicht den *in vivo* Chlorophyllidanteil in den Pflanzen wieder. Die Chlorophyllidanteile im Wildtyp können auf eine *in vitro*-Aktivität von CHL1 zurückgeführt werden. Demzufolge findet durch die Aktivität von CHL1 Chlorophyllabbau während der Extraktion statt. Aufgrund der T-DNA-Insertion in den *chl1*-Mutanten ist diese Aktivität inhibiert, was zu den stark verminderten Chlorophyllidanteilen führt.

Mittels Datenbankrecherche ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) wurden zu CHL1 und CHL2 homologe Proteine identifiziert und solche mit höchster Sequenzähnlichkeit in Form eines Kladogramms dargestellt (Abb. 25). Deren Lokalisation wurde auch teilweise als plastidär vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Es ist möglich, dass einige der aufgeführten Proteine weitere Chlorophyllhydrolasen darstellen, welche an der Induktion der Chlorophylldegradation beteiligt sind.



**Abb. 25** Kladogramm verwandter Proteine der Chlorophyllasen CHL1 und CHL2 aus *Arabidopsis*

Zu CHL1 und CHL2 homologe Proteine wurden mit Hilfe der BLAST-Software identifiziert und in Form eines Kladogramms dargestellt (MegAlign; Clustal V Methode). Es wurden weiterhin die mittels der Software TargetP ermittelten Lokalisationen der Proteine angegeben. Es bedeuten „C“: Chloroplast, „S“: sekretorischer Weg, „-“: andere Lokalisation. Die Zahlen geben die „reliability class“ von 1 bis 5 an. Je kleiner die Zahl, umso sicherer ist die vorhergesagte Lokalisation.

Kariola *et al.* (2005) beschrieben, dass Pflanzen mit durch Interferenz-RNA inhibierter Expression von *CHL1* Veränderungen in der Pathogenabwehr zeigen. Es wurde gefolgert, dass *CHL1* während Pathogenbefall den Chlorophyllabbau induziert, wodurch die Akkumulation photoaktiver Chlorophyllmoleküle verhindert wird. Tsuchiya *et al.* (1999) zeigten, dass *CHL1* durch das Phytohormon Jasmonat induziert

wird. Jasmonat spielt nicht nur in der Seneszenz eine wichtige Rolle, sondern auch in der Induktion von Wundfaktoren (Murphy *et al.*, 2005). In der Tat würde die Induktion der *CHL1*-Expression nach Zellschädigung weitere Zellschäden aufgrund reaktiver Sauerstoffspezies vermeiden. Demnach wäre die Induktion des Chlorophyllabbaus während Pathogenbefall eine alternative Funktion von *CHL1*.

### 5.1.2 Überexpression von *CHL1* führte zu keinem erhöhten Chlorophyllabbau

Durch Überexpression von *CHL1* im Ökotyp Columbia 0 und der tocopheroldefizienten EMS-Mutante *hpt1* konnte der Chlorophyllabbau in *Arabidopsis* nicht induziert werden. Demzufolge waren auch kaum Veränderungen im Gehalt von Tocopherol und den Fettsäurephytylestern feststellbar. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass neben *CHL1* weitere Chlorophyllhydrolasen existieren. Harpaz-Saad *et al.* (2007) transformierten Kürbispflanzen und Tabakprotoplasten mit einem Gesamtlängenkonstrukt der Zitrus-Chlorophyllase und konnte ebenfalls keinen erhöhten Chlorophyllabbau feststellen. Im Gegensatz dazu führte die Expression eines um die N-terminalen 21 Aminosäuren gekürzten Zitrus-Chlorophyllase-Konstruktes zu einem erhöhten Chlorophyllabbau in transformierten Tabakprotoplasten und Kürbispflanzen. Es wurde gefolgert, dass *in vivo* durch Prozessierung des N-terminalen Bereiches von *CHL1* die Chlorophyllaseaktivität posttranslational reguliert wird (Harpaz-Saad *et al.*, 2007). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Expression dieses gekürzten Konstruktes zu einer falschen Lokalisation von *CHL1* in Kürbis und damit zu Chlorophyllabbau führte.

### 5.1.3 Zusammenfassung

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen der Blätter und Samen der Chlorophyllasemutanten und der Überexpression von *CHL1* wurde gefolgert, dass es neben den Chlorophyllasen *CHL1* und *CHL2* wahrscheinlich weitere Chlorophyllhydrolasen in Blättern und Samen von *Arabidopsis* existieren, welche *in vivo* den Chlorophyllabbau induzieren. Daher sind die T-DNA-Insertionsmutanten nur bedingt geeignet, den Phytolmetabolismus in *Arabidopsis* zu untersuchen.



## 5.2 Charakterisierung der *staygreen*-Mutanten

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, dass Phytol aus der Chlorophyllhydrolyse Eingang in die Synthesen weiterer Phytylderivate, wie Tocopherol und Fettsäurephytylester findet. Die Mutation der Chlorophyllasegene *CHL1* und *CHL2* hatte jedoch keinen bedeutenden Einfluss auf den seneszenzbedingten Chlorophyllabbau. Daher waren diese Linien nur eingeschränkt geeignet, den Phytolmetabolismus in *Arabidopsis* zu untersuchen. Aufgrund dessen wurden Pflanzen untersucht, in denen aufgrund von Mutationen im Degradationsweg des Chlorophylls kein bzw. eingeschränkt Chlorophyllabbau stattfindet. Die Pheophorbid-a-Oxygenase-Mutante *pao1* und zwei unabhängige Linien, in denen die Expression des *SGR*-Gens mittels Interferenz-RNA (*SGR*-RNA<sub>i</sub>) inhibiert wird, zeigen eine deutliche Inhibierung des Chlorophyllabbaus nach Dunkelinkubation.

Die Untersuchung der *staygreen*-Mutanten hinsichtlich Chlorophyllabbau und Chlorophyllid zeigte, dass die Retention des Chlorophylls in den untersuchten Linien unterschiedlich stark erfolgt. Während im Wildtyp die Dunkelinkubation zu einem schnellen Chlorophyllabbau führte, blieb der Chlorophyllgehalt von *pao1* über die gesamte Zeit der Dunkelinkubation unverändert. Die *SGR*-RNA<sub>i</sub>-Linien dagegen wiesen im Chlorophyllabbau einen zwischen Wildtyp und *pao1* intermediären Phänotyp auf. Entsprechend konnte ein starker Anstieg an Tocopherol und Fettsäurephytylester im Wildtyp, aber nicht in *pao1* detektiert werden. Die *SGR*-RNA<sub>i</sub>-Linien reicherten, entsprechend dem Chlorophyllabbau, zum Wildtyp und *pao1* intermediäre Mengen Tocopherol und Fettsäurephytylester an. Interessanterweise sind in *pao1* am dritten Tag nach Dunkelbehandlung dem Wildtyp ähnlich hohe Menge an Fettsäurephytylester zu finden, jedoch kein Anstieg an Tocopherol. Daher kann zum einen gefolgert werden, dass der Chlorophyllabbau in *pao1* erst nach dem dritten Tag der Dunkelbehandlung, wahrscheinlich durch einen *feedback*-Mechanismus, inhibiert wird und dass die Fettsäurephytylester einem zügigen Abbaumechanismus unterliegen. Zum anderen scheint Phytol primär Eingang in die Fettsäurephytylestersynthese zu finden, denn ein Anstieg an Tocopherol war in *pao1* zu keinem Zeitpunkt detektierbar.

Mit Hilfe der *staygreen*-Mutanten war es möglich, einen deutlichen Zusammenhang zwischen Chlorophylldegradation und Tocopherol- und Fettsäurephytylestere synthese zu zeigen. Damit konnte bewiesen werden, dass es in *Arabidopsis* neben der plastidären *de novo*-Isoprenoidsynthese einen alternativen Weg zur Bereitstellung von Phytylpyrophosphat gibt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Arbeiten von Valentin *et al.*, (2006) und Ischebeck *et al.* (2006), in denen gezeigt wurde, dass in Samen und Blättern Phytol durch zwei unabhängige Kinasen zu Phytylpyrophosphat phosphoryliert wird. Damit steht aktiviertes Phytol für weitere Stoffwechselprozesse, wie z.B. der Tocopherolsynthese zur Verfügung. In der Tat ist der Tocopherolgehalt in den Samen der *vte5*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Valentin *et al.*, 2006). Rise und Mitarbeiter (1989) analysierten den Chlorophyll- und Tocopherolgehalt seneszenten Pflanzen der Spezies *Meliza azedarach* und *Vinca major*. Sie berechneten, dass sich die Phytolmenge im Verlauf der Seneszenz nicht ändert. Daher wurde gefolgert, dass durch Chlorophyllhydrolyse freigesetztes Phytol Eingang in die Tocopherolsynthese findet. Allerdings konnte im Zuge der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Phytol aus dem Chlorophyllabbau in *Arabidopsis* neben der Tocopherolsynthese auch zum großen Teil zu Fettsäurephytylestern umgesetzt wird. Die Ergebnisse von Rise *et al.* (1989) legen nahe, dass in *M. azedarach* und *V. major* nur geringe Mengen Fettsäurephytyl ester in der Seneszenz akkumulieren.

### **5.3 Phytol wird in Blättern und Samen in Form von Fettsäurephytylestern und Tocopherol gespeichert**

Während der Seneszenz, unter Stressbedingungen, aber auch unter Standardwachstumsbedingungen wird in Blättern Chlorophyll abgebaut, um z.B. eine Überreduktion des Photosyntheseapparates und damit eine Schädigung der Chloroplasten durch reaktive Sauerstoffspezies zu vermeiden. Das bedeutet, dass zu dieser Zeit Phytol freigesetzt wird. Die Bestimmung des Phytolgehaltes in Blättern ergab jedoch, dass kaum freies Phytol akkumuliert. Demzufolge muss Phytol sofort degradiert bzw. in den Metabolismus eingeschleust werden.

Durch ein Fütterungsexperiment von Keimlingen von *A. thaliana* mit Phytol wurde demonstriert, dass Phytol sich in erster Linie in Fettsäurephytylestern und in Tocopherol anreichert, jedoch kaum in Phyllochinon (Ischebeck *et al.*, 2006).

Zwei zusätzliche Phosphorylierungsschritte von aus Chlorophylll freigesetztem Phytol sind notwendig (Valentin *et al.*, 2006; Ischebeck *et al.*, 2006), bevor es im Zuge der Tocopherolsynthese durch die Aktivität der Homogentisatphytyltransferase mit Homogentisat zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon reagiert. Valentin *et al.* (2006) identifizierten die Phytolkinase VTE5, durch deren Aktivität freies Phytol zu Phytolphosphat umgesetzt wird. Die zweite Kinase zur Synthese von Phytylpyrophosphat ist bisher noch unbekannt. Ischebeck *et al.* (2006) konnten jedoch zeigen, dass beide Kinasen innerhalb der Chloroplastenhüllmembran lokalisiert sind.

In *in vitro*-Tests mit Blattproteinextrakten boten Ischebeck *et al.* (2006) für die Fettsäurephytylestersynthese Acyl-CoA-Ester und Phytol bzw. freie Fettsäuren und Phytylpyrophosphat als Substrate an. Es konnten nur Fettsäurephytylester in der Reaktion mit den Substraten Acyl-CoA und Phytol detektiert werden. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Synthese der Fettsäurephytylester durch Kondensation von Coenzym-A-aktivierten Fettsäuren mit Phytol erfolgt. Phytol wird hauptsächlich mit mittelkettigen, gesättigten Fettsäuren (10:0, 12:0, 14:0) sowie mit Hexadecatriensäure (16:3) verestert. Da die Fettsäure 16:3 hauptsächlich in dem Galactolipid Monogalactosyldiacylglycerol vorkommt, wird angenommen, dass sie aus dem stress- und seneszenzbedingten Galactolipidabbau stammt, während die mittelkettigen, gesättigten Fettsäuren Intermediate der plastidären *de novo* Fettsäuresynthese sind (Gaude *et al.*, 2007). Lipasen katalysieren die Hydrolyse von Lipiden mit der Freisetzung von Fettsäuren. Da die Akkumulation freier Fettsäuren aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften für Membranen schädlich ist, könnten diese zunächst in Coenzym-A-Ester umgewandelt werden. Es wurden in *Arabidopsis* verschiedene plastidär lokalisierte Acyl-CoA-Synthetasen identifiziert (Shockey *et al.*, 2002). Diese aktivierten Fettsäuren können im Zuge der  $\beta$ -Oxidation abgebaut oder in andere Lipide inkorporiert werden (Murphy *et al.*, 2005). Da die mittelkettigen Fettsäuren vermutlich aus der plastidären *de novo*-Fettsäuresynthese stammen, werden diese Phytylester möglicherweise aus Acyl-ACP-Estern und Phytol synthetisiert. Es ist auch denkbar, dass durch Lipasen freigesetztes 16:3, ähnlich den Fettsäuren aus der *de novo*-Synthese, als Acyl-ACP mit Phytol verestert wird.

### 5.3.1 Die Fettsäurephytylesterzusammensetzung in Blättern und Samen ist verschieden

Die Funktion der Fettsäurephytylester ist noch weitgehend unbekannt. Man vermutet, sie fungieren als Speicher des Phytols und der Fettsäuren, welche aus dem Lipidabbau stammen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Lokalisierung dieser Ester in den Plastoglobuli (Gaude *et al.*, 2007).

Die Fettsäurekomposition eines *Arabidopsis*-Blattes ist von der Fettsäurezusammensetzung der Fettsäurephytylester verschieden. Ein Gesamtlipidextrakt eines Blattes enthält hauptsächlich die Fettsäuren 16:0, 16:3, 18:2 und 18:3 (Browse *et al.*, 1986a). Bis auf den Phytylester von 18:2 sind die Phytylester der anderen Fettsäuren in seneszenten Blättern detektierbar. Unter diesen Bedingungen ist allerdings der 16:3-Phytylester die Hauptkomponente. Unter Standardwachstumsbedingungen akkumulieren dagegen hauptsächlich Phytylester mit mittelkettigen Fettsäuren (10:0, 12:0, 14:0). Unter diesen Bedingungen findet Lipidabbau hauptsächlich im Zuge des Lipid-*turnovers* statt. Aufgrund dessen scheint die Synthese dieser Ester stark reguliert und vor allem den Wachstumsbedingungen angepasst zu sein. Weiterhin scheinen in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen Acyltransferasen mit verschiedenen Spezifitäten die Synthese zu katalysieren.

Die Fettsäurezusammensetzung der Phytylester in den Samen von *Arabidopsis* ist von der in den Blättern verschieden. Obwohl in Samen hauptsächlich die Fettsäuren 16:0, 18:1, 18:2, 18:3 und 20:1 vorkommen, konnten nur die Phytylester von 16:0, 18:0, 18:2 und 18:3 detektiert werden. Die Phytylester zeigten zu jedem untersuchten Zeitpunkt der Samenreife eine ähnliche Fettsäurezusammensetzung. Dies lässt darauf schließen, dass im Gegensatz zu Blättern die Regulation der Fettsäurephytylestersynthese in jedem Stadium der Samenreife gleich ist und auch die gleichen substratspezifischen Acyltransferasen die Synthese katalysieren.

### 5.3.2 Die Bedeutung des alternativen Phytylsyntheseweges für den Tocopherolgehalt in Blättern und Samen

Es wird weitgehend die Meinung akzeptiert, dass Tocopherol ein Antioxidans ist und mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Membranen vor oxidativem Abbau schützt (Fryer, 1992). Es wurde mehrfach gezeigt, dass Tocopherol unter Stress- und Seneszenzbedingungen stark ansteigt. Demzufolge wäre die Wiederverwertung von Phytol zur Synthese von Tocopherol für die Pflanze eine energetisch effiziente Möglichkeit, unter Stress- und Seneszenzbedingungen den Tocopherolgehalt schnell zu erhöhen, um die plastidären Membranen vor oxidativem Abbau zu schützen. Andererseits wurde gezeigt, dass Tocopherol in Blättern kein essentielles Antioxidans ist und durch andere Mechanismen ersetzt werden kann. Das Wachstum der tocopherolfreien Mutante *vte1* von *Arabidopsis* ist unter optimalen Bedingungen dem Wildtyp sehr ähnlich. Unter Stress akkumuliert *vte1* nur geringfügig weniger Chlorophyll (Porfirova *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass der Tocopherolverlust in *vte1* durch Erhöhung des Gehaltes der beiden Antioxidantien Ascorbat und Glutathion kompensiert werden kann (Kanwischer *et al.*, 2004). Havaux *et al.*, (2005) zeigten ferner, dass mit Hochlicht gestresste *vte1*-Pflanzen mehr Zeaxanthin im Vergleich zum Wildtyp akkumulieren, was darauf schließen lässt, dass die Pigmente des Xanthophyllzyklus die Tocopheroldefizienz in der Mutante kompensieren können. Erst die Kreuzung von *vte1* mit der Zeaxanthin-defizienten Mutante *npq1* führte zur starken Erniedrigung der photosynthetischen Effizienz unter Stressbedingungen (Havaux *et al.*, 2005).

Der Tocopherolgehalt in Samen ist höher als in Blättern. Sattler und Mitarbeiter (2004) analysierten die Keimfähigkeit der Samen der tocopheroldefizienten Mutanten *vte1* und *vte2*. Die Samen wurden bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchtigkeit inkubiert, um ein beschleunigtes Altern zu imitieren. Die Keimungsrate der Mutanten war anschließend im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Daher scheint Tocopherol eine große Bedeutung für die Keimfähigkeit von Samen zu besitzen. Demzufolge kann die Wiederverwertung des Phytols in Form von Tocopherol in Samen als essentiell betrachtet werden, um die Keimung der Samen nach langer Lagerung zu gewährleisten.

### 5.3.3 In Blättern wird Phytol primär in Form von Fettsäurephytylestern, jedoch in Samen als Tocopherol gespeichert

Senescente Blätter des Wildtyps akkumulieren etwa 300 nmol g<sup>-1</sup> FG Fettsäurephytylester, aber mit etwa 150 nmol g<sup>-1</sup> FG nur die Hälfte der Menge an Tocopherol. Folgt man der Annahme, dass die Phytylkomponente dieser Metabolite aus dem Chlorophyllabbau stammt, so bedeutet dies, dass Phytol in Blättern in erster Linie in Form der Fettsäurephytylester gespeichert wird. In reifen Samen konnten ca. 9 pmol pro Samen Tocopherol und dagegen nur etwa 3 pmol pro Samen Fettsäurephytylester detektiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass in den Samen Tocopherol gegenüber den Fettsäurephytylestern die primäre Speicherform des Phytols ist.

## 5.4 Charakterisierung der *ggr*-Mutante

Um weitere Einblicke in den Phytolstoffwechsel zu erhalten, wurde eine T-DNA-Insertionsmutante der Geranylgeranylreduktase hinsichtlich ihres Wachstums und des Gehaltes an phytolhaltigen Metaboliten untersucht. Die T-DNA wurde im ersten Exon, also zwischen Start- und Stopcodon lokalisiert, was mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vollständige Defizienz der GGR-Aktivität zur Folge hat. Die für die Insertion homozygoten Pflanzen sind nur auf Nährmedium überlebensfähig, wachsen sehr langsam und haben nur wenige grüne Blätter. Homozygote *ggr*-Mutanten wurden auf Phytylderivate untersucht. Während Tocopherol in geringen Mengen detektiert werden konnte, waren kein Phyllochinon, keine Fettsäurephytylester und kein Chlorophyll nachweisbar. Anstelle von Chlorophyll akkumulierten Geranylgeranyl-Chlorophyll a und Geranylgeranyl-Chlorophyll b. Weiterhin waren die Photosynthesepigmente Lutein und  $\beta$ -Carotin gegenüber dem Wildtyp reduziert.

Bereits Tanaka *et al.* (1999) konnte mittels *antisense*-RNA die Expression der GGR in Tabak reduzieren. Dies führte zu einem verlangsamten Wachstum der transformierten Tabakpflanzen und zu vermindertem Chlorophyll- und Tocopherolgehalt. Wie auch in der vorliegenden Arbeit für *ggr* gezeigt, waren in den transgenen Tabakpflanzen besonders Lutein und  $\beta$ -Carotin reduziert. Shibata *et al.* (2004) beschrieben die

Reismutanten M134 und M249, welche ebenfalls unter Gewächshausbedingungen nicht lebensfähig sind. Die biochemische Analyse dieser Pflanzen lässt ebenfalls auf einen Defekt in der Reduktion der Prenylseitenkette schließen. In der Mutante M134 wurde ausschließlich Geranylgeranyl-Chlorophyll detektiert, was auch in der hier vorliegenden Arbeit für die *ggr*-Mutante gezeigt werden konnte. M249 dagegen akkumuliert auch Dihydro- und Tetrahydrogeranylgeranyl-Chlorophyll. Die Mutante *ΔchlP* aus *Synechocystis* mit inaktivierter GGR kann nur auf glucosehaltigem Medium wachsen (Shpilyov *et al.*, 2005). Die Mutante akkumuliert ebenfalls ausschließlich Geranylgeranyl-Chlorophyll und kein Chlorophyll und Tocopherol. Es konnten allerdings geringe Mengen  $\alpha$ -Tocotrienol bestimmt werden.

Expressionsstudien von in *E. coli* heterolog exprimiertem GGR-Protein zeigten, dass dieses Enzym *in vitro* die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytolpyrophosphat bzw. von Geranylgeranyl-Chlorophyll zu Phytol-Chlorophyll über die Zwischenstufen Dihydro- und Tetrahydrogeranylgeranylpyrophosphat bzw. Dihydro- und Tetrahydrogeranylgeranyl-Chlorophyll katalysiert (Keller *et al.*, 1998). Es wurde gefolgert, dass *in vivo* GGR sowohl die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat als auch von Geranylgeranyl-Chlorophyll über die unvollständig reduzierten Derivate katalysiert. In der *Synechocystis*-Mutante *ΔchlP* und in der *ggr*-Mutante aus *Arabidopsis* liegt eine inaktive GGR vor und entsprechend waren nur Geranylgeranyl-Chlorophyll nachweisbar. Die Reismutante M249 dagegen akkumuliert Geranylgeranyl-Chlorophyll-derivate mit unterschiedlich reduzierten Geranylgeranylseitenketten (Shibata *et al.*, 2004 a), was daraufhin deutet, dass GGR in dieser Mutante nicht vollständig inaktiviert vorliegt. In verschiedenen transgenen Tabakpflanzenlinien, in denen die Expression von GGR mittels *antisense*-RNA verschieden stark reduziert war, konnte dagegen ausschließlich Geranylgeranyl-Chlorophyll, jedoch keine verschieden stark reduzierten Geranylgeranyl-Chlorophyll- bzw. Geranylgeranylpyrophosphat-derivate detektiert werden (Tanaka *et al.*, 1999). Dies legt den Schluss nahe, dass eine verminderte Expression von GGR in Tabak den vollständigen Verlust der geranylgeranylreduzierenden Aktivität zur Folge hat, während in Reis eine verminderte GGR-Aktivität die Akkumulation unvollständig reduzierter Geranylgeranyl-derivate zur Folge hat (Tanaka *et al.*, 1999; Shibata *et al.*, 2004 a; Keller *et al.*, 1998).

#### 5.4.1 Die an der Fettsäurephytylester-, Tocopherol- und Phyllochinonsynthese beteiligten Enzyme zeigen hohe Substratspezifitäten für die Phytylgruppe

In *ggr* konnte Geranylgeranyl-Chlorophyll, jedoch keine Fettsäureester von Geranylgeraniol, kein Tocotrienol und kein Menachinon-4 (Vitamin K<sub>2</sub>) detektiert werden. Dies bedeutet, dass die an der Synthese der Fettsäurephytylester, der Tocopherole und von Phyllochinon beteiligten phytylgruppenübertragenen Enzyme eine hohe Substratspezifität für die Phytylgruppe aufweisen.

Tocotrienole konnten bisher hauptsächlich in monokotylen Pflanzen identifiziert werden, jedoch nur selten in dikotylen. Dieser Umstand ist auf die Präsenz einer weiteren Prenyltransferase in monokotylen Pflanzen zurückzuführen, welche spezifisch für das Substrat Geranylgeranylpyrophosphat ist. In der Tat konnten nach Einbringung der Gerste-Homogentisatgeranylgeranyltransferase (*HGGT*) in *Arabidopsis* Tocotrienole nachgewiesen werden (Cahoon *et al.*, 2003). Rippert *et al.* (2004) wählten eine alternative Strategie, die zur Akkumulation von Tocotrienolen in *Arabidopsis* führte. Nach Co-Expression der Hefe-Prephenatdehydrogenase und der *Arabidopsis-p*-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase konnten in diesen transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienol nachgewiesen werden. Dieser Umstand wird auf ein erhöhtes Angebot von Homogentisat zurückgeführt, aufgrund dessen die Homogentisatprenyltransferase neben Phytylpyrophosphat auch Geranylgeranylpyrophosphat als Substrat nutzt. Reiter und Lorbeer (2001) beschrieben die Extraktion von Wachsen aus Oliven- und Sonnenblumenöl und fanden neben den Phytylwachsestern auch Geranylgeranylwaxester in geringen Mengen.

Shibata *et al.*, (2004 a) detektierten in den Reismutanten M249 und M134 neben den Geranylgeranyl-Chlorophyllderivaten auch Geranylgeranyl-Menachinonderivate. Ähnlich den Geranylgeranyl-Chlorophyllderivaten akkumulieren die Reismutanten Geranylgeranyl-Menachinonderivate mit unterschiedlich reduzierten Geranylgeranylseitenketten. So konnte in M134 überwiegend Geranylgeranyl-Menachinon nachgewiesen werden und in M249 neben Dihydrogeranylgeranyl-Menachinon hauptsächlich Tetrahydrogeranylgeranyl-Menachinon. Diese Ergebnisse zeigen, dass 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA)-phytyl-transferase alternativ zu Phytylpyrophosphat auch Geranylgeranylpyrophosphat als Substrat nutzen kann. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Prenyltransferase eine höhere Präferenz für



Phytylpyrophosphat gegenüber Geranylgeranylpyrophosphat hat (Kaiping *et al.*, 1984). Enzymtests mit Spinatchloroplastenfraktionen zeigten, dass nur Phytylpyrophosphat, aber nicht Geranylgeranylpyrophosphat, das *in vivo* Substrat für die Tocopherol- und Phyllochinonsynthese ist (Soll *et al.*, 1980). In dem Cyanobacteriumstamm PCC 7421 wurde anstelle Phyllochinon Menachinon-4 als Elektronenakzeptor A<sub>1</sub> innerhalb des PS I detektiert (Mimuro *et al.*, 2005). Ein Genomvergleich mit anderen Cyanobakterien und *E. coli* ergab, dass lediglich die Gene *DHNA-phytyltransferase (MenA)* und *Demethylphyllochinon-Methyltransferase (MenG)*, welche für die letzten beiden an der Phyllochinonsynthese beteiligten Enzyme codieren, im Genom des Stammes PCC 7421 vorhanden sind. Daher wurde gefolgert, dass dieser Cyanobakterienstamm die Zwischenstufe DHNA über einen alternativen Weg synthetisiert und MenA und MenG die Synthese von Menachinon-4 aus DHNA katalysieren.

Analog zur Tocopherolsynthese kann demnach vermutet werden, dass in *Arabidopsis* die an der Synthese der Fettsäurephytylester und Phyllochinon beteiligten Enzyme ebenfalls eine hohe Substratspezifität für die Phytylgruppe aufweisen. Entsprechende Geranylgeranylacyltransferasen zur Synthese der Fettsäuregeranylgeranylester bzw. eine Geranylgeranyltransferase zur Synthese von Menachinon-4 scheinen in *Arabidopsis* nicht zu existieren.

#### 5.4.2 Es existiert wahrscheinlich eine weitere Geranylgeranylreduktase-Aktivität

Obwohl weder Chlorophyll, noch Phyllochinon und Fettsäurephytylester in *ggr* detektierbar waren, konnten geringe Mengen an Tocopherol nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die T-DNA-Insertion zu keiner vollständigen Defizienz der GGR-Aktivität führt, oder dass es eine weitere Geranylgeranyl-reduzierende Aktivität in *Arabidopsis* gibt. Die T-DNA befindet sich im ersten Exon des Gens und es konnten mit Ausnahme von Tocopherol keine phytylhaltigen Metabolite in *ggr* nachgewiesen werden. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die T-DNA-Insertion eine vollständige Inaktivierung der GGR zur Folge hat. Die Präsenz von Tocopherol wurde mittels Fluoreszenz-HPLC nachgewiesen und über das Massenspektrum nach GC-MS-Analyse bestätigt. Eine Verunreinigung mit einer heterozygoten oder Wildtyppflanze

kann ausgeschlossen werden, da die untersuchten *ggr*-Mutanten zuvor mittels PCR auf Homozygotie untersucht wurden.

In den bereits erwähnten Reismutanten M249 und M134 und in der *Synechocystis*-Mutante  $\Delta chlP$ , welche ebenso einen Defekt in der Geranylgeranylreduktase aufweisen, konnte allerdings kein Tocopherol nachgewiesen werden (Shpilyov *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2004 a; Shibata *et al.*, 2004 b). Die Tocopherolmenge in *ggr* entsprach unter Standardwachstumsbedingungen ca. 22 % des Wildtypocopherols. Da Stickstoffmangelstress im Wildtyp zu einer Erhöhung des Tocopherolgehaltes führte, jedoch nicht in der *ggr*-Mutante, entsprach die Menge an Tocopherol nur noch etwa 2 % des Wildtypocopherols. Aus diesem Grund und da in *Arabidopsis* kein zu GGR sequenzähnliches Protein existiert, handelt es sich wahrscheinlich um eine Nebenaktivität einer anderen Reduktase. Erstaunlicherweise geht aus dieser Aktivität nur die Phytylgruppe für die Tocopherol-, jedoch nicht für die Phyllochinon-, Chlorophyll- bzw. Fettsäurephytylestersynthese hervor. Dies kann in einer von der Reduktase verschiedenen Lokalisation der phytylgruppenübertragenen Enzyme begründet sein. Homogentisatphytyltransferase wurde in der Chloroplastenhüllmembran lokalisiert (Soll *et al.*, 1985; Soll *et al.*, 1980), während die Chlorophyllsynthetase mit der Thylakoidmembran assoziiert ist (Soll *et al.*, 1983). Allerdings wurde die Aktivität der DHNA-phytyltransferase ebenfalls in der Hüllmembran detektiert (Schultz *et al.*, 1981; Kaiping *et al.*, 1984). Aufgrund der ermittelten Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die Synthese der Phytylgruppe des Phyllochinons zum großen Teil über die plastidäre *de novo*-Synthese erfolgt, da eine stress- und seneszensbedingte Änderung des Phyllochinongehaltes nicht festgestellt wurde.

#### **5.4.3 Verschiedene Prenylpyrophosphate können Substrat der Chlorophyllsynthetase sein**

Geranylgeranylreduktase katalysiert die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat zu Phytylpyrophosphat innerhalb der plastidären Isoprenoidsynthese. Phytylpyrophosphat wird dann im Zuge der Tocopherolsynthese durch die Aktivität der Homogentisatphytyltransferase (VTE2) auf Homogentisat übertragen, bzw. Chlorophyllsynthetase katalysiert die Veresterung mit Chlorophyllid zu Chlorophyll

(Heldt, 1999). Forschungsergebnisse aus den 80er Jahren zeigen jedoch, dass *in vitro* auch Geranylgeranylpyrophosphat und sogar Farnesylpyrophosphat Substrate der Chlorophyllsynthetase sein können (Rüdiger *et al.*, 1980; Soll und Schultz, 1981). Allerdings wurden unterschiedliche Schlüsse bezüglich der Substratpräferenz gezogen. Während Rüdiger *et al.*, (1980) schlussfolgern, dass Geranylgeranylpyrophosphat das bevorzugte Substrat der Chlorophyllsynthetase ist, zeigen Soll *et al.*, (1983), dass die höchste katalytische Aktivität mit Phytylpyrophosphat als Substrat erzielt wird. Daher muss in Frage gestellt werden, ob tatsächlich Chlorophyllsynthetase die Veresterung von Chlorophyllid mit einer Phetylgruppe und nicht etwa mit einer Geranylgeranylgruppe katalysiert.

Im Zuge dieser Arbeit konnte in *ggr*-Pflanzen kein Chlorophyll nachgewiesen werden, dafür jedoch Geranylgeranyl-Chlorophyll. Das bedeutet, dass Geranylgeranylpyrophosphat Substrat der Chlorophyllsynthetase sein kann. Die *ggr*-Mutante wurde mit Phytol gefüttert, um zu untersuchen, ob *in vivo* auch Phytylpyrophosphat Substrat der Chlorophyllsynthetase sein kann. In den gefütterten *ggr*-Pflanzen konnten ähnlich hohe Mengen Chlorophyll wie Geranylgeranyl-Chlorophyll in ungefütterten Pflanzen detektiert werden. Im Wildtyp dagegen wurde zu keinem Zeitpunkt Geranylgeranyl-Chlorophyll nachgewiesen. Dies bedeutet, dass in *Arabidopsis* sowohl Geranylgeranylpyrophosphat als auch Phytylpyrophosphat als Substrat der Chlorophyllsynthetase in Frage kommen und anhand der Ergebnisse dieses Experimentes keine Aussage über das tatsächliche Substrat gemacht werden kann.

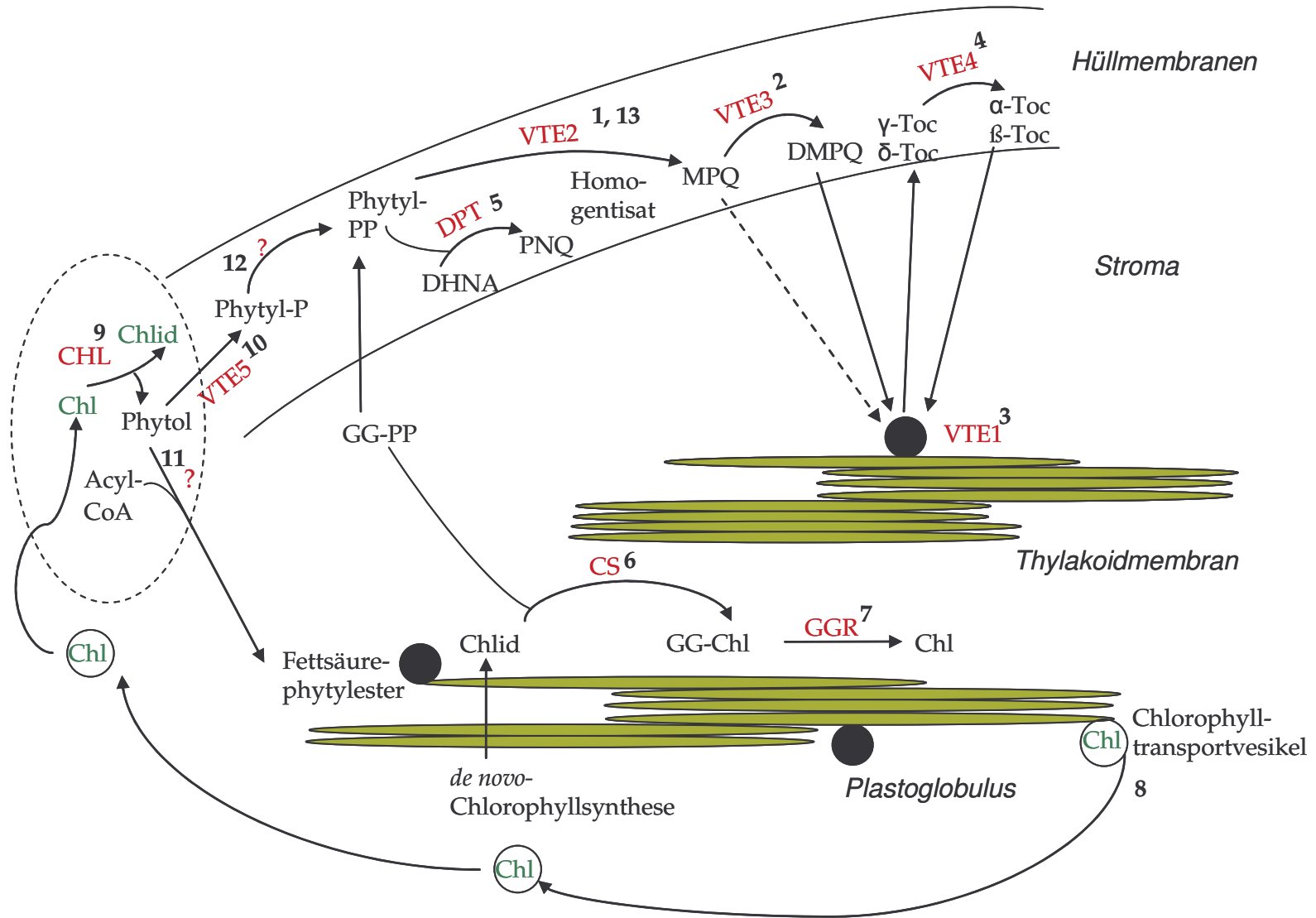
Rüdiger *et al.* (1980) bestimmten eine Präferenz der Chlorophyllsynthetase für die Substrate Geranylgeranylpyrophosphat gegenüber Phytylpyrophosphat ein Verhältnis von 6:3. Shibata *et al.* (2004 b) demonstrierten anhand von etiolierten Reiskeimlingen, dass in den ersten drei Stunden nach Wiederbeleuchtung ausschließlich Geranylgeranyl-Chlorophyll bzw. Dihydro- und Tetrahydrogeranylgeranyl-Chlorophyll nachweisbar sind. Erst nach etwa fünf Stunden konnte Chlorophyll nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen stark vermuten, dass zunächst Geranylgeranyl-Chlorophyll synthetisiert wird, welches anschließend durch GGR zu Chlorophyll reduziert wird.

## 5.5 Ein Modell für den Phytolstoffwechsel in *Arabidopsis thaliana*

Anhand der erzielten Ergebnisse sollte ein vorläufiges Modell über den plastidären Phytolstoffwechsel in *Arabidopsis thaliana* entwickelt werden. In dieses wurden ebenso die Forschungsergebnisse der letzten Jahre eingeschlossen (Abb. 26). Da einige Aktivitäten bisher noch nicht identifiziert bzw. lokalisiert wurden, ist das Modell noch unvollständig.

Phytylpyrophosphat ist ein Produkt des plastidären 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Isoprenoidsyntheseweges und reagiert mit Homogentisat durch die in der Hüllmembran lokalisierten Aktivität der Homogentisatphytyltransferase HPT1/VTE2 zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon (MPQ) (1) (Soll *et al.*, 1985; Soll *et al.*, 1980). VTE3 katalysiert dann die Methylierung von 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon (MPQ) zu 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon (DMPQ, 2). Die Zyklisierung von MPQ und DMPQ zu  $\delta$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol erfolgt durch VTE1 in den Plastoglobuli (3) (Vidi *et al.*, 2006; Porfirova *et al.*, 2002), welche mit der Thylakoidmembran assoziiert sind (Austin *et al.*, 2006). Die VTE4-katalysierte Methylierungsreaktion zu  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Tocopherol findet wiederum in der Hüllmembran statt (4) (Soll *et al.*, 1985; Soll *et al.*, 1980). Die Vorstufe des Phyllochinons, 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ), wird durch die Aktivität der DHNA-phytyltransferase (DPT) (Schultz *et al.*, 1981) aus Phytylpyrophosphat und 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA) synthetisiert (5). Geranylgeranylpyrophosphat ist ebenfalls ein Produkt der plastidären Isoprenoidsynthese und kann durch die Thylakoidmembran-assoziierte Chlorophyllsynthetase (Soll *et al.*, 1983) mit Chlorophyllid verestert werden (6). Es gibt diverse Hinweise, dass die Chlorophyllsynthese über die Zwischenstufe Geranylgeranyl-Chlorophyll abläuft (Tanaka *et al.*, 1999; Soll *et al.*, 1983; Soll und Schultz, 1981; Shibata *et al.*, 2004b; Shibata *et al.*, 2004a; Rüdiger *et al.*, 1980; Keller *et al.*, 1998). Geranylgeranyl-Chlorophyll wird dann durch Geranylgeranylreduktase GGR zu Chlorophyll reduziert (7). Soll *et al.* (1983) schlugen vor, dass eine Thylakoidmembranständige GGR die Reduktion von Geranylgeranyl-Chlorophyll und eine Hüllmembranständige GGR die Reduktion von Geranylgeranylpyrophosphat katalysiert. Die Ergebnisse der Analysen von *ggr* lassen eine dominante und eine sehr geringe GGR-Aktivität vermuten. Chlorophyllhydrolasen (CHL) katalysieren die Hydrolyse des Chlorophylls (9). Aus *Arabidopsis* wurden die beiden Chlorophyllhydrolasen

*Chlorophyllase1* und *Chlorophyllase2* identifiziert. Die Analyse der Chlorophyllasemutanten *chl1* und *chl2* in der hier vorliegenden Arbeit zeigte jedoch, dass diese Enzyme keinen maßgeblichen Beitrag am Chlorophyllabbau leisten. CHL1 und CHL2 konnten bisher nicht exakt lokalisiert werden. Dennoch ist man sich einig, dass sie nicht mit der Thylakoidmembran assoziiert sind, um vorzeitigen Abbau des Chlorophylls zu vermeiden (Matile *et al.*, 1999). Zunehmend wird eine extraplastidäre Lokalisation in Betracht gezogen (Tsuchiya *et al.*, 1999; Tsuchiya *et al.*, 1997; Guiamét *et al.*, 1999). Daher muss es einen Transportmechanismus geben, mit Hilfe dessen Chlorophyll aus der Thylakoidmembran zum Ort der Chlorophyllasen transportiert wird (8). Phytol aus der Chlorophyllhydrolyse kann anschließend durch die Hüllmembran-ständige Phytolkinase VTE5 (10) zu Phytylphosphat phosphoryliert (Valentin *et al.*, 2006; Ischebeck *et al.*, 2006), oder durch eine bisher nicht identifizierte Acyltransferase mit einer Fettsäure verestert werden (11; Ischebeck *et al.*, 2006). Die Identität der Acyltransferasen ist bisher unbekannt. Fettsäurephytylester werden hauptsächlich in den Plastoglobuli gespeichert (Gaude *et al.*, 2007). Das durch VTE5 entstandene Phytylphosphat kann durch eine weitere noch nicht identifizierte Kinase zu Phytylpyrophosphat phosphoryliert werden (12). Diese Aktivität wurde ebenfalls in der Hüllmembran detektiert (Ischebeck *et al.*, 2006). Phytylpyrophosphat dient als Phytylgruppendonator der VTE2-Reaktion bei der Synthese von Tocopherol (13).



**Abb. 26 Ein vorläufiges Modell für Phytol-Stoffwechsel in *Arabidopsis thaliana***

Dargestellt ist ein Teil eines Chloroplasten mit Hüllmembranen, Stroma, Thylakoidmembran und Plastoglobuli. Enzyme sind rot gekennzeichnet. Phytylpyrophosphat (Phytyl-PP) ist ein Produkt des plastidären Isoprenoidsyntheseweges. Phytyl-PP reagiert mit Homogentisat zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon (MPQ) durch die Aktivität der Homogentisatphytyltransferase (VTE2) (1). MPQ wird durch die Aktivität einer Methyltransferase (VTE3) zu 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydrochinon (DMPQ) methyliert (2). Die Zyklisierung von MPQ und DMPQ zu  $\delta$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol ( $\delta$ -Toc,  $\gamma$ -Toc) erfolgt durch Tocopherolzyklase (VTE1) in den Plastoglobuli (3). Eine weitere Methylierung zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc,  $\beta$ -Toc) wird katalysiert durch  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase (VTE4) (4). DHNA-phytyltransferase (DPT) katalysiert die Synthese von 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) aus Phytyl-PP und 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA) (5). Chlorophyllsynthetase (CS) katalysiert die Veresterung von Chlorophyllid (Chlid) und Phytyl-PP (6), anschließend reduziert Geranylgeranylreduktase (GGR) Geranylgeranyl-Chlorophyll (GG-Chl) zu Chlorophyll (Chl) (7). Mittels eines Transportvehikels wird Chlorophyll zu den wahrscheinlich extraplastidär lokalisierten Chlorophyllasen (CHL) transportiert (8) und zu Chlorophyllid und Phytol hydrolysiert (9). Bisher unbekannt Acyltransferasen verestern Phytol mit Fettsäure-Coenzym-A-Estern (Acyl-CoA) zu Fettsäurephytylestern (11), bzw. Phytolkinase (VTE5) katalysiert die Aktivierung von Phytol zu Phytylphosphat (Phytyl-P) (10). Eine weitere Kinase katalysiert die Umsetzung zu Phytylpyrophosphat, welches ebenso durch die Aktivität von VTE2 auf Homogentisat übertragen wird (13). Die Identität der mit (?) dargestellten Enzyme sowie die Lokalisation des mit einer gestrichelten Ellipse markierten Stoffwechselweges sind bisher noch unbekannt. Ferner ist unbekannt, ob die Hüllmembran-lokalisierten Aktivitäten in der inneren bzw. äußeren Hüllmembran lokalisiert sind.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit belegen, dass es einen alternativen Syntheseweg des Phytylpyrophosphates gibt. Dabei wird Phytol aus dem Chlorophyllabbau für die Synthese weiterer Phytylderivate genutzt. Die Ergebnisse der Analysen der *staygreen*-Mutanten nach dunkelinduzierter Seneszenz und von *ggr* lassen darauf schließen, dass der Anstieg des Tocopherol- und Fettsäurephytylestergehaltes unter Stress und in der Seneszenz auf den Recyclingweg zurückzuführen ist.

Durch Anwendung von Fosmidomycin wurde die plastidäre *de novo*-Isoprenoidsynthese in stickstoffmangelgestressten Wildtypen inhibiert. Dies führte zu einer Reduktion des Tocopherolgehaltes von 60 % im Vergleich zu stickstoff-

mangelgestressten Kontrollpflanzen. Gaude *et al.*, (2007) zeigten, dass unter diesen Bedingungen hauptsächlich Chlorophyll abgebaut wird. Aufgrund dessen könnte gefolgert werden, dass über die plastidäre *de novo*-Isoprenoidsynthese ein großer Teil des für die Tocopherolsynthese benötigten Phytylpyrophosphat synthetisiert wird. Es ist möglich, dass unter Stickstoffmangelbedingungen weiterhin Chlorophyllsynthese stattfindet. Damit würde der Anteil des Tocopherols, welcher im Zuge der *de novo*-Isoprenoidsynthese synthetisiert wird, überschätzt. Denn der Tocopherolgehalt in Fosmidomycin-behandelten Pflanzen reduziert sich um den Anteil, welcher aus dem nachsynthetisierten Chlorophyll hervorgeht. Obwohl nicht eindeutig geklärt werden kann, welchen Beitrag die *de novo*-Isoprenoidsynthese am Gesamttocopherolgehalt in Blättern leistet, so zeigt dieses Experiment, dass sie eine Rolle an der Tocopherolsynthese spielt.

Alternativ kann spekuliert werden, ob Phytol *in vivo* hauptsächlich über den Chlorophyllabbau produziert wird. Unter Standardwachstumsbedingungen beträgt der Tocopherol- bzw. Fettsäurephytylestergehalt etwa 5-25 nmol g<sup>-1</sup> FG bzw. 0-5 nmol g<sup>-1</sup> FG und der Chlorophyllgehalt ca. 1000 nmol g<sup>-1</sup> FG. Unter Stress- und Seneszenzbedingungen steigen die Gehalte an Tocopherol und Fettsäurephytylester auf ca. 100-150 nmol g<sup>-1</sup> FG bzw. 300-350 nmol g<sup>-1</sup> FG an, während der Chlorophyllgehalt je nach Stressbedingung stark abnimmt. Der Phyllochinongehalt bleibt dagegen konstant bei etwa 6-8 nmol g<sup>-1</sup> FG. Damit entspricht die Summe des Phytylgehaltes von Tocopherol, den Fettsäurephytylestern und Phyllochinon unter Standardwachstumsbedingungen etwa 3,8 % des Chlorophyllphytylgehaltes und steigt unter Stressbedingungen auf bis zu 50 %. Das bedeutet, dass maximal etwa 50 % des durch Hydrolyse freigesetzten Phytols in andere Synthesewege eingeschleust wird. Das Ergebnis des Fosmidomycin-Experimentes zeigt allerdings, dass nur etwa die Hälfte des unter Stress akkumulierten Tocopherols aus dem Chlorophyllabbau resultiert. Aufgrund dessen reduziert sich die Chlorophyllphytylmenge, welche in die Synthesewege anderer Phytylderivate eingeschleust wird, auf wahrscheinlich weniger als 50 %. In Blättern etwa sechs Wochen alter Pflanzen konnten nur geringe Mengen an freiem Phytol detektiert werden. Zwar wurden seneszenzente Blätter nicht auf ihren Phytolgehalt analysiert, doch vermutlich steigt der Phytolgehalt, wenn überhaupt, nur zum geringen Teil. Daher muss unter Stress- und Seneszenzbedingungen ein erheblicher Anteil an Phytol aus dem Chloroplasten exportiert und im Zuge der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden.



## 6. Zusammenfassung

Als Bestandteil von Chlorophyll ist Phytol das am häufigsten vorkommende Isoprenoid in der Biosphäre (Volkman und Maxwell, 1986). Große Mengen an Chlorophyll werden jährlich degradiert und dabei wird Phytol freigesetzt, über dessen Verbleib jedoch wenig bekannt ist. Es sollte der Nachweis erbracht werden, dass im Zuge des Chlorophyllabbaus hydrolysiertes Phytol Eingang in die Synthese anderer Phytol-derivate findet.

Während der Gehalt an Tocopherol, Chlorophyll und Fettsäurephytyl-ester entwicklungs- bzw. seneszenzabhängig ist, bleibt der Gehalt an Phyllochinon etwa gleich. Auch in Samen ist der Gehalt von Tocopherol, Chlorophyll und Fettsäurephytyl-ester entwicklungsabhängig. Es wurde gefolgert, dass nur die Synthesen von Tocopherol und Fettsäurephytyl-ester während des Chlorophyllabbaus stimuliert werden. Daher sollten Mutanten analysiert werden, welche im Chlorophyllabbau inhibiert sind. Da Chlorophyllase den ersten Schritt des Chlorophyllabbaus katalysiert, wurden zwei unabhängige T-DNA-Insertionsmutanten für *Chlorophyllase1* (*CHL1*) und eine T-DNA-Insertionsmutante für *Chlorophyllase2* (*CHL2*) identifiziert und eine *chl1-1chl2*-Doppelmutante erzeugt. Die Analyse der Chlorophyllidanteile ergab eine im Vergleich zum Wildtyp starke Reduktion in den *chl1*-Mutanten, während der Chlorophyllidanteil von *chl2* ähnlich hoch dem Wildtyp ist. Der Chlorophyllidanteil sich entwickelnder *chl1-1chl2*-Pflanzen nahm in der Seneszenz zu. Die Chlorophyllasemutanten zeigten kein verändertes Seneszenzverhalten im Vergleich zu den Wildtypen. Ferner konnte in den *chl1*-Linien nur geringfügig weniger Tocopherol und Fettsäurephytyl-ester als in den Wildtypen nachgewiesen werden. Auch der Tocopherolgehalt der Samen war in den Chlorophyllasemutanten unverändert zu den Wildtypen. Aufgrund dessen wurde gefolgert, dass neben den Chlorophyllasen *CHL1* und *CHL2* weitere Chlorophyllhydrolyasen in Samen und Blättern von *Arabidopsis* existieren.

Daher wurde auf andere Mutanten zurückgegriffen, in denen der Chlorophyllabbau stark inhibiert ist und die Seneszenz nach Dunkelinkubation im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögert ist. Eine deutliche Korrelation zwischen vermindertem Chlorophyllabbau und Gehalt an Tocopherol und Fettsäurephytyl-ester konnte in den

*staygreen*-Mutanten *pao1* und zwei unabhängigen *SGR* (*staygreen*)-RNA<sub>i</sub>-Linien nachgewiesen werden. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Synthese von Tocopherol und der Fettsäurephytylester durch die Chlorophyllhydrolyse induziert wird. Es wurde gefolgert, dass vor allem unter Seneszenz- bzw. Stressbedingungen dieser alternative Syntheseweg von Phytol eine Rolle spielt. Dennoch kommt der Phytylsynthese durch die *de novo*-Isoprenoidsynthese auch eine Bedeutung zu. Nach Behandlung von stickstoffmangelgestressten Wildtyppflanzen mit dem Inhibitor Fosmidomycin, welcher die plastidäre *de novo*-Isoprenoidsynthese hemmt, war der Tocopherolgehalt gegenüber stickstoffmangelgestressten Kontrollpflanzen stark reduziert.

Ferner konnte eine T-DNA-Insertionsmutante der *Geranylgeranylreduktase* (*GGR*) identifiziert werden. Diese Mutante kann nur auf Nährmedium überleben, hat nur wenige grüne Blätter und bildet keine Samen. Es konnte kein Phyllochinon, Chlorophyll und keine Fettsäurephytylester, jedoch geringe Mengen Tocopherol nachgewiesen werden. Der Resttocopherolgehalt wird auf die Nebenaktivität einer anderen Reduktase zurückgeführt. Weiterhin wurde nur das Geranylgeranylderivat des Chlorophylls identifiziert. Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass die phytylgruppenübertragenen Enzyme der Tocopherol-, Phyllochinon- und Fettsäurephytylestersynthese eine hohe Substratspezifität für die Phytylgruppe aufweisen. Nach Fütterung von Phytol konnte in *ggr* Tocopherol und Chlorophyll bestimmt werden. Aufgrund dessen kann gefolgert werden, dass Chlorophyllsynthetase aus *Arabidopsis* sowohl Geranylgeranyl-, als auch Phytylpyrophosphat als Substrat nutzen kann und damit ein breiteres Substratspektrum aufweist.

## 7. Ausblick

Durch die Analyse von *staygreen*-Mutanten, welche im Chlorophyllabbau inhibiert sind, konnte in der hier vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass in *Arabidopsis* Phytol aus dem Chlorophyllabbau Eingang in die Synthese von Tocopherol und Fettsäurephytylester findet. Ferner wurden *Arabidopsis*-Mutanten mit defizienter Chlorophyllaseaktivität untersucht. In diesen Mutanten konnte zwar ein im Vergleich zum Wildtyp verminderter Chlorophyllidanteil bestimmt werden, doch war kein Unterschied zum Wildtyp im *in vivo* Chlorophyllabbau feststellbar. Daher wurde angenommen, dass in *Arabidopsis* weitere Chlorophyllhydrolasen an der Induktion des Chlorophyllabbaus beteiligt sind. Zur Identifizierung dieser Chlorophyllhydrolasen sollen T-DNA-Insertionsmutanten von seneszenz- bzw. stressinduzierten Kandidatengenen untersucht werden. Durch Dunkelinkubation solcher Mutanten und Bestimmung des Chlorophyllidanteils kann gefolgert werden, ob die entsprechenden Gene potentielle Chlorophyllhydrolasen darstellen.

Die Untersuchung der Bedeutung und Funktion der Fettsäurephytylester soll Gegenstand weiterer Forschung sein. Stress- bzw. seneszenzinduzierte Acyltransferasen stellen mögliche Kandidatengene für die Fettsäurephytylestersynthese dar. Die Untersuchung entsprechender T-DNA-Insertionsmutanten auf den Gehalt und die Zusammensetzung der Fettsäurephytylester kann zunächst Aufschluss darüber geben, wie viele Acyltransferasen an der Synthese der Fettsäurephytylester beteiligt sind. Die Inhibierung der Fettsäurephytylestersynthese kann die Akkumulation von freiem Phytol zur Folge haben, was Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum haben kann. Die Inhibierung der Fettsäurephytylestersynthese kann sich auch auf die Synthese anderer Phytylderivate auswirken und eine veränderte Regulierung des Phytolmetabolismus bewirken. Daher sollen Tocopherol und Phyllochinon in diesen Mutanten bestimmt werden. Eventuell stellt die Inhibierung der Fettsäurephytylestersynthese einen biotechnologischen Ansatz zur Erhöhung des Tocopherolgehaltes dar.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass Phytol, welches aus dem Chlorophyllabbau stammt, in die Tocopherol- und Fettsäurephytylestere synthese eingeschleust wird, dennoch muss ein großer Teil des Phytols oxidativ abgebaut werden. Ishizaki *et al.*, (2005) identifizierten bereits das mitochondriale Transferprotein ETFQO als Bestandteil des oxidativen Abbauweges von Phytol. Die Inhibierung dieses Weges durch Identifizierung weiterer an der Phytoloxidation beteiligten Gene wäre ebenfalls ein biotechnologischer Ansatz zur Erhöhung des Tocopherolgehaltes in Samen und Blättern.

## 8. Literaturverzeichnis

- Akhtar MS, Goldschmidt EE, John I, Rodoni S, Matile P, Grierson D** (1999) Altered patterns of senescence and ripening in gf, a stay-green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journ Exp Bot* **50**: 1115-1122
- Anderson WH, Gellermann JL, Schlenk H** (1984) Effect of drought on phytyl wax esters in *Phaseolus* leaves. *Phytochem* **23**: 2695-2696
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH** (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10600-10605
- Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H, King I** (2007) Cross-species identification of Mendel's I locus. *Science* **315**: 73
- Austin JR, 2nd, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA** (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* **18**: 1693-1703
- Azzi A, Stocker A** (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res* **39**: 231-255
- Bachmann A, Fernández-López J, Ginsburg S, Thomas H, Bouwkamp JC, Solomos T, Matile P** (1994) Stay-green genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.: chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytol* **126**: 593-600
- Balz M, Schulte E, Thier H-P** (1992) Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC. *Fat Sci Technol* **94**: 209-213
- Benedetti CE, Arruda P** (2002) Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol* **128**: 1255-1263
- Benedetti CE, Costa CL, Turcinelli SR, Arruda P** (1998) Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **116**: 1037-1042
- Bergmüller E** (2003) Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von Tocopherol (Vitamin E) und zum Lipid-Metabolismus in *Arabidopsis thaliana*. Universität Potsdam, Potsdam
- Bergmüller E, Porfirova S, Dörmann P** (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol* **52**: 1181-1190
- Bick JA, Lange BM** (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* **415**: 146-154

- Biggins J, Mathis P** (1988) Functional role of vitamin K in photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochem* **27**: 1494-1500
- Brandis A, Vainstein A, Goldschmidt EE** (1996) Distribution of chlorophyllase among components of chloroplast membranes in orange (*Citrus sinensis*) leaves. *Plant Physiol Biochem* **34**: 49-54
- Brigelius-Flohé R, Traber MG** (1999) Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J* **13**: 1145-1155
- Browse J, McCourt P, Somerville C** (1986a) A mutant of *Arabidopsis* deficient in C(18:3) and C(16:3) leaf lipids. *Plant Physiol* **81**: 859-864
- Browse J, McCourt PJ, Somerville CR** (1986b) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem* **152**: 141-145
- Buchanan B, Hashimoto T, Asakawa Y** (1995) Phytyl esters and phaeophytin from the hornwort *Megaceros flagellaris*. *Phytochem* **41**: 1373-1376
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** eds (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*,
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ** (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol* **21**: 1082-1087
- Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D** (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**: 2343-2356
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cranwell PA, Jaworski GHM, Bickley HM** (1990) Hydrocarbons, sterols, esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes. *Phytochem* **29**: 145-151
- Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ, Rohmer M** (1998) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* **331 ( Pt 2)**: 615-621
- Evans HM, Bishop KS** (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**: 650-651
- Fang Z, Bouwkamp JC, Solomos T** (1998) Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* **49**: 503-510
- Fryer MJ** (1992) The antioxidant effect of thylakoid vitamin E (a-tocopherol). *Plant Cell Env* **15**: 381-392

- Gaude N, Bréhélin C, Tischendorf G, Kessler F, Dörmann P** (2007) Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J* **49**: 729-739
- Gellermann JL, Anderson WH, Schlenk H** (1975) Synthesis and analysis of phytyl and phytenoyl wax esters. *Lipids* **10**: 656-661
- Ginsburg S, Schellenberg M, Matile P** (1994) Cleavage of chlorophyll-porphyrin (requirement for reduced ferredoxin and oxygen). *Plant Physiol* **105**: 545-554
- Grusak MA, DellaPenna D** (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 133-161
- Guiamét JJ, Pichersky E, Noodén LD** (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts *Plant Cell Physiol* **40**: 986-992
- Harpaz-Saad S, Azoulay T, Arazi T, Ben-Yaakov E, Mett A, Shibolet Y, Hörtensteiner S, Gidoni D, Gal-On A, Goldschmidt EE, Eyal Y** (2007) Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *Plant Cell* **19**: 1007-1022
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3451-3469
- Heldt H-W** (1999) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Hendry GAF, Houghton JD, Brown SB** (1987) The degradation of chlorophyll-a biological enigma. *New Phytol* **107**: 255-479
- Hennig W** (2002) Genetik, Ed 3rd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Hinder B, Schellenberg M, Rodoni S, Ginsburg S, Vogt E, Martinoia E, Matile P, Hörtensteiner S** (1996) How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *J Biol Chem* **271**: 27233-27236
- Höfgen R, Willmitzer L** (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci* **66**: 221-223
- Hofius D, Sonnwald U** (2003) Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci* **8**: 6-8
- Hörtensteiner S** (2004) The loss of green color during chlorophyll degradation-a prerequisite to prevent cell death? *Planta* **219**: 191-194
- Hörtensteiner S** (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 55-77

- Hörtensteiner S, Wuthrich KL, Matile P, Ongania KH, Kräutler B** (1998) The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. *J Biol Chem* **273**: 15335-15339
- Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dörmann P** (2006) A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**: 2470-2477
- Ishizaki K, Larson TR, Schauer N, Fernie AR, Graham IA, Leaver CJ** (2005) The critical role of *Arabidopsis* electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *Plant Cell* **17**: 2587-2600
- Ishizaki K, Schauer N, Larson TR, Graham IA, Fernie AR, Leaver CJ** (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *Plant J* **47**: 751-760
- Ito H, Ohtsuka T, Tanaka A** (1996) Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *J Biol Chem* **271**: 1475-1479
- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y** (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J* **20**: 653-661
- Jakob E, Elmadfa I** (1996) Application of a simplified HPLC assay for the determination of phylloquinone (vitamin K1) in animal and plant food items. *Food Chem* **56**: 87-91
- Jansen GA, Wanders RJ, Watkins PA, Mihalik SJ** (1997) Phytanoyl-coenzyme A hydroxylase deficiency-the enzyme defect in Refsum's disease. *N Engl J Med* **337**: 133-134
- Kaiping S, Soll J, Schultz G** (1984) Site of methylation of 2-phytyl-1,4-naphthoquinol in phylloquinone (Vitamin K1) synthesis in spinach chloroplasts. *Phytochem* **23**: 89-91
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA** (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701
- Keller Y, Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B** (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis-evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* **251**: 413-417
- Kräutler B, Jaun B, Bortlik K, Schellenberg M, Matile P** (1991) On the enigma of chlorophyll degradation: the constitution of a secophorphinoid catabolite. *Angew Chem Int Ed Engl* **30**: 1315-1318
- Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, Tanaka A** (2007) Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* **19**: 1362-1375



- Laule O, Furholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruissem W, Lange M** (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6866-6871
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM** (1998) *Prinzipien der Biochemie*. Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-274
- Liljenberg C** (1977) The occurrence of phytylpyrophosphate and acyl esters of phytol in irradiated dark-grown barley seedlings and their possible role in biosynthesis of chlorophyll. *Physiol Plant* **39**: 101-105
- Lin JF, Wu SH** (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **39**: 612-628
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- Lohmann A** (2004) *Die Biosynthese von Phyllochinon (Vitamin K) in Arabidopsis thaliana*. Technische Universität Berlin, Berlin
- Matile P, Ginsburg S, Schellenberg M, Thomas H** (1988) Catabolites of chlorophyll in senescing barley leaves are localized in the vacuoles of mesophyll cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9529-9532
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H** (1999) Chlorophyll degradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 67-95
- Matile P, Schellenberg M** (1996) The cleavage of phaeophorbide a is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol Biochem* **34**: 55-59
- Matile P, Schellenberg M, Vicentini F** (1997) Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta* **201**: 96-99
- Mendel G** (1866) *Versuche über Pflanzen-Hybriden*. *Proc Nat Hist Soc*
- Mimuro M, Tsuchiya T, Inoue H, Sakuragi Y, Itoh Y, Gotoh T, Miyashita H, Bryant DA, Kobayashi M** (2005) The secondary electron acceptor of photosystem I in *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 is menaquinone-4 that is synthesized by a unique but unknown pathway. *FEBS Lett* **579**: 3493-3496
- Molina-Torres J, Martinez ML** (1991) Tocopherols and leaf age in *Xanthium strumarium*. *New Phytol* **118**
- Mühlecker W, Kräutler B** (1996) Breakdown of chlorophyll: constitution of nonfluorescing chlorophyll-catabolites from senescent cotyledons of the edicot rape. *Plant Physiol Biochem* **34**: 61-75
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**:31-57

- Oberhuber M, Berghold J, Breuker K, Hörtensteiner S, Kräutler B** (2003) Breakdown of chlorophyll: a nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless "nonfluorescent" chlorophyll catabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6910-6915
- Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ, Jeon JS, Park YI, Paek NC** (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* **19**: 1649-1664
- Patterson GW, Hugly S, Harrison D** (1993) Sterols and phytyl esters of *Arabidopsis thaliana* under normal and chilling temperatures. *Phytochem* **33**: 1381-1383
- Peisker AS, Düggelin T, Rentsch D, Matile P** (1989) Phytol and the breakdown of chlorophyll in senescent leaves. *J Plant Phys* **135**: 428-432
- Pereira AS, Siqueira DS, Elias VO, Simoneit BR, Cabral JA, Aquino Neto FR** (2002) Three series of high molecular weight alkanolates found in Amazonian plants. *Phytochem* **61**: 711-719
- Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P** (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12495-12500
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standard by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394
- Poulus A, Sharp P, Whiting M** (1984) Infantile Refsum's disease (phytanic acid storage disease): a variant of Zellweger's syndrome? *Clin. Genet.* **26**: 579-586
- Pružinska A, Tanner G, Anders I, Roca M, Hörtensteiner S** (2003) Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15259-15264
- Pružinska A, Tanner G, Aubry S, Anders I, Moser S, Müller T, Ongania KH, Kräutler B, Youn JY, Liljegren SJ, Hörtensteiner S** (2005) Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiol* **139**: 52-63
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M** (2004) Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol* **134**: 92-100
- Rise M, Cojocaru M, Gottlieb HE, Goldschmidt EE** (1989) Accumulation of alpha-tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiol* **89**: 1028-1030

- Rodoni S, Mühlecker W, Anderl M, Kräutler B, Moser D, Thomas H, Matile P, Hörtensteiner S** (1997) Chlorophyll Breakdown in Senescent Chloroplasts (Cleavage of Pheophorbide a in Two Enzymic Steps). *Plant Physiol* **115**: 669-676
- Rontani JF, Bonin PC, Volkman JK** (1999) Production of wax esters during aerobic growth of marine bacteria on isoprenoid compounds. *Appl Environ Microbiol* **65**: 221-230
- Rontani JF, Cuny P, Grossi V** (1996) Photodegradation of chlorophyll phytyl chain in senescent leaves of higher plants. *Phytochem* **42**: 347-351
- Rüdiger W, Benz J, Guthoff C** (1980) Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes. *Eur J Biochem* **109**: 193-200
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Savidge B, Weiss JD, Wong YH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE** (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 321-332
- Schenk N, Schelbert S, Kanwischer M, Goldschmidt EE, Dörmann P, Hörtensteiner S** (2007) The chlorophyllases *AtCHL1* and *AtCHL2* are dispensable for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. In Vorbereitung
- Schultz G, Ellerbrock BH, Soll J** (1981) Site of prenylation reaction in synthesis of phyloquinone (vitamin K1) by spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* **117**: 329-332
- Shibata M, Mikota T, Yoshimura A, Iwata N, Tsuyama M, Kobayashi Y** (2004 b) Chlorophyll formation and photosynthetic activity in rice mutants with alterations in hydrogenation of the chlorophyll alcohol side chain. *Plant Sci* **166**: 593-600
- Shibata M, Tsuyama M, Takami T, Shimizu H, Kobayashi Y** (2004 a) Accumulation of menaquinones with incompletely reduced side chains and loss of alpha-tocopherol in rice mutants with alternations in the chlorophyll moiety. *J Exp Bot* **55**: 1989-1996
- Shintani D, DellaPenna D** (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**: 2098-2100
- Shioi Y, Sasa T** (1986) Purification of solubilized chlorophyllase from *Chlorella protothecoides*. *Methods Enzymol* **123**: 421-427
- Shockey JM, Fulda MS, Browse JA** (2002) *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* **129**: 1710-1722
- Shpilyov AV, Zinchenko VV, Shestakov SV, Grimm B, Lokstein H** (2005) Inactivation of the geranylgeranyl reductase (*ChlP*) gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 195-203

- Soll J, Kemmerling M, Schultz G** (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch Biochem Biophys* **204**: 544-550
- Soll J, Schultz G** (1980) Site of biosynthesis of  $\alpha$ -tocopherol in spinach chloroplasts. *FEBS Letters* **112**: 243-246
- Soll J, Schultz G** (1981) Phytol synthesis from geranylgeraniol in spinach chloroplasts. *Biochem Biophys Res Comm* **99**: 907-912
- Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA** (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **238**: 290-299
- Soll J, Schultz G, Rudiger W, Benz J** (1983) Hydrogenation of geranylgeraniol : Two pathways exist in spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **71**: 849-854
- Takamiya KI, Tsuchiya T, Ohta H** (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci* **5**: 426-431
- Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K** (1998) Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12719-12723
- Tanaka R, Oster U, Kruse E, Rüdiger W, Grimm B** (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol* **120**: 695-704
- Tappel AL** (1962) Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamins and Hormones* **20**: 493-510
- Thayer SS, Björkmann O** (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth Res* **23**: 331-343
- Thomas H, Schellenberg M, Vicentini F, Matile P** (1996) Gregor Mendel's Green and Yellow Pea Seeds. *Bot Acta* **109**: 3-4
- Tramontano WA, Ganci D, Pennino M, Dierenfeld ES** (1992) Age dependent  $\alpha$ -tocopherol concentrations in leaves of soybean and pinto beans. *Phytochem* **31**
- Trebitsh T, Goldschmidt EE, Riov J** (1993) Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in *Citrus* fruit peel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9441-9445
- Tsuchiya T, Ohta H, Masuda T, Mikami B, Kita N, Shioi Y, Takamiya K** (1997) Purification and Characterization of Two Isozymes of Chlorophyllase from Mature Leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol* **38**: 1026-1031
- Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Iwamatsu A, Shimada H, Masuda T, Takamiya K** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15362-15367

- Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, Jensen PK, Qi Q, Venkatesh TV, Karunanandaa B, Baszis SR, Norris SR, Savidge B, Gruys KJ, Last RL** (2006) The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* **18**: 212-224
- van den Brink DM, Miert JN, Dacremont G, Rontani JF, Wanders RJA** (2005) Characterization of the final step in the conversion of phytol into phytanic acid. *J Biol Chem* **280**: 26838-26844
- Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Aasen ED, Hao M, Stein JC, Norris SR, Last RL** (2003) Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. *Plant Cell* **15**: 3007-3019
- Vicentini F, Hörtensteiner S, Schellenberg M, Thomas H, Matile P** (1995) Chlorophyll breakdown in senescent leaves: identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytol* **129**: 247-252
- Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, Kessler F, Bréhélin C** (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* **281**: 11225-11234
- Volkman JK, Maxwell JR** (1986) *Acyclic isoprenoids as biological markers*. Elsevier, Amsterdam, Niederlande
- Wanders RJ, Jansen GA, Lloyd MD** (2003) Phytanic acid  $\alpha$ -oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta* **1631**: 119-135
- Willstätter R, Mieg W** (1906) Untersuchungen über Chlorophyll. I. Ueber eine Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten. *Liebig's Ann. Chem.* **350**: 1-47
- Zbierzak A M, Kanwischer M, Wille Ch, Lohmann A, Bréhélin C, Kessler F, Dörmann P** (2007) Intersection of the tocopherol and plastoquinone metabolic pathways at the plastoglobule. *JBC eingereicht*

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
cDNA	complementär DNA
Chl	Chlorophyll
CHL1	Chlorophyllase1
CHL2	Chlorophyllase2
Chlid	Chlorophyllid
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.</i> deoxy ribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	<i>engl.</i> <u>e</u> xpressed <u>s</u> equence <u>t</u> ag
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FCC	fluoreszierendes Chlorophyllkatabolit
FG	Frischgewicht
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit massenselektiven Detektor
GGR	Geranylgeranylreduktase
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie ( <i>engl.</i> high pressure liquid chromatographie)
LB	<i>left border</i>
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
M <sup>+</sup>	Molekülion
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure,

mRNA	massenger RNA
MS-Medium	Murashige and Skoog – Medium
MSTFA	N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCC	nicht-fluoreszierendes Chlorophyllkatabolit
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PP	Pyrophosphatrest
RCC	Rotes Chlorophyllkatabolit
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl.</i> <u>ri</u> bo <u>nuc</u> leic <u>a</u> cid)
RNA <sub>i</sub>	Interferenz-RNA
rRNA	ribosomal RNA
SE	Standardfehler ( <i>engl.</i> Standarderror)
SGR	<u>STAYGREEN</u> (seneszenzinduziertes Gen)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>engl.</i> volume per volume)
VTE1	Tocopherolzyklase
VTE2 / HPT1	Homogentisatphytyltransferase
VTE3	2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydrochinon-Methyltransferase
VTE4	γ-Tocopherol-Methyltransferase
VTE5	Phytolkinase
w/v	Masse pro Volumen ( <i>engl.</i> weight per volume)
WT	Wildtyp
+N, -N	+Stickstoff, - Stickstoff

Fettsäuren wurden nach dem Muster X:N abgekürzt. Dabei bedeutet X die Anzahl der Kohlenstoffatome und N die Anzahl der Doppelbindungen.

Es wurden die SI-Einheiten demäß des *Système International d'Unités* verwendet.

## Danksagung

Für die Bereitstellung meines Themas, die fachliche Betreuung und die exzellenten Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie bedanke ich mich bei PD Dr. Peter Dörmann und Prof. Dr. Lothar Willmitzer. Dr. Dirk Hinch und Dr. Wolfgang Lein danke ich für konstruktive Diskussionen und Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meine lieben Kollegen der AG Dörmann für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich Prof. Felix Kessler für die Möglichkeit zwei Monate in seiner Arbeitsgruppe in Neuchâtel zu arbeiten, wodurch ich mehr Arbeitserfahrung in einem anderen Labor und insbesondere in der Elektronenmikroskopie gewann. Stefan Hörtensteiner danke ich für die Überlassung der Pflanzen *pao1* und *SGR-RNA<sub>i</sub>*.

Ich danke meinen Eltern für Ihre Unterstützung, viele ermunternden Worte und ihr stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Matthias und Hermine für die vielen Aufmunterungen und die Bereicherung meines Lebens.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie angefertigt habe und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Doktorarbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Marion Kanwischer

Golm, 09.08.2007