



1 Einleitung

1.1 Herbizide in der modernen Landwirtschaft

Die Landwirtschaft war und ist für den Menschen von enormer Bedeutung, weil sie sein Überleben durch Gewährleistung der Nahrungsversorgung sichert. Sie bezeichnet die zielgerichtete Produktion pflanzlicher und tierischer Erzeugnisse auf einer zu diesem Zweck bewirtschafteten Fläche. Natürlicherweise gehen mit dem menschlichen Eingriff in solche Standorte auch Nachteile einher. So bieten beispielsweise die durch Düngung und Pflege gut in Stand gehaltenen Anbauflächen ideale Lebensbedingungen für Schädlinge, wie Insekten oder Pilze und Unkräuter.

Bei letzteren handelt es sich um unerwünschte Begleitvegetation wie Wildpflanzen oder spontan aufwachsende Kulturpflanzen, die mit den eigentlich angebauten Nutzpflanzen in direkte Konkurrenz um Nährstoffe, Licht und Wasser treten. Die Konsequenzen hieraus können erschwerte Erntebedingungen (Heldt, 1999) und sogar eine starke Reduktion des Ernteertrags sein. So haben US-amerikanische Bauern jährliche Einbußen von bis zu 20 Milliarden US-Dollar durch von Unkräutern bedingte Ernteauffälle (Basu *et al.*, 2004). Es gibt unterschiedliche Strategien, um solche Verluste einzudämmen. Die klassischen Ansätze beinhalten eine mechanische Unkrautkontrolle wie beispielsweise die Bodenbearbeitung durch Pflügen, Mähen, Beweidung oder Handarbeit. Weiterhin gibt es die Möglichkeit der biologischen Kontrolle, welche sich die natürlichen Feinde eines Unkrauts zu Nutze macht (z.B. Wilson, 1964; Julien und Maywald, 1995; Zimmermann *et al.*, 2000). Die in der modernen Landwirtschaft bedeutsamste Methode ist jedoch nach wie vor der Einsatz von chemischen Bekämpfungsmitteln, den Herbiziden (lat. *herba* = Kraut, Gras und lat. *caedere* = töten). Im Jahr 2010 wurden von Landwirten weltweit etwa 17 Milliarden US-Dollar für Herbizide ausgegeben (Krähmer und Stübler, 2012) und Studien belegen, dass Ernteerträge ohne den Einsatz von Herbiziden um 50 % und mehr verringert sein können (Zwerger *et al.*, 2004).

Die Geschichte der Herbizide begann in den 1950er Jahren mit der Entdeckung der herbizidalen Wirkung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), welches zur Kontrolle breitblättriger Unkräuter in Getreide- oder Zuckerrohrkulturen eingesetzt wird (Bayley *et al.*, 1992). Bis heute sind über 230 Substanzen bekannt, die insgesamt durch mehr als 30 verschiedene Mechanismen ihre herbizidale Wirkung entfalten (Seitz *et al.*, 2003).



Innerhalb der Herbizide wird zwischen selektiven und nicht-selektiven Herbiziden unterschieden. Erstere ermöglichen eine Unkrautkontrolle ohne Schädigung der Kulturpflanzen. Die Ursache hierfür beruht oft darauf, dass die Unkräuter das applizierte Herbizid nicht oder nur langsamer abbauen können, als Nutzpflanzen. Alternativ kann der molekulare Angriffsort nur im Unkraut in einer hemmbaren Form vorkommen. Nicht-selektive Herbizide inhibieren das Wachstum sowohl von Unkräutern als auch von Nutzpflanzen und können daher nur angewendet werden, wenn die Beseitigung aller Pflanzen gewünscht ist. Dies ist beispielsweise vor der Aussaat, nach der Ernte oder bei der Unkraut-Freihaltung von Industriearealen der Fall. Das wohl prominenteste Beispiel eines solchen Totalherbizids ist das 1976 von der Firma Monsanto kommerzialisierte Glyphosat (Roundup®; www.monsanto.de/monsanto/monsanto_frueher.htm).

Um Herbizide breiter gefächert einsetzen zu können, wurden zwei Technologien entwickelt, die eine selektive Nutzung ermöglichen. Eine dieser beiden ist die *Safenertechnologie*. Sie setzt auf die kombinierte Anwendung von Herbiziden in Gemischen mit chemischen Substanzen, den *Safenern*, die in der Kulturpflanze einen Mechanismus zum Schutz vor der herbizidalen Wirkung in Gang setzt. Hierbei kann es sich um eine veränderte Absorption/Translokation oder um verstärkten Abbau des Herbizids handeln. Die Folge ist eine selektive Entgiftung des Herbizids in der Nutzpflanze, nicht aber in den Unkräutern (Seitz *et al.*, 2003; Behringer *et al.*, 2011).

Die zweite Möglichkeit zur selektiven Nutzung von Herbiziden ist das Einbringen von Herbizidtoleranz in Kulturpflanzen. Hierbei werden zwei Ansätze unterschieden: Zum einen der klassische Züchtungsweg, bei dem beispielsweise durch induzierte Zufallsmutagenese eine Resistenz bzw. Toleranz gegenüber Herbiziden erzeugt wird. Ein Beispiel hierfür ist das Clearfield® Produktionssystem (BASF) in dem auf diesem Weg eine erhöhte Toleranz gegenüber Imidazolinonen (Acetolactatsynthase-Inhibitoren) erzeugt wurde. Dieses System ist für Raps-, Sojabohnen-, Sonnenblumen-, Weizen- und Reis-Kulturen erhältlich (Niehoff und Klingenhagen, 2012). Auf der anderen Seite steht die Gentechnik, bei der mittels gezieltem Einbringen von toleranzvermittelnden Genen bzw. den entsprechend kodierten Proteinen eine erhöhte Herbizidtoleranz in den Kulturpflanzen gewährleistet wird. Ein Beispiel hierfür ist das LibertyLink®-System (Bayer CropScience) in Nutzpflanzen wie Baumwolle, Raps und Sojabohne, welches zusammen mit dem Herbizid Glufosinat (Liberty®, Bayer CropScience) vertrieben wird. In die entsprechenden Kultursorten wird das Phosphinotricinacetyltransferase (*bar*)-Gen aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus*



eingebraucht. In derart modifizierten Pflanzen findet nach Glufosinatbehandlung eine Acetylierung des Herbizids durch das *bar*-Genprodukt, die Phosphinotricinacetyltransferase (PAT), statt, wodurch das Herbizid unwirksam wird. Ein zweites bisher kommerzialisiertes Beispiel ist die Glyphosattoleranz im Roundup Ready[®]- (CP4 *epsps*-Gen, Monsanto) oder dem GlyTol[®]-(*2mepsps*-Gen, Bayer CropScience) System. Die *epsps*-Gene kodieren für modifizierte 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthasen, deren Bindungsaffinitäten gegenüber Glyphosat stark erniedrigt sind und somit eine Glyphosattoleranz in den modifizierten Kulturpflanzen ermöglicht (Wallace *et al.*, 2011).

In den letzten Jahren kam es durch den übermäßigen Gebrauch von Glyphosat zur Entwicklung von resistenten Unkräutern, wie beispielsweise *Amaranthus*-Arten, die mit diesem Totalherbizid nicht mehr kontrolliert werden können (Lorentz *et al.*, 2011). Dieses Problem wird durch die Tatsache verschärft, dass in den letzten 20 Jahren keine neuen Herbizidwirkmechanismen kommerzialisiert wurden (Krämer, 2012; Duke, 2012). Langfristig können sich daher Unkrautpopulationen entwickeln, die mit keinem Herbizid selektiv kontrolliert werden können. Um dies zu verhindern gibt es im integrierten Pflanzenschutz klassische Methoden, wie die mechanische Unkrautbekämpfung, Fruchtfolgemaßnahmen, der Anbau von Zwischenfrüchten und die Saathygiene. Ganz entscheidend ist allerdings der Wechsel von Herbizid-Wirkstoffen unter Ausnutzung alternativer Wirkmechanismen (Werner, 2010). Eine potenzielle Lösung bietet die Anwendung der effektiven 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD)-Inhibitorherbizide. Durch Identifizierung und Kommerzialisierung von Nutzpflanzen, in denen toleranzvermittelnde HPPD-Proteine implementiert wurden, können aussichtsreiche Alternativen zu den bisher beschriebenen, selektiv einsetzbaren Herbiziden geschaffen werden.

1.2 Herbizidale HPPD-Inhibitoren und deren Zielprotein, die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

Die Geschichte der HPPD-Inhibitoren begann 1977 mit der Beobachtung Reed Grays, dass in direkter Nähe zu Karminroten Zylinderputzern (*Callistemon citrinus*) weniger Unkräuter wuchsen, als an anderen Standorten. In anschließenden Studien wurde aus Extrakten solcher Pflanzen der erste natürlich vorkommende HPPD-Inhibitor Leptospermon gewonnen (Beaudegnies *et al.*, 2009). In den darauffolgenden Jahren wurden viele weitere HPPD-

Inhibitoren identifiziert und kommerzialisiert. Sie werden heute in drei chemische Klassen unterteilt (Abb. 1): die Triketone wie beispielsweise Tembotrion (Laudis[®], Bayer CropScience), Sulcotrion (Mikado[®], Bayer CropScience) und Mesotrion (Callisto[®], Syngenta). Weiterhin die Isoxazole wie Isoxaflutol (Balance[®], Bayer CropScience), ein Vorläufermolekül, dessen aktives Prinzip eine offenkettige Diketonitril-Form ist, s. Abb. 1; Seitz *et al.*, 2003) und die Pyrazolate wie z.B. Pyrasulfotol (Huskie[®], Bayer CropScience) oder Topramezon (Clio[®] Super, BASF).

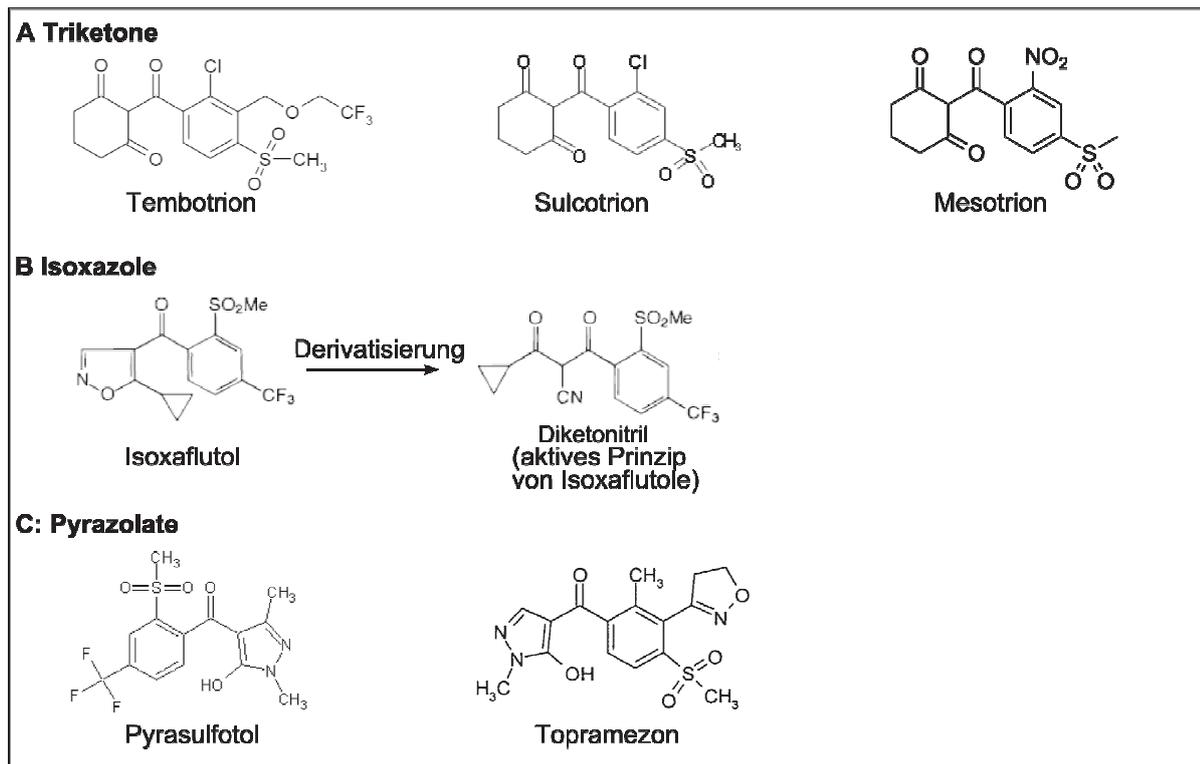


Abb. 1: Beispiele für HPPD-Inhibitoren der chemischen Klassen (A) Triketone, (B) Isoxazole und (C) Pyrazolate. Die jeweiligen Hersteller und Markenbezeichnung sind dem Text in 1.2 zu entnehmen. Bei dem Herbizid Isoxaflutol handelt es sich um ein Vorläufermolekül, das nach Aufnahme durch Pflanzen in einer nicht-biologischen Reaktion zur aktiven Substanz Diketonitril derivatisiert wird.

Das Zielprotein der HPPD-Inhibitoren ist die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (EC 1.13.11.27). Mit Ausnahme einiger Gram-positiver Bakterien sind HPPDs in nahezu allen aerob lebenden Organismen zu finden (Brownlee *et al.*, 2004). Sie gehören zu den α -Ketosäure-abhängigen Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen und sind wesentlich am Phenylalanin- und Tyrosin-Metabolismus beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von wichtigen lipidlöslichen Chinonverbindungen der Chloroplasten höherer Pflanzen (Fritze *et al.*, 2004).

der Homogentisatsynthese durch Hemmung der HPPD-katalysierten Reaktion für Pflanzen letal ist.

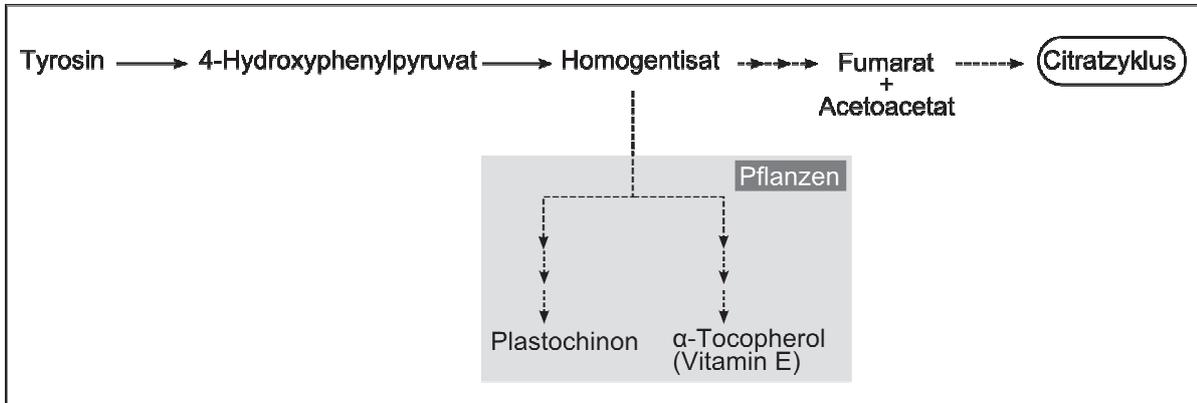


Abb. 3: Einordnung der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Reaktion. Die beteiligten Komponenten sind namentlich genannt. Durchgehende Pfeile symbolisieren direkte Umsetzungen, gestrichelte Pfeile symbolisieren vereinfacht Stoffwechselwege, an denen mehrere Enzyme beteiligt sind und dienen der schematischen Darstellung.

Werden Pflanzen mit HPPD-Inhibitoren behandelt, wird deren Wachstum gehemmt und in neu gebildeten Blättern kommt es zum Ausbleichen (*Bleaching*) der Blätter, welches für diese Herbizidklasse charakteristisch ist. Biochemisch wird hierbei durch Bindung der Inhibitoren an das aktive Zentrum der HPPD die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisat blockiert. Die erste unmittelbare Konsequenz ist eine Verringerung des Plastochinonpools, gefolgt von einer Phytoenakkumulation in behandelten Pflanzen. Durch Fehlen von Plastochinon können in älteren Geweben keine Elektronen mehr in der Elektronentransportkette der Photosysteme übertragen werden. Viel wichtiger aber ist die Unterbrechung der Biosynthese von Carotinoiden, denn durch ihr Fehlen kann überschüssige Anregungsenergie in den Lichtsammelkomplexen der Pflanzen nicht mehr abgeführt werden. In der Folge entstehen Chlorophyllmoleküle im Tripletzustand, die in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoff zu generieren. Solche zerstören Lipide und Proteine, induzieren den Abbau der photosynthetischen Komplexe und die Freisetzung von Chlorophyll, welches weiteren Singulett-Sauerstoff generiert. Als Folge dieser Kettenreaktion kommt es in behandelten Pflanzen zu einer Zerstörung aller Pigmente, dem Ausbleichen, der Zerstörung von Zellstrukturen und in letzter Konsequenz dem Tod der Pflanze (Heldt, 1999; Beaudegnies *et al.*, 2009; Porée *et al.*, 2011a). Abb. 4 zeigt beispielhaft die phänotypische Reaktion von regenerierenden Tabakblattstückchen (*N. tabacum*) auf die HPPD-Inhibitoren Tembotrion, Diketonitril und Mesotrion

(unveröffentlichte Ergebnisse, Prof. Dr. Rüdiger Hain, Bayer CropScience AG, Frankfurt am Main). In dieser Kultivierungsform weist Tabak die typischen Symptome einer HPPD-Inhibitorsensitivität in Form von Wachstumsinhibition und dem Ausbleichen von neu gebildetem Gewebe auf.

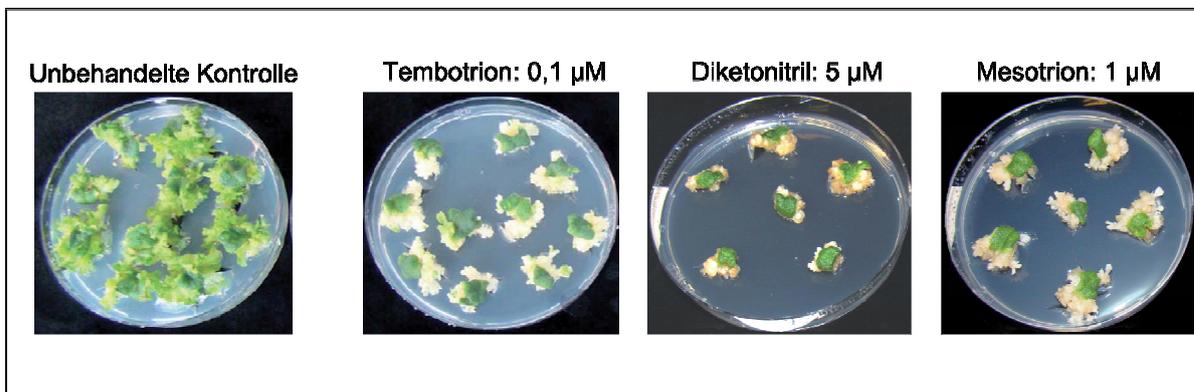


Abb. 4: Die Wirkung von HPPD-Inhibitoren auf *N. tabacum* (Wildtyp; Sorte Samsun). Für die Untersuchung der Dosiswirkung der Herbizide wurden Blattscheiben auf MS-Medium versetzt mit 1 mg Benzylaminopurin/l ohne (unbehandelte Kontrolle) und mit den HPPD-Inhibitoren Tembotrion, Diketonitril und Mesotrion für 42 Tage behandelt. Gezeigt sind die regenerierten Gewebe, behandelt mit den jeweils niedrigsten angewendeten Herbizidkonzentrationen. Bilder mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Rüdiger Hain.

Hauptsächlich finden HPPD-Inhibitoren Anwendung als Herbizide im Pflanzenschutz. Sie werden in den meisten Fällen in Kombination mit *Safenern* (z.B. Tembotrion mit dem *Safener* Isoxadifen-ethyl; Schulte und Köcher, 2009) zur Bekämpfung dikotyledoner, breitblättriger Unkräuter und einiger Gräser in Kulturen wie Mais, Reis und im Getreideanbau eingesetzt (Schmitt *et al.*, 2008; Rosinger *et al.*, 2008; Van Almsick *et al.*, 2009). Bisher ist eine selektive Nutzung dieser Herbizide nur in monokotyledonen Kulturpflanzen und häufig nur in Kombination mit einem *Safener* möglich, nicht aber in dikotyledonen Nutzpflanzen, die wirtschaftlich ebenso relevant sind, wie beispielweise Baumwolle, Raps oder Sojabohne. Um dieses Problem zu lösen, gibt es zwei Strategien. Eine zielt auf die Entwicklung neuer Substanzen, entweder auf Herbizid- oder auf *Safener*basis ab. Die zweite Lösungsstrategie liegt in der Implementierung von HPPD-Inhibitortoleranz in dikotyledone Nutzpflanzen, wodurch eine selektive Anwendung von HPPD-Inhibitoren auch in solchen Kulturen möglich wäre. Eine derartige Implementierung setzt die Kenntnis toleranzvermittelnder Gene bzw. Proteine voraus. Hierbei kann es sich im Falle der HPPD-Inhibitoren um HPPD-Proteine mit entweder natürlicherweise hohen oder künstlich durch Mutagenese erhöhten Toleranzeigenschaften handeln, wobei solche

Merkmale zunächst identifiziert und in Testsystemen hinsichtlich ihres Toleranzpotenzials evaluiert werden müssen.

1.3 Bestehende Testsysteme zur Identifizierung und Evaluierung von HPPD-Inhibitor toleranten HPPDs

Generell können die bisher bestehenden Testsysteme zur Toleranzevaluierung von potenziell toleranten HPPD-Proteinen in zwei Gruppen eingeteilt werden: in *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen.

Bei ersteren kann die Enzymaktivität in zellfreien Messsystemen quantitativ bestimmt werden, wobei entweder die Menge an verbleibendem Substrat oder gebildetem Produkt bestimmt wird. Dies kann zu verschiedenen Zeitpunkten (kontinuierlich) oder am Ende (Endpunktanalyse) einer Messung geschehen. Im Substrat-Verbrauchstest wird die zu testende HPPD zusammen mit ihrem Substrat (4-Hydroxyphenylpyruvat, s. Abb. 2) mit bzw. ohne Inhibitor inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird nach entsprechender Inkubationszeit durch Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin abgestoppt. Das Reagenz bildet mit unverbrauchtem Substrat ein bräunliches Hydrazonderivat, welches photometrisch quantifiziert werden kann (Busch *et al.*, 2009). Mit dieser Methode sind nur Endpunktmessungen möglich. Darüber hinaus ist das Hydrazonderivat instabil, was zu unpräzisen Ergebnissen führen kann. Ein weiterer *in vitro*-Test ist die Quantifizierung von gebildetem Homogentisat mittels HPLC. Im Prinzip läuft diese wie der zuvor beschriebene Test ab, jedoch mit dem Unterschied, dass dem Proteinassay zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die enzymatische Reaktion abgestoppt wird. Mittels HPLC-basierter Analyse können Homogentisat und 4-Hydroxyphenylpyruvat bestimmt werden (Garcia *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum Substrat-Verbrauchstest sind dynamische Messungen möglich und die erzielten Ergebnisse sehr präzise, allerdings ist diese Methode arbeits- und kostenintensiver. In einem dritten alternativen Evaluationssystem wird im Proteinassay die HPPD-katalysierte Reaktion an die enzymatische Reaktion einer Homogentisat-Dioxygenase (HGD) gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Homogentisat zu Maleylacetoacetat, welches seinerseits ein hohes Absorptionsvermögen bei einer Wellenlänge von 320 nm aufweist. Durch steigende Absorption bei 320 nm kann demnach indirekt die HPPD-Reaktion verfolgt und quantifiziert werden (Albert *et al.*, 2012). Eine vierte Analyse-Möglichkeit ist eine Messung des Sauerstoffverbrauchs in HPPD-



katalysierten Reaktionen mit einer Clark-Elektrode bei definiertem pH-Wert und definierter Temperatur (Garcia *et al.*, 1999). Auch diese Methode erlaubt hohe Präzision, doch die Analyse von HPPD-Proteinen im Hochdurchsatz ist schwer durchführbar.

Für alle bisher beschriebenen Methoden müssen die Gene für potenziell toleranzvermittelnde HPPDs zunächst kloniert und das entsprechende Enzym rekombinant exprimiert werden. Dies ist kosten- und zeitaufwendig und verhindert daher das Testen von *Hpd*-Genen bzw. den kodierten HPPD-Proteinen im Hochdurchsatz. Weiterhin liefern *in vitro*-Methoden ausschließlich Informationen über das Protein selbst, nicht aber über sein Toleranzpotenzial in einem lebenden Organismus, also in einer natürlichen Umgebung und, wie später in 1.4 beschrieben, korreliert eine hohe *in vitro*-Toleranz nicht zwingend proportional mit einer hohen Toleranz *in planta*.

Eine Alternative zur Analyse des Toleranzpotenzials von HPPDs ist die Untersuchung *in vivo* in *Escherichia coli*. Die Bakterien werden mit zu testenden *Hpd*-Genen transformiert und anschließend in Anwesenheit von Succinat und Tyrosin weiterkultiviert (Boudec *et al.*, 2001). Bei der HPPD-Reaktion in *E. coli*-Zellen wird das Substrat zu Homogentisat umgesetzt und dieses in das umgebende Medium freigesetzt. Oxidation des Produkts in Anwesenheit von Luftsauerstoff führt zu Chinoidderivaten, die durch spontane Polymerisation melanokrate Stoffe bilden und so eine bräunliche Färbung des Kulturmediums verursachen (Arias-Barrau *et al.*, 2004). Diese Färbung dient als Indikator für HPPD-Aktivität. Findet eine solche Färbung auch in Anwesenheit von HPPD-Inhibitoren statt, ist dies ein Hinweis auf bestehendes Toleranzpotenzial der getesteten HPPD. Die Färbereaktion der Bakterien ist nicht quantitativ, womit dieser Test zwar geeignet ist, die HPPD-Aktivität nachzuweisen, jedoch schwer einen genauen Schluss über das spätere Toleranzpotenzial der HPPD in Pflanzen zulässt.

Eine weitere Testmethode wurde von Arias-Barrau und Kollegen entwickelt, welche auf einem genetisch modifizierten *E. coli*-Stamm basiert. Dieser exprimiert Proteine, die ein Wachstum mit Tyrosin als ausschließlicher Kohlenstoff- und Energiequelle ermöglichen: die Aminosäure wird über mehrere Intermediate, unter anderem 4-Hydroxyphenylacetat und Homogentisat zu Fumarat umgesetzt, welches als Energieäquivalent in den Citratzyklus (vgl. Abb. 3) eingespeist wird (Arias Barrau *et al.*, 2004). Auf Grund der Rolle der HPPD in diesem Stoffwechselweg könnte der Stamm durch weitere Modifikationen möglicherweise als Screening-System zur Identifizierung HPPD-Inhibitor toleranter HPPD-Proteine verwendet werden.

Allerdings stellt im Vergleich zu den bisher vorgestellten *in vitro*- und *in vivo*- Testsystemen in Hinblick auf die spätere Anwendung, nämlich die Vermittlung von Herbizidtoleranz in Nutzpflanzen, die Evaluierung potenziell toleranzvermittelnder *Hpd*-Gene direkt in Nutz- oder Modellpflanzen die Methode mit höchster Vorhersagekraft dar. Durch Behandlung solcher transgener Pflanzen mit HPPD-Inhibitoren wird eine direkte Einschätzung des Toleranzpotenzials der jeweiligen HPPD im Zielorganismus möglich (Boudec *et al.*, 2001).

1.4 Das Testsystem Pflanze: Evaluierung von HPPD-Inhibitortoleranz im Zielorganismus

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Vorgehensweisen beschrieben und zum größten Teil auch angewendet, um sowohl in Nutzpflanzen, als auch in den Modellpflanzen Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und *N. tabacum* Toleranz gegenüber HPPD-Inhibitoren wie Sulcotrion oder Isoxaflutol (bzw. Diketonitril, der aktiven Substanz des Vorläufermoleküls, s. Abb. 2) durch Expression von HPPD-Proteinen zu erlangen. So wurde gezeigt, dass die Überexpression der HPPD aus Gerste (*Hordeum vulgare*, HvHPPD) in Tabak bzw. der HPPD aus *A. thaliana* (AtHPPD) in *A. thaliana* zu einer 10-fach höheren Toleranz gegenüber Sulcotrion führt (Falk *et al.*, 2003 bzw. Tsegaye *et al.*, 2002). Um das Voraufdauerherbizid Isoxaflutol, auch im Nachaufdauer, also nach dem Auskeimen der Saat, in natürlicherweise sensitiven Kulturen wie der Sojabohne einsetzen zu können, wurden verschiedene Strategien angewendet. Zum einen wurde die HPPD aus *Pseudomonas fluorescens* (PfHPPD) in Tabak, Mais und Sojabohne überexprimiert. Die daraus hervorgehenden Pflanzenlinien zeigten im Vergleich zu jeweils untransformierten Pflanzen höhere Isoxaflutoltoleranzen bei Voraufdaueranwendung: Transgene Tabaklinien wiesen eine etwa 10-fache, transgene Sojabohnen eine etwa 15-fache und transgene Maislinien eine etwa 4-fache Steigerung der Isoxaflutoltoleranz auf. Allerdings war die Toleranzerhöhung bei Verwendung dieses Herbizids im Nachaufdauer für eine Kommerzialisierung solcher Sorten nicht ausreichend (Matringe *et al.*, 2005; Green, 2012). Daher wurden die Toleranzeigenschaften der verwendeten PfHPPD optimiert: anhand der 3D-Kristallstruktur (Serre *et al.*, 1999) mit Diketonitril im katalytischen Zentrum wurden Mutanten entworfen und anschließend mittels gerichteter Mutagenese generiert. Auf diesem Weg wurde die Enzymvariante PfHPPD-G336W (Position der mutierten Aminosäure bezieht sich auf die Proteinsequenz der PfHPPD aus Busch *et al.*, 2009, Angabe der Aminosäuren im Ein-